

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



DÉSARROLLO Y VALIDACIÓN DE NUEVOS
MÉTODOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE
SÓLIDA PARA ANÁLISIS MEDIOAMBIENTAL

NECHAR, MOUNIR

CURSO 96-97



Biblioteca Universitaria de Granada



01090441

TESIS DOCTORAL

MOUNIR NECHAR
Granada, 1997

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

~~T. Prov 16/88~~
T 8/46



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 23-5-97
ENTRADA NUM. 1660

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS
DE ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA PARA
ANÁLISIS MEDIOAMBIENTAL**

TESIS DOCTORAL

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613382494
N.º Copia 615955552

**Mounir Nechar
Granada, 1997**



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE NUEVOS MÉTODOS
DE ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA PARA
ANÁLISIS MEDIOAMBIENTAL**

por
Mounir Nechar

**Departamento de Química Analítica
Universidad de Granada**

Visado en Granada, Junio de 1997.

**Fdo.- Dr^a. M^a Francisca Molina
Molina y Dr. Juan Manuel Bosque
Sendra, Profesores Titulares
del Departamento de Química
Analítica de la Universidad
de Granada.**

Fdo.- Mounir Nechar

MEMORIA PRESENTADA PARA ASPIRAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

**A la memoria de mi padre,
"que en paz descansa".**

**A mi madre, a mis hermanos,
cuñados y sobrinos.**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los directores del trabajo, Dra. María Francisca Molina Molina y Dr. Juan Manuel Bosque Sendra, por su ayuda, dedicación y orientación, durante la elaboración de la presente Memoria.

Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada y a todos sus miembros, Profesores y Doctorandos, porque me han hecho sentir como en mi propia casa.

A la Dra. María Del Carmen Valencia Mirón, Dr. José Molina Molina, Dra. María Gracia Bagur González, Dr. Luis Cuadros Rodríguez, Dra. Ana María García Campaña, Dr. Reduán Bergmi, Dr. Jamal Rohand y Dr. Said Boudra.

Con especial mención a Loli, por su apoyo y comprensión del día a día.

Sería injusto no citar a mis tíos y a sus hijos, así como a Abdúl e Younes.

A mis amigos de Tetuán y en especial a los del V.C.A.

A Ramón, Roque, Paco, Antonio y M^a Del Mar por comprender la influencia de la investigación sobre mis "cambios de humor".

Hay otras muchas personas que durante todos estos años me han mostrado su cariño y afecto; con todos ellos quiero también compartir este trabajo.

Por último, al I.C.M.A por la concesión de una beca para la realización de la Tesis Doctoral.

ÍNDICE

ÍNDICE

OBJETO DE LA TESIS	1
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I	
DISOLUCIONES, INSTRUMENTACIÓN Y SOPORTES UTILIZADOS	63
1.- DISOLUCIONES UTILIZADAS	65
1.1.- Disoluciones patrón	65
1.2.- Disoluciones de reactivos	66
1.3.- Disoluciones reguladoras	67
1.4.- Disoluciones para el estudio de las interferencias y/o enmascaramiento	68
2.- SOPORTES SÓLIDOS EMPLEADOS	69
2.1.- Polímeros de estireno	70
2.2.- Polímeros de dextrano	71
3.- OTROS PRODUCTOS QUÍMICOS	72
4.- INSTRUMENTACIÓN	73
5.- ORDENADORES Y PROGRAMAS EMPLEADOS	73
6.- MATERIAL DEL LABORATORIO	75
7.- PROCEDIMIENTO OPERATORIO	75
7.1.- Obtención y fijación del derivado coloreado del analito	75
7.2.- Medida de la absorbancia en fase sólida	76

8.- IDENTIFICACIÓN DE COMPLEJOS SÓLIDOS	78
---	----

BIBLIOGRAFÍA	80
--------------------	----

CAPÍTULO II

OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	81
--	-----------

1.- DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES	84
---	----

1.1.- Clasificación de los métodos de optimización	84
--	----

1.1.1.- Métodos de tipo Caja Negra (Secuencial)	85
---	----

1.1.2.- Métodos de tipo Analítico (Simultáneo)	85
--	----

1.2.- Diseño experimental	85
---------------------------------	----

1.2.1.- ¿Qué es un diseño experimental?	85
---	----

1.2.2.- Principios básicos	86
----------------------------------	----

1.2.3.- Directrices de un diseño experimental	87
---	----

1.4.- Metodología de la superficie de respuesta	88
---	----

1.4.1.- Modelos de primer orden	90
---------------------------------------	----

a.- Diseño Simplex	90
--------------------------	----

b.- Diseño Factorial 2^k	91
----------------------------------	----

c.- Diseños Factoriales Fraccionados a dos niveles	93
--	----

d.- Método EVOP	94
-----------------------	----

1.4.2.- Modelos de segundo orden	96
--	----

a.- Diseño Factorial 3^k	96
----------------------------------	----

b.- Diseño Compuesto Central	98
------------------------------------	----

c.- Método de Box-Wilson	100
--------------------------------	-----

d.- Diseño de Box-Behnken	100
---------------------------------	-----

e.- Diseño Doehlert	100
---------------------------	-----

1.5.- Optimización de variables en Espectrofotometría en Fase Sólida	103
--	-----

- Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas	106
--	-----

- Comprobación del modelo de segundo orden	106
--	-----

- Análisis de la varianza	107
---------------------------------	-----

- Estimación de los coeficientes del modelo de segundo orden	108
--	-----

- Estudio de la superficie de respuesta estimada	109
--	-----

- Obtención de los valores óptimos	109
--	-----

2.- VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS	112
---	-----

2.1.- Rechazo de valores anómalos	113
---	-----

2.2.- Calibración lineal univariante	114
--	-----

Índice

2.2.1.- El modelo de regresión lineal univariante	114
2.2.2.- Comprobación del modelo establecido	115
2.2.3.- Comprobación del ajuste de los datos experimentales al modelo lineal	115
a.- Evaluación del "fallo de ajuste" (cuando existen réplicas)	116
b.- Evaluación de la linealidad cuando no existen réplicas	117
- Coeficiente de variación de los factores de respuesta	117
- Regresión por mínima mediana de cuadrados	117
2.2.4.- Estimación de los parámetros de regresión	119
a.- Desviación estándar de regresión (o de residuales)	120
b.- Desviación estándar de la pendiente	120
c.- Desviación estándar del término independiente	121
d.- Intervalos de confianza para la pendiente y el término independiente	121
e.- El coeficiente de correlación lineal	121
f.- El coeficiente de determinación	122
2.2.5.- Cálculo de la desviación estándar de la señal y de la concentración	122
a.- Desviación estándar de la señal	122
b.- Desviación estándar de la concentración	123
2.2.6.- Comparación de pendientes de dos rectas de calibrado	124
2.3.- Estimación de los parámetros de fiabilidad	125
2.3.1.- Linealidad	125
2.3.2.- Sensibilidad	126
2.3.3.- Límite de detección	127
2.3.4.- Límite de cuantificación	130
2.3.5.- Rango dinámico lineal	130
2.3.6.- Precisión	131
2.3.7.- Robustez	132
2.3.8.- Selectividad	134
2.4.- Comprobación de la veracidad de un método analítico	135
2.4.1.- Utilización de muestras sintéticas	136
2.4.2.- Utilización de métodos de referencia	138
a.- Comparación de las medias de dos conjuntos de resultados independientes entre sí	138
b.- Comparación de dos conjuntos de resultados. Aplicación de la regresión lineal	140
2.4.3.- Utilización de la metodología de adición de patrón	141

BIBLIOGRAFÍA	145
--------------------	-----

CAPÍTULO III

DETERMINACIÓN DE SULFITO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA

EN FASE SÓLIDA	149
-----------------------------	------------

1.- ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN FASE SÓLIDA	152
---	-----

2.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE CONDICIONAN LA FORMACIÓN DEL ÁCIDO p-ROSANILINMETILSULFÓNICO EN EL CAMBIADOR	153
--	-----

2.1.- Influencia de la concentración de la disolución reguladora	153
--	-----

2.2.- Influencia de volumen de formaldehído	155
---	-----

2.3.- Influencia de volumen de p-rosanilina	156
---	-----

2.4.- Influencia del tiempo de agitación	158
--	-----

2.5.- Estabilidad de las disoluciones de trabajo de sulfito	159
---	-----

2.6.- Resumen de las variables optimizadas	162
--	-----

3.- ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO ANALÍTICO	163
--	-----

3.1.- Calibrado del método. Parámetros de fiabilidad	163
--	-----

- Linealidad	165
--------------------	-----

- Sensibilidad	166
----------------------	-----

- Límite de detección	167
-----------------------------	-----

- Límite de cuantificación	168
----------------------------------	-----

- Rango dinámico lineal	169
-------------------------------	-----

- Precisión	169
-------------------	-----

- Comparación de los parámetros obtenidos para las dos resinas	170
--	-----

3.2.- Procedimiento operatorio propuesto	172
--	-----

3.3.- Selectividad	172
--------------------------	-----

4.- DISTRIBUCIÓN DEL ANALITO ENTRE LA FASE SÓLIDA Y LA DISOLUCIÓN ACUOSA	176
---	-----

5.- APLICACIONES ANALÍTICAS	177
-----------------------------------	-----

5.1.- Análisis de sulfito en agua de lluvia	178
---	-----

5.1.1.- Ensayos en agua de lluvia simulada	178
--	-----

5.1.1.1.- Preparación del agua de lluvia simulada	178
---	-----

5.1.1.2.- Influencia del volumen de agua de lluvia simulada sobre el calibrado	178
---	-----

5.1.1.3.- Estudios de recuperación en agua de lluvia simulada	185
5.1.1.4.- Estabilidad del sulfito en agua de lluvia simulada	186
* Estabilidad del sulfito bajo refrigeración	186
* Estabilidad del sulfito "en condiciones de muestreo"	187
* Influencia de la presencia de metales en la estabilidad	189
* Conclusiones del estudio	190
5.1.1.5.- Comparación del método propuesto (EFS) con el método en disolución	191
5.1.2.- Análisis de sulfito en agua de lluvia real	193
5.1.2.1.- Recogida de las muestras de agua de lluvia real	193
5.1.2.2.- Determinación de metales en agua de lluvia real.	194
5.1.2.3.- Características del agua de lluvia recogida	194
5.1.2.4.- Determinación de sulfito por el método de adición de patrón	197
5.2.- Análisis de sulfito en agua mineral	197
5.2.1.- Calibrado de adición de patrón	198
5.2.2.- Estudio de recuperación	199
BIBLIOGRAFÍA	201
CAPÍTULO IV	
DETERMINACIÓN DE CINCO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA	
EN FASE SÓLIDA	203
1.- ESTUDIOS PRELIMINARES	206
1.1.- Ensayos de fijación	206
1.2.- Influencia de los haluros en el sistema	209
1.3.- Espectros de absorción en disolución y en fase sólida	212
1.3.1.- Espectros en ausencia de yoduro potásico	212
1.3.2.- Espectros en presencia de yoduro potásico	215
2.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE CONDICIONAN LA FORMACIÓN Y LA FIJACIÓN DEL COMPLEJO	217
2.1.- Optimización univariante de las condiciones experimentales	217
2.1.1.- Concentración de KI	217
2.1.2.- Influencia del pH	217
2.1.3.- Concentración de la disolución reguladora	220

2.1.4.- Influencia del orden de adición	220
2.1.5.- Estabilidad de las disoluciones de reactivo	221
2.1.6.- Influencia de la concentración de reactivo	222
2.1.7.- Influencia del tiempo de agitación	223
2.1.8.- Influencia de la cantidad de soporte sólido	225
2.1.9.- Estabilidad del complejo fijado en el cambiador	226
2.2.- Optimización de PAR y KI utilizando los diseños de DOEHLERT	227
2.2.1.- Diseño I	227
2.2.2.- Diseño II	233
2.2.3.- Diseño III	237
* Variación de la concentración de PAR a $[KI] = cte$	241
* Variación de la concentración de KI a $[PAR] = cte$	242
2.3.- Influencia de la concentración de KI sobre la repetibilidad y el calibrado	244
2.3.1.- Influencia de la concentración de KI sobre la repetibilidad	244
2.3.2.- Influencia de la concentración de KI sobre el calibrado	245
2.4.- Valoración de las optimizaciones	248
2.5.- Resumen de las variables optimizadas	248
3.- ESTABLECIMIENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	249
3.1.- Método para 100 mL	249
3.1.1.- Calibrado del método. Parámetros de fiabilidad	249
3.1.2.- Procedimiento operatorio propuesto	255
3.2.- Método para 500 mL	256
3.2.1.- Optimización de PAR y KI utilizando los diseños de DOEHLERT	256
- Diseño I	256
- Diseño II	260
* Variación de la concentración de PAR a $[KI] = cte$	264
* Variación de la concentración de KI a $[PAR] = cte$	266
3.2.2.- Influencia del tiempo de agitación	266
3.2.3.- Estabilidad del complejo fijado en el cambiador	268
3.2.4.- Resumen de las variables optimizadas	269
3.2.5.- Calibrado del método. Parámetros de fiabilidad	269
3.2.6.- Procedimiento operatorio propuesto	274
3.2.7.- Robustez	276
3.2.8.- Comparación de los métodos propuestos	281
3.3.- Selectividad	283
3.3.1.- Estudio de las interferencias	283
3.3.2.- Selección de agentes enmascarantes	284
3.3.3.- Efecto del ión tartrato sobre el calibrado	287

3.3.4.- Enmascaramiento con tartrato: Análisis de muestras sintéticas	288
4.- DISTRIBUCIÓN DEL ANALITO ENTRE LA FASE SÓLIDA Y LA DISOLUCIÓN ACUOSA	291
4.1.- Método de 100 mL	291
4.2.- Método de 500 mL	292
5.- APLICACIONES ANALÍTICAS	294
5.1.- Análisis de cinc en muestras de agua	294
5.1.1.- Agua destilada	294
5.1.2.- Agua mineral	299
5.2.- Análisis de cinc en una muestra de leche	303
5.2.1.- Determinación de cinc por el método propuesto	304
5.2.2.- Determinación de cinc por el método de referencia	307
BIBLIOGRAFÍA	310
CAPÍTULO V	
DETERMINACIÓN DE CADMIO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA	
	311
1.- ESTUDIOS PRELIMINARES	314
1.1.- Ensayos de fijación	314
1.2.- Espectros de absorción en disolución y en fase sólida en presencia de KI	314
2.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE CONDICIONAN LA FORMACIÓN Y LA FIJACIÓN DEL COMPLEJO	317
2.1.- Influencia del orden de adición	317
2.2.- Influencia del pH	318
2.3.- Concentración de la disolución reguladora	319
2.4.- Optimización de KI y PAR utilizando los diseños de DOEHLERT	320
- Diseño I	320
- Diseño II	325
* Variación de la concentración de PAR a $[KI] = cte$	329
* Variación de la concentración de KI a $[PAR] = cte$	330
2.5.- Estabilidad del complejo fijado en el cambiador	332
2.6.- Influencia de la fuerza iónica	332

2.7.- Influencia del tiempo de agitación	334
2.8.- Resumen de las variables optimizadas	335
3.- ESTABLECIMIENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	336
3.1.- Método para 100 mL	336
3.1.1.- Calibrado del método. Parámetros de fiabilidad	336
3.1.2.- Procedimiento operatorio propuesto	342
3.2.- Método para 500 mL	343
3.2.1.- Optimización de KI y PAR utilizando los diseños de DOEHLERT	343
- Diseño I	343
- Diseño II	347
* Variación de la concentración de PAR a [KI] = cte	351
* Variación de la concentración de KI a [PAR] = cte	353
3.2.2.- Influencia del tiempo de agitación	354
3.2.3.- Estabilidad del complejo fijado en el cambiador	355
3.2.4.- Resumen de las variables optimizadas	355
3.2.5.- Calibrado del método. Parámetros de fiabilidad	356
3.2.6.- Procedimiento operatorio propuesto	361
3.2.7.- Robustez	362
3.2.8.- Comparación con otros métodos	366
3.3.- Selectividad	368
3.3.1.- Estudio de las interferencias	368
3.3.2.- Selección de agentes enmascarantes	369
3.3.3.- Ensayos de enmascaramiento	372
4.- DISTRIBUCIÓN DEL ANALITO ENTRE LA FASE SÓLIDA Y LA DISOLUCIÓN ACUOSA	376
5.- FACTORES QUE MODIFICAN LA SENSIBILIDAD	378
5.1.- Volumen de muestra	378
5.2.- Cantidad de soporte sólido	379
6.- APLICACIONES ANALÍTICAS	383
6.1.- Muestra 1	383
6.2.- Muestra 2	385
BIBLIOGRAFÍA	391

CAPÍTULO VI

DETERMINACIÓN DE CINCO Y CADMIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA

EN FASE SÓLIDA	393
1.- OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES QUÍMICAS QUE AFECTAN LA FIJACIÓN SIMULTÁNEA DE CINCO Y CADMIO	396
1.1.- Variables químicas que afectan la fijación simultánea de cinc y cadmio	396
1.2.- Concentraciones de PAR y KI	396
1.2.1.- Concentración de PAR	397
1.2.2.- Concentración de KI	397
2.- DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CINCO Y CADMIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA EN FASE SÓLIDA	399
2.1.- Obtención de los espectros derivados	400
2.2.- Selección de las condiciones instrumentales óptimas para la determinación de mezclas de complejos de cinc y cadmio por espectrofotometría derivada en fase sólida	401
2.2.1.- Influencia de la velocidad de barrido	402
2.2.2.- Elección del factor de filtrado en la obtención de los espectros derivados	402
2.2.3.- Influencia del incremento de la longitud de onda	403
2.3.- Selección de la longitud de onda de medida	404
3.- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL SISTEMA. PARÁMETROS DE FIABILIDAD DEL MÉTODO	406
3.1.- Rectas de calibrado para los complejos de cadmio y cinc	406
3.1.1.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer	406
3.1.2.- Rectas de calibrado para cadmio en presencia de concentraciones constantes de cinc	412
3.1.3.- Rectas de calibrado para cinc en presencia de concentraciones constantes de cadmio	413
3.1.4.- Comparación de las pendientes de las distintas rectas obtenidas	415
3.2.- Parámetros de fiabilidad	415
- Linealidad	415
- Sensibilidad	415
- Límite de detección	416
- Límite de cuantificación	417
- Rango dinámico lineal	417

- Precisión	417
- Selectividad	419
3.3.- Procedimiento operatorio propuesto	421
4.- DETERMINACIÓN DE CADMIO Y CINC EN MEZCLAS BINARIAS	422
5.- DETERMINACIÓN DE CADMIO Y CINC EN UN AGUA MINERAL	423
5.1.- Calibrado de adición de patrón	423
5.2.- Calibrado de Youden	423
5.3.- Comprobación de la veracidad del método	424
5.4.- Contenido analítico de cadmio en la muestra	426
5.5.- Contenido analítico de cinc en la muestra	427
BIBLIOGRAFÍA	429
CAPÍTULO VII	
CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS IMPLICADOS EN LA	
DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE Zn(II) Y Cd(II) CON PAR	431
1.- ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN EL VISIBLE DEL LIGANDO Y DE LOS	
COMPLEJOS FIJADOS EN EL SEPHADEX	434
1.1.- Espectros de absorción del ligando	434
1.2.- Espectros de absorción de los complejos	436
2.- ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO Zn-PAR	437
2.1.- Método de Holme-Langmyhr	437
2.2.- Método de Bent-French	445
3.- CÁLCULO DEL NÚMERO DE PROTONES LIBERADOS EN EL PROCESO	448
4.- ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO Cd-PAR	451
5.- SÍNTESIS Y ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS SÓLIDOS	455
5.1.- Síntesis de los complejos sólidos	455
5.1.1.- Complejo sólido Zn-PAR	455
5.1.2.- Complejo sólido Cd-PAR	455
5.2.- Análisis térmico	456
5.3.- Medidas de conductancia eléctrica	459

Índice

5.4.- Espectros de absorción en el visible	459
5.5.- Espectros infrarrojos	461
6.- ESPECTROS IR DE LOS COMPLEJOS Y DEL LIGANDO FIJADOS EN EL SEPHADEX	462
7.- CÁLCULOS DE ORBITALES MOLECULARES Y CONCLUSIONES DEL ESTUDIO . .	465
BIBLIOGRAFÍA	471
APÉNDICE	473
CONCLUSIONES	493

OBJETO DE LA TESIS

OBJETO DE LA TESIS.

La presente Memoria se enmarca dentro de la línea de trabajo que viene desarrollando el grupo de investigación "Espectrometría en fase sólida" del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, desde hace varios años. Los objetivos planteados en esta Tesis son los siguientes:

1.- Estudio de nuevas aplicaciones de la Espectrofotometría en fase sólida (EFS) en un campo de gran interés en la actualidad como es el análisis medioambiental. Para ello, se abordarán los siguientes aspectos:

- Determinación de sulfito con p-rosanilina y formaldehído, en medio ácido, por ser uno de los agentes responsable de la lluvia ácida.
- Determinación de cinc y cadmio utilizando 4-(2-piridilazo)resorcinol, elementos traza de importancia en el análisis de aguas naturales.

2.- Utilización, y desarrollo en los casos necesarios, de técnicas quimiométricas en la optimización de variables experimentales de la EFS y en la validación de los métodos que se propongan.

3.- Evaluación de la Espectrofotometría derivada en fase sólida como herramienta para la resolución de mezclas de iones metálicos.

4.- Estudio de las reacciones químicas involucradas en los sistemas analíticos. En este sentido, se procederá a la síntesis e identificación de los complejos que forman los iones Zn(II) y Cd(II) con 4-(2-piridilazo)resorcinol.

INTRODUCCIÓN

Dos de las características de la **Química Analítica** actual son, sin duda, su versatilidad, para poder afrontar las necesidades en continuo cambio del mundo moderno, y la gran diversidad de su objeto. Así, la Química Analítica se ha introducido con fuerza en campos en otro tiempo ignorados, sin por ello ceder terreno en los que tradicionalmente ha desarrollado.

El papel de la Química Analítica en la industria moderna es de inestimable importancia, pues se extiende, no sólo al análisis de los materiales y al control analítico de la producción, sino a la búsqueda de fuentes alternativas de energía y a la mejora de los productos y procesos existentes, introduciendo cada vez mayor grado de automatización.

La investigación experimental tanto de las ciencias físicas como biológicas depende, en buena parte, de medidas analíticas. La diagnosis médica tiene su base fundamental en análisis clínicos y los análisis forenses y criminológicos precisan, cada

día en mayor grado, del concurso de la Química Analítica. La clasificación de un mineral es incompleta sin el conocimiento de su composición química y las técnicas analíticas son indispensables en el estudio bioquímico de la materia viva y sus procesos metabólicos.

Mención especial merece la **Química Analítica del medio ambiente**, pues el deseo de la sociedad, en general, de poner a disposición de sus miembros una mayor cantidad y variedad de bienes de consumo, energía y movilidad entre ellos, está en conflicto con el mantenimiento de un medio ambiente saludable.

La degradación del medio ambiente -con la consiguiente amenaza para la salud y los ecosistemas- no es un fenómeno nuevo: las modificaciones del ambiente provocadas por el ser humano se han hecho notar desde muy antiguo. Sin embargo, en el momento actual los problemas se han acentuado, y, como consecuencia de ello, ha surgido una conciencia en la sociedad de lo importante que es mantener la calidad del medio ambiente, aún a costa de ciertos sacrificios.

Para que las estrategias que se desarrollen para proteger el ambiente sean eficaces, es necesario tener un conocimiento y una comprensión del problema suficientes. Es en esta investigación, donde los químicos, y en especial los químicos analíticos, deben jugar un papel fundamental. El de controlar las características del aire, de las aguas superficiales y marinas, de los vertidos industriales del más variado tipo, etc ..., a fin de adoptar las medidas de acción oportunas. Frecuentemente es necesario realizar los análisis a niveles macro y micro y con elevadas metas de sensibilidad, selectividad, exactitud y precisión. Además se debe considerar la selección de las muestras y el tratamiento de los resultados, estadísticamente, y se exigen otros requisitos como la rapidez, economía de costo, de tiempo y de esfuerzo, automatización, etc ... Para ello, son necesarios técnicas, métodos y procedimientos que sean sensibles y selectivos y dentro de lo posible sencillos, y baratos. Precisamente, en este campo se encuadran las aplicaciones de la **Espectrofotometría en fase sólida** desarrolladas en la Presente Memoria Doctoral.

Para afrontar estos retos, la Química Analítica ha integrado los conocimientos y recursos de las diversas ramas de la Ciencia y de la Ingeniería poniendo en juego un tratamiento interdisciplinario.

Hoy en día, el número de herramientas que usa el químico analítico es tan elevado que, como indica Mottola [1], ha producido especialistas en técnicas (por ejemplo, en cromatografía, en espectroscopía, en electroanálisis) e incluso, especialistas especializados (en cromatografía de gases o de líquidos, en espectroscopía molecular o atómica, etc ...). Sin embargo, esta situación, que describe perfectamente la actual, debe ser capaz de incorporar el trabajo en equipo para tener la flexibilidad y versatilidad, citadas anteriormente, necesarias a la Química Analítica actual.

El carácter multidisciplinario de la Química Analítica ha llevado a Zolotov [2] a proponer un nuevo nombre para esta disciplina, el de "ciencias analíticas", por analogía con el de "ciencias de la vida" o "ciencias de la tierra". Para este autor, la Química Analítica es ahora algo más que estrictamente una parte de la Química.

Las relaciones multidisciplinarias definen, según Mottola [1], la Química Analítica "aplicada", mientras que las relaciones con las otras ramas de la Química, definen la llamada "fundamental". Estas dos vertientes no son independientes entre sí, y su desarrollo obedece a una relación simbiótica entre ellas.

La Química Analítica, pobremente adjetivada de aplicada, está en constante renovación al poner su énfasis en el desarrollo de los métodos y las técnicas a utilizar por el Análisis Químico. En claro contraste, la Química Analítica fundamental se ocupa de los estudios teóricos, y puede parecer que tiene más en común con la Física aplicada, la Química Física, o las Matemáticas; puede, sin embargo, reconocerse por su dedicación a los problemas analíticos.

La investigación en este área de conocimiento debe, por tanto, lograr el desarrollo riguroso e interdependiente de sus dos vertientes, uniendo además un aspecto importante: el componente creativo.

El crear nuevas técnicas y métodos y el desarrollar y mejorar las ya existentes, son, por tanto, cometidos importantes de la investigación en Química Analítica. En este sentido, el objetivo de la presente Tesis, desarrollar y mejorar algunos aspectos de la metodología de la Espectrometría en fase sólida, para el análisis de especies de interés medioambiental, está plenamente justificado.

Es necesario, por último, dedicar unas palabras a la importancia de la Química Analítica en la era de la información.

Entendiendo la Química Analítica como una metodología de investigación de una ciencia experimental que estudia la materia y los fenómenos naturales, se puede comprender que es una gran fuente de información [3] y por tanto es lógico que intente aprovecharse del desarrollo de nuevos sistemas de obtención y tratamiento de la información, con el fin de utilizarlos para una mejora en la elaboración y gestión de su propia información [4].

Así, desde hace una serie de años se ha planteado con carácter prioritario la mejora de la calidad de los resultados analíticos, tanto desde el punto de vista de mejorar los métodos y procedimientos utilizados para conseguir resultados con calidad contrastada con el fin de obtener la máxima información posible de ellos [5].

Para la obtención de calidad en el proceso de medida químico, en la actualidad, es imprescindible la adecuada utilización de un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que se han agrupado bajo el nombre de "**Quimiometría**".

Aunque previamente, en los años 40 y 50, Youden ya había realizado análisis de datos utilizando técnicas estadísticas y había publicado libros sobre control de calidad, fue en la década de los 70 cuando, de forma más continua, algunos grupos de investigación introdujeron el uso de la matemática aplicada y los métodos estadísticos clásicos para el tratamiento de los datos analíticos, al mismo tiempo que propusieron y desarrollaron modelos específicos para el análisis de los mismos, lo que permitió mejorar la información obtenida de las medidas químicas.

El término "Quimiometría" es atribuido al químico sueco S. Wold [6] que en una petición de una beca, en 1974, realizó una justificación de la aplicación de modelos matemáticos y procedimientos estadísticos a los datos químicos con el fin de extraer la máxima información de ellos [7].

Sin embargo, los objetivos a conseguir con la Quimiometría se establecieron en 1975 cuando S. Wold y B.R. Kowalski crearon la Sociedad Internacional de Quimiometría (International Chemometrics Society). Estos objetivos se pueden resumir de la siguiente manera [8]:

- Permitir un mejor tratamiento de los datos recogidos por los analistas, así como extraerles la máxima información posible.
- Aumentar la calidad de las medidas químicas mejorando las condiciones de su recogida.

La Quimiometría, como señala Brereton [6], es una disciplina aún muy joven que está en pleno desarrollo como lo demuestra el elevado número de trabajos y libros que se publican actualmente (en los dos últimos *Fundamental Reviews of Chemometrics* publicados [9], [10], el número de citas bibliográficas utilizadas han sido del orden de 20.000 y 25.000 respectivamente); el creciente número de revisiones científicas publicadas; la existencia de congresos internacionales plenamente establecidos, como el "Chemometrics in Analytical Chemistry"; el alto nivel alcanzado por las dos revistas internacionales más antiguas dedicadas al tema, "Journal of Chemometrics" y "Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems"; así como la aparición de dos nuevas revistas "Journal of Chemistry Information and Computer Sciences" y "Accreditation and Quality Assurance", esta última sobre aspectos relacionados con la quimiometría.

Podemos destacar la importancia de la Quimiometría y de su relación con la Química Analítica recogiendo, sin ánimo de ser exhaustivos, algunos de los temas y problemas que pueden ser resueltos con la aplicación de los métodos y procedimientos quimiométricos sobre los datos químicos.

Uno de los primeros problemas con que se enfrenta el químico analítico es la toma de muestra. Los métodos estadísticos pueden ayudar a planificar el plan de muestreo así como a interpretar en su justa medida los datos obtenidos [11], [12].

La elección [13] y optimización de variables analíticas e instrumentales [14], [15], constituye el siguiente paso para conseguir la mejor respuesta del sistema con el menor número de medidas posibles y la mayor confianza en la bondad de los datos obtenidos.

El procesado de señales instrumentales [16], entendiendo por tal, cualquier tipo de transformación de las señales o de los propios datos una vez obtenidos, que permitan facilitar o mejorar el acceso a la información analítica que esta contenida en dichas señales [17].

Los complejos problemas (medioambientales, bioquímicos, médicos, etc) que se presentan en la actualidad obligan a la búsqueda de la máxima información con el menor costo y tiempo de análisis posible, por lo que la modelización del problema y una adecuada calibración [18], [19] pueden permitir la obtención de los mejores resultados en el laboratorio de análisis químico.

Por último, el análisis multicomponente [20], [21], la clasificación y reconocimiento de modelos y la relación estructura/actividad son problemas actuales que la Quimiometría contribuye a su resolución a través del procesado y tratamiento de los datos instrumentales [22], [23].

Para terminar esta sucinta visión sobre la Quimiometría, cumplidos 20 años desde su nacimiento "oficial", podemos recoger tres opiniones sobre el pasado, presente y futuro de la misma.

Brown [24] considera a la Quimiometría como un campo multidisciplinar, situada entre la química y la estadística aplicada, que permite extraer información de los datos químicos mediante métodos matemáticos y estadísticos. Se diferencia de la Química Analítica por el hecho que los métodos quimiométricos permiten obtener mayor información que la correspondiente a la cualidad o cantidad de las especies en las muestras. A su vez se diferencia de la Estadística ya que la Quimiometría se dirige más sobre los aspectos sistemáticos que sobre los aspectos aleatorios de los datos. En base a la gran utilidad que esta disciplina ha demostrado en el campo de la Química Analítica, este autor, recomienda una labor de difusión de la misma, empezando por el campo educativo, a fin de que los alumnos, de todos los niveles, empiecen a conocer los métodos quimiométricos, desde los más sencillos y rutinarios aplicables a los sistemas univariantes, hasta los más complejos aplicables a problemas como la clasificación y reconocimiento de modelos.

Cela [25], hace una reflexión acerca de esta disciplina tanto sobre la enorme ayuda que ha aportado al investigador en distintas áreas de trabajo, así como

el futuro inmediato basándose sobre la enorme evolución de las publicaciones, libros de texto y programas. Dicho autor señala también la intensa y profunda relación que existe entre la Quimiometría y la Química Analítica, por lo que en su opinión, la Quimiometría debería enseñarse no como algo especial sino como parte integrante de la Química Analítica. Así, la Quimiometría, en sus distintos aspectos, debe considerarse como una herramienta necesaria en cada una de las etapas del proceso analítico, por lo que su enseñanza progresiva puede resultar de gran utilidad para un adecuado aprendizaje de la Química Analítica.

En forma similar opina Wold [7], aunque señalando que los químicos deben dar prioridad al problema químico y utilizar la Quimiometría como la herramienta que proporciona la ayuda para conseguir la mejor información posible y no adaptar el problema químico a la herramienta estadística.

1.- ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA

Yoshimura, Waki y Ohashi propusieron en 1976 [26] una nueva metodología espectrofotométrica para el análisis de trazas de iones metálicos, que ha dado lugar a la Espectrofotometría en fase sólida (EFS), desarrollada en gran medida por nuestro grupo de investigación en los últimos años.

La EFS consiste, básicamente, en la preconcentración selectiva del analito (o bien de un derivado apropiado de éste) en un cambiador iónico o en un adsorbente, seguida de la medida directa de la absorbancia en fase sólida.

Los métodos analíticos basados en dicha metodología [27], [28] presentan, por lo general, las siguientes ventajas:

a).- elevada sensibilidad, ya que la medida se realiza sobre el propio soporte con el analito preconcentrado, con lo que se incrementa la sensibilidad en uno o varios órdenes de magnitud con respecto a los métodos espectrofotométricos tradicionales.

b).- selectividad alta, puesto que las especies interferentes pueden ser excluidas del soporte en condiciones adecuadas.

c).- bajo costo, pues las determinaciones pueden realizarse con instrumentos convencionales e instalaciones habituales en cualquier laboratorio analítico.

d).- posibilidad de crear métodos a "medida" seleccionando el volumen de muestra y/o la cantidad de fase sólida en función de la concentración de analito, sensibilidad necesaria y condiciones de trabajo.

Procedimientos para el desarrollo del color en la fase sólida

Podemos distinguir diferentes formas de desarrollar el color en el soporte sólido, que dependerán, fundamentalmente, de la naturaleza del analito y de los restantes componentes de la muestra, de la necesidad o no de obtener un derivado coloreado de la especie que se determina y de la selectividad de dicha reacción.

El caso más simple lo tenemos en la determinación de una especie coloreada, que presente una fijación selectiva sobre el soporte seleccionado, bien por intercambio iónico [29] o bien por adsorción [30], si dicha especie no es iónica. Bastará agitar la disolución problema con una pequeña cantidad de soporte para conseguir la preconcentración. Esta situación se puede hacer extensiva en algunos casos a compuestos no coloreados pero que absorben en el ultravioleta, empleando un soporte suficientemente traslúcido [31], [32], [33].

Si el analito no es coloreado se obtiene un derivado que si lo sea, por reacción con un compuesto cromogénico. Este es el procedimiento más empleado en la determinación de cationes y aniones tanto orgánicos como inorgánicos, habiéndose desarrollado una gran variedad de reacciones para ello: de complejación [34], de oxidación reducción [35], de diazotación [36], catalítica [37], etc.

La forma operatoria consiste en poner en contacto la muestra con el reactivo cromogénico y con el soporte, adicionando los tres componentes en una botella de tamaño adecuado y agitando el tiempo necesario. Factores tales como concentración

del reactivo, pH, fuerza iónica, tiempo de agitación etc. habrán de ser optimizados para conseguir una fijación reproducible, y lo más cuantitativa posible. La adición de enmascarantes puede ser necesaria en algunos sistemas, de forma similar a como ocurre en los métodos espectrofotométricos convencionales, para aumentar la selectividad.

A veces se recurre a la fijación previa del analito en el soporte sólido desde la disolución muestra seguida de la adición del agente cromogénico. Este procedimiento puede aplicarse cuando el reactivo posee una selectividad baja por el analito. Es el caso de las determinaciones de cadmio con PAR y de cinc con Zincón llevadas a cabo por Yoshimura [38], [39]. El ión metálico se retiene en una resina de cambio aniónico, como iodo o clorocomplejo y posteriormente se transforma en el complejo coloreado tras la adición de los reactivos correspondientes. No obstante, este procedimiento ofrece el inconveniente de requerir dos equilibraciones sucesivas en su ejecución.

En otras ocasiones se ha prefijado el reactivo cromogénico en el soporte, obteniéndose soportes quelatantes como resinas o celulosas modificadas. Pero esta forma de operar tiene su aplicación, sobre todo en preconcentración selectiva de iones [40].

Una gran ventaja de la EFS respecto a la espectrofotometría convencional radica en el notable incremento de sensibilidad que ofrece, pues la misma es función del volumen de muestra a analizar y de la cantidad de cambiador utilizado. Así, utilizando volúmenes de muestra de 1 L, de frecuente empleo en EFS, se pueden alcanzar coeficientes de absortividad molar aparente del orden de 10^8 L/mol.cm [41], lo que supone sensibilidades del orden de 10^3 - 10^4 veces mayores que las obtenidas en espectrofotometría convencional, pudiendo cuantificarse concentraciones de analito inferiores a 0'1 ng/mL. Se ofrece así la posibilidad de determinar elementos traza mediante espectrofotometría UV-Visible sin necesidad de una preconcentración del analito, tal y como se requiere, normalmente, en la espectrofotometría convencional.

Espectrofotometría derivada en fase sólida

La Espectrofotometría UV-Visible en su modalidad de derivadas se emplea para resolver mezclas de compuestos que presentan espectros de absorción fuertemente solapados, ya que esta técnica permite su determinación cuantitativa, permitiendo la medida exacta a la longitud de onda del máximo y la mejor resolución de los espectros. Esto hace que se produzca un aumento en la selectividad y sensibilidad respectivamente. Esta técnica presenta una desventaja y es que a medida que aumenta la diferenciación, disminuye la relación señal/ruido, esto hace que sea necesario filtrar la señal resultante.

La técnica consiste en calcular el espectro derivado, para ello en el intervalo de longitudes de onda seleccionado se determina el cociente $dA/d\lambda$ para la primera derivada, $d^2A/d\lambda^2$ para la segunda y así sucesivamente. Para seleccionar el orden de la derivada se llega a una situación de compromiso entre la fidelidad con la que se calcula la derivada y la razón señal/ruido.

Las aplicaciones de las técnicas de derivadas en unión con la espectrofotometría en fase sólida, han sido limitadas. En los primeros trabajos realizados, utilizando técnicas analógicas, se proponen métodos para la determinación individual de metales: cobre, cromo y hierro [42] y samario y europio [43]. Con posterioridad, utilizando técnicas digitales, se han publicado métodos para la determinación individual de plomo [44], wolframio [45] y molibdeno [46]. Dentro de nuestro grupo de investigación, Capitán-Vallvey y col. aplicaron la espectrofotometría derivada en fase sólida a la determinación simultánea de sulfamidas, midiendo en la zona del UV [47] y al análisis de mezclas de colorantes [48]. Por su parte, Valencia y col. han desarrollado el primer método para la resolución de mezclas de iones metálicos mediante la medida de la primera derivada de la absorbancia de los complejos en fase sólida [49]. En todos los casos, se utilizó la técnica de medida del "zero crossing".

Aplicaciones de la EFS

Los datos aportados por nuestro Grupo de investigación, algunos de los cuales se recogen en la tabla 1, han mostrado que los errores en las determinaciones no son excesivos, dadas las bajas concentraciones de los analitos en las matrices analizadas, para las que el método convencional correspondiente en disolución resultaría inaplicable. En dicha tabla se recogen, además, algunas características analíticas de los métodos EFS propuestos para el análisis de especies inorgánicas y orgánicas, así como el tipo de muestra donde han sido aplicados.

Tabla 1. Aplicaciones de la Espectrofotometría en Fase Sólida.

Analito	λ_{\max} (nm)	Rango ^a ($\mu\text{g/L}$)	DER (%)	L_D ($\mu\text{g/L}$)	Aplicación	Referencia
SO ₂	565	4-56 ^b	2'1	1'2	Aire	[50]
F ⁻	580	0'8-16	2'8	0'5	Aguas (mineral, potable, rio)	[37]
NO ₂ ⁻	550	0'5-9	6'1	0'3	Agua de mar	[36]
PO ₄ ³⁻	705	2-45	5'4	1'3	Aguas (mineral, potable)	[35]
Mn(II)	470	5-100	1'9	1'0	Tejidos y carbones vegetales, aguas	[51]
Zr(IV)	585	8-20 ^c	2'3	---	Agua mineral	[52]
UO ₂ ²⁺	550	1-10	4'1	0'3	Agua de pozo	[53]
Ti(IV)	440	10-35	4'3	0'4	Agua de mar	[34]
Cu(II)	560	4-80	1'7	0'3	Aguas (bruta, mineral, potable)	[54]
Fe(III)	510	1-10 ^b	2'0	0'2	Nieve, suero humano, vino	[55]
V(IV)	563	0'6-25	2'2	0'6	Agua mineral, crudo de petroleo	[56]
Sn(IV)	576	2-40 ^c	2'1	0'3	Aguas (mineral, de mar)	[57]
Be(II)	580	0'1-1'2	2'3	0'006	Aguas (mineral, potable, de pozo)	[58]
Al(III)	590	0'1-6	1'4	0'02	Aguas (destilada, mineral, potable)	[59]
AcAcO ⁻	590	0'1-3 ^b	1'9	8'0	Urina	[60]
MeBz	546	0'2-3 ^b	3'7	0'1	Bebida alcohólica	[61]
QY ^e	414	10-750 ^b	5'2	3'0	Bebidas no alcohólicas y colonias	[62]
SY y SUD ^d	487	15-500 ^b	2'2	3'5	Colorantes comerciales	[29]
		20-200 ^b	3'1	4'4		
QY ^e	418	1'5-15 ^c	5'7	0'4	Bebidas no alcohólicas	[63]

^a Volumen de muestra 1000 mL, excepto para ^b 100 mL y ^c 500 mL. El rango para Benzoato de metilo (MeBz) y acetoacetato AcAcO⁻ es en mg/L. ^d Determinación simultánea de Sunset Yellow FCF y Sudan I. ^e Determinación de Quinoline Yellow.

2.- INTERÉS DEL ANÁLISIS DE LAS ESPECIES SELECCIONADAS

La **Química Ambiental** se puede definir como el estudio de las fuentes de emisión, reacciones, transporte, efectos y destino de las especies químicas en el agua, el suelo y el aire; así como los efectos que la tecnología ocasiona en el medio ambiente [64]. El desarrollo de esta parte de la Química es muy antiguo, aunque ha sido en los últimos años de este siglo cuando ha tenido un mayor crecimiento debido en gran parte al aumento de la contaminación de origen antropogénico y de los problemas medioambientales asociados con ella. El origen de lo cual puede atribuirse a un incremento muy elevado de la población mundial, en conjunción con la búsqueda de mayores niveles de vida.

Una definición de **contaminante** bastante real, aunque poco química, puede ser: *"demasiado de algo en el lugar equivocado"*. Aplicándola a los contaminantes químicos, nos pone de manifiesto que cualquier compuesto químico, en cualquier medio, puede llegar a ser un contaminante si está presente en una concentración excesiva para dicho medio.

El estudio de la contaminación ambiental pueden hacerse, en función de los medios contaminados, en tres grandes apartados: agua, aire y suelo. Esto supone utilizar diferentes estrategias para ello, ya que la fuente de contaminación, el tipo de contaminante y el nivel de concentración puede diferir muy ampliamente. Además, los distintos procesos en los que intervienen son función del tipo de contaminantes y del medio contaminado. Sin embargo, no son compartimentos estancos sino que existe gran relación entre ellos y los problemas que pueden causarse. Un típico ejemplo, es la emisión de gases a la atmósfera por las centrales térmicas, allí a través de reacciones químicas son transformados en ácidos fuertes y vuelven a caer a la superficie terrestre en forma de lluvia ácida, con la consiguiente acidificación del suelo, ríos y lagos.

En la actualidad los químicos están investigando en profundidad el origen, destino y procesos implicados en la contaminación ambiental, los problemas que causa y las posibles soluciones. Sin duda, unas de las muchas disciplinas implicadas en el estudio de la Química Ambiental, con un papel importante, es la Química Analítica.

Uno de los mayores desafíos de la Química Ambiental, es la determinación de la naturaleza y cantidad de contaminantes específicos en cualquiera de los medios contaminados. El análisis químico se convierte, por lo tanto, en una etapa crucial en el desarrollo de este campo multidisciplinar. Sin embargo, su aplicación es una tarea compleja y de gran dificultad dados los distintos problemas que se pueden presentar en función del medio contaminado. Así, en la atmósfera mientras que el tipo de contaminantes y/o la forma de presentación de los mismos puede ser amplio, los niveles de concentración de los mismos en el aire pueden ser muy pequeños, incluso, menores de un microgramo por metro cúbico y sin embargo, ser causa de una gran cantidad de problemas. Por su parte, un contaminante peligroso en un agua natural puede estar a un nivel de concentración del orden de un miligramo por litro. Al mismo tiempo, las especies contaminantes no van a encontrarse de forma aislada en el medio, por lo cual la determinación de una determinada especie puede verse afectada por problemas de interferencia, causados por la existencia de otros compuestos susceptibles de presentar señales analíticas similares a la del propio analito o por interacción con la propia matriz de la muestra.

Los estudios de especiación de elementos traza en el medio ambiente son un nuevo compromiso para la Química Analítica, ya que a la determinación de niveles de concentración muy pequeños se suma la necesidad de diferenciar formas químicas de un mismo elemento, es decir, en especiación es necesario mejorar tanto la sensibilidad como la selectividad de las técnicas y métodos empleados. La existencia de abundante bibliografía de distintos aspectos sobre el tema, la necesidad e importancia de estos estudios en el laboratorio de análisis de control [65] o la especiación de elementos traza en distintos tipos de muestras: aguas [66] y materiales biológicos [67], así como revisiones generales [68] y de las distintas técnicas empleadas: técnicas cromatográficas [69], cromatografía líquida [70], absorción atómica [71], técnicas acopladas para la especiación de compuestos organometálicos [72], y el análisis por inyección en flujo como herramienta en estudios de especiación [73] son un ejemplo del interés de estos aspectos en el campo de la Química Analítica.

Todo ello, conlleva diferentes problemas, así como precauciones muy determinadas en la toma y conservación de la muestra y de los posibles pretratamientos de la misma [74]. Asimismo, la determinación del analito requiere técnicas o métodos de análisis con bajos límites de detección, así como la necesidad

de alta selectividad o de métodos previos de separación de los compuestos interferentes.

En esta memoria de doctorado, se han seleccionado el anión sulfito y dos cationes, cinc y cadmio, como analitos cuya determinación presenta interés desde el punto de vista medio ambiental como a continuación se recoge.

SULFITO

El dióxido de azufre, el ácido sulfuroso y el sulfito son compuestos oxigenados del azufre, elemento no metálico del Grupo VI, subgrupo B de la tabla periódica.

El ácido sulfuroso se obtiene por la disolución de dióxido de azufre en agua, es un ácido débil diprótico ($K_1 = 1.7 \times 10^{-2}$ y $K_2 = 5 \times 10^{-6}$), que actúa como reductor frente a los oxidantes (por ejemplo, el oxígeno atmosférico), convirtiéndose en ácido sulfúrico.

Tiene una amplia utilización en la industria alimenticia como antiséptico y preservador [75], debido a cuatro razones:

- 1).- Es un eficaz inhibidor de procesos no enzimáticos que se producen durante el almacenaje de productos secos.
- 2).- Se evitan los procesos enzimáticos de ennegrecimiento durante el procesado de los productos.
- 3).- Se evita el crecimiento de algunos microorganismos.
- 4).- Sus propiedades reductoras son útiles en la conservación de los carotenos existentes en muchos alimentos.

También se emplea como decolorante en la industria textil y en la industria papelera.

La mayor parte de los problemas que el dióxido de azufre produce sobre la salud están relacionados con la irritación del sistema respiratorio y problemas bronquiales. Así, a concentraciones superiores a 8 ppm, produce la irritación inmediata de la garganta.

Los daños provocados sobre los materiales son debidos, principalmente, a los vapores de ácido sulfúrico altamente reactivo que se produce por la oxidación catalítica del SO_2 en las gotas de agua. Algunos de los problemas que causan son: cambios en las propiedades físicas de las pinturas, cueros, papeles y tejidos; aumento de la corrosión de los metales, especialmente hierro, acero y cinc; degradación de los materiales carbonatados, etc.

Se puede estimar que, a escala mundial, se vierten a la atmósfera unos 150 millones de toneladas de SO_2 . Estas emisiones proceden principalmente de fuentes antropogénicas. Asimismo, dentro de la atmósfera y debido a la oxidación del sulfuro de hidrógeno, se generan anualmente alrededor de 200 millones de toneladas de dióxido de azufre [76].

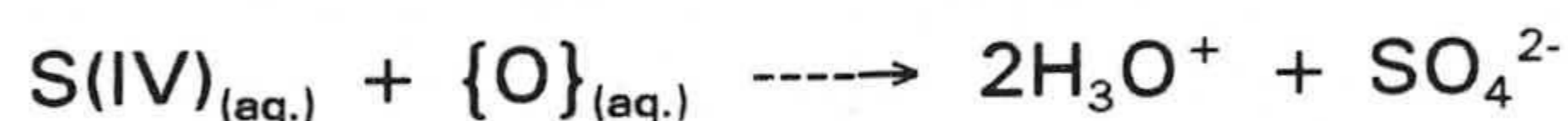
Las emisiones antropogénicas de óxido de azufre proceden principalmente de la combustión de combustibles fósiles (principalmente carbón), en plantas generadoras de energía, procesos industriales y en menor grado operaciones comerciales y residenciales.

Como muchos otros contaminantes gaseosos, el dióxido de azufre reacciona para formar partículas en el aire, que se depositan o son arrastradas de la atmósfera mediante diversos procesos, por ejemplo, mediante la lluvia.

Independientemente de los procesos implicados, una gran parte del SO_2 atmosférico se oxida a ácido sulfúrico y sulfato, en particular sulfato amónico e hidrógeno sulfato amónico. Los sulfatos abandonan finalmente la atmósfera o son lavados por la lluvia. La parte restante del SO_2 se disuelve en las gotas de agua de la atmósfera, originando ácido sulfuroso. Dado sus valores de pK (1'76 y 7'20), dependiendo del pH del medio está como HSO_3^- o como SO_3^{2-} , sufriendo a su vez procesos de oxidación y transformación en sulfato.

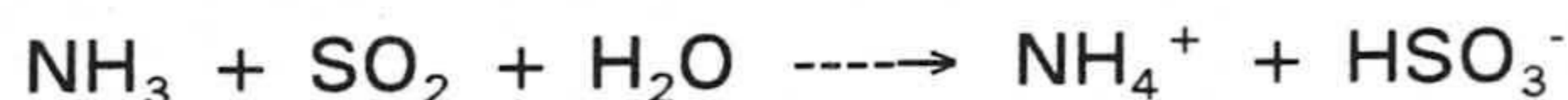
Introducción

El proceso total de oxidación es bastante complejo y se produce dentro de las gotas de agua. Incluye el transporte del SO_2 y del oxidante a la fase acuosa, difusión de las especies dentro de las gotas, hidrólisis e ionización del dióxido de azufre y oxidación de los compuestos de azufre (IV), de acuerdo con el proceso global (no ajustado) siguiente:



donde $\{\text{O}\}_{(\text{aq.})}$ representa un agente oxidante (H_2O_2 , HO^- o O_3) y $\text{S(IV)}_{(\text{aq.})}$ es SO_2 , HSO_3^- o SO_3^{2-} .

Si el oxidante es el ozono, la velocidad de la reacción de oxidación se incrementa cuando actúa frente al ión sulfito o se aumenta el pH. Así, es más rápida en presencia de NH_3 que reacciona con SO_2 para producir ión amonio e ión bisulfito en disolución:



En ausencia de catalizadores, la reacción de oxidación con oxígeno molecular disuelto es demasiado lenta para ser significativa. Sin embargo, la oxidación catalizada por sales de hierro y manganeso, en muchos casos procedentes de las propias cenizas del carbón quemado y transportadas por el viento, es muy rápida.

La lluvia ácida no es más que una consecuencia de la incorporación de sustancias ácidas, principalmente los ácidos sulfúrico y nítrico, al agua de lluvia, provocando un importante aumento de la concentración de H_3O^+ , lo que produce valores del pH del orden de 2 [77].

Los efectos negativos de la lluvia ácida pueden contemplarse desde distintos puntos de vista: biológico, material y económico.

Uno de los posibles efectos de la lluvia ácida consiste en la acidificación del suelo y en la posible alteración de la química del mismo [78].

El proceso de acidificación es función de varios factores. En principio, cuanto más erosionable es el suelo (calcareo, basáltico, etc) mayor es la resistencia que ofrece a su acidificación. Una mayor profundidad del suelo también impide su acidificación ya que es mayor la probabilidad de contener suelo erosionable. El mayor grosor de la capa de humus favorece la neutralización del ácido al contener gran cantidad de componentes que pueden actuar como disoluciones reguladoras y a la mayor concentración de iones metálicos que pueden intercambiarse con el ión hidrógeno. No obstante, el mayor arrastre de los iones metálicos de la capa de humus por la mayor acidez del medio (lixiviación), tiene efectos negativos. Por una parte, impide una adecuada incorporación a las plantas de los nutrientes esenciales (iones calcio, potasio y magnesio), mientras que por otra parte la mayor movilidad de iones tóxicos (cadmio, cinc, plomo o manganeso) facilita su adsorción por las plantas y su incorporación a la cadena trófica.

La lluvia ácida provoca la meteorización o disolución de los aluminosilicatos presentes en el suelo, con la correspondiente movilidad del ión aluminio. Este compete con otros elementos esenciales, en su fijación en las plantas, inhibiendo su crecimiento [79]. Asimismo, el arrastre del aluminio por las aguas superficiales y subterráneas, provoca su hidrólisis ácida y, en consecuencia, la acidificación de los ríos y lagos, lo que provoca la disminución e incluso la desaparición de la materia orgánica al formar compuestos insolubles que se depositan en el fondo del lago. Todo lo cual acarrea problemas de supervivencia a los peces y demás organismos acuáticos, sobre todo cuando el pH del agua alcanza valores inferiores a 4'5 [80].

Otra forma por la que la lluvia ácida ejerce su acción, es teniendo en cuenta que la mayor acidez de las nubes se produce en la parte baja de las mismas, por lo cual la vegetación, sobre todo en parajes de elevada altitud, puede quedar sometida a una atmósfera de elevada acidez. Con ello, las gotas ácidas actúan extrayendo los nutrientes de las plantas a un ritmo superior del que son reemplazados por las raíces.

Por último, la lluvia ácida también afecta a la integridad de los materiales, así, ataca a la piedra provocando el llamado "mal de la piedra", el cual implica desde la degradación irreversible de los edificios, hasta la pérdida de resistencia de algunos

materiales modernos empleados en la construcción.

Los procesos implicados en la formación de la lluvia ácida y su problemática medioambiental, nos indican que el desarrollo de métodos analíticos para determinar sulfito a niveles de trazas en agua de lluvia en presencia de relativamente altas concentraciones de sulfato presenta un gran interés.

CINC

El cinc es un metal blanco-azulado, medianamente maleable, que se hace dúctil entre 110 y 150°C, mientras a bajas temperaturas es quebradizo.

El aire seco no lo altera, similarmente a lo que le ocurre al cadmio, pero en presencia de humedad, el metal se recubre de una capa blanca de carbonato básico que protege al resto.

En sus compuestos aparece exclusivamente con estado de oxidación +II, y se comporta como un metal anfótero. Sus principales compuestos complejos se forman con amoníaco y con ión cianuro.

El cinc se utiliza para la construcción de techumbres de edificios, canalones y bajantes de aguas, para el recubrimiento de hierro y aceros, así como para la fabricación de aleaciones, bronce y latones entre otras. Algunos compuestos de cinc se utilizan tanto para la fabricación de pinturas como de productos farmacéuticos.

Su presencia en el medio ambiente es debida a varias causas. La erosión de sus minerales libera cinc, aunque su movilidad en el agua está restringida por su adsorción en las arcillas, por lo que su presencia en las aguas naturales es relativamente baja [81]. Asimismo, su presencia en aguas potables se debe generalmente al deterioro de tuberías y contenedores de acero galvanizado. Por último, las emisiones de las industrias que utilizan cinc como materia prima para la producción de aleaciones, productos farmacéuticos y pinturas, entre otros, pueden provocar la contaminación del medio.

El cinc se encuentra muy repartido en la composición de los seres vivos, y es considerado un elemento indispensable para la vida humana [82]. Participa en un gran número de reacciones enzimáticas, entre ellas las asociadas con la síntesis del DNA y del RNA, es esencial para una adecuada función de la membrana celular, la síntesis de las proteínas [83] y es necesario para el crecimiento de los huesos [84]. El control de su deficiencia puede realizarse mediante el análisis de su contenido en el suero sanguíneo [85] y en el cabello humano [86].

Por lo general, el cinc es considerado uno de los elementos menos peligrosos, aunque su toxicidad puede aumentar debido a la presencia de otros elementos (arsénico, plomo, cadmio y antimonio) como impurezas.

Sin embargo, la inhalación de humos procedentes de procesos de galvanoplastia se ha asociado con el síndrome denominado "fiebre del humo de metal" cuyos síntomas son fiebre, escalofríos, disnea, inflamación de los músculos, náuseas y fatiga, aunque no se conocen los mecanismos que ocasionan estos efectos. Se han producido envenenamientos agudos por cinc como resultado del consumo de alimentos y bebidas contaminados con este metal por los propios recipientes de cinc o acero galvanizado utilizados para almacenarlos. Los síntomas típicos incluyen dolores epigástricos, diarreas, náuseas y vómitos [87]. Por lo que no es recomendable este tipo de contenedor para almacenar alimentos ya que los alimentos ácidos pueden disolver suficiente cinc para causar envenenamientos.

Existe una cierta controversia sobre el papel del cinc como agente cancerígeno, así la deficiencia de cinc en la dieta ha sido asociada con el desarrollo del cáncer de esófago en humanos [88], mientras que ensayos *in vitro* y *in vivo* sobre animales, sin una clara confirmación en seres humanos, ha puesto de manifiesto que la ingestión de sales de cinc induce la formación de tumores y exalta el papel de otros agentes cancerígenos en el tracto gastrointestinal. La presencia de $ZnCl_2$ en el agua potable ha sido asociada con el incremento del cáncer de mama en roedores [89].

Asimismo, concentraciones altas de $Zn(II)$ son tóxicas para animales y plantas [90]. Así, algunos compuestos de cinc son empleados como biocidas [91] en medicina y como fungicidas en agricultura [92].

CADMIO

El cadmio es un metal blanco-azulado, blando, muy dúctil y maleable. Posee puntos de fusión y ebullición menores que el cinc. Es un metal volatilizable que produce vapores por debajo de su punto de ebullición. Si se le calienta a temperaturas elevadas emite vapores amarillo-rojizo de óxido de cadmio de olor desagradable. En sus compuestos se presenta exclusivamente con estado de oxidación +II. Se combina directamente con los halógenos, el oxígeno y el azufre con desprendimiento de calor. Es desplazado por el cinc por tener un potencial de reducción más negativo.

Se obtiene como subproducto en el refinado del cinc y de otros metales, especialmente cobre y plomo.

Este metal es muy resistente a la corrosión, por lo que se usa como protector de otros metales, alrededor del 50% de cadmio producido se utiliza para este fin. Asimismo, se utiliza para fabricación de aleaciones antifricción, para soldaduras, válvulas de seguridad de calderas, células fotoeléctricas, electrodos para baterías alcalinas, pigmentos y estabilizadores del color en plásticos, barras de cadmio como captadores de neutrones en los reactores químicos, etc.

Su presencia en el medio ambiente es debida a las emisiones producidas por fundiciones, especialmente de plomo, cobre y cinc y por industrias que utilizan cadmio en acumuladores alcalinos, aleaciones pinturas y plásticos, además de las producidas en la fabricación y uso de fertilizantes y pesticidas conteniendo cadmio y en la combustión de aceites y residuos de tratamientos metálicos [93].

El cadmio emitido a la atmósfera puede, dependiendo del tamaño de partícula, mantenerse en suspensión o bien depositarse en suelos o agua. La relación cadmio depositado a cadmio en el aire es del orden de 15-20 mg/m² mes a 1 µg/m³ de cadmio en el aire. La contaminación atmosférica produce de 0 a 1'5 µg Cd/día.

El cadmio penetra en el cuerpo humano por vía respiratoria en los lugares de trabajo relacionados con la industria del cadmio y por la inhalación del humo del tabaco, debido a la especial absorción de este metal por la planta del tabaco [94].

El agua y los alimentos contaminados [95] son la principal vía de ingestión en individuos que no fuman ni trabajan en la industria del cadmio. Debido a su larga vida biológica (> 20 años), el cadmio entra en la cadena alimenticia y se acumula en el organismo. Los alimentos derivados de la carne, incluyendo el hígado y los riñones, así como, en ciertos casos, los mariscos, constituyen importantes fuentes de ingestión de cadmio.

La absorción del cadmio es función del tamaño de partícula y de su solubilidad. Los niveles de absorción por inhalación van desde 0'1-35% de la cantidad respirada en medios contaminados al 10% del cadmio contenido en el humo del tabaco. Por su parte, la absorción a través del tracto gastrointestinal puede variar considerablemente, el caso general es del 5%, mientras que, en individuos con deficiencias de hierro puede llegar al 20% [94].

La mayor parte del cadmio absorbido se acumula en el hígado y los riñones, y no se produce biotransformación del cadmio en el organismo [96].

La distribución del cadmio en el organismo, se produce a través del suero sanguíneo asociado con la albúmina y otras proteínas de alto peso molecular. En el hígado se induce la síntesis de la metalotianina, una proteína de bajo peso molecular, a cuyos grupos sulfidrilo se enlaza originando el complejo cadmio-metalotianina. Una fracción de este complejo se reintroduce en la corriente sanguínea. Debido a su bajo peso molecular, este complejo es filtrado en el riñón donde se va acumulando.

La eliminación del cadmio por el organismo es muy lenta, realizándose principalmente por la orina. En menor extensión, también es excretado con la bilis y el jugo pancreático en las heces.

Los problemas asociados con el cadmio son diversos [94]. Debido a su enlace con los grupos sulfidrilo de las proteínas, cuando este enlace se produce en una enzima puede provocar efectos tóxicos, al inhibir la función de la misma.

La soldadura con materiales que contienen cadmio o la exposición a humos o polvos de los distintos compuestos de cadmio pueden provocar problemas graves en los pulmones: edemas pulmonares, enfisemas y bronquitis crónica [97].

El órgano crítico de absorción de cadmio son los riñones, lo que se manifiesta por problemas renales con un incremento en la excreción urinaria de proteínas de bajo peso molecular (proteinuria), glucosuria y alteraciones en el metabolismo del calcio y del fósforo [98].

Asimismo, el cadmio causa efectos genotóxicos en una gran variedad de células, incluyendo las humanas. Por ello, este metal y sus compuestos están clasificados como cancerígenos [99].

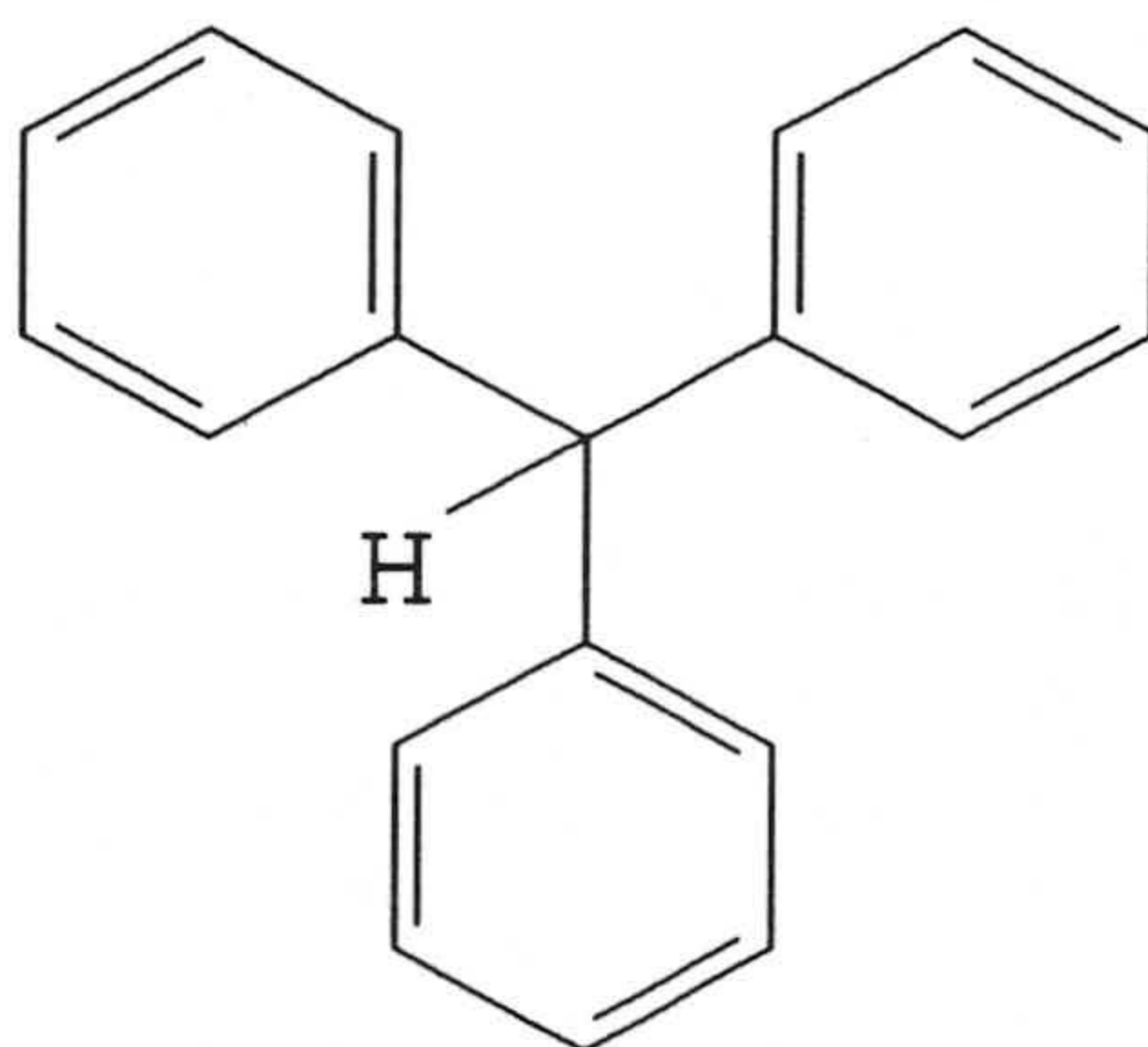
Otros efectos observados por exposiciones prolongadas son anemia, disfunción del hígado, dismineralización de los huesos y enfermedades cardiovasculares [98].

3.- ANTECEDENTES DE LOS SISTEMAS OBJETO DE ESTUDIO

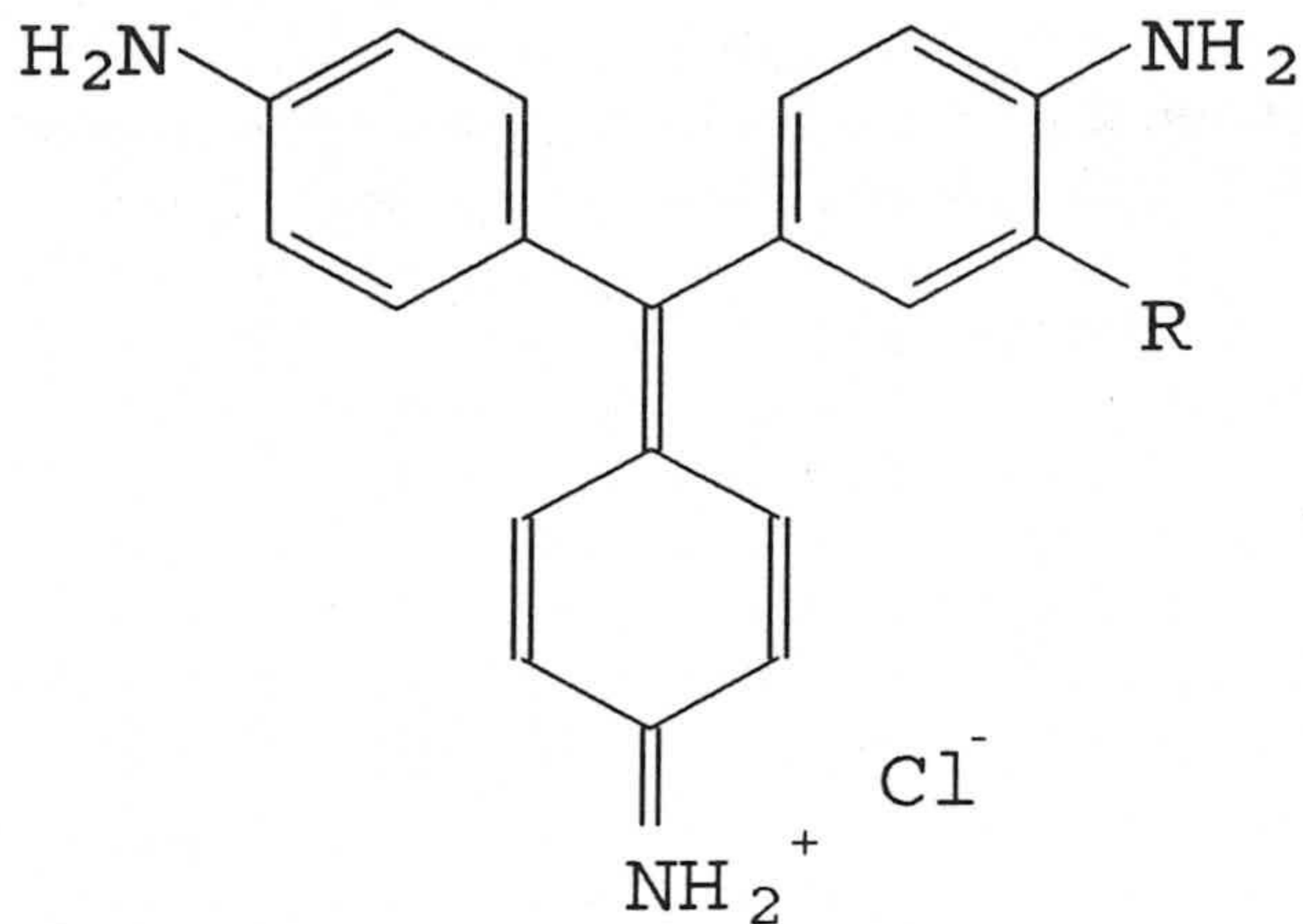
3.1.- Sistema sulfito-pararosanilina

Pararosanilina

Es un agente cromogénico perteneciente a la familia de los trifenilmetanos. Estos derivan de la siguiente estructura:



La pararosanilina es también conocida como Basic Red 9 y Basic Para Fuchsin, para diferenciarlo de la Rosanilina (Basic Violet 14 o Basic Fuchsin). La estructura de estos compuestos es la siguiente:



<u>Reactivo</u>	<u>Estructura</u>	<u>Nombre</u>
Pararosanilina	R = H	Clorhidrato de triaminofeniltolilmetano
Rosanilina	R = CH ₃	Clorhidrato de triaminodifeniltolilmetano

La forma comercial es una mezcla de los dos compuestos conocida con el nombre común de Basic Fuchsin, aunque se pueden encontrar comercializados distintos productos que se diferencian en el porcentaje de ambos compuestos. Así, por ejemplo, la casa comercial Aldrich tiene en su catálogo, bajo el epígrafe común de Basic Fuchsin, dos productos diferentes solo diferenciables en el distinto porcentaje de Rosanilina o Pararosanilina.

El clorhidrato de estos compuestos presenta aspecto de cristales verde-metálicos, solubles en agua y en alcohol, originando disoluciones rojo-carmín y disoluciones casi incoloras en medios ácido o básico.

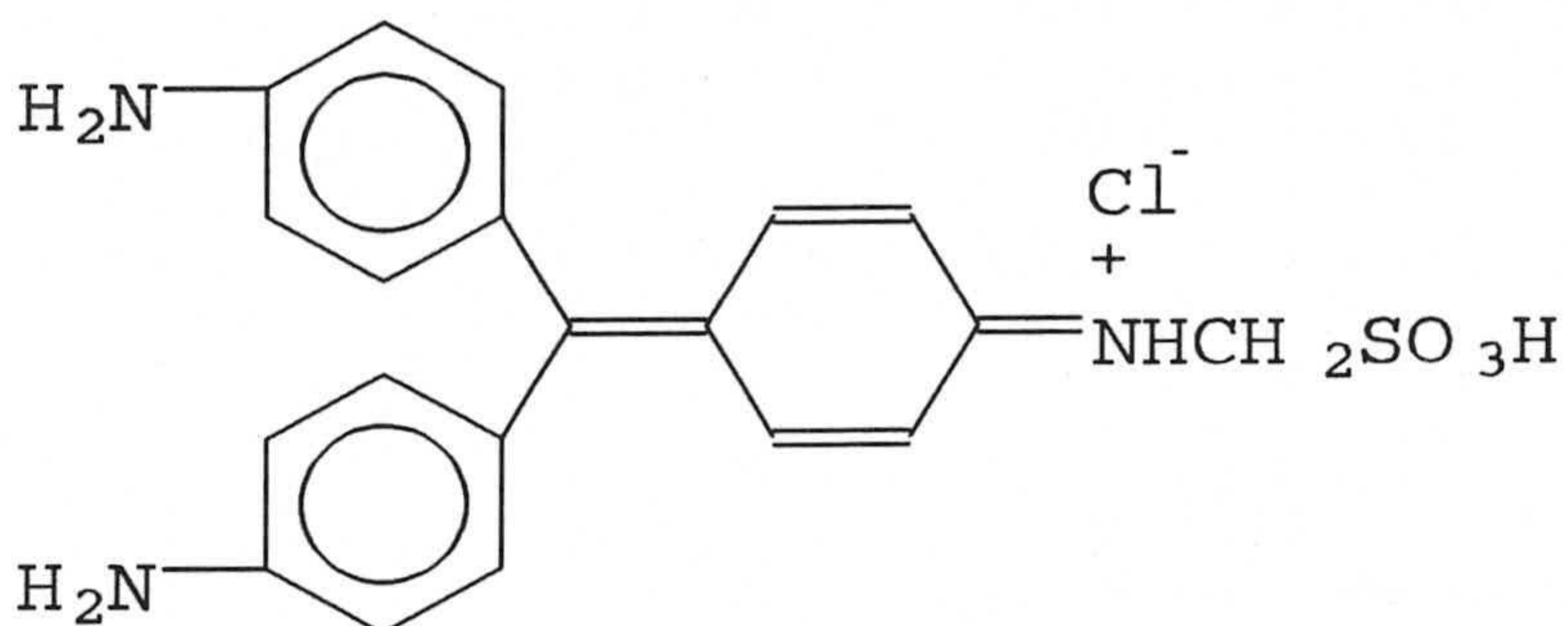
Se han utilizado como colorantes industriales y colorantes de tejidos en Biología, así como reactivo catiónico en la determinación de elementos metálicos previa extracción de pares iónicos [100]. Sin embargo, desde el punto de vista analítico, la máxima aplicación de la pararosanilina es la determinación de elementos no metálicos, especialmente de compuestos de azufre [101], habiéndose propuesto como reactivo en el método estándar para la determinación del ión sulfito en el análisis de aguas [102].

Determinación espectrofotométrica de sulfito utilizando pararosanilina como reactivo cromogénico

La determinación de sulfito, dióxido de azufre o cualquier otro compuesto de azufre que pueda ser transformado en dióxido de azufre está basada en su reacción con pararosanilina en presencia de formaldehído. La reacción, en presencia de un exceso de formaldehído, origina el ácido hidroximetilsulfónico:



Este compuesto reacciona con la pararosanilina, en medio ácido, produciendo un compuesto de color púrpura [103]. Tiene su máximo de absorción a 560 nm, presentando una absortividad molar de 3×10^4 L/mol cm a esta longitud de onda. El producto coloreado está esencialmente formado del derivado mono sustituido:

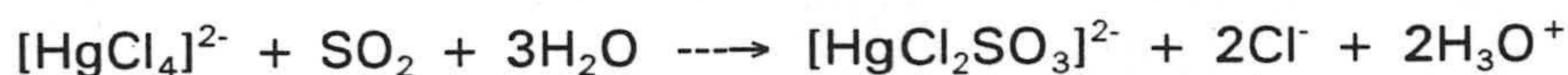


aunque también se forman los compuestos di- y tri- sustituidos [104], [105]. El método presenta la ventaja de tener un pequeño blanco ya que la pararosanilina es prácticamente incolora en medio ácido fuerte.

Este método fue desarrollado por West y Gaeke [103] siendo extremadamente sensible, bastante selectivo (únicamente los óxidos de nitrógeno presentan una seria interferencia) y muy sencillo. Sin embargo, esta reacción presenta el problema que la concentración y pureza de la pararosanilina puede variar con el producto comercial, tanto por ser de distinto fabricante o incluso para el mismo fabricante por ser de distinto lote [105]. Este problema fue parcialmente solucionado por Scaringelli y col. [106] mediante la purificación de la pararosanilina por extracción con 1-butanol de las impurezas que contiene. Asimismo, se deben controlar factores tales como la luz [106] y el tiempo de medida [107] debido a la falta de estabilidad del producto de la reacción con la pararosanilina. Finalmente, para eliminar la interferencia de los óxidos de nitrógeno en la determinación de SO_2 se ha propuesto la utilización del ácido sulfámico; para ello, este compuesto se adicionaba a la disolución que se utilizaba como absorbente del dióxido de azufre [108].

Asimismo, la poca estabilidad del sulfito frente al oxígeno atmosférico obliga a utilizar estabilizantes para la recogida del SO_2 atmosférico, así como para la posterior conservación del sulfito recogido.

En el primer trabajo de West y Gaeke [103] se propone la utilización del tetracloromercuriato sódico (TCM) como absorbente del dióxido de azufre y estabilizante del sulfito, a través de la siguiente reacción:



Estudios posteriores de la estabilidad de este complejo, indicó que aunque el sulfito presentaba una mayor resistencia a la oxidación en presencia de TCM la estabilidad no era total produciéndose pérdidas del 1 al 3% por día, dependiendo de la cantidad de TCM utilizada [106].

Debido a los problemas que aportaba la utilización del TCM como absorbente: inestabilidad del sulfito con el tiempo y alta toxicidad del TCM, se han propuesto otros compuestos orgánicos e inorgánicos como estabilizantes del sulfito o absorbentes de dióxido de azufre.

Dasgupta y col. [107] proponen la utilización de una disolución tamponada de formaldehído como absorbente de SO_2 , comprobando su efectividad en un período de 30 días. Aunque el proceso de formación del compuesto coloreado se complica, ya que previamente a la reacción con la pararosanilina es necesario realizar la hidrólisis alcalina de la muestra recogida en el formaldehído.

La utilización de etanodial como absorbente [109] permite la eliminación de esta etapa previa a la formación del producto coloreado, sin perder efectividad en la recogida y estabilidad del analito.

La ciclohexanona propuesta como alternativa al TCM en su papel de absorbente del dióxido de azufre [110], presenta similar eficacia para períodos de recogida de 6 horas, sin embargo es menos efectivo en la conservación de la muestra.

Utilizando AEDT 10^{-3} M se mantuvieron estables disoluciones 10^{-3} M de sulfito, a temperatura ambiente, durante una semana. En un período de 4 semanas se producen pérdidas del 15% en la concentración de analito [111].

Suzuki e Imai proponen como absorbente de SO_2 el dimetilsulfóxido [112], obteniendo buenos resultados incluso utilizando un único recipiente para la recolección de la muestra.

La monoetanolamina [113] es un buen absorbente del SO_2 . La concentración utilizada no presenta ningún tipo de efecto sobre la eficacia de la absorción del analito. Asimismo, su papel como estabilizante del sulfito fue adecuado en el intervalo de tiempo de 25 días (la pérdida de SO_2 en este período fue del 1-2%, utilizando una concentración 0'05 M de monoetanolamina) incluso con aireación forzada de la muestra.

Raman y col. basándose en el aducto que se forma entre el dióxido de azufre y la morfolina, proponen el uso de este compuesto como absorbente y estabilizante del sulfito [114]. Con tal fin, este compuesto presenta varias ventajas: no es tóxico, no necesita ningún tipo de reacción previa a la formación del compuesto coloreado, y sobre todo presenta buenas eficiencias como absorbente y estabilizante [50].

El método de la pararosanilina ha sido ampliamente utilizado para la determinación de azufre total, sulfito o dióxido de azufre en distintos tipos de muestras.

Scaringelli y col. [106] reoptimizan los parámetros implicados en la reacción (purificación de la pararosanilina, pH, concentración de formaldehído, influencia de la luz sobre el desarrollo del color, etc) antes de aplicarlo a muestras de aire de distintas ciudades para determinar el SO_2 atmosférico.

Dasgupta y col. [107] realizan un completo estudio del mecanismo de la reacción, indicando que de acuerdo con la alta absorptividad del producto de la reacción el grupo sulfónico debe estar ionizado. Utilizan como absorbente una disolución tamponada de formaldehído en la determinación de dióxido de azufre del aire.

En la primera aplicación de la EFS al análisis de gases, Bosque-Sendra y col. [50] determinan dióxido de azufre en muestras de aire de laboratorio.

La determinación de azufre total requiere la combustión de la muestra para producir dióxido de azufre y su posterior fijación como sulfito como paso previo a la determinación con pararosanilina y formaldehído.

Siguiendo este procedimiento se ha determinado el azufre en suelos [115], distintos tipos de rocas [116], metales y aleaciones: níquel, aleaciones de níquel y aceros [117], cobre de alta pureza y bronce (el sistema permite analizar 20 muestras al día) [118], [119], trióxido de uranio y ácido fluorhídrico [120]. En estas muestras, la combustión se realiza en corriente de nitrógeno y en presencia de V_2O_5 . El SO_3 obtenido se reduce a SO_2 por tratamiento con cobre caliente (900-950 °C), y se recoge sobre TCM. Finalmente se procede a la determinación espectrofotométrica del sulfito en la disolución.

La aplicación del procedimiento para la determinación del azufre total en selenio [121], ha permitido la reducción del tiempo de análisis frente al procedimiento convencional (de dos días a 2 horas).

Asimismo, se ha aplicado a la determinación de azufre en compuestos orgánicos sólidos y aceites minerales [122].

Se ha utilizado para la determinación continua de SO_2 en la atmósfera. En el primer sistema propuesto [123], el SO_2 se absorbe directamente en la mezcla de pararosanilina y formaldehído, permitiendo -según los autores- mayor rapidez en la formación del color así como mayor intensidad del mismo. En la segunda propuesta [124], el absorbente utilizado es el TCM y los resultados obtenidos en la medida de la atmósfera cercana a una planta industrial -para un período de 24 horas de muestreo- cubren el rango desde el límite de detección (0'08 mg/m³) a 0'35 mg/m³.

Por último, se han propuesto distintos sistemas para la determinación continua de sulfito en vinos, empleando la reacción con la pararosanilina y el formaldehído.

En el primero de ellos, se desarrolla un método para la determinación simultánea de dióxido de azufre libre y total, mediante un sistema de flujo continuo [125].

La utilización de un sensor para sistemas en flujo basado en la inmovilización en un cambiador iónico del producto de la reacción entre la pararosanilina, formaldehído y sulfito, ha permitido la determinación del sulfito no enlazado en vinos blancos y rosados [126].

Finalmente, basándose en el hecho que la concentración de un analito gaseoso en una corriente portadora de gas que pasa a través de una disolución de muestra, a una temperatura dada, es proporcional al contenido del mismo en la muestra, Zhi y col. [127] proponen un método de análisis en flujo para determinar sulfito en muestras de alimentos (vinos y manzana seca), que no utiliza el clásico módulo de difusión gaseosa, sino un sistema dinámico de extracción gaseosa mediante el cual se prepara la disolución de ensayo de dióxido de azufre en la concentración deseada desde la muestra acidificada.

3.2.- Sistemas cinc-PAR y cadmio-PAR

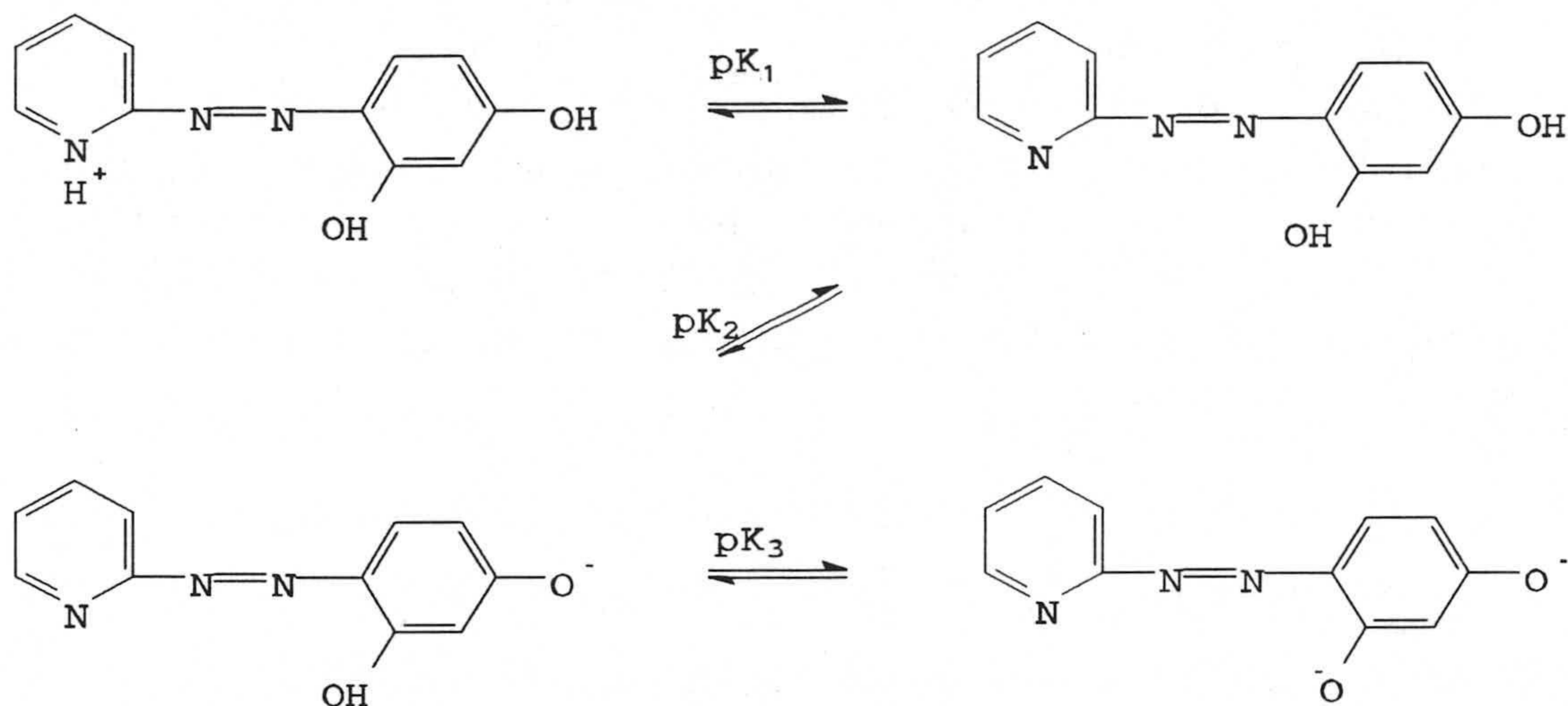
El 4-(2-piridilazo)resorcinol como reactivo analítico

La aplicación de compuestos con grupos 2-piridilazo al análisis químico ha sido extensivamente estudiada desde hace más de 40 años. Dentro de este grupo, destacan el 1-(2-piridilazo)-2-naftol (conocido como PAN) y el 4-(2-piridilazo)resorcinol (conocido como PAR) por ser los más versátiles reactivos para metales [128].

El PAN fue introducido en 1955 [129] como indicador metalocrómico para la valoración de Cu(II), cinc e indio con AEDT. El uso del PAN en valoraciones directas está limitado, sin embargo, por su baja solubilidad en agua.

Si el grupo 2-naftol del PAN es substituido por resorcinol, obtenemos el PAR, compuesto soluble en agua, tanto él mismo como sus complejos metálicos, por lo que presenta ventajas como indicador metalocrómico y como reactivo cromogénico en medios acuosos, frente al PAN, usos para los que fue propuesto a finales de los cincuenta [130], [131].

El 4-(2-piridilazo)resorcinol, está disponible comercialmente bajo tres formas: el ácido libre (H_2L), la sal monosódica ($NaHL \cdot H_2O$) y la sal disódica ($Na_2L \cdot 2H_2O$). Sus equilibrios de disociación ácido-base, pueden ser escritos como:



Existe pues una forma catiónica protonada (H_3L^+), una forma eléctricamente neutra (H_2L) y dos formas aniónicas (HL^-) y (L^{2-}). Son posibles también dos especies adicionales protonadas H_4L^{2+} y H_5L^{3+} en disolución de ácido sulfúrico al 50 y 90%, respectivamente [128].

Los constantes de disociación correspondientes a los anteriores equilibrios, determinados fotométricamente en agua, son [132]:

$$pK_{a1}(N^+H) = 3'1; \quad pK_{a2}(p-OH) = 5'6; \quad pK_{a3}(o-OH) = 11'9$$

La gran solubilidad en agua del PAR y de sus quelatos puede atribuirse a la presencia del grupo hidroxilo relativamente fuerte en la posición *para*.

Parece ser que la gran diferencia entre los valores de pK_{a2} y pK_{a3} se debe a la existencia de un enlace de hidrógeno entre el grupo *o*-OH y el grupo azo, formándose un sistema plano en el que hay máxima conjugación entre el anillo de resorcinol y el grupo azo. Esto además permite que el grupo azo ejerza su efecto electrón-atrayente sobre el grupo *p*-OH aumentando su acidez considerablemente [133].

El PAR forma con los iones metálicos complejos solubles en agua, intensamente coloreados (por lo general rojos o rojo-violeta), algunos de los cuales pueden ser extraídos en disolventes orgánicos, que han permitido proponerlo como reactivo para la determinación fotométrica de diferentes metales [128].

Los iones que dan reacción con PAR en distintos medios se muestran en la tabla 2, mientras que en la tabla 3 se han recogido algunos datos de los complejos originados. Sin duda, el PAR es un reactivo no selectivo, pero su sensibilidad fotométrica para ciertos metales es mayor que la de muchos otros compuestos.

Tabla 2. Principales elementos que reaccionan con el PAR en distintos medios.

Medio	Color*
Ácido	Cu(II), Bi(III), Zr(IV), Ti(IV), Tl(III), Nb(V), Ta(V), Pd(II) (verde); V(V) (púrpura)
Neutro o debilmente ácido	Pb(II), Zn(II) (rosa); Cd(II), Co(II), Ni(II), Hg(II), Mn(II), U(VI), La(III), Ga(III), Fe(III) (marrón); Fe(II) (marrón-rojo); In(III), Sc(III), Al(III), Th(IV), Tl(II), Pt(IV), Rh(III), Ir(IV), Sn(III) (rosa-amarillo); Y(III)
Amoniacal	Ca(II), Sr(II), Ba(II), Ag(I)

* rojo o rojo-violeta, salvo que se indique lo contrario.

Tabla 3. Algunos datos de los complejos metálicos del PAR*.

Ión metálico	Relación molar (M:L)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	ϵ (L/mol cm)	pH
Al(III)	1:1	510	$3'64 \times 10^4$	5'1-5'5
Bi(III)	1:1	515	$1'07 \times 10^4$	0'0-3'5
Cd(II)	1:2	504	$1'02 \times 10^4$	6'0-8'0
Co(II)	1:2	510	$5'60 \times 10^4$	8'3
Cu(II)	1:1	522	$1'21 \times 10^4$	2'3-5'0
Cu(II)	1:2	510	$5'89 \times 10^4$	5'0
Fe(III)	1:2	536	$6'04 \times 10^4$	8'0-9'3
Ga(III)	1:2	504	$1'02 \times 10^4$	6'0-8'0
In(III)	1:2	510	$8'64 \times 10^4$	7'0
Nb(V)	1:1	550	$3'87 \times 10^4$	5'8
Ni(II)	1:2	517	$2'20 \times 10^4$	4'0
Pb(II)	1:1	517	$3'80 \times 10^4$	10'0
Pd(II)	1:1	510	$1'84 \times 10^4$	5'7-6'4
Sc(III)	1:1	515	$2'21 \times 10^4$	8'1
Ta(V)	1:1	515	$2'04 \times 10^4$	6'0-8'0
Th(IV)	1:4	500	$3'89 \times 10^4$	3'0-7'0
UO ₂ ²⁺	1:1	530	$3'95 \times 10^4$	8'0
V(V)	1:1	550	$3'60 \times 10^4$	4'5-6'5
Zn(II)	1:2	495	$6'34 \times 10^4$	8'0

* Tomados de Shibata [128].

Para resolver la escasa selectividad del PAR, se pueden tomar diferentes medidas como el ajuste del pH, o el uso de apropiados agentes enmascarantes como AEDT y ACDT. Así, por ejemplo, se ha podido determinar V(V) en presencia de V(IV) usando una técnica de FIA, y empleando el ACDT como enmascarante [134]. También se puede emplear la extracción con disolventes, en condiciones seleccionadas [128], [132] o incluso las técnicas de multicomponentes. Un ejemplo de esta técnica analítica lo tenemos en la determinación simultánea de Ca y Mg con PAR usando análisis de inyección secuencial [135].

La determinación espectrofotométrica de iones metálicos con PAR ha sido propuesta para matrices muy diversas que van desde metales y aleaciones, hasta aguas naturales o residuales y materiales industriales. En la tabla 4 se recogen algunos de los procedimientos propuestos, no mencionados en los párrafos anteriores, y que ilustran, de alguna manera la extensa aplicabilidad analítica del 4-(2-piridilazo)resorcinol. En esta tabla no se han incluido los métodos propuestos para Zn ni para Cd, ya que se comentarán en apartados siguientes de esta Introducción.

Composición de los complejos metálicos del PAR. Complejos sólidos aislados

Como puede verse en la tabla 2, el PAR forma complejos con relaciones molares metal:ligando de 1:1 y 1:2, con la excepción del complejo de torio (ThL_4) [128]. En la mayoría de los casos, la especie que se forma en medios ácidos es MHL^+ , y en medios básicos, ML_2^{2-} .

Las constantes de estabilidad de algunos de estos complejos han sido determinadas potenciométrica o fotométricamente, por diferentes autores [128].

Geary y col. [136] a través de estudios comparativos de constantes de formación de complejos metálicos del PAR, y de otros compuestos estructuralmente relacionados, postularon que en la quelación, el PAR actúa como ligando tridentado, interviniendo el N piridínico, el grupo *o*-hidroxilo y el N del grupo azo más lejano al heterociclo.

Tabla 4. Algunos métodos de determinación espectrofotométrica de iones metálicos con PAR.

Metal	pH (λ_{medida})	Rango lineal (μg)	Aplicación	Referencia
Co(II)	7'0-8'0 (510 nm)	2-20	Aguas	[137]
In(III)	3'0 (500 nm)	2-30	Productos industriales	[128]
Bi(III)	0-3'5 (530 nm) (en fosfato de tributilo)	5-200	-----	[128]
Fe(III)	10'0 (500 nm)	2-4	Aguas	[138]
Pb(II)	10'0 (520 nm)	10-200	Aceros, bronce	[139][140]
Mn(II)	10'0 (500 nm)	2-20	Aguas residuales	[141]
Ni(II)	9'0 (493 nm)	5-50	Aleaciones	[128]
Nb(V)	6'0 (550 nm)	9-70 (b = 4cm)	Aceros, Aleaciones	[142]
Ta(V)	5'5 (536 nm) (en presencia de oxalato)	5-80	Aleaciones	[128]

La información encontrada en la bibliografía sobre la síntesis e identificación de complejos sólidos del 4-(2-piridilazo)resorcinol es bastante escasa, siendo así que estudios de este tipo ayudarían a caracterizar las especies involucradas en la determinación espectrofotométrica de los metales con PAR.

Corsini y col. [143] prepararon los complejos sólidos de Zn, Ni, Co y Mn con Par en medio ácido. Los análisis elementales se ajustan a una relación molar metal:Par 1:2 en todos los casos, con una molécula de agua en el complejo de Zn y dos en los restantes. No aportan, sin embargo, más información sobre la identificación de estos sólidos que el análisis elemental.

Por su parte, Geary y col. [136] aislaron el complejo sólido de Cu que se ajusta a la siguiente fórmula: $\text{Cu.Par.H}_2\text{O.NO}_3$. Únicamente aportan el análisis elemental (C y N).

Más recientemente, destacan los trabajos de Siroki y col. que preparan y caracterizan complejos sólidos del PAR con niobio [144], con cobalto [145], con cobre [146] o con vanadio(V) [147].

Estudios de los complejos de Zn(II) y Cd(II) con PAR en disolución. Aplicaciones analíticas

Entre los primeros estudios sobre la composición de los complejos de Zn(II) y de Cd(II) con PAR en disolución hemos de citar a Iwamoto [148], si bien sus conclusiones sobre la estequiometría de estos complejos a $\text{pH} = 10$, 1:1 metal:ligando, fue pronto discutida por Corsini y col. [143] quienes determinaron potenciométricamente una relación Zn(II):PAR 1:2, en medio dioxano-agua al 50%. Estos autores estimaron posteriormente, en el mismo medio, el número de protones liberados en la complejación y las constantes de formación del complejo [133]. Geary y col. [136] llevaron a cabo estudios similares en dioxano-agua al 50% y en disolución acuosa. Más recientemente, se ha determinado la constante de estabilidad del complejo 1:1 Zn(II)-PAR, por medios espectrofotométricos [149].

La reacción entre los iones Zn(II) y Cd(II) con PAR ha permitido proponer al ligando, en primer lugar, como reactivo para la detección cualitativa de dichos iones mediante reacciones a la gota [150], [151], [152].

Las características espectrofotométricas del complejo de Zn(II) con Par en disolución fueron pronto aprovechadas para la determinación de este ión. Así, Kitano y Ueda [153] aportan una absortividad molar para el complejo de $8'3 \times 10^4$ y Goldstein y col. [154] de $8'2 \times 10^4$ L/mol cm a 493 nm. Ahrland y Herman [155] establecen condiciones operatorias para llevar a cabo la determinación espectrofotométrica de Zn en disolución acuosa: pH = 8, fijado con tampón borato, ligero exceso de ligando, longitud de onda de medida = 495 nm ($\epsilon = 8'1 \times 10^4$ L/mol cm), no siendo necesario tiempo de espera. La ley de Beer se cumple en el rango 2-20 μ M, siendo la sensibilidad de Sandell de 0'00081 μ g/cm².

También se ha propuesto operar a pH más ácido, aunque con menores sensibilidades: la absortividad molar aportada por Nagarkar [156] a pH = 6 y medio hidroalcohólico es $2'9 \times 10^4$ L/mol cm a 510 nm.

Hemos de citar una evaluación crítica de los métodos propuestos en algunos de los trabajos anteriores, y en otros no citados, para la determinación espectrofotométrica de Zn(II) con PAR y con ligandos relacionados, realizada por Ackermann y Köthe [157] quienes, posteriormente [158], han presentado una revisión de las características analíticas de los métodos que emplean el PAR como reactivo espectrofotométrico para distintos metales, entre ellos el Zn(II).

Entre las aplicaciones analíticas de la determinación espectrofotométrica directa de cinc con PAR hemos encontrado, en la revisión realizada, la determinación de Zn en partículas atmosféricas, previo muestreo sobre papel de filtro, incineración de éste y disolución del residuo [159]; la determinación de Zn en seleniuro de cobre dopado con este metal, tras la descomposición del material con HNO₃ y la separación del Se ($\lambda_{\text{medida}} = 540$ nm, pH = 9'18) [160]. También, la determinación de Zn(II) en materiales biológicos [161], de interés clínico [162] o bioquímico, como la determinación de los iones Zn(II) liberados por las proteínas [163].

La determinación espectrofotométrica de Cd(II) con PAR ha sido bastante menos estudiada. Se pueden citar las condiciones recogidas por S. Shibata [128], pH= 8-10, $\lambda = 495$ nm. Más recientemente, Vlckova y col. [164], estudian la reacción de complejación en medio acuoso y en medios con un 10% de acetona, usando un programa informático, SQUAD-G. En medio hidroorgánico caracterizan tres complejos, CdL_2H_2 , CdL_2H^- y CdL_2H^{2-} , con sus longitudes de onda de máxima absorción, sus absortividades molares y las constantes de formación respectivas. Usando el programa STAT evalúan los parámetros estadísticos del método establecido.

Finalmente citaremos la determinación espectrofotométrica de trazas de cinc y de cadmio en agua residual con PAR y una mezcla de surfactantes iónicos y no iónicos. La diferencia de absorbancia obtenida antes y después de la adición de dietilditiocarbamato sódico, que destruye el complejo Cd(II)-PAR, permite la cuantificación de ambos metales [165].

Métodos analíticos con extracción líquido-líquido

Para mejorar la calidad de los métodos espectrofotométricos de determinación de Zn(II) y Cd(II) con PAR, en disolución, se han propuesto algunos procedimientos de extracción líquido-líquido:

- Nonova y col. [166], propusieron el uso de sales de amonio cuaternario, como el cloruro de cetildimetilbencilamonio (CDBA) o sales de cadena larga [167], para la extracción en cloroformo del quelato de Zn(II) como complejos de asociación iónica.

- La extracción en un disolvente orgánico de complejos ternarios se ha propuesto tanto para Zn(II) como para Cd(II). El primero forma un complejo 1:2:3 con PAR y difenilguanidina, extraíble en $CHCl_3$ y que puede ser usado para la determinación espectrofotométrica a 515 nm, si bien la absortividad molar que presenta ($\epsilon = 6.7 \times 10^4$) [168] no es superior a la obtenida en medio homogéneo. Sin embargo, Tananaiko [169] encuentra mejor sensibilidad en la determinación

analítica de Cd(II) usando el complejo Cd:PAR:cloruro de cetilpiridinium 1:2:2 que con el quelato de PAR.

- También cabe citar aquí los procedimientos propuestos para estos iones que incluyen una extracción líquido-líquido previa a la propia determinación espectrofotométrica con PAR. Así, Chakravarty [170] determina Zn(II) en muestras ambientales combinando la extracción previa con N-hidroxi-N,N'-difenilbenzamidina (HDPBA) y la adición de enmascarantes. Consiguen de esta forma una buena selectividad. En el procedimiento propuesto para la determinación de Cd(II), también en muestras ambientales [171], el complejo del ión con un ácido hidroxámico se extrae en cloroformo y a continuación se agrega PAR y se lleva a cabo la lectura de absorbancia a 510 nm. Según parece, se produce un intercambio de ligando en el complejo de cadmio.

Cromatografía, electroforesis capilar y métodos automáticos que usan el sistema de reacción Zn(II)-PAR.

Que la reacción del PAR con Z(II) es una de las más sensibles para la determinación espectrofotométrica de este ión lo prueba el hecho de ser la reacción seleccionada para la detección en determinados sistemas continuos:

Fritz y Story [172] emplean esta reacción como derivatización post-columna en la determinación cromatográfica de iones metálicos, entre ellos el cinc, intercalando en el cromatógrafo de líquidos, entre la columna analítica y el detector espectrofotométrico continuo, una cámara de mezcla en la que se pone en contacto el eluyente de la columna con el reactivo cromogénico.

En este caso, la separación cromatográfica se realiza sobre los propios iones. Sin embargo, También se puede operar mediante derivatización pre-columna en continuo, usando una disolución de PAR como fase móvil y llevando a cabo la separación de los metales como quelatos metálicos. La técnica cromatográfica empleada aquí es la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa [173].

Más recientemente, se han estudiado ambos tipos de derivatización con PAR para su uso en electroforesis capilar [174].

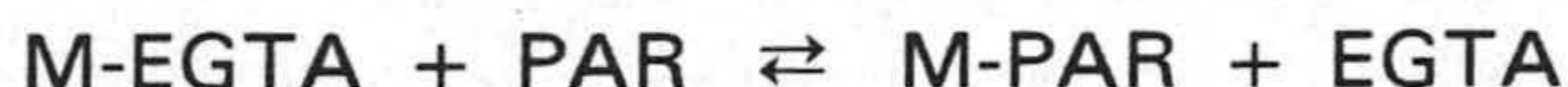
Así mismo, se han propuesto métodos automáticos usando analizadores centrífugos para la determinación de cinc, tanto en aguas [154] como en suero [175] adaptando para ello el método espectrofotométrico basado en el PAR.

Mención especial merece el sensor óptico para Zn(II), desarrollado por Wang [176]. Se basa en una membrana de PVC que lleva disuelto un compuesto análogo al PAR pero lipofilizado, el 1-octadeciloxi-4-(2-piridilazo)resorcinol. El espectro de absorción de la membrana tras equilibrarse con Zn(II) a pH 4'8, muestra un máximo a 523 nm. Quizás uno de sus puntos débiles sea un tiempo de respuesta excesivamente largo.

Análisis de multicomponentes

El análisis espectrofotométrico simultáneo de mezclas de iones metálicos, entre ellos cinc y/o cadmio, utilizando la formación de sus complejos con PAR, y programas de regresión lineal múltiple, ha sido acometido por algunos autores [177], [178].

Blanco y col. [179] proponen un método espectrofotométrico cinético para el análisis de mezclas de iones, Fe(III), Co(II) y Zn(II), usando regresión PLS y Stopped-Flow Injection Analysis. El método se basa en las diferencias de velocidad de desplazamiento del EGTA, por el ligando cromogénico PAR:



reacción que ya había sido estudiada para la determinación de Zn(II) por Tanaka y col. [180], [181]. El empleo de un detector de diodos permite recoger simultáneamente las absorbancias a varias longitudes de onda y usando PLS, procesar

la información multivariante obtenida, para resolver las mezclas. No obstante, como en casos citados anteriormente, la sensibilidad no es muy buena (para el cinc, los rangos de concentraciones del calibrado varían entre 2-7 ppm en mezclas binarias a 2-5 ppm en mezclas ternarias)

Finalmente, en este apartado hemos de citar el trabajo de Bobrowskagrzesi [182] en el que proponen un método espectrofotométrico de derivadas para eliminar interferencias espectrales mutuas y analizar mezclas de iones divalentes (entre ellos el Zn(II)), con PAR, en el rango de concentraciones 0'05-1 ppm. En las mezclas binarias emplean la primera derivada, mientras que en las mezclas más complejas usan la segunda y la tercera derivada espectral.

BIBLIOGRAFÍA

- [1].- H. Mottola, *Anal. Chim. Acta*, **242**, 1-3, 1991.
- [2].- Y.A. Zolotov, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **349**, 403-408, 1994.
- [3].- M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Trends Anal. Chem.*, **14**, 242-250, 1995.
- [4].- M. Feinberg, *L'actualité chimique*, Mayo-Junio, 191-201, 1991.
- [5].- K.S. Booksh, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.*, **66**, 782A-791A, 1994.
- [6].- R.G. Brereton, *Analyst*, **112**, 1635-1657, 1987.
- [7].- S. Wold, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **30**, 109-115, 1995.
- [8].- D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, "Chemometrics: a textbook". Cap. I, 5-11. Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [9].- S.D. Brown, T.B. Blank, S.T. Sum, L.G. Weyer, *Anal. Chem.*, **66**, 315R-359R, 1994.
- [10].- S.D. Brown, S.T. Sum, F. Despagne, B.K. Lavine, *Anal. Chem.*, **68**, 21R-61R, 1996.
- [11].- G. Kateman, F.W. Pijpers, "Quality Control in Chemical Analysis". Cap. II, 15-76. Wiley, New York, 1981.
- [12].- R. Guardans Cambo, "Bases estadísticas para el muestreo ambiental", en: "Quimiometría ambiental: Gestión de las medidas de contaminantes", 1-23. Ciemat, Madrid, 1990.
- [13].- P.W. Araujo, R.G. Brereton, *Trends Anal. Chem.*, **15**, 26-31, 1996.
- [14].- P.W. Araujo, R.G. Brereton, *Trends Anal. Chem.*, **15**, 63-70, 1996.
- [15].- P.W. Araujo, R.G. Brereton, *Trends Anal. Chem.*, **15**, 156-163, 1996.

-
- [16].- R. Cela, "Adquisición de señales analíticas", en: "Avances en Quimiometría Práctica", R. Cela, 19-49. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1994.
- [17].- R.G. Brereton, *Analyst*, **120**, 2313-2336, 1995.
- [18].- R. Boqué, F.X. Rius, "Profundizando en la Calibración lineal univariante", en: "Avances en Quimiometría Práctica", R. Cela, 157-187. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1994.
- [19].- E.V. Thomas, *Anal. Chem.*, **66**, 795A-804A, 1994.
- [20].- K. Danzer, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **351**, 3-10, 1995.
- [21].- V. Cerda, J.M. Estela, R. Fortaleza, A. Cladera, E. Gomez, M.T. Oms, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **52**, 159-178, 1993.
- [22].- M.C. Ortiz, L.A. Sarabia, "Componentes principales y correspondencias", en: "Avances en Quimiometría Práctica", R. Cela, 241-353. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1994.
- [23].- M. Blanco, "Multideterminación mediante Análisis Multivariante", en: "Temas Avanzados de Análisis Químico", J.J. Laserna y D. Pérez Bendito, 369-384. Ediciones Edinford, S.A., Málaga, 1994.
- [24].- S.D. Brown, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **30**, 49-58, 1995.
- [25].- R. Cela, *Quim. Anal.*, **15**, 5-20, 1996.
- [26].- K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi, *Talanta*, **23**, 449-452, 1976.
- [27].- K. Yoshimura, H. Waki, *Talanta*, **32**, 345-352, 1985.
- [28].- F. Capitán, L.F. Capitán-Vallvey, M.C. Valencia, J.M. Bosque Sendra, F. Molina, I. de Orbe, *Analisis*, **19**, 177-179, 1991.
- [29].- L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández, I. de Orbe, R. Avidad, *Analyst*, **120**, 2421-2442, 1995.

- [30].- F. Capitán, L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández, I. de Orbe, R. Avidad, *Anal. Chim. Acta.*, **331**, 141-148, 1996.
- [31].- H. Waki, J. Korkisch, *Talanta*, **30**, 95-100, 1983.
- [32].- L.F. Capitán-Vallvey, I. de Orbe, M.C. Valencia, J.J. Berzas, *Anal. Chim. Acta*, **282**, 75-80, 1993.
- [33].- L.F. Capitán-Vallvey, I. de Orbe, M.C. Valencia, J.J. Berzas Nevado, *Talanta*, **41**, 1327-1333, 1994.
- [34].- L.F. Capitán-Vallvey, M.C. Valencia, I. de Orbe, *Microchemical J.*, **40**, 166-174, 1989.
- [35].- J.M. Bosque Sendra, C. Mérida, L.F. Capitán-Vallvey, *Analisis*, **18**, 531-535, 1990.
- [36].- F. Capitán, M.C. Valencia, L.F. Capitán-Vallvey, *Mikrochim. Acta*, **III**, 303-311, 1984.
- [37].- L.F. Capitán-Vallvey, M.C. Valencia, J.M. Bosque Sendra, *Analyst*, **113**, 419-422, 1984.
- [38].- K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi, *Talanta*, **25**, 579-583, 1978.
- [39].- K. Yoshimura, H. Waki, *Mem. Fac. Sci., Kyushu Univ., Ser. C.*, **11**, 181-188, 1978.
- [40].- M. Foerster, K.H. Lieser, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **309**(3), 177-80, 1981.
- [41].- M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán-Vallvey, *Anal. Lett.*, **25**, 1961-1980, 1992.
- [42].- H. Ishii, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **312**, 114-120, 1982.
- [43].- H. Ishii, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **312**, 24-28, 1984.
- [44].- M.I. Shtokalo, E.E. Kostenko, I.Z. Zhuk, *J. Anal. Chem.*, **47**, 1335-1340, 1992.

-
- [45].- M.I. Pascual Reguera, A. Molina Diaz, M.C. Pacheco Castillo, M.C. Anguita Fernández, M.L. Fernández de Córdoba y L.F. Capitán-Vallvey, *Mikrochim. Acta*, **112**, 225-235, 1994.
- [46].- A. Molina Diaz, M.I. Pascual Reguera, E. Liñan-Veganzones, M.L. Fernández de Cordova, L.F. Capitán-Vallvey, *Talanta*, **43**, 185-191, 1996.
- [47].- L.F. Capitán-Vallvey, I. de Orbe, M.C. Valencia, *Anal. Chim. Acta*, **282**, 75-80, 1993.
- [48].- L.F. Capitán-Vallvey, N. Navas, I. de Orbe, R. Avidad, *Analisis*, **23**, 448-451, 1995.
- [49].- M.C. Valencia, S. Boudra, J.M. Bosque Sendra, *Anal. Chim. Acta*, **327**, 73-82, 1996.
- [50].- J.M. Bosque-Sendra, F. Molina, E. López, *Analyst*, **116**, 871-874, 1991.
- [51].- A. Molina Diaz, J.J. Vida Sagrista, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán-Vallvey, *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **45**, 219-228, 1991.
- [52].- L.F. Capitán-Vallvey, J.M. Bosque Sendra, M.C. Valencia, *Analisis*, **17**, 601-604, 1989.
- [53].- J.M. Bosque Sendra, M.C. Valencia, L.F. Capitán-Vallvey, *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **38**, 551-559, 1990.
- [54].- F. Capitán, J.M. Román, L.F. Capitán-Vallvey, *Anal. Lett.*, **24**, 1201-1217, 1991.
- [55].- F. Capitán García, R. Checa, R. Avidad, L.F. Capitán-Vallvey, *Talanta*, **42**, 711-715, 1995.
- [56].- S. Boudra, J.M. Bosque Sendra, M.C. Valencia, *Talanta*, **42**, 1525-1532, 1995.
- [57].- M.C. Valencia, D. Gimeno, L.F. Capitán-Vallvey, *Anal. Lett.*, **26**, 1211-1226, 1993.
- [58].- M.C. Valencia, S. Boudra, J.M. Bosque Sendra, *Analyst*, **118**, 1333-1336, 1993.

- [59].- J.M. Bosque Sendra, M.C. Valencia, S. Boudra, *Anal. Lett.*, **27**, 1579-1594, 1994.
- [60].- M.F. Molina, M.C. Valencia, J. de la Torre, L.F. Capitán-Vallvey, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **7**, 843-850, 1989.
- [61].- L.F. Capitán-Vallvey, M.C. Valencia, J. García, *Quim. Anal.*, **6**, 445-455, 1987.
- [62].- L.F. Capitán-Vallvey, I. de Orbe Payá, N. Navas Iglesias, M.D. Fernández Ramos, R. Avidad Castañeda, *Quim. Anal.*, **13**, 196-199, 1994.
- [63].- L.F. Capitán-Vallvey, I. de Orbe, S. López Rodríguez, R. Avidad Castañeda, *Mikrochim. Acta*, **117**, 129-135, 1995.
- [64].- S.E. Manahan, "Environmental Chemistry". Cap. I, 1-20. 6ª edición, Lewis Publishers, Boca Raton, 1994.
- [65].- A. Ríos Castro, "La Especiación Química en el Laboratorio Analítico de Control", en: "Temas Avanzados de Análisis Químico", J.J. Laserna y D. Pérez Bedito, 343-367. Ediciones Edinford S.A., Málaga, 1994.
- [66].- T.M. Florence, *Talanta*, **29**, 345-364, 1982.
- [67].- D. Behne, *Analyst*, **117**, 555-557, 1992.
- [68].- J.C. Van Loon, R.R. Barefoot, *Analyst*, **117**, 567-570, 1991.
- [69].- Y.K. Chau, *Analyst*, **117**, 571-575, 1991.
- [70].- K. Robards, P. Starr, E. Patsalides, *Analyst*, **116**, 1247-1273, 1991.
- [71].- A. Sanz Medel, *Analyst*, **120**, 799-807, 1995.
- [72].- O.F.X. Donard, R. Ritsema, "Hyphenated techniques applied to the Speciation of Organometallic compounds in the Environment", en: "Environmental Analysis Techniques, Applications and Quality Assurance", D. Barceló, 549-606. Elsevier, Amsterdam, 1993.
- [73].- M.D. Luque de Castro, *Mikrochim. Acta*, **109**, 165-168, 1992.

-
- [74].- P. Quevauviller, *Mikrochim. Acta*, **119**, 329-338, 1995.
- [75].- D. Barnett, *Food Technol. Aust.*, **37**, 503-505, 1985.
- [76].- S. Leharne, *Educ. Chem.*, **24**, 141-144, 1987.
- [77].- G.E. Likens, F.H. Bormann, *Science*, **184**, 1176-1179, 1974.
- [78].- E.C. Krug, C.R. Frink, *Science*, **221**, 520-525, 1983.
- [79].- J.D. Birchall, J.S. Chapell, "The Chemistry of Aluminium and Silicon within the Biological Environment", en: "Aluminium in Food and the Environment", R.C. Massey y D. Taylor, 40-51. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991.
- [80].- M.R. Wills, C.D. Hewitt, J. Savory, M.M. Herman, "Effects of Aluminium Maltol on Brain Tissue in Vivo and in Vitro", en: "Trace Elements in Health and Disease", A. Aitio, A. Aro, J. Järvisalo y H. Vainio, 227-233. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991.
- [81].- T. Morales, M^a T. Montaña, G. Galán, J.L. Gómez Ariza, *Analyst*, **112**, 467-471, 1987.
- [82].- E. Berman, "Toxic Metals and their Analysis", Cap. XXXI, 233-248. Heyden & Son Ltd., Londres, 1980.
- [83].- R.P. Sharma y R.R. Dugyala, "Effects of Metals on Cell-Mediated Immunity and Biological Response Modulators", en: "Toxicology of Metals", L.W. Chang, L. Magos y T. Suzuki, 785-796. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996.
- [84].- M.H. Bhattacharyya, E. Jeffery y E.K. Silbergeld, "Bone Metabolism: Effects of Essential and Toxic Trace Metals", en: "Toxicology of Metals", L.W. Chang, L. Magos y T. Suzuki, 959-976. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996.
- [85].- Y. Hayashibe, M. Takeya, Y. Sayama, *Anal. Sciences*, **10**, 795-799, 1994.
- [86].- R. Liu, D. Liu, A. Sun, G. Liu, *Analyst*, **120**, 569-572, 1995.
- [87].- C.L. Keen, "Teratogenic Effects of Essential Trace Metals: Deficiencies and Excesses", en: "Toxicology of Metals", L.W. Chang, L. Magos y T. Suzuki, 977-1001. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996.

- [88].- L.A. Poirier y N.A. Littlefield, "Metal Interactions in Chemical Carcinogenesis", en: "Toxicology of Metals", L.W. Chang, L. Magos y T. Suzuki, 289-298. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996.
- [89].- M.D. Cohen, D.H. Bowser y M. Costa, "Carcinogenicity and Genotoxicity of Lead, Beryllium, and Other Metals", en: "Toxicology of Metals", L.W. Chang, L. Magos y T. Suzuki, 253-284. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996.
- [90].- B. Raman, V.M. Shinde, *Talanta*, **36**, 469-472, 1989.
- [91].- R. Beltrán Lucena, E. Morales, J.L. Gomez Ariza, *Il Farmaco*, **49**, 297-300, 1994.
- [92].- L. Mathew, T. Prasada Rao, C.S.P. Iyer, A.D. Damodaran, *Talanta*, **42**, 41-43, 1995.
- [93].- K. Robards, P. Worsfold, *Analyst*, **116**, 549-568, 1991.
- [94].- L. Gerhardsson y S. Skerfving, "Concepts on Biological Markers and Biomonitoring for Metal Toxicity", en: "Toxicology of Metals", L.W. Chang, L. Magos y T. Suzuki, 81-112. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996.
- [95].- E. Berman, "Toxic Metals and their Analysis", Cap. IX, 65-73. Heyden & Son Ltd., Londres, 1980.
- [96].- R.A. Braithwaite, R. Armstrong, D.M. Franklin, D.R. Chettle y M.C. Scott, "Cadmium Toxicokinetics Following Long-term Occupational Exposure", en: "Trace Elements in Health and Disease", A. Aitio, A. Aro, J. Järvisalo y H. Vainio, 95-103. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991.
- [97].- J.M. Benson y J.T. Zelikoff, "Respiratory Toxicology of Metals", en: "Toxicology of Metals", L.W. Chang, L. Magos y T. Suzuki, 929-938. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996.
- [98].- K. Nogawa y T. Kido, "Itai-Itai Disease and Health Effects of Cadmium", en: "Toxicology of Metals", L.W. Chang, L. Magos y T. Suzuki, 353-369. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996.
- [99].- M.P. Waalkes y R.R. Misra, "Cadmium Carcinogenicity and Genotoxicity", en: "Toxicology of Metals", L.W. Chang, L. Magos y T. Suzuki, 231-243. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, 1996.

-
- [100].- K.L. Cheng, K. Ueno y T. Imamura, "CRC Handbook of Organic Analytical Reagents", 459-470. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1982.
- [101].- W.J. Williams, "Handbook of anion determination", 587-599. Ed. Butterworth, 1979.
- [102].- The Standing Committee of Analysts. "Determination of Sulphite, Sulphur Dioxide, Thiosulphate and Thiocyanate, with Notes on the Determination of Total Sulphur and Other Sulphur Compounds 1985". HMSO Books, Londres, 1987.
- [103].- P.W. West, G.C. Gaeke, Anal. Chem., **28**, 1816-1819, 1956.
- [104].- R.V. Nauman, P.W. West, F. Tron, G.C. Gaeke, Anal. Chem., **32**, 1307-1311, 1960
- [105].- J.B. Pate, J.P. Lodge, A. F. Wartburg, Anal. Chem., **34**, 1660-1662, 1962.
- [106].- F.P. Scaringelli, B.E. Saltzman, S.A. Frey, Anal. Chem., **39**, 1709-1719, 1967.
- [107].- P.K. Dasgupta, K. DeCesare, J.C. Ullrey, Anal. Chem., **52**, 1912-1922, 1980.
- [108].- P.W. West, F. Ordoveza, Anal. Chem., **34**, 1324-1325, 1962.
- [109].- K. Irgum, Anal. Chem., **57**, 1335-1338, 1985.
- [110].- J.L. Lambert, M.J. Chejlava, M.H. Beyad, J.V. Paukstelis, Talanta, **29**, 37-40, 1982.
- [111].- R.E. Humphrey, M.H. Ward, W. Hinze, Anal. Chem., **42**, 698-702, 1970.
- [112].- Y. Suzuki, S. Imai, Anal. Chem., **58**, 3271-3273, 1986.
- [113].- A. Bhatt, V.K. Gupta, Analyst, **108**, 374-379, 1983.
- [114].- V. Raman, J. Rai, M. Singh, D.C. Parashar, Analyst, **111**, 189-191, 1986.

- [115].- C. Bloomfield, *Analyst*, **87**, 586-593, 1962.
- [116].- J.G. Sen Gupta, *Anal. Chem.*, **35**, 1971-1973, 1963.
- [117].- K.E. Burke, C.M. Davis, *Anal. Chem.*, **34**, 1747-1751, 1962.
- [118].- H. Pugh, W.R. Waterman, *Anal. Chim. Acta*, **55**, 97-106, 1971.
- [119].- S. Barabas, J. Kaminski, *Anal. Chem.*, **35**, 1702-1705, 1963.
- [120].- R.P. Larson, L.E. Ross, N.M. Ingber, *Anal. Chem.*, **31**, 1596-1597, 1959.
- [121].- L. Acs, S. Barabas, *Anal. Chem.*, **36**, 1825-1829, 1964.
- [122].- E.W. Seefield, J.W. Robinson, *Anal. Chim. Acta.*, **22**, 61-65, 1960.
- [123].- H.L. Helwig, C.L. Gordon, *Anal. Chem.*, **30**, 1810-1814, 1958.
- [124].- P. Frigieri, A. Rolla, *Inter. Lab.*, 48-52, 1986.
- [125].- F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, **59**, 950-954, 1987.
- [126].- P. Richter, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **283**, 408-413, 1993.
- [127].- Z.L. Zhi, A. Ríos, M. Valcárcel, *Analyst*, **120**, 2013-2018, 1995.
- [128].- S. Shibata, "2-Pyridylazo Compounds in Analytical Chemistry", en: H.A. Flaschka y A.J. Barnard Jr., "Chelates in Analytical Chemistry". Vol. IV, 116-164. Ed. Marcel Dekker, INC., New York, 1972.
- [129].- K.L. Cheng, R.H. Bray, *Anal. Chem.*, **27**, 782-785, 1955.
- [130].- E.J. Langmyhr, H. Kristiansen, *Anal. Chim. Acta*, **20**, 524-527, 1959.
- [131].- F.H. Pollard, P. Hanson, W.J. Geary, *Anal. Chim. Acta*, **20**, 26-31, 1959.

-
- [132].- K.L. Cheng, K. Ueno y T. Imamura, "CRC Handbook of Organic Analytical Reagents", 195-201. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, 1982.
- [133].- A. Corsini, Q. Fernando, H. Freiser, *Inorg. Chem.*, **2**(1), 224-226, 1963.
- [134].- M.J.C. Taylor, G.D. Marshall, S.J.S. Williams, J.F. Vanstaden, C. Saling, *Anal. Chim. Acta*, **329**(3), 275-284, 1996.
- [135].- E. Gómez, C. Tomas, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdá, *Analyst*, **120**(4), 1181-1184, 1995.
- [136].- W.J. Geary, G. Nickless, F.H. Pollard, *Anal. Chim. Acta*, **27**, 71-79, 1962.
- [137].- J.S. Fritz, J.E. Abbink, M.A. Payne, *Anal. Chem.*, **33**, 1381-1383, 1961.
- [138].- T. Yotsuyanagi, K. Goto, M. Nagayama, *Bunseki Kagaku*, **18**, 184-190, 1969.
- [139].- R.M. Dagnell, T.S. West, P. Young, *Talanta*, **12**, 583-588, 1965.
- [140].- *Ibid.*, **12**, 589-592, 1965.
- [141].- T. Yotsuyanagi, K. Goto, M. Nagayama, K. Aomura, *Bunseki Kagaku*, **18**, 477-481, 1969.
- [142].- P. Pakalns, *Anal. Chim. Acta*, **41**, 283-292, 1968.
- [143].- A. Corsini, I. Mai, L. Yih, Q. Fernando, H. Freiser, *Anal. Chem.*, **34**(9), 1090-1093, 1962.
- [144].- M. Siroki, C. Djordjevic, *Anal. Chem.*, **43**(11), 1375-1378, 1971.
- [145].- M. Siroki, L. Maric, Z. Stefanac, M.J. Herak, *Anal. Chim. Acta*, **75**, 101-109, 1975.
- [146].- M. Siroki, L. Maric, M.J. Herak, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **278**(4), 285-286, 1976.

- [147].- N. Galesic, M. Siroki, *Acta Crystallogr., Sect. B*, **B35(12)**, 2931-2937, 1979.
- [148].- T. Iwamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **34(5)**, 605-610, 1961.
- [149].- E. Ohyoshi, *Polyhedron*, **5(6)**, 1165-70, 1986.
- [150].- M. Fujimoto, T. Iwamoto, *Mikrochim. Ichnoanal. Acta*, 7655, 1963.
- [151].- H. Watanabe, *Nippon Kagaku Zasshi*, **86**, 513, 1965.
- [152].- C. Radhakrishnamurty, G.S. Rao, *Acta Cienc. Indica, Chem.*, **16C(1)**, 113-5, 1990.
- [153].- M. Kitano y J. Ueda, *Nippon Kagaku Zasshi*, **91**, 987, 1970; *Chem. Abstr.*, **74**, 71352e, 1971.
- [154].- G. Goldstein, W.L. Maddox, M.T. Kelley, *Anal. Chem.*, **46(4)**, 485-489, 1974.
- [155].- S. Ahrland, R.G. Herman, *Anal. Chem.*, **47(14)**, 2422-2426, 1975.
- [156].- S.G. Nagarkar, M.C. Eshwar, *Indian J. Technol.*, **14(1)**, 43-44, 1976.
- [157].- G. Ackermann, J. Köthe, *Talanta*, **26**, 693-703, 1979.
- [158].- L. Sommer, J. Koethe, M. Langova, G. Ackermann, *Scr. Fac. Sci. Nat. Univ. Purkynianae Brun.*, **14(3-4)**, 135-146, 1984; *Anal. Abstr.*, **48**, 5B20, 1986.
- [159].- D. Davydov, K.I. Vichevich, A.A. Anashkina, E.L. Shuvaeva, *Gig. Sanit.*, **11**, 50-51, 1987.
- [160].- L.V. Ermakova, V.A. Podgornaya, *Zavod. Lab.*, **54(9)**, 30-32, 1988.
- [161].- M. Pollak, V. Kuban, *Collet. Czech. Chem. Commun.*, **44(3)**, 725-41, 1979.
- [162].- L. Lampugnani, M. Maccheroni, *Clin. Chem.*, **30(8)**, 1366-1368, 1984.

-
- [163].- J.B. Hunt, S.H. Neece, A. Ginsburg, *Anal. Biochem.*, **146**(1), 150-157, 1985.
- [164].- S. Vlckova, L. Jancar, V. Kuban, J. Havel, *Collet. Czech. Chem. Commun.*, **47**(4), 1086-1099, 1982.
- [165].- Wen-Bin Qi, Li-Zhong Zhu, *Talanta*, **32**(10), 1013-1015, 1985.
- [166].- D. Nonova, V. Nenov, N. Lihareva, *Talanta*, **23**, 679-681, 1976.
- [167].- D. Nonova, K. Stoyanov, *God. Sofii. Univ., Khim. Fak.*, **74**, 313-328, 1984; *Anal. Abstr.*, **47**, 3B36, 1985.
- [168].- S.G. Mamuliya, I.V. Pyatniskii, K.I. Grigalashvili, *Ukr. Khim. Zh.*, **44**, 410-413, 1978; *Anal. Abstr.*, **35**, 4B46, 1978.
- [169].- M.M. Tananaiko, T.I. Vysotskaya, *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved., Khim. Khim. Tekhnol.*, **27**(5), 544-547, 1984.
- [170].- S. Chakravarty, R.K. Mishra, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **345**, 613-616, 1993.
- [171].- Y.K. Agraval, T.A. Desai, *Analyst*, **111**, 305-307, 1986.
- [172].- J.S. Fritz, J.N. Story, *Anal. Chem.*, **46**(7), 825-829, 1974.
- [173].- J.E. DiNuncio, R.W. Yost, E.K. Hutchison, *Talanta*, **32**(8B), 803-806, 1985.
- [174].- F.B. Regan, M.P. Meaney, S.M. Lunte, *J. Chromatogr. B-Biomed. Applications*, **657**(2), 409-417, 1994.
- [175].- R. Ciuti, G.A. Galli, *G. Ital. Chim. Clin.*, **12**(2), 91-100, 1987.
- [176].- K. Wang, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, *Analyst*, **117**, 57-60, 1992.
- [177].- E. Gómez, J.M. Estela, V. Cerdá, M. Blanco, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **342**, 318-321, 1992.
- [178].- Y.N. Ni, *Anal. Chim. Acta*, **284**(1), 192-205, 1993.

- [179].- M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, J. Riba, *Anal. Chem.*, **66**(18), 2905-2911, 1994.
- [180].- M. Tanaka, S. Funahashi, K. Shirai, *Anal. Chim. Acta*, **39**, 437-445, 1967.
- [181].- M. Tanaka, S. Funahashi, K. Shirai, *Inorg. Chem.*, **7**(3), 573-578, 1968.
- [182].- E. Bobrowskagrzesik, A.M. Grossman, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **354**(4), 498-502, 1996.

CAPÍTULO I

DISOLUCIONES, INSTRUMENTACIÓN Y SOPORTES SÓLIDOS.

En este capítulo, se señalan las disoluciones, los soportes sólidos y la instrumentación utilizados. Así mismo, se hace una descripción del procedimiento operatorio que de alguna manera se repite a lo largo de todo el trabajo experimental desarrollado en la presente memoria.

1.- DISOLUCIONES UTILIZADAS

Todos los productos químicos usados son de grado analítico salvo que se indique lo contrario. El agua utilizada para preparar todas las disoluciones es de ósmosis inversa.

1.1.- Disoluciones patrón

Disolución estándar de sulfito, 0'5 g/L

Preparada disolviendo 0'433 g de Na_2SO_3 anhidro, Merck P.A., en 500 mL de agua de ósmosis inversa y contrastada iodométricamente [1].

Disolución de trabajo de sulfito, 5 mg/L

5 mL de la disolución estándar de sulfito se llevan a 500 mL con agua de ósmosis inversa añadiendo morfolina (0'02% v/v) como estabilizador. Esta disolución de 5 ppm, almacenada bajo refrigeración (7-8 °C), es estable durante al menos 5 meses. Las disoluciones de menor concentración se obtienen mediante adecuada dilución de la disolución de trabajo en el momento de su utilización.

Disolución estándar de cinc, 1 g/L

Se prepara disolviendo 0'521 g de $ZnCl_2$, Panreac P.R.S., en 250 mL de HCl 1 M. A partir de ésta se preparan disoluciones de menor concentración, por dilución adecuada con agua de ósmosis inversa.

Disolución estándar de cadmio, 3'5 g/L

Se obtiene disolviendo 2'002 g de $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$; Merck P.A., en 250 mL de agua de ósmosis inversa y llevando a pH = 2'0 con H_2SO_4 1 M. Esta disolución se contrasta con EDTA en presencia de neT [2]. Las disoluciones de menor concentración se obtienen mediante adecuada dilución de la disolución estándar con agua de ósmosis inversa.

1.2.- Disoluciones de reactivos

Disoluciones de clorhidrato de pararosanilina

Se prepara una disolución concentrada, disolviendo 0'2 g de clorhidrato de pararosanilina (C.I. 42500 Basic Red 9), Aldrich, en 100 mL de HCl 1 M y se purifica siguiendo el procedimiento de Scaringelli y col. [3] tal y como se recoge en el apéndice. 6 mL de esta disolución se diluyen a 100 mL con agua de ósmosis inversa para obtener la disolución de trabajo.

Disolución de formaldehído, 0'28% (v/v)

Preparada pipeteando el volumen necesario de formaldehído, Probus P.Q., del 97% de pureza y enrasando con agua de ósmosis inversa.

Disoluciones de morfolina

Se preparan disoluciones a varias concentraciones a partir de morfolina, Panreac P.R.S., del 97% de pureza.

Disoluciones de 4-(2-piridilazo)resorcinol

Se preparan disoluciones de diversas concentraciones disolviendo la cantidad necesaria de la sal monosódica del 4-(2-piridilazo)resorcinol (monohidratada), Merck, en agua de ósmosis inversa y enrasando al volumen adecuado. Las disoluciones así preparadas se guardan al abrigo de la luz tapando el matraz con papel aluminio.

Disoluciones de yoduro potásico

Preparadas disolviendo la cantidad necesaria de la sal KI, Panreac P.R.S., en agua de ósmosis inversa y enrasando al volumen adecuado.

1.3.- Disoluciones reguladoras

Disolución reguladora de $\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}/\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{K}$ de $\text{pH} = 3'0$

Es obtenida por mezcla de las cantidades adecuadas de disoluciones de ácido monocloracético, Fluka P.A., 0'1 M y de hidróxido potásico, Panreac P.A., 0'1 M.

Disoluciones reguladoras de H_3BO_3/NaH_2BO_3 de pH = 8'7

Son obtenidas por mezcla de los volúmenes adecuados de disoluciones 0'2 M o 0'5 M, de ácido bórico, Merck P.A, y de hidróxido sódico, Panreac P.A.

1.4.- Disoluciones para el estudio de las interferencias y/o enmascaramiento

Se preparan a partir de las sales con una concentración de 1 g/L referida al ión correspondiente. Las sales utilizadas para la preparación de estas disoluciones quedan reflejadas en la tabla I.1.

Tabla I.1. Sales utilizadas en el estudio de la selectividad.

Ión	Sal empleada	Ión	Sal empleada
Al(III)	$Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	IO_3^-	KIO_3
A. Ascórbico	$C_6H_8O_6$	Mg(II)	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$
Bi(III)	$Bi(NO_3)_3$	Mn(II)	$MnSO_4 \cdot H_2O$
Br^-	$NaBr$	NH_4^+	NH_4Cl
$C_2O_4^{2-}$	$Na_2C_2O_4$	Ni(II)	$Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$
Ca(II)	$Ca(NO_3)_2 \cdot H_2O$	NO_2^-	$NaNO_2$
Cd(II)	$3CdSO_4 \cdot 8H_2O$	NO_3^-	$NaNO_3$
$CH_3CO_2^-$	CH_3CO_2Na	Pb(II)	$Pb(NO_3)_2$
Citrato	$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	PO_4^{3-}	KH_2PO_4
Cl^-	$NaCl$	SCN^-	$NaSCN$
CO_3^{2-}	Na_2CO_3	SiO_3^{2-}	Na_2SiO_3
Co(II)	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	$S_2O_3^{2-}$	$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$
Cr(III)	$Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	SO_3^{2-}	Na_2SO_3
Cu(II)	$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	SO_4^{2-}	$Na_2SO_4 \cdot 2H_2O$
F^-	NaF	Tartrato	$NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$
Fe(III)	$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	Tiourea	H_4N_2CS
HCO_3^-	$NaHCO_3$	V(V)	NH_4VO_3
I^-	KI	Zn(II)	$ZnCl_2$

2.- SOPORTES SÓLIDOS EMPLEADOS

Existen gran variedad de productos sintéticos y naturales que muestran propiedades de cambio iónico. De entre todos ellos, nosotros en esta memoria, hemos empleado:

- Resinas de cambio iónico de poliestireno-divinilbenceno:

- * Dowex 1X8 (100-200 mallas), Sigma, en ciclo cloruro.
- * Dowex 1X8 (200-400 mallas), Sigma, en ciclo cloruro.
- * Dowex 50X8 (100-200 mallas), Sigma, en ciclo hidrógeno.

- Cambiadores iónicos de tipo dextrano:

- * Sephadex DEAE A-25, Sigma, en ciclo cloruro.
- * Sephadex QAE A-25, Sigma, en ciclo cloruro.
- * Sephadex SP C-25, Sigma, en ciclo sodio.

- Soportes sin grupos de cambio iónico:

- * Sephadex G-15, Sigma.

En los soportes del primer tipo (Dowex), ha sido necesario el siguiente tratamiento antes del empleo:

- * lavado con HCl (1 M),
- * lavados repetidos con agua de ósmosis inversa,
- * secado al aire a temperatura ambiente,

mientras que los otros soportes han sido empleados sin tratamiento previo.

A continuación se describen algunas de las características de los dos tipos de soportes utilizados con mayor frecuencia en esta memoria.

2.1.- Polímeros de estireno

Los polímeros de cambio iónico más importantes hoy en día son aquellos basados en el poliestireno. Están constituídos por una matriz hidrofóbica formada por cadenas lineales de poliestireno unidas entre sí por puentes de divinilbenceno. Unidos a los anillos aromáticos, se hallan grupos funcionales iónicos tales como:

$---SO_3^-$; $---COO^-$; $---PO_3^{2-}$ en cambiadores catiónicos, y

$---NH_3^+$; $---NRH_2^+$; $---NR_2^+$; $---NR_3^+$ en cambiadores aniónicos.

Son materiales porosos y al poseer grupos hidrófilos, son afectados por las características del medio (pH, constante dieléctrica, ..., etc) y al ponerlos en suspensión en agua o en cualquier disolvente polar, lo absorben en su interior, se hinchan y se convierten en "geles". El grado de entrecruzamiento (relacionado directamente con el porcentaje de DVB) determina el tamaño de los microporos de la matriz, la capacidad de hinchamiento y la movilidad de los contra-iones en la resina. Esta última influye a su vez en la velocidad del proceso de cambio iónico.

En la tabla I.2 se recogen algunas características de las resinas utilizadas en esta memoria, tanto la Dowex 50X8 (fuertemente ácida) como la Dowex 1X8 (fuertemente básica) [4].

Tabla I.2. Resinas de cambio iónico.

Resina	Descripción	Tamaño (mallas)	Grupo funcional	Contraión	Capacidad (meq/g)
Dowex 50	catiónica fuerte	100-200	$--SO_3^-$	H^+	4'3
Dowex 1	aniónica fuerte	100-200 200-400	$--CH_2-N^+(CH_3)_3$	Cl^-	3'3

2.2.- Polímeros de dextrano

El dextrano es un polisacárido formado por residuos de glucosa unidos entre sí por enlaces α -1,6-glucosídicos [5].

Los geles Sephadex se obtienen entrecruzando dextrano con epíclorhidrina lo que da lugar a una estructura tridimensional como la que se recoge en la figura I.1.

El grado de entrecruzamiento determina en gran medida ciertas características del gel como su capacidad de hinchamiento, sus propiedades mecánicas o la cinética de intercambio, en los Sephadex de cambio iónico.

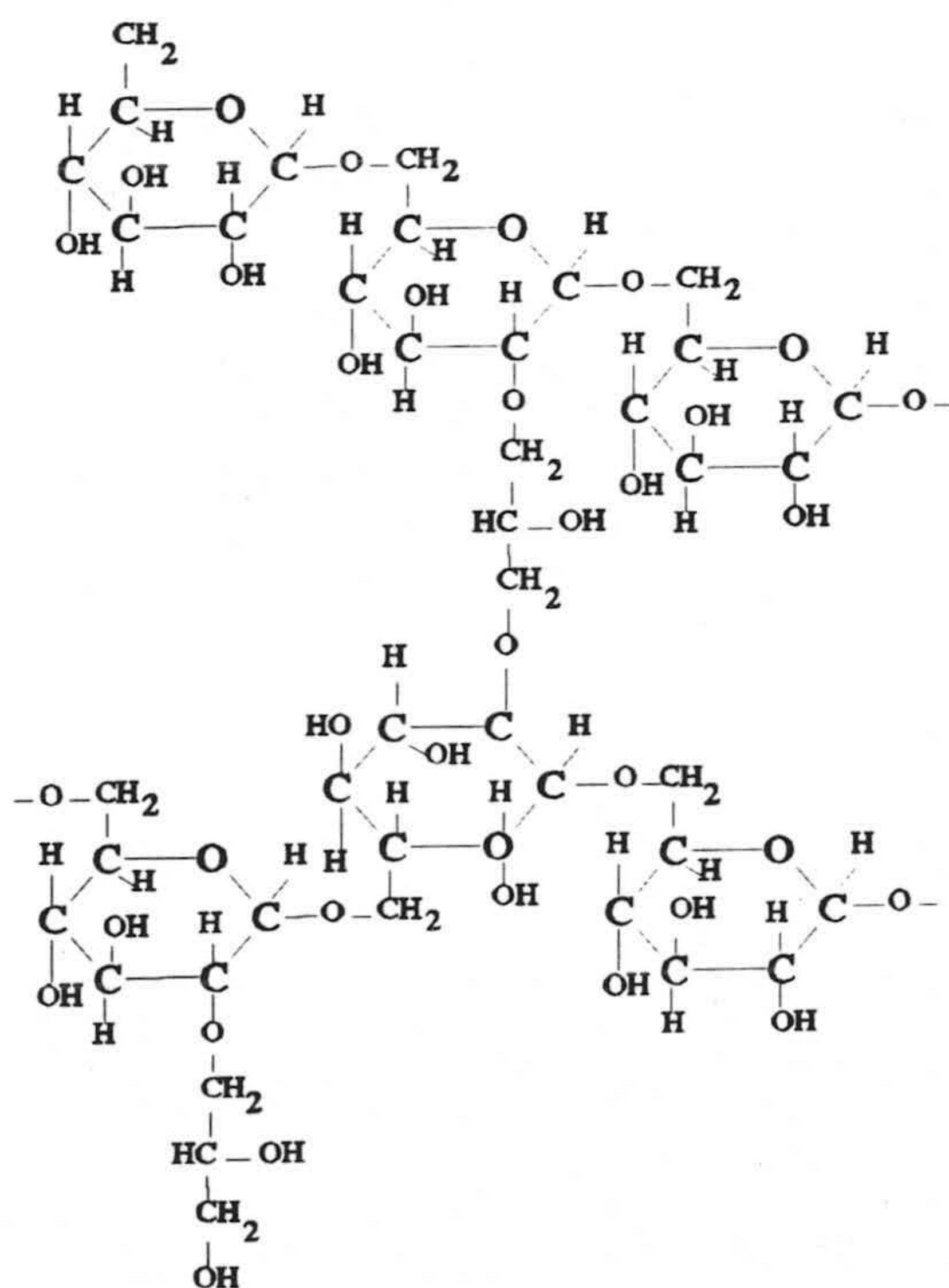


Figura I.1. Estructura parcial del Sephadex.

Los cambiadores iónicos son preparados introduciendo adecuados grupos funcionales sobre la matriz de Sephadex. Dichos grupos se enlazan a las unidades de glucosa a través de uniones éter estables [6], obteniéndose así cambiadores iónicos con carácter ácido fuerte, Sephadex SP; y ácido débil, Sephadex CM; base fuerte, Sephadex QAE y base débil, Sephadex DEAE (tabla I.3).

Su nomenclatura, como puede observarse, emplea las iniciales del correspondiente grupo funcional, responsable del carácter cambiador (DEAE, QAE, CM, SP), seguido de letra A ó C, según se trate de un cambiador aniónico ó catiónico, y de un número que indica su grado de porosidad.

Tabla I.3. Cambiadores iónicos Sephadex.

Tipo	Descripción	Grupo funcional	Contraión	Capacidad (meq/g)
DEAE-A-25	aniónico débil	dietilaminoetil	Cl ⁻	3'5 ± 0'5
QAE-A-25	aniónico fuerte	dietil-(2-hidroxipropil)aminoetil	Cl ⁻	3'0 ± 0'4
CM-C-25	catiónico débil	carboximetil	Na ⁺	4'5 ± 0'5
SP-C-25	catiónico fuerte	propilsulfónico	Na ⁺	2'3 ± 0'3

3.- OTROS PRODUCTOS QUÍMICOS

- Acido nítrico 60% de pureza, Panreac P.A.
- Acido sulfúrico 96% de pureza, Panreac P.A.
- Acido clorhídico 35% de pureza, Panreac P.A.
- Hidróxido sódico, Panreac P.A.
- Hidróxido potásico, Panreac P.A.
- Dicromato potásico 99% de riqueza, Panreac P.A.
- Metilisobutilcetona (MIBK), Panreac R.A.
- Butanol-1, Panreac P.A.

4.- INSTRUMENTACIÓN

- Espectrofotómetro BAUSCH & LAMB, mod. Spectronic 2000, provisto de un registrador X-Y HOUSTON mod. 33-35-08 y equipado con cubetas STARNA de 1 mm y 1 cm.

- Espectrofotómetro UV.VIS PERKIN & ELMER, mod. Lambda 2, que incluye software PECSS para archivar y manipular los espectros.

- Espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN ELMER, mod. 2380, equipado con varias lámparas de cátodo hueco, y con quemadores de acetileno y óxido nitroso-acetileno.

- pH-metro digital Crison, mod. 501, provisto de un electrodo Ingold combinado de vidrio y calomelanos saturado.

- Balanzas analíticas Mettler AE 163 y PJ 360.

- Agitador rotatorio de botellas, Agitaser mod. 2000 (velocidad, 77 rpm).

- Centrifugadora, URA Technic, mod. 2610, velocidad máxima 4000 rpm.

- Desionizador de agua SETA compuesto por:

* Equipo de osmosis inversa mod. BL-A3.

* Equipo de cambio iónico mod. SETAPUR-4E.

5.- ORDENADORES Y PROGRAMAS EMPLEADOS

Ordenadores e impresoras empleadas

* Ordenador personal 386 DX-40 con: 4 mbytes de Ram, disco duro de 170 mbytes, coprocesador matemático, unidad de disco flexible de 3^{1/2} pulgadas, tarjeta

gráfica super VGA.

* Impresoras: Canon BJ y Hewlett Packard Laserjet III.

Paquetes informáticos utilizados

* La recogida y tratamiento de los espectros se ha realizado en gran parte mediante el programa software **PECSS** que permite el control del Lambda 2 desde el PC en formato binario de alta resolución (formato ASCII) siguiendo las definiciones JCAMP. La comunicación con el espectrofotómetro se ha establecido mediante un interface RS-232C vía puerto serie, permitiendo el registro de todos los espectros. Estos últimos fueron almacenados en discos flexibles de 3^{1/2} pulgadas para un posterior tratamiento con distintos programas.

Para calcular los espectros derivados a partir de los espectros de absorción, el **PECSS** se basa en los métodos de Savitzky-Golay [7,8]. Se aplica un factor de 10 a los datos espectrales en cada etapa de derivación.

* **Quimiometría V 1.0.** (1994) [9]. Dicho programa nos ha permitido comparar pendientes de las rectas así como estimar el límite de detección a partir de las probabilidades de falsos positivo y negativo.

* **Statgraphics V 6.0.** Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, U.S.A. 1992. Utilizado para llevar a cabo la regresión por mínimos cuadrados, la comparación de medias y la optimización de variables experimentales con los diseños de Doehlert.

* **Alamin.** (1996) [10]. Usado para la determinación de los parámetros de fiabilidad de los métodos y la validación de éstos por la metodología de adición de patrón.

* **Harvard Graphics V 3.00.** (Bistream Inc. 1991) para la representación de todas las gráficas recogidas en esta memoria.

* **Progress.** [11]. Este programa ha sido utilizado para determinar tanto los datos anómalos como el límite superior de la recta de calibrado, mediante la regresión por mínima mediana de cuadrados, cuando no se realizaron réplicas.

6.- MATERIAL DEL LABORATORIO

El material volumétrico utilizado para la realización de las experiencias, como matraces aforados, pipetas aforadas y graduadas, ... etc, ha sido AFORA o similar de clase A.

Antes de su utilización ha sido lavado y enjuagado con abundante cantidad de agua desionizada y un último enjuague con agua de ósmosis inversa. En caso de las cubetas de medida se utilizó una disolución de $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (1:1) para su limpieza después de cada experiencia siendo a continuación enjuagadas, repetidas veces, con agua de ósmosis inversa.

7.- PROCEDIMIENTO OPERATORIO

7.1.- Obtención y fijación del derivado coloreado del analito

a).- En botellas de polietileno de 1 L de capacidad se adicionan, en el orden adecuado en cada caso, el analito y los reactivos correspondientes para el volumen de muestra elegido.

b).- Se agrega la cantidad de fase sólida seleccionada y se equilibran ambas fases en un agitador rotatorio de botellas durante un tiempo fijo.

c).- Se filtra en embudo provisto de placa de vidrio sinterizado.

d).- La fase sólida retenida se empaqueta en una cubeta de 1 mm de paso de luz, con ayuda de una pipeta, y se centrifuga durante 1 minuto o 30 segundos.

7.2.- Medida de la absorbancia en fase sólida

La atenuación del haz de radiación producida por la fase sólida con la especie fijada, medida a la longitud de onda del máximo de absorción de la especie fijada, A_λ , es el resultado de varias contribuciones.

$$A_\lambda = A_{NC} + A_{Sol} + A_R + A_{RL}$$

donde A_{NC} representa la absorbancia neta de las especies complejas fijadas en fase sólida, A_{Sol} la absorbancia correspondiente a la disolución intersticial que queda entre los granos de cambiador, A_R la atenuación de fondo debida a la absorción y dispersión de luz por parte de la matriz sólida y A_{RL} la absorbancia correspondiente a los reactivos fijados en el cambiador, en el caso que éstos absorban a la longitud de onda de medida.

Generalmente, A_{Sol} puede ser despreciada cuando las razones de distribución de los componentes de la muestra son muy altos, lo que suele ocurrir normalmente.

Por otra parte, los valores de A_{NC} , A_R y A_{RL} están afectados por el empaquetamiento de los granos de cambiador en la cubeta de medida. Es por esto que la medida de la absorbancia correspondiente a la especie sorbida sobre el cambiador, usando como referencia un blanco de cambiador preparado en iguales condiciones pero exento de analito, no puede ser obtenida midiendo únicamente la absorbancia a la longitud de onda del máximo de absorción.

No obstante, cuando la medida de la absorbancia se realiza a dos longitudes de onda, correspondiendo una al máximo de la especie, A_{λ_1} , y otra situada en una región en la que sólo absorbe el cambiador (700-800 nm), A_{λ_2} ; la diferencia de absorbancia $\Delta A = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2}$, tiene la propiedad de mantenerse constante bajo

condiciones de empaquetamiento similares.

Por otra parte, si la absorbancia del blanco de cambiador, que viene dada por:

$$A_{\lambda,b} = A_{b,Sol} + A_{b,R} + A_{b,RL}$$

se mide a las mismas longitudes de onda (λ_1 y λ_2), la diferencia de absorbancia, $\Delta A_b = A_{\lambda_{1b}} - A_{\lambda_{2b}}$, se mantendrá igualmente constante bajo similares condiciones de empaquetamiento.

La absorbancia neta de la especie fijada en la fase sólida se obtiene a partir de la diferencia entre las dos absorbancias:

$$\Delta A - \Delta A_b = |A_{NC} + (A_R + A_{RL}) - (A_R^* + A_{RL}^*)| - |(A_{b,R} + A_{b,RL}) - (A_{b,R}^* + A_{b,RL}^*)|$$

siendo las absorbancias que llevan (*) aquellas que corresponden a la longitud de onda λ_2 donde no absorbe el complejo.

Puesto que:

$$|(A_R + A_{RL}) - (A_R^* + A_{RL}^*)| - |(A_{b,R} + A_{b,RL}) - (A_{b,R}^* + A_{b,RL}^*)| = 0$$

entonces tenemos:

$$\Delta A - \Delta A_b = A_{NC}$$

En la figura 1.2 se recoge los términos anteriormente usados.

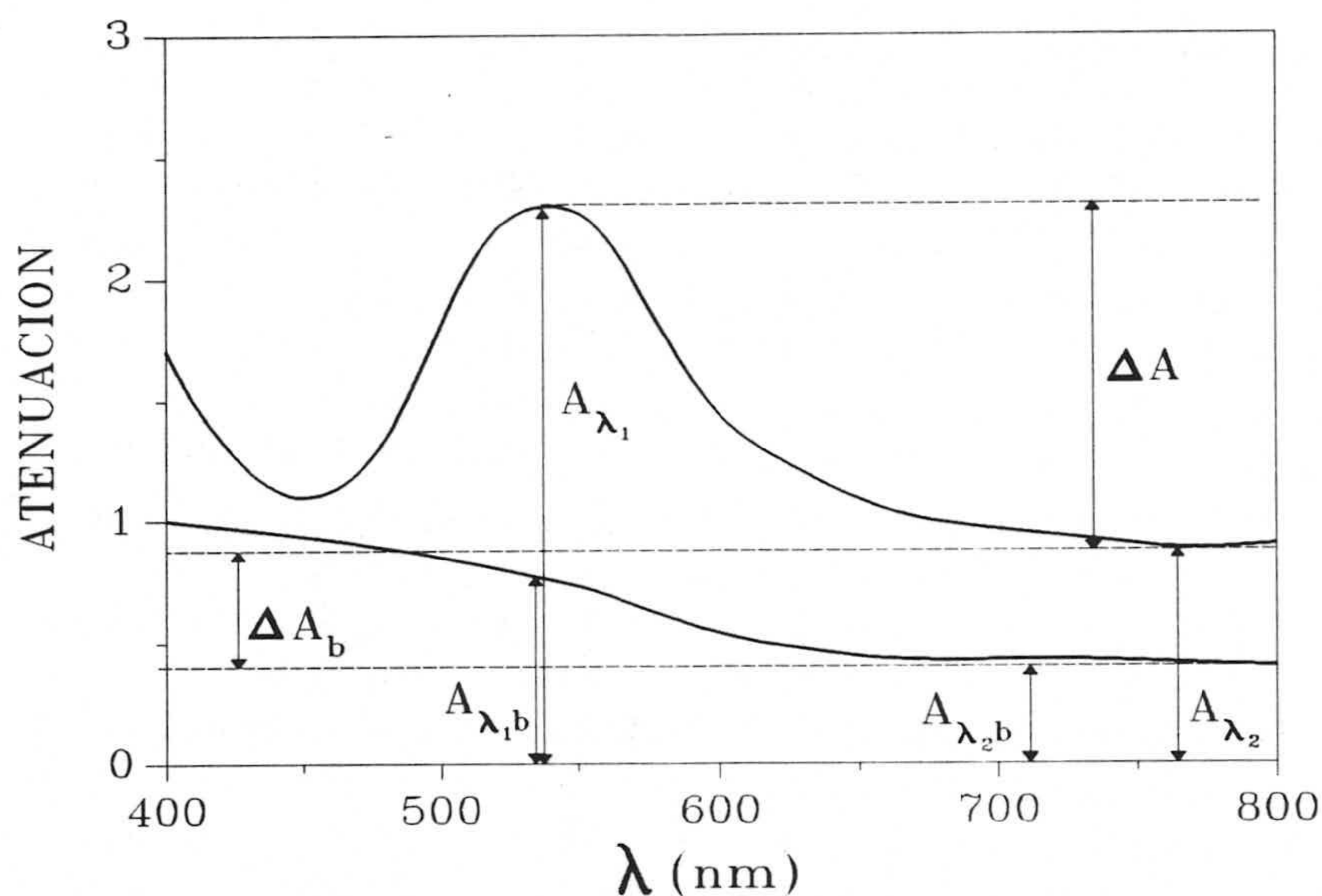


Figura I.2. Contribuciones a la absorbancia de un sistema fijado en una fase sólida.

8.- IDENTIFICACIÓN DE COMPLEJOS SÓLIDOS

En la identificación de los complejos sólidos aislados se han empleado los equipos, materiales y métodos que se indican a continuación:

Análisis elemental orgánico

Para la determinación del contenido en carbono, hidrógeno y nitrógeno en los sólidos aislados se empleó un equipo Perkin-Elmer 240-C de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

Análisis térmico

El estudio del comportamiento térmico se ha llevado a cabo en un equipo Mettler TA-3000, provisto de un calorímetro diferencial Mettler DSC-20 y una

termobalanza Mettler TG-50. Los diagramas termogravimétricos se han registrado empleando una atmósfera de aire puro con un flujo de 100 ml/min y una velocidad de calentamiento de 20 °C/min. El porcentaje de metal en cada complejo se ha calculado a partir del residuo obtenido en la termogravimetría correspondiente.

Medidas de conductancia

Las medidas de conductancia de disoluciones de los complejos en dimetilformamida se han llevado a cabo en un conductímetro Radiometer, tipo CDM 2d., con célula de conductividad CDC 104.

Espectroscopía infrarroja

Los espectros infrarrojos entre 4000 y 400 cm^{-1} de los diferentes sólidos se han obtenido en un espectrofotómetro con transformada de Fourier Nicolet 20SXB de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. Las muestras se prepararon en forma de pastillas usando KBr como medio dispersante. Para la zona comprendida entre 600 y 180 cm^{-1} , se prepararon pastillas en polietileno y los espectros se registraron en un equipo Perkin-Elmer 983-G.

Cálculos de orbitales moleculares

Los cálculos de orbitales moleculares se han realizado en el laboratorio de Modelización y Diseño Molecular mediante el programa Spartan versión 4 [12], utilizando un modelo semiempírico diseñado para metales de transición como el PM3(tm), con optimización completa de geometría.

Sobre las geometrías de mínima energía resultantes y a partir de la función de onda PM3(tm) se procede a calcular los valores de las distancias y ángulos de enlace, así como los ángulos diedros.

BIBLIOGRAFÍA

- [1].- F. Bermejo Martínez, "Química Analítica General, Cuantitativa e Instrumental". Cap. XIII, 693-871. 5ª Edición. Departamento de Química Analítica. Universidad de Santiago de Compostela, 1974.
- [2].- F. Bermejo Martínez, A. Prieto Bouza, "Aplicaciones Analíticas del AEDT y Análogos". Cap. VII, 317-600. Departamento de Química Analítica. Universidad de Santiago de Compostela, 1975.
- [3].- F.P. Scaringelli, B.E. Saltzman, S.A. Frey, Anal. Chem., **39**, 1709-1719, 1967.
- [4].- J.A. Dean, "Chemical Separation Methods". Cap. V, 86-125. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1969.
- [5].- L. Fischer, "Gel Filtration Chromatography". Cap. III, 29-56. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, 1980.
- [6].- "Ion Exchange Chromatography, principles and methods", Cap. IV, 10-17. Pharmacia LKB Biotechnology, Sweden, 1983.
- [7].- A. Savitzky, M.J.E. Golay, Anal. Chem., **36**, 1627-1639, 1964.
- [8].- H.H. Madden, Anal. Chem., **50**, 1383-1386, 1978.
- [9].- **Quimiometría V 1.0** (1994). Desarrollado por M. Blanco, R. Boqué, R. Cela, J. Coello, S. Maspoch, Mª C. Ortíz, J. Rija, F.X. Rius, A. Ruíz, L.A. Sarabia y X. Tomás. Programa que se incluye en el libro "Avances en Quimiometría Práctica". Coordinado por R. Cela. Editado por el Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1994.
- [10].- **Alamin** (1996). Desarrollado por A. García Campaña, J.L. Sierra Fernández y L. Cuadros Rodríguez, en "Nuevas Aplicaciones Fluorimétricas del Rojo de Alizarina. S. Utilización de Medios Micelares". Tesis Doctoral de A. García Campaña, 1995, Universidad de Granada.
- [11].- **Progress**. Programa incluido en el libro de P.J. Rousseeuw y A.M. Leroy, "Robust Regression and Outlier Detection". Wiley, New York, 1989.
- [12].- Spartan V.4.0 Wavefunction, Inc 18401 Von Karman Ave., #370 Irvine, CA 92715 U.S.A. 1995.

CAPÍTULO II

OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

Para verificar la calidad obtenida en el proceso de medida químico, en la actualidad, es imprescindible la adecuada utilización de un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que se han agrupado bajo el nombre de "**Quimiometría**". Los objetivos a conseguir con esta disciplina se pueden resumir de la siguiente manera [1]:

- Permitir un mejor tratamiento de los datos recogidos por los analistas, así como extraerles la máxima información posible.

- Aumentar la calidad de las medidas químicas mejorando las condiciones de su recogida.

En este capítulo, se pretende facilitar las ideas básicas de tipo quimiométrico que, de forma conveniente, han sido aplicadas para proporcionar la máxima información química de los datos analíticos, así como un conjunto de acciones que permiten comprobar la calidad de los resultados.

1.- DISEÑO Y OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

Para poner a punto un determinado método analítico se requiere siempre el conocimiento de los valores numéricos que han de tomar las diferentes variables que intervienen en el proceso y que permiten obtener un resultado analítico con la mejor calidad posible. Generalmente esta calidad suele estar asociada a la obtención de un valor máximo de señal analítica, aunque en ciertos casos pueden utilizarse otros tipos de variables respuesta como puede ser "la cantidad de información" [2].

El proceso de hallar estas condiciones óptimas se denomina "*optimización*" [3].

1.1.- Clasificación de los métodos de optimización

Tradicionalmente, los distintos valores se han encontrado aislando cada variable y optimizándola de manera independiente de las restantes, pero cuando el efecto de alguna de ellas no es independiente de las demás (se producen interacciones entre dos o más variables), este proceso de "*uno-a-la-vez*" o *univariante*, puede conducir a conclusiones erróneas [4]. Por ello es conveniente utilizar técnicas formales de optimización *multidimensionales* o *multivariantes* que permiten la optimización simultánea de más de una variable. Esta nueva forma de planificar las experiencias supera claramente al sistema tradicional ya que por una parte, puede detectar y estimar aquellas interacciones que ocurren entre las variables y por otra, requiere menos medidas para obtener la misma o mejor precisión que el procedimiento clásico.

A lo largo de la investigación que se presenta en esta memoria se han utilizado tanto métodos univariantes como multivariantes para la optimización de los métodos que se proponen.

Básicamente, los métodos multivariantes se dividen en dos grupos [5]:

- Métodos de tipo Caja Negra (Secuencial).
- Métodos de tipo Analítico (Simultáneo).

1.1.1.- Métodos de tipo Caja Negra (Secuencial)

Este es un concepto derivado de la teoría de sistemas en el que asumimos un casi total desconocimiento del sistema, aunque sabemos que tiene entradas (valores de las variables) y salidas (respuestas, resultados). En este caso, se diseñan estrategias consistentes en establecer cada experimento tras la evaluación de los resultados de los experimentos anteriores. Por ello, los métodos de este grupo se denominan de tipo *secuencial*. Los más conocidos dentro de este grupo de métodos secuenciales son los métodos *simplex*, y dentro de éstos el *simplex regular*.

1.1.2.- Métodos de tipo Analítico (Simultáneo)

El término "*Analítico*" se usa en el sentido matemático y se refiere a la posibilidad de disponer de una descripción matemática suficientemente aproximada de la superficie de respuesta (una ecuación) como para evaluar la localización del óptimo por derivación de dicha función. Las técnicas basadas en diseños de tipo factorial son representantes genuinos de esta estrategia y su utilización en condiciones en las que el número de experimentos se reduzca al mínimo constituyen el denominado *método de Box-Wilson* (*steepest ascend, de gradiente, o de pendiente máxima*). Puesto que en estos casos, todos los experimentos se planifican con anterioridad a su realización, los métodos que pertenecen a este grupo se denominan de tipo *simultáneo*.

1.2.- Diseño experimental

1.2.1.- ¿Qué es un diseño experimental?

La optimización de las variables experimentales, tanto en los métodos de tipo secuencial como de tipo simultáneo, puede llevarse a cabo de una forma correcta utilizando un diseño experimental apropiado en el que simultáneamente se pueden

obtener los valores óptimos de dichas variables. Los diseños a tres niveles nos permiten ajustar los datos experimentales a funciones polinómicas de grado 2 y un estudio adecuado de tales funciones posibilita encontrar la región del óptimo con relativamente pocas experiencias [6].

Se define, *un diseño experimental* como una prueba o serie de pruebas en las cuales se introducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso o sistema, de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida [7].

Puesto que el principal objetivo de un diseño experimental es aumentar nuestro conocimiento sobre el sistema en estudio, no existe un diseño que se pueda considerar "el mejor" ya que la elección de éste dependerá de las condiciones y fines para los que se establece el mismo.

1.2.2.- Principios básicos

La metodología estadística consiste en planear un experimento para obtener datos apropiados, que pueden ser analizados mediante métodos estadísticos, con el fin de producir conclusiones válidas y objetivas. Este método de análisis estadístico está estrechamente relacionado con el diseño experimental ya que depende directamente del diseño empleado.

Existen tres conceptos básicos en el diseño experimental, formando una parte importante de todo experimento, que son la obtención de réplicas, la aleatorización y el análisis por bloques.

- *La réplica*: se trata de una repetición del experimento básico. Este concepto permite por una parte obtener una estimación del error experimental y por otra calcular de forma más precisa el efecto de cualquier factor en un diseño dado.

- *La aleatorización*: se refiere al hecho de que tanto la asignación del material experimental como el orden en que se realizan los ensayos se determinan aleatoriamente.

- *El análisis por bloques*: es una técnica que se usa para incrementar la precisión del experimento. Un bloque es una porción homogénea del material experimental dentro del total del material.

1.2.3.- Directrices de un diseño experimental

Cuando se plantea un diseño experimental, se requiere de antemano tener una idea clara de qué es exactamente lo que se va a estudiar. Para ello y antes de llevar a cabo el proceso de optimización, se deben de realizar las siguientes operaciones [7]:

- Comprensión y evaluación del problema.
- Elección de los factores y niveles. (los factores o tratamientos, son las variables de las que depende la respuesta y los niveles son los posibles valores que puede tomar cada uno de los factores en el tipo de diseño elegido).
- Selección de la variable respuesta.
- Elección del diseño experimental.
- Realización del experimento.
- Análisis estadístico de los datos: comprobación del modelo y evaluación de los factores que influyen en la variable respuesta.
- Conclusiones.

1.4.- Metodología de la superficie de respuesta

La *Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)*, es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influida por varias variables, y el objetivo es optimizar esta respuesta [8].

Supongamos por ejemplo, la existencia de dos variables X e Y que influyen en la respuesta R de un proceso de optimización. Dicha respuesta es función de los niveles x e y correspondientes a los factores X e Y respectivamente, tal y como se indica en la ecuación:

$$R = f(x, y) + \varepsilon$$

donde ε representa el error o ruido observado en la respuesta R . Si la respuesta esperada se denota por $E(R) = f(x, y) = \eta$, entonces la superficie representada por

$$\eta = f(x, y)$$

se denomina *superficie de respuesta*.

En la mayoría de los problemas de MSR, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce. Por ello, el primer paso en MSR consiste en determinar una aproximación apropiada a la relación funcional real entre la respuesta y el conjunto de variables independientes. Por lo general, se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes, sin embargo la existencia de curvatura en el sistema obligaría a usar polinomios de mayor grado. Así y para un modelo de segundo orden, la ecuación general sería:

$$R = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum \beta_{ij} x_i x_j$$

siendo, x_i : el nivel correspondiente al factor X_i ; β_0 : el término independiente; β_i : el

coeficiente del término lineal; β_{ii} y β_{ij} : los coeficientes del término cuadrático.

Los distintos parámetros del polinomio de aproximación, β_i , se estiman utilizando el método de mínimos cuadrados. Dicha estimación, se hace más eficazmente si se utilizan los diseños experimentales apropiados. A menudo, los diseños usados para ajustar superficies de respuesta se denominan *diseños de superficie de respuesta*. En el trabajo de Palasota y Deming [9], se recogen algunas de las superficies de respuesta frecuentemente encontradas en química (superficie mostrando un máximo, un mínimo y un punto de silla respectivamente).

El ajuste y el análisis de superficies de respuesta se facilitan en gran medida con la elección apropiada de un diseño experimental. Para llevar a cabo dicha elección, hay que tener en cuenta una serie de características deseables en el diseño elegido [8]:

- Proporciona una distribución razonable de puntos de datos en toda la región de interés.
- Permite investigar la idoneidad del modelo, incluyendo el fallo de ajuste.
- Permite la realización de experimentos en bloques.
- Permite la construcción secuencial de diseños de orden superior.
- Proporciona una estimación de error interna.
- No requiere un número grande de experiencias.
- No requiere demasiados niveles de las variables independientes.
- Asegura simplicidad en los cálculos de los parámetros del modelo.

De una manera esquemática, vamos a citar las principales clases de diseños disponibles para las etapas de ajuste lineal y cuadrático de modelos a la superficie de respuesta [10].

1.4.1.- Modelos de primer orden

La propiedad básica de selección en este tipo de modelos es la ortogonalidad que garantiza sencillez en las estimaciones y máxima precisión tanto en las regiones de confianza para uno o varios parámetros como para las predicciones de las respuestas. Este grupo lo podrían formar:

- * El diseño Simplex.
- * Los diseños Factoriales y Fracciones Factoriales con puntos centrales a dos niveles.
- * El método EVOP (Evolutionary Operation).

a.- Diseño Simplex

El simplex es una técnica de diseño experimental donde la respuesta se optimiza respecto a k factores, de los k vértices posibles, y $k-1$ están en el mismo plano o hiperplano. Así, para dos factores el simplex será un triángulo equilátero, para tres factores un tetraedro y así sucesivamente. Estas figuras geométricas tienen la interesante propiedad de poder formar un nuevo simplex regular sobre cualquier cara de un simplex dado por la adición, tan sólo, de un nuevo punto equidistante de los de cara fija.

Desde el punto de vista matemático, el simplex es un algoritmo secuencial de búsqueda directa, que se caracteriza por la no utilización de derivadas de la respuesta y por basarse en un estudio secuencial de observaciones [11]. Cada valor de respuesta se compara, en cada caso, con los obtenidos anteriormente y del examen de ellos se decide cual es el siguiente punto experimental. Para un simplex bidimensional, el valor óptimo

se alcanza cuando los simplex se aproximan entre sí originando una figura hexagonal.

Aunque el simplex tiene la ventaja de moverse bien con un gran número de variables, en realidad es un método ciego ya que ni conoce, ni evalúa en ningún momento la superficie de respuesta. Su utilización no es muy extendida pues no aporta información adicional sobre el sistema y habría que hacer nuevos puntos experimentales, por ejemplo un diseño factorial [12], para evaluar numéricamente los efectos y/o calcular el óptimo encontrado.

La optimización utilizando el método simplex se ha utilizado en diversas áreas de la química analítica: espectroscopia de absorción molecular y atómica, espectrometría de plasma, cromatografía de gases, etc. Una buena revisión del tema puede encontrarse en el trabajo de Cela y Bustamante publicado en Química Analítica [13].

Puesto que la mayor desventaja del método simplex es el gran número de experimentos que debemos de realizar para alcanzar el óptimo, y que este número será tanto mayor cuanto más alejados del óptimo hayamos iniciado el proceso, se han propuesto varias modificaciones que se basan en procurar que el avance del simplex sea más rápido cuando está alejado del óptimo y más lento cuando está cerca, reduciendo por consiguiente el número de experimentos. Entre estas modificaciones se pueden destacar la del *Simplex Modificado*, que si se lleva hasta sus últimas consecuencias se llega al *Método de contracción masiva*, y la del *Simplex de Centroide Compensado* [14].

b.- Diseño Factorial 2^k

Los diseños factoriales son ampliamente utilizados en experimentos en los que intervienen varios factores para estudiar el efecto conjunto de éstos sobre la variable respuesta.

Para realizar un diseño factorial completo, se selecciona un número fijo de "niveles" para cada una de un conjunto de "variables" (factores) y se hace experimentos

con todas las combinaciones posibles. Si hay L_1 niveles para la 1ª variable, L_2 para la 2ª, ..., y L_k para la k -ésima, el conjunto de todas las $L_1 \times L_2 \times \dots \times L_k$ condiciones experimentales se llama "Diseño Factorial $L_1 \times L_2 \times \dots \times L_k$ " [15]. Aunque existen varios casos especiales de este tipo de diseño, los diseños factoriales a dos niveles (2^k , donde k es el número de variables), son considerados de gran importancia por varias razones:

- Requieren relativamente pocas unidades experimentales y nos permiten estudiar un número mayor de factores.

- Cuando se necesita una exploración más completa se pueden aumentar de modo sencillo para formar diseños compuestos.

- Forman la base de los diseños factoriales fraccionados a dos niveles.

En la tabla II.1, se muestra la matriz de un diseño factorial 2^3 y en la figura II.1, su correspondiente representación gráfica.

Tabla II.1. Matriz de un diseño factorial 2^3 .

Experimento	X_1	X_2	X_3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	-	+
4	+	-	+
5	-	+	-
6	+	+	-
7	-	+	+
8	+	+	+

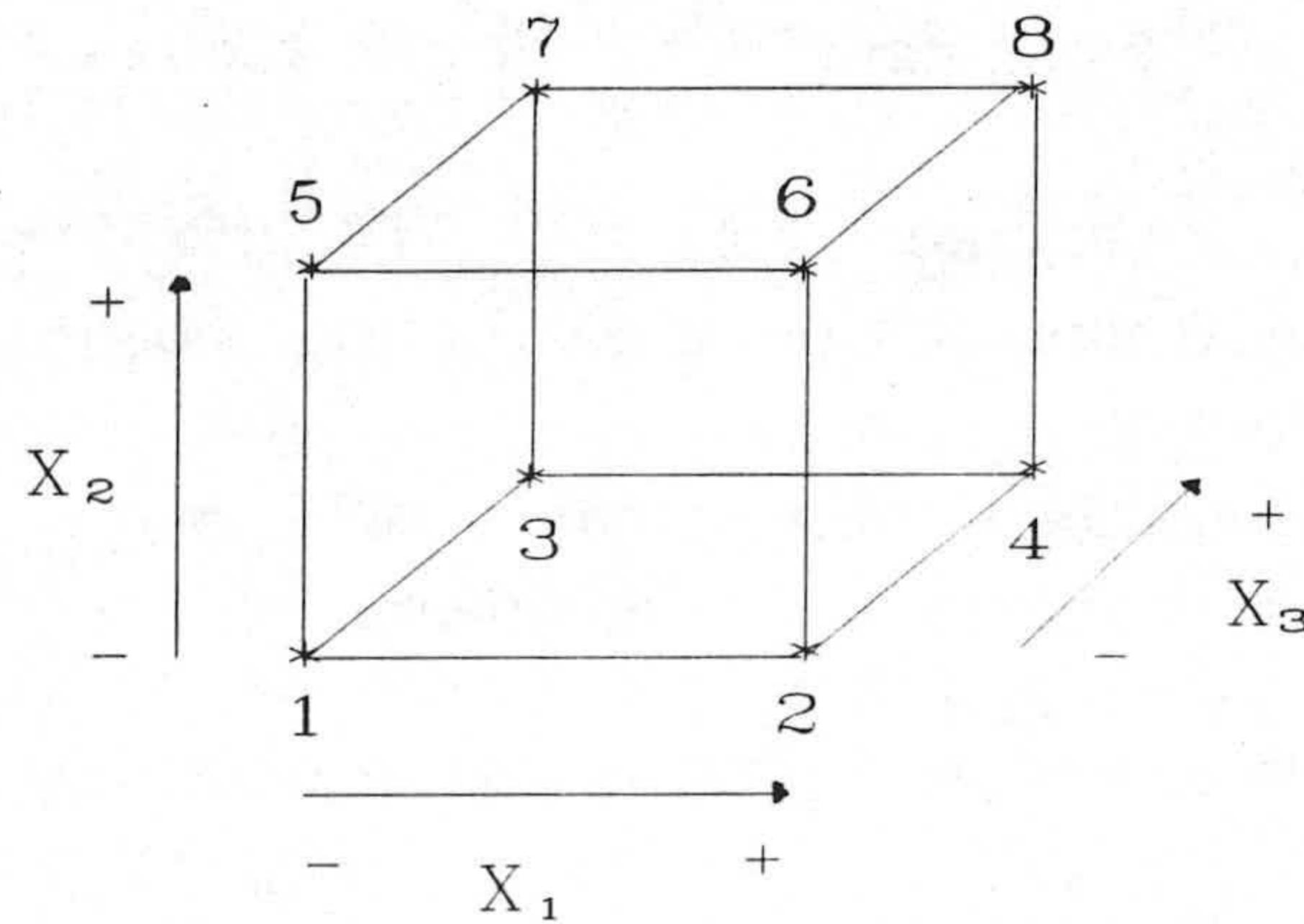


Figura II.1. Diseño factorial 2^3 . - y + indican el nivel más bajo y el más alto respectivamente.

Los diseños factoriales 2^3 son adecuados para la estimación de los efectos tanto de primer orden como de interacción, sin embargo dichos diseños fallan cuando existen efectos adicionales que son significativos tales como los de segundo orden [16].

Estos diseños factoriales 2^3 basados sobre los modelos de primer orden representan unos planos, generalmente, inclinados debido a los términos de interacción, en lugar de superficies de respuesta conteniendo un máximo [17].

c.- Diseños Factoriales Fraccionados a dos niveles

El número de experimentos elementales que requiere un diseño factorial 2^k completo aumenta geoméricamente al crecer k . Cuando k es grande la información deseada se puede obtener, casi siempre, realizando sólo una fracción del diseño factorial completo [18]. El hecho de que se puedan estimar todos los efectos, no implica que todos sean significativos. Existe cierta jerarquización ya que la importancia de los efectos

principales tiende a ser mayor que la de las interacciones de dos factores, que a su vez tiende a ser mayor que la de las interacciones de tres factores, y así sucesivamente.

Un uso importante de los factoriales fraccionarios se da en "los experimentos de escrutinio" [18]. El éxito en el empleo de estos diseños se basa en tres ideas clave [19]:

- *El efecto de dispersidad de efectos*: cuando existen varias variables, es probable que el sistema o proceso sea influido principalmente por algunos de los efectos principales e interacciones de orden inferior.

- *La propiedad de proyección*: los diseños factoriales fraccionarios pueden proyectarse en diseños más poderosos (más grandes) en el subconjunto de factores significativos.

- *Experimentación secuencial*: es posible combinar los experimentos de dos o más factoriales fraccionarios para conformar de manera secuencial un diseño más grande y estimar los efectos de los factores y las interacciones de interés.

En nuestro caso, hemos utilizado para estudiar la robustez de nuestro método analítico, dos diseños factoriales fraccionados saturados a dos niveles $2^{(7-4)}$ (fracción 1/16 y con 7 variables) y $2^{(3-1)}$ (fracción 1/2 y con 3 variables) centrados sobre el óptimo experimental (apartado 2.3.7 del mismo capítulo).

d.- Método EVOP

El método EVOP (Evolutionary Operation o Operación Evolutiva), propuesto por Box en 1957, es un algoritmo secuencial de búsqueda del óptimo basado por lo general en diseños 2^k factoriales.

El método establece rodear el primer punto con las experiencias propuestas por un diseño 2^k , formando lo que se denomina "un ciclo del EVOP", de forma que ese punto

inicial de trabajo corresponda al centro del diseño. En el caso de 2 factores, X e Y , la ecuación de la superficie de respuesta más sencilla que puede ajustarse a este modelo es:

$$R = \beta_0 + \beta_1 X + \beta_2 Y + \beta_{12} XY$$

donde β_0 es el término independiente y β_{12} el coeficiente correspondiente a la influencia de la posible interacción. β_1 y β_2 representan los términos de la influencia de los factores X e Y sobre la respuesta y corresponden a los valores que toman las derivadas de la ecuación anterior respecto a X e Y en el punto central $(0,0)$, que pueden interpretarse en forma vectorial tal y como se indica en la figura II.2.

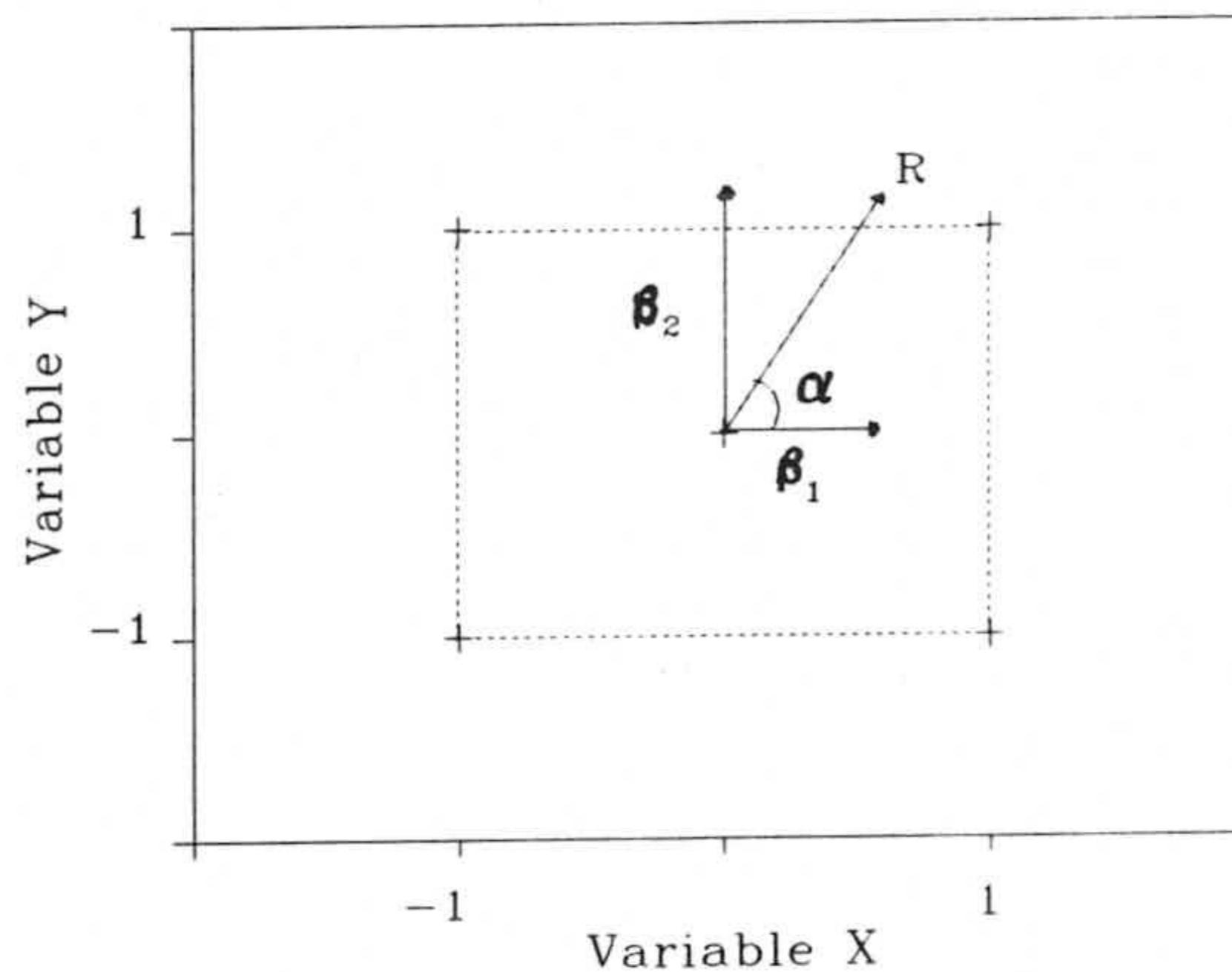


Figura II.2. Método de EVOP para dos variables, cada una a dos niveles. α es el ángulo formado por la resultante R con respecto al eje X , β_1 y β_2 representan los términos de la influencia de los factores.

La resultante de dichos vectores nos indica la dirección de máxima pendiente hacia la que hay que desplazar las condiciones experimentales para aproximarse al óptimo. El proceso de optimización implica recalcular con ellas los nuevos valores de β_1

y β_2 correspondientes al nuevo ciclo. Para dar por finalizado el proceso, existen dos criterios que acostumbra ser los que se presentan con mayor frecuencia en la práctica:

- Al realizar un nuevo ciclo de experiencias no se aprecia una mejora significativa de la respuesta. Esta situación corresponde bien a que se ha alcanzado una zona de respuesta constante, o bien a que el óptimo se encuentra en el interior del dominio experimental definido por el ciclo.

- Al evaluar la resultante de un ciclo, ésta nos indica como nuevo ciclo a realizar el ciclo anterior. En este caso las resultantes de los dos ciclos tienen sentidos opuestos dando lugar a que el proceso de optimización "rebote" entre ambos.

1.4.2.- Modelos de segundo orden

Los diseños correspondientes a este tipo de modelo deben tener por lo menos tres niveles de cada factor. Dichos diseños se construyen atendiendo a las siguientes propiedades: ortogonalidad, rotabilidad e isovarianza. Se pueden distinguir 6 clases fundamentales:

- * El diseño Factorial 3^k .
- * El diseño Compuesto Central.
- * El método de Box-Wilson.
- * El diseño de Box-Behnken.
- * El diseño Doehlert.

a.- Diseño Factorial 3^k

Es un diseño que consta de k factores con tres niveles cada uno, lo que permite modelar con una relación cuadrática entre la respuesta y cada factor. En general, estos niveles pueden referirse como nivel inferior, intermedio y superior y que se suelen

representar mediante los dígitos 0, 1 y 2 respectivamente. Sin embargo, es necesario señalar dos puntos:

- El diseño 3^k no es el mejor medio para modelar una relación cuadrática ya que los diseños que veremos a continuación son mejores alternativas.

- El diseño 2^k aumentado con puntos centrales es un excelente medio para obtener una indicación de curvatura, permitiendo así el mantener reducidos el tamaño y la complejidad del diseño y al mismo tiempo obtener cierta protección contra la curvatura.

El diseño más simple de la serie es el 3^2 (figura II.3). Este consta de dos factores y necesita 9 puntos experimentales.

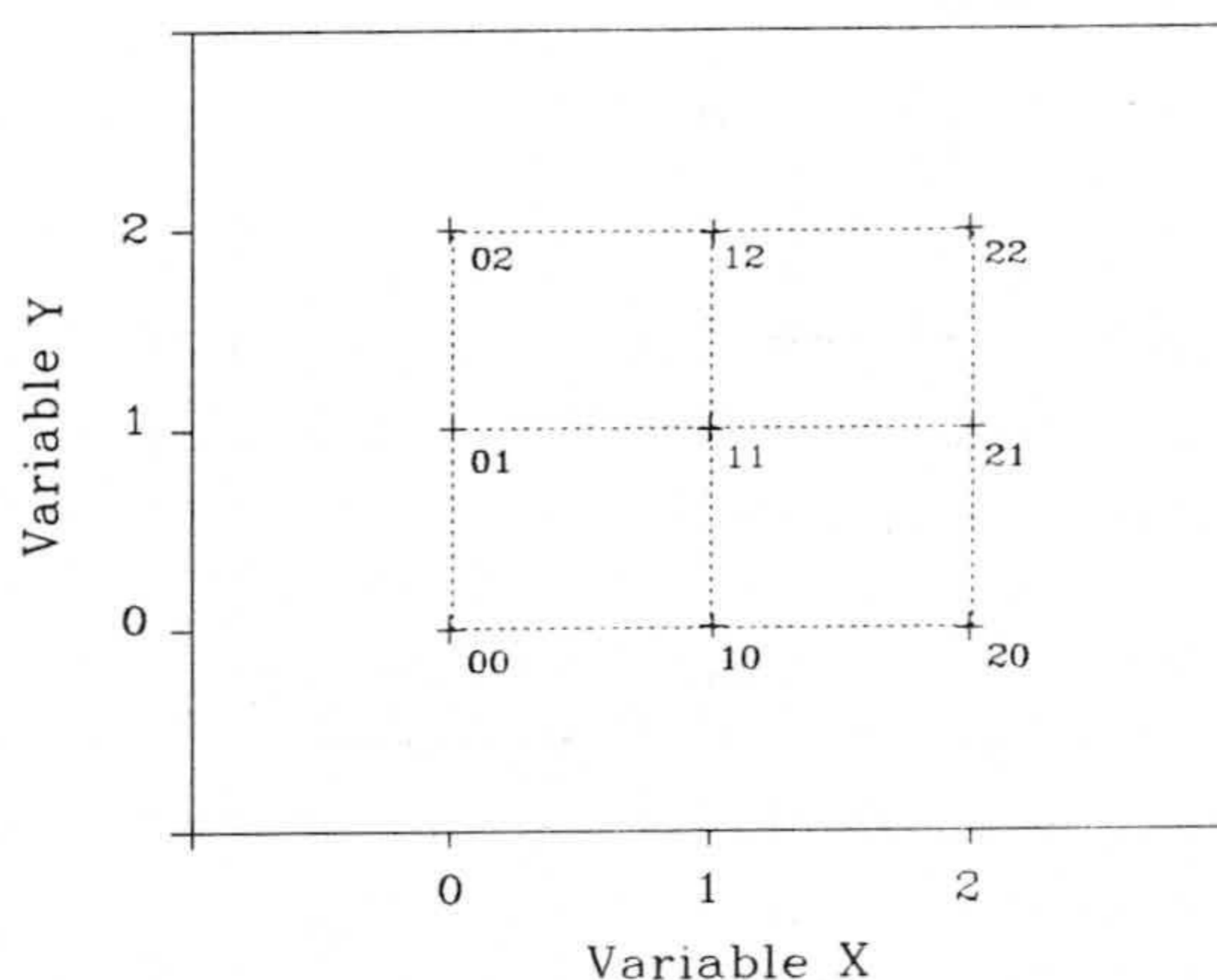


Figura II.3. Combinaciones de tratamientos en un diseño 3^2 .

b.- Diseño Compuesto Central

Este diseño consiste en un factorial o factorial fraccionario 2^k , aumentado por $2k$ puntos axiales, y n_c puntos centrales. Estos diseños necesitan un número relativamente alto de experimentos ($N=2^k+2k+1$, k es el número de variables a estudiar), sin embargo con el uso de los programas estadísticos de ordenador, el cálculo no supone ninguna limitación.

El diseño compuesto central es probablemente el diseño experimental más utilizado para ajustar superficies de respuesta de segundo orden por varias razones:

- Se convierte en rotatable mediante la elección de α . De hecho, $\alpha = (n_F)^{1/4}$ proporciona un diseño compuesto central rotatable, donde n_F es el número de puntos en la porción factorial del diseño.

- Puede "crecer" a partir de un diseño de primer orden (el 2^k) agregando los puntos axiales y quizás algunos puntos centrales.

- Puede controlarse mediante la elección del número de puntos centrales, n_c , ya que si la elección es adecuada, el signo de dicho diseño puede hacerse ortogonal o bien, transformarse en uno de precisión uniforme.

- Si $\alpha = 1$, este diseño se convierte en un diseño compuesto central centrado en las caras. Dicho diseño no es rotatable y esto se considera una seria desventaja.

En la figura II.4, se representa gráficamente un diseño compuesto central para tres variables, cuya matriz de diseño se recoge en la tabla II.2.

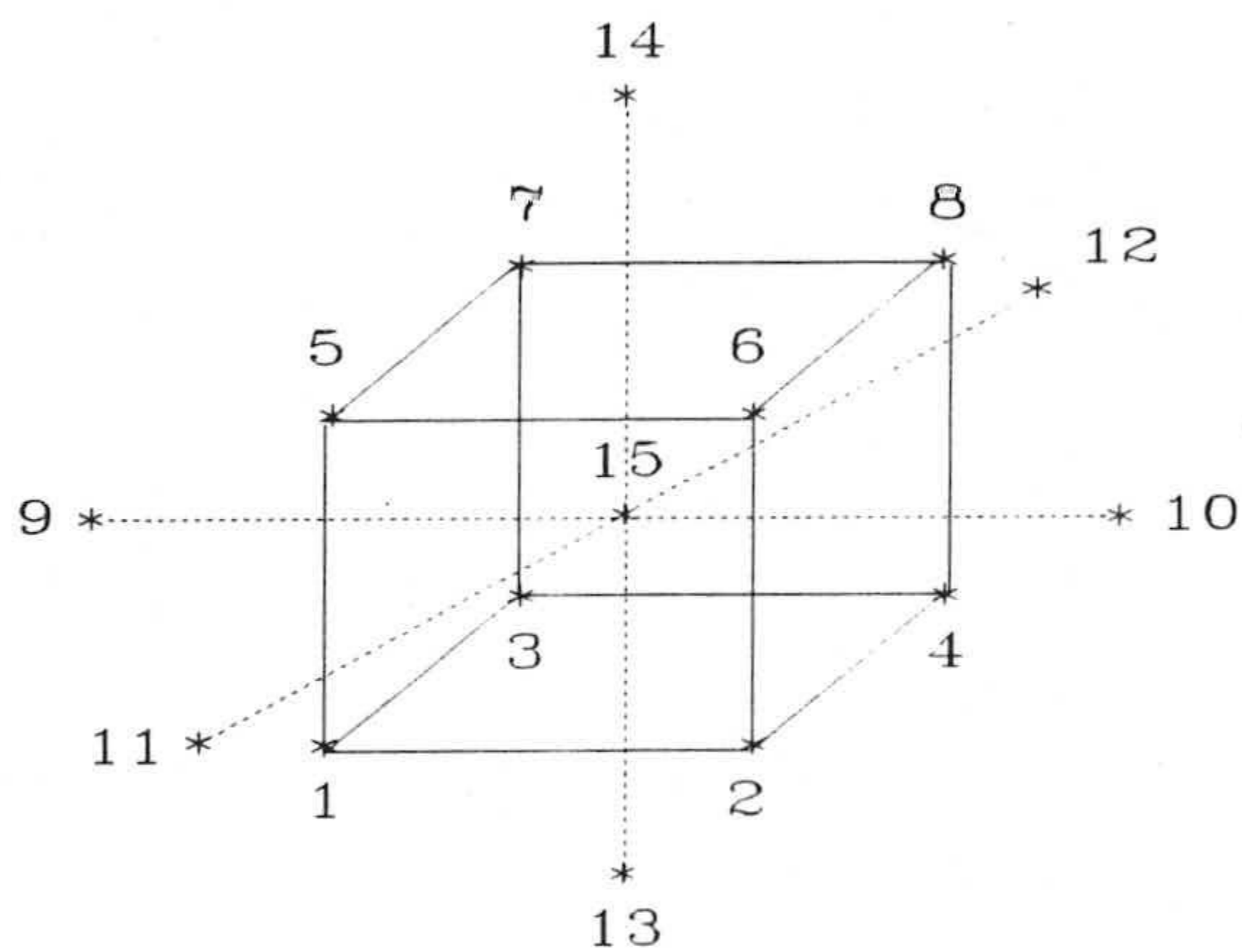


Figura II.4. Diseño compuesto central para tres variables.

Tabla II.2. Matriz del diseño compuesto central de tres variables.

Experimento	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	$-a$	0	0
10	a	0	0
11	0	$-a$	0
12	0	a	0
13	0	0	$-a$
14	0	0	a
15	0	0	0

c.- Método de Box-Wilson

Uno de los métodos más populares que se utilizan en MSR es el método de gradiente o máxima pendiente, "*steepest ascend*", propuesto por Box-Wilson y que implica la utilización de diseños factoriales, en principio a dos niveles hasta localizar la región del óptimo, y posteriormente a tres o más niveles para un estudio más detallado de la superficie de respuesta [20]. Este se realiza ajustando los valores experimentales a un polinomio de grado superior y a partir de esta ecuación, que representa la superficie de respuesta, aplicando la condición de máximo, se calculan los valores de las distintas variables que proporcionan el óptimo. Habitualmente se utilizan polinomios de grado 2, ya que estos describen adecuadamente la mayoría de los sistemas analíticos [21,22], para lo cual basta con un diseño experimental a tres niveles.

d.- Diseño de Box-Behnken

Box y Behnken, han propuesto algunos diseños de tres niveles para ajustar superficies de respuesta. Estos diseños se forman combinando factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos. Los diseños resultantes suelen ser más eficientes en términos del número de experimentos requerido, y son rotables (o casi rotables).

En la figura II.5, se ilustra geoméricamente un diseño de Box-Behnken para tres variables, mientras que en la tabla II.3, se recoge la matriz de dicho diseño.

e.- Diseño Doehlert

Los diseños de Doehlert [23], presentan una distribución uniforme de puntos sobre todo el espacio experimental, dispuesta según una red romboidal (en el caso de dos variables produce un hexágono, figura II.6).

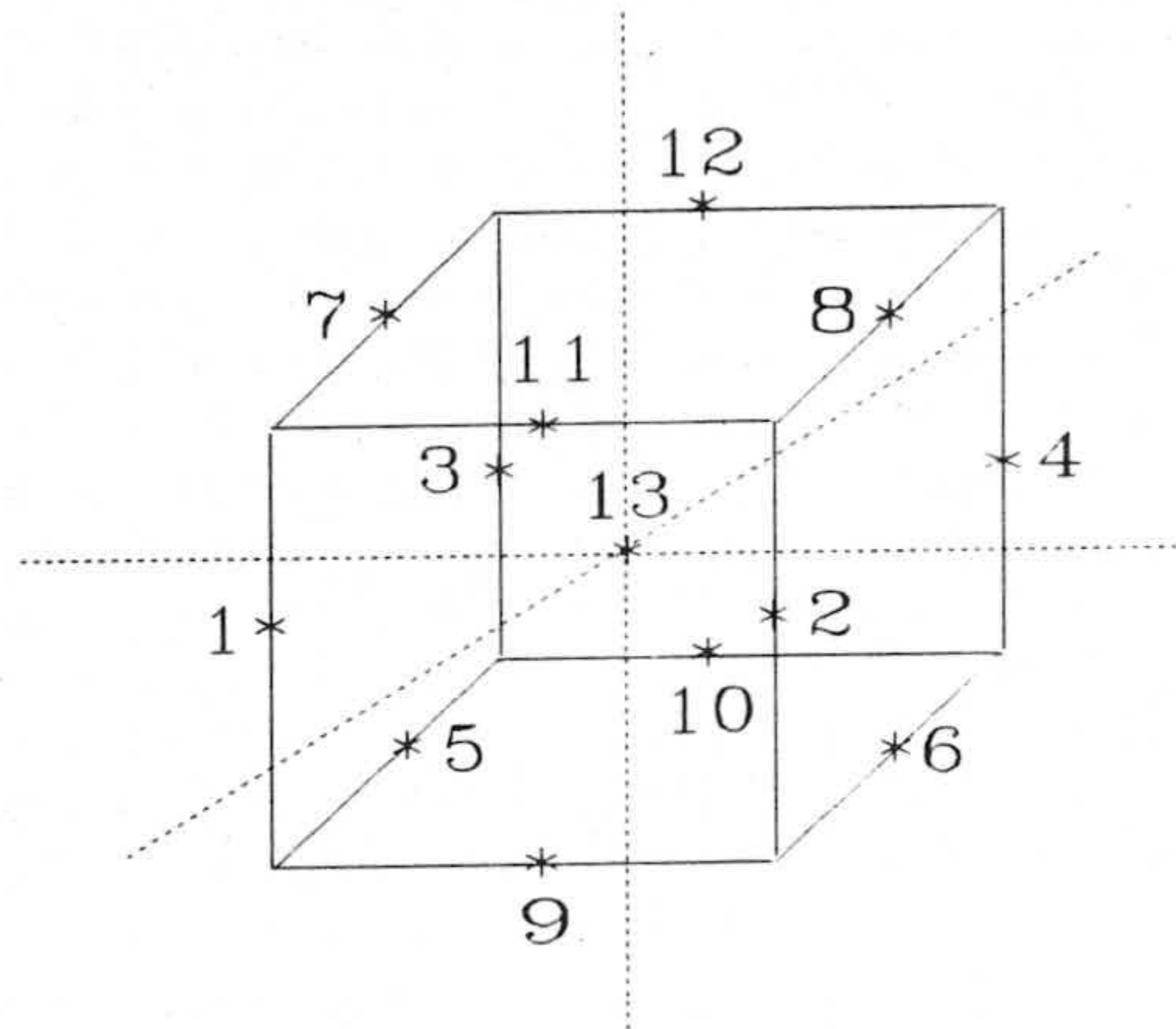


Figura II.5. Diseño de Box-Behnken para tres variables.

Tabla II.3. Matriz del diseño de Box-Behnken de tres variables

Experimento	X_1	X_2	X_3
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0

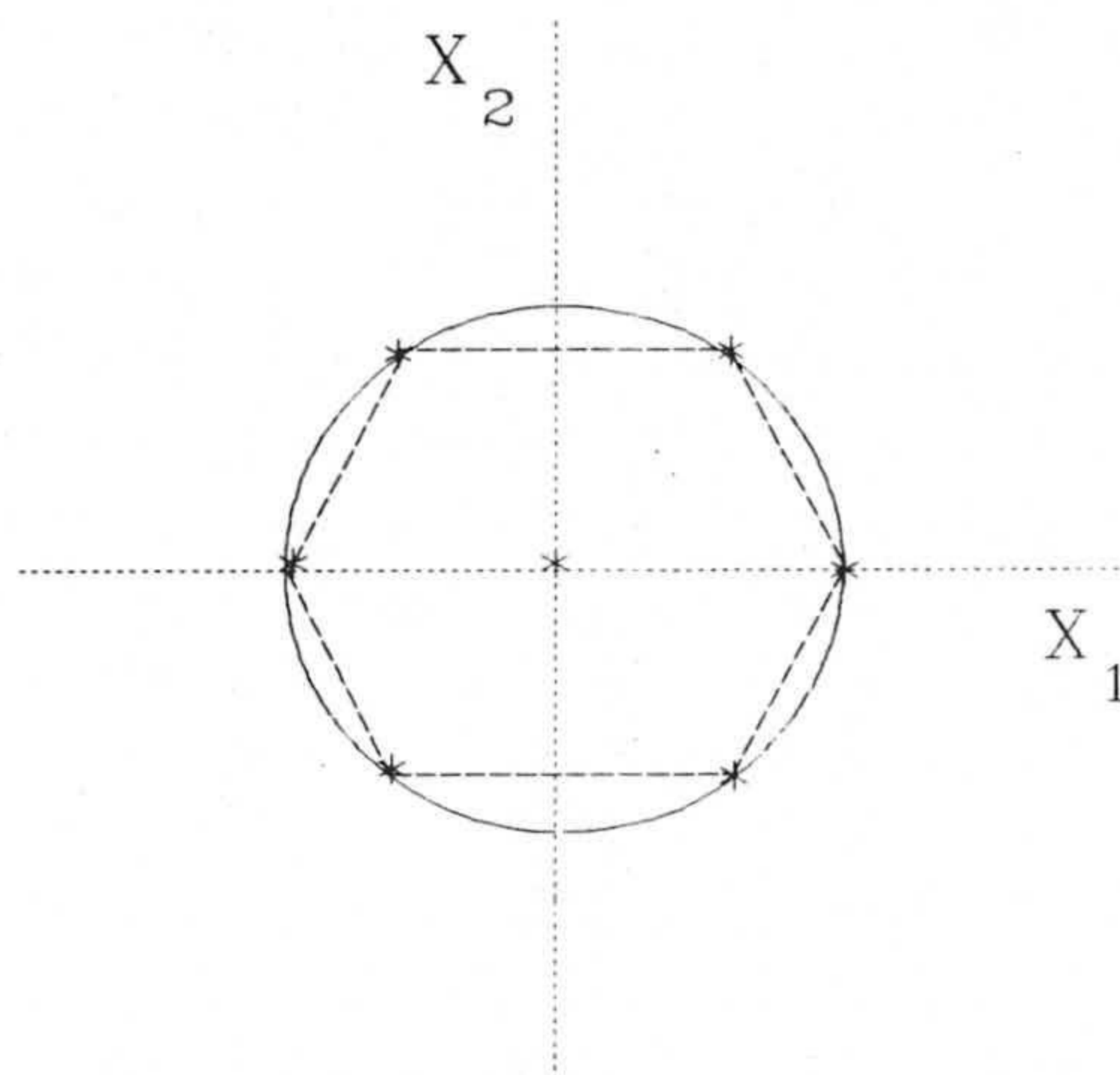


Figura II.6. Estructura del diseño Doehlert para dos variables.

Los diseños de Doehlert tienen una estructura adecuada para su utilización en Metodología de Superficies de Respuesta, así, poseen prácticamente todas las características señaladas anteriormente. Asimismo, requieren un número de experimentos menor ($N = k^2 + k + 1$) que los diseños compuestos centrales normalmente empleados en la Metodología de Superficie de Respuesta [20,24] y aunque no son ortogonales no se desvían significativamente de la calidad necesaria para su aplicación eficaz y segura [25].

Así, con un único diseño se puede localizar la región del óptimo con bastante aproximación, y si se desea una mayor precisión en su cálculo, basta con plantear un segundo diseño en la región previamente localizada. Por otro lado, estos diseños tienen una gran capacidad de movimiento a través del dominio experimental de las variables, lo que conlleva que se puedan utilizar bastantes datos de un diseño para el siguiente experimento (figura II.7).

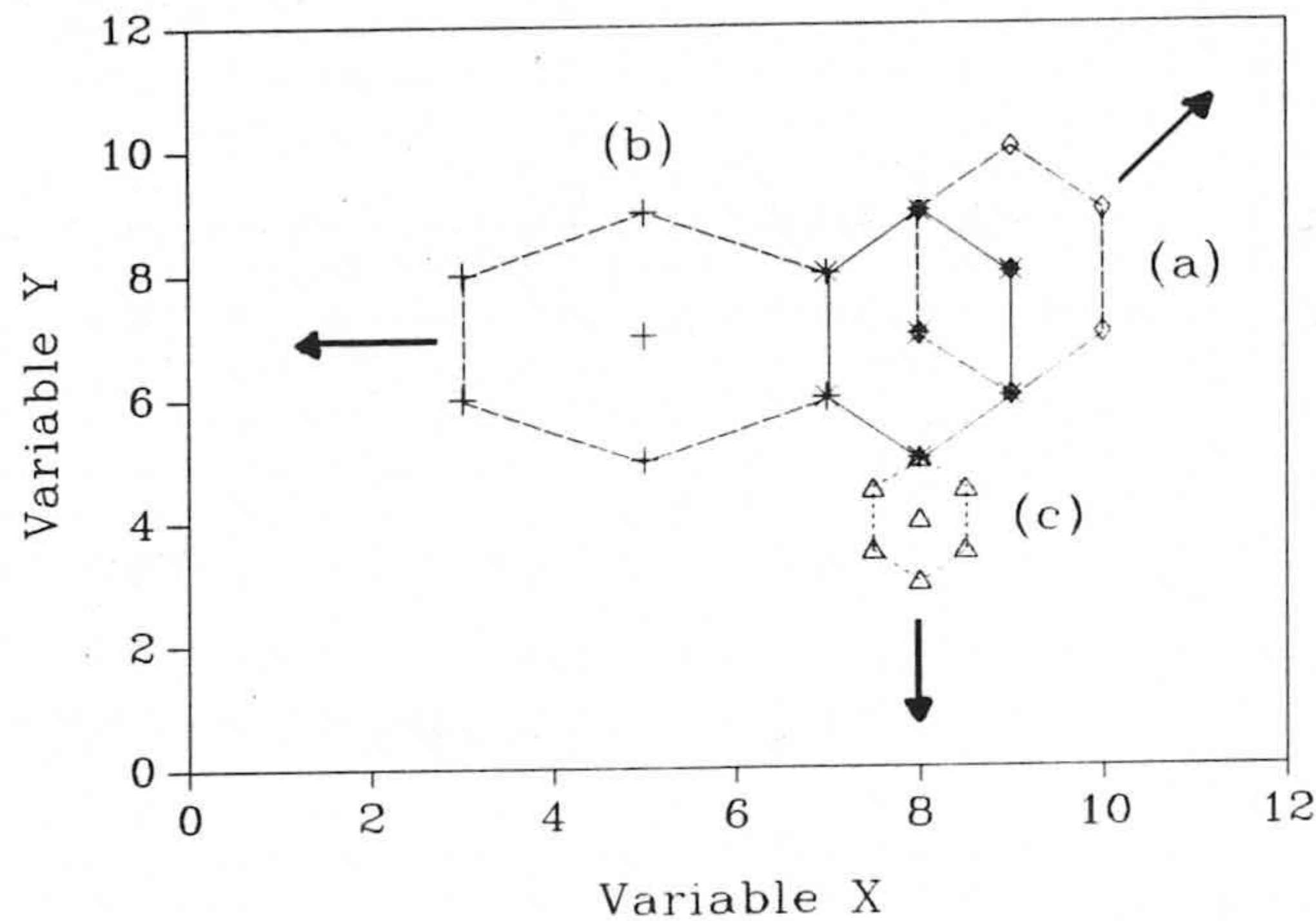


Figura II.7. Algunas posibilidades en la movilidad de los diseños Doehlert, en procedimientos secuenciales. (a) mismo tamaño y cuatro puntos experimentales comunes; (b) tamaño grande y dos puntos experimentales comunes; (c) tamaño pequeño y un punto experimental común.

Los diseños de Doehlert han sido utilizados en la optimización de sistemas cromatográficos [26], en el uso de microemulsiones como portadores de drogas [27] y en la interpretación de los factores que influyen en la determinación de analitos por Absorción atómica electrotérmica [28,29].

1.5.- Optimización de variables en Espectrofotometría en Fase Sólida

La optimización de las variables experimentales en Espectrofotometría en Fase Sólida (EFS) puede, por una parte, requerir un gran número de experiencias, lo que implica un elevado consumo de tiempo (entre 10-60 min, por punto experimental), mientras por otra parte, la interacción mutua de dichas variables puede motivar la formación de compuestos coloreados con distinta estequiometría, lo que se traduciría en la existencia de más de un valor óptimo en dicha selección de variables experimentales [30]. Por lo tanto, la utilización de la metodología de optimización basada en el uso de

diseños experimentales multidimensionales se hace adecuada para los usuarios de esta técnica.

Aquí proponemos la utilización de los diseños Doehlert para la optimización de las concentraciones de 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) y de KI debido a la influencia que ejercen estas variables sobre la formación y la fijación de sus complejos con el analito en el cambiador. Para ello, nuestro objetivo es hallar las concentraciones óptimas de dichas variables que maximizan la respuesta, así como estudiar las posibles interacciones entre ellas. El estudio de este proceso, se ha llevado a cabo sobre dos sistemas: Zn-PAR y Cd-PAR, en presencia de KI y para dos volúmenes (100 y 500 mL).

Con la aplicación de los diseños Doehlert en Espectrofotometría en Fase Sólida, la optimización de variables puede realizarse de forma sencilla y rápida y con mayor eficacia en comparación a la metodología tradicional. Hecho que ha podido ser comprobado en esta Memoria, ya que en el trabajo experimental se han utilizado tanto métodos de optimización univariante como multivariante.

Esta red originalmente regular de los diseños Doehlert, puede deformarse un poco con el fin de facilitar el acceso a los valores necesarios para realizar cada experimento, de esta manera las coordenadas "y" de los puntos del diseño con un valor de $\sqrt{3}/2$ se transforman en 1 (figura II.8).

Para la optimización de las variables utilizando diseños de Doehlert, es necesario en primer lugar el establecimiento del diseño elegido; en segundo lugar, proceder a la obtención de los valores experimentales correspondientes. Tras lo cual, y utilizando el programa adecuado (en nuestro caso, el programa STATGRAPHICS), obtener la ecuación de segundo orden a la que se ajustan nuestros datos experimentales. A continuación, habrá que realizar un estudio de dicha ecuación, a fin de obtener el óptimo -si lo hubiera- de acuerdo con el siguiente esquema de trabajo:

- Comprobación de las hipótesis matemáticas.
- Comprobación del modelo de segundo orden.

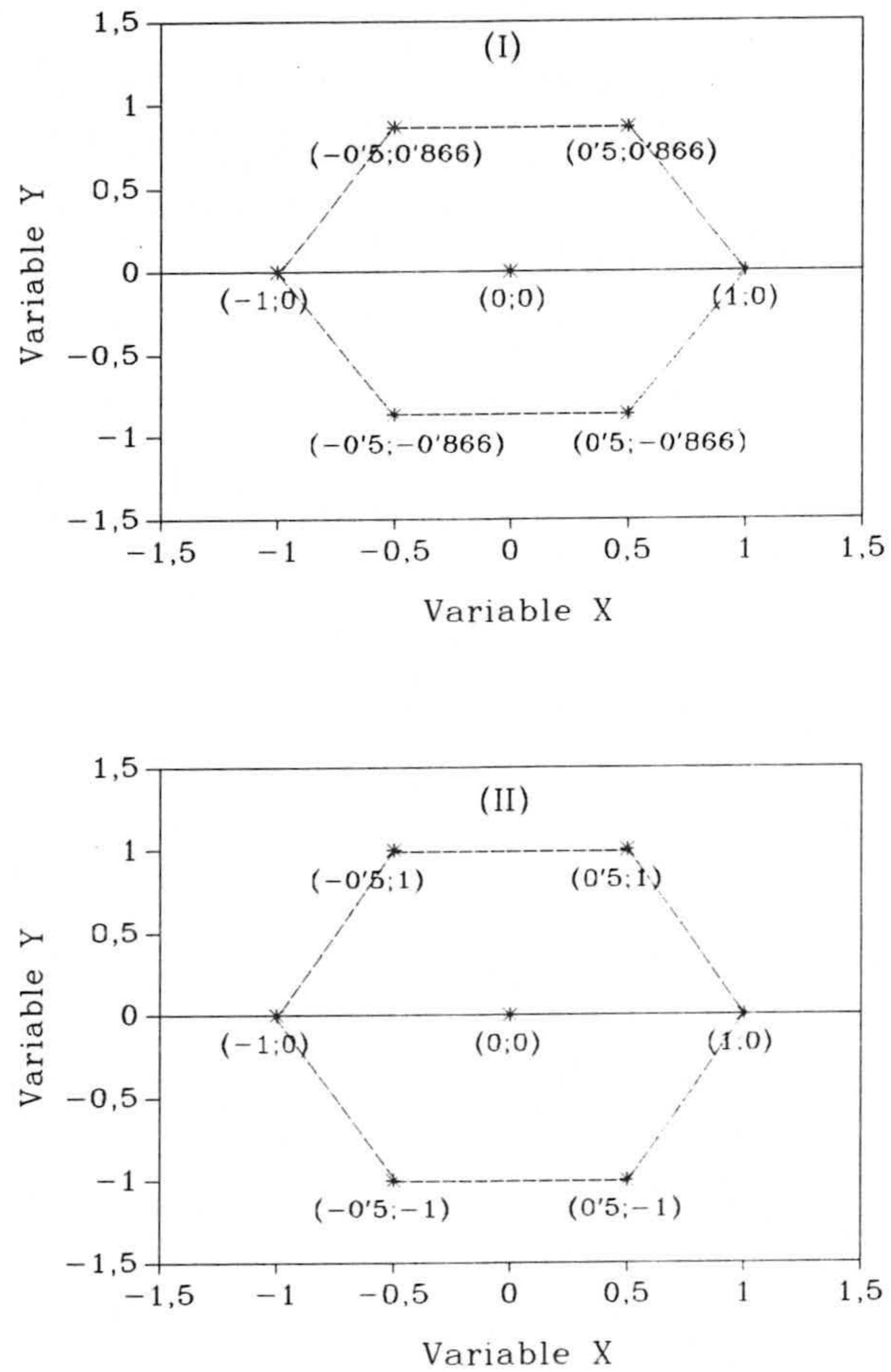


Figura II.8. Diseños Doehlert centrados para dos variables. (I) diseño regular, (II) diseño deformado.

- Análisis de la varianza.
- Estimación de los coeficientes del modelo de segundo orden.
- Estudio de la superficie de respuesta estimada.
- Obtención de los valores óptimos.

- Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

La comprobación de las hipótesis matemáticas puede llevarse de forma gráfica mediante el análisis de los residuales. Así y para elegir los factores, sus valores y obtener conclusiones, se requieren una serie de principios básicos de tipo estadístico:

* *Aleatorización*: el orden del conjunto de experimentos y del sistema experimental debe de elegirse aleatoriamente.

* *Normalización*: una forma de comprobar la normalidad consiste en construir una gráfica de probabilidad normal tanto de los valores de respuesta como de sus residuos. En el caso de que exista cumplimiento de dicha hipótesis, esta gráfica suele ser una línea recta.

* *Homogeneidad de las varianzas*: la comprobación de esta hipótesis se consigue representando los residuos en función de los valores de una de las variables. Dicha gráfica no debe mostrar una forma de embudo o de campana.

* *Independencia*: se deduce a partir de una gráfica de los residuos frente a los valores predichos de la variable respuesta. Un paso importante para asegurar la independencia es realizar un procedimiento apropiado de aleatorización.

- Comprobación del modelo de segundo orden

La comprobación del modelo de regresión de segundo orden se lleva a cabo mediante la representación gráfica de la variable respuesta observada (experimental) frente a aquella predicha por el modelo. Asimismo, el coeficiente de determinación r^2 nos mide el porcentaje de variabilidad de la variable dependiente que nos explica nuestro modelo de regresión, por lo tanto, cuanto más se acerque el valor del coeficiente de determinación a 1, podremos decir que mejor se ajustan los puntos experimentales al modelo.

- Análisis de la varianza

El análisis de la varianza (ANOVA) ofrece la posibilidad de conocer los niveles de significación, P, para cada uno de los coeficientes de regresión del modelo de segundo orden. En la tabla II.4, se recoge el análisis de la varianza para el diseño utilizado.

Tabla II.4. Tabla de ANOVA.

Efecto	SC	g.l.	MC	F_{cal}	P (%)
A	SC_A	1	MC_A	F_A	P_A
B	SC_B	1	MC_B	F_B	P_B
AB	SC_{AB}	1	MC_{AB}	F_{AB}	P_{AB}
AA	SC_{AA}	1	MC_{AA}	F_{AA}	P_{AA}
BB	SC_{BB}	1	MC_{BB}	F_{BB}	P_{BB}
Error total	SC_T	1	MC_T	F_T	P_T
Total (corr.)	SC_{TC}	6			

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

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

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

A esta misma conclusión se puede llegar observando los niveles de significación. De este modo, si P es menor de un 5% se dirá que el coeficiente de regresión es

significativo; si por el contrario P es mayor que un 5%, dicho coeficiente no será significativo. El valor de P representaría la probabilidad de que el efecto del coeficiente de regresión sea debido únicamente al error aleatorio.

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

También se han evaluado los efectos estandarizados de cada factor obtenidos al dividir el efecto estimado (tabla II.5), de cada uno de ellos, por su correspondiente error estándar. La representación gráfica de éstos parámetros es otra estimación de los factores influyentes en el sistema ya que si algún valor del efecto estandarizado sobrepase el error estándar estimado a partir del error total con 1 g.l., $t = 12.7062$, se dirá que el efecto de la variable es significativo.

Tabla II.5. Tabla de los efectos estandarizados.

Efecto	Efecto estimado	Error estándar	Efecto estandarizado
Promedio	E_p	S_p	-----
A	E_A	S_A	EE_A
B	E_B	S_B	EE_B
AB	E_{AB}	S_{AB}	EE_{AB}
AA	E_{AA}	S_{AA}	EE_{AA}
BB	E_{BB}	S_{BB}	EE_{BB}

- Estimación de los coeficientes del modelo de segundo orden

A partir de las variables respuestas obtenidas con el diseño Doehlert, es posible estimar los coeficientes de regresión de una función respuesta del tipo:

$$R(X,Y) = \beta_0 + \beta_X X + \beta_Y Y + \beta_{XX} X^2 + \beta_{YY} Y^2 + \beta_{XY} XY$$

donde $R(X,Y)$ es la respuesta analítica del sistema, X y Y son las variables a optimizar, β_0 es un término independiente, β_X y β_Y representan los coeficientes del término lineal y β_{XX} , β_{YY} y β_{XY} los coeficientes del término cuadrático.

- Estudio de la superficie de respuesta estimada

La representación de la ecuación anterior muestra la superficie de respuesta estimada de la variable respuesta en función de las dos variables a optimizar.

- Obtención de los valores óptimos

La aplicación de los diseños Doehlert para dos variables sobre la zona elegida del espacio experimental proporciona la estimación de la relación funcional que representa a la superficie de respuesta de nuestro sistema. El análisis de esta función $R(X,Y)$, que corresponde a un modelo cuadrático, permite establecer dos circunstancias:

a.- La existencia de un máximo en la función mediante la aplicación del criterio de Lagrange [31]:

Un punto crítico (x_0, y_0) de una función $R(X,Y)$ 2-derivable es:

* Mínimo relativo si $H(x_0, y_0) > 0$ y $\partial^2 R / \partial x^2(x_0, y_0) > 0$

* Máximo relativo si $H(x_0, y_0) > 0$ y $\partial^2 R / \partial x^2(x_0, y_0) < 0$

* Punto de silla si $H(x_o, y_o) < 0$, donde:

$$H(x, y) = (\partial^2 R / \partial x^2)(\partial^2 R / \partial y^2) - (\partial^2 R / \partial x \partial y)^2$$

se denomina determinante hessiano de R .

Si el punto crítico resulta ser un máximo, la posición del óptimo se localiza algebraicamente, mediante la resolución de:

$$\partial R / \partial x = 0 \quad \text{y} \quad \partial R / \partial y = 0$$

Los valores de las variables encontrados, X_{\max} e Y_{\max} , en el óptimo, podrán ser utilizados en el procedimiento operatorio del futuro método analítico. Dicho óptimo ha de encontrarse dentro de la zona experimental abarcada por el diseño realizado, en caso contrario sería necesario llevar a cabo un nuevo diseño Doehlert alrededor del óptimo calculado en el diseño anterior.

b.- La no existencia de máximo en la función estimada para la superficie de respuesta de nuestro sistema:

Esto implicaría la necesidad de realizar un nuevo diseño Doehlert en la zona donde se estima la presencia del óptimo del sistema. Para localizar la zona del posible máximo es necesario buscar la dirección de máxima variación de la respuesta. El cálculo del vector gradiente [31] sobre 2 o más puntos del diseño inicial, nos permitirá encontrar dicha dirección.

$$\vec{\nabla} R(x_o, y_o) = \partial R / \partial x(x_o, y_o) \vec{i} + \partial R / \partial y(x_o, y_o) \vec{j}$$

El punto de corte de las rectas orientadas sobre las direcciones de los vectores gradientes indicará la región donde presumiblemente podemos encontrar el máximo de la respuesta (figura II.9).

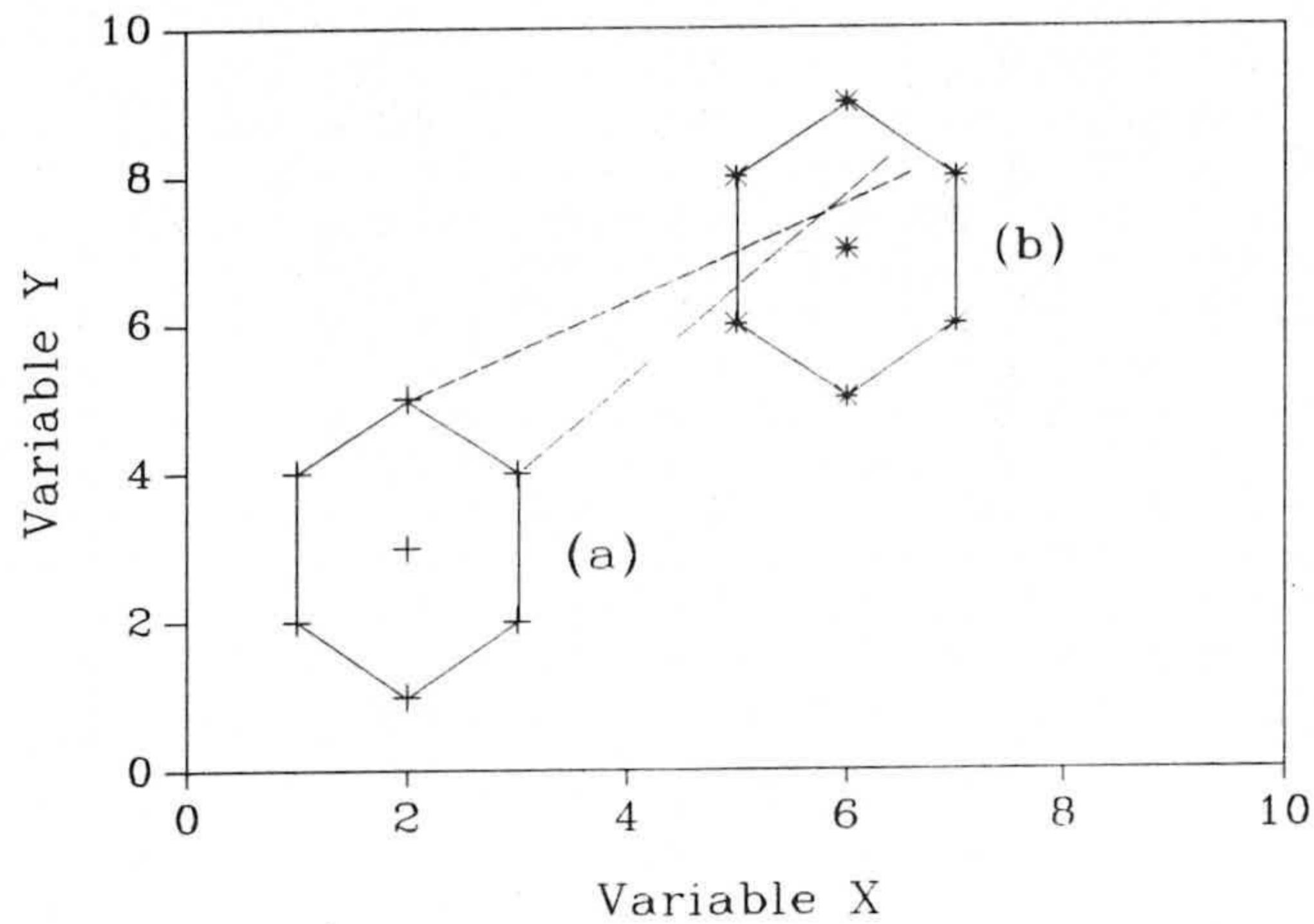


Figura II.9. Elección de un nuevo diseño experimental cuando la función respuesta no presenta un máximo. (a) primer diseño; (b) diseño nuevo.

Ecuación de la recta: $y = a + bx$

donde b y a tienen las siguientes expresiones:

$$b = \operatorname{arctg} \frac{[\partial R / \partial y (x_o, y_o)]}{[\partial R / \partial x (x_o, y_o)]}$$

$$a = y_o + bx_o$$

La repetición del proceso ya descrito y recogido en la figura II.10, permitirá la obtención del máximo si lo hubiera. En dicha figura, se representa un diagrama de flujo donde se recoge el procedimiento para el cálculo de los valores de las variables independientes que proporcionan una señal analítica máxima utilizando los diseños Doehlert.

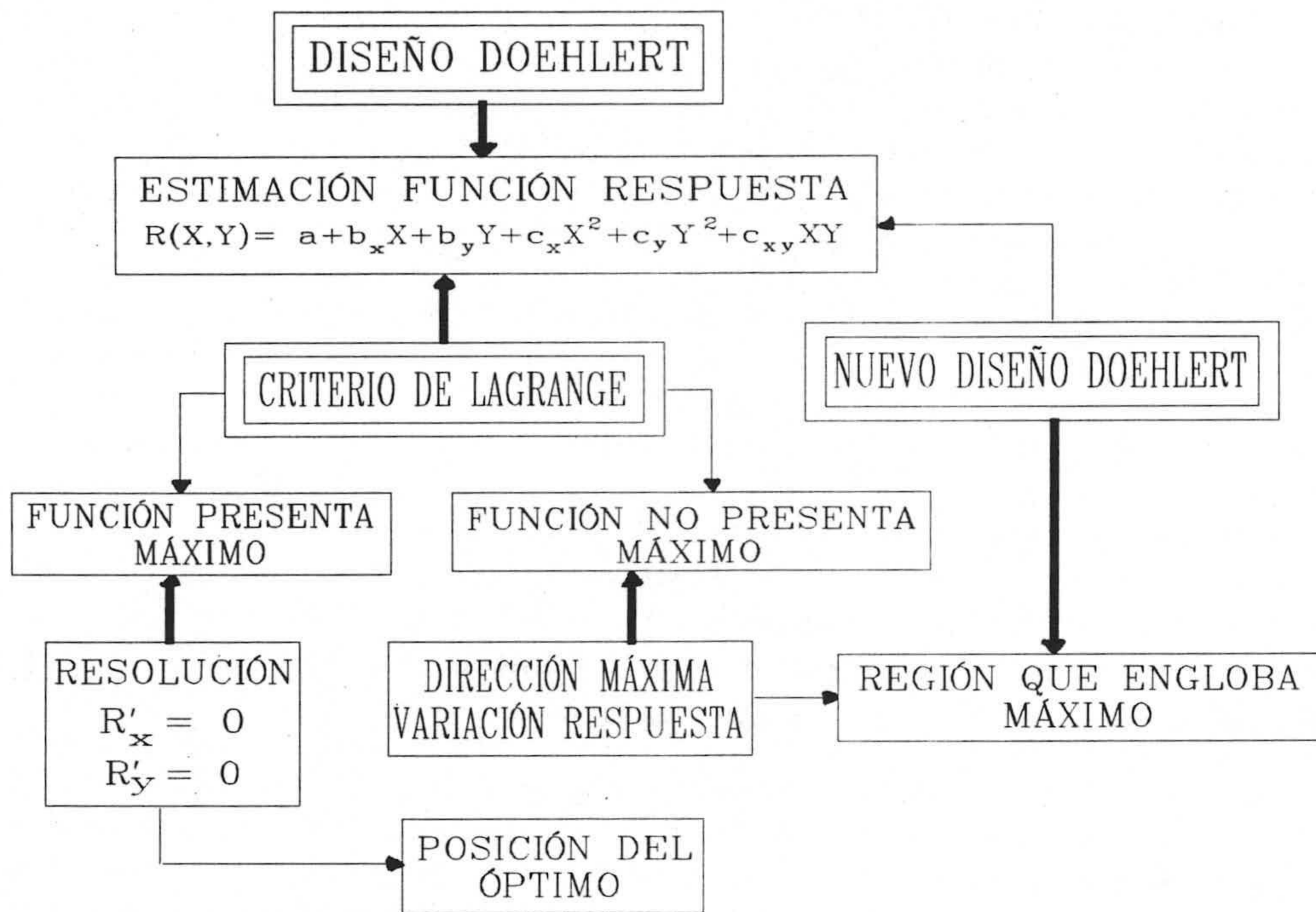


Figura II.10. Diagrama de flujo para la aplicación de los diseños Doehlert en la optimización de los métodos analíticos.

2.- VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE ANÁLISIS

Validar un método de análisis, según Rius [32], consiste en verificar su adecuación a unos requisitos llamados parámetros de calidad. Estos se definen, de acuerdo con Wilson [33], como un conjunto de valores cuantitativos experimentalmente determinados para evaluar lo apropiado que es un método analítico para cualquier propósito dado.

Estos parámetros pueden ser de tipo:

- Estadístico/quimiométrico.
- Operativo/económico.

Dentro del primer tipo figuran dos grupos, por una parte los parámetros estadísticos fundamentales como son la *exactitud* y la *precisión* y por otra, los quimiométricos como la *linealidad*, *sensibilidad*, *límites del método*, *rango dinámico lineal*, *robustez* y *selectividad*. Estos parámetros son los que constituyen **las características de fiabilidad** del método y demuestran su capacidad para mantener, a lo largo del tiempo, los criterios fundamentales de validación.

Dentro del segundo tipo figuran tanto **las características de practicabilidad** como de **idoneidad** del método. Las primeras son las que deciden si el procedimiento analítico es fácil ó difícilmente realizable en la práctica, como son la *rapidez del análisis*, *coste*, *seguridad*, *facilidad*, *habilidad personal*, *disponibilidad*. Mientras las segundas características se definen como el conjunto de parámetros que garantiza que el sistema responda, en el momento del análisis, a los requisitos fijados en la validación del método.

Dado que el objetivo, hoy en día, de la química analítica es la obtención de la mayor cantidad posible de información de alta calidad a costa del menor material, tiempo y esfuerzo humano, minimizando tanto los riesgos como el coste, algunas veces se debe llegar a una situación de equilibrio entre todos ellos [34].

2.1.- Rechazo de valores anómalos

Según Ortiz [35], el concepto de dato anómalo es cualitativo en el sentido de que no equivale al dato erróneo sino al dato distinto de la mayoría. En ocasiones, la presencia de datos anómalos pone de manifiesto la existencia de algún fenómeno no esperado al comienzo de la experimentación pero explicable bien por causas experimentales, bien por causas químicas.

Es el caso cuando se analiza una muestra repetidas veces mediante un método opuesto y se obtienen unos resultados, entre los cuales se sospecha la presencia de algún dato anómalo. Para rechazar estos valores dudosos, existen varias pruebas

estadísticas como el test Q de Dixon, el R de Grubbs o el test t [36]. Dichos tests han sido aplicados en los trabajos que se recogen en esta memoria.

2.2.- Calibración lineal univariante

La calibración lineal univariante, es una de las herramientas más usadas en la química analítica, donde la finalidad primordial es conocer la concentración C de analito presente en una muestra a partir de la señal ó respuesta medida, R , mediante un modelo de línea recta:

$$R = a + b C \quad (1)$$

siendo a y b el término independiente y la pendiente respectivamente de la recta de calibrado.

2.2.1.- El modelo de regresión lineal univariante

En realidad, para n pares de valores concretos C_i y R_i ($i = 1, 2, \dots, n$), la relación existente entre una concentración (variable independiente), C_i , y su correspondiente señal (variable dependiente), R_i , se expresa:

$$R_i = a + b C_i + e_i \quad (2)$$

siendo e_i el valor del error aleatorio asociado a la señal ó simplemente "residuo" y representa la diferencia entre el valor observado, R_i , y el valor predicho, \hat{R}_i , por el modelo. Las ecuaciones correspondientes son:

$$e_i = R_i - \hat{R}_i \quad (3)$$

$$\hat{R}_i = a + b C_i \quad (4)$$

Para hallar las mejores estimaciones de a y b se pueden utilizar varios criterios matemáticos, pero el más usado es el que minimiza la suma de cuadrados de los residuos, conocido como el método de mínimos cuadrados (least squares, LS), ya que proporciona las estimaciones más precisas entre las exactas:

$$\sum e_i^2 = \sum (R_i - \hat{R}_i)^2 \quad (5)$$

2.2.2.- Comprobación del modelo establecido

Para poder aplicar el método de mínimos cuadrados, las variables e_i , ó residuos, tienen que cumplir las siguientes hipótesis estadísticas: aleatoriedad e independencia, normalidad y homoscedasticidad que se verifican llevando a cabo respectivamente los tests de Durbin-Watson, Kolmogoroff o D'Agostino y Barlett. Sin embargo, la necesidad de tener réplicas de cada experimento para, en general, aplicar dichos tests de hipótesis, obliga frecuentemente a utilizar un sistema menos riguroso pero más aplicable desde el punto de vista práctico, el análisis gráfico de los residuales [37,38] representando e_i frente a los valores de C_i ó de R_i .

En la figura II.11, se da un ejemplo de la representación de e_i frente a los valores de la concentración, C_i , donde se ve perfectamente como los residuales se hacen grandes a medida que aumenta la concentración: es un caso de desigualdad de varianzas (heteroscedasticidad).

2.2.3.- Comprobación del ajuste de los datos experimentales al modelo lineal

En el trabajo recogido en esta memoria, la comprobación del grado de acoplamiento del modelo a los puntos experimentales se lleva a cabo de la siguiente manera:

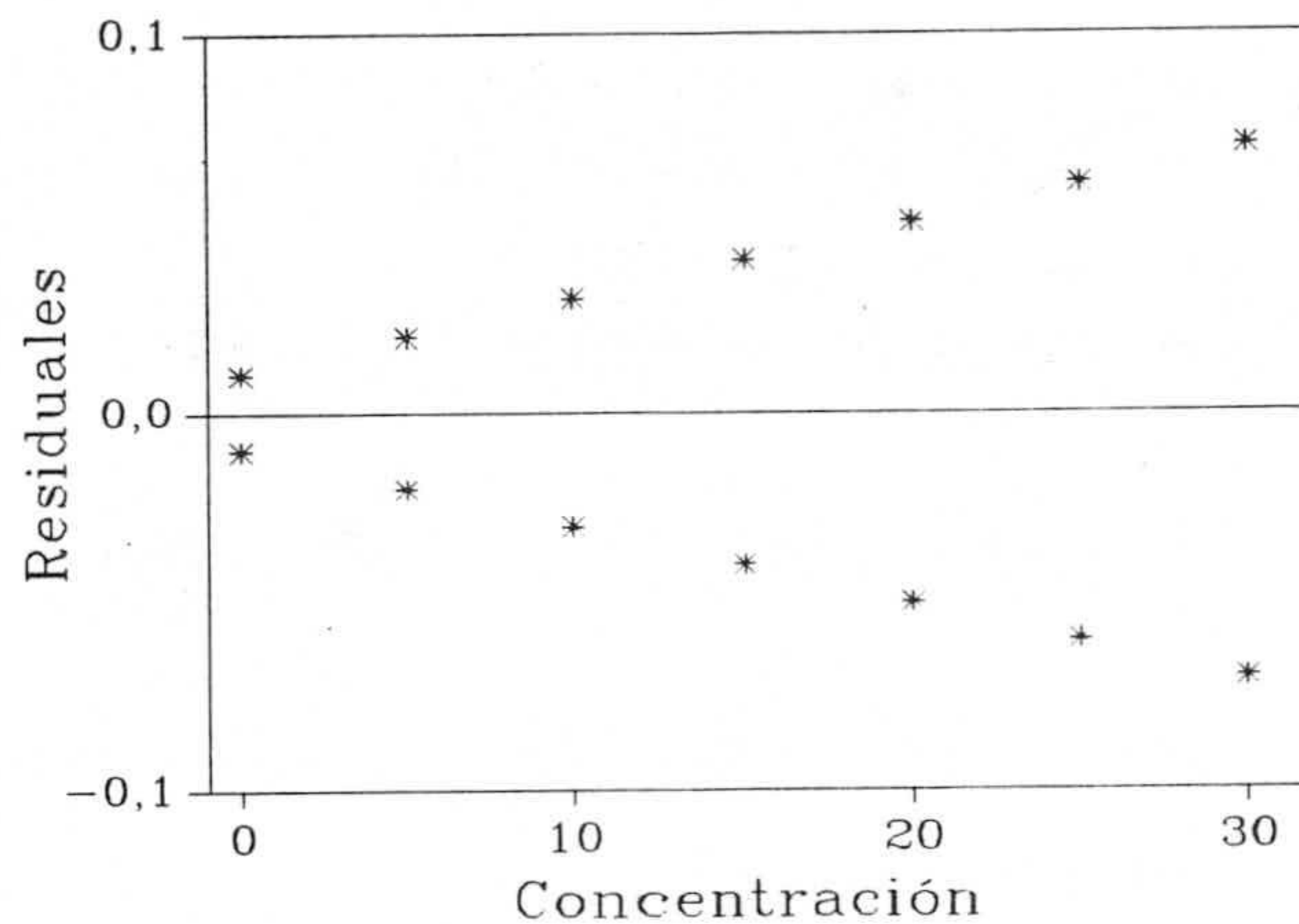


Figura II.11. Gráfico de los residuales.

- Cuando existen réplicas, se utiliza la estimación del fallo de ajuste mediante un test de Análisis de la Varianza (ANOVA).

- Cuando no hay réplicas, se recurre al uso del coeficiente de variación de los factores de respuesta y/o la regresión robusta (least median squares).

Hay que señalar que la idea de utilizar exclusivamente el coeficiente de correlación, r , como parámetro estimador de la calidad de un ajuste sólo por el número de nuevas que muestra, es incorrecta [39].

a.- Evaluación del "fallo de ajuste" (cuando existen réplicas)

Dicho test, según Analytical Methods Committee [40], se lleva a cabo realizando una serie de m réplicas para cada valor de C_i y calculando el estadístico:

$$F_{cal} = \frac{S_{LOF}^2}{S_{PE}^2} \quad (6)$$

que se compara con el valor F_{tab} , para un nivel de confianza α y con $k-2$ y n

grados de libertad, donde k y n son el número de patrones de calibración diferentes y el número total de observaciones respectivamente. s_{LOF}^2 y s_{PE}^2 representan las varianzas asociadas con el grado de acoplamiento y al error puro, respectivamente, y vienen dadas por:

$$s_{LOF}^2 = \frac{\sum m(\bar{R}_i - \hat{R}_i)^2}{k-2} \quad (7)$$

$$s_{PE}^2 = \frac{\sum \sum (R_{ij} - \bar{R}_i)^2}{n-k} \quad (8)$$

siendo \bar{R}_i el valor medio de las m réplicas R_{ij} para C_i y \hat{R}_i el valor de la señal predicha a partir del modelo lineal.

b.- Evaluación de la linealidad cuando no existen réplicas

- Coeficiente de variación de los factores de respuesta

El factor de respuesta se define como la relación existente entre la lectura (señal) y la concentración. Así, en una calibración lineal, los factores de respuesta son semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente de la recta de calibrado. Por eso se puede considerar el coeficiente de variación de los factores de respuesta como una estimación de la linealidad: un coeficiente de variación superior al 5% indicaría una falta de linealidad en los datos [41].

- Regresión por mínima mediana de cuadrados

Dada la incapacidad de los métodos convencionales de regresión ante el problema de la "no normalidad" de los residuales y la presencia de los "outliers", han sido propuestos los métodos robustos, para solucionar estos problemas y corregir los

errores del modelo en las aplicaciones de calibración así como en comparar dos procedimientos, entre otras aplicaciones.

Los métodos robustos pueden ser clasificados, de acuerdo con sus objetivos, en métodos de regresión, métodos de detección de los outliers (diagnósticos) y métodos de reducción de dimensiones (análisis exploratorio) [42]. En los dos primeros tipos se procede en orden inverso para detectar la ausencia de la normalidad en la distribución de los datos y la presencia de los outliers [43]: en una aproximación diagnóstica, se parte de la identificación de los outliers y luego se ajusta el resto de los datos a un método clásico, mientras que en una aproximación robusta, se empieza con el ajuste de la mayoría de los datos a un modelo y después se detectan los outliers mediante el estimador robusto.

Dentro de los métodos de regresión robusta, existen varios tipos en función del algoritmo utilizado, como son la mediana simple (SM), la mediana repetida (RM), mínimos cuadrados limitados (LTS) y la mínima mediana de cuadrados (LMS). Esta última, propuesta por Rousseeuw en 1984 y que consiste en minimizar:

$$\text{mediana}_i \{(R_i - \hat{R}_i)^2\} \quad (9)$$

tiene el mayor valor posible de "breakdown point" (50%). Este índice, según la definición de Hampel que recoge Massart y col. [43], es la mínima fracción del dato contaminado (outliers) que puede conducir a que el estimador tome valores arbitrariamente alejados de los correctos. El valor de este índice para el estimador LS es del orden de 0%.

La regresión robusta (LMS) ha sido aplicada con éxito con el fin de establecer rangos lineales de calibrado [44,45], determinar zonas lineales en curvas de valoración [46] y detectar los outliers [43]. Estos últimos se consideran como unas observaciones que aparecen para romper el modelo que muestra la mayoría de los datos. Sin embargo, éstos no son los únicos datos anómalos que podrían hallarse ya que existe otro tipo llamado "leverage" y que se define como aquella observación que esta aislada de las demás. El efecto de estos tipos de datos anómalos sobre la regresión LS es notable [35] puesto que, en primer lugar, afecta a las estimaciones tanto del término independiente como de la pendiente y en segundo lugar, pero r

menos importante, a la precisión de dichas estimaciones.

En nuestra investigación, hemos utilizado el programa "PROGRESS" que nos ha permitido aplicar el método de regresión LMS, calcular los residuos, identificar los que son anormalmente grandes y finalmente, rehacer la regresión LS sin considerar estos datos para aprovechar las buenas propiedades de precisión y exactitud que tienen los parámetros calculados con este criterio.

Dicho programa se basa en dos índices para diagnosticar si un dato es anómalo ó no: el índice robusto, RD, y el residuo estandarizado, RS. Así, un punto es considerado "leverage" si su RD es mayor que 2'5; mientras que si su RS sobrepasa el valor 2'5, en valor absoluto, entonces es "outlier". Un dato es "leverage/outlier" si tanto su RS como su RD superan el valor 2'5.

2.2.4.- Estimación de los parámetros de regresión

Para hacer una estimación de los parámetros de regresión, es necesario obtener la ecuación de la recta de calibrado a partir de una serie de disoluciones con distinta concentración del patrón, incluyendo el "blanco" (concentración de analito "cero") como valor adicional. Según Miller [47], es aconsejable no restar su señal a las señales de los demás patrones, antes de calcular la ecuación de la recta de regresión, ya que dicha señal instrumental esta sujeta a errores como las están aquellas de los otros puntos.

Una vez establecido el modelo lineal, la ecuación 5 tiene una solución única independientemente del número de parámetros implicados. En el caso que nos ocupa, las estimaciones de la pendiente y del término independiente vienen dadas por las ecuaciones:

$$b = \frac{\sum(C_i - \bar{C})(R_i - \bar{R})}{\sum(C_i - \bar{C})^2} \quad (10)$$

$$a = \bar{R} - b\bar{C} \quad (11)$$

siendo \bar{R} y \bar{C} los valores medios del conjunto de señales y concentraciones utilizadas en el calibrado.

a.- Desviación estándar de regresión (o de los residuales)

La desviación estándar de regresión, $s_{R,C}$, dada por la ecuación 12, mide la dispersión de las señales analíticas medidas alrededor de la recta de calibrado ajustada: dicha desviación es cero cuando todos los valores medidos están sobre la recta. Su valor indica el error experimental que afecta a la regresión de los datos y puede considerarse, en una primera aproximación, una medida de la bondad del ajuste de los datos experimentales a la recta.

$$s_{R,C} = \sqrt{\frac{\sum(R_i - \hat{R}_i)^2}{n-2}} \quad (12)$$

donde \hat{R}_i es el valor predicho de la señal, calculado a partir de la ecuación de la recta de regresión, y n es el número total de parejas de puntos utilizados para calcular la recta de regresión.

b.- Desviación estándar de la pendiente

Es la medida del error que se comete en la estimación de la pendiente de la recta de regresión y su valor va a incidir en el error de los datos calculados utilizando la ecuación del calibrado. Dicha desviación se calcula a partir de la ecuación:

$$s_b = s_{R,C} \sqrt{\frac{1}{\sum(C_i - \bar{C})^2}} \quad (13)$$

donde $s_{R,C}$ es la desviación estándar de regresión de R sobre C y \bar{C} el valor medio del conjunto de concentraciones utilizadas en el calibrado.

c.- Desviación estándar del término independiente

Es una medida del error máximo que se comete cuando se predice un valor de señal analítica a partir de un valor de concentración de analito. Dado que este error es mínimo en el centro de la recta y máximo en los extremos, el valor de s_a es el que corresponde al extremo inferior de la recta de calibrado. Su expresión es:

$$s_a = s_{R,C} \sqrt{\frac{\sum C_i^2}{n \sum (C_i - \bar{C})^2}} \quad (14)$$

d.- Intervalos de confianza para la pendiente y el término independiente

La expresión de los intervalos de confianza, tanto de la pendiente como del término independiente, está dada por dos factores, el valor de la t de Student y la desviación estándar del parámetro estimado. Las ecuaciones correspondientes son:

$$b \pm t_{(\alpha;n-2)} s_b \quad (15) \quad \text{y} \quad a \pm t_{(\alpha;n-2)} s_a \quad (16)$$

siendo $t_{(\alpha;n-2)}$ la t de Student para un nivel de significación determinado $1 - \alpha$ (generalmente $\alpha = 0.05$) y con $n-2$ grados de libertad.

e.- El coeficiente de correlación lineal

El coeficiente de correlación, r , obtenido a partir de la ecuación 17:

$$r = \frac{\sum (C_i - \bar{C})(R_i - \bar{R})}{\sqrt{\sum (C_i - \bar{C})^2 \sum (R_i - \bar{R})^2}} \quad (17)$$

la medida del grado de correlación lineal entre las señales analíticas experimentales y sus respectivas concentraciones y por tanto, refleja únicamente el grado de relación

entre estas dos variables. Nunca debe utilizarse como criterio de linealidad del modelo.

f.- El coeficiente de determinación

Es el cuadrado del coeficiente de correlación, r^2 , y mide la fracción de la variabilidad total que es explicada por la regresión lineal. Es posible utilizar este coeficiente como un estimador de la calidad del ajuste de los puntos experimentales al modelo de regresión.

2.2.5.- Cálculo de la desviación estándar de la señal y de la concentración

a.- Desviación estándar de la señal

Para calcular la desviación estándar de un valor de señal, R , predicha a partir de un valor de concentración, C , deducida por análisis de la regresión del conjunto de datos del calibrado se utiliza la ecuación:

$$s_R = s_{R,C} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(C - \bar{C})^2}{\sum (C_i - \bar{C})^2}} \quad (18)$$

donde los distintos términos representan:

$s_{R,C}$: la desviación estándar de regresión de R sobre C .

m : el número de réplicas medidas sobre cada patrón de concentración.

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

C : valor de concentración utilizado para predecir la señal analítica correspondiente.

\bar{C} : media aritmética de todos los valores de concentración utilizados.

C_i : cada uno de los valores de concentración utilizados en el análisis.

Dicha ecuación permite calcular la variabilidad de la señal analítica correspondiente a cualquier valor de concentración, siempre y cuando pertenezca al rango lineal. Es obvio que para obtener un valor pequeño de esta desviación es necesario minimizar los términos que se encuentran en el numerador y maximizar aquellos que forman parte del denominador.

b.- Desviación estándar de la concentración

La finalidad primordial de un calibrado es determinar la concentración de analito mediante interpolación a partir de la señal medida. Sin embargo, la estimación de la imprecisión asociada a dicha interpolación es bastante compleja ya que depende tanto del error de la medida de la señal como de los errores de la pendiente y del término independiente.

Según Martín Andrés y Luna del Castillo [38], una expresión general para el cálculo de la desviación estándar de la concentración podría ser de este tipo:

$$s_C = \frac{s_{R,C}}{b(1-g)} \sqrt{(1-g)\left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n}\right) + \frac{(R-\bar{R})^2}{b^2 \sum (C_i - \bar{C})^2}} \quad (19)$$

donde:

$s_{R,C}$: la desviación estándar de regresión de R sobre C .

b : la pendiente de la recta de calibrado.

m : el número de repeticiones del análisis.

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

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

R_o : la media aritmética de todos los valores de señal utilizados en el cálculo de la recta de regresión.

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

\bar{C} : la media aritmética de todos los valores de concentración utilizados en la regresión.

g es una función que viene dada por la siguiente expresión:

$$g = t^2 \frac{s_{R,C}^2}{b^2 \sum (C_i - \bar{C})^2} \quad (20)$$

siendo t el valor del estadístico de Student para un nivel de significación determinado $1 - \alpha$ (generalmente $\alpha = 0.05$) con $n-2$ grados de libertad.

Cuando g toma valores despreciables frente a 1, la ecuación anterior (19) tiene la siguiente forma reducida [38]:

$$s_c = \frac{s_{R,C}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(R - \bar{R})^2}{b^2 \sum (C_i - \bar{C})^2}} \quad (21)$$

este valor de s_c dependerá, de forma general, del número de puntos utilizados en el calibrado n así como de las determinaciones realizadas m y en forma particular, de la distancia del punto considerado al punto central de la recta de calibrado (término $R - \bar{R}$).

2.2.6.- Comparación de pendientes de dos rectas de calibrado

Cuando se dispone de dos rectas de calibrado surge la necesidad de demostrar que sus pendientes son estadísticamente idénticas. Existen varias pruebas estadísticas para esta comparación. En una primera aproximación se puede utilizar el intervalo de confianza del valor de una de ellas y ver si el valor de la otra está incluido en él [41]. Sin embargo, en nuestra investigación, hemos utilizado el programa "QUIMIO" para llevar a cabo dicha comparación. Los pasos a seguir se pueden resumir en:

- Una comprobación de la igualdad de varianzas de los residuales mediante el test F de Snedecor. Este valor calculado se compara con el valor teórico para el nivel

de confianza elegido α y con los grados de libertad n_1-2 y n_2-2 . Si no hay una diferencia estadísticamente significativa, el programa calcula una varianza estimada conjunta de las dos anteriores.

- Una comprobación de la igualdad de las pendientes, calculando el valor del estadístico t y comparándolo con el valor teórico con n_1+n_2-4 grados de libertad al nivel de significación 1%. Cuando existe una diferencia estadísticamente significativa entre las dos varianzas, la verificación de la igualdad de pendientes se lleva a cabo mediante la aproximación de Cochran.

2.3.- Estimación de los parámetros de fiabilidad

Una vez establecida la recta de calibrado y validado su modelo lineal, pasamos a estimar el valor de los parámetros de fiabilidad del método analítico. Para el cálculo de dichos parámetros en el trabajo recogido en esta memoria, se han seguido, siempre que ha sido posible dos criterios, el propuesto por la IUPAC [48] y el propuesto por Cuadros y col. [49]. Este último, que utiliza los datos del calibrado obtenidos a partir de una serie de réplicas de distintos patrones y posterior aplicación del modelo de regresión lineal, tiene la ventaja de ser más rápido y sencillo y permite la estimación de los parámetros de fiabilidad independientemente del instrumento usado, al mismo tiempo, tiene en cuenta los errores propios del calibrado.

2.3.1.- Linealidad

Generalmente se puede definir la linealidad como la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado [41]. Usualmente y a pesar de la incorrección, este parámetro se ha caracterizado a través del coeficiente de correlación lineal de Pearson [39], sin embargo, en un reciente documento del Analytical Methods Committee, se recomienda el uso del test de "fallo de ajuste" para detectar la no linealidad [40].

Por otra parte, hemos caracterizado la linealidad según lo propuesto por

Cuadros y col. [50]. Dicho trabajo aclara las dos características que se representan indistintamente por este término y que se refieren a propiedades distintas: la linealidad "in-line" y la linealidad "on-line".

* Linealidad "in-line": se refiere al comportamiento lineal de los valores experimentales de las señales analíticas, en relación con la concentración de analito, es decir, informa sobre la ausencia de curvatura en la línea de calibrado. Dicha linealidad, se evalúa a través del test de "fallo de ajuste".

* Linealidad "on-line": indica la mayor o menor dispersión de los datos alrededor de la línea recta. Generalmente esta linealidad se cuantifica, una vez que se ha obtenido un "fallo de ajuste" no significativo, a través de un parámetro definido como:

$$Lin.(%) = (1 - DER(b)) \times 100 \quad (22)$$

donde $DER(b)$ representa la desviación estándar relativa de la pendiente, expresada en tanto por uno, que se calcula por el cociente del valor de s_b entre b .

2.3.2.- Sensibilidad

Podemos considerar dos tipos de sensibilidades:

* La sensibilidad de calibrado

La sensibilidad de un método analítico, según lo que recomienda la IUPAC [48], viene dada por la pendiente, b , de la recta de calibrado. Cuanto más alta sea la pendiente, mayor es la sensibilidad. Expresada de esta forma, la sensibilidad mide la relación entre la señal instrumental y la concentración de analito y depende de las condiciones instrumentales utilizadas.

* La sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica, ampliamente discutida por Ingle [51], es inversamente proporcional a la capacidad de discernir pequeñas diferencias de concentraciones. Su

expresión es la siguiente:

$$Sens.anal. = \frac{b}{s_R} \quad (23)$$

donde s_R es la desviación estándar de las medidas de la señal analítica para una concentración dada. Expresada así, el valor de dicha sensibilidad depende de la concentración de analito, lo cual no sería adecuado si lo que se pretende es caracterizar un método analítico.

Cuadros y col. [49], proponen una expresión (24) obtenida a partir del análisis de regresión y cuyo valor es característico del calibrado del método e independiente del instrumento y de las transformaciones matemáticas llevadas a cabo para la lectura de la señal:

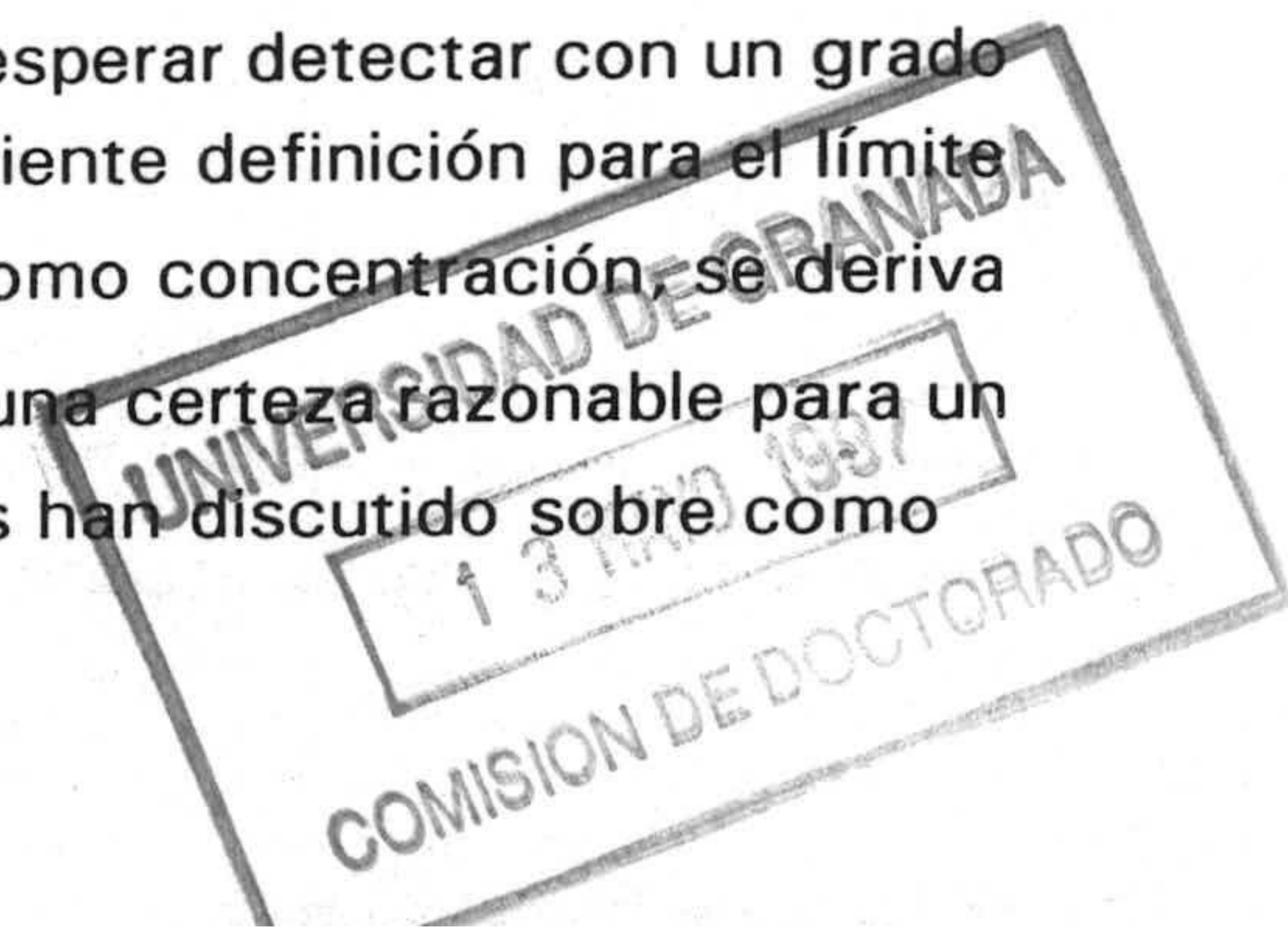
$$Sens.anal. = \frac{s_{R,C}}{b} \quad (24)$$

donde $s_{R,C}$ es la desviación estándar de la regresión de R sobre C .

2.3.3.- Límite de detección

El límite de detección es un parámetro analítico de gran interés en el análisis de elementos traza, contaminantes y productos de degradación. Durante cuatro décadas, han sido propuestos varios conceptos, terminologías y formulaciones para tratar el problema químico de la detección [52]. Esta capacidad de detectar pequeñas cantidades de analito es una de las características de muchas técnicas instrumentales [47].

Según Wilson [53], el límite de dección se define como la mínima concentración de una sustancia que el analista puede esperar detectar con un grado de confianza dado. La IUPAC [48], proporciona la siguiente definición para el límite de detección: "el límite de detección, L_D , expresado como concentración, se deriva de la menor medida, R_o , que puede ser detectada con una certeza razonable para un determinado procedimiento analítico". Muchos autores han discutido sobre como



deben entenderse las palabras "se deriva" y "certeza" en la definición previa [37].

En el trabajo recogido en esta memoria, se ha utilizado la aproximación de la IUPAC para evaluar el límite de detección mediante la expresión:

$$L_D = 3 s_{C_0} \quad (25)$$

donde la desviación estándar a concentración "cero", s_{C_0} , se calcula a partir de:

$$s_{C_0} = \frac{s_{R_0}}{b} \quad (26)$$

siendo s_{R_0} la desviación estándar del conjunto de repeticiones correspondientes a la señal del blanco [54] y b la pendiente de la recta de calibrado. Según el Analytical Methods Committee [55], es inapropiado recomendar un número particular de repeticiones para estimar el límite de detección, sin embargo un valor de diez observaciones se puede considerar adecuado.

También se ha empleado, en esta memoria, lo propuesto por Cuadros y col. [49] que calcula el límite de detección, según la aproximación de la IUPAC, a partir de la ecuación 25, pero estimando el valor de s_{C_0} a partir de la ecuación 19 ó 21 con los valores de la señal del "blanco" medidos para establecer la recta de calibrado. De esta forma, se toma en consideración tanto la desviación estándar de la concentración correspondiente al blanco como la imprecisión del valor de la pendiente.

Límite de detección calculado para probabilidades de falsos positivo y negativo determinadas

La determinación de un analito que puede estar presente a muy bajas concentraciones puede ser considerada como un test probabilístico [56]. Este esfuerzo de evaluar la calidad de un mejor procedimiento analítico radica en la determinación de las probabilidades de falsos positivo y negativo [45]. Dichos términos se pueden definir como las probabilidades de afirmar, respectivamente, que esta presente el analito cuando no es cierta (falso positivo) y de que no hay analito

cuando si lo había (falso negativo).

Según lo indicado por Ortiz y Sarabia [57], la definición del límite de detección aceptada por la IUPAC contempla la probabilidad de un falso positivo en el análisis de una muestra problema, pero no evalúa explícitamente la probabilidad de un falso negativo. Dichos autores señalan que esta probabilidad ha de considerarse como un parámetro de calidad para seleccionar un procedimiento u otro para resolver un problema de detección concreto. Liteanu [58] propone, para estimar la probabilidad de un falso negativo, el uso de la curva característica de detección como información para definir el significado real de los resultados experimentales en las proximidades del límite de detección.

En nuestra investigación, se ha hecho uso del programa "DETARCHI" [57], cuyo autores plantean el problema del límite de detección de la siguiente manera:

- Determinar la relación lineal entre la concentración y la señal mediante el cumplimiento del modelo de regresión por mínimos cuadrados.
- Considerar el límite de detección como un test de hipótesis en relación a la presencia de analito en la muestra problema.

En este programa [57], la expresión que se utiliza para calcular el límite de detección es la que propuso Clayton [56]:

$$L_D = \Delta(\alpha, \beta) \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{C}^2}{\sum(C_i - \bar{C})^2}} \frac{s_{R,C}}{b} \quad (27)$$

siendo:

$\Delta(\alpha, \beta)$: el parámetro de descentrado que depende de las probabilidades de falso positivo y de falso negativo.

m : el número de réplicas medidas sobre cada patrón de concentración.

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

\bar{C} : media aritmética de todos los valores de concentración utilizados.

C_i : cada uno de los valores de concentración utilizados en el análisis.

$s_{R,C}$: la desviación estándar de regresión de R sobre C .

b : la pendiente de la recta de calibrado.

El límite de detección, así definido, dependerá "del diseño experimental del calibrado, de la sensibilidad de éste, de la calidad de la regresión y de las probabilidades de falso positivo y de falso negativo que el analista esté dispuesto a asumir".

2.3.4.- Límite de cuantificación

Se puede definir el límite de cuantificación como la menor concentración de analito que puede ser determinada con suficiente precisión y exactitud [59]. Según Currie [60], dicho término se calcula sustituyendo en la ecuación 25 el valor 3 por 10, tal y como se indica en la ecuación 28:

$$L_Q = 10 s_{C_0} \quad (28)$$

El cálculo de la desviación estándar a concentración "cero" se puede obtener a partir de las ecuaciones 26 para el protocolo de la IUPAC y 19 ó 21 para el de Cuadros y col, obteniéndose dos estimaciones diferentes del límite de cuantificación.

2.3.5.- Rango dinámico lineal

Está definido por el límite superior e inferior (L_D) del intervalo de concentraciones de aplicación del método analítico y viene dado por la siguiente expresión:

$$RDL = 0.1 \frac{Lim_{superior}}{Lim_{inferior}} \quad (29)$$

2.3.6.- Precisión

Según Wilson [61], el término "precisión" se utiliza generalmente cuando se habla del grado de concordancia entre resultados repetidos. Definida así, la precisión estima la variabilidad de las medidas. Cuanto menor es la variabilidad, mayor es la precisión. Dentro de este término, se pueden distinguir dos tipos de estudios: la repetibilidad y la reproducibilidad [62]. Las medidas de la precisión suelen expresarse como desviación estándar o desviación estándar relativa (DER) [48].

La repetibilidad, según la definición de la Organización Internacional para la Estandarización (ISO) que recoge Feinberg [63] es aquella precisión que se obtiene a partir de unos resultados de ensayo mutuamente concordantes mediante el mismo método aplicado a la muestra a analizar y bajo las mismas condiciones. Mientras que la reproducibilidad, señala el mismo autor, es la precisión obtenida a partir de unos resultados de ensayo mutuamente concordantes mediante la aplicación del mismo método a la muestra a analizar y bajo diferentes condiciones.

La precisión del método, en nuestra investigación, se ha evaluado:

- Aplicando el método "p" veces, para una misma concentración C_{analito} y en la misma sesión experimental (Repetibilidad).

- Aplicando el método "q" veces, para la misma concentración C_{analito} pero en distintas sesiones experimentales (Reproducibilidad).

- Siguiendo el protocolo establecido por Cuadros y col. [49], mediante la expresión de la desviación estándar relativa de la concentración:

$$\% DER(C) = \frac{s_c}{C} \times 100 \quad (30)$$

siendo s_c la desviación estándar de la concentración calculada a partir de la ecuación 19 ó 21. Para ello, se considera a m como el número de réplicas y a R como la media de las señales correspondientes a cada nivel de concentración de analito patrón utilizados en el análisis de regresión.

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

2.3.7.- Robustez

La solidez (ruggedness) o robustez (robustness) de un método analítico es una medida de su capacidad para reproducir resultados cuando se lleva a cabo en diferentes circunstancias [64].

Diversas definiciones han sido propuestas por diferentes fuentes para este término, sin embargo dicha propiedad se ha definido desde dos puntos de vista [65]: como un ejercicio interlaboratorio o como un estudio intralaboratorio. En el primer caso, se evalúa el grado de reproducibilidad frente a cambios en las condiciones externas (ruggedness), mientras que en el segundo se estudia el efecto producido por pequeños cambios sobre el valor nominal de las variables experimentales (robustness).

Aunque Youden fue el primero en sugerir que los procesos analíticos necesitan ser sólidos, el término "ruggedness", según Vander Heyden y col [66], es relativamente reciente y forma parte de la validación de un método. Mulholland [67] señala que el test de este parámetro debería de ejecutarse antes de realizar el estudio de reproducibilidad porque ayudaría a anticipar y, si es necesario, eliminar posibles fuentes de error.

En este trabajo, se utilizó el protocolo de Cuadros Rodríguez y col. [64] para evaluar la robustez del método analítico. Para llevar a cabo dicho estudio, es necesario recurrir a la aplicación de un diseño factorial fraccionado saturado. En algunas situaciones y para no modificar la estructura del diseño, se han introducido algunas variables fantasma "dummy" elegidas de forma que se confundan con las interacciones más probables. Estas variables "dummy" se definen como unas variables imaginarias cuya modificación a partir de un nivel a otro no representa un cambio físico.

Se utilizaron los datos del calibrado para estimar tanto la señal predicha, \hat{R} (ecuación 4), como su desviación estándar, s_R (ecuación 18), correspondientes a la concentración de analito en estudio.

El cálculo del efecto principal, E_j , para cada variable experimental, j , se llevó a cabo utilizando la siguiente expresión:

$$E_j = \frac{2}{N} [\sum \Delta(R_i)_{(+1)} - \sum \Delta(R_i)_{(-1)}] \quad (31)$$

donde $\Delta(R_i)_{(+1)}$ y $\Delta(R_i)_{(-1)}$ indican las señales netas de cada experimento del diseño factorial fraccionado cuando la variable toma valores superiores e inferiores, respectivamente, al valor nominal.

Para determinar la significación de cada efecto principal, E_j , se comprobó si:

$$|E_j| \leq t s_E \quad (32) \quad (\text{el efecto no es significativo})$$

$$|E_j| > t s_E \quad (33) \quad (\text{el efecto es significativo})$$

siendo s_E la desviación estándar del efecto principal, cuya expresión es la siguiente:

$$s_E = \frac{2\sqrt{2}}{\sqrt{N}} s_R \quad (34)$$

donde N es el número de experimentos del diseño utilizado y s_R es la desviación estándar de la señal predicha correspondiente a la concentración de estudio, y t el valor de la t de Student con $n-2$ grados de libertad y para $\alpha = 5\%$.

La estimación de la desviación estándar del efecto principal, s_E , obtenida a partir de la ecuación 34, se llevó a cabo por aplicación de la ley de propagación de errores aleatorios y teniendo en cuenta las siguientes condiciones:

-
- Homoscedasticidad de las varianzas.
 - La señal neta ha sido obtenida a partir de la diferencia entre la señal de analito (a la concentración de estudio) y la de blanco.

2.3.8.- Selectividad

Según Valcárcel y Ríos [68], el término selectividad en Química Analítica informa sobre la presencia o ausencia de perturbaciones químicas, físicas o fisico-químicas que pueden alterar la detección cualitativa y/o determinación cuantitativa de analitos en una muestra. Cuando estas perturbaciones son de origen químico, constituyen lo que generalmente se denomina interferencias, mientras que la sustancia interferente es el agente responsable de la interferencia.

La IUPAC [69] recomienda para el interferente, la definición propuesta por Wilson [70], según la cual un interferente es una sustancia que causa, en un procedimiento analítico, un error sistemático en el resultado, para al menos, una concentración de analito dentro del rango del método.

Generalmente, las sustancias producen interferencias, en un método analítico, por una de las siguientes razones:

- La especie que interfiere produce también una respuesta en el sistema de medida.
- La especie interferente sustrae a la especie que se analiza de su participación en el proceso de medida, fenómeno llamado de "enmascaramiento".

El primer tipo de interferencias puede ocurrir para concentraciones muy diferentes de especies perturbadoras, siendo importante a veces a muy bajos niveles y otras sólo a concentraciones elevadas. En cambio, el segundo tipo de interferencias requiere al menos cantidades comparables de ambas especies (analito e interferente) para que pueda apreciarse un efecto importante.

En nuestra investigación, para saber si una especie es interferente, se mide la señal instrumental del analito en presencia de ella y se comprueba si está incluida en

un intervalo de confianza:

$$R_{(C_o)} \in (R_i \pm s^*) \quad (35)$$

donde:

R : es la señal neta del analito en presencia del interferente.

C_o : es la concentración de analito a la que se realiza el estudio de la interferencia.

R_i : es la señal neta del analito en ausencia del interferente.

Para definir el valor de s^* se ha seguido alguno de los siguientes procedimientos:

a).- Fijar su valor en términos de la desviación estándar de la señal de forma que ésta sea igual o superior a la obtenida en el estudio de la repetibilidad o reproducibilidad del método.

b).- Utilizando el valor de $t_{2\alpha} s_R$, siendo $t_{2\alpha}$ el valor de la t de Student (de una sola cola) con $n-2$ grados de libertad y un nivel de confianza de 2α (generalmente $\alpha = 0'05$) y calculando s_R a partir de la ecuación 18, para un valor predicho de señal utilizando el conjunto de datos obtenidos para establecer la recta de calibrado [71].

De esta manera, toda señal del analito en presencia de ión extraño que se encuentre en el intervalo, se considerará que no es interferente.

2.4.- Comprobación de la veracidad de un método analítico

El concepto de exactitud como propiedad de un método analítico, se refiere tanto a la comprobación de la ausencia de errores sistemáticos (comprobación de la veracidad) como al establecimiento de la incertidumbre de los resultados (precisión) obtenidos con el método analítico que se pretende validar [32]. Evaluar la veracidad consiste pues en estimar la concentración del analito en la muestra y compararla con un valor de referencia representativo que se considera como verdadero mediante la

herramienta estadística adecuada. Sin embargo, ante la imposibilidad de conocer el valor verdadero y con objeto de disponer de un valor de referencia aceptado, se utilizan materiales de referencia certificados.

- Materiales de referencia certificados

Según las definiciones de la Organización Internacional para la Estandarización, en su Norma ISO 30 [72], un material de referencia certificado (CRM) es "un material ó sustancia que tiene una ó varias de sus propiedades lo suficientemente establecidas para permitir su uso en la calibración de un aparato ó en la validación de un método analítico ó en la asignación de valores a un material, estando certificados uno o varios valores de una o más de sus propiedades por procedimientos técnicamente válidos llevados a cabo por un organismo competente". Dichos materiales, son fabricados adecuadamente por diferentes organizaciones tales como: "Community Bureau of Reference, (BCR)" ó "National Institute of Standards and Technology, (NIST)". Estos materiales presentan una característica fundamental: la *trazabilidad*.

El concepto de trazabilidad se relaciona con la propiedad de establecer los vínculos adecuados entre nuestros resultados y la referencia o patrón adecuados. Es evidente por tanto, que determinar la trazabilidad de un valor verdadero convencionalmente establecido, es la misma operación que evaluar la exactitud de nuestro procedimiento.

En el trabajo recogido en esta memoria, al no disponer de materiales de referencia certificados, para la comprobación de la veracidad se ha recurrido a otras estrategias alternativas [73]:

- Muestras sintéticas.
- Método de referencia.
- Metodología de adición de patrón.

2.4.1.- Utilización de muestras sintéticas

Preparadas mezclando los constituyentes de pureza determinada en

concentración perfectamente conocida, y a la disolución resultante se añadió una cierta cantidad de analito. Sobre alicuotas de estas disoluciones se aplicaron los métodos propuestos y se llevaron a cabo bien estudios de recuperación o bien el correspondiente test de hipótesis para comparar el valor medio de un conjunto de resultados con un número.

En el caso de estudios de recuperación, el protocolo estadístico aplicable es el de la comparación de la recuperación media, $\bar{\mathfrak{R}}$, frente a 100, mediante un test t de Student:

$H_0: \bar{\mathfrak{R}} = 100$ (la recuperación media no difiere significativamente de 100).

$H_1: \bar{\mathfrak{R}} \neq 100$ (la recuperación media difiere significativamente de 100).

y el estadístico correspondiente es:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{\mathfrak{R}} - 100|}{(s_{\mathfrak{R}}/\sqrt{n})} \quad (36)$$

donde $s_{\mathfrak{R}}$ es la desviación estándar de las n recuperaciones llevadas a cabo con el método propuesto.

Por su parte, el test de hipótesis para comparar el valor medio de un conjunto de resultados, \bar{x}_R , con un número, x_r , sería también un test t de Student:

$H_0: \mu = x_r$ (sólo existen errores aleatorios).

$H_1: \mu \neq x_r$ (existen errores sistemáticos).

siendo el estadístico:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_R - x_r|}{(s_R/\sqrt{n})} \quad (37)$$

donde s_R es la desviación estándar de las n determinaciones llevadas a cabo con el método propuesto.

En ambos casos, si $t_{cal} < t_{tab}(\alpha; n-1 g.l.)$ se acepta la hipótesis nula (H_0) concluyéndose que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la media obtenida con el método propuesto y el valor de referencia.

2.4.2.- Utilización de métodos de referencia

En la práctica normal de un laboratorio, se da frecuentemente esta situación: se pone a punto un método nuevo y para establecer la veracidad de los resultados se comparan con los obtenidos con otro método perfectamente establecido y comprobado [41]. Dicha comparación, a partir de dos series de resultados y sobre una misma muestra, nos permite hallar la veracidad del resultado obtenido con el método nuevo.

a.- Comparación de las medias de dos conjuntos de resultados independientes entre sí

Suponemos que se parte de una misma muestra que se analiza n_R veces por el método analítico nuevo y n_r por el de referencia. Para cada conjunto de datos obtenidos se halla la media aritmética \bar{x}_i y su correspondiente desviación estándar s_i .

* Como primer paso, se comparan las varianzas s_r^2 y s_R^2 , del método de referencia y de nuestro método respectivamente [74], mediante el test de la F de Snedecor de forma que se sitúe en el numerador la mayor de las dos varianzas. Si la varianza del método de referencia es mayor que la del método nuevo, la ecuación empleada es:

$$F_{cal} = \frac{s_r^2}{s_R^2} \quad (38)$$

El valor de F_{cal} se compara con el valor tabulado para el nivel de confianza α elegido y con los grados de libertad n_r-1 y n_R-1 correspondientes al numerador y al denominador respectivamente.

Si $F_{cal} < F_{tab}$, se concluye que no existe diferencia significativa entre las varianzas de los dos conjuntos de datos y se calcula su varianza conjunta s_p^2 mediante la expresión:

$$s_p^2 = \frac{(n_r-1) s_r^2 + (n_R-1) s_R^2}{(n_r+n_R-2)} \quad (39)$$

Si $F_{cal} > F_{tab}$, esto indicaría que existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los dos conjuntos de datos. En este caso, no se puede calcular la varianza conjunta s_p^2 .

* Como segundo paso, se comparan las medias \bar{x}_r y \bar{x}_R de los dos conjuntos de datos mediante el test t de Student. La expresión del valor de dicho test depende de que si las varianzas son iguales ó no.

Cuando las varianzas son iguales, el valor de t calculado tiene la siguiente expresión:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_r - \bar{x}_R|}{\sqrt{s_p^2 (1/n_r + 1/n_R)}} \quad (40)$$

que se compara con t tabulado para el valor de α y n_r+n_R-2 grados de libertad elegidos.

En el caso de que las varianzas son distintas, el test t se lleva calculando el estadístico:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{x}_r - \bar{x}_R|}{\sqrt{(s_r^2/n_r) + (s_R^2/n_R)}} \quad (41)$$

que se compara con aquel tabulado, previo cálculo, según la aproximación de Welch, de los grados de libertad resultantes de redondear al número entero más próximo al valor:

$$grados\ de\ libertad = \frac{(s_r^2/n_r + s_R^2/n_R)^2}{\frac{(s_r^2/n_r)^2}{n_r-1} + \frac{(s_R^2/n_R)^2}{n_R-1}} \quad (42)$$

En ambos casos, si $t_{cal} < t_{tab}$ se acepta la hipótesis nula concluyéndose que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias obtenidas con los dos métodos.

b.- Comparación de dos conjuntos de resultados. Aplicación de la regresión lineal

Según Penninckx [75], la validación de un método analítico puede ser llevada a cabo mediante una regresión por mínimos cuadrados. Para que esta metodología sea aplicable y los resultados válidos, la comparación de las dos series de resultados se debe realizar cumpliendo los condicionantes siguientes [76]:

- 1.- El método más preciso se representa en el eje de abscisas.
- 2.- Es necesario que se representen un número razonable de puntos (se aconsejan al menos 10 puntos).
- 3.- Los valores de concentración deben estar uniformemente espaciados a lo largo del rango ensayado.

Es esta una forma de interpretar la exactitud y la precisión del método nuevo ya que si éste es tan exacto y tan preciso como el de referencia, se obtiene una recta cuya pendiente es 1 y término independiente es 0, es decir, una línea recta cuya

ecuación es del tipo $y = x$.

La evaluación de la exactitud, calculando el intervalo de confianza tanto para la pendiente como para el término independiente mediante las ecuaciones 15 y 16, se lleva a cabo de la siguiente manera:

* Si los límites de confianza de b no incluyen el 1, significa que $b \neq 1$ y que existe un error sistemático proporcional a la concentración de analito.

* Si los límites de confianza de a no incluyen el 0, significa que $a \neq 0$ y que existe un error sistemático constante por exceso ó por defecto.

Una estimación de la precisión puede obtenerse a partir de la representación gráfica de los límites de tolerancia de la recta de regresión ya que si la hipérbola es estrecha, se dirá que el método tiene una buena precisión pero si es ancha, la precisión es mala.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que debe realizarse un test conjunto para contrastar la pendiente y el término independiente (la región de confianza es una elipse) y no contrastar individualmente la pendiente frente a 1 y el término independiente frente a 0 (la región de confianza es un rectángulo circunscrito en la elipse anterior), ya que podría darse el caso de aceptar las hipótesis individuales sin que se pueda aceptar la conjunta [77]. En nuestro caso, hemos utilizado para realizar esta comparación la parte del programa "QUIMIO" dedicada a regresión lineal univariante [78].

2.4.3.- Utilización de la metodología de adición de patrón

Propuesto por Chow y Thompson [79], el método de adición de patrón es muy frecuentemente utilizado en Química Analítica. Dependiendo de la técnica instrumental elegida, se distinguen varias modalidades del método [80]:

- Variación continua de patrón en un volumen total constante.

-
- Variación continua de patrón y muestra en un volumen total constante.
 - Adición simple de un volumen variable de patrón.
 - Volumen total variable con variación continua de patrón.

Desde el punto de vista práctico, los objetivos fundamentales del método de adición de patrón son:

- Determinar analitos en muestras en las que los efectos matriz conducen a resultados inexactos, si se utiliza la calibración con patrones.
- Detectar analitos en la muestra cuyo nivel es inferior al límite de cuantificación pero superior a su sensibilidad analítica.
- Comprobar la exactitud de un resultado analítico cuando no se dispone de una muestra de referencia.

El uso de esta metodología para la comprobación de la veracidad requiere el establecimiento de una nueva recta de calibrado con adición de patrón y la medida del verdadero "blanco" de la muestra a partir de la gráfica de Youden [81,82]. La aplicabilidad de esta determinación, que fue ampliamente discutida por Cardone [83,84], se lleva a cabo representando las señales de la muestra frente a las respectivas masas, volúmenes o concentraciones de la misma. El análisis por regresión lineal de este conjunto de datos da lugar a un término independiente, que representa la componente de error constante del método, llamado blanco total de Youden (BTY).

De acuerdo con lo recogido por Thompson [85], las dos rectas de calibrado tanto con patrones como de adición de patrón pueden presentar cuatro disposiciones espaciales:

- Una superpuesta sobre la otra (los dos calibrados son idénticos).
- Una desplazada paralelamente respecto a la otra (existe un error sistemático constante ó traslacional).

- Ambas rectas parten del mismo punto, pero con distinta pendiente (existe un error sistemático proporcional ó rotacional).

- Ambas rectas se cortan en un punto distinto al origen (hay combinación de ambos tipos de errores).

En este trabajo, se ha utilizado el protocolo estadístico de Cuadros y col. [86] para llevar a cabo la comprobación de la veracidad en algunos de los métodos propuestos. Dicho protocolo esta basado en el método de adición de patrón y en un tratamiento estadístico que incluye la comparación de calibrados y test de hipótesis. Asimismo, para su aplicación se deben cumplir dos premisas:

a).- Ausencia de efecto interactivo matriz-analito que provoque errores sistemáticos proporcionales.

b).- Eliminación de la contribución de la matriz a la respuesta analítica.

en caso contrario no sería aplicable el protocolo.

Para aplicar este protocolo se sigue el procedimiento siguiente:

1.- Establecimiento de los calibrados:

a).- Estándar (CE).

b).- De adición de patrón (CA).

c).- Con porciones de muestra o calibrado de Youden (CY).

2.- Comparación de las varianzas de regresión de CE y CA. Cálculo de la varianza promedio.

3.- Comparación de las pendientes de CE y CA. Cálculo de la pendiente promedio.

4.- Estimación del contenido en analito en la muestra real a partir de CY.

5.- Corrección de las alturas en el origen de las rectas de calibrado de CE y CA. Estimación del blanco de la matriz a partir de CY.

6.- Estimación de los contenidos en analito en la disolución de medida mediante CE y CA. Comparación de ambos contenidos.

Si los contenidos estimados a partir de los dos calibrados (CE y CA) son iguales estamos poniendo de manifiesto que el error sistemático constante ha sido corregido con el blanco de Youden y por lo tanto es posible utilizar el calibrado estándar como recta de calibrado en futuras determinaciones.

BIBLIOGRAFÍA

- [1].- M. Feinberg, L'actualité chimique, Mai-Juin, 191-201, 1991.
- [2].- C. Liteanu, I. Rica, Anal. Chem., **51**(12), 1986-1995, 1979.
- [3].- I.L. Marr, M.S. Cresser, I.J.G. Ariza, "Química Analítica del Medio Ambiente". Cap. II, 21-72. Editorial Universidad de Sevilla, 1990.
- [4].- D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, F. Kaufman, "Chemometrics: a Textbook". Cap. XVIII, 293-304. Elsevier, Amsterdam, 1988.
- [5].- R. Cela, "Técnicas de Optimización (Método del Simplex Geométrico)", en: "Avances en Quimiometría Práctica", R. Cela, 441-477. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1994.
- [6].- L. Gámiz Gracia, L. Cuadros Rodríguez, M. Román Ceba, Talanta, **44**, 75-83, 1997.
- [7].- D.C. Montgomery, "Diseño y Análisis de Experimentos". Introducción, 1-11. Grupo Editorial Iberoamérica, México, 1991.
- [8].- D.C. Montgomery, "Diseño y Análisis de Experimentos". Cap. XVI, 467-509. Grupo Editorial Iberoamérica, México, 1991.
- [9].- J.A. Palasota, S.N. Deming, J. Chem. Ed., **69**(7), 560-563, 1992.
- [10].- J. Ollero Hinojosa, "Metodología de Superficie de Respuesta", curso COMETT II "Introducción a la Quimiometría". Granada, octubre 1994.
- [11].- D.E. Long, Anal. Chim. Acta, **46**, 193-206, 1969.
- [12].- Ad.S. Olansky, S.N. Deming, Anal. Chim. Acta, **83**, 241-249, 1976.
- [13].- R. Cela, J.A.P. Bustamante, Quim. Anal., **III**(2), 87-128, 1984.
- [14].- P.B. Ryan, R.L. Barr, H.D. Todd, Anal. Chem., **52**, 1460-1467, 1980.
- [15].- G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, "Estadística para Investigadores". Cap. X, 317-362. Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 1989.
- [16].- P.W. Araujo, R. Brereton, Trends Anal. Chem., **15**(2), 63-70, 1996.
- [17].- A. Delacroix, C. Porte, Analisis, **24**(1), 22-25, 1996.
- [18].- P.W. Araujo, R. Brereton, Trends Anal. Chem., **15**(1), 26-31, 1996.
- [19].- D.C. Montgomery, "Diseño y Análisis de Experimentos". Cap. XI, 299-345. Grupo Editorial Iberoamérica, México, 1991.
- [20].- G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, "Estadística para Investigadores". Cap. XV, 525-554. Editorial Reverté, S.A., Barcelona, 1989.

-
- [21].- O. Grossmann, *Anal. Chim. Acta*, **186**, 185-193, 1986.
- [22].- O. Grossmann, *Anal. Chim. Acta*, **203**, 67-77, 1987.
- [23].- D.C. Doehlert, *Appl. Stat.*, **19**, 231-239, 1970.
- [24].- H. Yuzhu, D.L. Massart, *J. Chromatogr.*, **485**, 311-323, 1989.
- [25].- F.S. Alonso, "Quimiometría Ambiental, Gestión de las Medidas Contaminantes". Cap. IV, 27-30. Editorial del Ciemat, Madrid, 1990.
- [26].- B. Bourguignon, F. Marcenac, H.R. Keller, P.F. de Aguiar, D.L. Massart, *J. Chromatogr.*, **628**, 171-189, 1993.
- [27].- F. Pattarino, E. Marengo, M.R. Gasco, R. Carpignano, *Intern. J. Pharm.*, **91**, 157-165, 1993.
- [28].- Z. Benzo, P. Araujo, A. Sierraalta, F. Ruetter, *Anal. Chem.*, **65**, 1107-1113, 1993.
- [29].- P.W. Araujo, M.J. Gómez, Z.A. de Benzo, C. Castillo, *Chem. Int. Lab. Syst.*, **16**, 203-211, 1992.
- [30].- M.C. Valencia, J.M. Bosque Sendra, L.F. Capitán Vallvey, *Analisis*, **17**(10), 601-604, 1989.
- [31].- M.J. Valderrama, "Métodos Matemáticos Aplicados a las Ciencias Experimentales". Cap. XII-XIII, 284-307. Pirámide, Madrid, 1989.
- [32].- F.X. Rius, "Validación de Métodos Analíticos. Trazabilidad e Incertidumbre", curso COMETT II "Introducción a la Quimiometría". Granada, octubre 1994.
- [33].- A.L. Wilson, *Talanta*, **17**, 21-29, 1970.
- [34].- M. Valcárcel, A. Ríos, *Anal. Chem.*, **65**(18), 781A-787A, 1993.
- [35].- M. C. Ortiz, "Calidad del Calibrado Químico", curso COMETT II "Introducción a la Quimiometría". Granada, octubre 1994.
- [36].- F.X. Rius, "Tratamiento Estadístico de Datos Analíticos (I). Principios Básicos", en: "La calidad en los Laboratorios Analíticos", M. Valcárcel, A. Ríos, 39-69. Reverté, Barcelona, 1995.
- [37].- D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, "Chemometrics: A textbook". Cap. V, 75-92. Elsevier, Amsterdam 1988.
- [38].- A. Martín Andrés, J.D. Luna del Castillo, "Bioestadística para las Ciencias de la Salud". Cap. XII, 451-499. Edición Norma, Madrid 1990.
- [39].- Analytical Methods Committee, *Analyst*, **113**, 1469-1471, 1988.
- [40].- Analytical Methods Committee, *Analyst*, **119**, 2363-2366, 1994.
- [41].- Monografía A.E.F.I., "Validación de Métodos Analíticos", Hewlett-Packard Eds., 1989.
- [42].- Y.Z. Liang, O.M. Kvalheim, *Chem. Int. Lab. Syst.*, **32**, 1-10, 1996.

- [43].- D.L. Massart, L. Kaufman, P.J. Rousseeuw, A. Leroy, *Anal. Chim. Acta*, **187**, 171-179, 1986.
- [44].- M.C. Ortiz, M.J. Arcos, J.V. Juarros, J.L. Palacios, L.A. Sarabia, *Anal. Chem.*, **65**, 678-682, 1993.
- [45].- A. Herrero, M.C. Ortiz, M.J. Arcos, J.L. Palacios, *Analyst*, **119**, 1585-1592, 1994.
- [46].- M.C. Ortiz, A. Herrero, *Chem. Int. Lab. Syst.*, **27**, 231-243, 1995.
- [47].- J.N. Miller, *Analyst*, **116**, 3-14, 1991.
- [48].- IUPAC. Analytical Chemistry Division, *Spectrochim. Acta B*, **33B**, 242-245, 1978.
- [49].- L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jimenéz Linares, M. Román Ceba, *Anal. Lett.*, **26**, 1243-1258, 1993.
- [50].- L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, J.M. Bosque Sendra, *Anal. Lett.*, **29(7)**, 1231-1239, 1996.
- [51].- J.D. Ingle, Jr, *J. Chem. Ed.*, **51**, 100-105, 1971.
- [52].- L.A. Currie, W. Horwitz, *Analisis*, **22(5)**, 24-26, 1994.
- [53].- A.L. Wilson, *Talanta*, **20**, 725-732, 1973.
- [54].- J.D. Winefordner, G.L. Long, *Anal. Chem.*, **55**, 712A-724A, 1983.
- [55].- Analytical Methods Committee, *Analyst*, **112**, 199-204, 1987.
- [56].- C.A. Clayton, J.W. Hines, P.D. Elkins, *Anal. Chem.*, **59(20)**, 2506-2514, 1987.
- [57].- M.C. Ortiz, L. Sarabia, " Límite de Detección. Curvas Características de Detección", en: "Avances en Quimiometría Práctica", R Cela, 189-209. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1994.
- [58].- C. Liteanu, C. Rica, "Statistical Theory and Methodology of Trace Analysis". Cap. VI, 181-253. Ellis Horwood Ltd. Chichester, England 1980.
- [59].- D.L. Massart, J. Suceyers-Verbeke, B. Vandeginste, *Analisis*, **22(5)**, 14-16, 1994.
- [60].- L.A. Currie, *Anal. Chem.*, **40(3)**, 586-593, 1968.
- [61].- A.L. Wilson, *Talanta*, **17**, 31-34, 1970.
- [62].- C. Hartmann, *Analisis*, **22(5)**, 19-21, 1994.
- [63].- M. Feinberg, *Analisis*, **22(5)**, 34-37, 1994.
- [64].- L. Cuadros Rodríguez, R. Blanc García, A.M. García Campaña, J.M. Bosque Sendra, pendiente de publicación.

-
- [65].- Y. Vander Heyden, *Analisis*, **22(5)**, 27-29, 1994.
- [66].- Y. Vander Heyden, K. Luypaert, C. Hartmann, D.L. Massart, J. Hoogmartens, J. De Beer, *Anal. Chim. Acta*, **312**, 245-262, 1995.
- [67].- M. Mulholland, *Trends. Anal. Chem.*, **7(10)**, 383-389, 1988.
- [68].- M. Valcárcel, A. Ríos, *Analisis*, **18**, 469-475, 1990.
- [69].- IUPAC. Analytical Chemistry Division, *Pure & Appl. Chem.*, **55(3)**, 553-556, 1983.
- [70].- A.L. Wilson, *Talanta*, **21**, 1109-1121, 1974.
- [71].- A.M. García Campaña, L. Cuadros Rodríguez, C. Jimenéz Linares, F. Allés Barrero, M. Román Ceba, *Anal. Lett.*, **28(2)**, 369-380, 1995.
- [72].- ISO Guide 30 (1981), ISO GENEVA, Switzerland.
- [73].- Analytical Methods Committee, *Analyst*, **120**, 29-34, 1995.
- [74].- J.C. Miller, J.N. Miller, *Analyst*, **113**, 1351-1356, 1988.
- [75].- W. Penninckx, *Analisis*, **22(5)**, 22-23, 1994.
- [76].- J.C. Miller, J.N. Miller, "Estadística para Química Analítica". Cap. V, 87-119. 2ª Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. Wilmington, Delaware, 1993.
- [77].- D.L. Massart, B.G.M. Vanderginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, "Chemometrics: A textbook". Cap. XIII, 165-189. Elsevier, Amsterdam 1988.
- [78].- R. Boqué, F.X. Rius, "Profundizando en La Calibración Lineal Univariante", en: "Avances en Quimiometría Práctica", R. Cela, 157-187. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 1994.
- [79].- T.J. Chow, T.G. Thompson, *Anal. Chem.*, **27(1)**, 18, 1955.
- [80].- M. Bader, *J. Chem. Ed.*, **57**, 703, 1980.
- [81].- M.J. Cardone, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66(5)**, 1257-1282, 1983.
- [82].- M.J. Cardone, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66(2)**, 1283-1294, 1983.
- [83].- M.J. Cardone, *Anal. Chem.*, **58**, 433-438, 1986.
- [84].- M.J. Cardone, *Anal. Chem.*, **58**, 438-445, 1986.
- [85].- M. Thompson, *Analyst*, **107**, 1169, 1982.
- [86].- L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, F. Allés Barrero, C. Jimenéz Linares, M. Román Ceba, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **78**, 795, 1995.

CAPÍTULO III

DETERMINACIÓN DE SULFITO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA.

Una vez liberados a la atmósfera por la combustión del azufre en carburantes y carbones, el óxido y el dióxido de azufre se disuelven en agua y forman bisulfito o sulfito, que al oxidarse gradualmente a ácido sulfúrico o sulfato, caen al suelo disueltos en agua de lluvia. Esto acidifica el medio ambiente y provoca una disminución de la capacidad neutralizante del suelo y del agua.

En el presente capítulo, se propone utilizar la Espectrofotometría en Fase Sólida para la determinación del sulfito, en un volumen de 250 mL, basada sobre la formación de un compuesto, el ácido pararosanilmetilsulfónico (p-RMS), intensamente coloreado que se obtiene a partir de la reacción entre el sulfito, p-roanilina y formaldehído en medio ácido [1].

1.- ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN FASE SÓLIDA

El espectro de absorción del compuesto fijado en fase sólida, ha sido obtenido a partir de una disolución que contenía 5 mL de p-rosanilina purificada del 0'012%, 5 mL de la disolución de HCOH del 0'28%, 10 mL de la disolución de sulfito de 1'03 ppm estabilizado en morfolina, 5 mL de la disolución reguladora (ClCH₂CO₂H/ClCH₂CO₂K) 0'1 M de pH = 3'0 y el agua de ósmosis inversa necesaria para llevar a un volumen final de 250 mL. El blanco correspondiente, se preparó de la misma manera pero exento de sulfito.

Tras agitar las botellas, con 150 mg de resina Dowex 1X8 (100-200 mallas) en ciclo Cl⁻, durante un tiempo de 90 minutos, se obtuvieron los espectros que se recogen en la figura III.1.

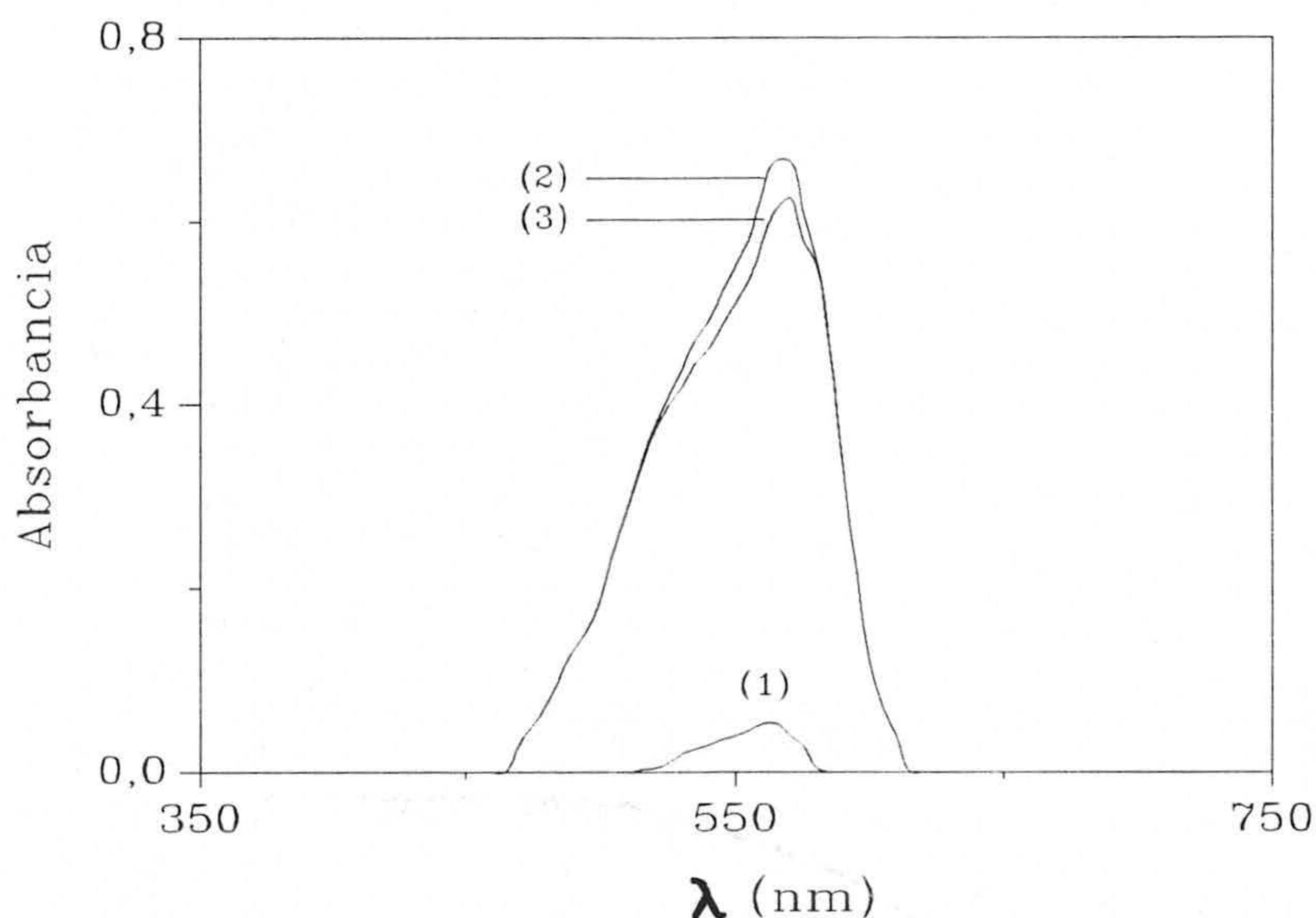


Figura III.1. Espectros de absorción en fase sólida. Espectro (1): blanco frente a resina en agua; Espectro (2): p-RMS frente a resina en agua; Espectro (3): p-RMS frente a blanco.

El espectro de absorción neto del compuesto formado (p-RMS) y fijado en la

resina, presenta un solo máximo a una longitud de onda de 565 nm (espectro 3, figura III.1) mientras que el blanco correspondiente tiene una señal casi despreciable a esta misma longitud de onda. Sin duda, el carácter catiónico de la p-rosanilina en estas condiciones impide su retención en un cambiador de aniones como es la resina Dowex 1X8.

2.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE CONDICIONAN LA FORMACIÓN DEL ÁCIDO p-ROSANILINMETILSULFÓNICO EN EL CAMBIADOR

2.1.- Influencia de la concentración de la disolución reguladora

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon varios matraces de 250 mL que contenían 3 mL de disolución de p-rosanilina purificada del 0'008%, 2 mL de disolución de HCOH del 0'2%, 10 mL de la disolución de sulfito de 0'96 ppm estabilizado en morfolina, volúmenes crecientes de la disolución reguladora (ClCH₂CO₂H/ClCH₂CO₂K) 0'1 M de pH = 3'0 y el agua de ósmosis inversa necesaria para llevar a un volumen final de 250 mL. Para los correspondientes blancos, se prepararon de la misma manera.

Utilizando el procedimiento anteriormente mencionado con 150 mg de resina Dowex 1X8 (200-400 mallas) y con un tiempo de agitación de 40 minutos, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla III.1 y se representan en la figura III.2.

Se observa que el incremento de la concentración de la disolución reguladora no afecta a la absorbancia neta en el rango de concentraciones $0'4 \times 10^{-3}$ - $2'8 \times 10^{-3}$ M (fuerza iónica de $1'0 \times 10^{-4}$ - $1'1 \times 10^{-3}$ M). Por tanto para posteriores experiencias, se opta por una concentración de 2×10^{-3} M de tampón.

Hay que señalar que altas concentraciones de la disolución reguladora producen una disminución de la absorbancia neta debido a un aumento en la absorbancia del blanco. Esto podría ser causado por una mayor fijación de la p-rosanilina por un proceso de adsorción, al compensarse su carga positiva con los

aniones de un medio de mayor contenido iónico.

Tabla III.1. Influencia de la concentración de la disolución reguladora.

V (mL)	[Tampón] $\times 10^3$ (M)	A_b	A	A_{neta}
1	0'4	0'125	0'757	0'632
3	1'2	0'134	0'772	0'638
4	1'6	0'136	0'766	0'630
5	2'0	0'139	0'771	0'632
6	2'4	0'163	0'790	0'627
7	2'8	0'158	0'784	0'626
10	4'0	0'170	0'763	0'593
20	8'0	0'216	0'774	0'558

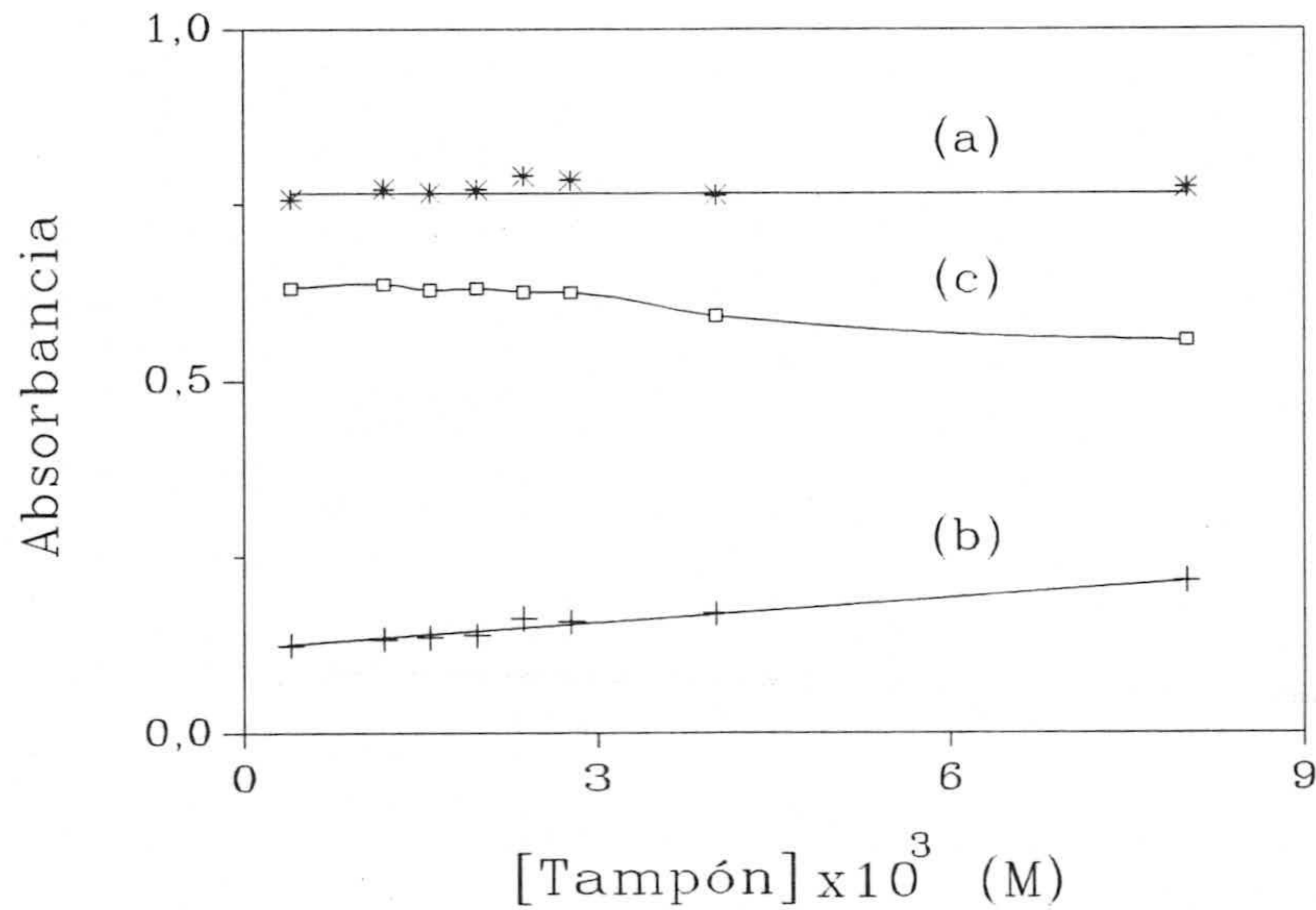


Figura III.2. Influencia de la concentración de la disolución reguladora. (a), (b) y (c) influencia sobre la absorbancia de analito, del blanco y neta respectivamente.

Este comportamiento de la p-rosanilina ha sido confirmado en otros tipos de fases sólidas. En efecto, la fijación de ésta es mayor sobre un cambiador catiónico (Dowex 50W en forma H^+ , 100-200 mallas) que sobre el cambiador aniónico confirmando la carga positiva del reactivo. Además, sobre geles tipo dextrano sin grupos de cambio iónico (Sephadex G-15, 40-120 μ), la fijación de la p-rosanilina es mayor que sobre el cambiador catiónico o sobre el aniónico. Estos hechos confirman la gran contribución del proceso de adsorción en la fijación de la p-rosanilina.

2.2.- Influencia de volumen de formaldehído

Se prepararon disoluciones que contenían 3 mL de disolución de p-rosanilina purificada del 0'008%, volúmenes crecientes de la disolución de HCOH del 0'28%, 10 mL de disolución de sulfito de 0'96 ppm y 5 mL de la disolución reguladora en un volumen final de 250 mL. Se emplearon 150 mg de resina Dowex 1X8 (100-200 mallas) y un tiempo de agitación de 50 minutos.

Utilizando el procedimiento habitual, se obtuvieron las absorbancias netas que se recogen en la tabla III.2 y que se representan en la figura III.3.

Tabla III.2. Influencia de volumen de formaldehído.

V (mL)	A_{neta}
1'0	0'422
2'0	0'438
3'5	0'511
4'5	0'531
5'5	0'539
7'0	0'525

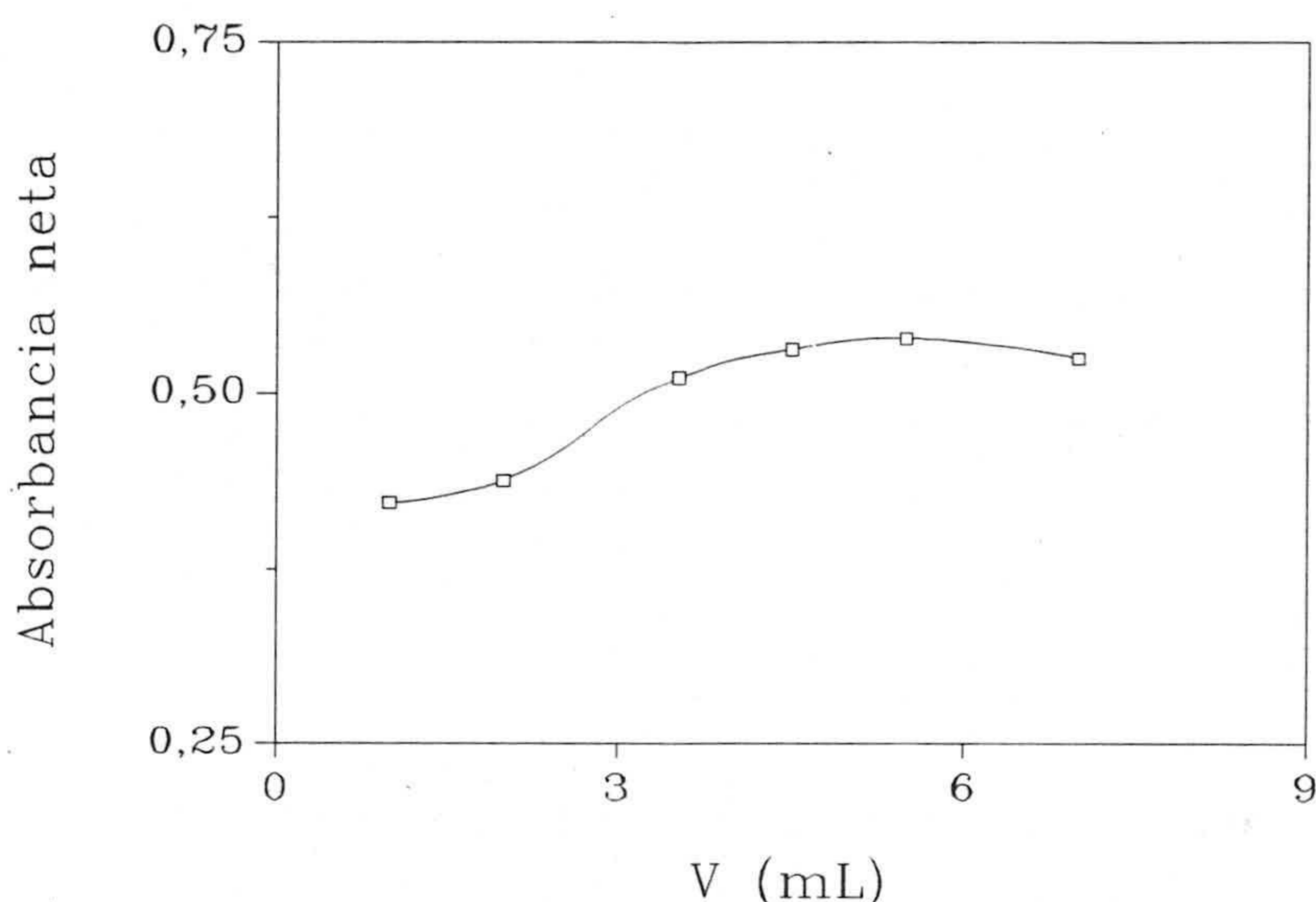


Figura III.3. Influencia de volumen de formaldehído.

Se observa que aumenta la absorbancia neta con la concentración de formaldehído y que se alcanza una constancia a partir de 3'5 mL. Para posteriores experiencias, se opta por un volumen de 5 mL.

2.3.- Influencia de volumen de p-rosanilina

Para el estudio de esta variable se han preparado una serie de matraces aforados de 250 mL que contenían volúmenes crecientes de la disolución de p-rosanilina purificada del 0'012%, 5 mL de disolución de formaldehído del 0'28%, 10 mL de la disolución de sulfito de 0'96 ppm y 5 mL de la disolución reguladora y se ha operado en la forma descrita con 150 mg de resina Dowex 1X8 (100-200 mallas) y un tiempo de agitación de 50 minutos. Los blancos correspondientes se procesaron de la misma manera.

Los resultados obtenidos (recogidos en la tabla III.3 y figura III.4) indican que la absorbancia neta alcanza un máximo en el rango 3'0-7'0 mL de p-rosanilina purificada del 0'012%. Por lo tanto, se elige una concentración de reactivo

correspondiente a 5 mL, para posteriores experiencias.

Tabla III.3. Influencia de volumen de p-rosanilina.

V (mL)	A_{neta}
2'0	0'478
2'5	0'525
3'0	0'555
5'0	0'585
7'0	0'549

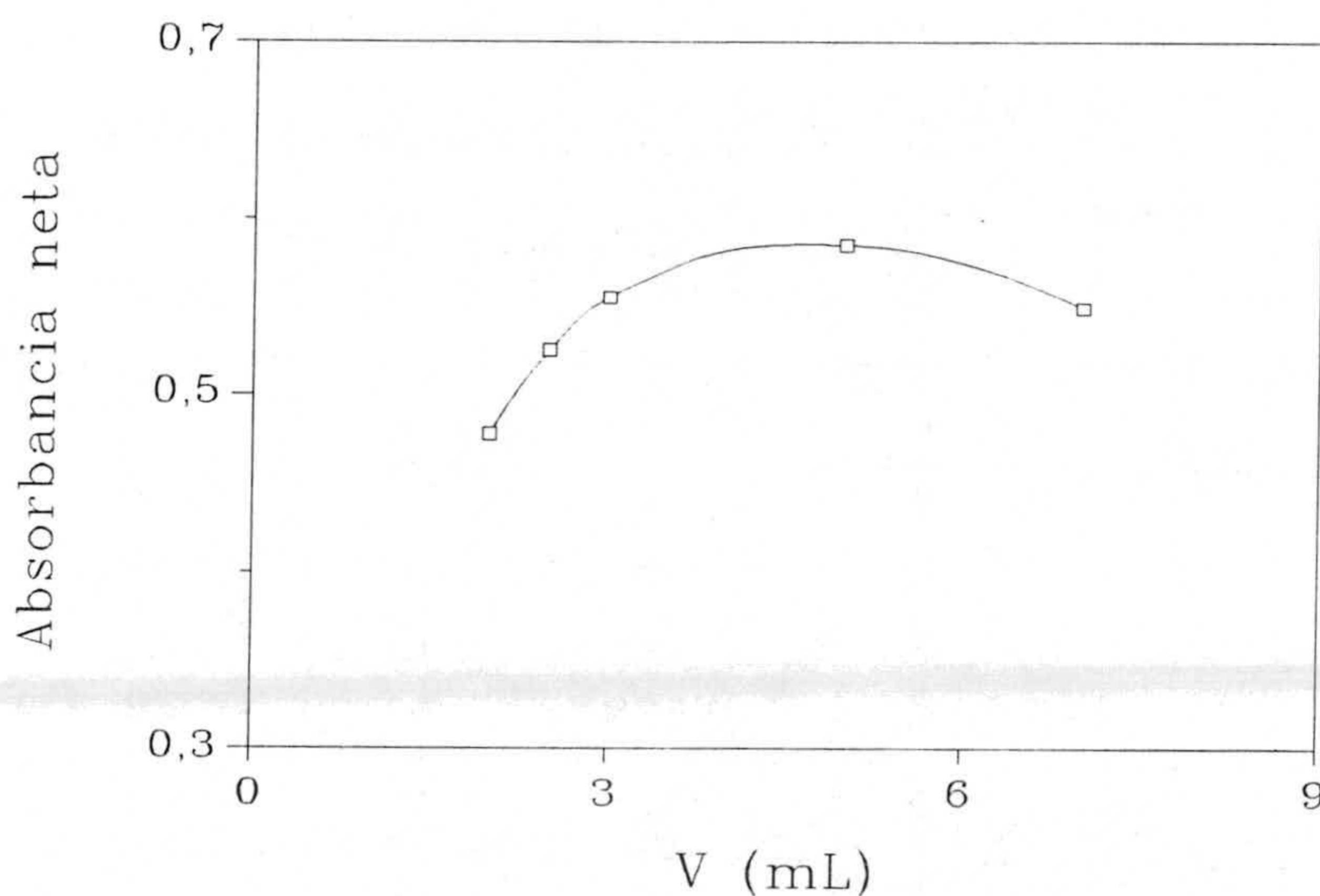


Figura III.4. Influencia de la concentración de p-rosanilina.

2.4.- Influencia del tiempo de agitación

El tiempo de agitación del soporte sólido en la disolución de analito, es una variable fundamental en Espectrofotometría en Fase Sólida ya que se deben alcanzar condiciones de equilibrio o próximos a él, para realizar adecuadamente las medidas. Por ello, a veces, al tiempo de agitación, se le llama de equilibración.

El estudio de esta variable, se llevó a cabo sobre la misma cantidad (150 mg) de dos tipos de resina Dowex 1X8 empleadas hasta ahora: de 100-200 y de 200-400 mallas y con una velocidad de 77 rpm.

Los resultados obtenidos para 41'2 ppb de sulfito (resina de 100-200 mallas) y 10'3 ppb (resina de 200-400 mallas) y los volúmenes previamente fijados de los reactivos se recogen en la tabla III.4. Como cabía esperar, la máxima absorbancia se alcanza antes en la resina de menor tamaño de grano (cinética más rápida).

Tabla III.4. Influencia del tiempo de agitación (250 mL de disolución, 150 mg de resina).

t (min)	A_{neta}	
	100-200 mallas	200-400 mallas
20	0'336	0'289
30	0'433	0'311
40	-----	0'341
50	0'559	0'339
60	0'591	0'340
70	0'599	-----
80	0'581	-----
90	0'539	-----

Se seleccionan tiempos de agitación de 70 y 40 minutos para las resinas de 100-200 y 200-400 mallas, respectivamente, para posteriores experiencias.

Por otra parte, se ha comprobado que aumentar la velocidad de agitación sobre la habitual (77 rpm) no aumenta la absorbancia neta alcanzada.

En efecto, tres disoluciones de ensayo idénticas conteniendo 10^3 ppb de sulfito agitadas junto con 150 mg de resina Dowex 1X8 (200-400 mallas) durante 40 minutos a una velocidad de 97 rpm dieron un valor medio para la absorbancia neta de 0.342 ± 0.003 , que no difiere significativamente del correspondiente a un tiempo de agitación de 40 minutos a 77 rpm ($P = 46\%$).

Esto sugiere que, en las condiciones normales de operación, la velocidad global del proceso no está gobernada por la difusión a través de la película estacionaria de disolución que rodea a las partículas de resina que se agitan (difusión de película).

2.5.- Estabilidad de las disoluciones de trabajo de sulfito

Son conocidos los problemas relativos a la preparación y conservación de las disoluciones patrón de sulfito, dada la tendencia de éste a oxidarse a sulfatos.

De entre las sustancias usadas como estabilizadores [1-7] la más adecuada para las condiciones experimentales utilizadas aquí es la morfolina. Este compuesto al 0.02% (v/v) mantiene estable la disolución de trabajo de 5 ppm durante 12 días, a temperatura ambiental (20-25 °C).

Partiendo de estos datos nos planteamos conocer en primer lugar, la estabilidad de las disoluciones de sulfito en presencia de morfolina, cuando estas disoluciones son mantenidas bajo refrigeración. Por otra parte, estudiar si estas disoluciones admiten elevaciones de la temperatura, aspecto importante a tener en cuenta a la hora de realizar un programa de muestreo medioambiental.

Para saber cuál es la estabilidad de sulfito patrón, mantenido bajo refrigeración (7-8 °C), se preparó una disolución de 5.4 ppm en morfolina al 0.02% y se fué

analizando en diferentes días, empleando el procedimiento habitual. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.5 y figura III.5.

Tabla III.5. Estabilidad de la disolución de sulfito bajo refrigeración.

Día	A _{nete}	Día	A _{nete}
1	0'259	31	0'263
2	0'266	36	0'264
3	0'248	45	0'289
4	0'276	71	0'248
6	0'261	78	0'278
7	0'253	90	0'247
8	0'247	99	0'237
9	0'272	104	0'244
10	0'281	113	0'243
15	0'276	126	0'257
17	0'258	141	0'258
20	0'259	163	0'234
22	0'266	187	0'226
24	0'238	218	0'221
27	0'248	250	0'211

Se puede concluir que en estas condiciones la disolución de sulfito es perfectamente estable durante un tiempo de 5 meses y que a partir de este tiempo la absorbancia empieza a disminuir progresivamente.

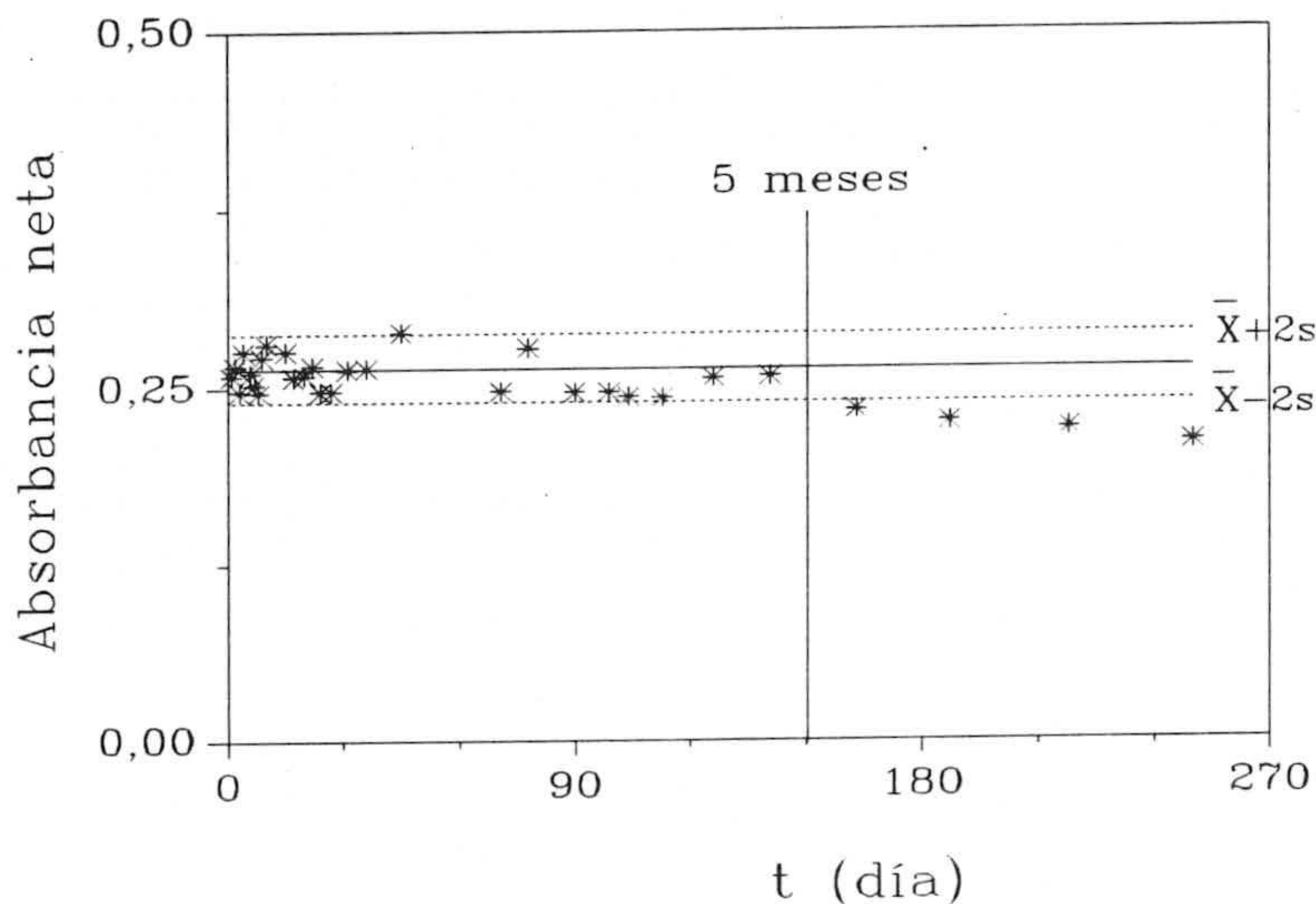


Figura III.5. Estabilidad de la disolución de sulfito bajo refrigeración. $C_{\text{sulfito}} = 17'2$ ppb, $V(\text{p-rosanilina del } 0'012\%) = 5$ mL, $V(\text{HCOH del } 0'28\%) = 5$ mL, 150 mg de resina Dowex 1X8 (100-200 mallas), $t_{\text{agitación}} = 70$ min, $V = 250$ mL. \bar{X} y s son la media aritmética y la desviación estándar respectivamente de los 10 primeros valores.

Para observar la estabilidad del sulfito frente a la elevación de temperatura, se calentaron durante 45 minutos cuatro disoluciones de 0'9 ppm a diferentes temperaturas en un baño maria. Se pipetearon 5 mL de cada una de estas disoluciones y se les añadieron los demás reactivos, tal y como se indica en el procedimiento operatorio. Las absorbancias netas obtenidas, utilizando 150 mg de resina de 100-200 mallas (tabla III.6) no muestran dependencia alguna con la temperatura ensayada.

La media aritmética de dichos valores, $0'266 \pm 0'004$, es significativamente igual a la media de las absorbancias netas obtenidas de una disolución de sulfito que no ha sido calentada, 0'264 ($P = 45\%$). Por consiguiente, se puede concluir que la elevación de la temperatura en las condiciones ensayadas no altera el contenido de sulfito de las disoluciones.

Tabla III.6. Estabilidad frente a la elevación de la temperatura.

T (°C)	A _{neto}
30	0'264
40	0'270
50	0'268
60	0'261

2.6.- Resumen de las variables optimizadas

Los valores óptimos encontrados en el estudio de las variables que afectan al sistema en estudio, se resumen en la tabla III.7.

Tabla III.7. Resumen de las variables optimizadas (V = 250 mL).

Variable	Valor óptimo
Orden de adición Cantidad de resina Dowex 1X8 [Tampón], pH = 3'0 V(formaldehído del 0'28%) V(p-rosanilina del 0'012%) Tiempo de agitación (para los dos tipos de resina Dowex 1X8) Temperatura Velocidad del agitador $\lambda_{medida}/\lambda_{empaquetamiento}$ Estabilidad del sulfito patrón (5 ppm en morfolina al 0'02%)	PRA + HCOH + SO ₃ ²⁻ + Tampón 150 mg 2'00x10 ⁻³ M 5 mL 5 mL 40 min. (200-400 mallas) 70 min. (100-200 mallas) no afecta 77 r/min. 565/700 nm 5 meses

3.- ESTABLECIMIENTO DEL MÉTODO ANALÍTICO

En este apartado se recogen los calibrados del método, sus parámetros de fiabilidad así como sus procedimientos operatorios propuestos, para los dos tipos de resina Dowex 1X8 (100-200 y 200-400 mallas).

3.1.- Calibrados del método. Parámetros de fiabilidad

Para comprobar el cumplimiento de la linealidad de la relación entre la absorbancia y la concentración de sulfito, se utilizaron tres réplicas de cada concentración para cada tipo de resina.

Para ello, se prepararon matraces de 250 mL en los que se introdujeron 5 mL de la disolución de p-rosanilina purificada del 0'012%, 5 mL de la disolución de formaldehído del 0'28%, volúmenes crecientes de la disolución de sulfito estabilizado en morfolina de 3'25 ppm (para la resina 100-200 mallas) o de 5 ppm (para la de 200-400 mallas) y 5 mL de disolución reguladora ($\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{H}/\text{ClCH}_2\text{CO}_2\text{K}$) 0'1 M de pH = 3'0 completando finalmente con agua de ósmosis inversa hasta el enrase. Dependiendo del tipo de resina, las botellas se agitaron durante 70 (para 100-200 mallas) o 40 minutos (para 200-400 mallas) obteniéndose los resultados que se recogen en la tabla III.8.

La comprobación del ajuste de los datos experimentales al modelo lineal, para ambas resinas, se llevó a cabo utilizando la estimación del fallo de ajuste mediante el test de análisis de la varianza.

Cuando se introducen todos los datos experimentales (tanto para una como para otra resina), los ANOVA correspondientes dan un test de curvatura significativo ($P = 2'77\%$ y $2'20\%$ para la resina 100-200 y 200-400 mallas, respectivamente), lo que indica que existe al menos un punto que se aparta de la línea recta en ambas funciones de calibrado.

Tabla III.8. Calibrados del método.

C_{sulfito} (ppb)	A (100-200 mallas)	C_{sulfito} (ppb)	A (200-400 mallas)
0	0'068 0'079 0'060	0	0'179 0'165 0'172
13	0'251 0'278 0'276	10	0'473 0'482 0'496
26	0'496 0'484 0'466	20	0'792 0'799 0'783
39	0'688 0'671 0'692	30	1'109 1'097 1'102
52	0'900 0'872 0'900	40	1'421 1'402 1'412
65	1'093 1'108 1'123	50	1'713 1'722 1'735
78	1'211 1'277 1'119	60	1'988 2'010 2'003

Una vez eliminado el conjunto de datos correspondientes a la concentración de sulfito de 78 ppb para la resina 100-200 mallas y 60 ppb para la resina 200-400 mallas, se obtuvieron los ANOVA cuyos tests de curvatura no son significativos ($P = 81'98$ y

99'67% para la resina 100-200 y 200-400 mallas, respectivamente), lo que indica que no existen curvaturas entre los datos y por tanto los límites superiores del método son 65 y 50 ppb de sulfito para la resina 100-200 y 200-400 mallas, respectivamente.

Las ecuaciones de las rectas de calibrado deducidas de la regresión por mínimos cuadrados son, respectivamente:

$$A = 0'065 + 0'016C_{\text{sulfito}} \quad \text{y} \quad A = 0'172 + 0'031C_{\text{sulfito}}$$

En la tabla III.9, se indican sus principales parámetros estadísticos.

Tabla III.9. Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor	
	Resina 100-200 mallas	Resina 200-400 mallas
n	18	18
m	3	3
$s_{R,C}$	0'0128	0'0079
a	0'0648	0'1723
s_a	0'0053	0'0033
b	0'0160	0'0310
s_b	0'0001	0'0001
r^2 (%)	99'88	99'98

Linealidad

La linealidad "in-line" y "on-line" para ambas resinas se recoge a continuación:

	100-200 mallas	200-400 mallas
Lin. "in-line"	81'98 %	99'67 %
Lin. "on-line"	99'15 %	99'68 %

Sensibilidad

- La sensibilidad dada por la IUPAC es:

$$\text{Sens. cal. (b)} = 0'016 \text{ y } 0'031 \text{ (unidad de abs./ppb SO}_3^{2-}\text{)}$$

para la resina Dowex 1X8 (100-200 mallas) y la (200-400 mallas), respectivamente.

- La sensibilidad analítica:

* Calculada a partir de la repetibilidad, se obtuvo midiendo la absorbancia neta de diez disoluciones conteniendo 41 ppb de sulfito (para 100-200 mallas) o 10 ppb (para 200-400 mallas), a las cuales se les aplicó el procedimiento habitual. Las señales medias así como el valor de desviación estándar, para ambas resinas, se reflejan en la tabla III.10.

Tabla III.10. Repetibilidad del método.

Estadístico	Valor	
	100-200 mallas	200-400 mallas
$C_{\text{sulfito}}(\text{ppb})$	41	10
n	10	10
\bar{A}_{neta}	0'653	0'473
S_R	0'0236	0'0080

y por consiguiente, las sensibilidades analíticas son:

$$\text{Sens. anal. } (b/s_R) = 0'68 \text{ y } 3'88 \text{ ppb}^{-1} \text{ de SO}_3^{2-}$$

para la resina de 100-200 y 200-400 mallas, respectivamente.

* La sensibilidad analítica, calculada a partir del modelo de regresión lineal, es:

$$\text{Sens. anal. } (s_{R,C}/b) = 0'80 \text{ y } 0'25 \text{ ppb de SO}_3^{2-}$$

para la resina de menor y mayor malla, respectivamente.

Límite de detección

- Para determinar el límite de detección, según la expresión que da la IUPAC, se procedió a medir la absorbancia de diez blancos a los cuales se les aplicó el procedimiento habitual. Los valores medios de las señales medidas así como la desviación estándar de los mismos (para ambos tipos de resina) se reflejan en la tabla III.11

Tabla III.11. Repetibilidad del blanco.

Estadístico	Valor	
	100-200 mallas	200-400 mallas
$C_{\text{sulfito}}(\text{ppb})$	0	0
n	10	10
\bar{A}_b	0'053	0'158
s_{R_o}	0'0062	0'0084

y por consiguiente, los límites de detección son 1'16 ppb (100-200 mallas) y 0'81 ppb (200-400 mallas).

- Los límites de detección calculados a partir del modelo de regresión lineal, son:

$$L_D = 1'71 \text{ y } 0'54 \text{ ppb.}$$

para las resinas de 100-200 y 200-400 mallas, respectivamente.

- Los límites de detección, para probabilidades de falsos positivo y negativo del 95% ($\alpha = 0'05$, $\beta = 0'05$) y teniendo en cuenta tres determinaciones sobre el blanco para cada tipo de resina, son:

$$L_D = 1'96 \text{ y } 0'62 \text{ ppb}$$

para las resinas de 100-200 y 200-400 mallas, respectivamente.

Límite de cuantificación

Los límites de cuantificación calculados a partir de:

- La repetibilidad, son:

$$L_Q = 3'79 \text{ y } 2'71 \text{ ppb}$$

- El modelo de regresión lineal, son:

$$L_Q = 5'69 \text{ y } 1'82 \text{ ppb}$$

para la resina de menor y mayor malla, respectivamente.

Rango dinámico lineal

Puesto que los límites superiores son 65'00 y 50'00 ppb y los límites inferiores son 1'16 y 0'81 ppb, respectivamente, para la resina de menor y mayor malla, los rangos dinámicos lineales son:

$$RDL = 5'603 \text{ y } 6'173$$

Precisión

- Repetibilidad del método:

La precisión, expresada como desviación estándar relativa de la señal (tabla III.10), llevada a cabo sobre concentraciones de sulfito de 41 y 10 ppb es:

$$DER (\%) = 3'60 \% \text{ (para 100-200 mallas)}$$

$$DER (\%) = 1'69 \% \text{ (para 200-400 mallas)}$$

correspondiendo a una desviación estándar relativa sobre la concentración de 3'60 y 2'58 % respectivamente.

- Reproducibilidad del método:

El estudio de la reproducibilidad se llevó a cabo midiendo la absorbancia neta de diez disoluciones de sulfito de 17 ppb (para 100-200 mallas) o de 19 ppb (para 200-400 mallas), en distintos días, siguiendo el procedimiento habitual. Los valores medios de las señales obtenidas así como la desviación estándar de los mismos se recogen en la tabla III.12.

Tabla III.12. Reproducibilidad del método.

Estadístico	Valor	
	100-200 mallas	200-400 mallas
$C_{\text{sulfito}}(\text{ppb})$	17	19
n	10	10
\bar{A}_{neta}	0'264	0'600
S_R	0'0122	0'0267
$DER(\%)$	4'62	4'45

Se puede concluir que el método presenta una adecuada reproducibilidad a las concentraciones estudiadas, cualquiera que sea el soporte empleado (de los dos ensayados).

- Se evaluó finalmente la precisión del método propuesto a partir del modelo de regresión lineal, de acuerdo con el protocolo establecido en el capítulo II, representando la desviación estándar relativa de la concentración frente a ésta (figura III.6).

Podemos observar en la figura III.6, como la precisión de la medida disminuye al disminuir la concentración de analito. Esta figura se puede utilizar para estimar la precisión en la determinación de sulfito a cualquier valor de concentración dentro del intervalo ensayado.

Comparación de los parámetros obtenidos para las dos resinas

La metodología propuesta presenta una doble alternativa para su aplicación, en función del tamaño de grano de la resina utilizada. La tabla III.13 recoge algunos elementos de comparación. Así, mientras que la resina de 100-200 mallas presenta valores bajos de absorbancia en el blanco pero necesita un tiempo de agitación de 70 minutos, la resina de 200-400 mallas reduce el tiempo de equilibración a 40 minutos y

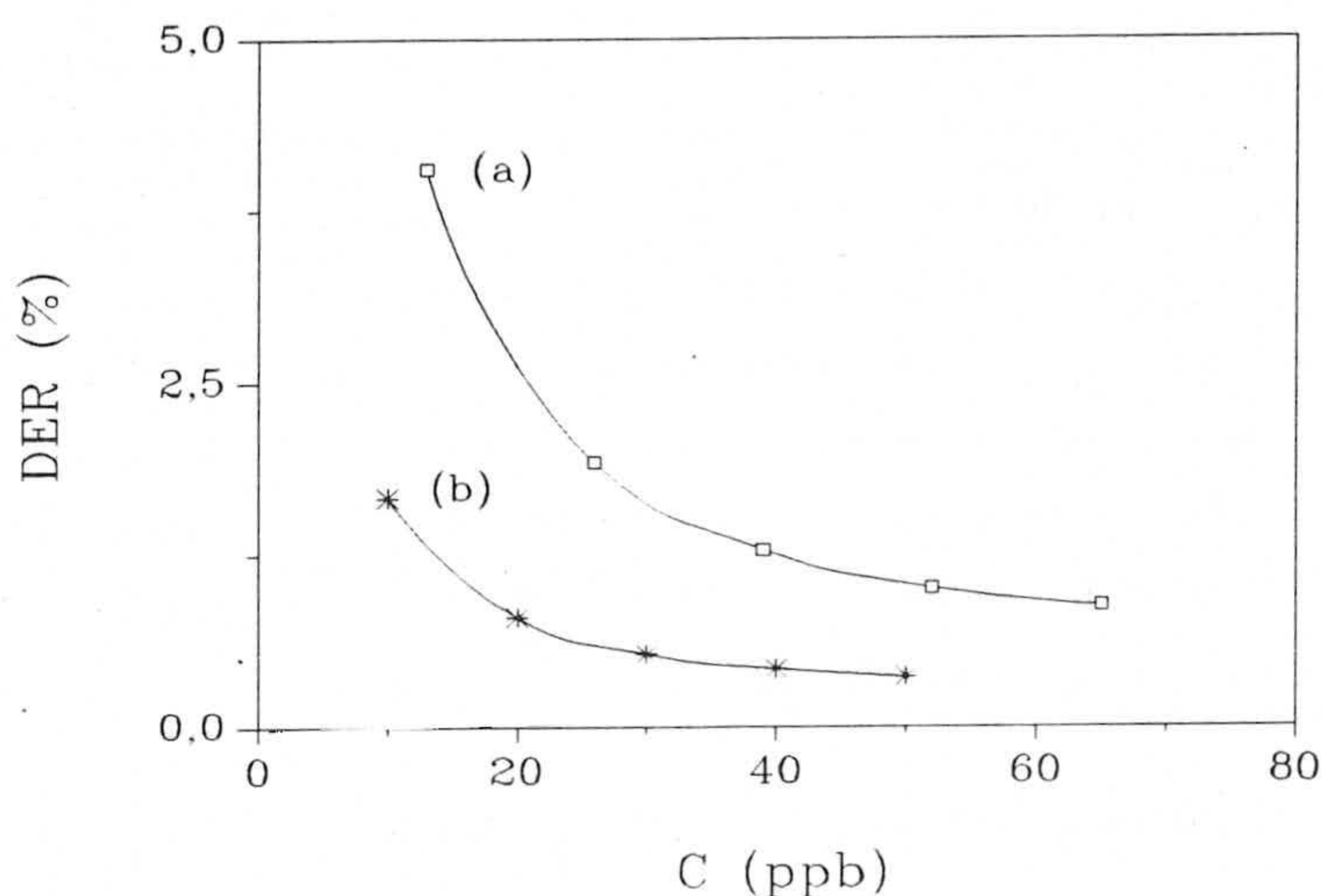


Figura III.6. Variación de la DER (%) con la concentración de SO_3^{2-} . (a) y (b): curvas de precisión correspondientes a las resinas Dowex 1X8 (100-200 mallas) y (200-400 mallas), respectivamente.

permite una mayor sensibilidad y menores límites de detección y de cuantificación.

Tabla III.13. Comparación de parámetros para las dos resinas.

	Resina Dowex 1X8	
	100-200 mallas	200-400 mallas
Señal del blanco	0'053	0'158
Tiempo de agitación (min.)	70	40
Sensibilidad (unidad de abs./ppb SO_3^{2-})	0'016	0'031
Límite de detección (ppb)	1'16	0'81
Límite de cuantificación (ppb)	3'79	2'71

3.2.- Procedimiento operatorio propuesto

En matraces de 250 mL, se introducen en este orden: 5 mL de la disolución de p-rostanilina purificada al 0'012%, 5 mL de la disolución de formaldehído del 0'28%, el volumen de disolución de sulfito, estabilizado en morfolina, necesario para que su concentración esté comprendida entre 3'8-65'0 (o 2'7-50'0) ppb, para la resina de 100-200 (o 200-400) mallas, 5 mL de disolución reguladora (ClCH₂CO₂H/ClCH₂CO₂K) 0'1 M y de pH 3'0 y el volumen de agua de ósmosis inversa preciso para completar hasta el enrase. Se trasvasan las disoluciones así preparadas a frascos de polietileno de 1L de capacidad, y se les añade 150 mg de la resina Dowex 1X8 elegida y el equipo se equilibra en un agitador rotatorio durante 70 (o 40) minutos. Se recoge la fase sólida por filtración y se empaqueta en cubetas de vidrio óptico de 1-mm de paso de luz. Finalmente, después de centrifugar las cubetas durante 1 minuto, se mide la absorbancia, frente a una cubeta con la resina adecuada equilibrada en agua de ósmosis inversa, a las longitudes de onda 565 y 700 nm. El blanco se prepara y se mide de manera análoga.

Mediante interpolación de la absorbancia del compuesto en la recta de calibrado, preparado en idénticas condiciones, se deduce la concentración de analito en la disolución problema.

3.3.- Selectividad

Una vez realizadas las experiencias necesarias para establecer el método de determinación de SO₃²⁻ con p-rostanilina y formaldehído, pasamos al estudio de la influencia que la presencia de iones extraños ejerce en la determinación, bien por encontrarse corrientemente en las aguas naturales y/o por ser especies que puedan oxidar el sulfito a sulfato.

Para ello, y siguiendo el método propuesto para la resina de 100-200 mallas operamos con disoluciones conteniendo 16 ppb de sulfito y cantidades variables del ión cuyo efecto se quiere ensayar. El orden de adición fue: p-rostanilina + formaldehído +

ion extraño + sulfito + tampón. Los blancos se prepararon de la misma manera pero exentos de analito e interferente.

Para estimar la tolerancia de los iones extraños se procedió como se indicó en el capítulo II. Se comprobó si la señal neta obtenida en presencia del posible interferente está incluida o no dentro del intervalo $A_{neta} \pm s^*$, donde A_{neta} es el valor medio obtenido en el estudio de reproducibilidad (0'264) y s^* , la desviación estándar de las señales de dicho estudio (0'0122), que corresponde a errores relativos iguales o menores al 5 %.

El resumen de la tolerancia de los distintos iones, se recoge en la tabla III.14.

Tabla III.14. Tolerancia de iones extraños en la determinación de 16 ppb de sulfito.

Ion Extraño	Tolerancia (ppb)
SO ₄ ²⁻	250000
PO ₄ ³⁻ , SiO ₃ ²⁻	20000
Cl ⁻ , NO ₃ ⁻	5000
F ⁻	3000
NH ₄ ⁺	2000
Ca(II), Mg(II)	1000
Al(III), NO ₂ ⁻	100
Mn(II)	50
Cu(II)	30
Cr(III)	20
Fe(III), Pb(II)	10

A partir de dicha tabla, se deduce que:

- Causan una gran interferencia los iones Fe(III) y Pb(II).
- Los iones Cr(III), Cu(III) y Mn(II) interfieren moderadamente, admitiéndose como mínimo hasta una relación 1'25/1 en peso, con respecto al sulfito.
- Tienen una tolerancia elevada todos los aniones además de Al(III), Ca(II), Mg(II) y NH_4^+ .

Hay que señalar que la interferencia fue negativa para la mayoría de los iones y positiva para Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , SiO_3^{2-} , Ca(II), Mg(II) y NH_4^+ .

Finalmente, se ha comprobado que en algunos casos, la tolerancia puede aumentarse si se mide frente a un blanco que contenga el ión interferente. en estas condiciones se admite la presencia de hasta 50 ppm de Cl^- , 100 ppm de NO_3^- y 10 ppm de Ca(II).

Influencia sobre la señal del blanco

La absorbancia del blanco no se afecta por la presencia de la mayoría de los iones extraños ensayados. Sin embargo, en ciertos casos se han observado aumentos de absorbancia.

En la tabla III.15, se recoge el efecto de los aniones sobre la absorbancia del blanco. Como se puede observar, la absorbancia del blanco aumenta linealmente con la concentración del ión extraño en cuestión ($r^2 > 96\%$, en todos los casos). Esta subida del blanco justifica tanto la interferencia positiva de estos aniones como el incremento de la tolerancia para los iones Cl^- , NO_3^- y Ca(II), usando un blanco con el ión extraño preparado al efecto.

Tabla III.15. Efecto de los aniones sobre la señal del blanco.

Ión	Ecuación (C en ppm)	r ² (%)	Intervalo de concentración (ppm)
Cl ⁻	$A_b = 0'057 + 0'0007C$	96'0	0-100
NO ₃ ⁻	$A_b = 0'043 + 0'0015C$	99'2	0-250
SO ₄ ²⁻	$A_b = 0'052 + 0'0007C$	99'8	0-250
SiO ₃ ²⁻	$A_b = 0'057 + 0'0057C$	98'2	0-25

En la tabla III.16 se recogen los niveles de falso positivo calculados para estos aniones, esto es, la máxima concentración de dichos aniones que, en ausencia de analito, produce una absorbancia inferior o igual a la del límite de cuantificación del método. Mayores concentraciones producirán resultados positivos falsos, en ausencia de analito.

Tabla III.16. Niveles de falso positivo de los interferentes que tienen efecto sobre la señal del blanco.

Ión	Falso positivo ^(*) (ppm)
Cl ⁻	21'4
NO ₃ ⁻	19'3
SO ₄ ²⁻	28'6
SiO ₃ ²⁻	2'6

(*): Calculado a partir de las ecuaciones de la tabla III.15 y la absorbancia correspondiente al límite de cuantificación del método (3'79 ppb).

Por otra parte, la dependencia lineal observada entre la absorbancia y la concentración de nitratos en los casos de las disoluciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ o $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, tanto en ausencia como en presencia de sulfito, es similar a la observada en las disoluciones de NaNO_3 . Esto indica que la interferencia positiva en los ensayos de $\text{Ca}(\text{II})$ y $\text{Mg}(\text{II})$ puede ser explicada por la presencia de NO_3^- como anión en las disoluciones de los cationes.

4.- DISTRIBUCIÓN DEL ANALITO ENTRE LA FASE SÓLIDA Y LA DISOLUCIÓN ACUOSA

La razón de distribución D entre la fase sólida y la disolución acuosa, para una especie química X , viene dada por:

$$D = \frac{\text{mmoles de } X \text{ sorbidos por gramo de resina}}{\text{mmoles de } X \text{ por mL de disolución}}$$

Para calcular la razón de distribución de la especie objeto de estudio en las condiciones experimentales de trabajo, se prepararon al pH adecuado tres disoluciones idénticas que, en un volumen de 250 mL, contenían $4,47 \times 10^{-5}$ mmoles de sulfito, 5 mL de p-rosanilina purificada al 0,012% y 5 mL de formaldehído del 0,28%. Estas disoluciones se equilibraron durante 50 minutos con 150 mg de resina Dowex 1X8 (200-400 mallas) y a continuación se procesaron en la manera habitual. La absorbancia neta obtenida, $(A_{\text{neta}})_1$, se interpoló en la recta de calibrado preparada en idénticas condiciones, obteniéndose así la concentración de sulfito fijado en resina (mmol/g). A continuación, se recogieron las disoluciones filtradas, se les añadieron otros 150 mg de resina y se agitaron nuevamente durante 50 minutos. A partir de la absorbancia neta obtenida, $(A_{\text{neta}})_2$, se calcula la concentración de analito que queda en la disolución (mmol/mL). Finalmente, dividiendo ambas concentraciones, se obtiene el valor de la razón de distribución en mL/g.

En la tabla III.17, se recogen los resultados obtenidos.

Tabla III.17. Razón de distribución para el método de 250 mL.

Determinación n°	(A _{neta}) ₁	mmol/g de sulfito en fase sólida	(A _{neta}) ₂	mmol/mL de sulfito en disolución	D (mL/g)
1	0'445	2'89x10 ⁻⁴	0'143	5'19x10 ⁻⁸	5568
2	0'429	2'79x10 ⁻⁴	0'146	5'32x10 ⁻⁸	5244
3	0'423	2'75x10 ⁻⁴	0'153	5'60x10 ⁻⁸	4911

El valor medio de la razón de distribución, expresado como $\bar{D} \pm \frac{St_{(0'05; n-1g.l)}}{\sqrt{n}}$ es:

$$(5'2 \pm 0'8) \times 10^3 \text{ mL/g}$$

Este valor, no muy elevado ($< 10^4$), indica que la fijación del analito en la fase sólida no llega a ser cuantitativa [8].

5.- APLICACIONES ANALÍTICAS

Para comprobar la utilidad del método propuesto en el análisis medioambiental, se ha aplicado a la determinación de sulfito en dos tipos de agua natural:

- * Agua de lluvia.
- * Agua mineral.

En ambos casos se ha seguido el procedimiento operatorio propuesto, utilizando la resina Dowex 1X8 de 200-400 mallas.

5.1.- Análisis de sulfito en agua de lluvia

Antes de aplicar el método propuesto a la determinación de sulfito en muestras reales de agua de lluvia, es necesario comprobar determinados extremos que pueden influir en la veracidad de los resultados, como la influencia de la matriz sobre la absorbancia desarrollada en fase sólida o aspectos relacionados con el muestreo.

5.1.1.- Ensayos en agua de lluvia simulada

Por ello, se ha preparado un agua de lluvia artificial sobre la que llevar a cabo las experiencias, en condiciones constantes y previamente fijadas.

5.1.1.1.- Preparación del agua de lluvia simulada

La preparación de una matriz que permita simular un agua de lluvia de manera adecuada, puede ser problemática. Se ha seleccionado el procedimiento propuesto por Koch y col. [9]. La disolución preparada, cuya composición está recogida en la tabla A.1 del apéndice, fue ajustada a pH = 4'5 y mantenida bajo refrigeración (7-8 °C). A partir de ella, diariamente y mediante la adecuada dilución, se han preparado disoluciones de composición análoga al SRM 2694 I [9], sobre las que se han llevado a cabo las experiencias recogidas a continuación.

5.1.1.2.- Influencia del volumen de agua de lluvia simulada sobre el calibrado

En primer lugar, se ha estudiado el efecto que producen volúmenes crecientes de agua de lluvia simulada sobre la absorbancia del blanco y sobre la absorbancia neta desarrollada por una cantidad constante de sulfito (4'7 μg), obteniéndose que volúmenes iguales o superiores a 50 mL bajan la señal del analito mientras que sobre la absorbancia del blanco, no existe ninguna influencia (tabla III.18).

Tabla III.18. Influencia del volumen de agua de lluvia simulada.

V (mL)	A _b	A	A _{neta}
10	0'160	0'746	0'583
25	0'155	0'744	0'581
50	0'153	0'492	0'329
100	0'160	0'356	0'193
200	0'145	0'302	0'139

Este efecto no puede atribuirse al aumento de fuerza iónica y sus consiguientes repercusiones en el equilibrio de fijación en la fase sólida pues, incluso en el caso de utilizar 200 mL de agua de lluvia simulada, nos encontramos dentro de los márgenes de tolerancia del método. Quizás la justificación deba buscarse en la reacción de formación del ácido p-rostanilinmetilsulfónico.

Es bien conocido que para que se produzca la reacción se requieren altas concentraciones de p-rostanilina, bajos valores de pH [3] y un orden fijo de adición de los reactivos. Estas condicionantes fueron tenidos en cuenta en el procedimiento operatorio propuesto, que ha sido seguido aquí. No obstante, cuando el sulfito se adiciona disuelto en un gran volumen (≥ 50 mL), posiblemente la concentración relativa de los reactivos durante la mezcla con el sulfito es menor que los valores óptimos y, en consecuencia, se forman menores cantidades del producto de reacción.

Para comprobar esta hipótesis se repitió la experiencia anterior, pero preparando el sulfito en agua de ósmosis inversa en lugar de agua de lluvia simulada. Los resultados obtenidos (tabla III.19 y figura III.7) son similares a los anteriores.

Tabla III.19. Influencia del volumen de agua de ósmosis inversa.

V (mL)	$A_{\text{neta}}^{(*)}$
10	0'599
25	0'595
50	0'488
100	0'274
200	0'134

(*) : la cantidad de sulfito es de $4'7 \mu\text{g}$ en todos los casos.

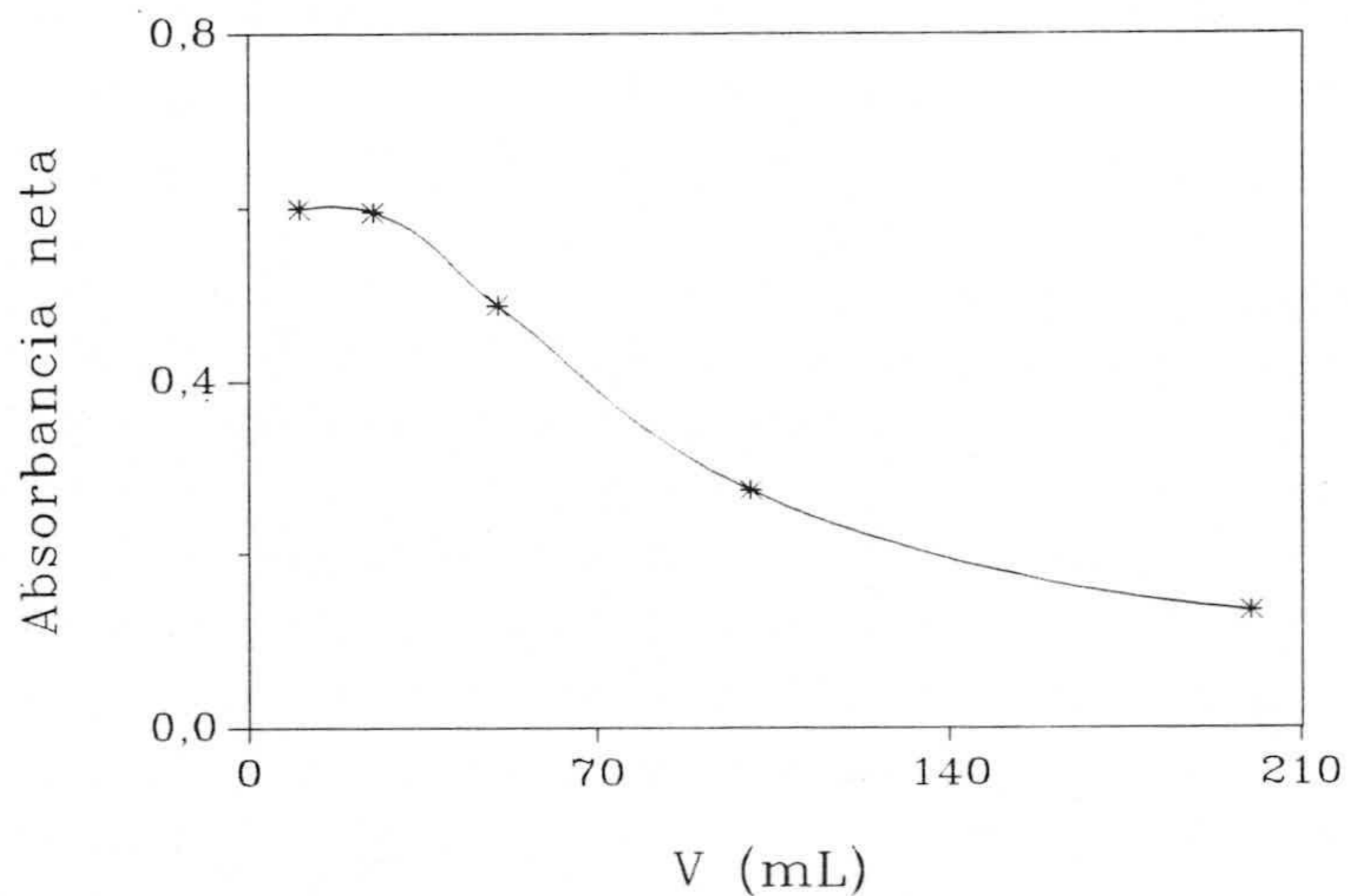


Figura III.7. Influencia del volumen de agua de ósmosis inversa. $V(\text{p-rosanilina del } 0'012\%) = 5 \text{ mL}$; $V(\text{HCOH del } 0'028\%) = 5 \text{ mL}$; $C_{\text{sulfito}} = 4'7 \mu\text{g}$; $\text{pH} = 3'0$; $V = 250 \text{ mL}$; 150 mg de resina Dowex 1X8 (200-400 mallas), $t_{\text{agitación}} = 40 \text{ minutos}$.

A continuación, se prepararon los siguientes calibrados:

- Un calibrado, sin agua de lluvia, según el procedimiento estándar (el sulfito se adiciona en volúmenes inferiores a 10 mL).

- Tres calibrados en presencia de 10, 25 y 50 mL de agua de lluvia simulada.

- Un calibrado, sin agua de lluvia, en el que se adicionan 50 mL de agua de ósmosis inversa conteniendo cantidades crecientes del sulfito patrón, para los diferentes puntos.

La ecuación correspondiente a la recta del calibrado estándar es:

$$A = 0'179 + 0'029C_{\text{sulfito}}$$

donde la concentración de sulfito viene expresada en ppb.

En la tabla III.20, se muestran sus principales parámetros estadísticos.

Tabla III.20. Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
<i>n</i>	5
<i>m</i>	3
<i>s_{R,C}</i>	0'0159
<i>a</i>	0'1792
<i>b</i>	0'0289
<i>r</i>	0'9994

Los calibrados obtenidos en presencia de agua de lluvia simulada se recogen en la tabla III.21 y se representan en la figura III.8.

Tabla III.21. Calibrados con distintos volúmenes de agua de lluvia simulada calibrado.

C_{sulfito} (ppb)	A		
	V = 10 mL	V = 25 mL	V = 50 mL
0'00	0'169	0'155	0'156
3'98	0'284	0'260	0'255
9'94	0'490	0'419	0'390
19'88	0'734	0'713	0'611
29'82	1'016	0'977	0'859

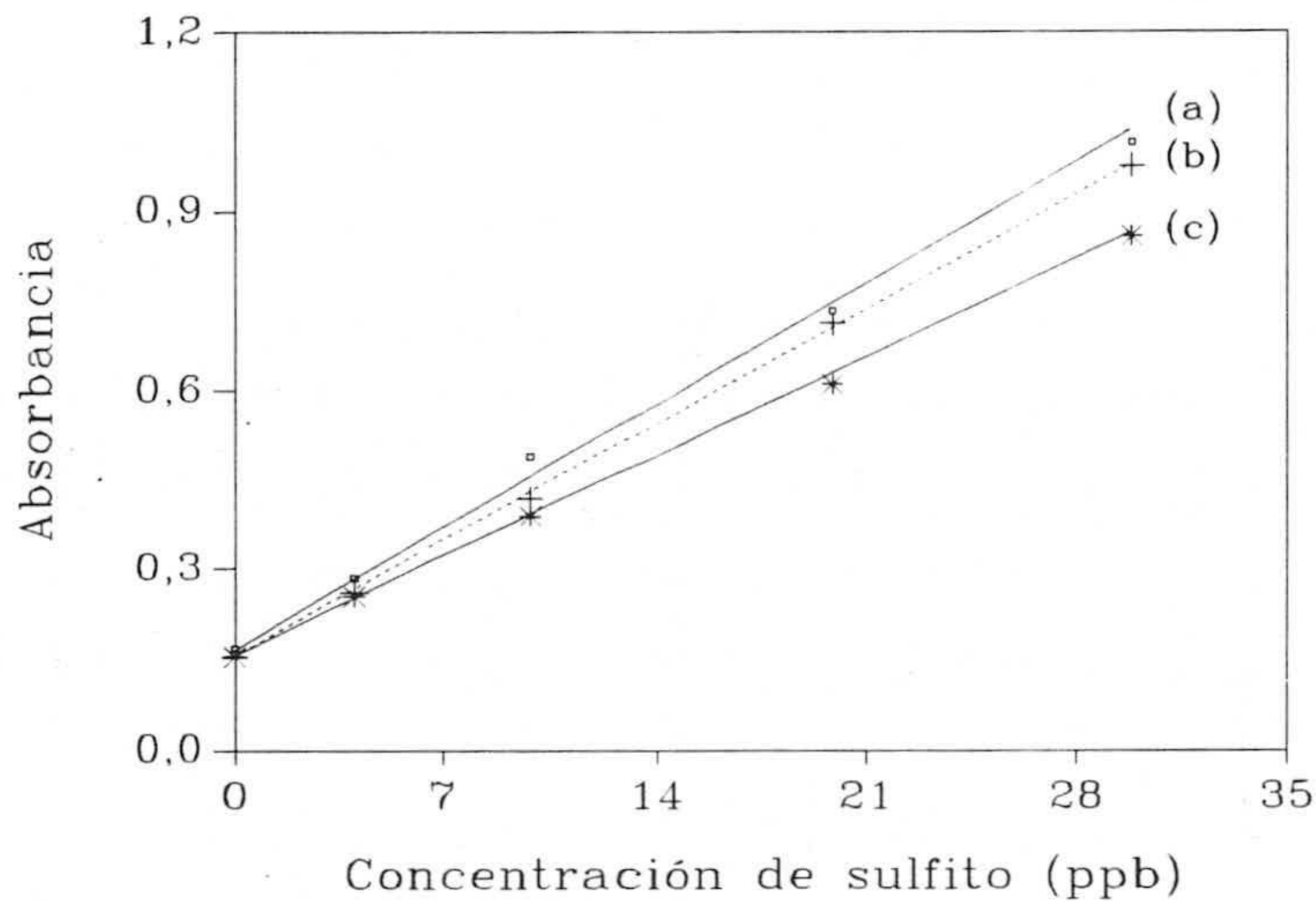


Figura III.8. Influencia de agua de lluvia simulada sobre la recta de calibrado. (a), (b) y (c) rectas de calibrado correspondientes a V = 10, 25 y 50 mL de agua de lluvia simulada, respectivamente.

En la tabla III.22, se muestran los principales parámetros estadísticos de las

ecuaciones de las rectas de calibrado llevadas a cabo sobre distintos volúmenes de agua de lluvia simulada.

Tabla III.22. Parámetros estadísticos de los calibrados.

Parámetro	Valor		
	V = 10 mL	V = 25 mL	V = 50 mL
<i>n</i>	5	5	5
<i>m</i>	1	1	1
<i>S_{R,C}</i>	0'0195	0'0078	0'0074
<i>a</i>	0'1798	0'1510	0'1573
<i>b</i>	0'0282	0'0278	0'0233
<i>r</i>	0'9988	0'9998	0'9997

El calibrado preparado adicionando el analito en un volumen constante de 50 mL, así como sus parámetros estadísticos se muestran en las tablas III.23 y III.24, respectivamente.

Tabla III.23. Calibrado estándar (V = 50 mL)

<i>C_{sulfito}</i> (ppb)	A
0'0	0'146
3'8	0'254
7'6	0'301
13'3	0'459
19'0	0'618
28'5	0'824

Tabla III.24. Parámetros estadísticos del calibrado estándar (V = 50 mL).

Parámetro	CE
<i>n</i>	6
<i>m</i>	3
<i>a</i>	0'1451
<i>b</i>	0'0240
<i>s_{R,C}</i>	0'0184

Utilizando el paquete informático "**QUIMIO**", se compararon las pendientes de las rectas de calibrado correspondientes a 10 mL y 25 mL de agua de lluvia simulada con la del calibrado estándar. Dichos tests indicaron que no existen diferencias significativas (P = 50 y 10% para 10 y 25 mL respectivamente).

Debido a la influencia observada del volumen de agua de lluvia simulada para V = 50 mL, la pendiente de su recta de calibrado se comparó con la que se realizó en las mismas condiciones pero sin agua de lluvia. Dicho test indicó que no existen diferencias significativas entre ambas pendientes (P = 46%).

Del estudio realizado se puede obtener la siguiente consecuencia, sobre la preparación de un calibrado adecuado en función de la probable concentración de analito en el agua problema:

- Si la concentración de sulfito es suficientemente elevada como para que el volumen de muestra sea ≤ 25 mL, se usará el calibrado estándar.

- En caso contrario, habrá de prepararse un calibrado al efecto usando un volumen constante de analito, igual al de la muestra analizada.

5.1.1.3.- Estudios de recuperación en agua de lluvia simulada

Para tal fin, se prepararon cuatro disoluciones de lluvia artificial (SRM 2694 I) conteniendo 497 ppb (A), 298 ppb (B), 99 ppb (C) y 40 ppb (D) de sulfito estabilizado en morfolina. Para la determinación, se tomaron 5, 10, 25 y 50 mL de las muestras A, B, C y D respectivamente y se les aplicó el procedimiento habitual para la resina de 200-400 mallas.

Los resultados obtenidos en las diferentes réplicas se recogen en la tabla III.25.

Tabla III.25. Ensayos de recuperación en SRM 2694 I.

Muestra	Volumen de muestra (mL)	A
A	5	0'493 0'470 0'478
B	10	0'534 0'550 0'540
C	25	0'449 0'483 0'440
D	50	0'347 0'351 0'342

El tratamiento de las absorbancias correspondientes a cada muestra, utilizando los calibrados adecuados (el estándar para las muestras A, B y C y el de 50 mL de volumen de analito para la muestra D) y teniendo en cuenta el factor de dilución en cada caso, condujo a las recuperaciones que se recogen en la tabla III.26. Se puede observar que los resultados son satisfactorios, estando los porcentajes de recuperación comprendidos entre 97 y 105%, $P(\mathfrak{R}) \geq 5\%$ en todos los casos.

Tabla III.26. Recuperación de sulfito en agua de lluvia simulada.

Muestra	C _{sulfito} añadida (ppb)	C _{sulfito} encontrada ± s _{n-1} (ppb)	\bar{X} (%)
A	497	520 ± 20	105
B	298	312 ± 7	105
C	99	96 ± 8	97
D	40	42 ± 1	105

5.1.1.4.- Estabilidad del sulfito en agua de lluvia simulada

Un aspecto importante en análisis medioambiental es conocer la estabilidad del analito en la muestra, para así poder estimar cuánto tiempo puede transcurrir entre la toma de muestra y su medida. No menos importancia tiene la estabilidad del analito en el transcurso del propio muestreo en los casos, como en las muestras de lluvia, en los que el tiempo de muestreo puede ser largo.

En lo que sigue, se presentan los resultados de las experiencias realizadas como primera aproximación a la problemática planteada y que comprenden estudios de estabilidad del sulfito en la matriz SRM 2694 I bajo diferentes condiciones.

* Estabilidad del sulfito bajo refrigeración

Para este estudio, se prepararon dos disoluciones de sulfito de diferente concentración, en la matriz SRM 2694 I, de 100 ppb (en presencia de $2.4 \times 10^{-3}\%$ de morfolina) y de 700 ppb (en presencia de $3 \times 10^{-3}\%$ de morfolina). De estas disoluciones, mantenidas bajo refrigeración (7-8 °C), se fueron tomando alícuotas para su análisis: recién preparadas las disoluciones (t = 0) y después de transcurridos diferentes intervalos de tiempo.

Los resultados, obtenidos se recogen en la tabla III.27.

Tabla III.27. Estabilidad del sulfito bajo refrigeración.

t (horas)	$A_{\text{neta}}^{(*)}$	
	100 ppb	700 ppb
0'0	0'230	0'486
1'0	0'219	0'497
3'5	0'239	0'496
5'0	0'216	0'495
24'0	0'219	0'456
48'0	0'225	0'465
96'0	0'249	0'475
168'0	0'210	0'494
240'0	0'229	0'466

(*) Promedio de tres determinaciones.

Tal y como se puede observar en dicha tabla, el sulfito a las dos concentraciones y en las condiciones del ensayo es estable durante al menos 10 días, ya que las absorbancias netas medidas a lo largo del tiempo presentan coeficientes de variación iguales o inferiores al 5%.

* Estabilidad del sulfito "en condiciones de muestreo"

En este caso, en primer lugar, dos disoluciones de sulfito idénticas a las utilizadas en el estudio anterior fueron introducidas en recipientes usados para la recogida de muestras reales de agua de lluvia (véase apartado 5.1.2.1.), situadas en lugares de muestreo y analizadas mediante EFS a lo largo de 24 horas. Durante este tiempo, las

disoluciones de sulfito estuvieron abiertas a la atmósfera, sometidas a los cambios de temperatura ambiente, ... etc, es decir, en condiciones habituales de muestreo.

Los resultados correspondientes a los valores medios de dos determinaciones se representan en la figura III.9.

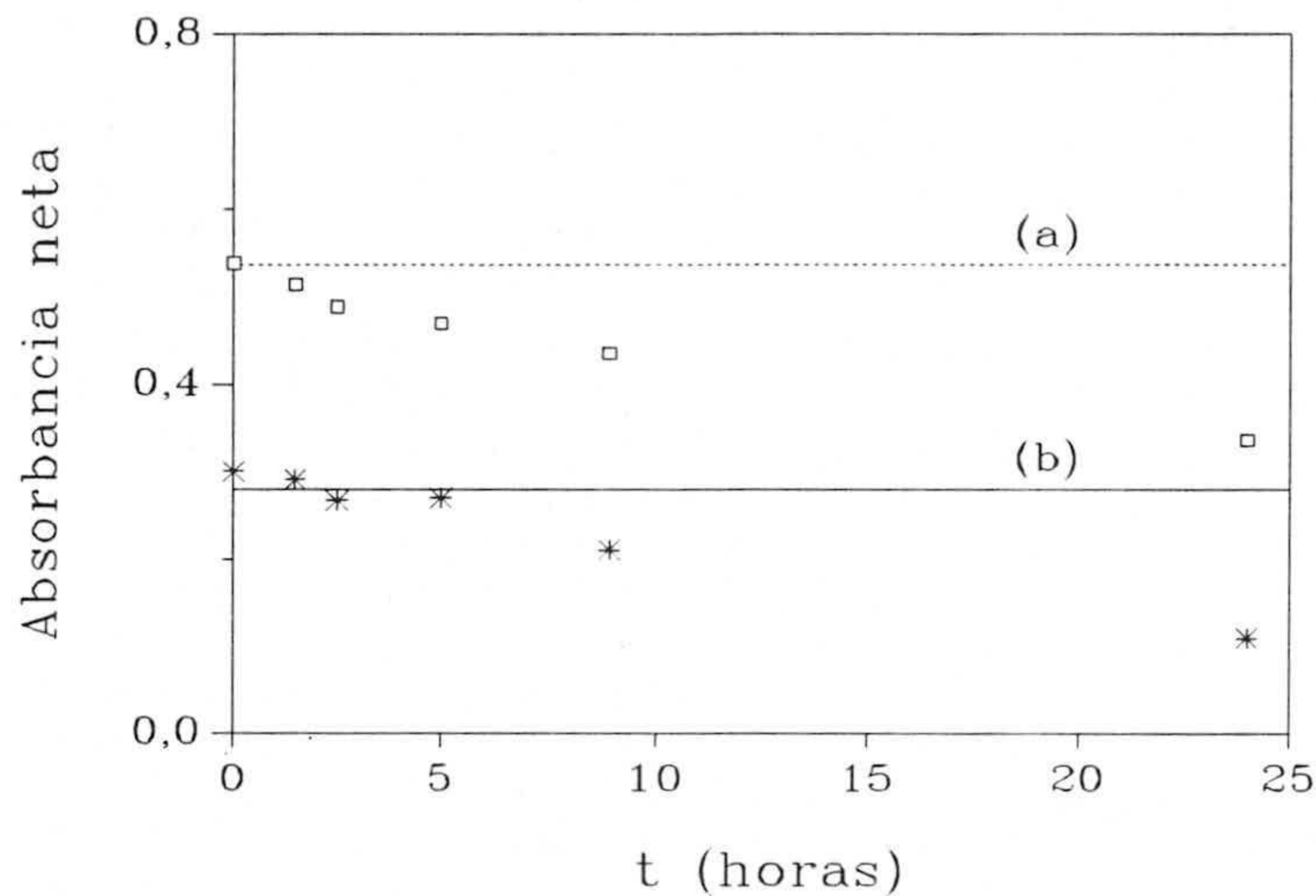


Figura III.9. Estabilidad de sulfito en SRM 2694 I y en condiciones de muestreo. (a) 700 ppb ($3 \times 10^{-3}\%$ de morfolina) (b) 100 ppb ($2,4 \times 10^{-3}\%$ de morfolina). - - - y _____ representan las A_{neta} promedio de los cuatro primeros muestreos, para 700 y 100 ppb de sulfito respectivamente.

A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la disolución de sulfito de menor concentración es estable durante 5 horas mientras que la disolución de mayor concentración es estable únicamente 1'5 horas.

A continuación, otro estudio de estabilidad llevado a cabo sobre la disolución de mayor concentración pero en presencia de una cantidad de morfolina mayor que la

anterior, $7 \times 10^{-3} \%$, indicó que en estas condiciones el sulfito permanece estable durante un tiempo de 2'5 horas (tabla III.28).

Tabla III.28. Estabilidad de 700 ppb de sulfito, en morfolina al $7 \times 10^{-3} \%$ y en condiciones de muestreo.

t (horas)	$A_{\text{neta}}^{(1)}$	T (°C) ⁽²⁾
0'0	0'539	15
1'5	0'515	12
2'5	0'489	13
5'0	0'470	13
9'0	0'436	9
24'0	0'337	13

⁽¹⁾: cada valor es promedio de dos determinaciones; ⁽²⁾: Temperatura ambiente a la toma de la alícuota de la muestra para el ensayo.

* Influencia de la presencia de metales en la estabilidad

La presencia de ciertos metales es un problema para la estabilidad del sulfito en disolución ya que éstos tienen una acción catalizadora en la reacción de oxidación de dicho analito.

Los metales elegidos para el ensayo fueron: Cu(II), Fe(III), Mn(II) y Pb(II), debido a que son frecuentemente encontrados en el medio ambiente o a que tienen un efecto interferente relativamente grande en el método propuesto.

El estudio de estabilidad se llevó a cabo sobre agua de lluvia simulada y a dos concentraciones de sulfito. La primera de menor concentración, 90 ppb de sulfito con $2'4 \times 10^{-3} \%$ en morfolina y 20 ppb de cada uno de los metales seleccionados; la segunda, de 600 ppb de analito con $5'6 \times 10^{-3} \%$ en morfolina, y en presencia de 50 ppb de cada

metal. De dichas disoluciones, mantenidas bajo refrigeración (7-8 °C), se fueron tomando alícuotas para determinar el contenido de sulfito a diferentes intervalos de tiempo.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.29 y muestran que ambas disoluciones de sulfito son estables al menos 14 horas en las condiciones indicadas.

Tabla III.29. Estabilidad de sulfito en SRM 2694 I, en presencia de metales y bajo refrigeración.

t (horas)	$A_{\text{neta}}^{(*)}$	
	90 ppb	600 ppb
0'0	0'258	0'419
1'0	0'266	0'421
2'5	0'264	0'479
5'0	0'255	0'447
9'0	0'234	0'437
14'0	0'271	0'430
16'5	0'215	0'382
22'0	0'199	0'363
37'5	0'195	0'363

(*): media de dos determinaciones.

*** Conclusiones del estudio**

De los estudios de estabilidad podemos concluir que el tiempo de muestreo de la lluvia real no debe superar 2 horas a fin de evitar pérdidas de analito. Por otra parte, si las muestras una vez tomadas se mantienen bajo refrigeración en el laboratorio, el análisis puede ser retrasado entre 14 horas y 10 días, dependiendo de la concentración de metales disueltos en el agua de lluvia.

5.1.1.5.- Comparación del método propuesto (EFS) con el método en disolución

Se ha llevado a cabo un estudio comparativo del método propuesto (EFS) y el método en disolución, basado en la misma reacción entre el sulfito y p-rosanilina en presencia de formaldehído [1], con las modificaciones de Scaringelli y col. [2], sobre agua de lluvia simulada, SRM 2694 I.

Para este estudio, se analizaron 5 muestras que contenían concentraciones crecientes de sulfito comprendidas entre 0'00 y 4'75 μg , por quintuplicado, por ambos métodos (el volumen final del método en disolución fué de 13 mL). Los resultados obtenidos, utilizando los calibrados adecuados en cada caso, se recogen en la tabla III.30.

Tabla III.30. Comparación de los métodos EFS y en disolución.

Sulfito puesto en la muestra (μg)	Sulfito encontrado (μg)									
	EFS					Disolución				
0'00	-0'06	-0'05	-0'03	-0'03	-0'07	-0'05	-0'08	-0'08	-0'10	-0'05
0'95	0'96	1'00	0'89	1'05	0'95	1'06	1'18	1'23	1'25	1'06
1'90	2'03	2'35	2'11	1'94	2'08	1'97	2'04	2'21	2'16	1'97
3'33	3'77	3'74	3'70	3'18	3'34	3'25	3'59	3'54	3'57	3'30
4'75	4'67	4'94	5'22	4'91	4'47	4'75	4'75	5'00	5'00	4'77

La representación de los resultados obtenidos con el método EFS frente a los proporcionados por el método en disolución, permite la comparación de las dos series de resultados mediante regresión lineal simple. La ecuación obtenida es:

$$y(\text{EFS}) = -0'037 + 1'013x(\text{Disolución}) \quad (r^2 = 0'9865)$$

Los intervalos de confianza de la ordenada en el origen y de la pendiente, teniendo en cuenta que $t(0'05; 23 \text{ g.l.}) = 2'069$, son:

$$a \pm ts_a = -0'037 \pm 0'147 \quad \text{y} \quad b \pm ts_b = 1'013 \pm 0'052$$

Como se puede observar, los intervalos de confianza de la ordenada en el origen y de la pendiente no difieren significativamente de 0 y 1, respectivamente, indicando que la veracidad de ambos métodos es similar.

Por su parte, la comparación conjunta del término independiente y de la pendiente, a través del programa "QUIMIO", ha puesto de manifiesto que no existe ningún error sistemático al nivel de confianza del 5% y por lo tanto el término independiente y la pendiente no difieren significativamente de 0 y 1, respectivamente.

Asimismo, se puede realizar un estudio comparativo en condiciones experimentales similares y con la ventaja de incluir el error inherente a las curvas de calibrado calculando los parámetros de fiabilidad de los dos métodos, utilizando la matriz de agua simulada, mediante el modelo propuesto por Cuadros Rodríguez y col. [10].

En la tabla III.31, se recogen algunos de los parámetros de fiabilidad de ambos métodos. Del estudio de estos datos se concluye que el método EFS presenta mejor linealidad y tiene menores valores de DER de la concentración [11] en todo el rango de concentraciones. La comparación de la sensibilidad analítica [12] nos indica que el método EFS permite discernir entre menores diferencias de concentración que el método en disolución. Finalmente, son destacables los menores valores de los límites de detección y cuantificación del método EFS frente a los obtenidos para el método en disolución.

Tabla III.31. Parámetros de fiabilidad de los dos métodos.

	Método	
	EFS	Disolución
Parámetros de fiabilidad		
Linealidad "on-line" (%)	97'7	96'8
Sensibilidad analítica (ppb)	0'8	21
Sensibilidad de calibrado (señal/(ppb))	0'0349	0'0005
Límite de detección (ppb)	1'3	34
Límite de determinación (ppb)	4'2	113
Precisión		
µg de sulfito	DER(C) %	
0'95	10'7	21'6
1'90	4'6	7'9
3'33	2'9	4'2
4'75	2'3	3'3

5.1.2.- Análisis de sulfito en agua de lluvia real

5.1.2.1.- Recogida de las muestras de agua de lluvia real

Las muestras de agua de lluvia fueron recogidas en frascos de vidrio (protegidos de la luz con papel de aluminio) de 250 ml de capacidad, con ayuda de unos embudos de vidrio, de 15-19 cm de diámetro ajustados estrechamente a los frascos, permitiendo así la entrada directa del agua en ellos. Los recogedores fueron puestos en diferentes lugares de la terraza de la Facultad de Ciencias de Granada.

Para cada muestreo, se prepararon al menos tres recogedores: el primero, con morfolina para estabilizar el sulfito y determinarlo con el método propuesto, el segundo, sin ningún aditivo para medir el pH y la conductancia electrolítica del agua y el tercero, con 2 mL de ácido nítrico concentrado para determinar el contenido de metales en dicha agua. Estos recogedores fueron expuestos no más de 2 horas durante el período de lluvia para evitar pérdidas del analito. Las muestras de agua así recogidas, se mantuvieron bajo refrigeración (7-8 °C) para su posterior análisis dentro del período de estabilidad del analito bajo nuestras condiciones.

5.1.2.2.- Determinación de metales en agua de lluvia real

En las muestras de agua de lluvia recogidas se han analizado los metales estudiados previamente como influyentes sobre la estabilidad del analito. Para ello, la técnica usada ha sido la Espectroscopía de absorción atómica de llama.

Dado que estos metales, salvo el Ca(II), no se encuentran en concentraciones suficientes para realizar la medida directa, fue necesario efectuar una preconcentración mediante quelación a pH 3'6 con dietilditiocarbamato sódico y extracción en metilisobutilcetona. Por su parte, el calcio ha sido determinado en el agua de lluvia de manera directa en presencia de estroncio. Los resultados obtenidos para las distintas muestras de agua de lluvia, se reflejan en la tabla III.32.

5.1.2.3.- Características del agua de lluvia recogida

En matraces de 250 mL, se introducen volúmenes crecientes de agua de lluvia simulada concentrada de fuerza iónica 0'02 M y el agua de ósmosis inversa hasta el enrase. A continuación se mide la conductividad electrolítica de cada disolución y se corrige utilizando patrones de KCl preparados a distintas concentraciones. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla III.33.

Tabla III.32. Contenido de metales (por EAA) en muestras de agua de lluvia tomadas en diferentes días.

Elemento	C (ppb)		
	11/2/93 (B)	12/2/93	27/2/93
Ca(II)	10000	17000	14000
Cu(II)	19	28	57
Fe(III)	182	167	245
Mn(II)	14	23	32
Pb(II)	38	53	22

Tabla III.33. Relación entre la fuerza iónica y conductividad eléctrica.

$\mu \times 10^3$ (M)	C ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
0'24	23
0'40	44
0'80	92
1'20	129
1'60	171
2'00	212
4'00	406

Utilizando la regresión por mínimos cuadrados de la conductividad electrolítica (C) sobre la fuerza iónica (μ), obtenemos la siguiente ecuación:

$$C = 8'6 + 1'09 \times 10^5 \mu$$

cuyo coeficiente de correlación $r = 0'9996$.

Aunque este cálculo sólo se puede realizar para fuerzas iónicas utilizadas en el

rango $0'24 \times 10^{-3} - 4'00 \times 10^{-3}$ M, dicha ecuación es útil ya que por interpolación se puede estimar la fuerza iónica del agua a analizar con tan sólo medir su conductividad eléctrica. Así y para saber la fuerza iónica de las muestras de agua que hemos analizado, hemos medido las conductividades eléctricas del agua de "Bezoya" (apartado 5.2) y de las aguas de lluvia que hemos recogido para el análisis. Los resultados se muestran en la tabla III.34.

Tabla III.34. Fuerza iónica de las aguas analizadas.

Agua	C ($\mu\text{S/cm}$)	$\mu \times 10^5$ (M)
de Bezoya	19'4	9'9
de lluvia de fecha:		
10/2/93	14'9	5'8
11/2/93 (B)	12'0	3'1
12/2/93	16'3	7'1
27/2/93	15'7	6'5

Como se puede observar a partir de ésta, parece que el agua de Bezoya tiene mayor fuerza iónica que el agua de lluvia recogida en Febrero del 93, aunque en todos los casos, la fuerza iónica que aportan estas muestras a la disolución de ensayo está dentro de los márgenes de tolerancia del método (vease apartado 2.1).

En la tabla III.35, se recogen los volúmenes de agua de lluvia, en presencia de concentraciones de morfolina, así como los valores de pH, medido en ausencia de cualquier aditivo.

Tabla III.35. Características del agua de lluvia recogida.

Fecha de muestreo	Tiempo de muestreo (min.)	Volumen de muestra (mL)	pH	C _{morfolina} (%)
10/2/93	15	20	6'8	7'2x10 ⁻³
11/2/93 (A)	60	21	6'9	6'5x10 ⁻³
11/2/93 (B)	30	150	7'0	2'5x10 ⁻³
12/2/93	20	140	7'0	3'9x10 ⁻³
27/2/93	25	150	7'0	2'6x10 ⁻³

5.1.2.4.- Determinación de sulfito por el método de adición de patrón

El método propuesto fue aplicado a la determinación de sulfito en muestras de agua de lluvia real por el método de adición estándar. Los resultados obtenidos del contenido en sulfito así como del estudio de las recuperaciones llevado a cabo sobre dichas muestras de agua de lluvia, se recogen en la tabla III.36.

Como se puede observar, los niveles de sulfito en agua de lluvia se encuentran en el rango de 150-480 ppb y las recuperaciones obtenidas están entre 95 y 105%. Por otra parte, los valores de $P(\%)$ obtenidos, en todos los casos, son superiores al 5%, lo que confirma la veracidad del método propuesto para este tipo de agua.

5.2.- Análisis de sulfito en agua mineral

El agua mineral analizada ha sido la procedente de Ortigosa del Monte-Segovia (Bezoya), agua que no fue tratada con Cl₂ y cuya composición química se recoge en la tabla A.2 del apéndice.

Tabla III.36. Determinación de sulfito en agua de lluvia real.

Fecha de muestreo	Volumen de muestra (mL)	[SO ₃ ²⁻] (ppb) añadido	[SO ₃ ²⁻] (ppb) encontrado ^(a)	% \mathfrak{R}	[SO ₃ ²⁻] (ppb) en muestra
10/2/93	5	---- 7'6 18'8	9'6 16'8 28'8	---- 94'7 102'1	480
11/2/93 (A)	2	---- 7'6 18'8	1'2 ± 0'4 ^(b) 8'8 ± 0'4 20'0 ± 1'2	---- 100'0 100'0	150
11/2/93 (B)	4	---- 3'6 9'6 18'8	2'8 ± 0'4 6'4 ± 0'4 12'4 ± 0'8 212 ± 1'2	---- 100'0 100'0 97'9	175
12/2/93	4	---- 7'6 18'8	3'6 ± 0'8 11'2 ± 0'4 21'6 ± 1'2	---- 100'0 95'7	225
27/2/93	10	---- 3'6 7'6 11'2	6'8 ± 1'2 10'4 ± 0'4 14'8 ± 0'4 17'6 ± 0'4	---- 100'0 105'3 96'4	170

^(a): media ± desviación estándar (m = 3); ^(b): valor inferior al límite de cuantificación.

5.2.1.- Calibrado de adición de patrón

Se ha aplicado el método de adición de patrón utilizando tres réplicas de cada concentración para obtener la curva de calibrado. Para ello, se introdujeron en matraces de 250 mL, 5 mL de p-rosanilina purificada del 0'012%, 5 mL de la disolución de HCOH del 0'28%, alícuotas de 50 mL de muestra conteniendo volúmenes crecientes de sulfito

de 0'95 ppm estabilizado en morfolina, 5 mL del tampón 0'1 M de pH = 3'0 y el agua de ósmosis inversa necesaria hasta el enrase.

Tras aplicar el procedimiento operatorio propuesto, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla III.37.

Tabla III.37. Calibrado de adición de patrón.

C_{sulfito} (ppb)	A		
0'0	0'159	0'138	0'148
3'8	0'234	0'227	0'243
7'6	0'311	0'330	0'337
11'4	0'435	0'421	0'443

La comparación estadística de la pendiente de la recta de adición de patrón con la de la recta de calibrado (tabla III.24), nos indica que éstas son significativamente iguales ya que $P = 33\%$.

Los principales parámetros estadísticos correspondientes a la ecuación de la recta de adición de patrón, se recogen en la tabla III.38.

A partir de las tres adiciones "cero", se deduce que el contenido del agua de Bezoya en sulfito es nulo o al menos es inferior al límite de detección del método.

5.2.2.- Estudio de recuperación

Puesto que, el contenido del agua de Bezoya en sulfito es nulo (o al menos es inferior al límite de detección del método), se ha procedido a un estudio de recuperación

Tabla III.38. Parámetros estadísticos del calibrado de adición de patrón.

Parámetro	CA
n	15
m	3
a	0'1430
b	0'0251
$s_{R,C}$	0'0112

para comprobar la validez del método para este tipo de muestra. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.39.

Tabla III.39. Ensayos de Recuperación.

C_{sulfito} añadida (ppb)	C_{sulfito} encontrada $\pm s_{n-1}$ (ppb)	$\bar{\mathcal{R}}$ (%)
3'8	3'7 \pm 0'4	97
7'6	7'5 \pm 0'6	99
11'4	12'2 \pm 0'2	107

Considerando las tres adiciones por triplicado recogidas en la tabla III.39, se obtiene una recuperación media, 101, cuyo valor se contrasta frente a 100 mediante el test de Student. Dicho test concluye afirmando que ésta no difiere significativamente del 100% ($P = 61\%$), y por tanto el método propuesto es válido para este tipo de muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- [1].- P.W. West, G.C. Gaeke, *Anal. Chem.*, **28**, 1816-1819, 1956.
- [2].- F.P. Scaringelli, B.E. Saltzman, S.A. Frey, *Anal. Chem.*, **39**, 1709-1719, 1967.
- [3].- P.K. Dasgupta, K. De Cesare, J.C. Ullrey, *Anal. Chem.*, **52**, 1912-1922, 1980.
- [4].- V. Raman, J. Rai, M. Singh, D.C. Parashar, *Analyst*, **111**, 189-191, 1986.
- [5].- K. Irgum, *Anal. Chem.*, **57**, 1335-1338, 1985.
- [6].- J.L. Lambert, M.J. Chejlava, M.H. Beyad, J.V. Paukstelis, *Talanta*, **29**, 37-40, 1982.
- [7].- J.M. Bosque Sendra, F. Molina, E. López, *Analyst*, **116**, 871-874, 1991.
- [8].- J.A. Dean, "Chemical Separation Methods". Cap. V, 86-125. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1969.
- [9].- W.F. Koch, G. Marinenko, R.C. Paule, *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, **91**, 33-41, 1986.
- [10].- L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, *Anal. Lett.* **26**, 1243-1258, 1993.
- [11].- J.C. Miller, J.N. Miller, "Estadística para Química Analítica". Cap. V, 87-119. 2ª Edición. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. Wilmington, Delaware, 1993.
- [12].- J.D. Ingle, Jr, *J. Chem. Ed.*, **51**, 100-105, 1971.

CAPÍTULO IV

DETERMINACIÓN DE CINC MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA.

El cinc ha sido intensamente estudiado en los últimos años debido a su importancia en las dietas humanas. La concentración de cinc en una dieta normal se encuentra entre 4 y 25 mg/d. Por éstas razones, su presencia debe ser controlada en los alimentos y en aguas [1]. En éstas últimas, el cinc aparece por deterioración del hierro galvanizado en las tuberías de almacenaje [2].

En el campo de la tecnología farmacéutica, la determinación del cinc es de gran importancia debido a su actividad biocida. Por ello, sus compuestos son utilizados en dermatología como agentes antisépticos y desinfectantes [3].

La determinación de cinc se ha planteado en varios campos, tales como medioambiental, nutricional, farmacéutico y biológico. En este último, se realizó un estudio comparativo llevado a cabo por Pollak y Kuban, y que recoge Krystek y col. [4], sobre 4 métodos espectrofotométricos, para la determinación de dicho ión, utilizando ditizona, zincón, PAR y PAN, y recomiendan el PAR como reactivo para la determinación de cinc en suero sanguíneo y urina.

En el presente capítulo, se propone la determinación de cinc mediante Espectrofotometría en Fase Sólida con el 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) y en presencia de yoduro potásico.

1.- ESTUDIOS PRELIMINARES

1.1.- Ensayos de fijación

En este apartado, se recogen las experiencias realizadas para seleccionar el reactivo orgánico que origine con el cinc un complejo con características óptimas para la determinación del ión mediante Espectrofotometría en Fase Sólida.

Los reactivos ensayados fueron tres azocompuestos: Arsenazo, 1-(2-tiazolilazo)-2-naftol (TAN) y 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) y dos trifenilmetanos: Violeta de Pirocatecol (PV) y Anaranjado de Xilenol (XO).

Para ello y en matraces de 100 mL conteniendo 500 ppb de Zn(II), se agregaron los distintos reactivos, todos a la misma concentración 8×10^{-6} M y en diferentes medios: ClCH₂CO₂H/ClCH₂CO₂K de pH = 3'14 (A), CH₃CO₂H/CH₃CO₂K de pH = 5'00 (B), KH₂PO₄/K₂HPO₄ de pH = 7'00 (C) y H₃BO₃/NaH₂BO₃ de pH = 9'00 (D). Una vez enrasadas a 100 mL, las disoluciones se transfirieron a botellas de polietileno y se agitaron durante 20 minutos con 150 mg de resina Dowex 1X8 (100-200 mallas) en ciclo Cl⁻. Filtradas las disoluciones, empaquetada la resina en cubetas de 1 mm de paso de luz y centrifugadas éstas durante 30 segundos, se registraron los distintos espectros en el intervalo de 400-750 nm frente a una cubeta con resina equilibrada con agua de ósmosis inversa. Los blancos correspondientes se prepararon de la misma manera pero exentos de cinc.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.1, a partir de la cual se observa que el reactivo que da mejor resultado es el PAR a pH 7'00 y 9'00. En ambos medios, el color del complejo fijado es anaranjado y el del reactivo amarillo, pero la intensidad de la coloración es superior a pH 9'00.

Tabla IV.1. Ensayos de fijación con distintos reactivos.

Reactivo	Medio	Blanco		Analito	
		λ_{\max} (nm)	A_{\max}	λ_{\max} (nm)	A_{\max}
Arsenazo	A	552	1'200	552	1'089
	B	554	1'148	554	1'171
	C	556	1'844	556	2'093
	D	557	0'873	557	0'969
TAN	A	494	0'711	494	0'667
	B	500	0'945	500	0'934
	C	507	1'054	507	1'145
	D	528	1'554	528	0'990
PAR	A	412	1'602	412	1'624
	B	412	2'014	412	1'849
	C	414	1'723	414	1'657
	D	414 $A_{496 \text{ nm}} = 0'241$ 414 $A_{496 \text{ nm}} = 0'390$	1'806	496 $A_{415 \text{ nm}} = 0'690$	2'096
PV	A	446	0'629	446	0'646
	B	610 $A_{450 \text{ nm}} = 0'510$	1'148	450 $A_{610 \text{ nm}} = 0'460$	0'550
	C	610	1'844	610	0'974
	D	610 $A_{520 \text{ nm}} = 0'440$	0'873	520 $A_{610 \text{ nm}} = 0'490$	0'520
XO	A	587 $A_{450 \text{ nm}} = 0'799$	1'133	587 $A_{450 \text{ nm}} = 0'990$	1'278
	B	587 $A_{470 \text{ nm}} = 0'780$	1'813	587 $A_{470 \text{ nm}} = 0'720$	0'720
	C	585 $A_{460 \text{ nm}} = 0'540$	1'281	585 $A_{460 \text{ nm}} = 0'540$	1'220
	D	588 $A_{450 \text{ nm}} = 0'600$	1'364	588 $A_{450 \text{ nm}} = 0'400$	1'424

A continuación y siguiendo el procedimiento anterior, se efectuaron ensayos de fijación del complejo que forma el Zn(II) con el PAR a pH = 9'00 sobre otros soportes de intercambio aniónico, Sephadex QAE-A-25 y DEAE-A-25.

Los resultados se recogen en la tabla IV.2 y nos indican que el complejo se fija sobre todos los soportes siendo la mayor absorbancia la obtenida con el Sephadex QAE-A-25.

Tabla IV.2. Ensayos de fijación del complejo de PAR a pH = 9'00 sobre distintos tipos de cambiadores aniónicos.

Tipo de cambiador (cantidad)	Blanco		Analito	
	λ_{\max} (nm)	A_{\max}	λ_{\max} (nm)	A_{\max}
DEAE-A-25 (80 mg)	414	2'733	494	2'292
	$A_{494 \text{ nm}} = 0'526$		$A_{414 \text{ nm}} = 1'605$	
QAE-A-25 (80 mg)	414	2'685	500	2'945
	$A_{500 \text{ nm}} = 0'431$		$A_{414 \text{ nm}} = 0'801$	

Hasta ahora los tres soportes con los que hemos trabajado eran aniónicos y para saber si la fijación del complejo es posible o no sobre otros cambiadores, se hicieron pruebas con Sephadex de tipo catiónico y sin grupos de cambio. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.3 y nos indican claramente que el complejo se fija solamente en el soporte aniónico. Por consiguiente y para posteriores experiencias, se elige el soporte Sephadex QAE-A-25.

Como se indica en la Introducción, existen trabajos en los que se han utilizado haluros de metales alcalinos para realizar una separación previa de Zn(II) y Cd(II) [5,6]. Por ello, hemos creído conveniente estudiar el efecto de los haluros sobre el sistema, a fin de mejorar la sensibilidad y/o selectividad.

Tabla IV.3. Ensayos de fijación del complejo de PAR a pH = 9'00 sobre 80 mg de distintos tipos de Sephadex.

Tipo de Sephadex	Blanco		Analito	
	λ_{\max} (nm)	A_{\max}	λ_{\max} (nm)	A_{\max}
Catiónico (SP-C-25)	507 $A_{500 \text{ nm}} = 0'007$	0'008	500 $A_{507 \text{ nm}} = 0'007$	0'007
Sin grupos (G-15)	417 $A_{500 \text{ nm}} = 0'012$	0'034	417 $A_{500 \text{ nm}} = 0'008$	0'028

1.2.- Influencia de los haluros en el sistema

Para este estudio, se prepararon varios matraces de 100 mL donde se introdujeron, 0'5 ml de disolución de Zn(II) de 10 ppm, 2 ml de disolución de PAR $3'92 \times 10^{-4}$ M, cantidades variables y crecientes de disolución del haluro 0'19 M, 10 mL de disolución reguladora ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$) 0'2 M de pH = 8'7 y el agua de ósmosis inversa necesaria para llevar a un volumen total de 100 mL. Se procedió en la forma acostumbrada con un tiempo de agitación de 10 minutos. En todos los casos, se prepararon los blancos correspondientes y se registraron los espectros de absorción entre 400 y 750 nm.

Hay que resaltar que los espectros de absorción del complejo Zn(II)-PAR en las condiciones citadas, no se modifican apreciablemente por la presencia de los haluros en el medio (ver apartado siguiente). Así, se mantiene la posición de las bandas de absorción ($\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$, en todos los casos), aunque se altera su intensidad.

En las tablas IV.4 a IV.7 se reúnen los valores de absorbancia a 500 nm obtenidos en presencia de I^- , Br^- , Cl^- y F^- , respectivamente.

Tabla IV.4. Influencia de Yoduro.

$[I^-] \times 10^3$ (M)	A_b	A	A_{neta}
0'00	0'7035	1'7065	1'0030
0'38	0'6308	1'7102	1'0794
0'95	0'5704	1'7099	1'1395
1'90	0'4630	1'7104	1'2474
3'80	0'4004	1'7160	1'3156
5'70	0'3522	1'7215	1'3693
9'50	0'2976	1'7379	1'4403
13'30	0'3192	1'7807	1'4615
19'00	0'2875	1'7400	1'4525

Tabla IV.5. Influencia de Bromuro.

$[Br^-] \times 10^3$ (M)	A_b	A	A_{neta}
0'95	0'4940	1'5969	1'1029
1'90	0'4028	1'5669	1'1641
5'70	0'3276	1'5513	1'2237
9'50	0'3018	1'5323	1'2305
13'30	0'2474	1'4957	1'2483
19'00	0'2114	1'4518	1'2404

Tabla IV.6. Influencia de Cloruro.

$[Cl^-] \times 10^3$ (M)	A_b	A	A_{neta}
0'95	0'5800	1'6745	1'0945
1'90	0'4728	1'6617	1'1889
5'70	0'3779	1'5971	1'2192
9'50	0'3698	1'5491	1'1793
13'30	0'3211	1'5291	1'2080
19'00	0'2804	1'4737	1'1933

Tabla IV.7. Influencia de Fluoruro.

$[F^-] \times 10^3$ (M)	A_b	A	A_{neta}
0'95	0'5357	1'5845	1'0488
1'90	0'5020	1'5356	1'0336
5'70	0'4610	1'5058	1'0448
9'50	0'4273	1'4601	1'0328
13'30	0'3864	1'4314	1'0450
19'00	0'3749	1'3640	0'9891

Se puede observar que al aumentar la concentración de cualquier haluro, la absorbancia del blanco disminuye en gran extensión. También disminuyen las absorbancias obtenidas de las disoluciones que contienen cinc, aunque de manera menos acentuada (en el caso de yoduro se obtiene una constancia). El efecto neto puede observarse en la figura IV.1: la presencia de haluros provoca un aumento de la

absorbancia del complejo. Los mayores aumentos de absorbancia corresponden al KI y por tanto los posteriores estudios se llevarán a cabo en presencia de KI.

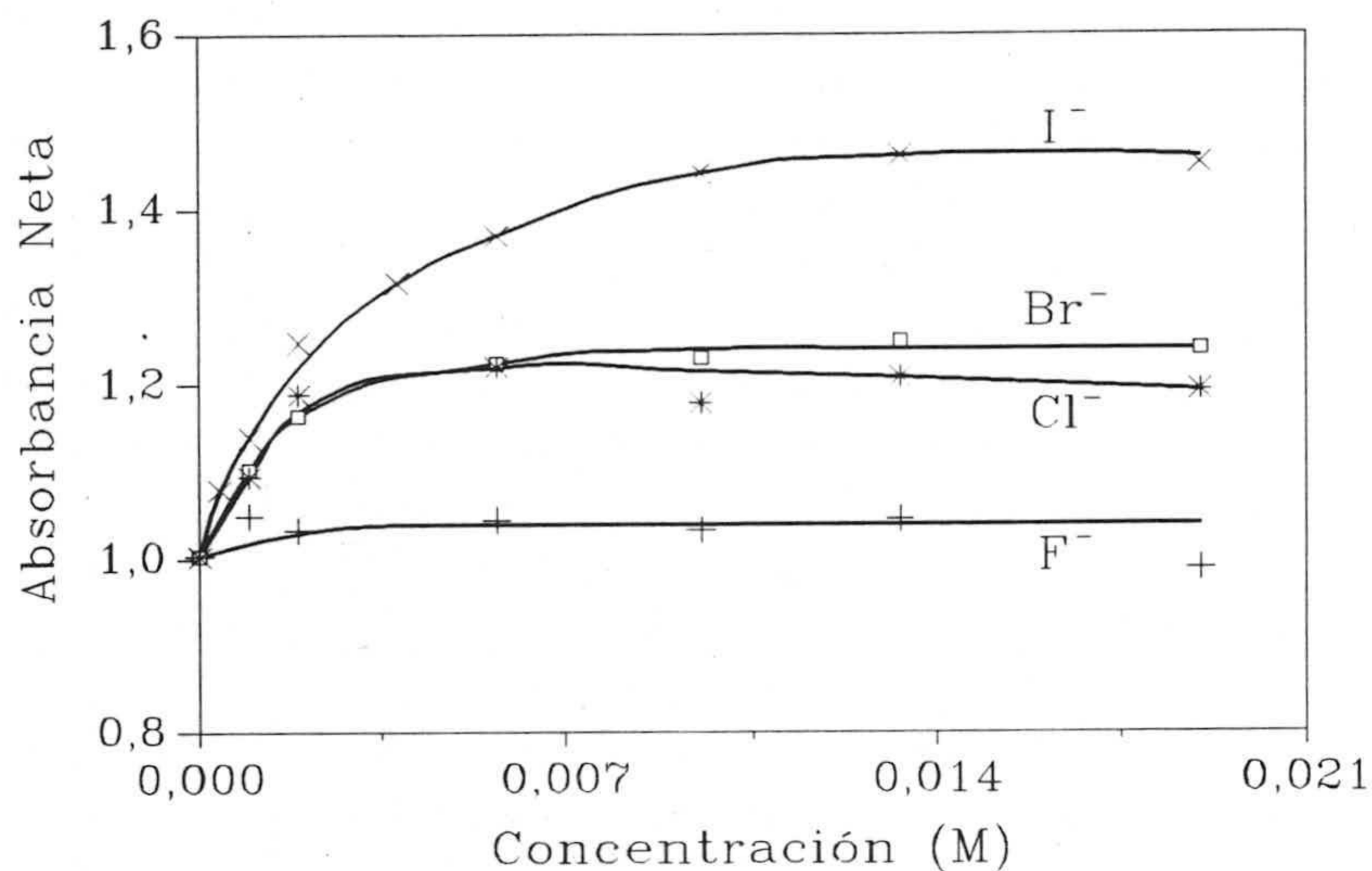


Figura IV.1. Influencia de los haluros. $C_{Zn} = 50$ ppb, $[PAR] = 7,84 \times 10^{-6}$ M, pH = 8,7, 80 mg de Sephadex QAE-A-25, $t_{agitación} = 10$ min, $V = 100$ mL.

1.3.- Espectros de absorción en disolución y en fase sólida

1.3.1.- Espectros en ausencia de yoduro potásico

Se obtuvieron los espectros de absorción del complejo formado entre el ión Zn(II) y el 4-(2-piridilazo)resorcinol en disolución acuosa y en fase sólida.

El espectro en disolución acuosa se obtuvo a partir de una disolución que para un volumen final de 50 mL contenía 0,5 mL de disolución de Zn(II) de 5 ppm, 1 mL de disolución de PAR $3,92 \times 10^{-4}$ M y 5 mL de tampón (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0,2 M de pH = 8,7 (figura IV.2, espectro 2).

Se preparó de forma análoga una disolución acuosa de la sal monosódica del reactivo, que para un volumen final de 50 mL contenía 1 mL de disolución de PAR $3'92 \times 10^{-4}$ M, 5 mL de tampón ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$) 0'2 M de pH = 8'7. El espectro, que se registró al igual que el del complejo, frente a una cubeta con agua de ósmosis inversa, se muestra en la figura IV.2, espectro 1. Ambos espectros se realizaron en cubetas de 1 cm de paso de luz.

A partir de la diferencia entre los espectros 2 y 1 se obtiene la absorbancia neta del complejo (figura IV.2, espectro 3) que muestra un máximo de absorción a 492 nm. Esta longitud de onda máxima obtenida concuerda con aquella señalada por Kitano y Ueda [7], 493 nm a pH = 9'7; Tanaka y col. [8], 495 nm a pH = 9'0; Ahrland y Herman [9], 495 nm a pH = 8'0 y cercana a la de Nonova y col. [10], 505 nm a pH = 9'7.

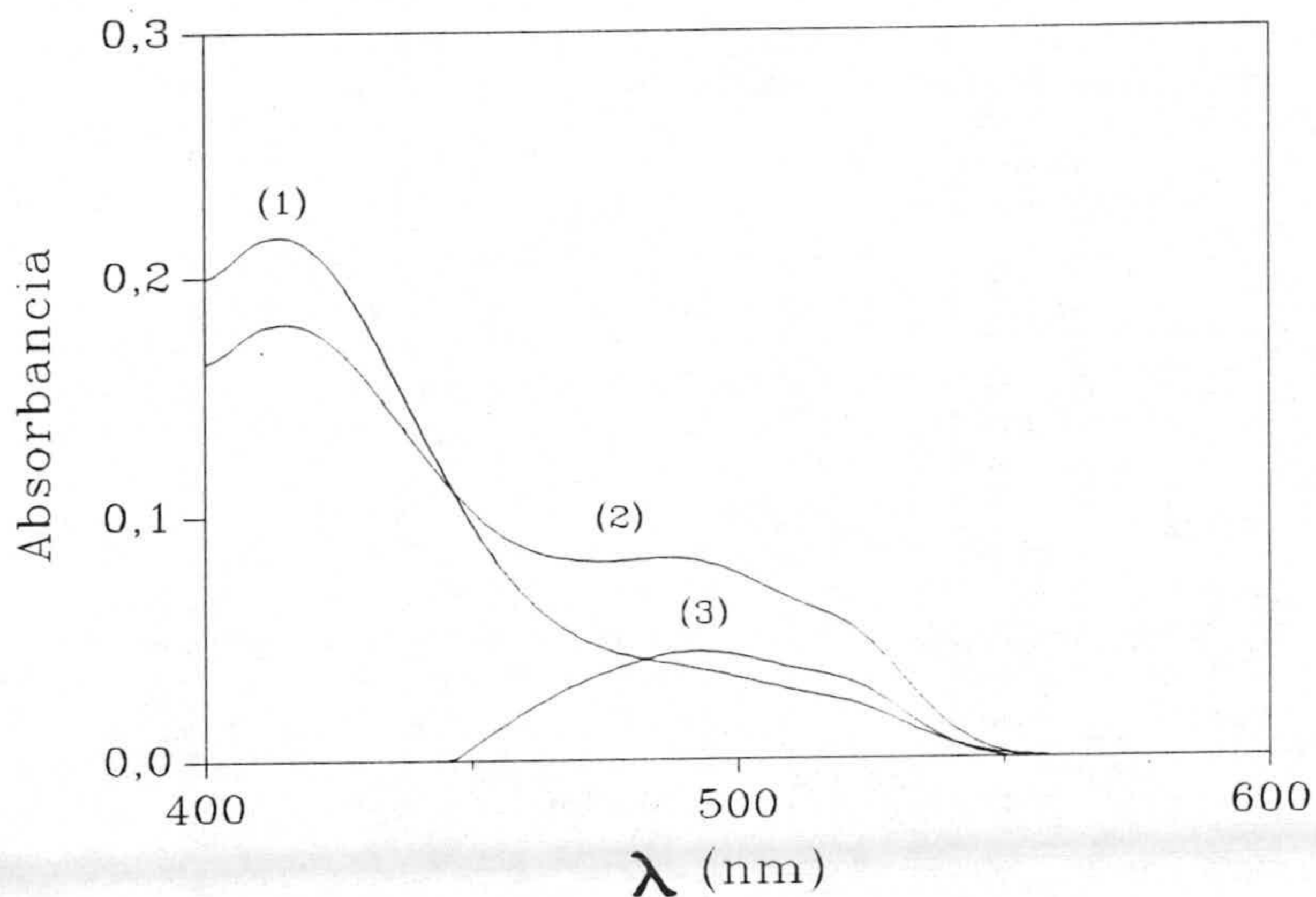


Figura IV.2. Espectros en disolución acuosa en ausencia de KI. Espectro (1): blanco frente a agua; Espectro (2): complejo frente a agua; Espectro (3): complejo frente al blanco. $C_{\text{Zn}} = 50$ ppb, $[\text{PAR}] = 7'84 \times 10^{-6}$ M, pH = 8'7, V = 50 mL.

Los espectros en fase sólida, se obtuvieron del siguiente modo: se preparó una disolución que contenía 0'5 mL de disolución de Zn(II) de 5 ppm, 2 mL de disolución de PAR $3'92 \times 10^{-4}$ M, 10 mL de tampón (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M de pH = 8'7 y el agua de ósmosis inversa para que el volumen final sea de 100 mL. Esta disolución se transfirió a un frasco de polietileno, se añadió 80 mg del soporte sólido QAE-A-25 en ciclo Cl^- y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Se filtró la disolución y el soporte se recogió con un gotero a una cubeta de vidrio óptico de 1 mm de paso de luz, centrifugando después durante 30 segundos. El espectro se registró frente a una cubeta con una cantidad de soporte sólido equilibrado con agua (figura IV.3, espectro 2). Se preparó asimismo el correspondiente blanco en fase sólida de forma análoga pero exento de cinc (figura IV.3, espectro 1) y por diferencia entre los espectros 2 y 1 se obtuvo el espectro neto correspondiente al complejo (figura IV.3, espectro 3) que muestra un máximo a 500 nm.

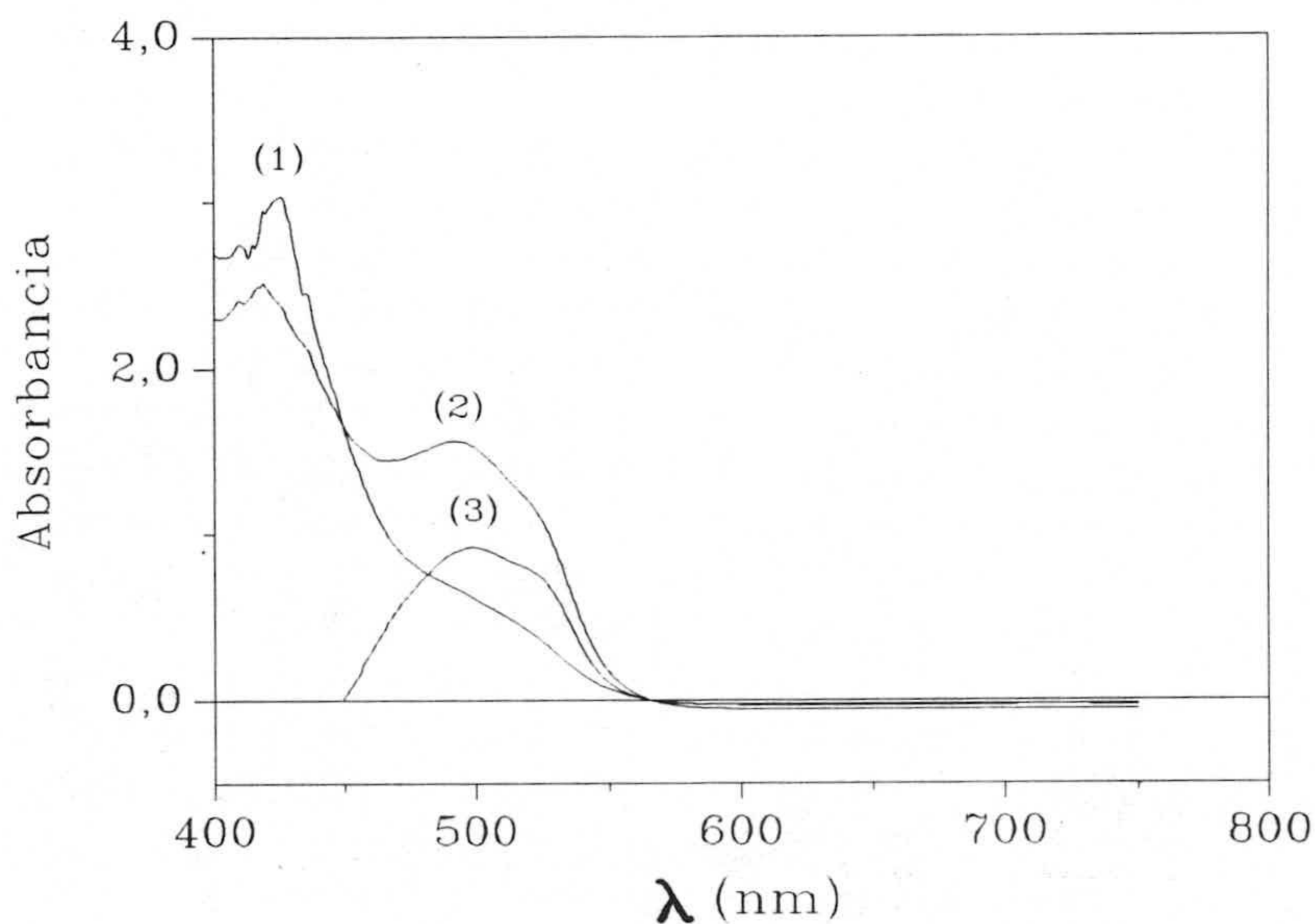


Figura IV.3. Espectros en fase sólida en ausencia de KI. Espectro (1): blanco frente al soporte en agua; Espectro (2): complejo frente al soporte en agua; Espectro (3): complejo frente al blanco. $C_{Zn} = 50$ ppb, $[PAR] = 7'84 \times 10^{-6}$ M, pH = 8'7, V = 100 mL, 80 mg de Sephadex QAE-A-25, $t_{agitación} = 10$ min.

1.3.2.- Espectros en presencia de yoduro potásico

Se obtuvieron los espectros de absorción del complejo formado entre el ión Zn(II) y el 4-(2-piridilazo)resorcinol en presencia de yoduro potásico, tanto en disolución acuosa como en fase sólida. Dichos espectros y sus condiciones operatorias están recogidos en las figuras IV.4 y IV.5.

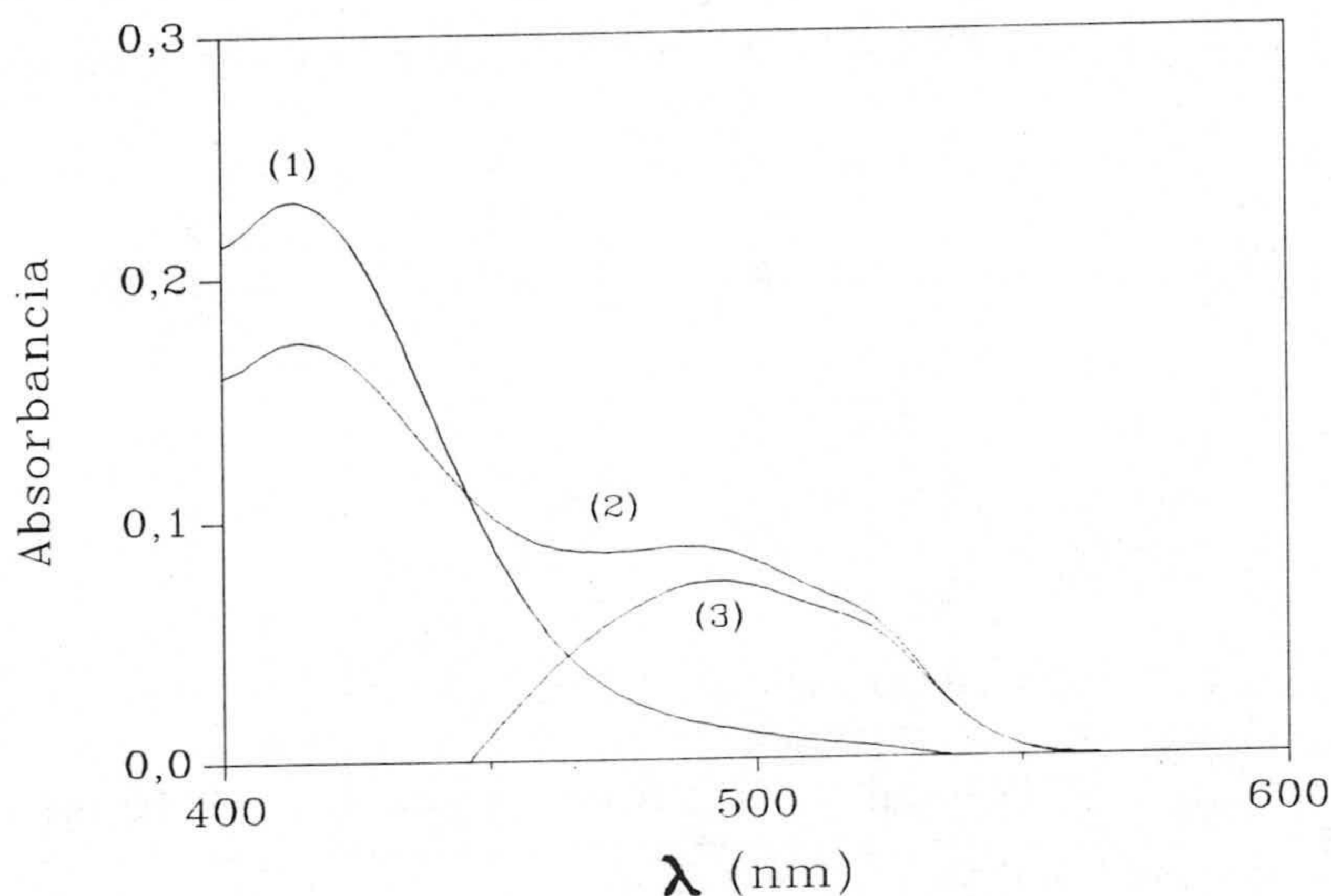


Figura IV.4. Espectros en disolución acuosa en presencia de KI. Espectro (1): blanco frente a agua; Espectro (2): complejo frente a agua; Espectro (3): complejo frente al blanco. $C_{Zn} = 50$ ppb, $[PAR] = 7,84 \times 10^{-6}$ M, $[KI] = 2 \times 10^{-3}$ M, $pH = 8,7$, $V = 50$ mL.

En dichas figuras, se observa que los espectros netos (3) correspondientes al complejo en disolución y en fase sólida, muestran máximos de absorción alrededor de 493 y 500 nm respectivamente, no produciéndose por tanto, modificación alguna en la posición de las bandas de absorción por la presencia de KI en el medio. Si puede observarse el aumento de la absorbancia neta del complejo, efecto ya comentado con

anterioridad.

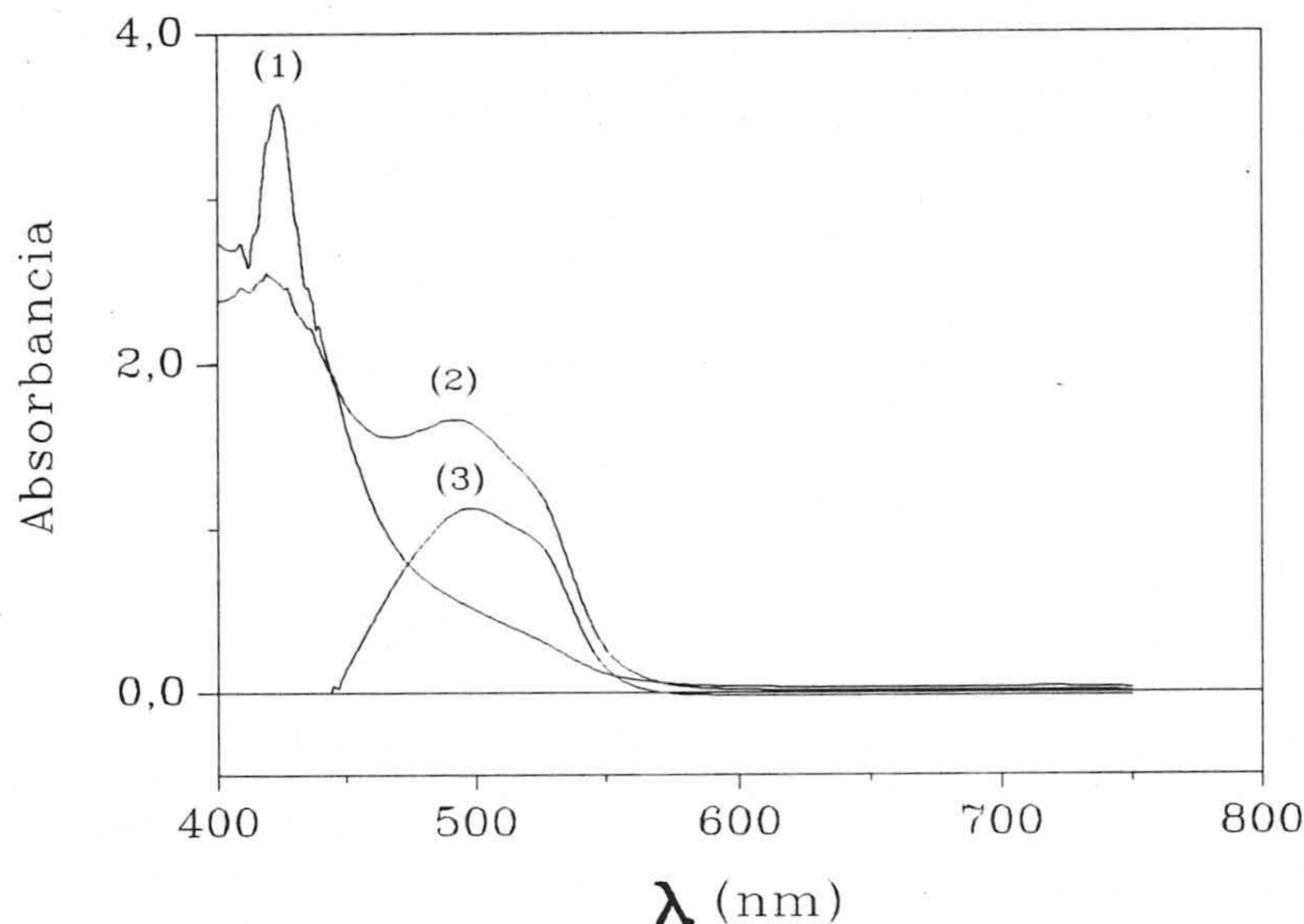


Figura IV.5. Espectros en fase sólida en presencia de KI. Espectro (1): blanco frente al soporte en agua; Espectro (2): complejo frente al soporte en agua; Espectro (3): complejo frente al blanco. $C_{Zn} = 50$ ppb, $[PAR] = 7'84 \times 10^{-6}$ M, $[KI] = 2 \times 10^{-3}$ M, $pH = 8'7$, $V = 100$ mL, 80 mg de Sephadex QAE-A-25, $t_{agitación} = 10$ min.

Para posteriores experiencias, las longitudes de onda sobre las cuales se van a llevar a cabo la lectura de la absorbancia son: $\lambda_{max} = 500$ nm, donde absorbe el complejo y $\lambda = 750$ nm, región donde sólo absorbe el soporte QAE-A-25.

Finalmente, señalamos que el complejo en presencia de KI se fija en soportes aniónicos y no lo hace en soportes catiónicos (Sephadex SP-C-25) o sin grupos de cambio (Sephadex G-15).

2.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE CONDICIONAN LA FORMACIÓN Y LA FIJACIÓN DEL COMPLEJO

2.1.- Optimización univariante de las condiciones experimentales

2.1.1.- Concentración de KI

Para fijar la concentración de KI, nos hemos basado sobre el anterior estudio correspondiente a la influencia de KI en el sistema Zn(II)-PAR (tabla IV.4). A la vista de los resultados, se eligió una concentración de KI 10^{-2} M ya que a esta concentración, la absorbancia neta del complejo es máxima.

Hay que señalar que la utilización de KI a concentraciones elevadas causa la fijación de algo de I_2 sobre la fase sólida [6], sin embargo, y puesto que la absorbancia sufre la misma subida a 750 que a 500 nm, la absorbancia neta final no se modifica.

2.1.2.- Influencia del pH

Para llevar a cabo esta experiencia, se prepararon varios matraces de vidrio de 100 mL de capacidad que contenían 25 ppb de Zn(II), 8×10^{-6} M de PAR, 10^{-2} M de KI y 10 mL de disolución tampón (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M de distintos valores de pH. De manera análoga, se prepararon las disoluciones blanco.

Utilizando el procedimiento anteriormente mencionado con 80 mg de Sephadex QAE-A-25 y con un tiempo de agitación de 10 min., se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla IV.8 y cuya representación gráfica se muestra en las figuras IV.6 y IV.7. De esta última, se deduce que a partir de pH 6'1 la absorbancia neta aumenta progresivamente hasta alcanzar un valor máximo que corresponde al intervalo de pH comprendido entre 7'7-9'5 y por consiguiente se elige un pH de 8'7 para posteriores experiencias.

Tabla IV.8. Influencia del pH.

pH	A _b	A	A _{neta}
4'90	0'3200	0'3990	0'0790
5'50	0'4572	0'5272	0'0700
6'00	0'5700	0'6351	0'0651
6'08	0'5810	0'6810	0'1000
6'30	0'6500	0'9148	0'2648
6'46	0'6800	1'1114	0'4314
6'72	0'7403	1'2307	0'4904
6'82	0'7387	1'3571	0'6184
6'89	0'7209	1'3116	0'5907
7'01	0'7033	1'3938	0'6905
7'15	0'7491	1'4791	0'7300
7'76	0'7710	1'5561	0'7851
8'08	0'7509	1'5426	0'7917
8'22	0'7850	1'5606	0'7756
8'32	0'7717	1'5535	0'7818
8'45	0'6653	1'4598	0'7945
8'67	0'6044	1'3857	0'7813
9'01	0'6129	1'3820	0'7691
9'48	0'5900	1'3630	0'7730

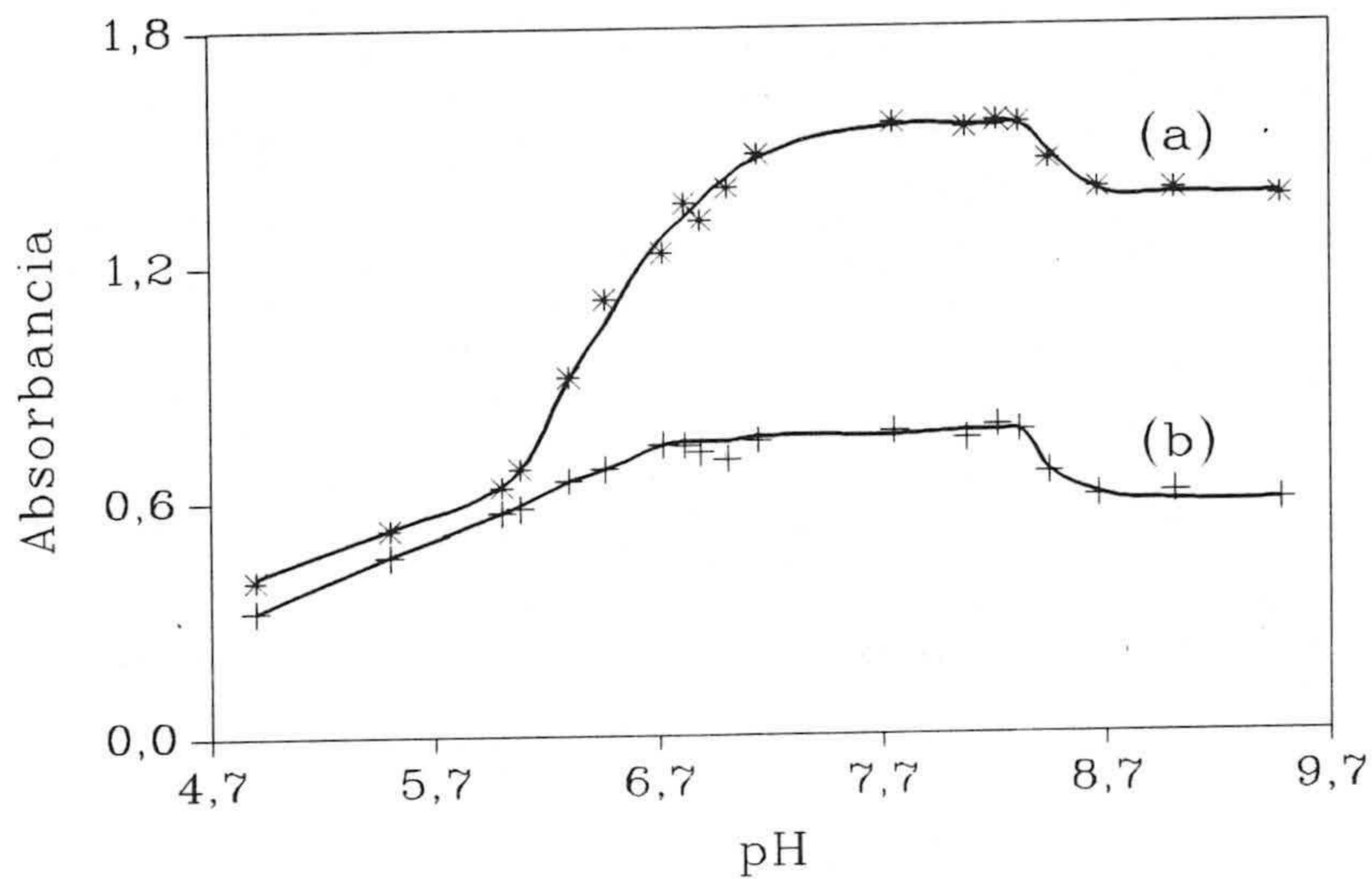


Figura IV.6. Influencia del pH. Influencia sobre la absorbancia de analito (a) y de blanco (b). $C_{Zn} = 25$ ppb, $[PAR] = 8 \times 10^{-6}$ M, $[KI] = 10^{-2}$ M, $V = 100$ mL, 80 mg de Sephadex QAE-A-25, $t_{agitación} = 10$ min.

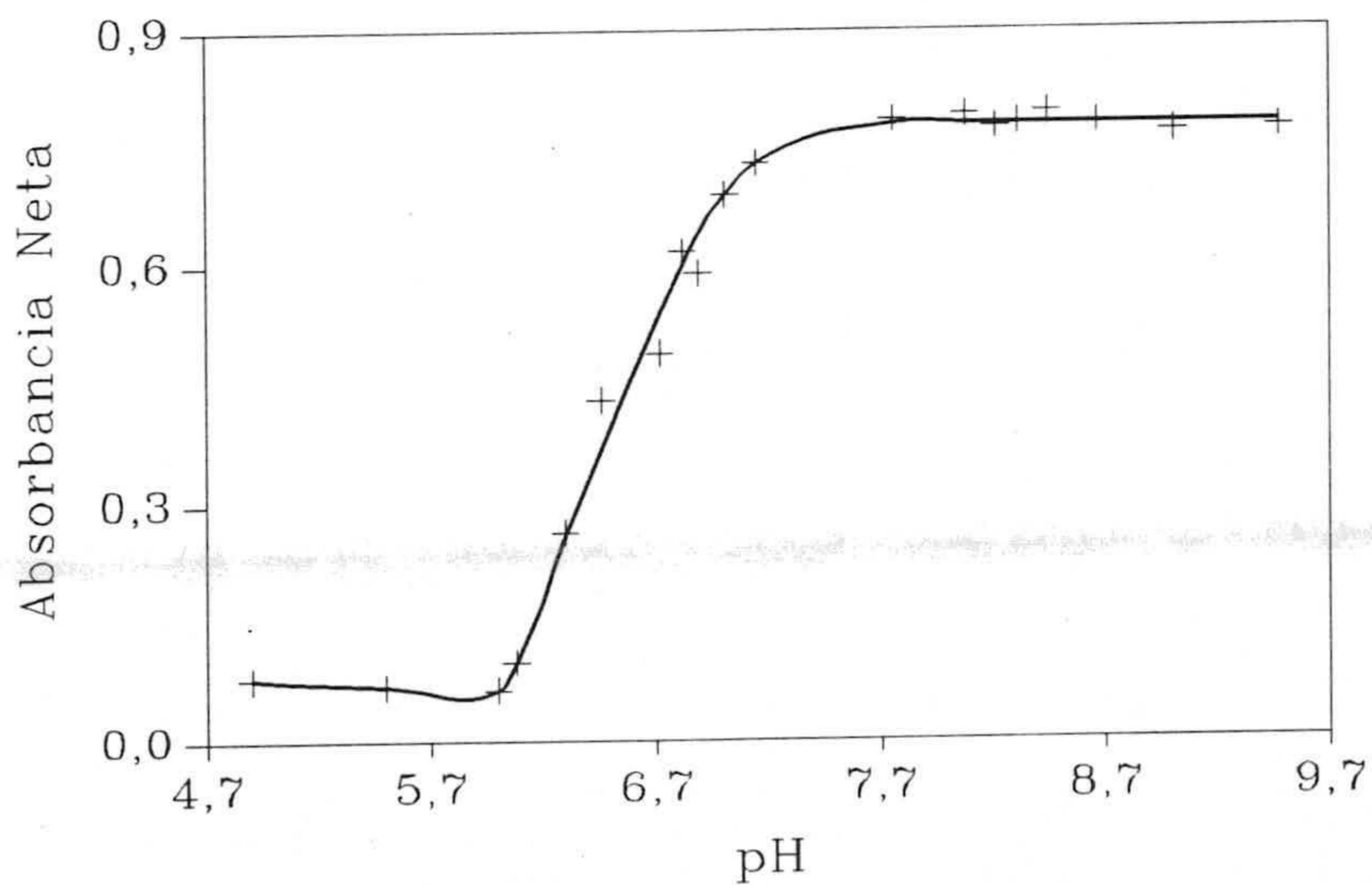


Figura IV.7. Influencia del pH sobre la absorbancia neta del complejo.

2.1.3.- Concentración de la disolución reguladora

Con el objeto de determinar la concentración óptima de tampón, se operó sobre 25 ppb de Zn(II), 8×10^{-8} M de PAR, 10^{-2} M de KI y cantidades crecientes de disolución reguladora ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$) 0'2 M de pH = 8'7. Los resultados obtenidos, tras agitar las botellas durante 10 min. con 80 mg de soporte sólido, se recogen en la tabla IV.9.

Tabla IV.9. Concentración de tampón.

V (mL)	[Tampón] (M)	A_{neta}
10	0'02	0'788
15	0'03	0'717
20	0'04	0'721

La máxima absorbancia se obtiene para a un volumen de tampón de 10 mL correspondiente a una concentración del mismo de 2×10^{-2} M. También se observa que al aumentar el volumen, la absorbancia neta sufre una caída, hecho que puede atribuirse al aumento de la fuerza iónica. Es por esto que, para posteriores experiencias, se opta por la adición de un volumen de disolución reguladora de 10 mL.

2.1.4.- Influencia del orden de adición

Para ver dicha influencia, se hicieron 3 réplicas de cada orden de adición y operando sobre 15 ppb de Zn(II), $7'84 \times 10^{-6}$ M de PAR, 10^{-2} M de KI y a pH = 8'7. Los órdenes ensayados fueron:

* Zn(II) + I⁻ + PAR + Tampón

* Zn(II) + PAR + I⁻ + Tampón

* Zn(II) + I⁻ + Tampón + PAR

* Zn(II) + I⁻ + PAR (preparado en Tampón)

Los resultados obtenidos indican que todos los órdenes de adición producen una alta variabilidad en los datos siendo el orden Zn(II)-PAR-I-Tampón el que presenta el menor coeficiente de variación. En el caso del último orden, donde el PAR fue preparado en el tampón, los correspondientes valores de la absorbancia, tanto del blanco como la del complejo, sufren una caída a lo largo del tiempo. Por consiguiente, se elige para las próximas experiencias como orden de adición el siguiente: Zn(II)-PAR-I-Tampón.

2.1.5.- Estabilidad de las disoluciones de reactivo

Para saber cuál es la estabilidad del reactivo, se prepara en un matraz de 100 mL una disolución de PAR disolviendo 0'0100 g de la sal monosódica del 4-(2-piridilazo)-resorcinol en 100 mL de agua de ósmosis inversa. A partir de esta disolución, mantenida a temperatura ambiente, se van tomando alícuotas: recién preparada la disolución ($t = 0$) y después de transcurridos diferentes intervalos de tiempo.

Así y para cada punto, se introducen en un matraz de 100 mL, 2 mL de disolución de PAR $3'92 \times 10^{-4}$ M, 10 mL de disolución de KI 0'1 M, 10 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M de $pH = 8'7$ y el agua de ósmosis inversa necesaria para llevar a un volumen final de 100 mL. Tras agitar las botellas durante 10 minutos con 80 mg de Sephadex QAE-A-25, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla IV.10.

Tabla IV.10. Estabilidad de la disolución de PAR
(disolución de trabajo destapada).

t (horas)	A
0'0	1'006
0'8	0'743
1'5	0'626
3'9	0'634
5'0	0'666
5'9	0'458

A la vista de los resultados, se deduce que el reactivo a la concentración de trabajo 3.92×10^{-4} M no es estable durante el tiempo de estudio ya que la absorbancia decrece a lo largo del tiempo. Este problema ya fué constatado por Shibata [11] quién atribuye la inestabilidad del PAR a la preparación de la disolución del reactivo en soluciones alcalinas, no siendo éste nuestro caso.

Otra causa de la inestabilidad podría ser la acción de la luz sobre la disolución de trabajo del PAR así, Gómez y col. [12], almacenan el reactivo en un frasco de polietileno oscuro. Para comprobar la estabilidad en estas condiciones, se repitió la experiencia anterior pero manteniendo fuera de la luz la disolución de trabajo del PAR (tapando el matraz con papel de aluminio). Los valores obtenidos se recogen en la tabla IV.11, y nos indican que el reactivo a la concentración de trabajo de 3.92×10^{-4} M es estable durante un tiempo de al menos 8 horas siempre y cuando se conserve la disolución en oscuridad.

Tabla IV.11. Estabilidad de la disolución de PAR (disolución de trabajo tapada).

t (horas)	A	t (horas)	A
0'0	0'3600	2'6	0'3556
0'2	0'3411	3'1	0'3696
0'5	0'3106	3'5	0'3737
0'7	0'3273	4'6	0'3647
1'0	0'2956	7'0	0'3707
1'3	0'3069	8'1	0'3734
2'1	0'3160	---	----

2.1.6.- Influencia de la concentración de reactivo

Para ver el efecto del exceso de reactivo sobre el sistema, se preparó una experiencia en la que se midió la absorbancia para distintas disoluciones en las que se mantuvieron constantes las concentraciones de cinc (15 ppb) y de KI (10^{-2} M) y se fue

aumentando la concentración del PAR en la disolución. Se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla IV.12 y que se representan en la figura IV.8.

Tabla IV.12. Influencia de la concentración de PAR.

[PAR] $\times 10^6$ (M)	A_b	A	A_{neta}
3'92	0'242	0'682	0'440
5'88	0'307	0'812	0'505
7'84	0'378	0'914	0'532
9'80	0'427	0'955	0'528
11'76	0'463	0'985	0'525
15'68	0'529	1'040	0'511

A la vista de los resultados, se deduce que se alcanza una constancia en la absorbancia neta del complejo a partir de una concentración de PAR $5'88 \times 10^{-6}$ M. Por consiguiente, se elige para posteriores experiencias una concentración de reactivo $7'84 \times 10^{-6}$ M.

2.1.7.- Influencia del tiempo de agitación

Para ver la influencia de dicho parámetro, se ha trabajado sobre 15 ppb de Zn(II), $7'84 \times 10^{-6}$ M de PAR, 10^{-2} M de KI y a pH = 8'7 añadiendo 10 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M. Los resultados obtenidos, tras aplicar el procedimiento operatorio previamente descrito y agitar las botellas durante tiempos variables en el intervalo de 5 a 20 minutos, se muestran en la tabla IV.13.

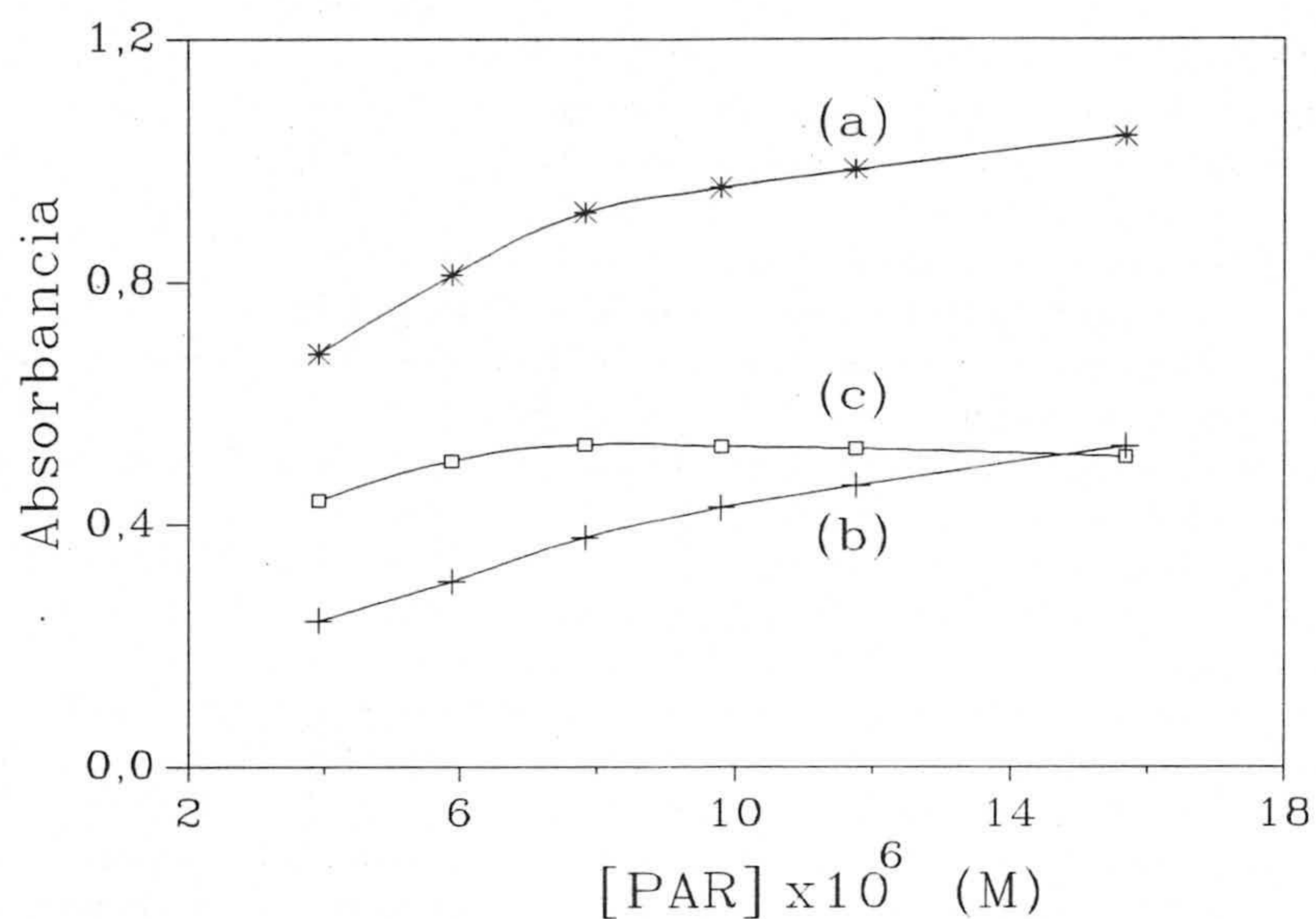


Figura IV.8. Influencia de la concentración de PAR. Influencia sobre la absorbancia de analito (a), de blanco (b) y neta (c). $C_{Zn} = 15$ ppb, $[KI] = 10^{-2}$ M, $pH = 8,7$, $V = 100$ mL, 80 mg de Sephadex QAE-A-25, $t_{agitación} = 10$ min.

Tabla IV.13. Influencia del tiempo de agitación.

t (min)	A_{neta}
5	0'512
10	0'528
15	0'519
20	0'665

A la vista de los resultados, se deduce que es suficiente un tiempo de agitación de 10 minutos para alcanzar la máxima absorbancia, tiempo que se seguirá usando para sucesivas experiencias.

2.1.8.- Influencia de la cantidad de soporte sólido

En todo sistema heterogéneo, una disminución en el volumen ó masa de una de las dos fases trae como consecuencia el aumento de la concentración de soluto en el equilibrio en dicha fase.

Se realiza esta experiencia para determinar la influencia que en el valor de la absorbancia del complejo ejerce la cantidad de soporte sólido utilizada y determinar a la vez la mínima cantidad del mismo que, sin aumentar en gran medida el tiempo de agitación, produzca la máxima absorbancia.

Para este estudio, se operó sobre 15 ppb de Zn(II), 7.84×10^{-6} M de PAR, 10^{-2} M de KI y a pH = 8.7. Después de añadir a las botellas cantidades crecientes del Sephadex QAE-A-25 y agitar durante 10 minutos, se obtuvieron los valores de la absorbancia que se recogen en la tabla IV.14 que se representan en la figura IV.9.

Tabla IV.14. Influencia de la cantidad del Sephadex QAE-A-25.

m_r (g)	A_{neta}
0.08	0.620
0.10	0.362
0.15	0.236
0.20	0.190

Conforme la cantidad del soporte utilizado aumenta, la absorbancia neta decrece debido a que se fija una cantidad constante de complejo en la fase sólida sobre cantidades crecientes del soporte, lo que da lugar a su "dilución". La cantidad de soporte que proporciona una máxima absorbancia corresponde a 0.080 g y es una cantidad que

se maneja con comodidad a la hora de filtrar la disolución y rellenar la cubeta.

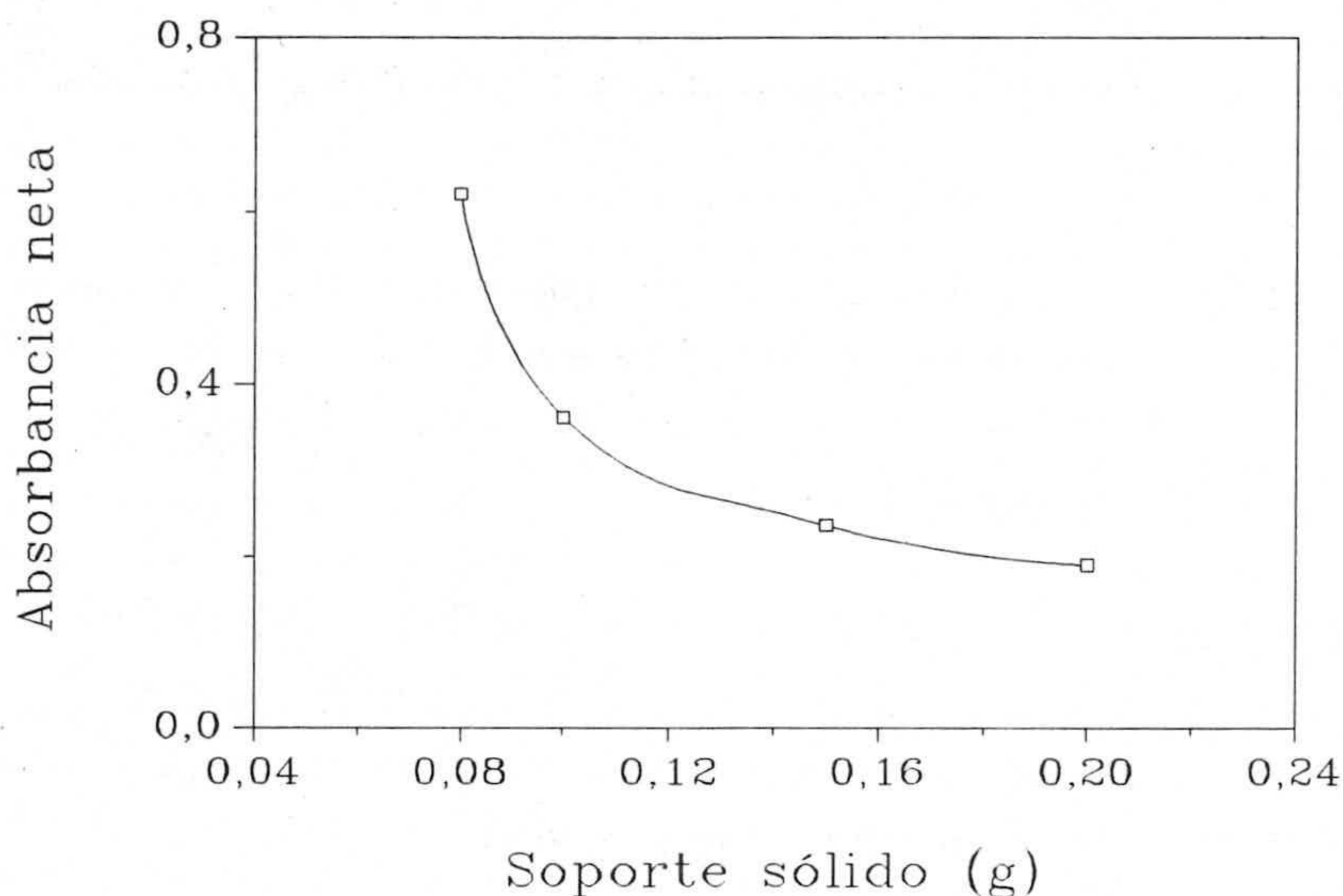


Figura IV.9. Influencia de la cantidad del soporte sólido. $C_{Zn} = 15$ ppb, $[PAR] = 7'84 \times 10^{-6}$ M, $[KI] = 10^{-2}$ M, $pH = 8'7$, $V = 100$ mL, $t_{agitación} = 10$ min.

2.1.9.- Estabilidad del complejo fijado en el cambiador

Con el objetivo de determinar la estabilidad del complejo una vez formado y fijado en el soporte sólido, se prepara una pareja de disoluciones (blanco y 15 ppb de cinc) sobre la cual se llevará a cabo diferentes medidas a intervalos regulares de tiempo. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.15.

Se observa un ligero aumento de la absorbancia del blanco que no llega a ser significativo hasta los 20 minutos (aumento del 3%) mientras que la absorbancia del analito se ve inalterada, y por consiguiente, esto se refleja en la absorbancia neta del complejo que disminuye ligeramente en la misma extensión.

Tabla IV.15. Estabilidad del complejo en el cambiador.

t (min)	A _b	A	A _{neto}
0	0'436	0'877	0'441
5	0'439	0'876	0'437
10	0'443	0'876	0'433
15	0'447	0'879	0'432
20	0'450	0'877	0'427

En adelante en todas las experiencias el tiempo transcurrido entre la preparación del complejo fijado en el soporte y la medida de su absorbancia no superará los 15 minutos.

2.2.- Optimización de PAR y KI utilizando los diseños de DOEHLERT

Para conocer la influencia del PAR y el KI sobre el sistema y la posible interacción entre ellos, se optimizaron estas variables conjuntamente, utilizando los diseños Doehlert cuyos fundamentos y adecuación al estudio han sido comentados en el capítulo II.

2.2.1.- Diseño I

Su nivel básico (0,0) se corresponde con las concentraciones 2×10^{-3} M de KI y $5'97 \times 10^{-6}$ M de PAR (figura IV.10). Cada variación de una unidad en el valor codificado significa un cambio de $\pm 1'5 \times 10^{-3}$ M y $\pm 3'98 \times 10^{-6}$ M en las concentraciones de KI y PAR respectivamente.

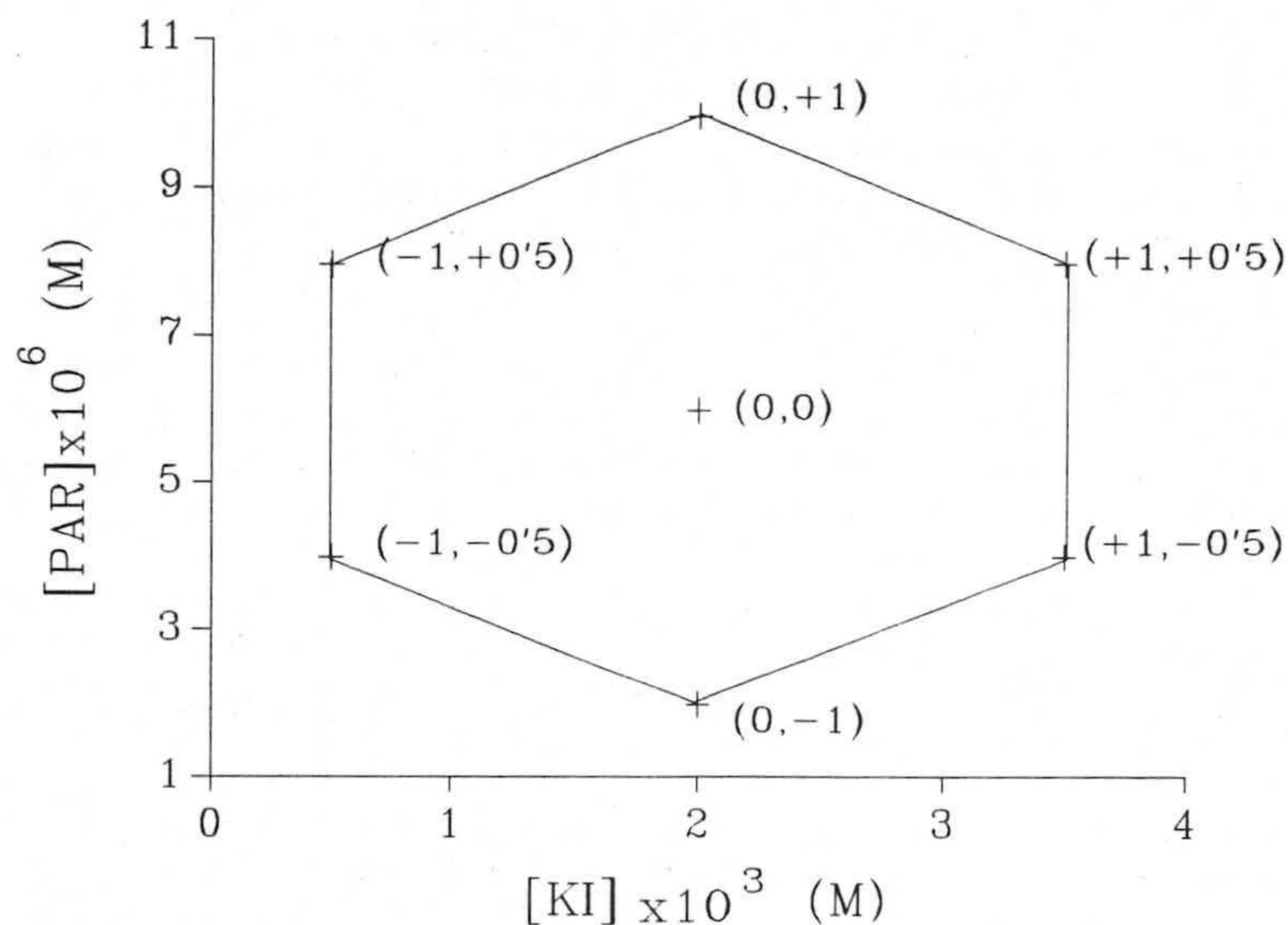


Figura IV.10. Diseño I. Los valores codificados, para cada experimento, vienen entre paréntesis.

Se procedió siguiendo la forma operatoria habitual sobre 25 ppb de Zn(II), con volúmenes variables de disolución de PAR $3'98 \times 10^{-4}$ M y de disolución de KI 0'1 M tal y como se indica en la tabla IV.16. El pH se mantuvo a 8'7 agregando 10 mL de disolución reguladora. Tras agitar las botellas durante 10 minutos, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla IV.16.

* Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

La herramienta utilizada para verificar la adecuación del modelo ha sido el análisis gráfico de los residuales. Así, en las gráficas de probabilidad normal tanto de los datos experimentales de las señales netas, como de sus residuales, se observa que no existe ninguna indicación de no normalidad, ni evidencia que sugiera posibles residuos inusitados. En la representación de los residuos frente a la concentración de una u otra

Tabla IV.16. Variables y resultados correspondientes al diseño I.

Nº	V _{PAR} (mL)	[PAR]x10 ⁶	V _{KI} (mL)	[KI]x10 ³	A _{neta}
1	1'0	3'98 (-0'5)	3'5	3'5 (+ 1)	0'6775
2	2'0	7'96 (+ 0'5)	3'5	3'5 (+ 1)	0'6490
3	0'5	1'99 (-1)	2'0	2'0 (0)	0'5560
4	1'5	5'97 (0)	2'0	2'0 (0)	0'6069
5	2'5	9'95 (+ 1)	2'0	2'0 (0)	0'5943
6	1'0	3'98 (-0'5)	0'5	0'5 (-1)	0'5234
7	2'0	7'96 (+ 0'5)	0'5	0'5 (-1)	0'5782

Los valores codificados, para cada punto, vienen entre paréntesis.

variable, se observa que no hay indicios de desigualdad de varianzas y por tanto se cumple la hipótesis de "homoscedasticidad". Finalmente, la gráfica de los residuos frente a los valores predichos de la señal neta, muestra que no hay ninguna relación entre esta última y los residuales y por tanto se acepta la hipótesis de independencia entre ellos. Las gráficas anteriormente citadas se recogen en el apéndice (figura A.1 a A.5).

Para juzgar la adecuación del modelo de regresión de segundo orden propuesto, se ha utilizado el coeficiente de determinación, r^2 . Se puede observar que el modelo se ajusta perfectamente a los datos experimentales, existiendo una buena concordancia entre éstos y los valores de la absorbancia neta predichos por dicho modelo (tablas IV.16 y VI.17), obteniéndose un valor de $r^2 = 0'9992$.

Tabla IV.17. Valores de las absorbancias predichas por el diseño I.

Nº	A _{neto} predicha	Nº	A _{neto} predicha
1	0'675	5	0'592
2	0'651	6	0'521
3	0'558	7	0'580
4	0'607	--	-----

* Análisis de la varianza (ANOVA)

Mediante la observación de la tabla del análisis de la varianza, se puede conocer el efecto que ejerce cada una de las variables, así como la existencia o no de interacción entre ellas. En la tabla IV.18, se observa que el único efecto que es significativo, ($P < 5\%$), es el correspondiente a la concentración de KI, mientras que su término cuadrático no tiene efecto alguno. Ni la variable que corresponde a la concentración de PAR, ni su término cuadrático tienen efecto sobre la señal neta. El único término cruzado que relaciona las concentraciones de KI y PAR, no es significativo y por tanto no existe interacción entre dichas variables.

Tabla IV.18. Análisis de la varianza.

Efecto	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P (%)
A: PAR	0'00088237	1	0'00088237	36'77	10'27
B: KI	0'01264500	1	0'01264500	526'88	2'73
AB	0'00173472	1	0'00173472	72'28	7'35
AA	0'00067204	1	0'00067204	28'00	11'73
BB	0'00007704	1	0'00007704	3'21	31'93
Error total	0'00002400	1	0'00002400		
Total (corr.)	0'01673528	6			

En la figura IV.11, se indican los efectos estandarizados de cada factor obtenidos al dividir el efecto estimado, de cada uno de ellos, por su correspondiente error estándar. A partir de ella, se deduce que el único factor cuyo efecto es significativo es la concentración de KI ya que su efecto estandarizado sobrepasa la línea discontinua de la gráfica. Esta representa el error estándar estimado a partir del error total con 1 grado de libertad ($t = 12.7$).

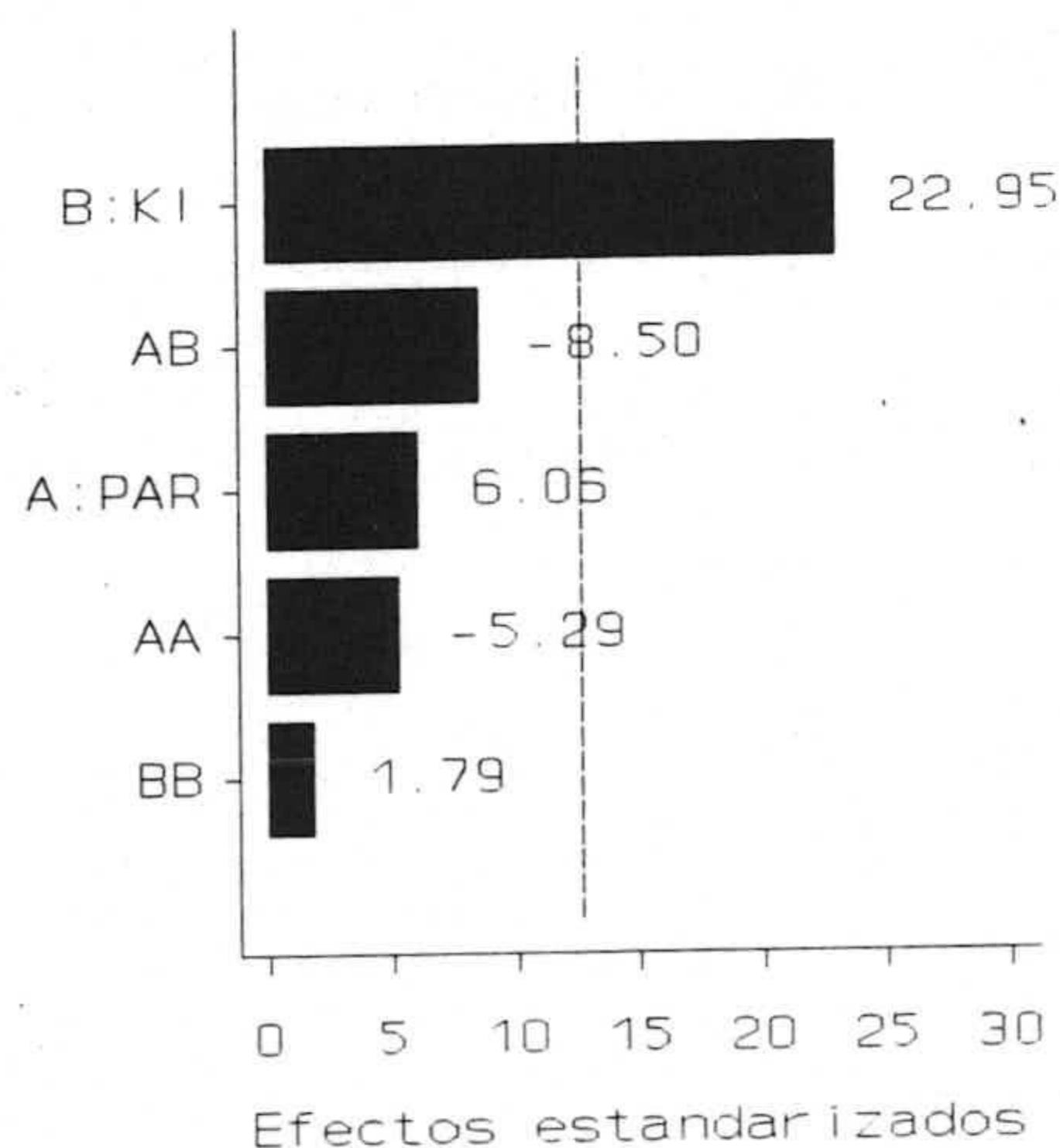


Figura IV.11. Gráfica de los efectos estandarizados.

Los resultados experimentales de este diseño se ajustan a la siguiente función:

$$A_{\text{neta}} = 0.3658 + 0.0422[\text{PAR}] + 0.0648[\text{KI}] - 0.0070[\text{PAR}][\text{KI}] - 0.0020[\text{PAR}]^2 + 0.0036[\text{KI}]^2. \quad (1)$$

que recoge la relación de la absorbancia neta con las concentraciones molares de PAR (multiplicada por 10^6) y de KI (multiplicada por 10^3).

Mediante la utilización de los coeficientes del ajuste polinómico se puede

representar la variación de la señal neta con la concentración de las dos variables experimentales en estudio. En la figura IV.12, se muestra la superficie de respuesta obtenida en este diseño. En ella se puede observar la presencia de punto de silla, que como veremos a continuación, se confirma al aplicar el criterio de Lagrange sobre la función cuadrática.

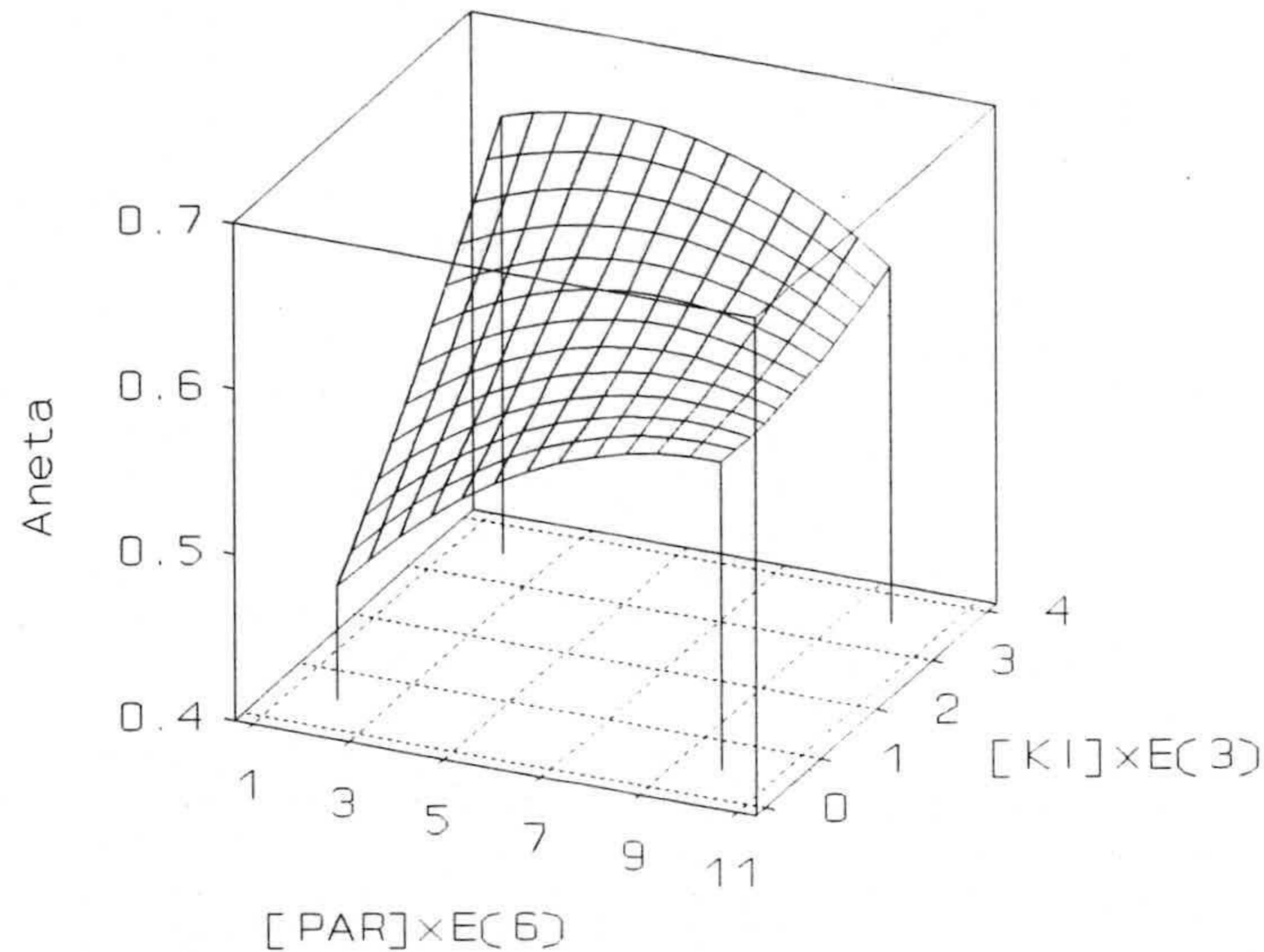


Figura IV.12. Superficie de respuesta correspondiente al diseño I.

* Cálculo del óptimo

La aplicación del criterio de Lagrange sobre la función indica la presencia de un punto de silla puesto que el determinante hessiano es negativo: $H(PAR, KI) = -0'00008$.

Como no tenemos un máximo, calcularemos las direcciones de máxima variación de la absorbancia en los puntos del diseño anterior, figura IV.13, que corresponden a la mayor concentración de KI, $(+ 1, + 0'5)$ y $(+ 1, -0'5)$, ya que ésta parece ser la dirección de aumento de la respuesta.

Las direcciones de máxima variación de la respuesta encontradas para cada uno de los puntos señalados anteriormente son $-22'3^{\circ}$ y $1'6^{\circ}$. Las rectas trazadas a partir de los puntos y con las direcciones calculadas se cortan en un punto cuyas coordenadas son $4'24 \times 10^{-6}$ M en PAR y $12'05 \times 10^{-3}$ M en KI, señalando la posición del posible óptimo (punto 1 en la figura IV.13). Para confirmar este extremo se procedió a realizar un segundo diseño.

2.2.2.- Diseño II

Con objeto de aprovechar algunos de los puntos experimentales utilizados en el diseño previo, se realiza el segundo diseño (figura IV.13) de modo que partiendo de los puntos del diseño I, se englobe la región donde se encuentra el posible óptimo previamente calculado.

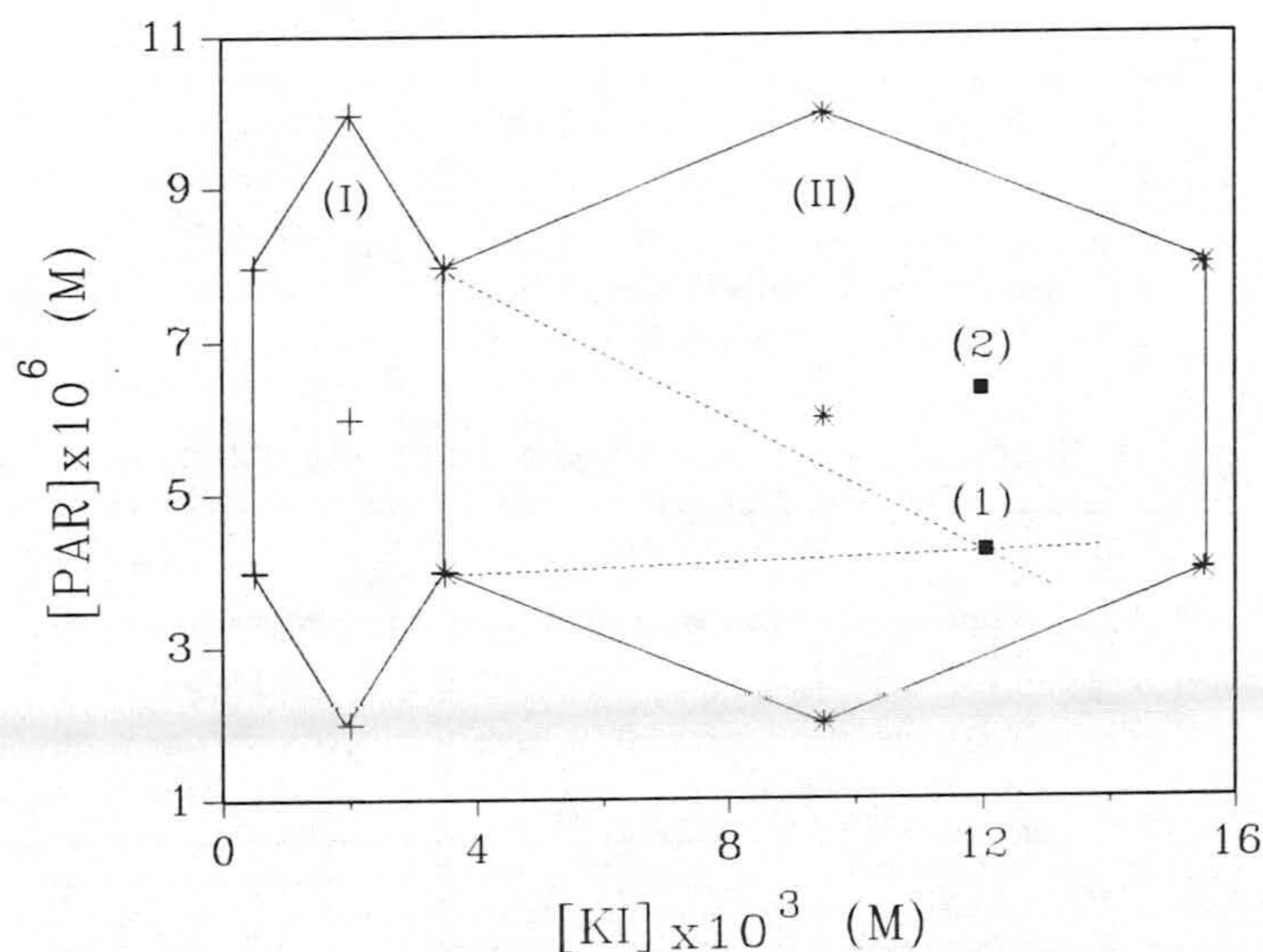


Figura IV.13. Representación conjunta de los diseños I y II. (1): óptimo estimado a partir del diseño I; (2): máximo obtenido a partir del diseño II.

Para llevar a cabo la realización de este diseño, se procedió de la misma manera que en el apartado anterior. Los volúmenes de PAR y KI agregados así como los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.19. En ésta también se reflejan, tanto los valores codificados (valores entre paréntesis) para cada punto como los dos puntos correspondientes al diseño I (puntos nº 1 y 2). Las absorbancias netas predichas se muestran en la tabla IV.20.

Tabla IV.19. Variables y resultados correspondientes al diseño II.

Nº	V _{PAR} (mL)	[PAR]x10 ⁶	V _{KI} (mL)	[KI]x10 ³	A _{neto}
1	1'0	3'98 (-0'5)	3'5	3'5 (+ 1)	0'6775
2	2'0	7'96 (+0'5)	3'5	3'5 (+ 1)	0'6490
8	0'5	1'99 (-1)	9'5	9'5 (+ 5)	0'7425
9	1'0	3'98 (-0'5)	15'5	15'5 (+ 9)	0'7505
10	1'5	5'97 (0)	9'5	9'5 (+ 5)	0'7797
11	2'0	7'96 (+0'5)	15'5	15'5 (+ 9)	0'7594
12	2'5	9'95 (+ 1)	9'5	9'5 (+ 5)	0'7475

Tabla IV.20. Valores de las absorbancias predichas por el diseño II.

Nº	A _{neto} predicha	Nº	A _{neto} predicha
1	0'674	10	0'782
2	0'653	11	0'769
8	0'748	12	0'745
9	0'751	---	-----

* Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

Para tal fin, se procedió al análisis gráfico de los residuales. La observación de las figuras correspondientes nos han mostrado que se cumplían las condiciones de normalidad, homoscedasticidad e independencia necesarias para el cumplimiento del modelo.

Nuevamente se ha encontrado una buena concordancia entre los valores de la señal neta experimental y aquellos correspondientes a la señal neta predicha por el modelo (tablas IV.19 y IV.20), $r^2 = 0'9952$.

* Análisis de la varianza (ANOVA)

Mediante la observación de la tabla del análisis de la varianza, tabla IV.21, se puede deducir que ni los efectos lineales, ni los cuadráticos correspondientes a las concentraciones de KI y PAR son significativos. El único término cruzado que relaciona las concentraciones de KI y PAR tampoco es significativo y por tanto no existe interacción entre dichas variables.

Tabla IV.21. Análisis de la varianza.

Efecto	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P (%)
A: PAR	0'00000768	1	0'00000768	0'08	83'09
B: KI	0'00840889	1	0'00840889	83'37	6'85
AB	0'00034969	1	0'00034969	3'47	30'92
AA	0'00080273	1	0'00080273	7'96	21'38
BB	0'00454484	1	0'00454484	45'06	9'29
Error total	0'00010086	1	0'00010086		
Total (corr.)	0'01353228	6			

A partir de los valores de la señal neta (tabla IV.19), se obtuvo la nueva función polinómica correspondiente:

$$A_{\text{neta}} = 0'5206 + 0'0183[\text{PAR}] + 0'0356[\text{KI}] + 0'0008[\text{PAR}][\text{KI}] - 0'0022[\text{PAR}]^2 - 0'0017[\text{KI}]^2. \quad (2)$$

que relaciona la absorbancia neta con las concentraciones molares de PAR (multiplicada por 10^6) y de KI (multiplicada por 10^3). La representación gráfica de la ecuación 2, que muestra la superficie de respuesta de este diseño, se recoge en la figura IV.14.

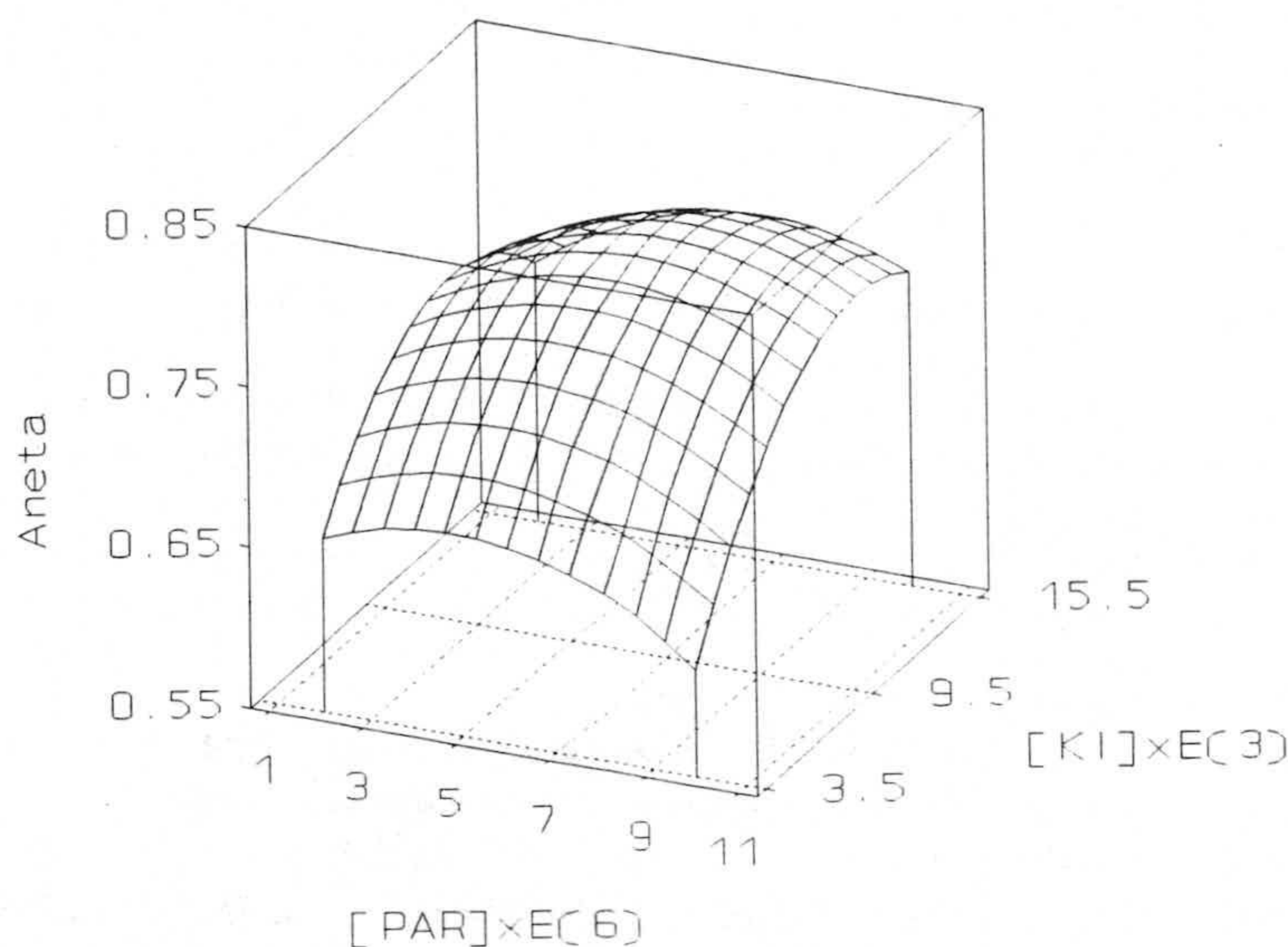


Figura IV.14. Superficie de respuesta correspondiente al diseño II.

* Cálculo del óptimo

Al aplicar el criterio de Lagrange tenemos: por una parte, el determinante hesiano $H(\text{PAR}, \text{KI}) = 0'00001 > 0$ y por otra, $\partial^2 A / \partial [\text{KI}]^2 = -0'0034$ y $\partial^2 A / \partial [\text{PAR}]^2 = -0'0044$,

ambos < 0 . Esto indica la presencia del máximo buscado, tal y como se observa en la figura IV.14, que corresponde a las concentraciones $6'34 \times 10^{-6}$ M en PAR y $11'97 \times 10^{-3}$ M en KI.

2.2.3.- Diseño III

Puesto que el diseño II utilizado cubre una amplia zona experimental, lo que podría implicar un posible error en el cálculo del máximo, realizamos un tercer diseño más estrecho, aprovechando los tres puntos intermedios del diseño II y acotando más el óptimo (figura IV.15), con objeto de confirmar las concentraciones óptimas calculadas.

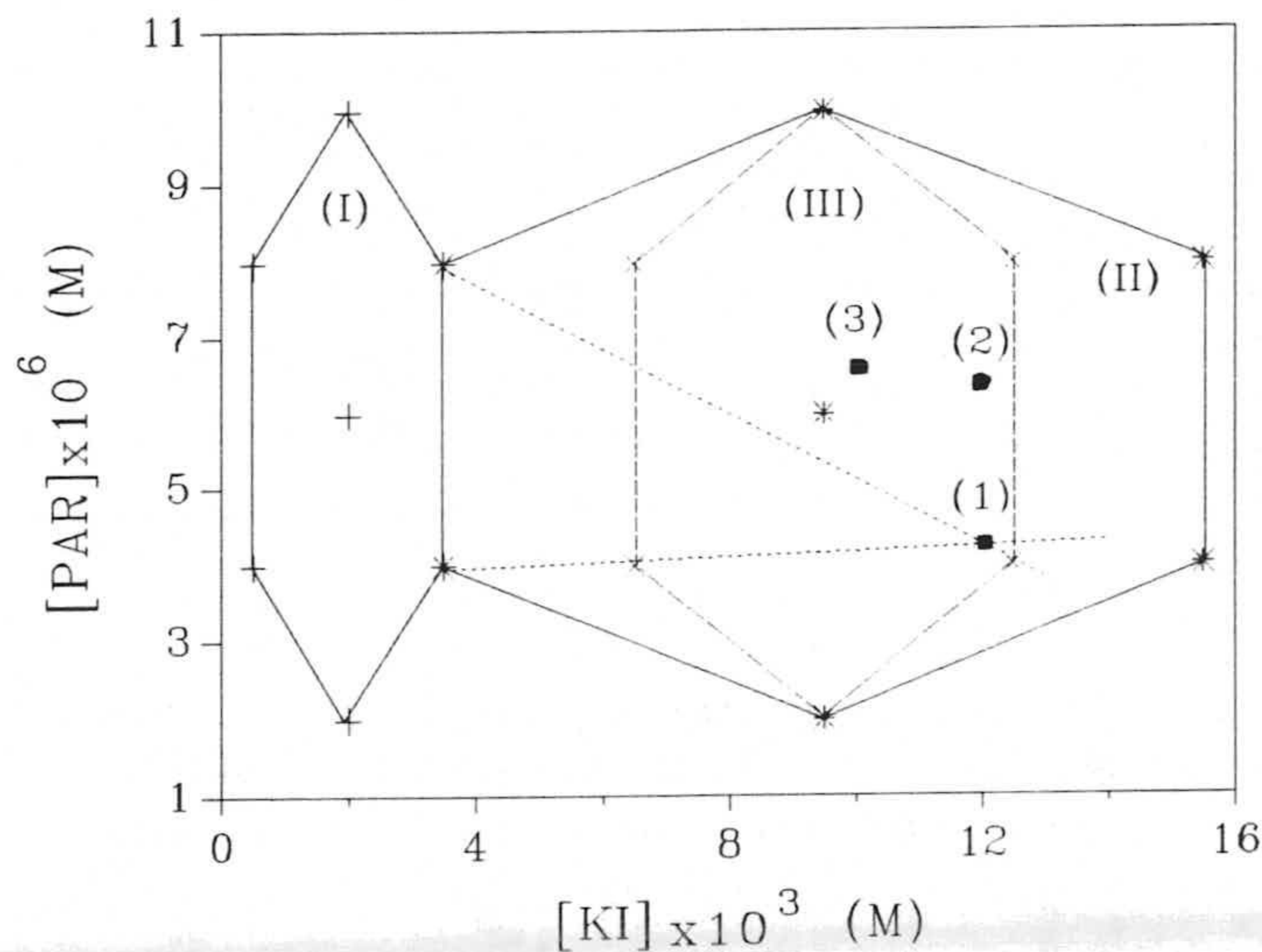


Figura IV.15. Representación conjunta de los diseños I, II y III. (1): óptimo estimado en el diseño I; (2) y (3): máximos obtenidos con los diseños II y III respectivamente.

El procedimiento es el mismo que en apartados anteriores. Los volúmenes de PAR y KI añadidos, así como los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.22. Las absorbancias netas predichas se muestran en la tabla IV.23.

Tabla IV.22. Variables y resultados correspondientes al diseño III.

Nº	V _{PAR} (mL)	[PAR]x10 ⁶	V _{KI} (mL)	[KI]x10 ³	A _{neto}
8	0'5	1'99 (-1)	9'5	9'5 (+5)	0'7425
10	1'5	5'97 (0)	9'5	9'5 (+5)	0'7797
12	2'5	9'95 (+1)	9'5	9'5 (+5)	0'7475
13	1'0	3'98 (-0'5)	12'5	12'5 (+7)	0'7332
14	1'0	3'98 (-0'5)	6'5	6'5 (+3)	0'6980
15	2'0	7'96 (+0'5)	12'5	12'5 (+7)	0'7634
16	2'0	7'96 (+0'5)	6'5	6'5 (+3)	0'7322

Los puntos 8, 10 y 12 corresponden al diseño II.

Tabla IV.23. Valores de las absorbancias predichas por el diseño III.

Nº	A _{neto} predicha	Nº	A _{neto} predicha
8	0'730	14	0'706
10	0'775	15	0'746
12	0'751	16	0'719
13	0'737	--	-----

* Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

Para verificar la adecuación del modelo matemático, se procedió al análisis gráfico de los residuales. Se pudo observar que se dan las condiciones de normalidad, homoscedasticidad e independencia necesarias para el cumplimiento del modelo.

Se observa como una menor concordancia entre los valores de la señal neta experimental (tabla IV.22) y aquellos correspondientes a la señal neta predicha (tabla IV.23), $r^2 = 0'9264$.

* Análisis de la varianza

Mediante la observación de la tabla IV.24, se puede deducir que ni los efectos lineales, ni los cuadráticos correspondientes a las concentraciones de KI y PAR son significativos. El único término cruzado que relaciona las concentraciones de KI y PAR, no es significativo y por tanto no existe interacción entre dichas variables.

Tabla IV.24. Análisis de la varianza.

Efecto	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P (%)
A: PAR	0'00046128	1	0'00046128	0'78	54'61
B: KI	0'00110224	1	0'00110224	1'87	39'54
AB	0'00000400	1	0'00000400	0'01	94'83
AA	0'00080273	1	0'00080273	1'37	44'34
BB	0'00183284	1	0'00183284	3'12	32'33
Error total	0'00058806	1	0'00058806		
Total (corr.)	0'00401834	6			

A partir de los valores de la señal neta (tabla IV.22), se obtuvo la nueva función polinómica:

$$A_{\text{neta}} = 0'2266 + 0'0309[\text{PAR}] + 0'0896[\text{KI}] - 0'0002[\text{PAR}][\text{KI}] - 0'0022[\text{PAR}]^2 - 0'0044[\text{KI}]^2. \quad (3)$$

que recoge la relación existente entre la señal neta experimental con las concentraciones molares de PAR y KI (multiplicadas respectivamente por 10^6 y 10^3). Dicha ecuación, se representa en la figura IV.16 que muestra la superficie de respuesta correspondiente a este diseño III.

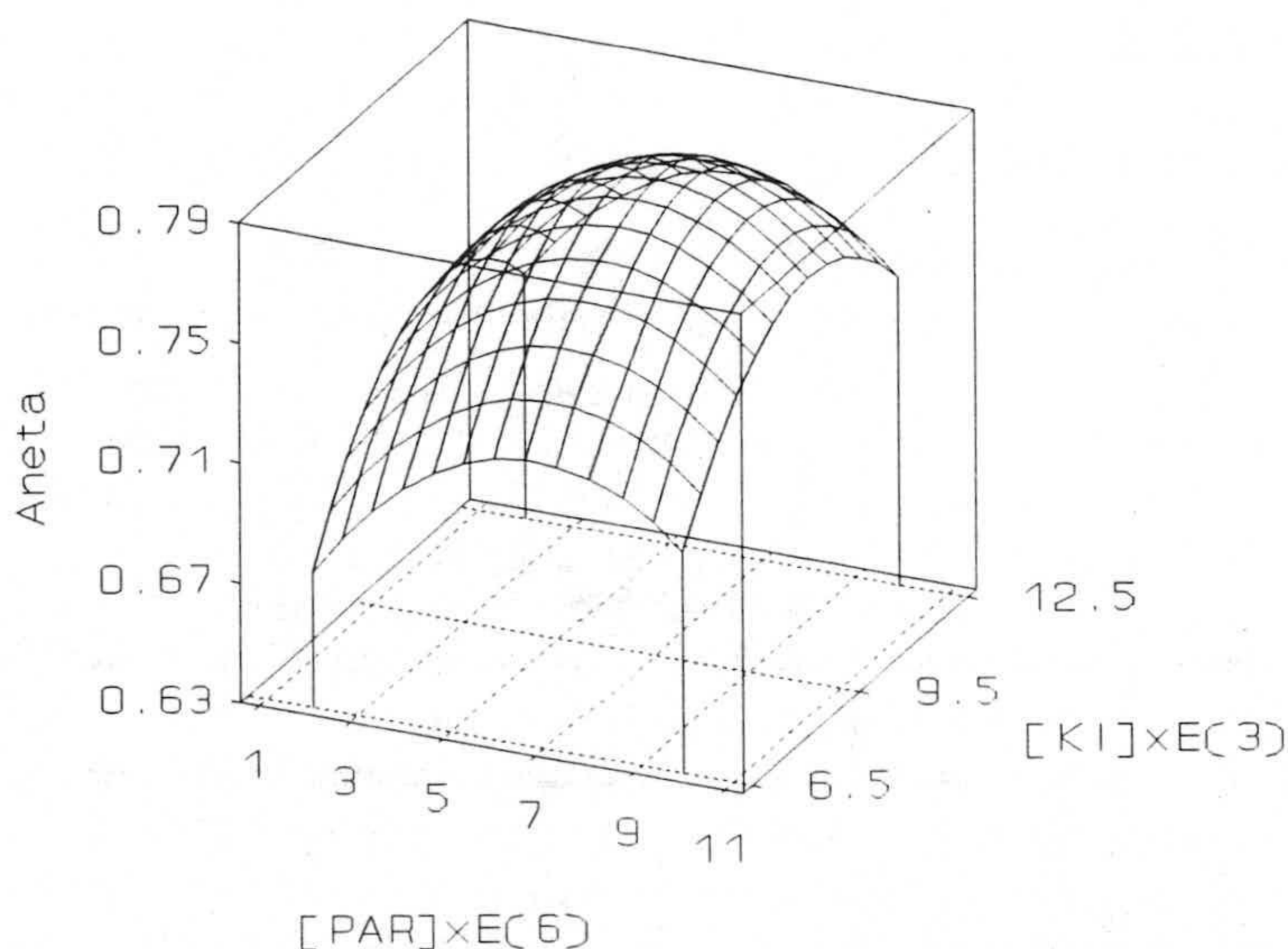


Figura IV.16. Superficie de respuesta correspondiente al diseño III.

* Cálculo del óptimo

Podemos observar como las respuestas obtenidas apenas varían en el dominio experimental, lo cual indica que la región explorada corresponde a una zona de "meseta"

(plano de equirespuesta), lo que nos confirma que el óptimo inicialmente calculado a partir del diseño II es representativo del sistema. En este caso, se podría discutir el uso de una función respuesta del tipo de las ecuaciones de segundo orden respecto al PAR y KI, ya que la absorbancia es prácticamente independiente de sus concentraciones en esta última región ensayada.

Los valores óptimos de la concentración de PAR y KI, obtenidos a partir de este diseño III, son $6'57 \times 10^{-6}$ M y $10'03 \times 10^{-3}$ M respectivamente.

*** Variación de la concentración de PAR a [KI] = cte**

La influencia de la concentración de PAR a una concentración fija de KI, se obtiene reemplazando en la ecuación 3 la concentración de KI por dicho valor. La ecuación resultante es solamente función de la concentración de PAR para $[KI] = 10^{-2}$ M:

$$A_{\text{neta}} = 0'6826 + 0'0289[\text{PAR}] - 0'0022[\text{PAR}]^2$$

que relaciona la señal neta con la concentración molar de PAR (multiplicada por 10^6).

En la tabla IV.25, se recogen los valores predichos de absorbancia neta al reemplazar en la ecuación anterior la concentración de PAR por distintos valores.

Dichos resultados se representan en la figura IV.17, de la cual se deduce que hay una constancia en la absorbancia para el rango de concentraciones de PAR entre 5×10^{-6} y 8×10^{-6} M. Esto nos confirma la bondad de los valores de concentración de PAR obtenidos tanto por el diseño II como por el diseño III.

Tabla IV.25. Influencia de la concentración de PAR a $[KI] = 10^{-2} M$.

$[PAR] \times 10^6$	A_{neta} predicha	$[PAR] \times 10^6$	A_{neta} predicha
1'99	0'731	6'97	0'777
2'99	0'749	7'96	0'773
3'98	0'763	8'96	0'765
4'98	0'772	9'95	0'752
5'97	0'777	---	-----

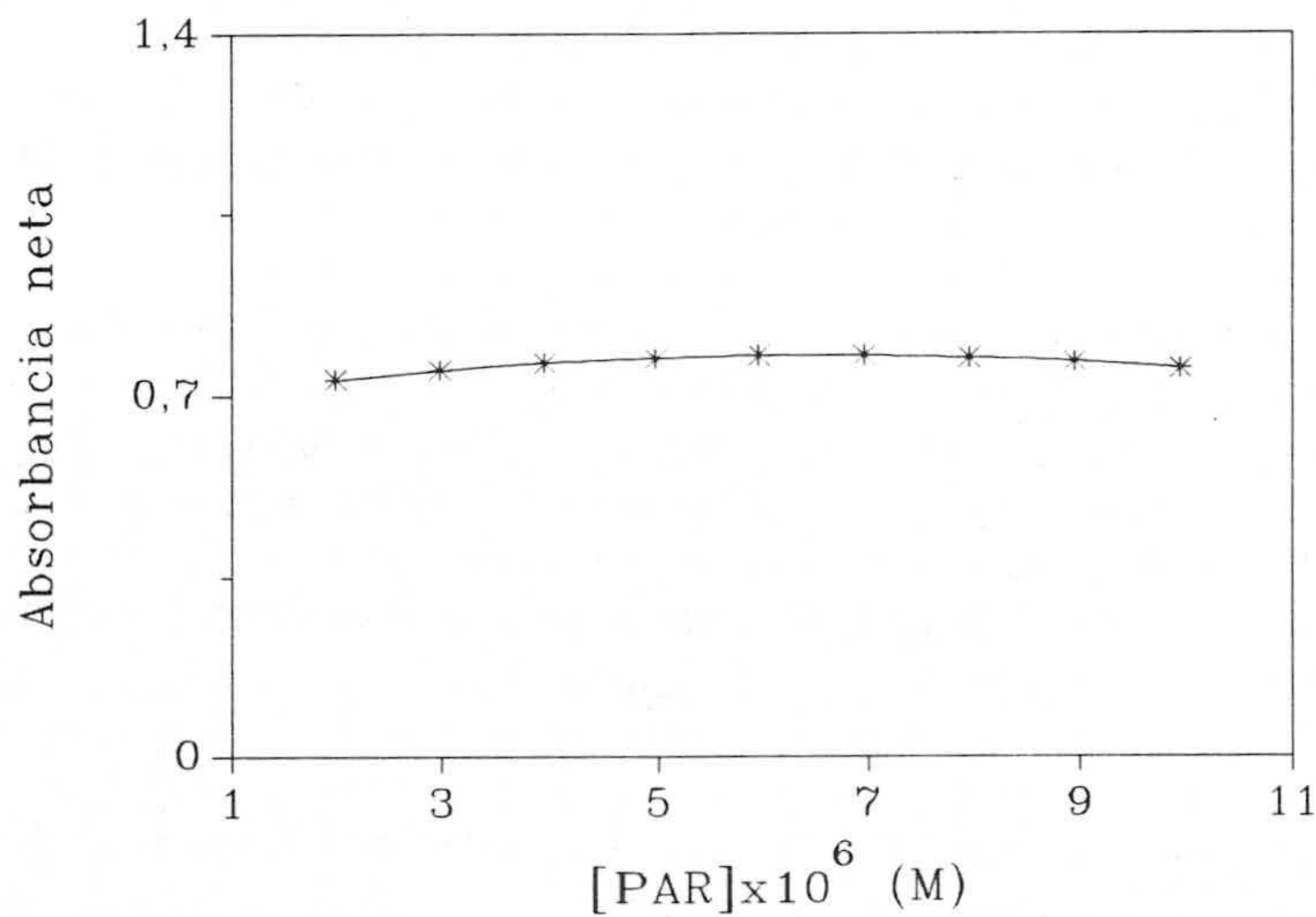


Figura IV.17. Variación de la señal con la concentración de PAR a $[KI] = cte$.

* Variación de la concentración de KI a $[PAR] = cte$

De forma similar, se obtiene la influencia de la concentración de KI a una concentración constante de PAR, reemplazando en la ecuación 3 la concentración de

PAR por $6'57 \times 10^{-6}$ M. La ecuación resultante sería:

$$A_{\text{neta}} = 0'3347 + 0'0883[\text{KI}] - 0'0044[\text{KI}]^2$$

que relaciona la señal neta con la concentración molar de KI (multiplicada por 10^3).

En la tabla IV.26, se recogen los resultados obtenidos de absorbancia neta predicha al reemplazar en la ecuación, la concentración de KI por distintos valores.

Tabla IV.26. Influencia de la concentración de KI a $[\text{PAR}] = 6'57 \times 10^{-6}$ M.

$[\text{KI}] \times 10^3$	A_{neta} predicha	$[\text{KI}] \times 10^3$	A_{neta} predicha
6'5	0'723	10'5	0'777
7'5	0'749	11'5	0'768
8'5	0'767	12'5	0'724
9'5	0'776	---	-----

Los datos de la tabla IV.26 se representan en la figura IV.18, a partir de la cual se deduce que en el rango de concentraciones comprendido entre $8'5 \times 10^{-3}$ y $11'5 \times 10^{-3}$ M existe una constancia en la absorbancia. Esto pone de manifiesto la validez de las concentraciones de KI obtenidas por los diseños II y III.

Por tanto, las concentraciones de PAR y KI a elegir según los diseños de Doehlert serían entre 5×10^{-6} y 8×10^{-6} M y entre 9×10^{-3} y 11×10^{-3} M, respectivamente.

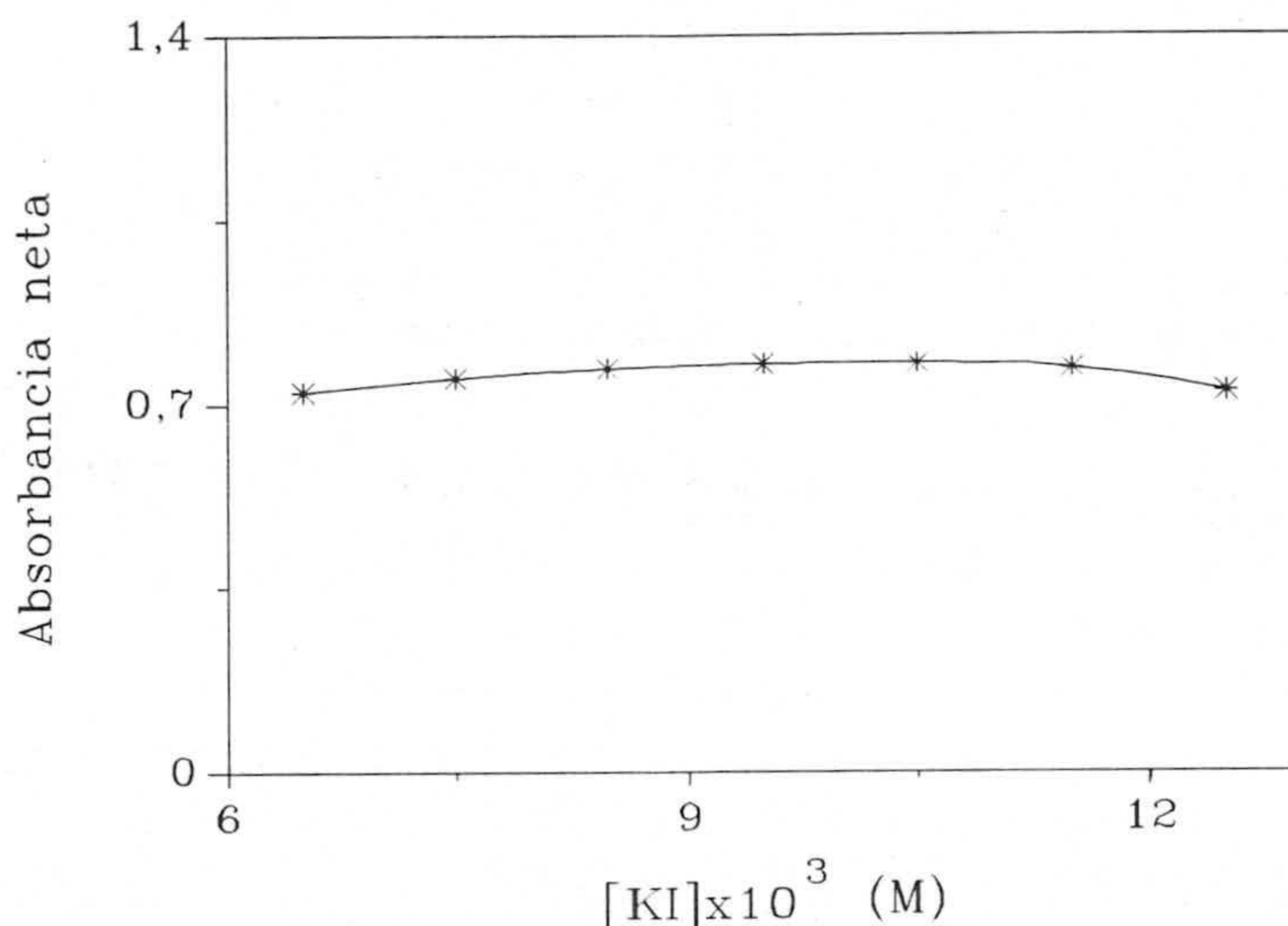


Figura IV.18. Variación de la señal con la concentración de KI a [PAR] = cte.

2.3.- Influencia de la concentración de KI sobre la repetibilidad y el calibrado

La utilización de KI como reactivo secundario, con el fin de aumentar tanto la sensibilidad en la determinación del complejo Zn(II)-PAR como la selectividad frente al Cd(II), parece que provoca una cierta variabilidad en los resultados, sobre todo, a concentraciones elevadas de KI. Por ello, se creyó conveniente llevar a cabo un estudio sistemático de la influencia del KI sobre la repetibilidad de los datos para diferentes concentraciones de analito.

2.3.1.- Influencia de la concentración de KI sobre la repetibilidad

Con objeto de llevar a cabo dicho estudio, se operó sobre 15 ppb de Zn(II), con una concentración $7,84 \times 10^{-6}$ M de PAR, a pH = 8,7 y a tres concentraciones de KI: 5×10^{-4} , 2×10^{-3} y 10^{-2} M, siendo esta última la concentración óptima obtenida tanto por los diseños Doehlert como por la metodología tradicional. Se prepararon 5 réplicas para

cada concentración de KI, junto con sus respectivos blancos.

Las absorbancias medias, así como sus correspondientes valores de desviación estándar relativa, se recogen en la tabla IV.27. A partir de dicha tabla, se puede observar que la concentración de KI 2×10^{-3} M, produce la menor variabilidad en los datos.

Tabla IV.27. Repetibilidad a tres concentraciones de KI.

[KI] (M)	A_b DER (%)	A DER (%)	A_{neta} DER (%)
5×10^{-4}	0'4564 4'0	0'8340 4'6	0'3776 9'7
2×10^{-3}	0'3946 4'5	0'7705 2'6	0'3760 4'2
10^{-2}	0'3807 8'9	0'9146 5'7	0'5298 7'7

2.3.2.- Influencia de la concentración de KI sobre el calibrado

Con el objetivo de ver el efecto del KI sobre el calibrado, se preparó una experiencia en la que se midieron las absorbancias correspondientes a tres réplicas de distintos niveles de concentración de cinc desde el valor "cero" (blanco) hasta 20 ppb, para dos concentraciones de KI: 2×10^{-3} y 10^{-2} M.

Para ello, se prepararon matraces de 100 mL, en los cuales se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de Zn(II) de 1 ppm, 2 mL de disolución de PAR $3'92 \times 10^{-4}$ M, 2 ó 10 mL de disolución de KI 0'1 M y 10 mL de disolución reguladora 0'2 M de pH= 8'7. Tras aplicar el procedimiento operatorio previamente descrito, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla IV.28.

Tabla IV.28. Influencia de la concentración de KI sobre el calibrado.

C _{Zn} (ppb)	A					
	2x10 ⁻³ M			10 ⁻² M		
0	0'421	0'494	0'498	0'510	0'459	0'437
5	0'610	0'674	0'638	0'590	0'537	0'610
10	0'728	0'788	0'798	0'752	0'770	0'798
20	0'912	0'988	1'063	1'019	1'022	1'168

El análisis de la varianza de los datos de la tabla IV.28, muestran que los tests de curvatura (fallo de ajuste) no son significativos, puesto que P = 41 y 54% para 2x10⁻³ y 10⁻² M en KI respectivamente.

Las ecuaciones de las dos rectas de calibrado, deducidas de la regresión por mínimos cuadrados, son:

$$A = 0'4956 + 0'0254C_{Zn} \quad \text{y} \quad A = 0'4535 + 0'0308C_{Zn}$$

para 2x10⁻³ y 10⁻² M en KI respectivamente. En la tabla IV.29, se indican los principales parámetros estadísticos de dichas ecuaciones.

En la tabla IV.30, se resume la influencia de las concentraciones de KI (2x10⁻³ y 10⁻² M), sobre el calibrado y la repetibilidad, usando el modelo estadístico propuesto por Cuadros Rodriguez y col. [13]. A partir de dicha tabla, se puede deducir que al aumentar la concentración de KI, aumenta algo la sensibilidad pero también la DER (%) de los datos. Por consiguiente, elegimos la concentración 2x10⁻³ M como adecuada con la que tendremos menor variabilidad en los datos sin una pérdida apreciable de sensibilidad.

Tabla IV.29. Parámetros estadísticos.

Parámetro	[KI]	
	2×10^{-3} M	10^{-2} M
n	12	12
m	3	3
$S_{R,C}$	0'0510	0'0498
a	0'4956	0'4535
S_a	0'0224	0'0223
b	0'0254	0'0308
S_b	0'0020	0'0019
r^2 (%)	94'40	96'16

Tabla IV.30. Influencia de la concentración de KI sobre los parámetros de fiabilidad y sobre la repetibilidad.

	[KI]	
	2×10^{-3} M	10^{-2} M
Parámetros de fiabilidad		
Linealidad "on-line" (%)	92'1	93'8
Sensibilidad analítica (ppb)	2'0	1'6
Sensibilidad de calibrado (señal/(ppb))	0'025	0'031
Límite de detección (ppb)	4'4	3'5
Límite de determinación (ppb)	14'8	11'7
Repetibilidad		
	DER(%)	
Señal de blanco	4'5	8'6
Señal de analito	2'6	5'7
Señal neta	4'2	7'7

2.4.- Valoración de las optimizaciones

La optimización de PAR y KI por la metodología de los diseños de Doehlert, nos ha ofrecido la posibilidad de hacer pocas experiencias en un tiempo corto, así como de obtener la superficie de respuesta y de predecir a partir de las ecuaciones, la absorbancia en función de los valores de la concentración de una variable manteniendo constante el valor de la otra.

Puesto que hubo una buena concordancia entre los valores óptimos estimados, para ambas concentraciones de PAR y KI, por el método tradicional y por la metodología de los diseños, debido probablemente a que en ningún momento el término cruzado fuera significativo, se decidió llevar a cabo para posteriores experiencias la optimización de las concentraciones de dichas variables por la metodología de los diseños.

2.5.- Resumen de las variables optimizadas

Los valores seleccionados en el estudio de las variables que afectan al sistema Zn(II)-PAR en presencia de KI se resumen en la tabla IV.31.

Tabla IV.31. Resumen de las variables optimizadas para un volumen de 100 mL.

Variable	Valor óptimo
[PAR]	$7'8 \times 10^{-6}$ M
[KI]	2×10^{-3} M
[Tampón], pH	2×10^{-2} M, 8'7
Orden de adición	Zn(II)-PAR-KI-T
Cantidad de soporte	0'080 g
Tiempo de agitación	10 min.
$\lambda_{\text{medida}}/\lambda_{\text{empaquetamiento}}$	500/750 nm
Estabilidad	15 min.

3.- ESTABLECIMIENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

3.1.- Método para 100 ml

3.1.1.- Calibrado del método. Parámetros de fiabilidad

Una vez optimizadas todas las variables que pueden afectar el sistema y para poder establecer la relación lineal entre la absorbancia y la concentración de cinc, se procedió preparando una serie de matraces de 100 mL, en los cuales se introdujeron cantidades variables y crecientes de disolución de Zn(II) de 500 ppb, 2 mL de disolución de PAR $3'92 \times 10^{-4}$ M, 2 mL de disolución de KI 0'1 M, 10 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M de pH = 8'7, completando finalmente con agua de ósmosis inversa hasta un volumen de 100 mL.

Tras aplicar el procedimiento operatorio habitual, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla IV.32 y figura IV.19.

Tabla IV.32. Calibrado del método.

C_{Zn} (ppb)	A	C_{Zn} (ppb)	A
0	0'4744	60	1'8388
10	0'7107	70	2'0498
20	0'9217	80	2'1736
30	1'1879	100	2'5270
40	1'4225	120	2'7508
50	1'6294	150	2'8850

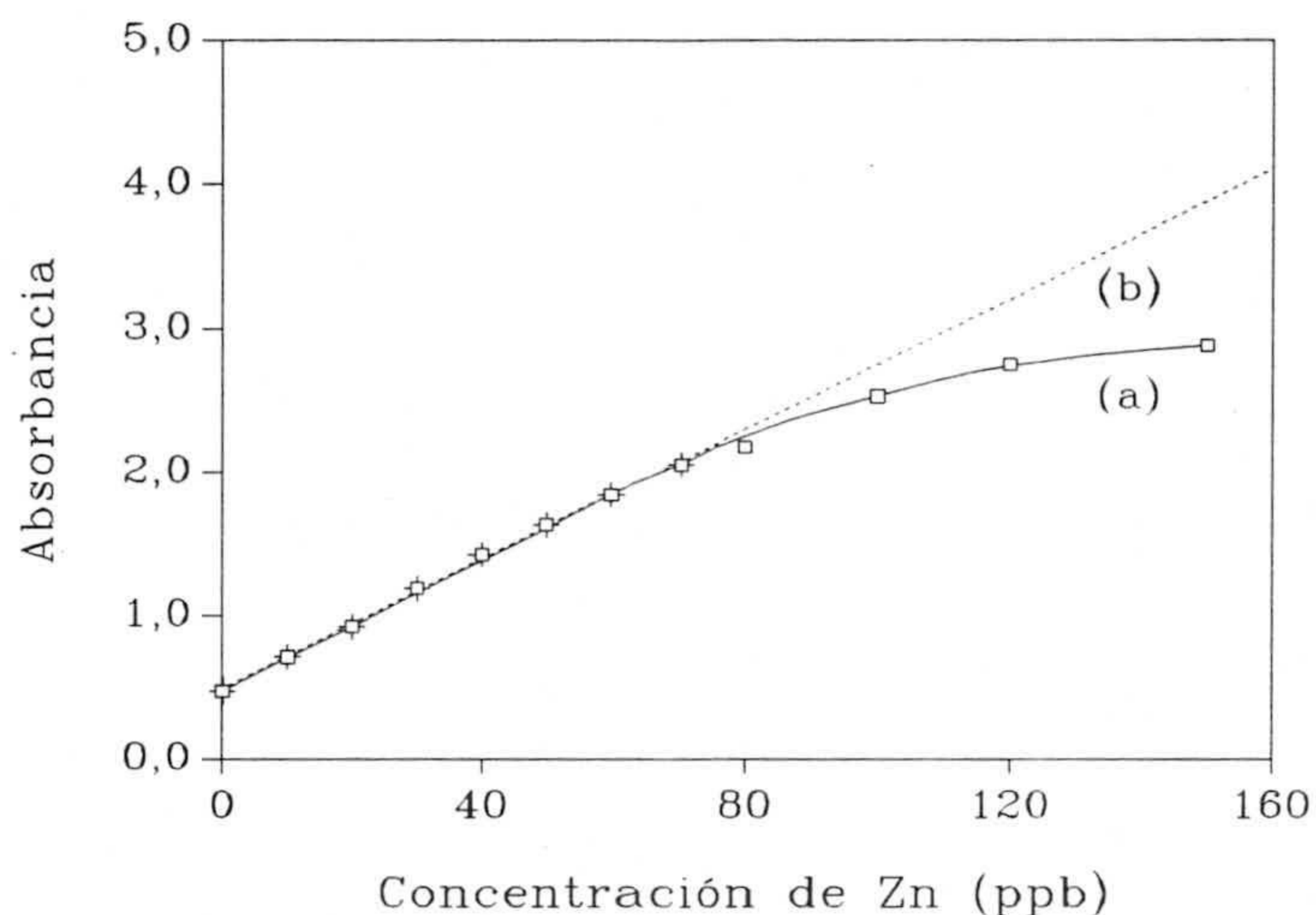


Figura IV.19. Calibrado del sistema Zn-PAR en presencia de KI. (a), curva de calibrado con todos los datos; (b); recta de calibrado correspondiente a 0-70 ppb.

Para determinar el límite superior del método, se usará tanto el coeficiente de variación de los factores de respuesta [14], como la regresión por mínima mediana de cuadrados (LMS), ya que no es posible utilizar el test de curvatura (fallo de ajuste) al no realizarse réplicas de los puntos experimentales.

Los resultados obtenidos, utilizando el coeficiente de variación de los factores de respuesta, se recogen en la tabla IV.33. A partir de la cual se considera que el límite superior del método corresponde a la concentración de cinc de 70 ppb, ya que el valor de la desviación estándar relativa de los factores de respuesta se mantiene constante (alrededor de 2'6 %). A su vez, los factores de respuesta encontrados presentan un valor muy próximo al de la pendiente de la recta de calibrado.

La aplicación de la regresión por mínima mediana de cuadrados (LMS), llevada a cabo, con el programa "**PROGRESS**", sobre todos los datos de la tabla IV.32, nos indicó la existencia de cuatro puntos que no se alinean con los demás. Dichos puntos corresponden a las concentraciones de 80, 100, 120 y 150 ppb. El primer punto es un

Tabla IV.33. Coeficiente de variación de los factores de respuesta.

C_{Zn} (ppb)	A_{neta}	$f.r$	$\overline{f.r}$	DER (%)
10	0'2363	0'0236	-----	----
20	0'4473	0'0224	-----	----
30	0'7135	0'0238	-----	----
40	0'9481	0'0237	0'0234	2'8
50	1'1550	0'0231	0'0233	2'5
60	1'3644	0'0227	0'0232	2'5
70	1'5754	0'0225	0'0231	2'6
80	1'6992	0'0212	0'0229	3'8
100	2'0526	0'0205	0'0226	5'0
120	2'2764	0'0190	0'0223	7'0
150	2'4106	0'0161	0'0217	11'0

"outlier" puesto que su RS (residuo estandarizado) es superior a 2'5 (en valor absoluto), mientras que los tres últimos son considerados "outlier-leverage" ya que los dos índices, tanto RS como RD (resistencia a la regresión), sobrepasan el umbral 2'5.

Por tanto el límite superior corresponde a la concentración de cinc de 70 ppb, conclusión que está en buen acuerdo con aquella obtenida utilizando el coeficiente de variación de los factores de respuesta.

La ecuación de la recta de calibrado (recta (b) de la figura IV.19), deducida de la regresión por mínimos cuadrados, es:

$$A = 0'4867 + 0'0227C_{Zn}$$

En la tabla IV.34, se indican los principales parámetros estadísticos de dicha ecuación.

Tabla IV.34. Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	8
m	1
$s_{R,C}$	0'0204
a	0'4867
s_a	0'0132
b	0'0227
s_b	0'0003
r^2 (%)	99'88

Repetibilidad

Se obtuvo midiendo, en el mismo día, la absorbancia de disoluciones a concentración "cero" (blanco) y a 25 ppb de cinc y a las cuales se les aplicó el procedimiento habitual. Los valores medios de las señales así como la desviación estándar de los mismos se muestran en la tabla IV.35.

Reproducibilidad

Mediante el estudio de la medida, en distintos días, de la absorbancia de disoluciones a las mismas concentraciones que en el apartado anterior y siguiendo el procedimiento habitual, se obtuvieron los valores medios de las señales así como la desviación estándar de los mismos (tabla IV.36).

Tabla IV.35. Repetibilidad del método de 100 mL.

	Blanco	Neta
C_{Zn} (ppb)	0	25
n	11	10
\bar{A}	0'443	0'526
s_{n-1}	0'0188	0'0224

C_{Zn} : concentración de cinc a la cual se llevó el estudio; n: número de determinaciones.

Tabla IV.36. Reproducibilidad del método de 100 mL.

	Blanco	Neta
C_{Zn} (ppb)	0	25
n	30	30
\bar{A}	0'472	0'534
s_{n-1}	0'0203	0'0267

C_{Zn} : concentración de cinc a la cual se llevó el estudio; n: número de determinaciones.

Parámetros de fiabilidad

El cálculo de éstos parámetros se ha llevado a cabo, tal y como se recoge en el Capítulo II, utilizando los protocolos de la IUPAC [15] y de Cuadros Rodríguez y col. [13]. Los parámetros calculados se recogen en la tabla IV.37. A partir de dicha tabla, se observa que tanto los límites de detección como de cuantificación calculados con el protocolo de la IUPAC son inferiores a aquellos obtenidos utilizando los datos de calibrado debido a que el primero en realidad, calcula la desviación estándar de la concentración correspondiente al blanco y no toma en consideración la imprecisión sobre el valor de la pendiente.

Tabla IV.37. Parámetros de fiabilidad.

Parámetro	Valor
- Linealidad	
"on-line" (%)	98'68
- Sensibilidad	
IUPAC (unidad de abs./ppb)	0'0227
analítica (b/s _R) (ppb ⁻¹)	1'01
datos de calibrado (ppb)	0'90
- Límite de detección	
IUPAC (ppb)	2'48
datos de calibrado ⁽¹⁾ (ppb)	3'22
para $\alpha = \beta = 5\%$ ⁽²⁾ (ppb)	4'01
- Límite de cuantificación	
IUPAC (ppb)	8'28
datos de calibrado ⁽¹⁾ (ppb)	10'73
- Rango dinámico lineal, RDL ⁽³⁾	2'82
- Precisión	
Repetibilidad (% DER)	4'3
Reproducibilidad (% DER)	5'0

⁽¹⁾: calculados teniendo en cuenta que la desviación estándar a concentración "cero" es $s_{C_0} = 1'0726$; ⁽²⁾: para probabilidades de falsos positivo y negativo del 95% y teniendo en cuenta una determinación sobre la señal del blanco; ⁽³⁾: estimado a partir de los límites superior e inferior del intervalo de linealidad (70 y 2'48 ppb respectivamente).

Por otra parte, en dicha tabla se recoge la precisión expresada como desviación estándar relativa de la señal utilizando los datos de las tablas IV.35 y IV.36, llevada a cabo sobre una concentración de 25 ppb de cinc. Se deduce que la precisión encontrada en el estudio de reproducibilidad es menor que la obtenida en el de repetibilidad.

Se evaluó también la precisión del método propuesto a partir del modelo de regresión lineal, de acuerdo con el protocolo establecido en el capítulo II, representando la desviación estándar relativa de la concentración frente a ésta. Los valores de concentración y de DER(%) se representan gráficamente en la figura IV.20.

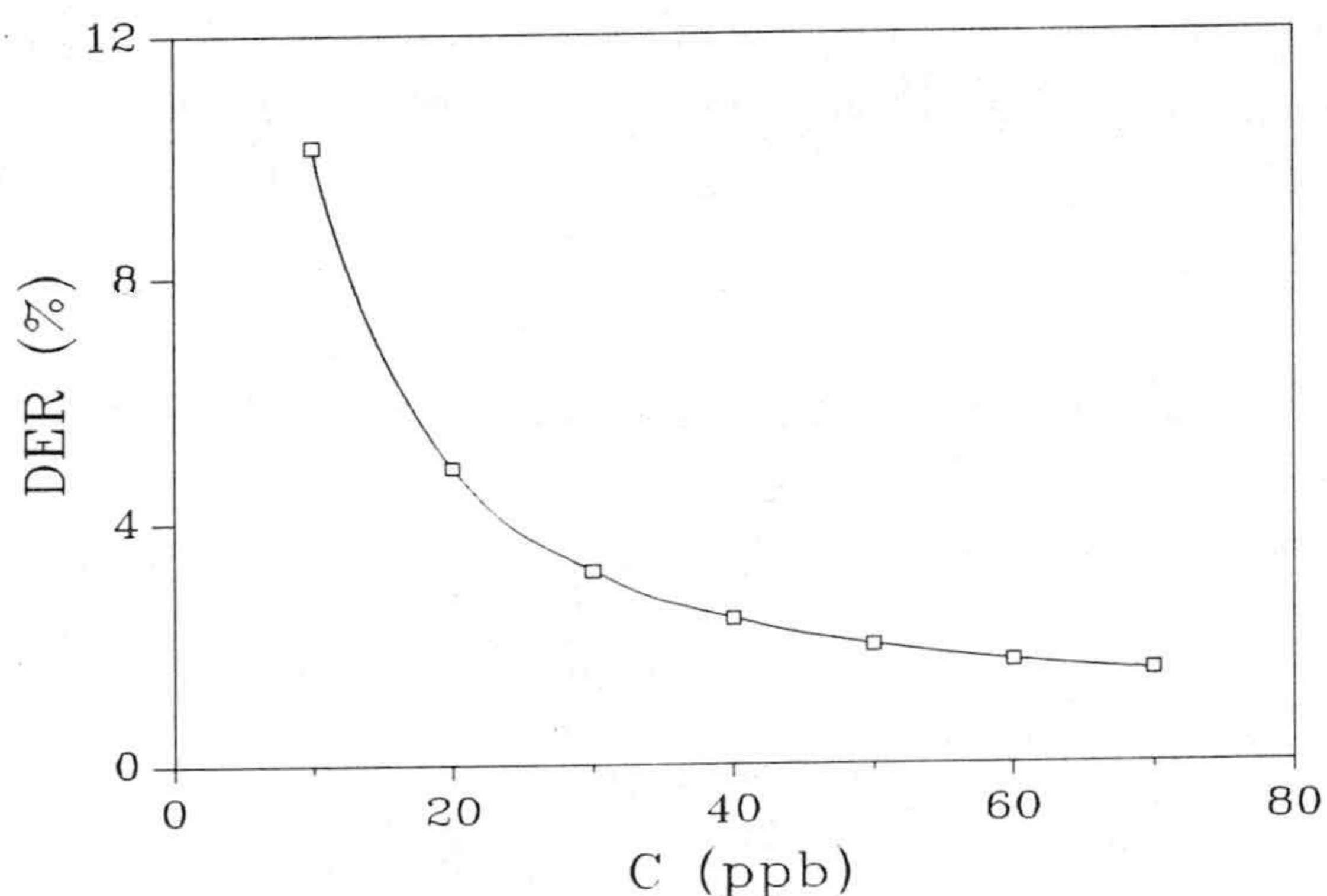


Figura IV.20. Variación de la DER (%) con la concentración de cinc.

A partir de dicha figura, podemos observar como la precisión de la medida disminuye al disminuir la concentración de analito. Esta gráfica nos puede servir para estimar la precisión de la determinación de cinc a cualquier valor de concentración dentro del intervalo ensayado.

3.1.2.- Procedimiento operatorio propuesto

En matraces de 100 mL se introducen, en este orden: el volumen de disolución de cinc necesario para que su concentración esté comprendida entre 8'3 y 70 ppb, 2 mL

de disolución de PAR $3'92 \times 10^{-4}$ M, 2 mL de disolución de KI 0'1 M, 10 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) de concentración 0'2 M y pH 8'7 y agua de ósmosis inversa hasta el envase. Se trasvasan las disoluciones así preparadas a frascos de polietileno de 1L de capacidad y se añaden 80 mg del soporte Sephadex QAE-A-25. Se equilibra en un agitador rotatorio durante 10 minutos. Se recoge la fase sólida, filtrando la disolución a través de un embudo, y se empaqueta en cubetas de vidrio óptico de 1-mm de paso de luz. Después de centrifugar las cubetas durante 30 segundos, se mide la absorbancia, frente a una cubeta con el soporte equilibrado en agua de ósmosis inversa, a las longitudes de onda 500 y 750 nm. El blanco se prepara en idénticas condiciones pero exento de Zn(II). Finalmente se obtiene la absorbancia neta como se ha descrito anteriormente.

Mediante interpolación de la absorbancia del complejo en la recta de calibrado, preparada en idénticas condiciones y con concentraciones de Zn(II) comprendidas entre 8'3 y 70 ppb, se deduce la concentración de cinc de la disolución problema.

3.2.- Método para 500 ml

3.2.1.- Optimización de PAR y KI utilizando los diseños de DOEHLERT

- Diseño I

La optimización de las concentraciones de PAR y KI se llevó a cabo sobre 10 ppb de Zn(II) utilizando un diseño de Doehlert cuyo nivel básico (0,0) se corresponde con las concentraciones 2×10^{-3} M de KI y $7'96 \times 10^{-6}$ M de PAR. Cada variación de una unidad en el valor codificado significa un cambio de $\pm 1'5 \times 10^{-3}$ M y $\pm 3'98 \times 10^{-6}$ M en las concentraciones de KI y PAR respectivamente (figura IV.21).

Tras aplicar el procedimiento previamente descrito, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla IV.38.

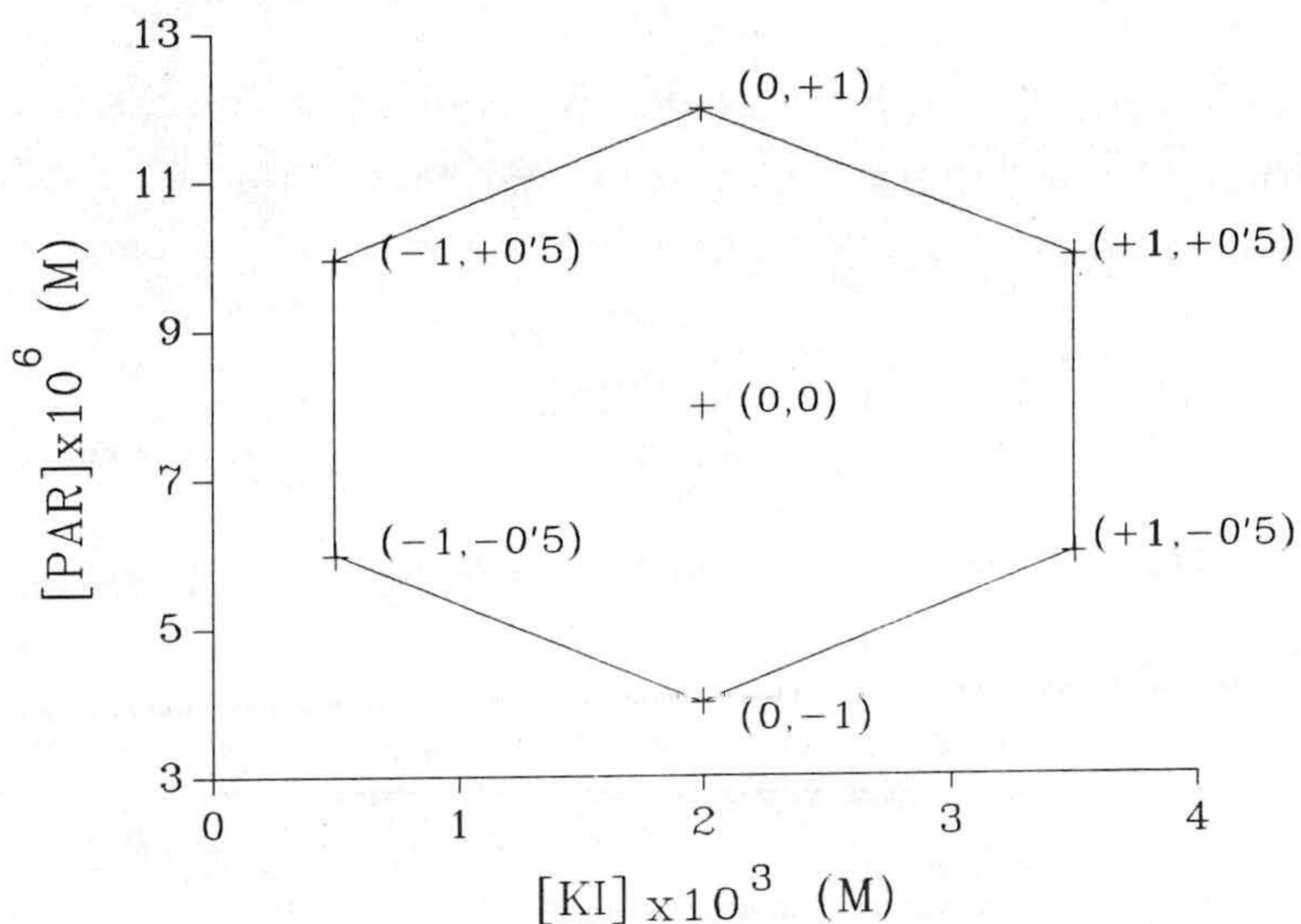


Figura IV.21. Diseño I. Entre paréntesis vienen los valores codificados.

Tabla IV.38. Variables y resultados correspondientes al diseño I.

Nº	V _{PAR} (mL)	[PAR]x10 ⁶	V _{KI} (mL)	[KI]x10 ³	A _{neta}
1	1'0	3'98 (-1)	2'0	2'0 (0)	1'1627
2	1'5	5'97 (-0'5)	3'5	3'5 (+1)	1'2417
3	1'5	5'97 (-0'5)	0'5	0'5 (-1)	0'6205
4	2'0	7'96 (0)	2'0	2'0 (0)	1'1105
5	2'5	9'95 (+0'5)	3'5	3'5 (+1)	1'0934
6	2'5	9'95 (+0'5)	0'5	0'5 (-1)	0'2869
7	3'0	11'94 (+1)	2'0	2'0 (0)	0'7833

* Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

Para tal fin, se procedió al análisis de las gráficas de los residuales, de las cuales se deduce que se dan las condiciones de normalidad, homoscedasticidad e independencia necesarias para el cumplimiento del modelo.

Se puede observar que existe una buena concordancia entre los valores de la señal neta predichos a partir del modelo y los obtenidos experimentalmente (tablas IV.38 y IV.39), $r^2 = 0'9988$.

Tabla IV.39. Valores de las absorbancias predichas por el diseño I.

Nº	A _{neta} predicha	Nº	A _{neta} predicha
1	1'180	5	1'109
2	1'224	6	0'303
3	0'603	7	0'764
4	1'110	---	-----

* Análisis de la varianza

Se puede observar en la tabla IV.40 que sólo existe un término significativo, aquel que corresponde a la concentración de KI. El único término cruzado que relaciona las concentraciones de KI y de PAR, no es significativo y por tanto no puede existir interacción entre dichas variables.

Tabla IV.40. Análisis de la varianza.

Efecto	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P (%)
A: PAR	0'12827804	1	0'12827804	73'26	7'30
B: KI	0'50958182	1	0'50958182	291'02	3'68
AB	0'00858402	1	0'00858402	4'90	26'62
AA	0'01262251	1	0'01262251	7'21	22'38
BB	0'08359121	1	0'08359121	47'74	9'03
Error total	0'00175104	1	0'00175104		
Total (corr.)	0'73515673	6			

A partir de los resultados experimentales, se obtuvo la función polinómica:

$$A_{\text{neta}} = 0'2728 + 0'0553[\text{PAR}] + 0'5866[\text{KI}] + 0'0155[\text{PAR}][\text{KI}] - 0'0087[\text{PAR}]^2 - 0'1180[\text{KI}]^2. \quad (1)$$

que relaciona la señal neta con las concentraciones molares de PAR y KI (multiplicadas por 10^6 y 10^3 respectivamente) y cuya representación gráfica, se recoge en la figura IV.22. En ella, se observa la presencia de un máximo, que como veremos a continuación, se confirma con la aplicación del criterio de Lagrange a la función cuadrática.

* Cálculo del óptimo

La aplicación del criterio de Lagrange sobre la función indica la presencia de un máximo puesto que: $H(\text{PAR}, \text{KI}) = 0'0039 > 0$ y tanto $\partial^2 A / \partial [\text{PAR}]^2 = -0'0174 < 0$ como $\partial^2 A / \partial [\text{KI}]^2 = -0'2360 < 0$. Este máximo está localizado en la posición $5'73 \times 10^{-6}$ M en PAR y $2'86 \times 10^{-3}$ M en KI. Como se puede comprobar, el óptimo está comprendido dentro del dominio experimental pero en un extremo de éste. Por ello se consideró adecuado realizar un segundo diseño con el fin de recomprobar los valores calculados.

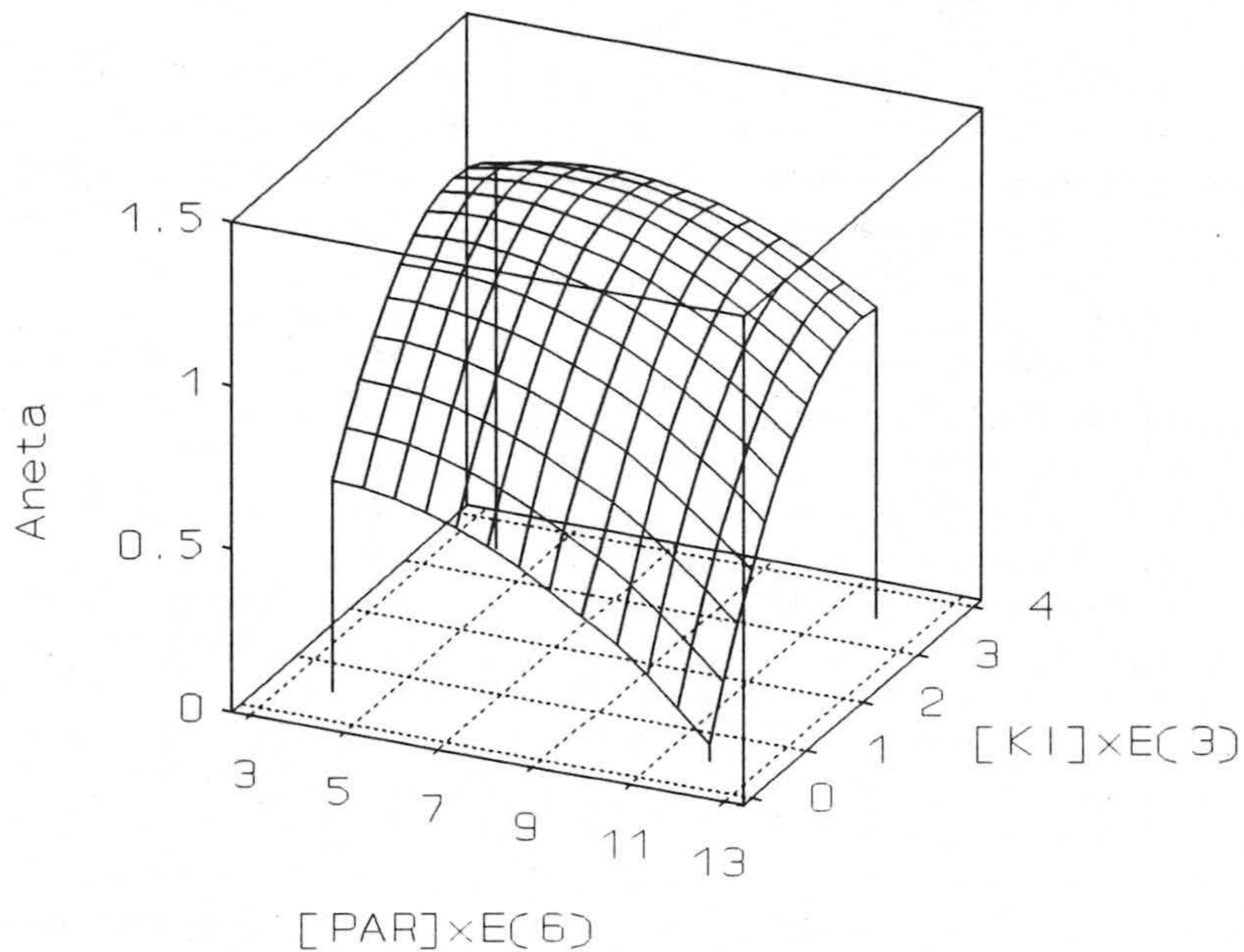


Figura IV.22. Superficie de respuesta correspondiente al diseño I.

- Diseño II

Está centrado sobre el óptimo calculado en el primer diseño y se aprovechan cuatro de los puntos experimentales de aquel (figura IV.23).

Se procedió de la misma manera que en el apartado anterior. Los volúmenes de PAR y KI añadidos así como los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.41 y las absorbancias netas predichas por el modelo en la tabla IV.42.

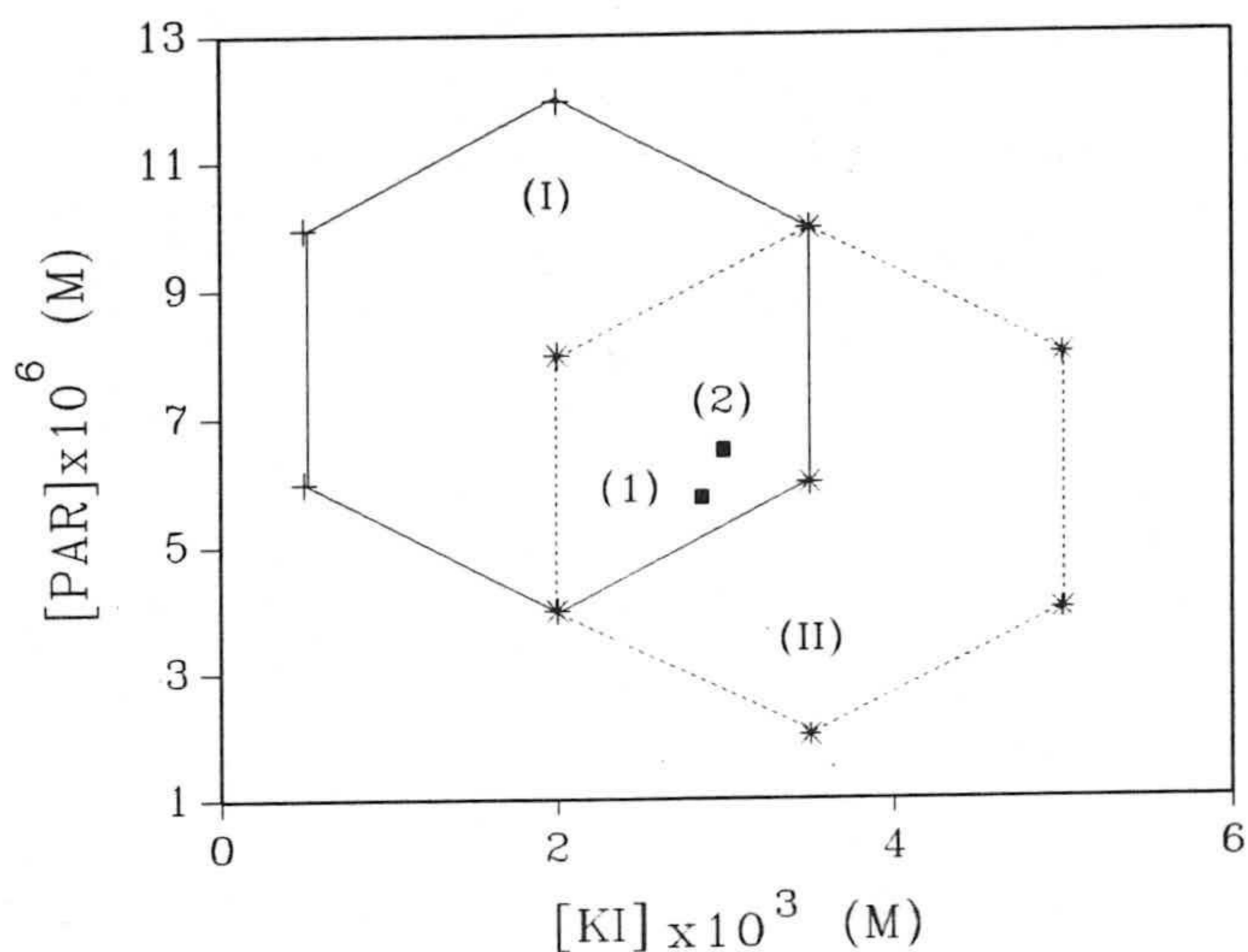


Figura IV.23. Representación conjunta de los diseños I y II. (1) y (2) máximos obtenidos a partir de los diseño I y II respectivamente.

Tabla IV.41. Variables y resultados correspondientes al diseño II.

Nº	V _{PAR} (mL)	[PAR]x10 ⁶	V _{KI} (mL)	[KI]x10 ³	A _{neta}
1	1'0	3'98 (-1)	2'0	2'0 (0)	1'1627
2	1'5	5'97 (-0'5)	3'5	3'5 (+1)	1'2417
4	2'0	7'96 (0)	2'0	2'0 (0)	1'1105
5	2'5	9'95 (+0'5)	3'5	3'5 (+1)	1'0934
8	0'5	1'99 (-1'5)	3'5	3'5 (+1)	0'8145
9	1'0	3'98 (-1)	5'0	5'0 (+2)	0'9953
10	2'0	7'96 (0)	5'0	5'0 (+2)	0'9753

Tabla IV.42. Valores de las absorbancias predichas por el diseño II.

Nº	A _{nete} predicha	Nº	A _{nete} predicha
1	1'104	8	0'872
2	1'240	9	0'935
4	1'167	10	1'031
5	1'031	---	-----

* Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

Para tal fin, se procedió al análisis de las gráficas de los residuales. De la observación de éstas, se deduce el cumplimiento de la normalidad, homoscedasticidad e independencia necesarias para la aplicación del modelo.

Por otra parte, existe una menor concordancia entre los valores de la señal neta predichos a partir del modelo y los obtenidos experimentalmente, $r^2 = 0'9100$, debido posiblemente a que en la zona del máximo, el ajuste de la función con una ecuación cuadrática puede ser insuficiente.

* Análisis de la varianza

Se puede observar, a partir de la tabla IV.43, que ni los efectos lineales ni los cuadráticos correspondientes a las concentraciones de PAR y KI son significativos. Asimismo, el término de interacción de las dos concentraciones tampoco es significativo.

A partir de las señales de la absorbancia neta experimental (tabla IV.41), se obtuvo la nueva función polinómica correspondiente:

Tabla IV.43. Análisis de la varianza.

Efecto	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P (%)
A: PAR	0'01965871	1	0'01965871	0'96	51'53
B: KI	0'02290682	1	0'02290682	1'12	47'45
AB	0'00025760	1	0'00025760	0'01	92'99
AA	0'05520004	1	0'05520004	2'69	34'35
BB	0'01402633	1	0'01402633	0'68	56'73
Error total	0'02053350	1	0'02053350		
Total (corr.)	0'11876821	6			

$$A_{\text{neta}} = 0'1133 + 0'2278[\text{PAR}] + 0'2720[\text{KI}] + 0'0027[\text{PAR}][\text{KI}] - 0'0182[\text{PAR}]^2 - 0'0484[\text{KI}]^2. \quad (2)$$

que recoge la relación entre dicha señal con las concentraciones molares de PAR y KI (multiplicadas, respectivamente por 10^6 y 10^3). En la figura IV.24, se representa gráficamente la superficie de respuesta de esta ecuación.

* Cálculo del óptimo

La aplicación del criterio de Lagrange sobre la función indica la presencia de un máximo puesto que: $H(\text{PAR}, \text{KI}) = 0'0035 > 0$ y tanto $\partial^2 A / \partial [\text{PAR}]^2 = -0'0364 < 0$ como $\partial^2 A / \partial [\text{KI}]^2 = -0'0968 < 0$, que está localizado en la posición $6'48 \times 10^{-6}$ M en PAR y $2'99 \times 10^{-3}$ M en KI. Como podemos observar, dicho máximo está muy próximo al encontrado a partir del diseño I.

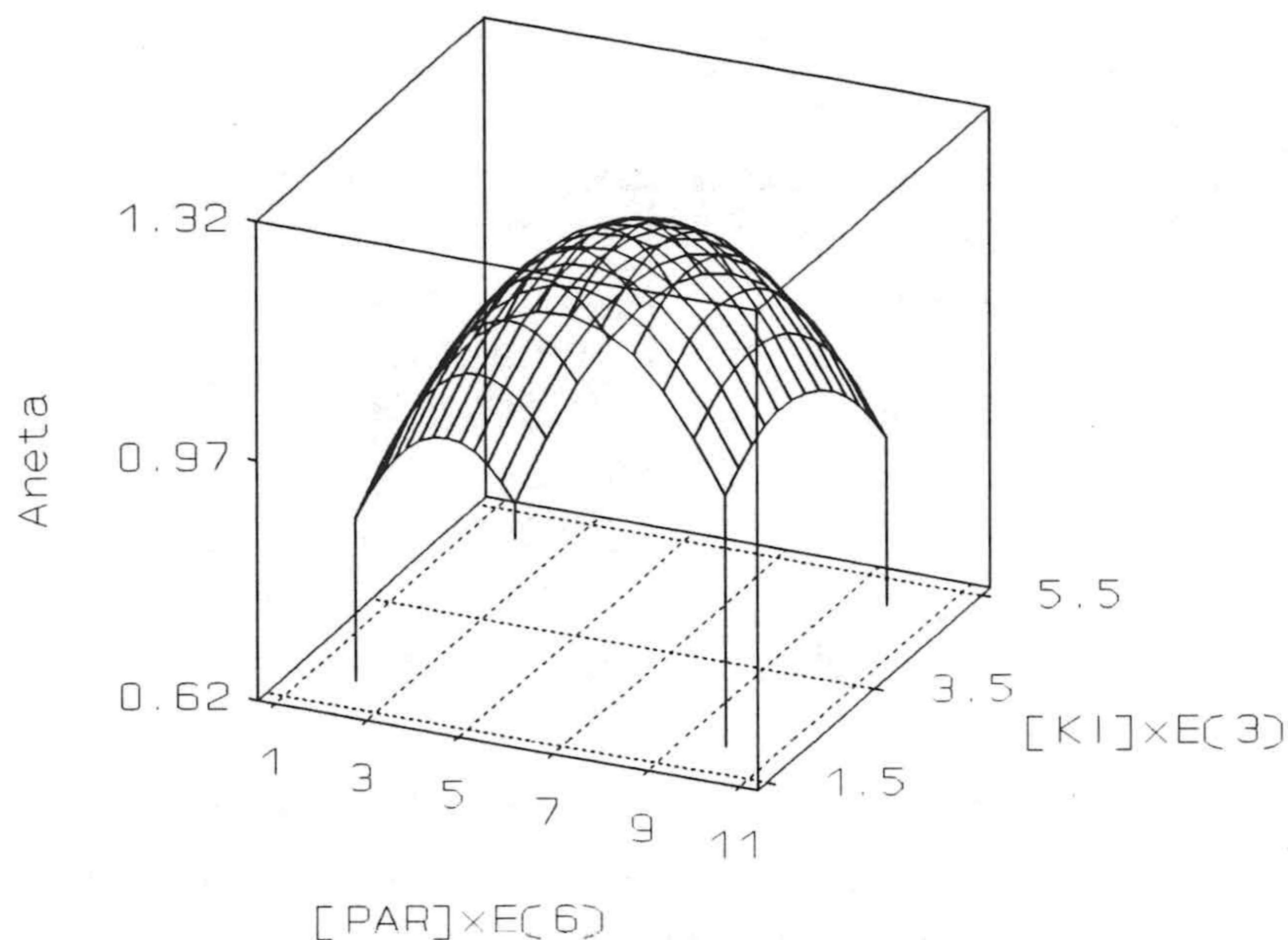


Figura IV.24. Superficie de respuesta correspondiente al diseño II.

*** Variación de la concentración de PAR a [KI] = cte**

La ecuación que recoge la influencia de la concentración de PAR sobre la absorbancia neta, a una concentración fija de KI (3×10^{-3} M), es la siguiente:

$$A_{\text{neta}} = 0'4939 + 0'2359[\text{PAR}] - 0'0182[\text{PAR}]^2$$

como en los casos anteriores, la concentración molar de PAR está multiplicada por 10^6 .

En la tabla IV.44, se recogen los valores predichos para la absorbancia neta al reemplazar en la ecuación, la concentración de PAR por distintos valores.

Tabla IV.44. Influencia de la concentración de PAR a $[KI] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$.

$[PAR] \times 10^6$	A_{neta} predicha	$[PAR] \times 10^6$	A_{neta} predicha
1'99	0'891	6'97	1'254
2'99	1'037	7'96	1'218
3'98	1'144	8'96	1'146
4'98	1'217	9'95	1'039
5'97	1'245	---	-----

Los datos de esta tabla se representan en la figura IV.25, a partir de la cual se deduce que en el intervalo de concentraciones de PAR 5×10^{-6} y 8×10^{-6} existe una constancia en la absorbancia neta y por tanto, se elige una concentración de PAR de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, para obtener así menores señales para el blanco.

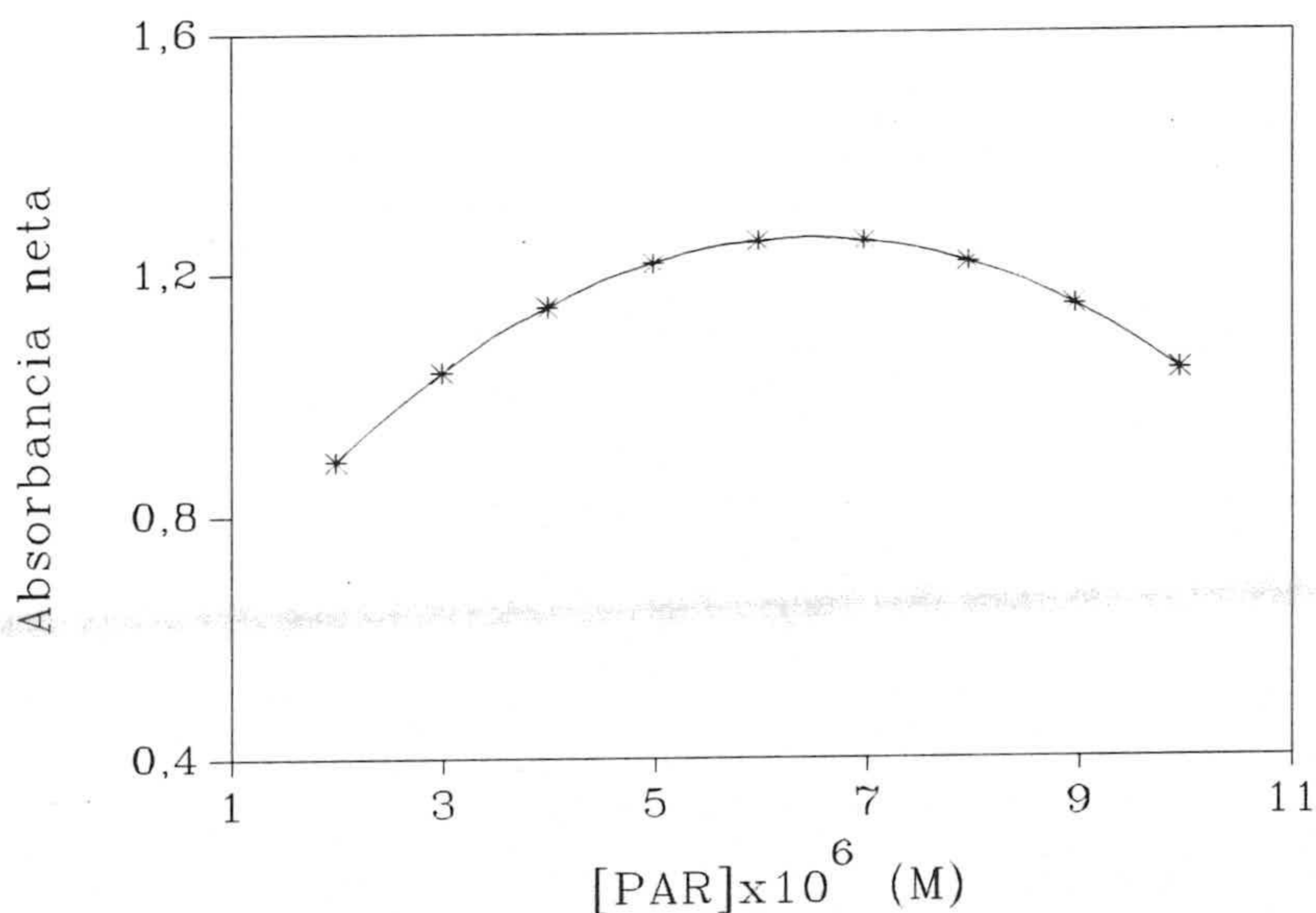


Figura IV.25. Variación de la señal con la concentración de PAR a $[KI] = \text{cte.}$

*** Variación de la concentración de KI a [PAR] = cte**

La relación entre la absorbancia neta y la concentración molar de KI (multiplicada por 10^3), para una concentración de PAR de 6.5×10^{-6} M es:

$$A_{\text{neta}} = 0.8252 + 0.2895[\text{KI}] - 0.0484[\text{KI}]^2$$

En la tabla IV.45, se muestran los valores predichos de absorbancia neta al reemplazar en la ecuación anterior, la concentración de KI por distintos valores. La representación gráfica (figura IV.26) muestra una constancia en la absorbancia en el rango de concentraciones de KI comprendido entre 2.5×10^{-3} y 3.5×10^{-3} M. Se escogerá por tanto una concentración de KI de 3×10^{-3} M, para posteriores experiencias.

Tabla IV.45. Influencia de la concentración de KI a [PAR] = 6.5×10^{-6} M.

[KI] $\times 10^3$	A_{neta} predicha	[KI] $\times 10^3$	A_{neta} predicha
2.0	1.211	4.0	1.209
2.5	1.246	4.5	1.148
3.0	1.258	5.0	1.063
3.5	1.246	---	-----

3.2.2.- Influencia del tiempo de agitación

Para ver la influencia de dicho parámetro, se operó sobre 5 ppb de Zn(II), 5.12×10^{-6} M de PAR, 3.08×10^{-3} M de KI y a pH = 8.7 añadiendo 5 mL de disolución reguladora. Tras agitar las botellas durante tiempos variables en el intervalo de 10 a 70 minutos y aplicar el procedimiento operatorio previamente descrito, se obtuvieron los resultados que se recogen en la figura IV.27.

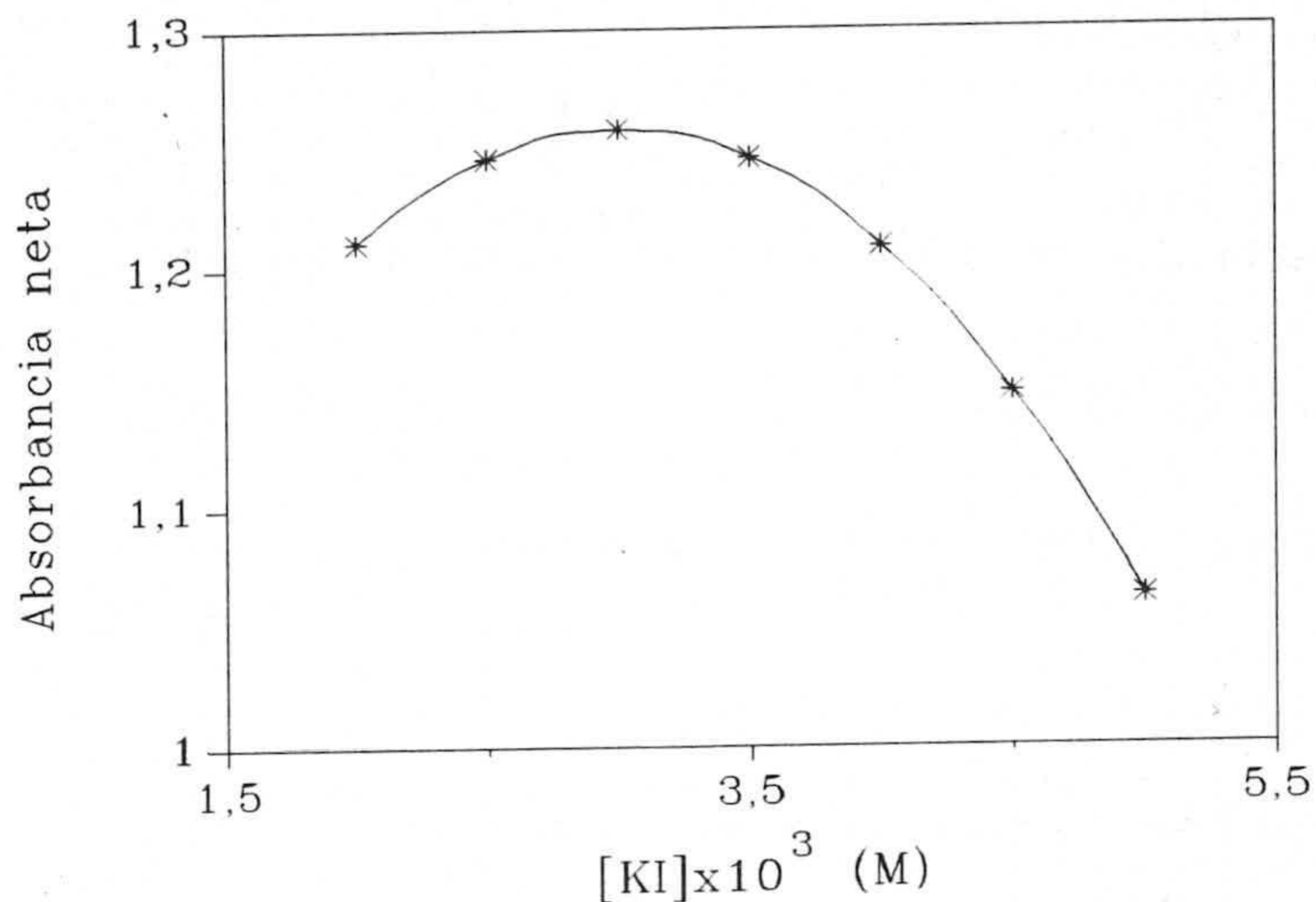


Figura IV.26. Variação de la señal con la concentración de KI a [PAR] = cte.

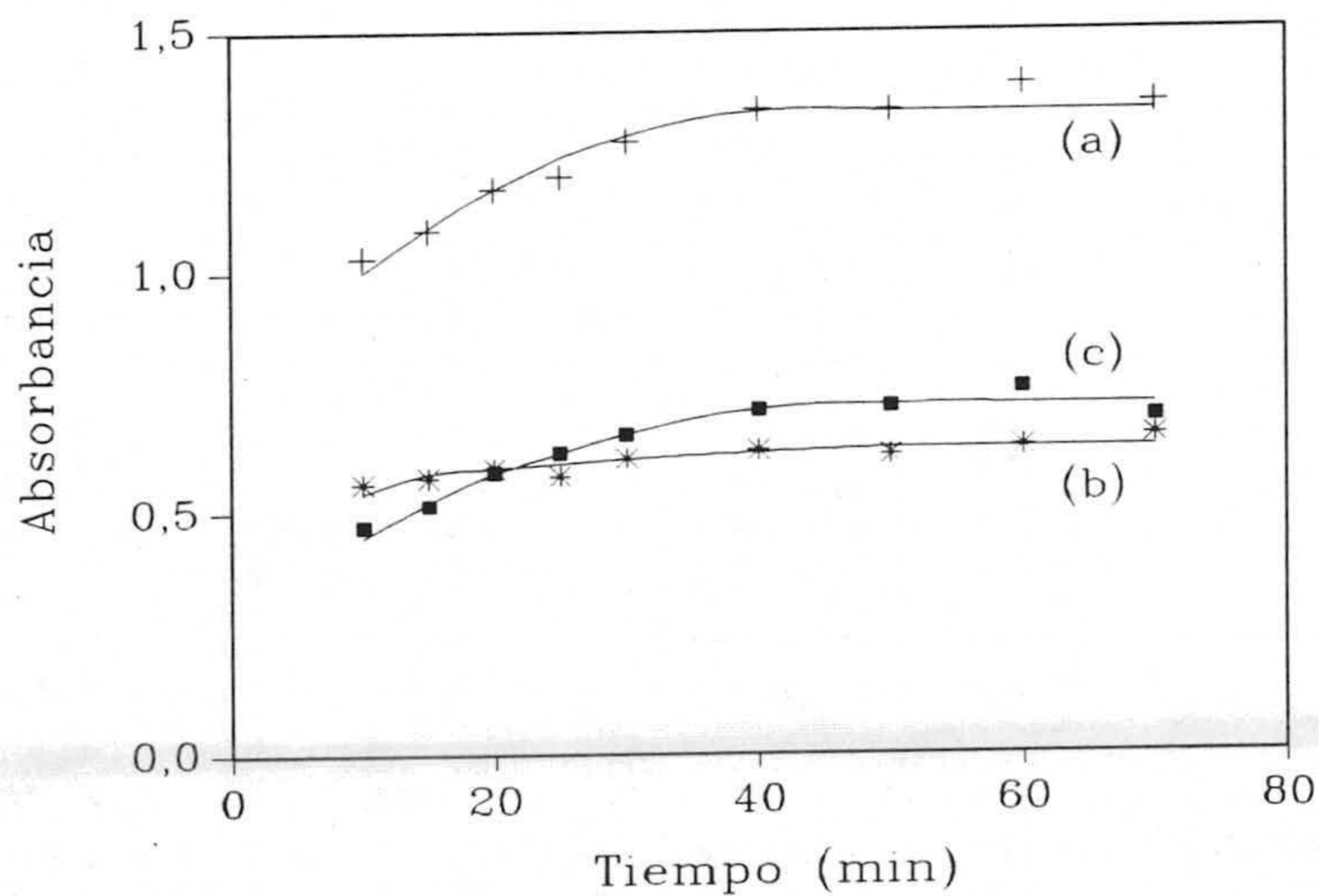


Figura IV.27. Influencia del tiempo de agitación. Influencia sobre la absorbancia de analito (a), de blanco (b) y neta (c). $C_{Zn} = 4,9$ ppb, $[PAR] = 5,05 \times 10^{-6}$ M, $[KI] = 3,03 \times 10^{-3}$ M, pH = 8,7, 80 mg de Sephadex QAE-A-25, V = 500 mL.

Se observa que es necesario un tiempo de agitación de al menos 40 minutos para alcanzar la máxima absorbancia, tiempo que emplearemos en posteriores experiencias.

3.2.3.- Estabilidad del complejo fijado en el cambiador

Este estudio se ha llevado a cabo para 5 ppb de cinc, operando en la forma habitual. A la vista de los resultados recogidos en la tabla IV.46, se deduce que el complejo se puede considerar estable durante un tiempo de al menos una hora.

Tabla IV.46. Estabilidad del complejo en el cambiador.

t(min)	A_b	A	A_{neta}
0	0'6311	1'3351	0'7040
5	0'6299	1'3282	0'6983
10	0'6275	1'3327	0'7052
15	0'6293	1'3305	0'7012
20	0'6305	1'3172	0'6867
25	0'6275	1'3284	0'7009
30	0'6304	1'3309	0'7005
40	0'6315	1'3347	0'7032
50	0'6285	1'3354	0'7069
60	0'6262	1'3298	0'7036

3.2.4.- Resumen de las variables optimizadas

Los valores óptimos encontrados en el estudio de las variables que afectan al sistema Zn(II)-PAR para un volumen de 500 mL se resumen en la tabla IV.47.

Tabla IV.47. Resumen de las variables optimizadas para 500 mL.

Variable	Valor óptimo
[PAR]	5×10^{-6} M
[KI]	3×10^{-3} M
[Tampón], pH	4.9×10^{-3} M, 8.7
Tiempo de agitación	40 min.
Estabilidad	60 min.

3.2.5.- Calibrado del método. Parámetros de fiabilidad

Para comprobar el cumplimiento de la linealidad de la relación entre la absorbancia y concentración de cinc, se utilizaron tres réplicas de cada concentración analito. Mediante una calibración lineal univariante se realizó la regresión lineal de los datos obtenidos, empleando el método de mínimos cuadrados.

Para ello, en frascos de polietileno de 1L, se introducen 500 mL de agua de ósmosis inversa, a la cual se añaden cantidades variables y crecientes de disolución de Zn(II) de 5 ppm, 2 mL de disolución de PAR 1.28×10^{-3} M, 2 mL de disolución de KI 0.77 M y 5 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0.5 M de pH = 8.7.

Tras aplicar el procedimiento operatorio anteriormente descrito, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla IV.48 y que se representan en la figura IV.28.

Tabla IV.48. Calibrado del método.

C_{Zn} (ppb)	A		
0'00	0'6140	0'6113	0'6094
1'96	0'9216	0'9068	0'8801
3'93	1'1578	1'1851	1'1771
5'89	1'4274	1'4725	1'4833
7'85	1'7573	1'7259	1'7160
9'80	1'9601	1'9571	1'8734
11'76	2'0626	2'1265	2'1101

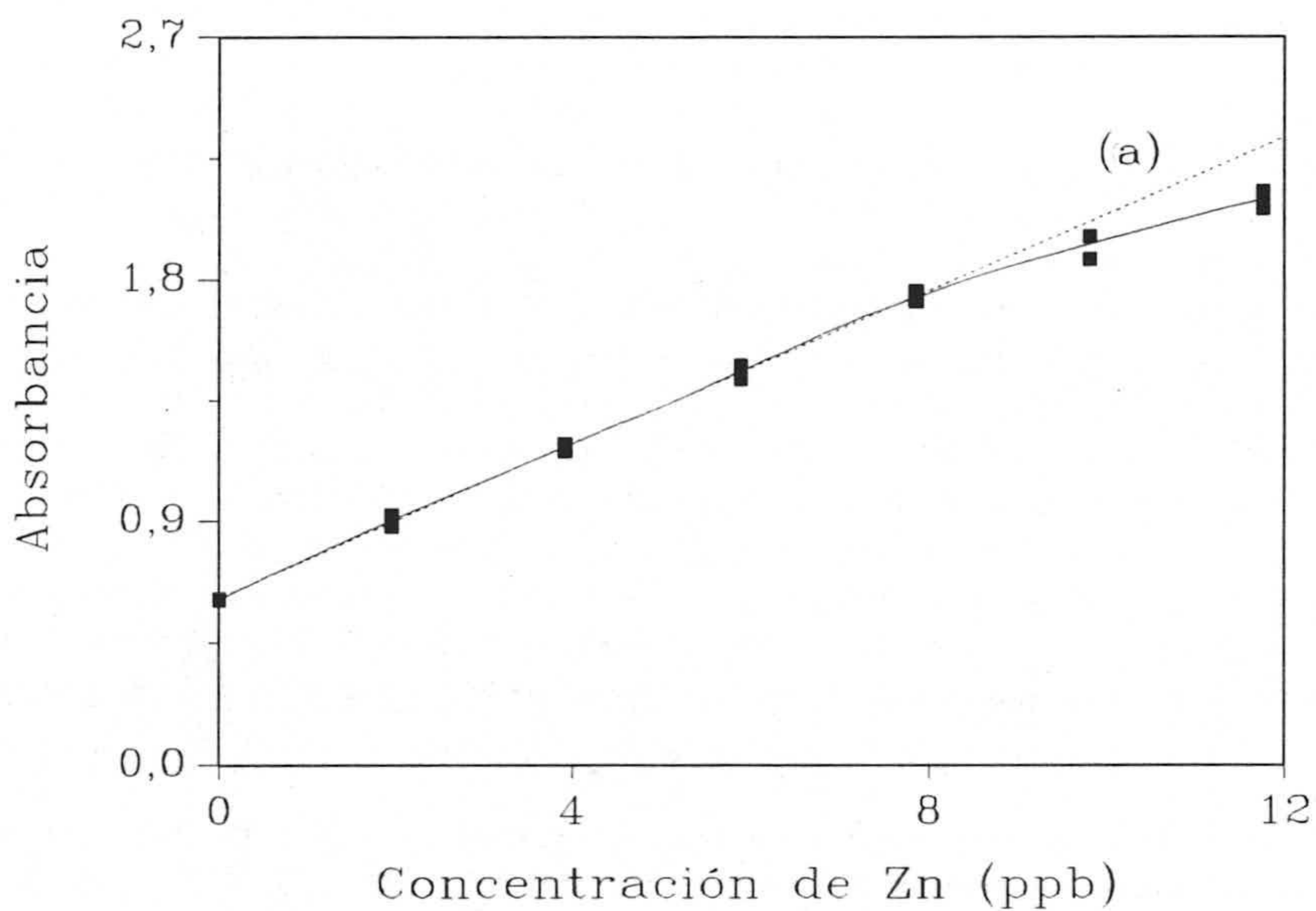


Figura IV.28. Calibrado del sistema Zn-PAR en presencia de KI. (a), recta de calibrado correspondiente a 0-7'85 ppb.

La comprobación del ajuste de los datos experimentales al modelo lineal, se llevó a cabo utilizando la estimación del fallo de ajuste, para lo cual se han medido tres réplicas de cada concentración de analito en el rango 0-12 ppb.

Cuando se introducen todos los datos experimentales de la señal (de 0'00 a 11'76 ppb), el ANOVA correspondiente, da un test de curvatura (lack-of-fit) significativo ($P = 0'02\%$), lo que indica que existe al menos un punto que se aparta de la línea recta.

La eliminación de las señales correspondientes a la concentración de Zn(II) de 11'76 ppb aunque mejoró el test de curvatura ($P = 3'8\%$), volvió a dar significativo, por lo que se eliminó también el conjunto de datos correspondientes a la concentración de cinc de 9'80 ppb. En estas condiciones el test de curvatura no es significativo ($P = 83'5\%$), indicando que el límite superior del método es 7'85 ppb de Zn(II).

La ecuación de la recta de calibrado, es:

$$A = 0'6161 + 0'1427C_{Zn}$$

En la tabla IV.49, se indican los principales parámetros estadísticos de dicha ecuación, mientras que en la figura IV.28, se recoge su correspondiente representación (recta (a)).

Repetibilidad

Se procedió a medir la absorbancia de dos series de disoluciones conteniendo la primera, el blanco y la segunda 4'91 ppb de cinc. Tras aplicar el procedimiento habitual a ambas series, se obtuvieron las señales cuyas medias y valor de desviación estándar se recogen en la tabla IV.50.

Tabla IV.49. Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	15
m	3
$s_{R,C}$	0'0182
a	0'6161
s_a	0'0082
b	0'1427
s_b	0'0017
r^2 (%)	99'82

Tabla IV.50. Repetibilidad del método de 500 mL.

	Blanco	Neta
C_{Zn} (ppb)	0'0	4'9
n	10	10
\bar{A}	0'5955	0'6676
s_{n-1}	0'0154	0'0137

C_{Zn} : concentración de cinc a la cual se llevó el estudio; n : número de determinaciones.

Reproducibilidad

Para llevar a cabo este estudio, se midieron las señales de la absorbancia de disoluciones a las mismas concentraciones que en el apartado anterior. Los valores medios de las señales así como la desviación estándar de los mismos se recogen en la tabla IV.51.

Tabla IV.51. Reproducibilidad del método de 500 mL.

	Blanco	Neta
C_{Zn} (ppb)	0'0	4'9
n	10	10
\bar{A}	0'6064	0'6694
s_{n-1}	0'0196	0'0295

C_{Zn} : concentración de cinc a la cual se llevó el estudio; n: número de determinaciones.

Parámetros de fiabilidad

Utilizando los protocolos de la IUPAC [15] y de Cuadros Rodríguez y col. [13], se han calculado los parámetros de fiabilidad del método cuyos valores se recogen en la IV.52.

A partir de ésta, se observa que tanto los límites de detección como de cuantificación calculados con el protocolo de la IUPAC son muy parecidos a aquellos obtenidos utilizando los datos de calibrado debido posiblemente a que en este caso, se han utilizado réplicas en la recta de calibrado.

Por otra parte, y como cabía de esperar, la precisión encontrada en el estudio de reproducibilidad es menor que la obtenida en el de repetibilidad.

A partir del modelo de regresión lineal y de acuerdo con el protocolo establecido en el capítulo II, se ha evaluado la precisión del método propuesto representando la desviación estándar relativa de la concentración frente a ésta. Los valores de concentración y de DER (%) se representan gráficamente en la figura IV.29.

Tabla IV.52. Parámetros de fiabilidad.

Parámetro	Valor
- Linealidad	
"on-line" (%)	83'53
"off-line" (%)	98'81
- Sensibilidad	
IUPAC (unidad de abs./ppb)	0'1427
analítica (b/s_R) (ppb^{-1})	10'42
datos de calibrado (ppb)	0'13
- Límite de detección	
IUPAC (ppb)	0'32
datos de calibrado ⁽¹⁾ (ppb)	0'28
para $\alpha = \beta = 5\%$ ⁽²⁾ (ppb)	0'32
- Límite de cuantificación	
IUPAC (ppb)	1'08
datos de calibrado ⁽¹⁾ (ppb)	0'94
- Rango dinámico lineal, RDL⁽³⁾	2'45
- Precisión	
Repetibilidad (% DER)	2'1
Reproducibilidad (% DER)	4'4

⁽¹⁾: se calcularon teniendo en cuenta que la desviación estándar a concentración "cero" es $s_{C_0} = 0'0935$; ⁽²⁾: para probabilidades de falsos positivo y negativo del 95% y tres determinaciones sobre la señal del blanco; ⁽³⁾: estimado a partir de los límites superior e inferior del intervalo de linealidad (7'85 y 0'32 ppb respectivamente).

3.2.6.- Procedimiento operatorio propuesto

En frascos de polietileno de 1L de capacidad se introducen en este orden: 500 mL de disolución problema conteniendo cinc entre 1'08 y 7'85 ppb, 2 mL de disolución de PAR $1'28 \times 10^{-3}$ M, 2 mL de disolución de KI 0'77 M y 5 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) de concentración 0'5 M y de pH 8'7. Se añaden 80 mg de Sephadex

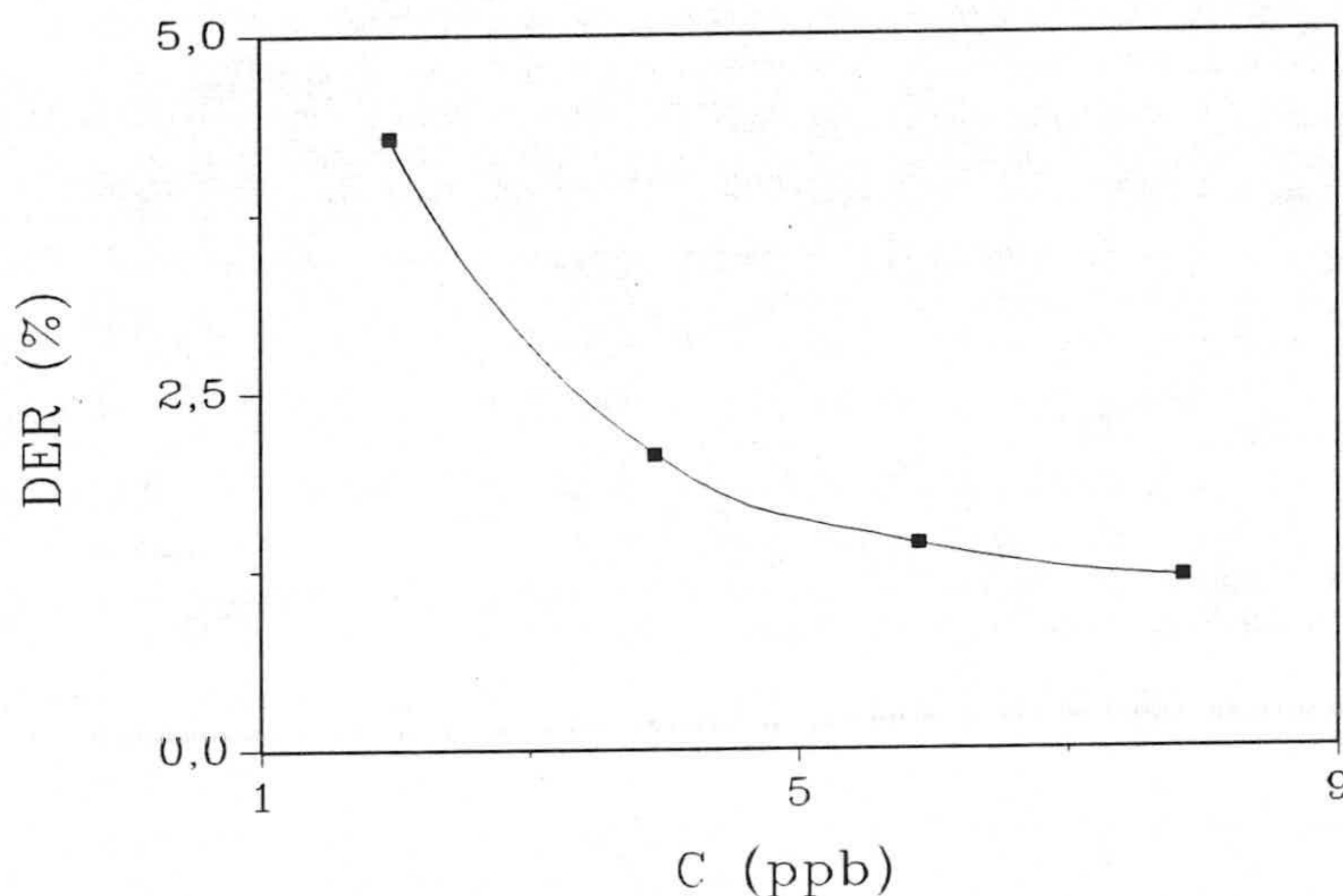


Figura IV.29. Variación de la DER (%) con la concentración de cinc.

QAE-A-25 y se equilibra en un agitador rotatorio durante 40 minutos. Se recoge la fase sólida por filtración y se empaqueta en cubetas de vidrio óptico de 1-mm de paso de luz. Finalmente, después de centrifugar las cubetas durante 30 segundos, se mide la absorbancia, frente a cambiador equilibrado con agua de ósmosis inversa, a las longitudes de onda 500 y 750 nm. El blanco se prepara y se mide de manera análoga. La absorbancia neta se obtiene como se indicó anteriormente.

Mediante interpolación de la absorbancia del complejo en la recta de calibrado, preparada en idénticas condiciones y con concentraciones de cinc comprendidas entre 1'08 y 7'85 ppb, se deduce la concentración de Zn(II) de la disolución problema.

3.2.7.- Robustez

Para estudiar la robustez del método propuesto, se utiliza un diseño factorial fraccionado saturado a dos niveles y centrado alrededor del óptimo, que se lleva a cabo con 7 variables y requiere un total de 8 puntos experimentales: se trata de un diseño 2^{7-4} (fracción 1/16). Se elige por una parte, como concentración de cinc a ensayar el valor de 4'91 ppb, y por otra, una variación de $\pm 10\%$ sobre el valor de 5 variables experimentales (concentración de PAR, cantidad de soporte sólido, tiempo de agitación, concentración de KI y volumen final). La variación de pH es de $\pm 0'1$ unidades y, por último, se ha añadido 1 variable "fantasma" haciéndola confundir con la interacción más probable (cantidad de soporte-tiempo de agitación) y así completar la estructura del diseño.

En la tabla IV.53 se indican las variables ensayadas, así como los valores que se asignan a cada una, mientras que en la tabla IV.54 se muestra la estructura del diseño.

Tabla IV.53. Variables ensayadas en el estudio de robustez al $\pm 10\%$.

Variable	Valor inferior (-1)	Valor superior (+ 1)
A: [PAR]	$4'5 \times 10^{-6}$ M	$5'5 \times 10^{-6}$ M
B: Cantidad del soporte	72 mg	88 mg
C: Tiempo de agitación	36 min.	44 min.
D: [KI]	$2'7 \times 10^{-3}$ M	$3'3 \times 10^{-3}$ M
E: Volumen final	458 mL	560 mL
F: "Fantasma"	----	----
G: pH	8'6	8'8

Para llevar a cabo la realización de este diseño, se prepararon 8 botellas de polietileno de 1L de capacidad en las cuales se añadió, siguiendo el orden habitual, los volúmenes adecuados de las siguientes disoluciones:

Tabla IV.54. Estructura del diseño factorial fraccionado saturado 2^{7-4} .

Nº	A	B	C	D	E	F	G	Absorbancia
1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	R ₁
2	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	R ₂
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	R ₃
4	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	R ₄
5	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	R ₅
6	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	R ₆
7	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	R ₇
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	R ₈

- Agua de ósmosis inversa.
- Zn(II) de 2'5 ppm.
- PAR $1'26 \times 10^{-3}$ M.
- KI 0'76 M.
- Tampón H_3BO_3/NaH_2BO_3 (0'5 M) de pH 8'8 o bien 8'6.

En la tabla IV.55 se recogen los resultados obtenidos tanto de la señal del analito como del blanco, así como de absorbancia neta.

Para ver el efecto de curvatura, se calculó la absorbancia neta media de los 8 puntos del diseño utilizado, \overline{A}_{neta} , y se comprobó si ésta pertenece al intervalo de confianza de la señal neta predicha, \hat{A}_{neta} , por la ecuación de la recta de calibrado:

$$\overline{A}_{neta} \in \hat{A}_{neta} \pm t_{(\alpha; n-2 g, l)} S_R$$

Al reemplazar cada parámetro por su correspondiente valor numérico

Tabla IV.55. Resultados del diseño factorial elaborado para el estudio de robustez al $\pm 10\%$.

Nº	A _b	A	A _{neta}
1	0'7095	1'2714	0'5619
2	0'5364	1'2176	0'6812
3	0'6187	1'3178	0'6991
4	0'6387	1'4612	0'8225
5	0'6696	1'3930	0'7234
6	0'4595	1'0604	0'6009
7	0'7067	1'5396	0'8329
8	0'7653	1'4818	0'7165

($\overline{A_{neta}} = 0'7048$, $\hat{A}_{neta} = 0'6962$, $t_{(5\%; 13 g.l)} = 2'160$ y $s_R = 0'0116$), obtenemos:

$$0'7048 \in 0'6962 \pm 0'0251$$

y por consiguiente se concluye que no existe curvatura significativa en el modelo.

Una vez comprobada la linealidad de los efectos principales de las variables experimentales, se calcularon dichos efectos y su desviación estándar s_E (ecuación 34, capítulo II). Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.56. Solamente los efectos principales debidos a las modificaciones (del $\pm 10\%$ en el valor nominal) de la cantidad de soporte sólido, del tiempo de agitación y del volumen final son significativos ya que son mayores, en valor absoluto, a $t_{(5\%; 13 g.l)} s_E$ (dónde t es el valor de t de Student de una sola cola).

A continuación, se ha estimado la robustez al 5% para las 3 variables experimentales que muestran efectos significativos. Los valores seleccionados, la estructura del diseño utilizado (2^{3-1}), así como los resultados obtenidos se recogen en las tablas IV.57 y IV.58.

Tabla IV.56. Efectos principales para la robustez al $\pm 10\%$.

Variable	Efecto	Significación
PAR	-0'0010	No
Cantidad de soporte	-0'1259	Sí
Tiempo de agitación	0'0273	Sí
KI	-0'0026	No
Volumen final	0'1204	Sí
"Fantasma"	0'0134	No
pH	-0'0005	No

$$t_{(5\%; 13 g.l)} = 1'771; s_E = s_R = 0'0116 \text{ y } t_{(5\%; 13 g.l)} s_E = 0'0205.$$

Tabla IV.57. Variables ensayadas para el estudio de robustez al $\pm 5\%$.

Variable	Valor inferior (-1)	Valor superior (+1)
A: Cantidad del soporte	76 mg	84 mg
B: Volumen final	484 mL	534 mL
C: Tiempo de agitación	38 min.	42 min.

Tabla IV.58. Estructura del diseño factorial fraccionado saturado 2^{3-1} .

Nº	A	B	C	A_{neta}
1	+1	+1	-1	0'7115
2	-1	+1	+1	0'7625
3	+1	-1	+1	0'6930
4	-1	-1	-1	0'6662

Para comprobar el test de linealidad, se calculó la absorbancia neta media de los 4 experimentos del diseño utilizado, y se comprobó que dicha señal pertenece al intervalo de confianza de la señal neta predicha correspondiente a una concentración de cinc de 4'91 ppb, tal y como se indica en la siguiente ecuación:

$$0'7083 \in 0'6962 \pm 0'0251$$

y por tanto, se concluye que no existe curvatura significativa en el modelo.

Finalmente, se calcularon los efectos principales de las variables experimentales, y se compararon con $t_{(5\%; 13 g.l)} s_E$. Los resultados obtenidos (tabla IV.59) muestran que sólo los efectos principales debidos a las modificaciones del tiempo de agitación y del volumen final son significativos. Esto indica que el control de estas variables es crítico puesto que variaciones del $\pm 5\%$ sobre el valor nominal de dichas variables provocarían un error sistemático en la medida de la absorbancia mayor que el propio error experimental.

Tabla IV.59. Efectos principales para la robustez al $\pm 5\%$.

Variable	Efecto	Significación
Cantidad de soporte	-0'0121	No
Volumen final	0'0574	Sí
Tiempo de agitación	0'0389	Sí

$$t_{(5\%; 13 g.l)} = 1'771; s_E = \sqrt{2} s_R = 0'0164 \text{ y } t_{(5\%; 13 g.l)} s_E = 0'0291.$$

Como conclusión del estudio llevado a cabo se puede decir que el método analítico propuesto es robusto para una modificación del $\pm 10\%$ sobre las concentraciones de PAR o KI, de $\pm 0'1$ unidad sobre el valor de pH o del $\pm 5\%$ sobre la cantidad de soporte sólido, necesitando un control más estrecho del tiempo de agitación y del volumen final.

3.2.8.- Comparación de los métodos propuestos

De los parámetros de los métodos propuestos (100 y 500 mL), se puede realizar un estudio comparativo de sensibilidad, de los límites de detección y de cuantificación y de precisión (tabla IV.60). Aunque ambos métodos presentan similar linealidad y mismo rango dinámico lineal, el método propuesto para 500 mL es más sensible, más preciso y presenta límites de detección y de cuantificación menores que aquellos obtenidos para el de 100 mL.

Tabla IV.60. Comparación de los métodos propuestos.

Parámetro	Método	
	100 mL	500 mL
Linealidad "on-line" (%)	98'68	98'81
Sensibilidad (unidad de abs./ppb)	0'0227	0'1427
Límite de detección (ppb)	2'48	0'32
Límite de cuantificación (ppb)	8'28	1'08
Rango dinámico lineal, RDL	2'82	2'45
Repetibilidad (% DER)	4'3	2'1
Reproducibilidad (% DER)	5'0	4'4

Es posible estimar el incremento de sensibilidad que se produce al utilizar un mayor volumen de muestra, de la razón entre el valor de las sensibilidades dadas según la IUPAC o a partir de las pendientes de las rectas de calibrado. El valor calculado para la razón entre las sensibilidades para el método de 500 mL de muestra y el correspondiente a 100 mL es:

$$S_{500} / S_{100} = 6'3$$

donde podemos comprobar un aumento de sensibilidad superior a 5.

Asimismo, la Espectrofotometría en Fase Sólida (EFS) presenta como principal ventaja frente a los otros métodos espectrofotométricos convencionales para determinar cinc en disolución, una mayor sensibilidad. Este hecho es posible ponerlo de manifiesto, por comparación de las absortividades molares de dichos métodos con los propuestos en la presente memoria (tabla IV.61).

Se puede observar como el método propuesto (500 mL) es hasta 1000 veces más sensible que el método convencional que emplea también PAR como reactivo y es hasta 30 veces más sensible que el método en fase sólida que utiliza el Zincón.

Tabla IV.61. Comparación de las sensibilidades de los métodos propuestos con la de otros métodos espectrofotométricos.

Reactivo	Absortividad molar (L/mol.cm)	Referencia
Snazoxs	$1'8 \times 10^4$	[16]
Hydrazidazol/Triton X-100	$2'7 \times 10^4$	[17]
PAN/CTMAB	$5'0 \times 10^4$	[4]
PPRT	$5'5 \times 10^4$	[2]
PPST	$6'1 \times 10^4$	[3]
Zincón ¹ (1000 mL)*	$3'1 \times 10^6$	[18]
PAR/(CTMAB-PO)	$8'1 \times 10^4$	[5]
PAR ¹ (100 mL)*	$1'5 \times 10^7$	mét. propuesto
PAR ¹ (500 mL)*	$9'4 \times 10^7$	mét. propuesto

¹: Espectrofotometría en fase sólida; *: Absortividad molar aparente (valor estimado de la absorbancia del complejo sorbido sobre la fase sólida a partir de una disolución acuosa 1 M de Zn(II) y suponiendo que fue medida en una cubeta de 1 cm); **Snazoxs**: (7,4-sulfo-1-naftilazo)-8-hidroxiquinoleina; **Hydrazidazol**: 1-(2-butirohidrazidonaftaleno)azo-2-hidroxi-4-nitrobenceno; **PAN**: 1-(2-piridilazo)-2-naftol; **CTMAB**: N-Cetil-N,N,N-trimetilamonio bromuro; **PPRT**: 1-(fenil-2-piridil)carbilidene-5-resorcilidenetiocarbohidrazona; **PPST**: 1-(fenil-2-piridil)carbilidene-5-salicilidene tiocarbohidrazona; **Zincón**: ácido 2-hidroxi-5-sulfonilazobencilidenehidrazinobenzóico; **Peregal O**: $C_{10}H_{37}O(CH_2CH_2O)_{20}H$.

3.3.- Selectividad

Una vez realizadas las experiencias necesarias para establecer el método de determinación de cinc con PAR, pasamos a determinar la interferencia producida en el mismo por la presencia de distintas concentraciones de iones extraños.

3.3.1- Estudio de las interferencias

Para llevar a cabo este estudio, se siguió el método propuesto para 100 mL. Se operó con disoluciones conteniendo 25 ppb Zn(II) a las que se añaden cantidades variables del ión cuyo efecto se quiere ensayar. Los blancos se prepararon de la misma manera pero exentos de Zn(II) y del interferente.

Para estimar la tolerancia de los iones extraños se procedió como se indica en el capítulo II. Para ello, se comprobó si la señal obtenida en presencia del posible interferente está incluida dentro del intervalo $A_{neta} \pm s^*$, donde se toma como A_{neta} el valor medio obtenido en el estudio de reproducibilidad (0'534) y como s^* la desviación estándar de dicho estudio (0'0267), que se corresponde a errores relativos iguales o menores al 5 %.

El resumen de la tolerancia de los distintos iones ensayados, se recoge en la tabla IV.62. A partir de dicha tabla, se deduce que:

- Para algunos iones, las concentraciones toleradas son las máximas probadas. Este es el caso de NO_3^- , Br^- , SO_4^{2-} y CO_3^{2-} .
- Causan una mayor interferencia los iones Cd(II), Co(II), Cu(II), Mn(II), Ni(II) y V(V) debido a que reaccionan también con el reactivo.
- Los iones Al(III), Bi(III) y Fe(III) interfieren moderadamente.

- Tienen una tolerancia elevada todos los aniones además del Ca(II) y el Mg(II).

Tabla IV.62. Tolerancia de los iones extraños.

Ión Extraño	Tolerancia (ppb)
NO_3^-	300000
Br^-	250000
$\text{Ca(II)}, \text{SO}_4^{2-}$	100000
IO_3^-	50000
$\text{Cl}^-, \text{Mg(II)}$	25000
$\text{CO}_3^{2-}, \text{CH}_3\text{COO}^-$	10000
Al(III)	50
Bi(III)	25
Fe(III)	20
Cr(III)	10
Pb(II)	5
$\text{Cu(II)}, \text{Mn(II)}$	2
$\text{Cd(II)}, \text{Co(II)}, \text{Ni(II)}, \text{V(V)}$	1

3.3.2.- Selección de agentes enmascarantes

Con el objetivo de estudiar la eliminación de la interferencia producida por los diferentes iones extraños, se ensayaron algunos posibles agentes enmascarantes comprobándose en primer lugar la tolerancia de dichos compuestos en el sistema y su

efecto sobre la señal del blanco. Los resultados obtenidos, se resumen en la tabla IV.63.

Tabla IV.63. Tolerancia de los agentes enmascarantes.

Especie	A_b	E.R (%) del blanco	Tolerancia (ppm)
Tiourea	0'472	0'0	250
A. Ascórbico	0'476	0'9	100
F ⁻	0'493	4'5	
ión C ₂ O ₄ ²⁻	0'468	-0'9	
ión C ₄ H ₄ O ₆ ²⁻	0'454	-3'8	
ión PO ₄ ³⁻	0'467	-1'1	50
S ₂ O ₃ ²⁻	0'476	0'9	10

De dicha tabla, se deduce que:

- Ninguno de los compuestos tiene influencia sobre la absorbancia del blanco ya que los errores relativos (E.R.) respecto al valor obtenido en la reproducibilidad (0'472) están en el intervalo de $\pm 5\%$.

- Todos los agentes enmascarantes ensayados tienen una elevada tolerancia, admitiéndose como mínimo hasta una relación 400/1 en peso, con respecto al cinc.

A continuación se estudió si la presencia de alguno de los compuestos citados enmascara a los iones que interfieren en el método. Para ello, se operó sobre disoluciones conteniendo cantidades no tolerables de cada ión interferente, una cantidad constante del agente enmascarante apropiado y una concentración de cinc de 25 ppb.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla IV.64. En ésta se recoge la siguiente información: el agente enmascarante y su correspondiente concentración, los iones interferentes ensayados con dicho agente y aquellos cuya tolerancia fue mejorada.

Tabla IV.64. Eliminación de las interferencias.

Agente	C (ppm)	Interferentes ensayados	Iones enmascarados (tolerancia)
F ⁻	100	Al(III) y Fe(III)	ninguno
S ₂ O ₃ ²⁻	10	Bi(III), Cd(II), Co(II), Cu(II), Fe(III) y Pb(II)	ninguno
ión PO ₄ ³⁻	50	Bi(III), Co(II), Cr(III), Fe(III), Mn(II) y Ni(II)	ninguno
ión C ₂ O ₄ ²⁻	100	Al(III), Fe(III) y Mn(II)	ninguno
A. Ascórbico	100	Cu(II)	ninguno
Tiourea	250	Bi(III) y Cu(II)	ninguno
ión C ₄ H ₄ O ₆ ²⁻	100	Al(III), Bi(III), Cd(II), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II) y Pb(II)	Al(III) (250 ppb), Cd(II) y Mn(II) (5 ppb), Co(II) (2 ppb) y Pb(II) (100 ppb)

Como se puede observar, el ión tartrato a la concentración de 100 ppm es el único agente enmascarante que mejora la tolerancia de algunos iones interferentes, en la determinación de 25 ppb de analito.

3.3.3.- Efecto del ión tartrato sobre el calibrado

A continuación y para ver el efecto de 100 ppm de tartrato sobre diferentes concentraciones de cinc, se llevó a cabo esta experiencia preparando una serie de matraces en los cuales se introdujeron 1 mL de tartrato de 10 g/L, cantidades crecientes de disolución de Zn(II) de 5 ppm para que las concentraciones estuviesen entre 0-40 ppb, 2 mL de disolución de PAR $3'92 \times 10^{-4}$ M, 2 mL de disolución de KI 0'1 M, 10 mL de disolución reguladora de pH = 8'7, completando finalmente con agua de ósmosis inversa hasta un volumen de 100 mL.

Los datos obtenidos se reflejan en la tabla IV.65.

Tabla IV.65. Calibrado en presencia de 100 ppm de tartrato.

C_{Zn} (ppb)	A	C_{Zn} (ppb)	A
0	0'4714	25	1'1526
10	0'7305	30	1'1737
15	0'8572	35	1'3483
20	0'9813	40	1'4957

La ecuación de la recta de calibrado, deducida de la regresión por mínimos cuadrados, es:

$$A = 0'4785 + 0'0250C_{Zn}$$

cuyos parámetros estadísticos se recogen en la tabla IV.66.

Tabla IV.66. Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	8
m	1
$s_{R,C}$	0'0311
$a \pm s_a$	0'4785 \pm 0'0222
$b \pm s_b$	0'0250 \pm 0'0009
r^2 (%)	99'26

Para determinar el efecto de los 100 ppm de tartrato sobre la recta de calibrado, se compara la pendiente de ésta con la presentada en la tabla IV.34 que corresponde a la pendiente de la recta de calibrado sin agente enmascarante. De dicha comparación, tal y como se recoge en el capítulo II, se obtuvo que ambas pendientes no difieren significativamente una de la otra ya que $P(b)$ es superior al 1% y por tanto se concluye que los 100 ppm del ión tartrato no tienen efecto aparente sobre el calibrado.

3.3.4.- Enmascaramiento con tartrato: Análisis de muestras sintéticas

Hasta ahora, se ha estudiado el efecto individual de cada ión extraño presente en la disolución del analito y para ver el efecto conjunto de algunos interferentes, en ausencia y en presencia de agente enmascarante, se prepararon dos disoluciones de diferentes muestras sintéticas: con 24'7 ppb de cinc y sin Zn(II). La composición de dichas muestras se recoge en la tabla IV.67.

Para la composición de dichas disoluciones se eligieron por una parte aquellos iones que presentaban menor tolerancia y se prepararon disoluciones de los mismos en concentraciones iguales o superiores a la tolerada (muestra A, B, C y D).

Tabla IV.67. Contenido de las muestras sintéticas.

Muestra sintética	Contenido (Concentración)
A	Al(III) (234 ppb); Cd(II) y Mn(II) (3 ppb); Co(II) (2 ppb); Pb(II) (57 ppb); Cl ⁻ (1 ppm) y NO ₃ ⁻ (292 ppm)
B	Al(III) (350 ppb); Cd(II), Mn(II) y Co(II) (6 ppb); Pb(II) (117 ppb); Cl ⁻ (1 ppm) y NO ₃ ⁻ (282 ppm)
C	Cu(II) (2 ppb); Fe(III) (24 ppb); Ni(II) (1 ppb); Cl ⁻ (1 ppm) y NO ₃ ⁻ (239 ppm)
D	Cu(II) (6 ppb); Fe(III) (50 ppb); Ni(II) (4 ppb); Cl ⁻ (1 ppm) y NO ₃ ⁻ (242 ppm)
E	Ca(II) (18 ppm); Mg(II) (24 ppm); Cl ⁻ (33 ppm); F ⁻ (59 ppb); SO ₄ ²⁻ (94 ppm) y NO ₃ ⁻ (29 ppm)
F	Al(III) (234 ppb); Cd(II) y Mn(II) (3 ppb); Co(II) y Cu(II) (2 ppb); Ca(II) (18 ppm); Fe(III) (24 ppb); Mg(II) (23 ppm); Ni(II) (1 ppb); Pb(II) (57 ppb); Cl ⁻ (33 ppm); F ⁻ (57 ppb); NO ₃ ⁻ (205 ppm) y SO ₄ ²⁻ (92 ppm)

Por otra parte, supuesto que se pretende aplicar el método al análisis de aguas, se prepararon dos disoluciones, la primera de ellas (muestra E) conteniendo únicamente los elementos considerados normales en dichas muestras. La última de las muestras preparadas (muestra F) recoge tanto elementos mayoritarios como algunos de aquellos que siendo minoritarios se presentan más frecuentemente en agua natural.

Siguiendo el método propuesto para 100 mL, se operó sobre 85 mL de muestra sintética, a los que se añadió 1 mL de tartrato de 10 g/L. Los blancos, conteniendo la muestra sintética exenta de cinc, se prepararon de la misma manera.

En la tabla IV.68 se recogen los resultados obtenidos para cada muestra sintética, así como los porcentajes de recuperación.

Tabla IV.68. Resultados obtenidos para las distintas muestras sintéticas. $C_{Zn;puesto} = 24'7$ ppb.

Muestra sintética	A_{neta}	Cinc hallado (ppb) $\bar{C}_{Zn} \pm s_{n-1}$	$\bar{\mathcal{R}}$ (%)	$P(\mathcal{R})$ (%)
A	0'5220 0'4984 0'5207	23'8 ± 0'6	96'4	14'0
B	0'4383 0'3772 0'3554	18'0 ± 2'0	72'9	2'9
C	0'5119 0'5669 0'5660	25'5 ± 1'5	103'2	46'6
D	0'3831 0'3401 0'2953	15'6 ± 2'1	63'3	1'7
E	0'4769 0'4918 0'4670	24'2 ± 0'6	98'0	28'9
F	0'4734 0'5201 0'5554	24'0 ± 1'9	97'2	57'6

Estos resultados son satisfactorios para todas las muestras salvo para la B y la D. Esto era previsible puesto que en ambas, las concentraciones de los iones interferentes son superiores a las toleradas por el método, aún en presencia del ión tartrato.

4.- DISTRIBUCIÓN DEL ANALITO ENTRE LA FASE SÓLIDA Y LA DISOLUCIÓN ACUOSA

4.1.- Método de 100 mL

Para calcular el valor de la razón de distribución de la especie objeto de estudio en las condiciones experimentales de trabajo, se prepararon al pH adecuado, 8'7, tres disoluciones idénticas con $4'74 \times 10^{-5}$ mmoles de Zn(II) en un volumen final de 100 mL, siendo las concentraciones de PAR y KI, $7'84 \times 10^{-6}$ M y 2×10^{-3} M respectivamente. Estas disoluciones se equilibraron durante 15 min con 80 mg de Sephadex QAE y se procesaron aplicando a cada una de ellas el método propuesto para 100 mL. La absorbancia obtenida, $(A_{\text{neta}})_1$, se interpoló en la recta de calibrado preparada en idénticas condiciones y se obtuvo así la cantidad de cinc fijada en la fase sólida. A continuación, se recogieron las disoluciones filtradas, se les añadieron otros 80 mg del soporte sólido y se trataron en la forma habitual. A partir de la absorbancia medida, $(A_{\text{neta}})_2$, se obtuvo la concentración de cinc que había quedado en disolución. Dividiendo la cantidad de cinc fijada en la fase sólida (mmol/g) por la de la disolución (mmol/mL), se obtiene el valor de la razón de distribución.

En la tabla IV.69, se recogen los resultados obtenidos tanto de las dos absorbancias netas como de las concentraciones de Zn(II) correspondientes. En nuestro caso, dado que la cantidad de cinc que se quedó en disolución (tanto en la determinación nº 2 como en 3), fue inferior al límite de detección del método, los valores de la razón de distribución se obtuvieron dividiendo la cantidad fijada en la fase sólida por la concentración correspondiente al límite de detección del método ($L_D = 3'81 \times 10^{-8}$ M).

Tabla IV.69. Razón de distribución para el método de 100 mL.

Determinación nº	$(A_{\text{neta}})_1$	mmol/g de Zn(II) en fase sólida	$(A_{\text{neta}})_2$	mmol/mL de Zn(II) en disolución	D (mL/g)
1	0'6371	$5'26 \times 10^{-4}$	0'0758	$4'28 \times 10^{-8}$	12290
2	0'7193	$5'95 \times 10^{-4}$	0'0191	$3'81 \times 10^{-8}$	15617
3	0'6420	$5'30 \times 10^{-4}$	-0'0009	$3'81 \times 10^{-8}$	13911

Por tanto, el valor medio de la razón de distribución, para el método de 100 mL, expresado como $\bar{D} \pm \frac{s t_{(0'05; n-1 g.l)}}{\sqrt{n}}$ es:

$$(1'4 \pm 0'4) \times 10^4 \text{ mL/g}$$

siendo:

$s = 0'17 \times 10^{-4}$, la desviación estándar de las n determinaciones ($n = 3$).

$t_{(0'05; n-1 g.l)} = 4'303$, el valor de la t de Student para un nivel de confianza, $\alpha = 0'05$, y $n-1$ grados de libertad.

4.2.- Método de 500 mL

Para ello, se prepararon para el método de 500 mL y al pH 8'7, tres disoluciones idénticas cuyo contenido en Zn(II), PAR y KI eran $7'64 \times 10^{-8}$, $5'03 \times 10^{-6}$ y $3'03 \times 10^{-3}$ M respectivamente. Estas disoluciones se equilibraron durante 50 min con 80 mg de Sephadex QAE, operándose a continuación en la forma descrita en el método de 100 mL.

En la tabla IV.70 se recogen los resultados obtenidos tanto de las dos absorbancias netas (la primera corresponde a la cantidad de Zn(II) fijada en la fase sólida

y la segunda a la que se quedó en disolución), como de las concentraciones de cinc correspondientes. Dado que la cantidad de cinc que se quedó en disolución, tanto en la determinación n° 2 como en 3), fue inferior al límite de detección del método, los valores de la razón de distribución se obtuvieron en dichas determinaciones dividiendo la cantidad fijada en la fase sólida por la concentración correspondiente al límite de detección ($L_D = 4'89 \times 10^{-9}$ M).

Tabla IV.70. Razón de distribución para el método de 500 mL.

Determinación n°	$(A_{\text{neto}})_1$	mmol/g de Zn(II) en fase sólida	$(A_{\text{neto}})_2$	mmol/mL de Zn(II) en disolución	D (mL/g)
1	0'7246	$4'93 \times 10^{-4}$	0'0560	$5'51 \times 10^{-9}$	89474
2	0'7179	$4'88 \times 10^{-4}$	-0'0276	$4'89 \times 10^{-9}$	99796
3	0'7443	$5'05 \times 10^{-4}$	-0'0551	$4'89 \times 10^{-9}$	103272

Por tanto, el valor medio de la razón de distribución, para el método de 500 mL, es:

$$(10 \pm 2) \times 10^4 \text{ mL/g}$$

donde $s = 0'72 \times 10^{-4}$, $n = 3$ y $t_{(0'05; n-1 g.l)} = 4'303$.

Los altos valores obtenidos de D ($> 10^4$) nos permiten considerar que en las condiciones operatorias de ambos métodos, la fijación del complejo puede considerarse cuantitativa [19].

5.- APLICACIONES ANALÍTICAS

Para comprobar la utilidad de los métodos de Espectrofotometría en Fase Sólida propuestos, se aplicó la metodología para 500 mL a la determinación de cinc en dos tipos distintos de muestras reales: agua y leche. En el primer caso, la validación se realizó siguiendo el protocolo de Cuadros Rodriguez y col. [20], mientras que en el segundo, se utilizó un método de referencia.

5.1.- Análisis de cinc en muestras de agua

Se escogieron dos tipos de agua con bajo contenido en cinc: un agua destilada recogida de un destilador con electrodos metálicos en este Departamento y un agua mineral ("Bezoya", procedente de Ortigosa del Monte-Segovia), agua de mineralización débil. La composición química de esta última se recoge en la tabla A.2 del apéndice.

5.1.1.- Agua destilada

Comprobación de la veracidad por adición de patrón

Para comprobar la veracidad del método analítico con esta muestra, se utilizó la metodología de adición de patrón, tal y como se recoge en el capítulo II.

Se obtuvieron los calibrados siguientes, en presencia de 20 ppm del ión tartrato como agente enmascarante:

- a).- Estándar.
- b).- De adición de patrón.
- c).- De Youden.

- Resultados

En la tabla IV.71 se recogen los datos obtenidos en las distintas series de medidas efectuadas para validar la determinación de cinc en agua destilada y en la figura IV.30 se muestran las representaciones gráficas de los mismos.

Tabla IV.71. Calibrados para la determinación de cinc en agua destilada.

Calibrado	V _{muestra} (mL)	C _{Zn} (ppb)	C _{Zn} (ppb) añadida	A		
Estándar (CE)	-----	0'00	-----	0'3856		
	-----	1'96	-----	0'6546		
	-----	3'92	-----	0'9350		
	-----	5'88	-----	1'1813		
	-----	7'84	-----	1'4262		
De adición de patrón (CA)	500	-----	0'00	0'6817	0'6335	0'6110
	500	-----	1'96	0'9231	0'8736	0'8475
	500	-----	3'92	1'1808	1'1211	1'1386
	500	-----	5'88	1'3925	1'3640	1'3871
De Youden (CY)	300	-----	-----	0'5757		
	400	-----	-----	0'6185		
	500	-----	-----	0'6608		

En la tabla IV.72, se indican los parámetros estadísticos calculados para las rectas correspondientes a los calibrados establecidos.

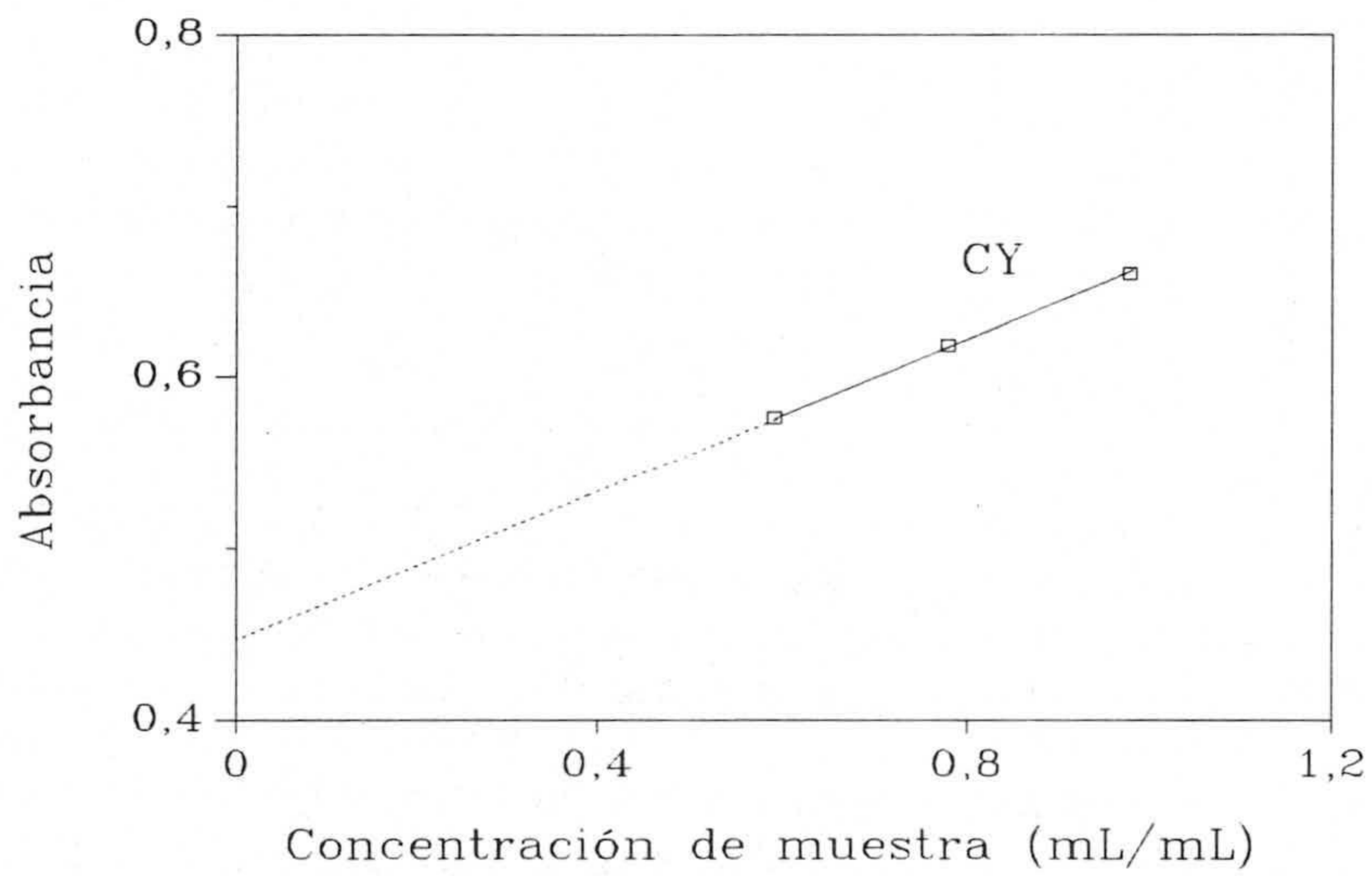
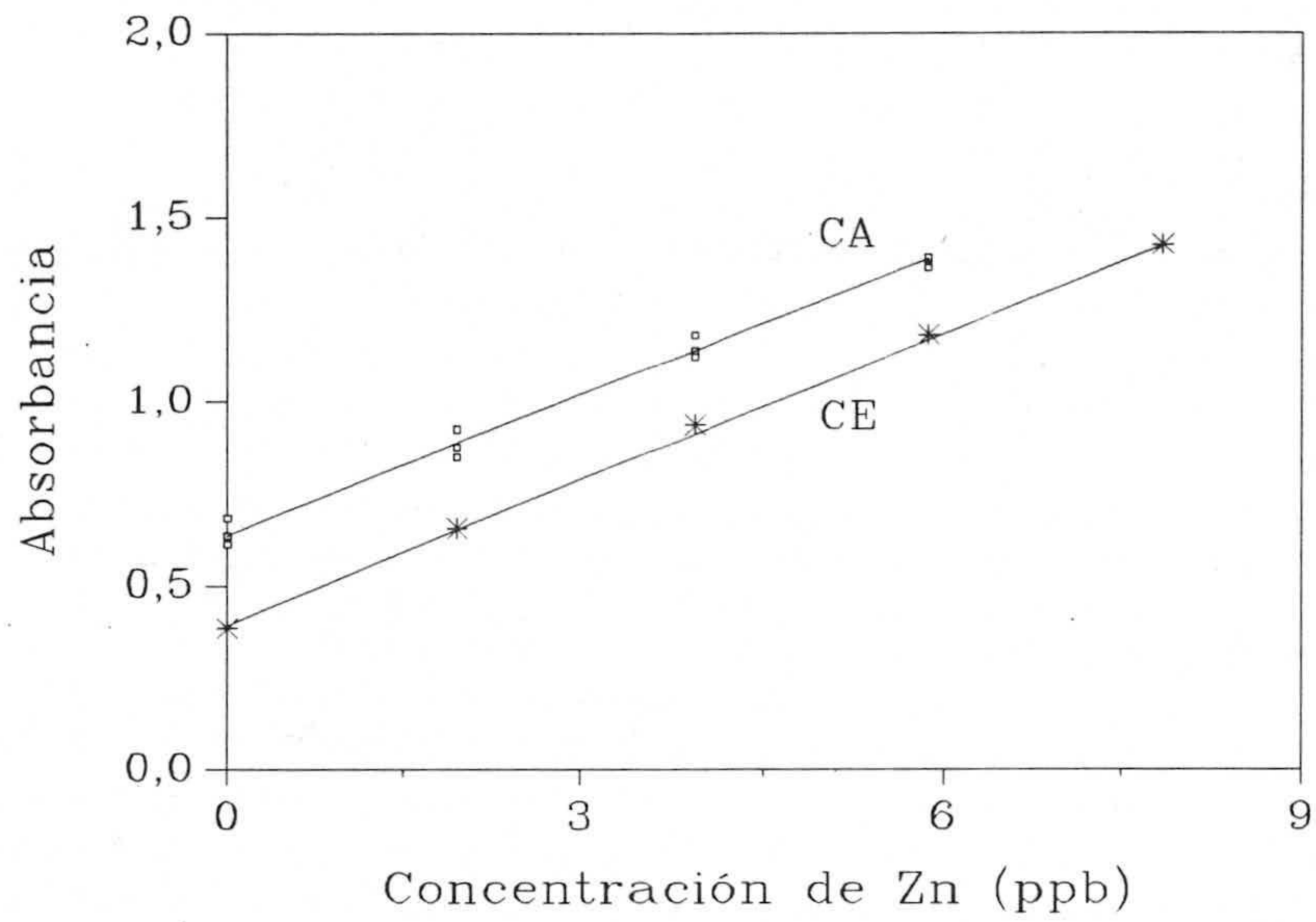


Figura IV.30. Rectas correspondientes a los calibrados establecidos para validar la determinación de cinc en agua destilada.

Tabla IV.72. Parámetros estadísticos para los tres calibrados establecidos.

Parámetro	CE	CA	CY
n	5	12	3
m	1	3	1
a	0'3950	0'6405	0'4475
b	0'1331	0'1267	0'2181
$s_{R,C}$	0'0140	0'0290	0'0011

La validación, tratando los datos de la tabla IV.71, se realizó mediante el protocolo estadístico de Cuadros Rodríguez y col. [20], que consiste en lo siguiente:

* Comprobación de la homogeneidad de las varianzas de regresión de los calibrados CE y CA. Cálculo de la varianza promedio:

$$F_{cal} = 4'53; \quad P(s) = 12'02 \%$$

$$v_1 = 10; v_2 = 3$$

$$s_p^2 = 6'92 \times 10^{-4}$$

* Comprobación de la igualdad de pendientes de las dos rectas de calibrado CE y CA. Pendiente promedio:

$$t_{cal}(b) = 1'168; \quad P(b) = 26'38 \%$$

$$v = 13$$

$$b_p = 0'1294$$

* Contenido "estimado" en cinc en la muestra real a partir de CY:

$$C_{muestra} = 1'7 \text{ ppb}$$

* Corrección de las alturas en el origen de las rectas de calibrado CE y CA:

$$a'_{CE} = 0'4093 \text{ y } a'_{CA} = 0'6325$$

* Blanco de Youden:

$$a_{CY} = 0'4475 \epsilon (0'4093 \pm 0'1189)$$

No existe componente de error sistemático constante puesto que $BY=0$.

* Concentraciones de cinc en la disolución de medida, calculadas a partir de los calibrados corregidos CE y CA. Comprobación de la veracidad:

$$C_{Zn;CE} = 1'80 \text{ ppb}$$

$$C_{Zn;CA} = 1'72 \text{ ppb}$$

$$t_{cal}(C) = 0'732; \quad P(C) = 47'62 \%$$

$$v = 14$$

Podemos concluir que el método es veraz ya que los contenidos de analito encontrados a partir de los dos calibrados son significativamente iguales.

Determinación de cinc en agua destilada

Una vez comprobada la validez del método y que no es necesario, para este tipo de muestra, aplicar el método de adición de patrón se realizan tres nuevas determinaciones del agua según el procedimiento habitual, en presencia de agente enmascarante. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.73.

Tabla IV.73. Determinación de Zn(II) en agua destilada. $V_{\text{muestra}} = 500 \text{ mL}$.

Determinación nº	A
1	0'6425
2	0'6576
3	0'6359

Interpolando las absorbancias medidas en el calibrado estándar se obtiene lo siguiente:

$$\bar{C}_{\text{disolución}} = 1'88 \text{ ppb}; \quad s_{n-1} = 0'0819; \quad DER(C) = 4'4 \%$$

Por tanto, el contenido de cinc en la muestra de agua destilada, teniendo en cuenta el factor de dilución ($f_{\text{dil}} = 510/500 = 1'02$) y expresado como $\bar{C}_{\text{muestra}} \pm s_{n-1}$ es:

$$C_{\text{Zn}} = (1'9 \pm 0'1) \text{ ppb}$$

5.1.2.- Agua mineral

Verificación del método por adición de patrón

Puesto que existen diferencias entre las pendientes de las dos rectas de calibrado (estándar y de adición de patrón) usando 20 ppm de tartrato, se ha aumentado la concentración del agente a 30 ppm. Dicha concentración también fue utilizada en el calibrado de Youden.

- Resultados

En la tabla IV.74, se recogen los datos obtenidos en los tres calibrados realizados para comprobar la veracidad de la determinación de cinc en agua mineral y en la figura IV.31 se muestran las representaciones gráficas de los mismos.

Los principales parámetros estadísticos calculados para las rectas de calibrado establecidas se recogen en la tabla IV.75.

Tabla IV.74. Calibrados para la determinación de Zn(II) en agua mineral.

Calibrado	V_{muestra} (mL)	C_{Zn} (ppb)	C_{Zn} (ppb) añadida	A	
Estándar (CE)	-----	0'00	-----	0'3714	0'3346
	-----	1'96	-----	0'6312	0'5581
	-----	3'92	-----	0'8965	0'9212
	-----	5'88	-----	1'1106	1'1253
	-----	7'84	-----	1'3421	1'5259
De adición de patrón (CA)	250	-----	0'00	0'7239	0'6582
	250	-----	1'96	0'9237	0'9128
	250	-----	3'92	1'1275	1'1145
	250	-----	5'88	1'4024	1'4755
De Youden (CY)	250	-----	-----	0'7066	
	300	-----	-----	0'7413	
	400	-----	-----	0'8394	
	500	-----	-----	0'8931	

Tabla IV.75. Parámetros estadísticos de los tres calibrados establecidos.

Parámetro	CE	CA	CY
n	10	8	4
m	2	2	1
a	0'3446	0'6753	0'5149
b	0'1370	0'1248	0'3946
$s_{R,C}$	0'0565	0'0429	0'0141

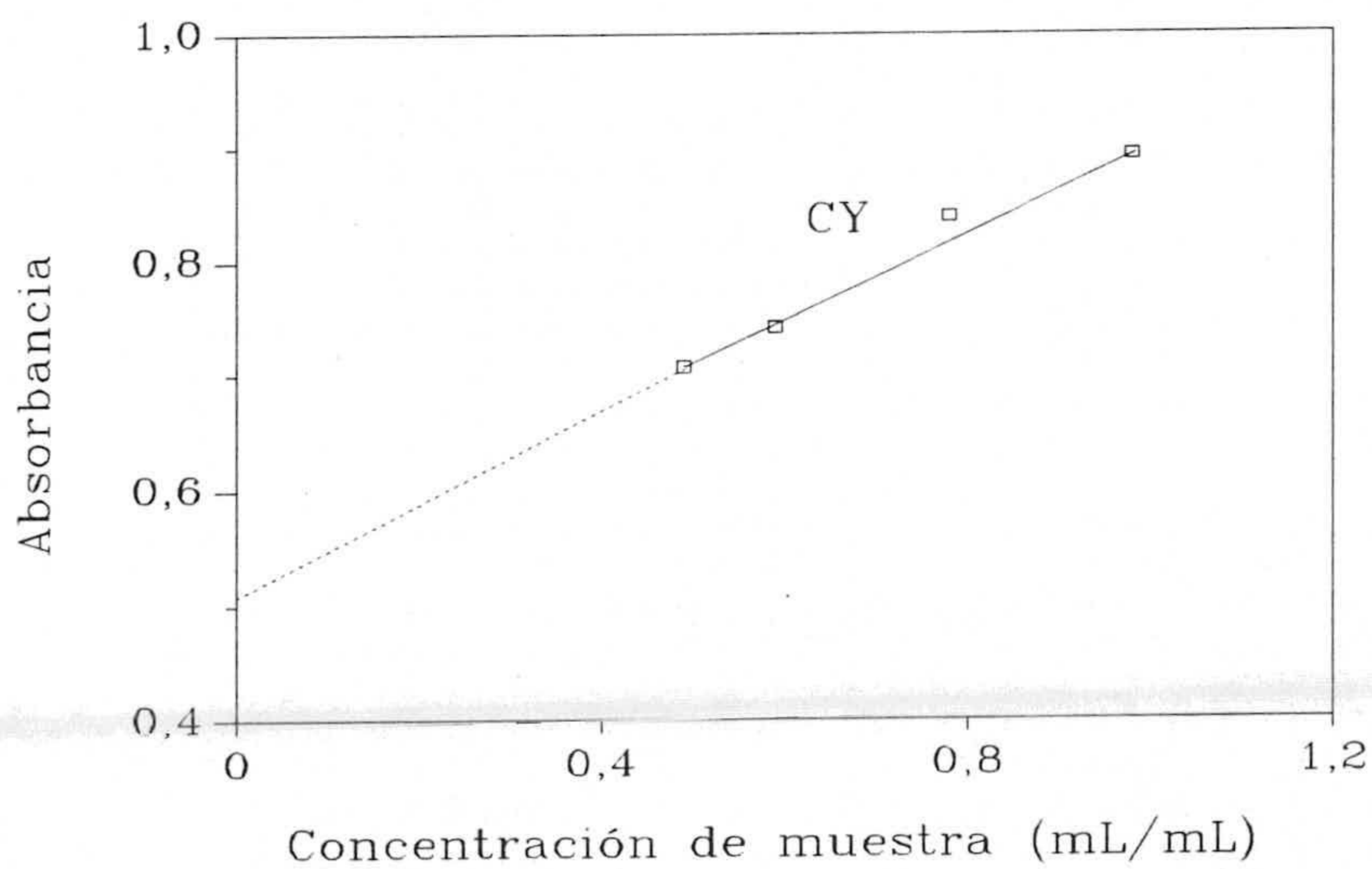
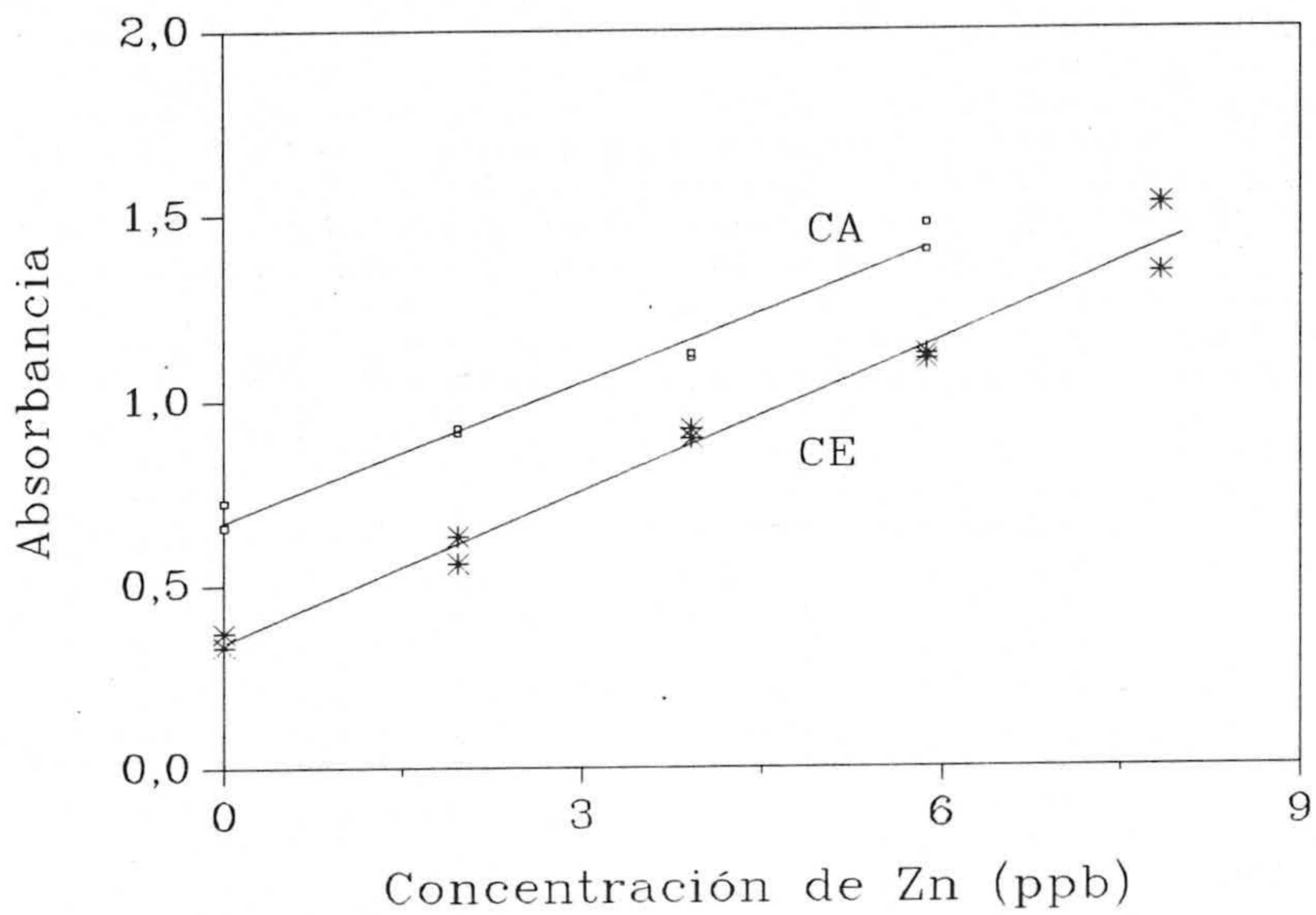


Figura IV.31. Rectas correspondientes a los calibrados establecidos para validar la determinación de cinc en agua mineral.

La comprobación, tratando los datos de la tabla IV.74, se realizó al igual que en el apartado anterior. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.76.

Tabla IV.76. Comprobación de la veracidad del método.

Parámetro	CE	CA
s^2	$s_{CE}^2 = s_{CA}^2$ ($P(s) = 26'02 \%$), $s_p = 0'0511$	
b	$b_{CE} = b_{CA}$ ($P(b) = 24'67 \%$), $b_p = 0'1329$	
a'	0'3607	0'6516
Blanco de Youden	$a_{CY} \notin (0'3607 \pm 0'0938)$ Existe componente de error sistemático constante, $BY \neq 0$	
C_{Zn} (ppb)	1'33	1'03
$C_{Zn;CE} = C_{Zn;CA}$ ($P(C) = 13'02 \%$)		

Podemos comprobar que ambos resultados no difieren significativamente, por lo que consideramos el método veraz.

Determinación de cinc en agua mineral

1.- Contenido "estimado" en cinc en la muestra real a partir del calibrado de Youden (CY):

$$C_{muestra} = 3'0 \text{ ppb}$$

2.- Contenido en cinc a partir del calibrado estándar (CE):

Una vez comprobada la validez del método, realizamos un número repetitivo de análisis de la muestra (tres determinaciones) según el procedimiento habitual. Los resultados encontrados se indican en la tabla IV.77.

Tabla IV.77. Determinación de Zn(II) en agua mineral. $V_{\text{muestra}} = 250 \text{ mL}$.

Determinación nº	A
1	0'7376
2	0'7153
3	0'7221

El tratamiento de las absorbancias obtenidas, tras restar el blanco de Youden y utilizar el calibrado estándar, conduce a lo siguiente:

$$\bar{C}_{\text{disolución}} = 1'53 \text{ ppb}; \quad s_{n-1} = 0'0874; \quad DER(C) = 5'7 \%$$

Por tanto, el contenido de cinc en la muestra de agua mineral, teniendo en cuenta el factor de dilución ($f_{\text{dil}} = 510/250 = 2'04$) y expresado como $\bar{C}_{\text{muestra}} \pm s_{n-1}$ es:

$$C_{\text{Zn}} = (3'1 \pm 0'2) \text{ ppb}$$

5.2.- Análisis de cinc en una muestra de leche (UHT)

Se ha aplicado el método propuesto a otro tipo de muestra real como es la leche. La composición química de la leche analizada ("RAM", energía y crecimiento) se recoge en la tabla A.3 del apéndice.

En este caso la comprobación de la veracidad del método analítico se ha llevado a cabo por comparación con los resultados obtenidos por Espectroscopía de absorción atómica (EAA) de llama.

5.2.1.- Determinación de cinc por el método propuesto

Método de adición de patrón

Puesto que el contenido de cinc en la leche problema, según se indica en el envase, es de 9 ppm, se preparó una disolución de ésta diluida 10 veces a partir de la cual se pipetearon 2'5 ml para el calibrado de adición de patrón y volúmenes crecientes para el calibrado de Youden, siguiendo el procedimiento habitual. Los resultados obtenidos para éstos dos calibrados aplicados, se recogen en la tabla IV.78, mientras que sus representaciones gráficas se muestran en la figura IV.32.

Tabla IV.78. Calibrados para la determinación de Zn(II) en leche por EFS.

Calibrado	V _{muestra} (mL)	C _{Zn} (ppb) añadida	A			
De adición de patrón (CA)	2'5	0'00	0'8922	0'8917	0'8658	0'9090
	2'5	1'47	0'9863	1'0309	0'9818	0'9658
	2'5	2'45	1'1415	1'0625	1'0941	1'0936
	2'5	3'43	1'2386	1'2014	1'1300	1'2030
De Youden (CY)	1'5	----	0'6769			
	2'5	----	0'7945			
	3'5	----	0'8983			
	4'5	----	1'0855			

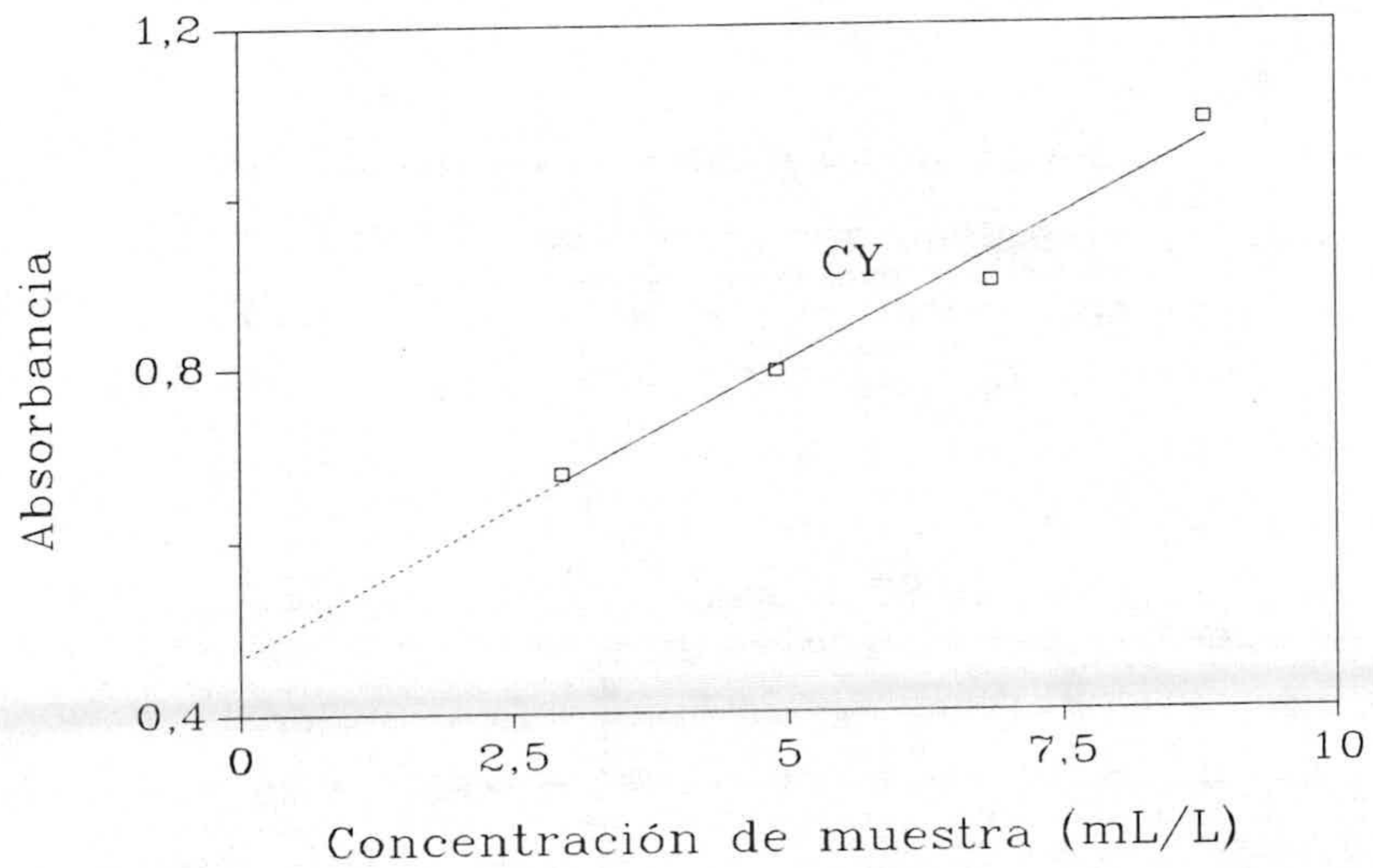
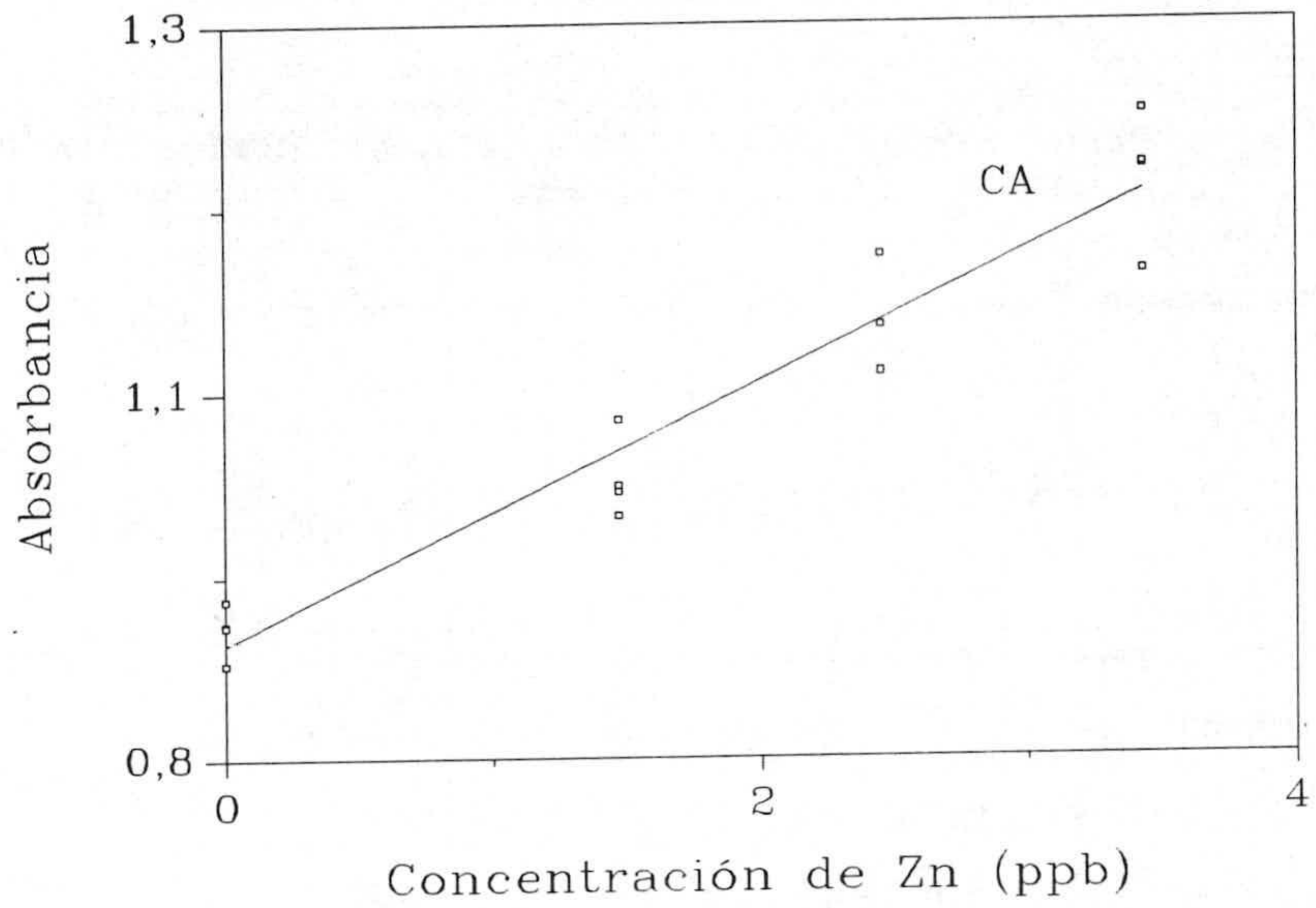


Figura IV.32. Rectas correspondientes a los calibrados establecidos para validar la determinación de cinc en leche por EFS.

En la tabla IV.79, se indican los parámetros estadísticos calculados para las rectas de calibrado.

Tabla IV.79. Parámetros estadísticos para los dos calibrados establecidos.

Parámetro	CA	CY
n	16	4
m	4	1
a	0'8785	0'4645
b	0'0893	67'9290
$s_{R,C}$	0'0326	0'0293

Puesto que la ordenada en el origen del calibrado de Youden, a_{CY} , no pertenece al intervalo de confianza correspondiente al término independiente del calibrado estándar, $0'3446 \pm 0'0713$, se concluye que existe componente de error sistemático constante y por lo tanto $BY \neq 0$.

Por extrapolación a $A = 0$ de los cuatro valores de la absorbancia, una vez restada a_{CY} , se obtiene tanto el contenido en cinc en cada una de las disoluciones preparadas como el contenido final en la muestra teniendo en cuenta el factor de dilución $f_{dil} = (510'5/2'5) \times (50/5)$. En la tabla IV.80, se recogen los resultados obtenidos.

Tabla IV.80. Resultados del método EFS.

Determinación nº	A	$C_{disolución}$ (ppb)	$C_{muestra}$ (ppm)
1	0'8922	4'79	9'78
2	0'8917	4'78	9'76
3	0'8658	4'49	9'17
4	0'9090	4'98	10'17

Por tanto, el contenido de cinc en la leche analizada encontrado por el método propuesto y expresado como $\bar{C}_{muestra} \pm s_{n-1}$ es:

$$C_{Zn} = (9'7 \pm 0'4) \text{ ppm}$$

5.2.2.- Determinación de cinc por el método de referencia

Para contrastar los resultados obtenidos por el método propuesto, se ha llevado a cabo la determinación mediante Espectroscopía de absorción atómica de llama.

Para ello, se ha hecho un calibrado por duplicado cuyos resultados y parámetros estadísticos se recogen en las tablas IV.81 y IV.82, respectivamente.

Tabla IV.81. Calibrado del método EAA.

C_{Zn} (ppb)	A	
0	0'000	0'000
200	0'033	0'032
400	0'063	0'063
600	0'091	0'093
800	0'122	0'123

A continuación, se aplicó la EAA a la determinación de cinc en tres alícuatas de muestra y por interpolación de las señales obtenidas sobre la recta de calibrado anterior, se determinó el contenido de cinc en la muestra de leche. Los resultados obtenidos, se indican en la tabla IV.83.

Tabla IV.82. Parámetros estadísticos para el método EAA.

Parámetro	Valor
$s_{R,C}$	$1'12 \times 10^{-3}$
a	$1'10 \times 10^{-3}$
s_a	$6'11 \times 10^{-4}$
b	$1'52 \times 10^{-4}$
s_b	$1'25 \times 10^{-6}$
r^2 (%)	99'95
Fallo de ajuste, P (%)	9'00

Tabla IV.83. Resultados del método EAA.

Determinación nº	A	$C_{disolución}$ (ppb)	$C_{muestra}$ (ppm)
1	0'073	473'03	9'46
2	0'072	466'45	9'33
3	0'072	466'45	9'33

El contenido de cinc en la leche analizada, encontrado por el método de referencia y expresado como $\bar{C}_{muestra} \pm s_{n-1}$ es:

$$C_{Zn} = (9'4 \pm 0'1) \text{ ppm}$$

Finalmente, con objeto de poner de manifiesto si hay concordancia entre los resultados obtenidos por la Espectroscopía de absorción atómica y los obtenidos por el método propuesto, se llevó a cabo un test de comparación de dos medias, según se recoge en el capítulo II. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.84.

Tabla IV.84. Comparación de los dos métodos analíticos.

	Mét. propuesto	Mét. EAA
$C_{Zn} (ppm)$	9'7	9'4
s^2	0'1701	0'0056
n	4	3
F_{cal}	30'38	$(P(s) = 3\%)$
g.l	3	
$t_{cal}(C)$	1'662	$(P(C) = 20\%)$

Valores críticos: $F_{(5\%;3g.l.;2g.l)} = 19'16$; $t_{(5\%;3g.l)} = 3'182$.

Como puede observarse, debido a que las varianzas de los conjuntos de datos son significativamente distintas ($F_{cal} > F_{tab}$; $P(s) < 5\%$), se han estimado los grados de libertad mediante la aproximación de Welch, y posteriormente se ha calculado el correspondiente estadístico $t(C)$ para la comparación de ambos resultados. Como $t_{cal} < t_{tab}$ ($P(C) > 5\%$), esto indica que no existen diferencias significativas entre ambos resultados y por tanto se acepta la veracidad del método propuesto.

BIBLIOGRAFÍA

- [1].- M.M. Morales, M.T. Montaña, G. Galán, *Analyst*, **112**, 467-471, 1987.
- [2].- G. González, R. Beltrán, J.L.G. Ariza, A.G. Pérez, *Quim. Anal.*, **8**(1), 81-90, 1989.
- [3].- R.B. Lucena, E. Morales, J.L.G. Ariza, *IL FARMACO*, **49**(4), 297-300, 1994.
- [4].- J. Krystek, J. Kubyleclea, B. Ptaszyński, *Chem. Anal. (Warsaw)*, **38**, 607-612, 1993.
- [5].- K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi, *Talanta*, **25**, 579-583, 1978.
- [6].- K. Yoshimura, S. Ohashi, *Memoirs of the Faculty of Science, Kyushu University, Ser. C*, **11**(2), 181-188, 1978.
- [7].- M. Kitano, J. Ueda, *Chem. Abstr.*, **74**, 71352 e, 1971.
- [8].- M. Tanaka, S. Funahashi, K. Shirai, *Anal. Chim. Acta*, **39**, 437-445, 1967.
- [9].- S. Ahrland, R.G. Herman, *Anal. Chem.*, **47**(14), 2422-2426, 1975.
- [10].- D. Nonova, V. Nenov, N. Lihareva, *Talanta*, **23**, 679-681, 1976.
- [11].- S. Shibata, "2-Pyridylazo Compounds in Analytical Chemistry", en: H.A. Flaschka, A.J. Barnard, "Chelates in Analytical Chemistry". Vol. IV, 116-164. Ed. Marcel Dekker, INC., New York, 1972.
- [12].- E. Gómez, J.M. Estela, V. Cerdà, M. Blanco, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **342**, 318-321, 1992.
- [13].- L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, M. Román Ceba, *Anal. Lett.*, **26**, 1243-1258, 1993.
- [14].- Monografía A.E.F.I., "Validación de Métodos Analíticos", Hewlett-Packard Eds., 1989.
- [15].- IUPAC. Analytical Chemistry Division, *Spectrochim. Acta B*, **33B**, 242-245, 1978.
- [16].- M.D.A. Jimenéz, M.A.P. Corvillo, A.C. Guzman, *Anales de Química*, **83**, 203-206, 1987.
- [17].- Z. Nan, G.Y. Xiang, L.Z. Ren, C.W. Yong, *Talanta*, **36**(7), 739-742, 1989.
- [18].- W.B. Qi, L.Z. Zhu, *Talanta*, **32**(10), 1013-1015, 1985.
- [19].- J.A. Dean, "Chemical Separation Methods". Cap. V, 86-125. Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1969.
- [20].- L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, F. Allés Barrero, C. Jimenéz Linares, M. Román Ceba, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **78**, 471-476, 1995.

CAPÍTULO V

DETERMINACIÓN DE CADMIO MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA.

El PAR forma un complejo estable con Cd(II) incluso en presencia de concentraciones relativamente altas de KI. Así, y tal como se ha puesto de manifiesto en el apartado 3.3.1 del capítulo anterior, solamente se tolera 1 ppb de Cd(II) en la determinación por Espectrofotometría en Fase Sólida de 25 ppb de Zn(II) con PAR y en presencia de una concentración de KI 2×10^{-3} M.

Estos hechos nos llevaron a plantear el estudio del complejo Cd(II)-PAR mediante EFS y proponer, si fuera posible, un método para la determinación de cadmio. Además, decidimos llevar a cabo dicho estudio en presencia de KI. El objetivo es poder conjugar las condiciones óptimas que se obtengan con las encontradas para la determinación de cinc y así, a continuación, abordar la determinación simultánea de ambos iones con PAR, sin necesidad de grandes manipulaciones.

El estudio del sistema Cd(II)-PAR se recoge en el presente capítulo y en el siguiente, la determinación simultánea de Zn(II) y Cd(II).

1.- ESTUDIOS PRELIMINARES

1.1.- Ensayos de fijación

En este apartado, se recogen los ensayos realizados en la elección del soporte más adecuado para la retención del complejo que forma el cadmio con el PAR. Los soportes ensayados fueron tres cambiadores de aniones; la resina Dowex 1X8 (100-200 mallas) y los Sephadex QAE A-25 y DEAE A-25, un cambiador catiónico (Sephadex SP C-25) y un soporte sin grupos de cambio (Sephadex G-15).

El procedimiento seguido fue el habitual con 500 ppb de Cd(II), una concentración de PAR 8×10^{-6} M y a pH 9'0 fijado con disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M. El tiempo de agitación fue de 10 minutos y los espectros fueron registrados frente a soporte equilibrado con agua de ósmosis inversa entre 400-750 nm.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.1, a partir de la cual se constata que el complejo se fija solo en los soportes aniónicos presentando la mayor absorbancia con el Sephadex QAE A-25.

Las pruebas llevadas a cabo en las mismas condiciones y sobre los soportes Sephadex previamente citados pero en presencia de KI ($3'9 \times 10^{-2}$ M) mostraron también, que el complejo se fija solamente sobre el Sephadex aniónico y que el KI no modifica ni la forma del espectro, ni la longitud de onda correspondiente a la máxima absorción aunque disminuye la absorbancia en la fase sólida. Para posteriores experiencias, se elige el soporte Sephadex QAE A-25.

1.2.- Espectros de absorción en disolución y en fase sólida en presencia de KI

El espectro en disolución acuosa se obtuvo a partir de una disolución que para un volumen final de 50 mL contenía 0'5 mL de disolución de Cd(II) de 8'6 ppm, 1'7 mL de disolución de KI 1'15 M, 1 mL de disolución de PAR $4'1 \times 10^{-4}$ M y 5 mL de tampón

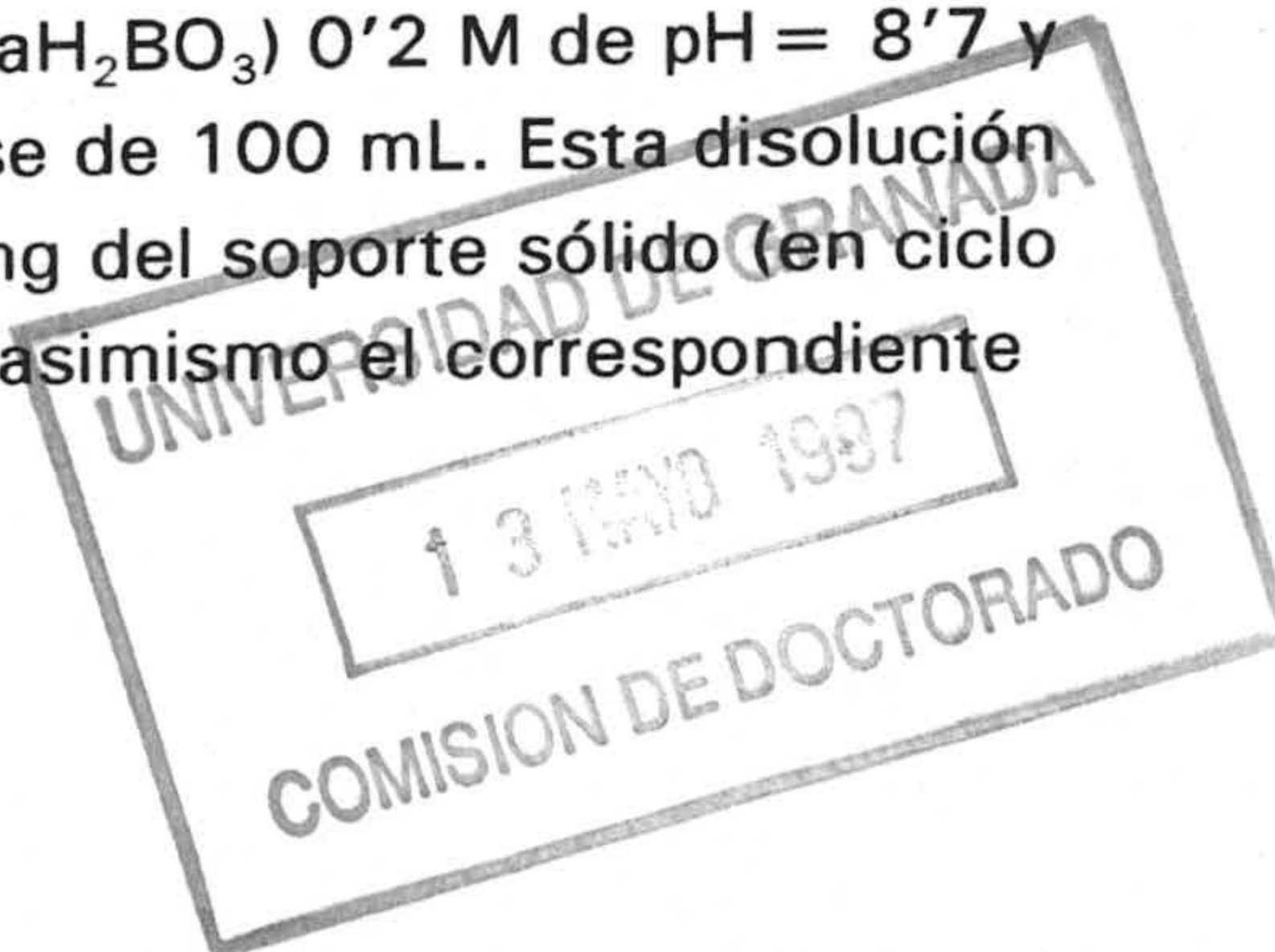
Tabla V.1. Ensayos de fijación del complejo Cd(II)-PAR a pH = 9'0 sobre distintos tipos de soportes.

Tipo de cambiador	Blanco		Analito	
	λ_{\max} (nm)	A_{\max}	λ_{\max} (nm)	A_{\max}
Resina Dowex 1X8 (100-200 mallas)	419 $A_{509 \text{ nm}} = 0'6251$	1'8488	509 $A_{419 \text{ nm}} = 0'6770$	2'1008
Sephadex DEAE A-25	419 $A_{504 \text{ nm}} = 0'4101$	2'7651	419 $A_{504 \text{ nm}} = 0'6938$	2'5228
Sephadex QAE A-25	419 $A_{504 \text{ nm}} = 0'3986$	2'7355	504 $A_{419 \text{ nm}} = 0'9438$	2'8190
Sephadex SP C-25	504 $A_{419 \text{ nm}} = 0'0017$	0'0046	504 $A_{419 \text{ nm}} = 0'0014$	0'0016
Sephadex G-15	419 $A_{504 \text{ nm}} = 0'0096$	0'0472	419 $A_{504 \text{ nm}} = 0'0136$	0'0397

($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$) 0'2 M de pH = 8'7. Se preparó de forma análoga una disolución de la sal monosódica del reactivo, aquí usada como blanco. Los espectros, medidos en cubetas de 1 cm de paso de luz, se recogen en la figura V.1.

El espectro neto del complejo (figura V.1, espectro 3) muestra un máximo de absorción alrededor de 496 nm. Esta longitud de onda concuerda con la señalada por Shibata [1], 495 nm a $8 < \text{pH} < 10$.

Los espectros en fase sólida, se obtuvieron del siguiente modo: se preparó una disolución que contenía 0'5 mL de disolución de Cd(II) de 17'5 ppm, 3'4 mL de KI 1'15 M, 2 mL de PAR $4'1 \times 10^{-4}$ M, 10 mL de tampón ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$) 0'2 M de pH = 8'7 y el agua de ósmosis inversa para que el volumen final fuese de 100 mL. Esta disolución se transfirió a un frasco de polietileno, se añadieron 80 mg del soporte sólido (en ciclo Cl) y la mezcla se agitó durante 10 minutos. Se preparó asimismo el correspondiente



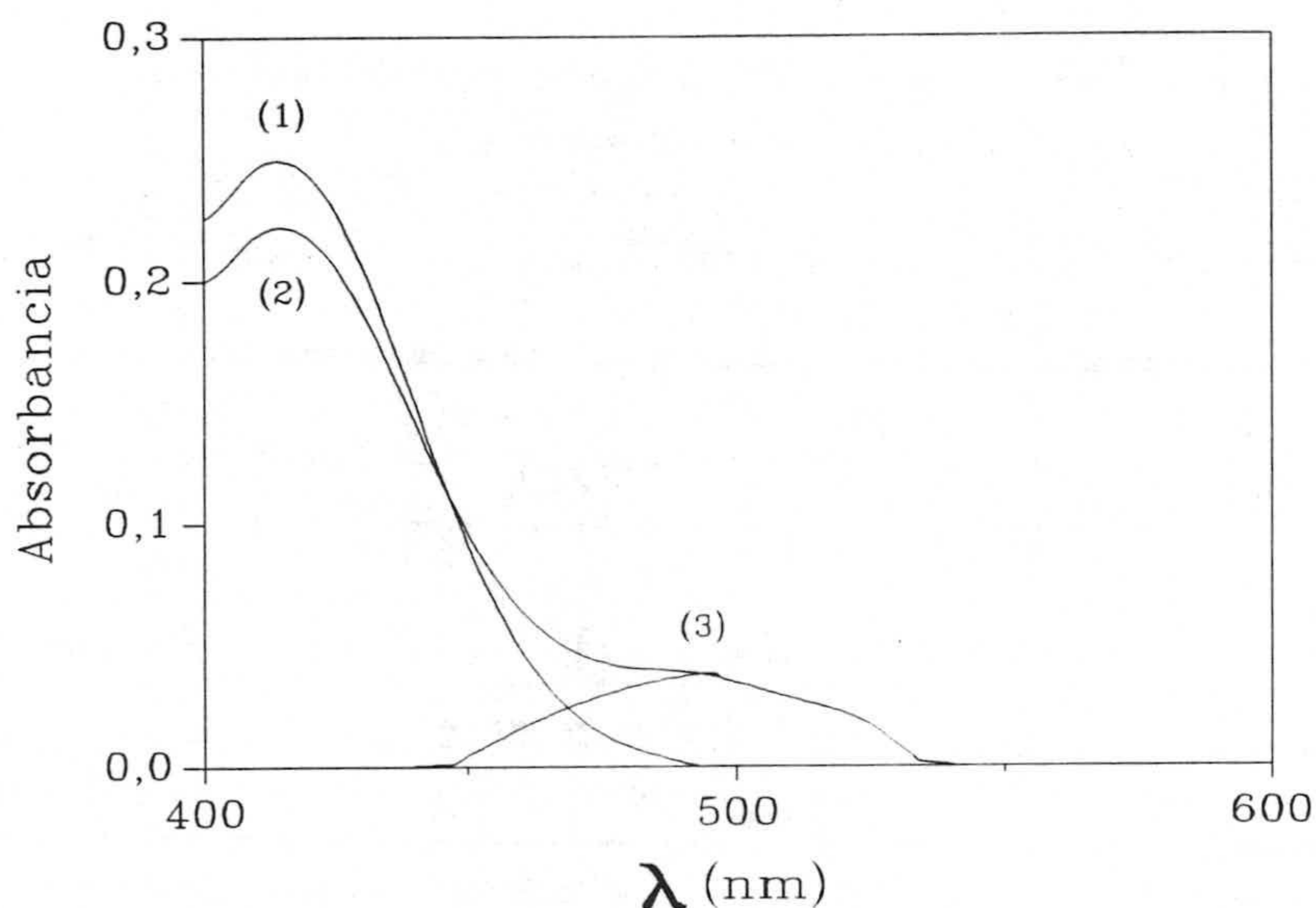


Figura V.1. Espectros en disolución. Espectro 1: blanco frente a agua; Espectro 2: complejo frente a agua; Espectro 3: complejo frente al blanco. $C_{Cd} = 86$ ppb, $[PAR] = 8'2 \times 10^{-6}$ M, $[KI] = 3'9 \times 10^{-2}$ M, $pH = 8'7$.

blanco en fase sólida y se operó en la forma habitual, obteniendo los espectros de la figura V.2. El espectro neto correspondiente al complejo muestra un máximo a 504 nm, longitud de onda próxima a la señalada por Yoshimura y col. [2], 510 nm a $pH = 10'0$.

Al comparar los espectros de las figuras V.1 y V.2, se puede observar que la fijación del complejo en el soporte provoca un ligero efecto batocrómico (de 8 nm) en el máximo de absorción. Por otra parte, se puede inferir que usando la Espectrofotometría en Fase Sólida se logra un aumento de sensibilidad.

Para posteriores experiencias, las longitudes de onda sobre las cuales se van a llevar a cabo las lecturas de la absorbancia son: 504 nm, λ_{max} del complejo y 750 nm, región donde sólo absorbe el soporte.

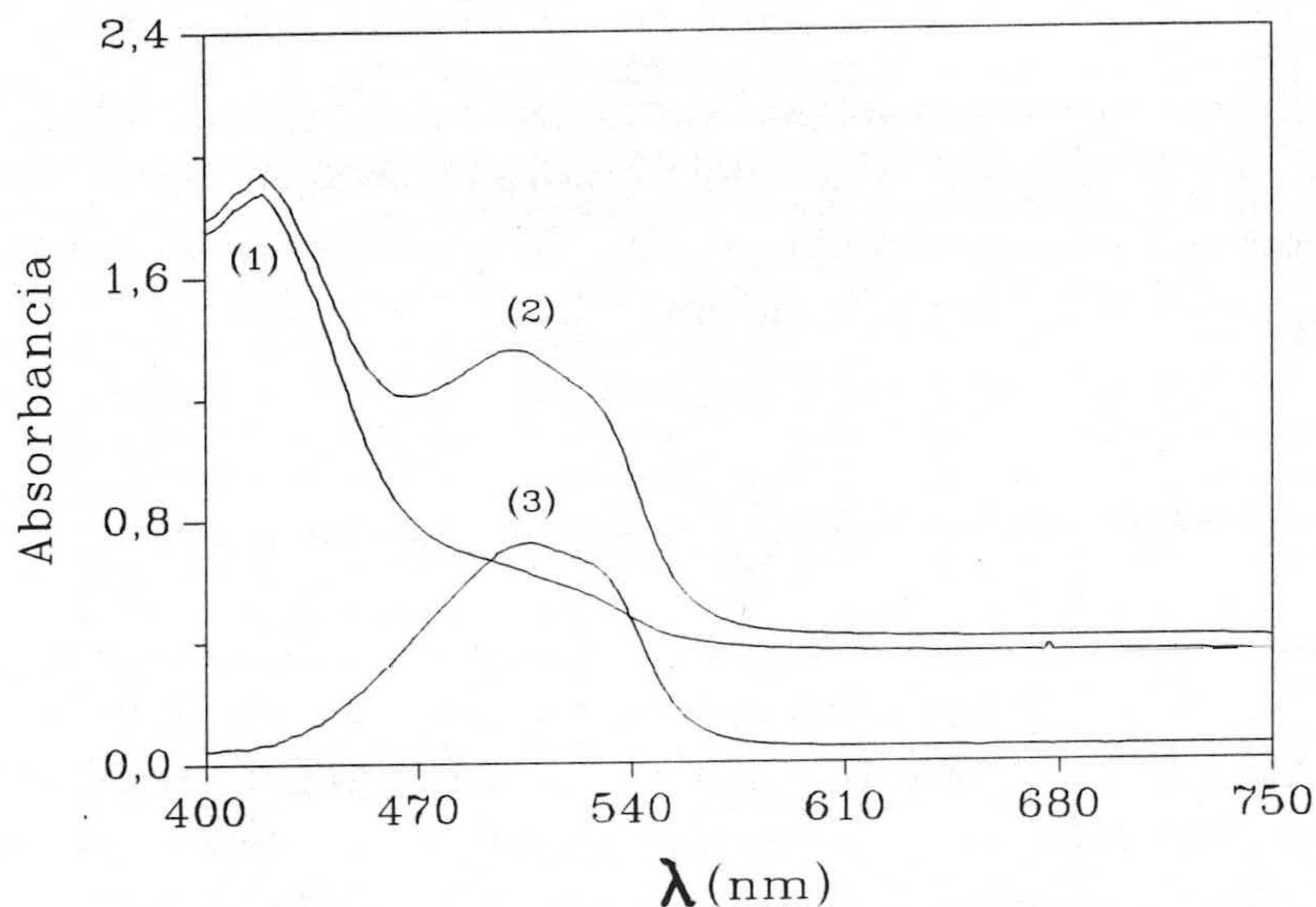


Figura V.2. Espectros en fase sólida. Espectro 1: blanco frente al soporte en agua; Espectro 2: complejo frente al soporte en agua; Espectro 3: complejo frente al blanco. $C_{Cd} = 87.5$ ppb, $[PAR] = 8.2 \times 10^{-6}$ M, $[KI] = 3.91 \times 10^{-2}$ M, $pH = 8.7$, $V = 100$ mL, 80 mg de Sephadex QAE A-25, $t_{agitación} = 10$ min.

2.- ESTUDIO DE LAS VARIABLES QUE CONDICIONAN LA FORMACIÓN Y LA FIJACIÓN DEL COMPLEJO

2.1.- Influencia del orden de adición

Para ver dicha influencia se operó, siguiendo dos órdenes de adición distintos, sobre 87.7 ppb de Cd(II), 7.96×10^{-6} M de PAR, 10^{-2} M de KI y a $pH = 8.7$ añadiendo 10 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0.2 M. Se usaron 80 mg de cambiador y un tiempo de agitación de 10 minutos. Los órdenes de adición fueron:



A la vista de los resultados obtenidos siguiendo el procedimiento operatorio habitual, parece que no hay diferencia importante al usar un orden de adición u otro, aunque a partir del segundo, se obtuvo una absorbancia neta algo mayor. Por ello, para posteriores experiencias, hemos elegido dicho orden de adición.

2.2.- Influencia del pH

Para llevar a cabo esta experiencia, se prepararon disoluciones que contenían 5 mL de disolución de Cd(II) de 1'755 ppm, 10 mL de disolución de KI 0'1 M, 2 mL de disolución de PAR $3'98 \times 10^{-4}$ M y 10 mL de disolución tampón ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$) 0'2 M de distintos valores de pH en 100 mL. Se emplearon 80 mg del cambiador y 10 minutos de agitación. Se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla V.2 y que se representan en la figura V.3.

Tabla V.2. Influencia del pH.

pH	A_b	A	A_{neta}
8'00	0'3495	0'9224	0'5729
8'50	0'2615	1'0193	0'7578
8'70	0'2449	1'0137	0'7688
8'90	0'2663	1'0406	0'7743
9'15	0'2769	1'1507	0'8738
9'40	0'2959	1'1880	0'8921
9'80	0'4026	1'4413	1'0387
9'90	0'4354	1'4911	1'0557

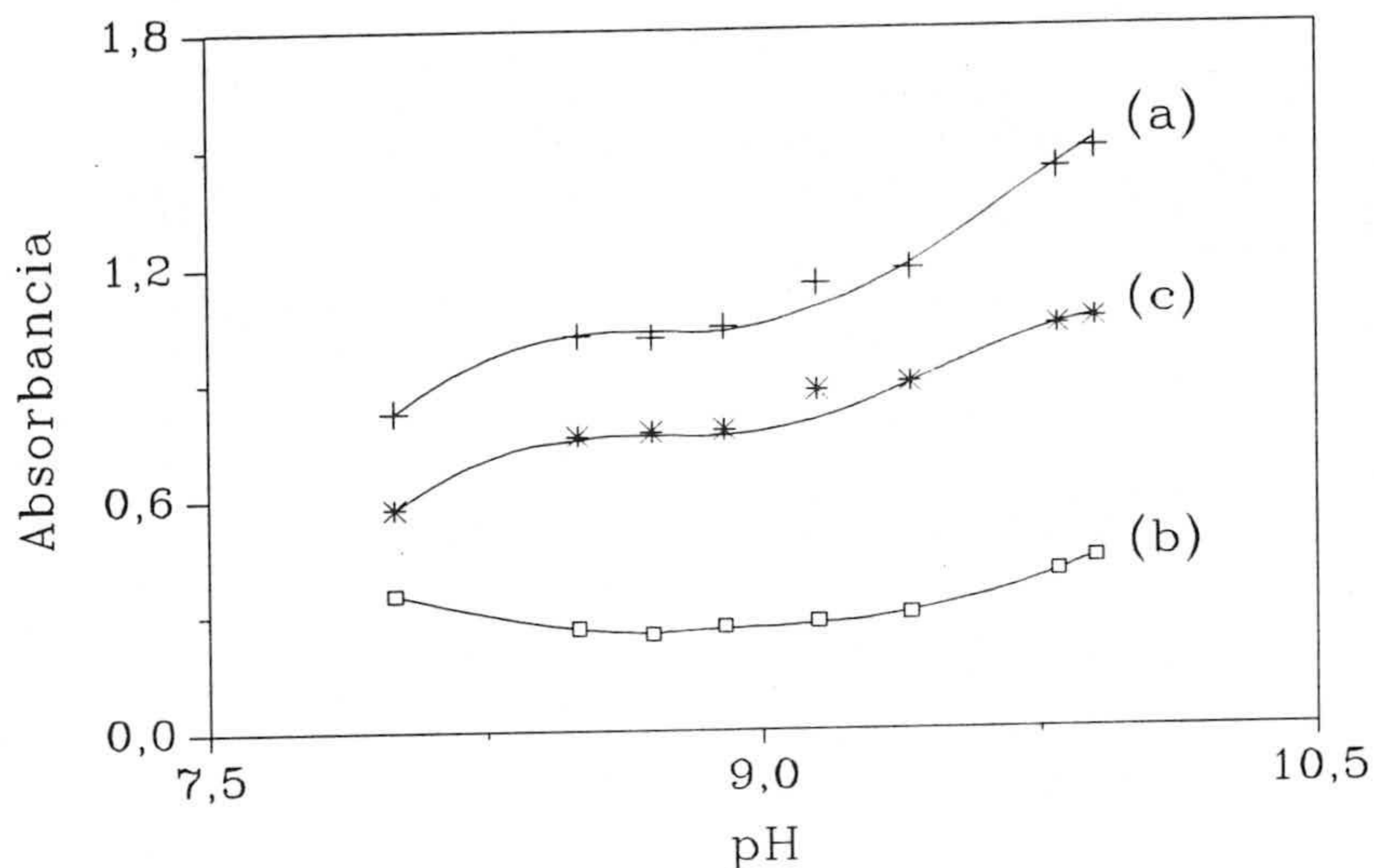


Figura V.3. Influencia del pH. a: analito; b: blanco y c: neta. $C_{Cd} = 87,7$ ppb, $[PAR] = 7,96 \times 10^{-6}$ M, $[KI] = 10^{-2}$ M, $V = 100$ mL, 80 mg de cambiador, $t_{agitación} = 10$ min.

Como se puede observar, existe una constancia de la absorbancia en la zona de pH comprendida entre 8'5-8'9. Por consiguiente se seguirá utilizando, para posteriores experiencias, el tampón de pH = 8'7.

2.3.- Concentración de la disolución reguladora

Con el objeto de determinar la concentración óptima de tampón, se operó sobre 87'7 ppb de Cd(II), $7,96 \times 10^{-6}$ M de PAR, 10^{-2} M de KI y cantidades crecientes de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M de pH = 8'7, siendo el volumen final de 100 mL.

Tras aplicar el procedimiento operatorio habitual, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla V.3. A partir de ésta, se observa que la máxima absorbancia corresponde a un rango de volúmenes de tampón entre 10 mL y 15 mL y se elige para

posteriores experiencias un volumen de 10 mL (concentración en los 100 mL, 2×10^{-2} M).

Tabla V.3. Concentración de tampón.

V (mL)	[Tampón] (M)	A_{neta}
5	0'01	0'7493
10	0'02	0'7971
15	0'03	0'8032
20	0'04	0'7752

2.4.- Optimización de KI y PAR utilizando los diseños de DOEHLERT

- Diseño I

Para ver la influencia conjunta del KI y el PAR, se optimizaron estas variables utilizando un primer diseño de Doehlert (figura V.4) cuyo nivel básico (0,0) se corresponde con las concentraciones 10^{-2} M de KI y $5'97 \times 10^{-6}$ M de PAR. Cada variación de una unidad en el valor codificado significa un cambio de $\pm 0'5 \times 10^{-2}$ M y $\pm 3'98 \times 10^{-6}$ M en las concentraciones de KI y PAR respectivamente. La concentración de Cd(II) fue 87'7 ppb y el pH se ajustó a 8'7 con tampón $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0'2 M.

Tras aplicar el procedimiento operatorio, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla V.4.

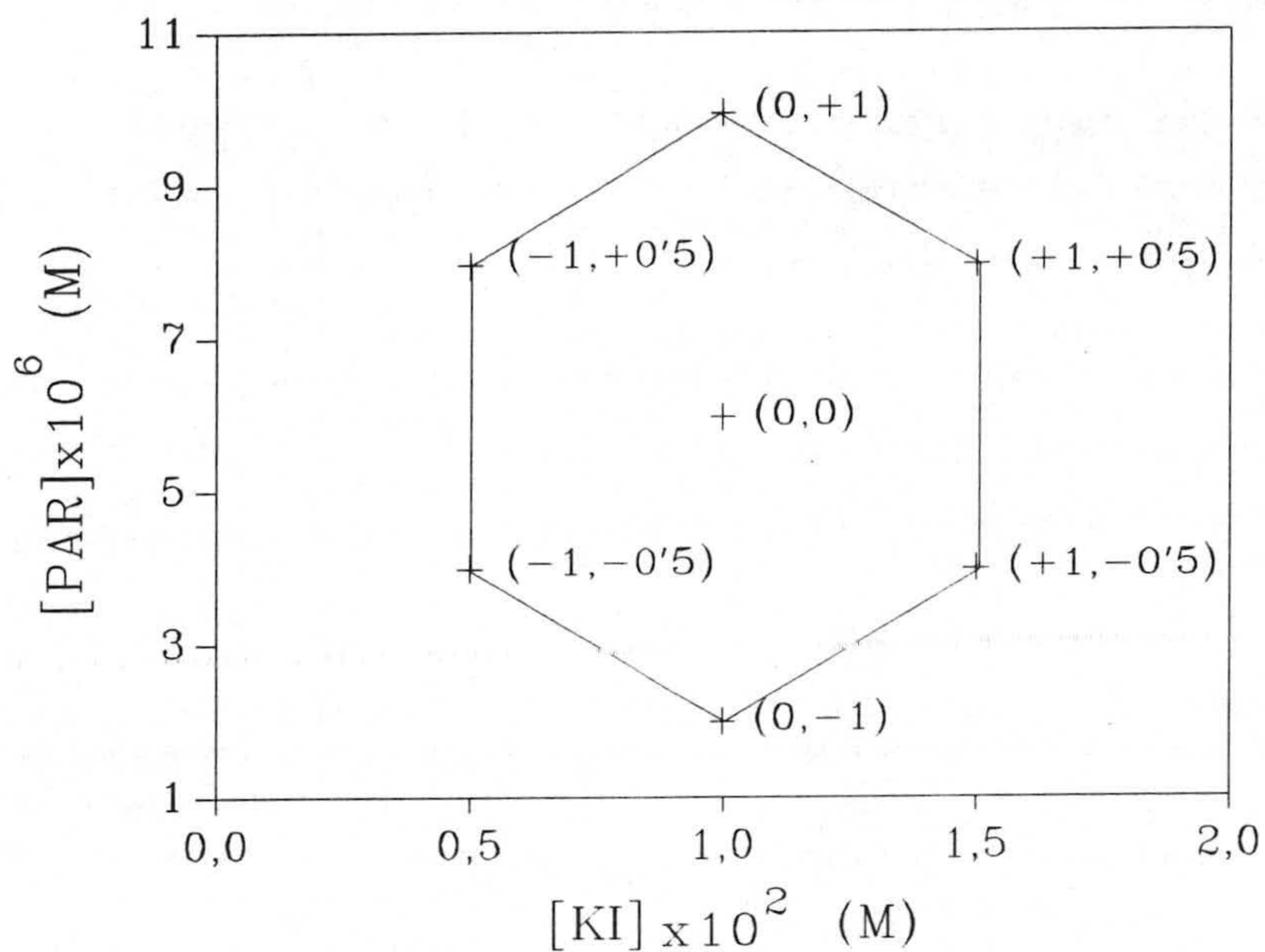


Figura V.4. Diseño I. Los valores codificados vienen entre paréntesis.

Tabla V.4. Variables y resultados correspondientes al diseño I.

Nº	V _{PAR} (mL)	[PAR]x10 ⁶	V _{KI} (mL)	[KI]x10 ²	A _{neta}
1	1'0	3'98 (-0'5)	15	1'5 (+1)	0'7136
2	2'0	7'96 (+0'5)	15	1'5 (+1)	0'7314
3	0'5	1'99 (-1)	10	1'0 (0)	0'5913
4	1'5	5'97 (0)	10	1'0 (0)	0'7756
5	2'5	9'95 (+1)	10	1'0 (0)	0'8065
6	1'0	3'98 (-0'5)	5	0'5 (-1)	0'8281
7	2'0	7'96 (+0'5)	5	0'5 (-1)	0'8840

* Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

Para tal fin, se procedió al análisis gráfico de los residuales, (figuras A.6 a A.8 del apéndice), comprobándose que se cumplen las condiciones de normalidad, homoscedasticidad e independencia.

Por otra parte, se observa que existe buena concordancia entre los valores de la absorbancia neta predichos por el modelo y los valores de absorbancia neta obtenidos experimentalmente (tabla V.4 y V.5), $r^2 = 0'9402$.

Tabla V.5. Valores de las absorbancias predichas por el diseño I.

Nº	A _{nete} predicha	Nº	A _{nete} predicha
1	0'691	5	0'787
2	0'754	6	0'805
3	0'615	7	0'910
4	0'777	--	----

* Análisis de la varianza (ANOVA)

De la tabla V.6, se deduce que ni los efectos lineales, ni los cuadráticos correspondientes a las concentraciones de KI y PAR son significativos. El único término cruzado que relaciona estas concentraciones, tampoco es significativo y por tanto no existe interacción entre dichas variables.

Tabla V.6. Análisis de la varianza.

Efecto	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P (%)
A: PAR	0'02117640	1	0'02117640	6'35	23'72
B: KI	0'01783560	1	0'01783560	5'34	25'62
AB	0'00036290	1	0'00036290	0'11	80'00
AA	0'00392193	1	0'00392193	1'18	46'65
BB	0'00127896	1	0'00127896	0'38	65'24
Error total	0'00333704	1	0'00333704		
Total (corr.)	0'05383408	6			

Los resultados experimentales de este diseño se ajustan a la función:

$$A_{\text{neta}} = 0'6848 + 0'0885[\text{PAR}] - 0'3392[\text{KI}] - 0'0096[\text{PAR}][\text{KI}] - 0'0048[\text{PAR}]^2 + 0'1314[\text{KI}]^2 \quad (1)$$

que recoge la relación de la absorbancia neta con las concentraciones molares de PAR (multiplicada por 10^6) y de KI (multiplicada por 10^2). La representación gráfica de dicha ecuación, que muestra la superficie de respuesta de este diseño, se recoge en la figura V.5. En ella, se observa la presencia de un punto de silla que como veremos a continuación, se confirma al aplicar el criterio de Lagrange sobre dicha función.

* Cálculo del óptimo

La aplicación del criterio de Lagrange sobre la función indica la presencia de un punto de silla puesto que el determinante hessiano es negativo: $H(\text{PAR}, \text{KI}) = -0'0026$.

A continuación, lo lógico sería calcular las direcciones de máxima variación de la absorbancia en los puntos $(-1, -0'5)$ y $(-1, +0'5)$ del diseño I (figura V.4), que

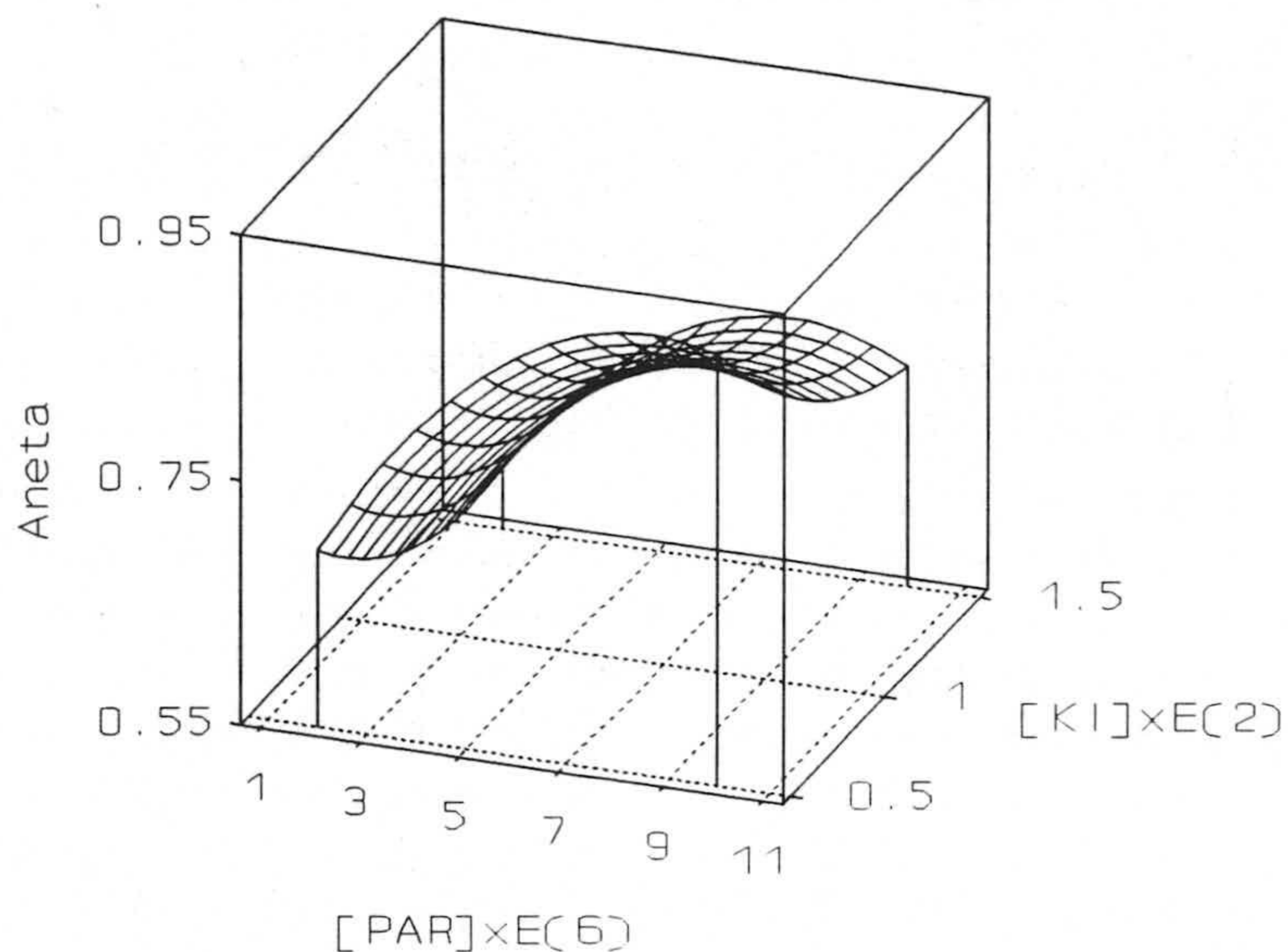


Figura V.5. Superficie de respuesta correspondiente al diseño I.

corresponden a la mínima concentración de KI, ya que ésta parece ser la dirección de aumento de la respuesta. Estos cálculos supondrían, posiblemente, determinar el cadmio en ausencia de KI.

Sin embargo, como se pretende llevar a cabo la determinación en presencia de KI, se calculan las direcciones en los puntos, que corresponden a la máxima concentración de KI, (+ 1, -0'5) y (+ 1, +0'5) del diseño I (figura V.6), resultando ser 64'9° y 6'1°. Las rectas trazadas a partir de los puntos y con las direcciones calculadas se cortan en un punto cuyas coordenadas son $7'77 \times 10^{-6}$ M en PAR y $3'27 \times 10^{-2}$ M en KI, señalando la posición del posible máximo.

- Diseño II

Se realiza a continuación un segundo diseño (figura V.6) de modo que englobe la región donde se encuentra el posible máximo previamente calculado.

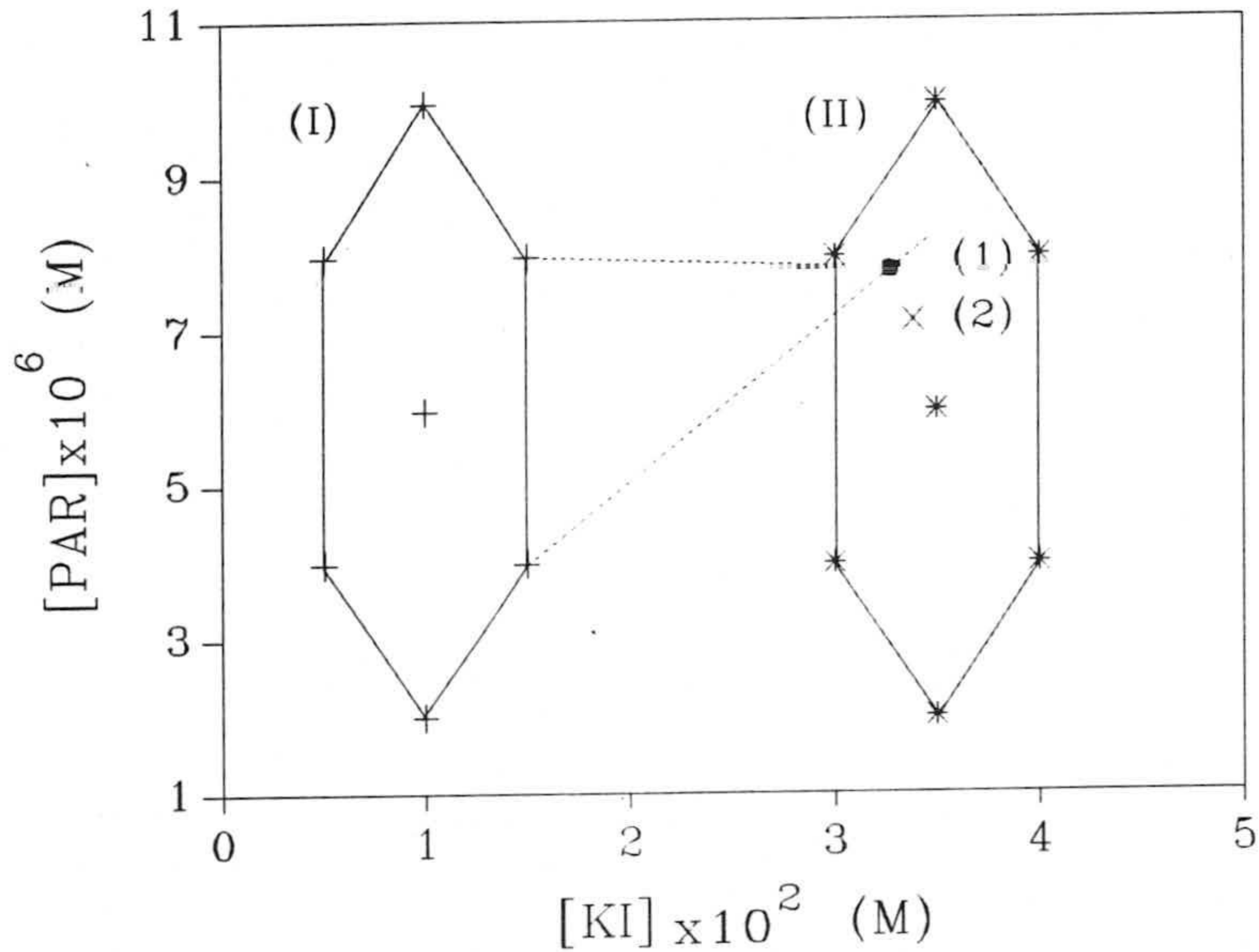


Figura V.6. Representación conjunta de los diseños I y II. (1): máximo estimado a partir del diseño I, (2): máximo obtenido a partir del diseño II.

Para llevar a cabo el segundo diseño, se procede de la misma manera que en el apartado anterior. Los volúmenes de PAR y KI agregados así como los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.7.

Tabla V.7. Variables y resultados correspondientes al diseño II.

Nº	V _{PAR} (mL)	[PAR]x10 ⁶	V _{KI} (mL)	[KI]x10 ²	A _{neta}
8	0'5	1'99 (-1)	3'5	3'5 (+5)	0'3281
9	1'0	3'98 (-0'5)	4'0	4'0 (+6)	0'5481
10	1'0	3'98 (-0'5)	3'0	3'0 (+4)	0'6006
11	1'5	5'97 (0)	3'5	3'5 (+5)	0'7793
12	2'0	7'96 (+0'5)	4'0	4'0 (+6)	0'6182
13	2'0	7'96 (+0'5)	3'0	3'0 (+4)	0'7111
14	2'5	9'95 (+1)	3'5	3'5 (+5)	0'6873

* Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

La observación de las representaciones gráficas de los residuales nos mostró el cumplimiento de la normalidad, homoscedasticidad e independencia necesarias para la aplicación del modelo.

Por otra parte, existe una buena concordancia entre los valores de la absorbancia neta predichos por el modelo y los valores de absorbancia obtenidos experimentalmente (tablas V.7 y V.8), $r^2 = 0'9578$.

* Análisis de la varianza

Se puede deducir, a partir de la tabla V.9, que ni los efectos lineales ni los cuadráticos correspondientes a las concentraciones de KI y PAR son significativos. El término cruzado que relaciona estas concentraciones tampoco es significativo y por tanto no existe interacción entre dichas variables.

Tabla V.8. Valores de las absorbancias predichas por el diseño II.

Nº	A _{neta} predicha	Nº	A _{neta} predicha
8	0'358	12	0'649
9	0'518	13	0'743
10	0'571	14	0'660
11	0'780	---	-----

Tabla V.9. Análisis de la varianza.

Efecto	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P (%)
A: PAR	0'06735008	1	0'06735008	12'67	17'20
B: KI	0'00528529	1	0'00528529	0'99	50'94
AB	0'00040804	1	0'00040804	0'08	83'03
AA	0'04917771	1	0'04917771	9'25	19'94
BB	0'01000961	1	0'01000961	1'88	39'47
Error total	0'00531633	1	0'00531633		
Total (corr.)	0'12831277	6			

A partir de los resultados experimentales de la tabla V.7, se obtuvo la nueva función polinómica:

$$A_{neta} = -4'5173 + 0'2779[PAR] + 2'5611[KI] - 0'0102[PAR][KI] - 0'0171[PAR]^2 - 0'3676[KI]^2. \quad (2)$$

que recoge la relación existente entre la señal neta experimental con las concentraciones molares de PAR y KI (multiplicadas respectivamente por 10⁶ y 10²). Dicha ecuación, se representa en la figura V.7 que muestra la superficie de respuesta correspondiente a este

diseño II.

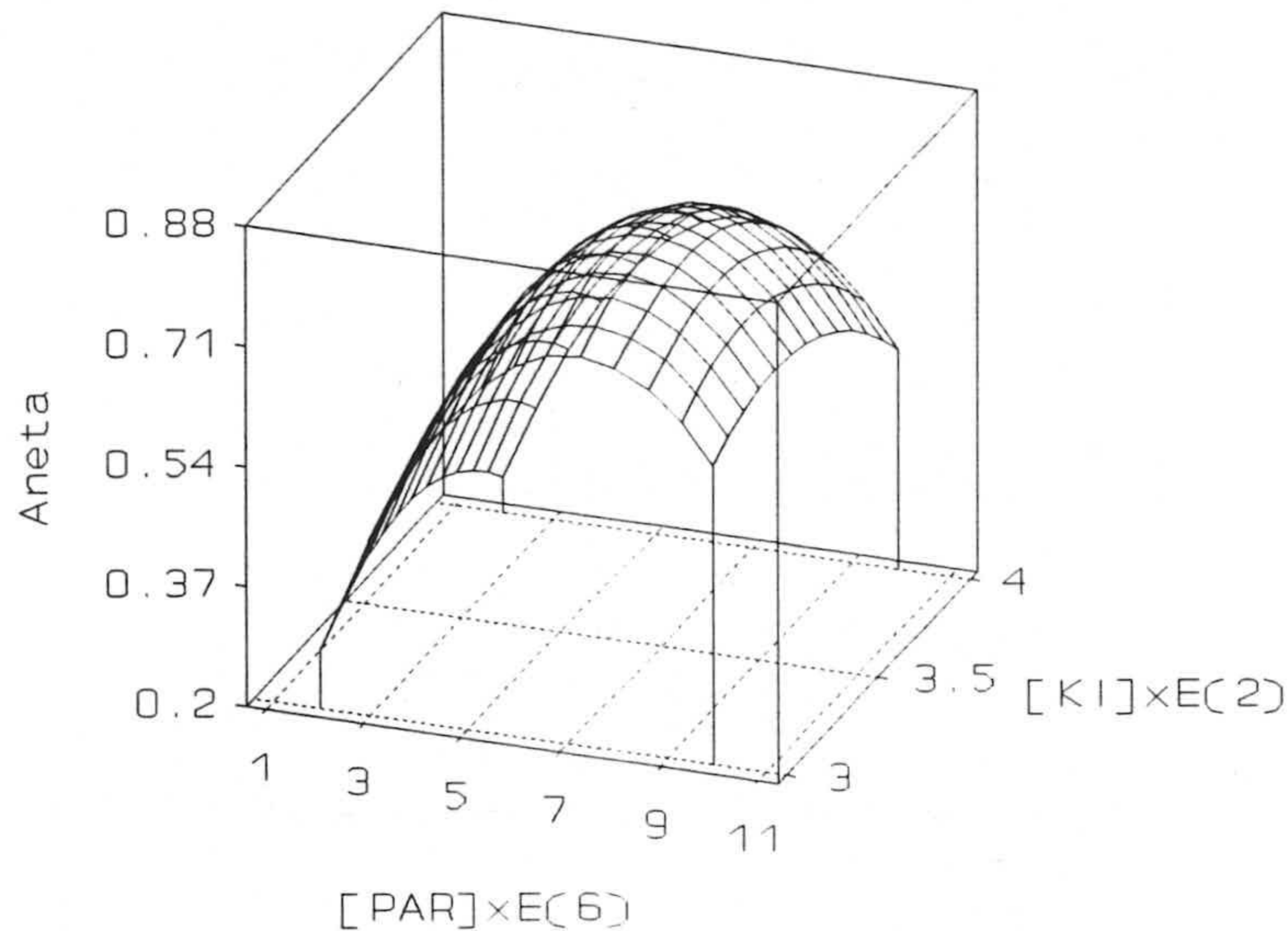


Figura V.7. Superficie de respuesta correspondiente al diseño II.

* Cálculo del óptimo

Al aplicar el criterio de Lagrange tenemos que: el determinante hesiano $H(\text{PAR}, \text{KI}) = 0'0250 > 0$ y tanto $\partial^2 A / \partial [\text{KI}]^2 = -0'7352$ como $\partial^2 A / \partial [\text{PAR}]^2 = -0'0342$ son < 0 , esto indica la presencia del máximo buscado, tal y como se observa en la figura V.7, y corresponde a $7'12 \times 10^{-6}$ M en PAR y $3'38 \times 10^{-2}$ M en KI. Como se puede observar, estas coordenadas correspondientes al máximo calculado no difieren mucho de las del máximo estimado a partir del diseño I.

*** Variación de la concentración de PAR a [KI] = cte**

La influencia de la concentración de PAR sobre la absorbancia neta a una concentración fija de KI (3.4×10^{-2} M), es la siguiente:

$$A_{\text{neta}} = -0.0604 + 0.2434[\text{PAR}] - 0.0171[\text{PAR}]^2$$

donde la concentración molar de PAR viene multiplicada por 10^6 .

En la tabla V.10, se recogen los valores predichos para la absorbancia neta al reemplazar en la ecuación anterior, la concentración de PAR por distintos valores.

Tabla V.10. Influencia de la concentración de PAR a $[\text{KI}] = 3.4 \times 10^{-2}$ M.

$[\text{PAR}] \times 10^6$	A_{neta} predicha	$[\text{PAR}] \times 10^6$	A_{neta} predicha
1.99	0.356	6.97	0.805
2.99	0.514	7.96	0.794
3.98	0.637	8.96	0.748
4.98	0.728	9.95	0.668
5.97	0.783	---	-----

A partir de estos datos, que se representan en la figura V.8, se deduce que el máximo se encuentra en el rango de concentraciones de PAR entre 6×10^{-6} y 8×10^{-6} M.

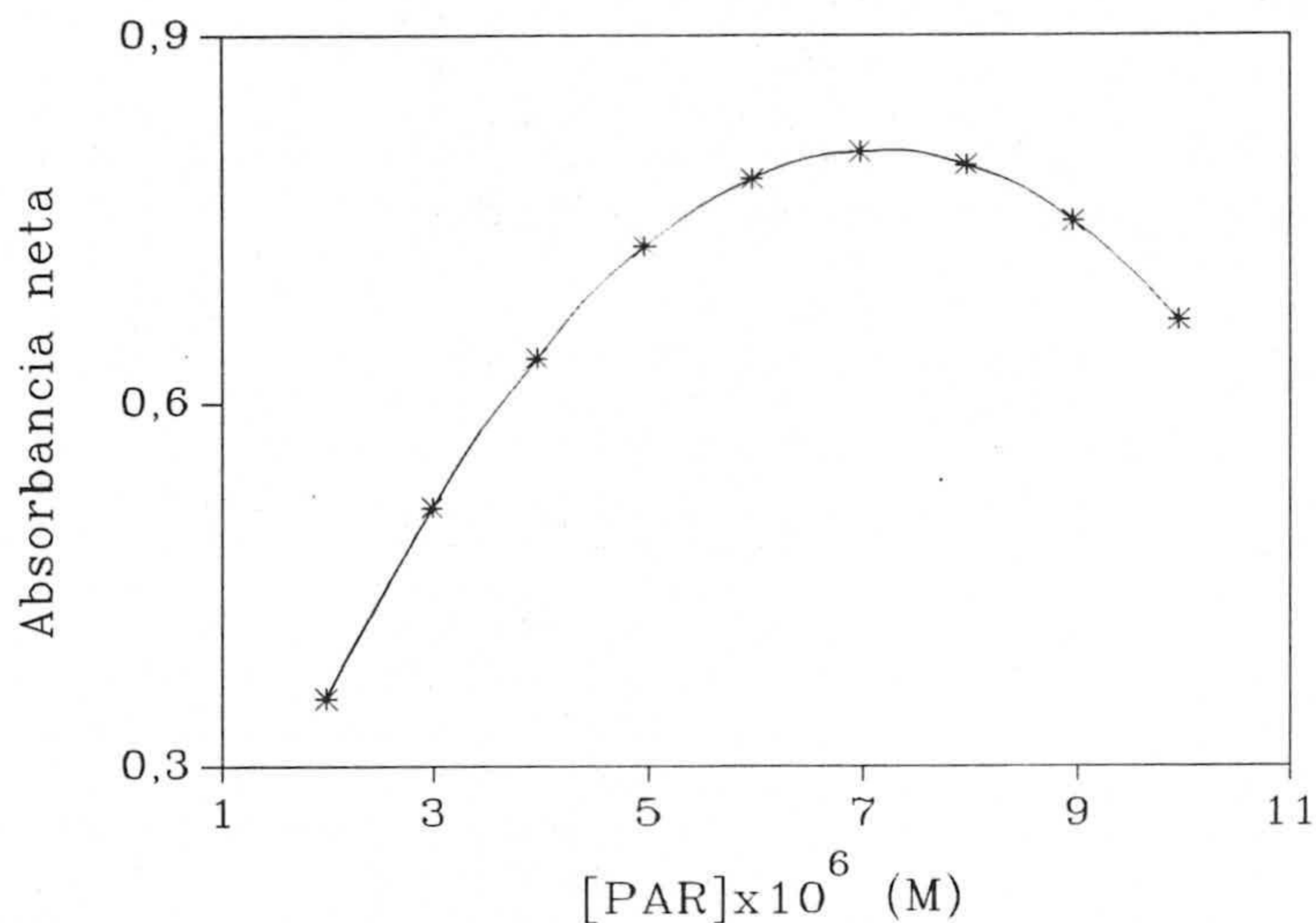


Figura V.8. Variación de la señal con la concentración de PAR a [KI] = cte.

*** Variación de la concentración de KI a [PAR] = cte**

La relación entre la absorbancia neta y la concentración de KI a una concentración de PAR, $7,1 \times 10^{-6}$ M, es:

$$A_{\text{neta}} = -3,4055 + 2,4885[\text{KI}] - 0,3676[\text{KI}]^2$$

donde la concentración molar de KI está multiplicada por 10^2 .

En la tabla V.11 y figura V.9, se recogen los valores predichos de absorbancia neta para distintas concentraciones de KI, mostrando máxima absorbancia en el rango de concentraciones de KI comprendido entre $3,2 \times 10^{-2}$ y $3,6 \times 10^{-2}$ M.

Las concentraciones de PAR y KI seleccionadas, para posteriores experiencias, son $7,1 \times 10^{-6}$ M y $3,4 \times 10^{-2}$ M respectivamente.

Tabla V.11. Influencia de la concentración de KI a $[PAR] = 7'1 \times 10^{-6} M$.

$[KI] \times 10^2$	A_{neta} predicha
3'0	0'752
3'2	0'793
3'4	0'806
3'6	0'789
3'8	0'743
4'0	0'667

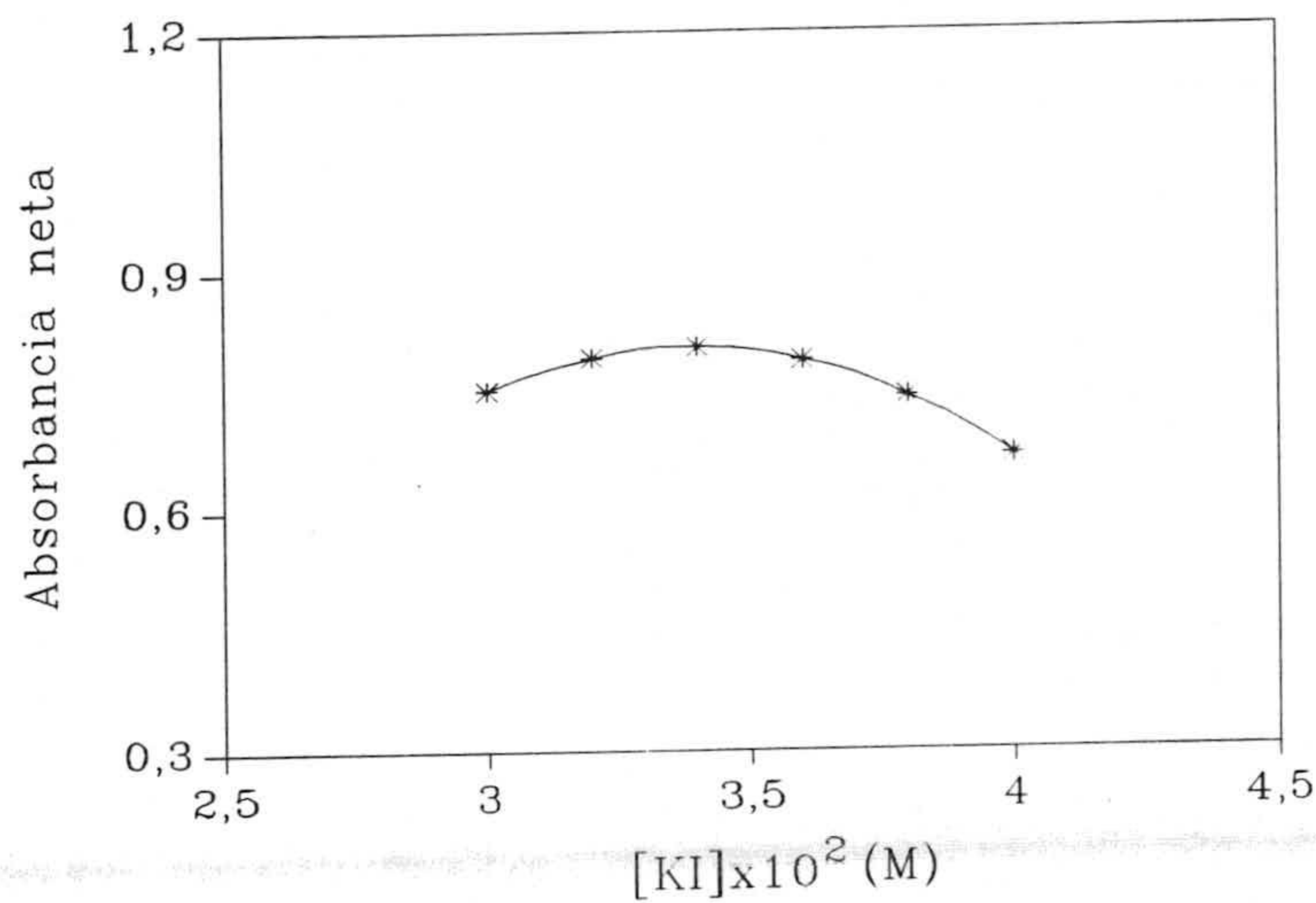


Figura V.9. Variación de la señal con la concentración de KI a $[PAR] = cte$.

2.5.- Estabilidad del complejo fijado en el cambiador

Para saber cuál es la estabilidad del complejo una vez formado y fijado en el cambiador, se prepara una pareja de disoluciones (blanco y analito) y se llevan a cabo diferentes medidas a lo largo del tiempo.

En esta experiencia y en las siguientes, la forma operatoria es como sigue: En un frasco de polietileno de 1L de capacidad se introducen 100 mL de disolución de Cd(II) de 87'7 ppb, a la cual se añaden 3'4 mL de disolución de KI 1'15 M, 2 mL de PAR $4'10 \times 10^{-4}$ M y 10 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M de pH = 8'7. Se agregan 80 mg de cambiador y se agita 10 minutos. El blanco, se prepara de la misma manera. Los resultados obtenidos, tras aplicar el procedimiento operatorio habitual, (tabla V.12), muestran que el complejo se puede considerar estable durante al menos una hora.

Tabla V.12. Estabilidad del complejo en el cambiador.

t (min)	A _{neta}	t (min)	A _{neta}
0	0'7270	25	0'7227
5	0'7227	30	0'7245
10	0'7224	40	0'7246
15	0'7222	50	0'7250
20	0'7192	60	0'7248

2.6.- Influencia de la fuerza iónica

Para establecer la influencia que ejerce la fuerza iónica del medio sobre la absorbancia neta del complejo se preparan varias disoluciones que contienen 100 mL de disolución de Cd(II) de 87'7 ppb y cantidades variables de NaCl.

Tras aplicar el procedimiento operatorio descrito en el apartado anterior, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla V.13. En ésta se indica, para cada volumen de NaCl adicionado, la fuerza iónica total, μ (suma de la aportada por el NaCl y la aportada por el tampón, μ_0), el aumento de la fuerza iónica que supone, μ/μ_0 , y la absorbancia neta obtenida.

Tabla V.13. Influencia de la fuerza iónica.

mL NaCl (0'705 M)	$\mu \times 10^2$ M	μ/μ_0	A_{neta}
0'0	1'73	1'00	0'6960
0'1	1'79	1'03	0'6906
0'4	1'97	1'14	0'6854
0'5	2'04	1'18	0'6529
0'9	2'28	1'32	0'6520
1'0	2'34	1'35	0'6553
1'4	2'59	1'50	0'6330
2'3	3'14	1'82	0'6137
3'5	3'87	2'24	0'5588
4'6	4'54	2'62	0'5597
9'3	7'41	4'28	0'4823
13'9	10'22	5'91	0'4802

La representación gráfica de la absorbancia neta frente al aumento de la fuerza iónica (figura V.10) permite una observación clara de la influencia de esta variable en el sistema.

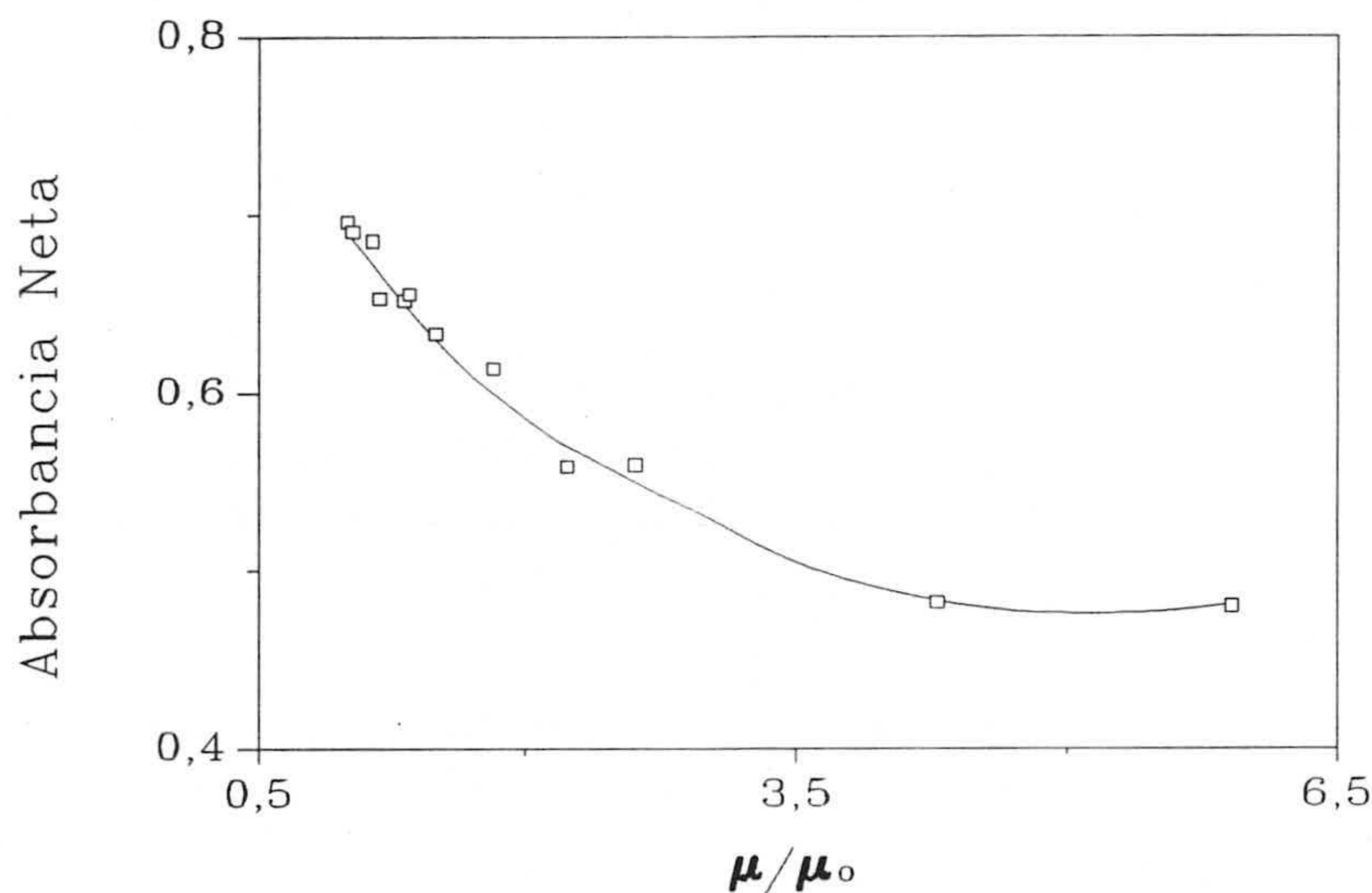


Figura V.10. Influencia de la fuerza iónica.

2.7.- Influencia del tiempo de agitación

Para ver la influencia de dicho parámetro, se operó sobre 76'0 ppb de Cd(II), con concentraciones de KI y PAR $3'4 \times 10^{-2}$ M y $7'1 \times 10^{-6}$ M, respectivamente y fijando el pH en 8'7 con la disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M.

Tras agitar durante tiempos variables y aplicar el procedimiento operatorio normal, se obtuvieron los resultados que se reflejan en la tabla V.14.

A la vista de los datos, se observa que es necesario un tiempo de agitación de al menos 10 minutos para alcanzar la máxima absorbancia, tiempo que seguiremos empleando para posteriores experiencias.

Tabla V.14. Influencia del tiempo de agitación.

t(min)	A _{neta}
5	0'6127
10	0'7027
15	0'6959
20	0'7101

2.8.- Resumen de las variables optimizadas

Los valores óptimos hallados en el estudio de las variables que afectan al sistema Cd(II)-PAR en presencia de KI, se resumen en la tabla V.15.

Tabla V.15. Resumen de las variables optimizadas para un volumen de 100 mL.

Variable	Valor óptimo
Orden de adición	Cd(II) + KI + PAR + Tampón
[PAR]	$7'1 \times 10^{-6}$ M
[KI]	$3'4 \times 10^{-2}$ M
[Tampón], pH = 8'7	$1'7 \times 10^{-2}$ M
Cantidad de soporte	0'08 g
Tiempo de agitación	10 minutos
$\lambda_{medida} / \lambda_{empaquetamiento}$	504/750 nm
Estabilidad	1 hora

3.- ESTABLECIMIENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

3.1.- Método para 100 mL

3.1.1.- Calibrado del método. Parámetros de fiabilidad

Para establecer el intervalo de dependencia lineal entre la absorbancia y la concentración de cadmio, se introducen en frascos de polietileno de 1L, 100 mL de agua de ósmosis inversa con cantidades variables y crecientes de disolución de Cd(II) de 17'55 ó 87'75 ppm, a los cuales se adicionan 3'4 mL de disolución de KI 1'154 M, 2 mL de disolución de PAR $4 \cdot 10 \times 10^{-4}$ M y 10 mL de disolución reguladora de pH = 8'7 y se sigue el procedimiento operatorio común.

Los datos obtenidos se recogen en las dos primeras columnas de la tabla V.16 y se representan en la figura V.11.

El análisis de estos datos utilizando el coeficiente de variación de los factores de respuesta [3], que se recoge en las tres columnas de la tabla V.16, indica que el límite superior del método corresponde a la concentración de Cd(II) de 190'10 ppb, ya que el valor de la desviación estándar relativa de los factores de respuesta encontrados se mantiene constante (alrededor de 4'2 %).

Sin embargo, el análisis mediante la regresión robusta usando el programa "PROGRESS", muestra la presencia de sólo tres puntos que son "outlier-leverage", los que corresponden a las concentraciones 380'20, 456'24 y 532'28 ppb de Cd(II).

Tabla V.16. Coeficiente de variación de los factores de respuesta.

C_{Cd} (ppb)	A_{neta}	$f.r$	$\overline{f.r}$	DER (%)
30'42	0'2664	0'0088	-----	---
60'83	0'5173	0'0085	-----	---
91'25	0'8473	0'0093	-----	---
121'66	1'1322	0'0093	0'0090	4'5
152'08	1'3857	0'0091	0'0090	3'9
190'10	1'6232	0'0085	0'0089	4'1
228'12	1'7818	0'0078	0'0088	6'1
304'16	2'4383	0'0080	0'0087	6'5
380'20	2'6639	0'0070	0'0085	9'0
456'24	2'8918	0'0063	0'0083	11'9
532'28	3'0654	0'0058	0'0080	15'0

A continuación, para el rango de concentraciones de Cd(II) comprendido entre 0'00 y 121'66 ppb se han obtenido tres réplicas de cada concentración (tabla V.17) se ha analizado la regresión lineal de los datos encontrando que el test de curvatura no es significativo ($P = 99'81\%$) y por tanto el límite superior elegido, 121'66 ppb, es correcto.

La ecuación de la recta de calibrado, deducida de la regresión por mínimos cuadrados, es:

$$A = 0'1977 + 0'0092C_{Cd}$$

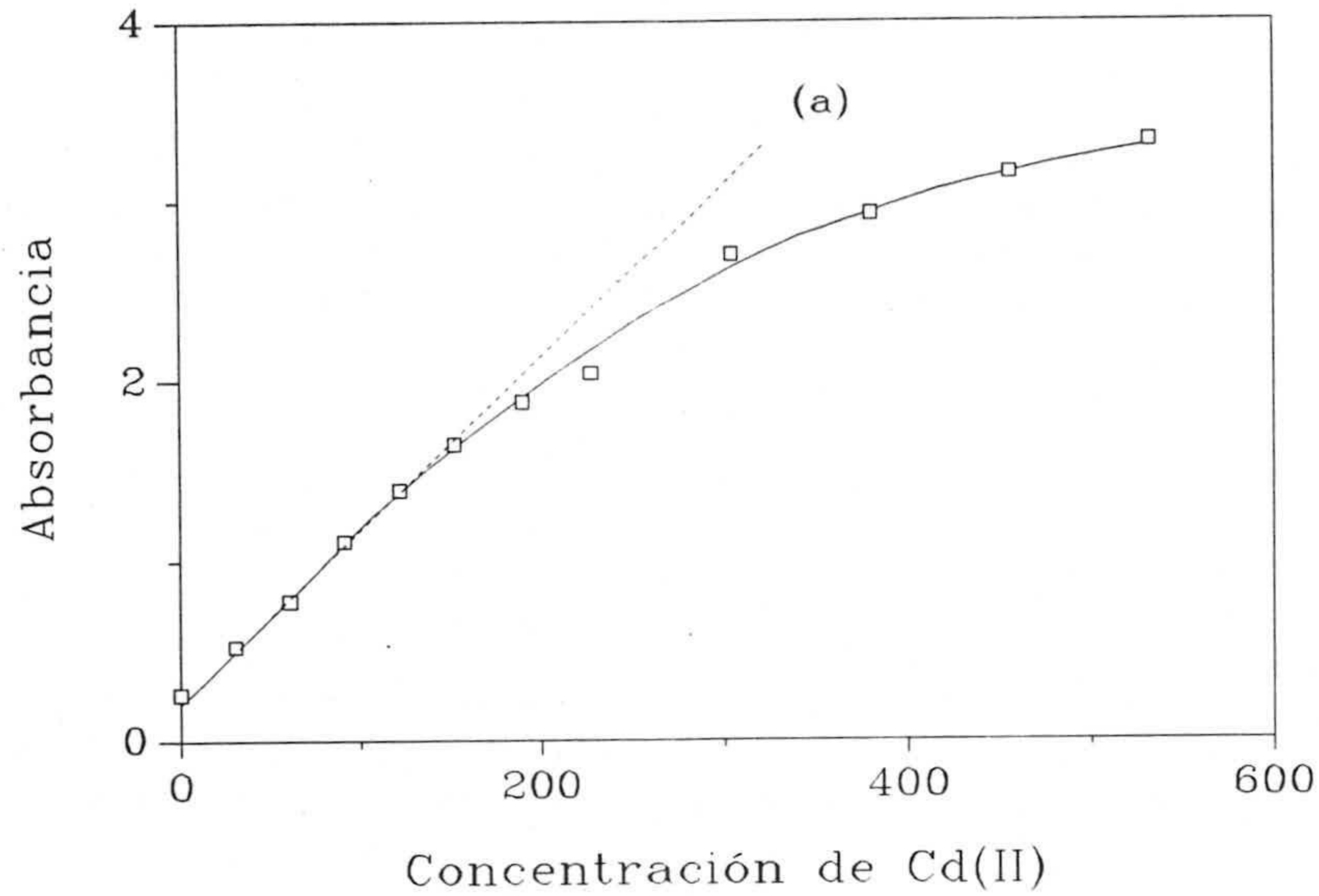


Figura V.11. Curva de calibrado del sistema Cd(II)-PAR en presencia de KI. a: recta de calibrado correspondiente a 0-122 ppb. [KI] = 3.4×10^{-2} M, [PAR] = 7.1×10^{-6} M, pH = 8.7, V = 115.4 mL, 80 mg de Sephadex QAE A-25, $t_{\text{agitación}} = 10$ min.

Tabla V.17. Calibrado por triplicado del método.

C_{Cd} (ppb)	A		
0'00	0'1873	0'1665	0'2377
30'42	0'4791	0'4797	0'4852
60'83	0'7304	0'7431	0'7963
91'25	1'0441	0'9972	1'0878
121'66	1'2603	1'3901	1'3164

En la tabla V.18 se indican los principales parámetros estadísticos de la ecuación de la recta de calibrado del método.

Tabla V.18. Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	15
m	3
$s_{R,C}$	0'0370
a	0'1977
s_a	0'0165
b	0'0092
s_b	0'00002
r^2 (%)	99'26

Repetibilidad

Se obtuvo midiendo, en el mismo día, la absorbancia de disoluciones a concentración "cero" (blanco) y a 76 ppb de cadmio y a las cuales se les aplicó el procedimiento habitual. Los valores medios de las señales así como la desviación estándar de los mismos se muestran en la tabla V.19.

Reproducibilidad

Mediante el estudio de la medida, en distintos días, de la absorbancia de disoluciones a las mismas concentraciones que en el apartado anterior y siguiendo el procedimiento habitual, se obtuvieron los valores medios de las señales así como la desviación estándar de los mismos (tabla V.20).

Tabla V.19. Repetibilidad del método de 100 mL.

	Blanco	Neta
C_{Cd} (ppb)	0	76
n	10	10
\bar{A}	0'2048	0'7112
s_{n-1}	0'0225	0'0244

C_{Cd} : concentración de cadmio a la cual se llevó el estudio; n: número de determinaciones.

Tabla V.20. Reproducibilidad del método de 100 mL.

	Blanco	Neta
C_{Cd} (ppb)	0	76
n	26	26
\bar{A}	0'1770	0'6960
s_{n-1}	0'0237	0'0252

C_{Cd} : concentración de cadmio a la cual se llevó el estudio; n: número de determinaciones.

Parámetros de fiabilidad

El cálculo de éstos parámetros se ha llevado a cabo, tal y como se recoge en el Capítulo II, utilizando los protocolos de la IUPAC [4] y de Cuadros Rodríguez y col. [5]. Los parámetros calculados se recogen en la tabla V.21, a partir de la cual se observa que, a pesar de utilizar réplicas, los límites de detección y de cuantificación calculados con el protocolo de la IUPAC son inferiores a aquellos obtenidos utilizando los datos de calibrado debido probablemente a que existe variabilidad en los datos del calibrado (el error experimental que afecta a la regresión, $s_{R,C}$, es alto).

Tabla V.21. Parámetros de fiabilidad.

Parámetro	Valor
- Linealidad	
"on-line" (%)	99'81
"in-line" (%)	97'83
- Sensibilidad	
IUPAC (unidad de abs./ppb)	0'0092
analítica (b/s _R) (ppb ⁻¹)	0'38
datos de calibrado (ppb)	4'02
- Límite de detección	
IUPAC (ppb)	7'34
datos de calibrado ⁽¹⁾ (ppb)	8'77
para $\alpha = \beta = 5\%$ ⁽²⁾ (ppb)	10'22
- Límite de cuantificación	
IUPAC (ppb)	24'46
datos de calibrado ⁽¹⁾ (ppb)	29'23
Rango dinámico lineal, RDL ⁽³⁾	1'66
- Precisión	
Repetibilidad (% DER)	3'4
Reproducibilidad (% DER)	3'6

⁽¹⁾: calculados teniendo en cuenta que la desviación estándar a concentración "cero" es $s_{C_0} = 2'9231$; ⁽²⁾: para probabilidades de falsos positivo y negativo del 95% y teniendo en cuenta tres determinaciones sobre la señal del blanco; ⁽³⁾: estimado a partir de los límites superior e inferior del intervalo de linealidad (121'66 y 7'34 ppb respectivamente).

Por otra parte, en dicha tabla se recoge la precisión expresada como desviación estándar relativa de la señal utilizando los datos de las tablas V.19 y V.20, llevada a cabo sobre una concentración de 76 ppb de cadmio. Se deduce que la precisión encontrada en el estudio de reproducibilidad es similar a la obtenida en el de repetibilidad.

Se evaluó también la precisión del método propuesto a partir del modelo de regresión lineal, de acuerdo con el protocolo establecido en el capítulo II, representando la desviación estándar relativa de la concentración frente a ésta. Los valores de concentración y de DER(%) se representan gráficamente en la figura V.12.

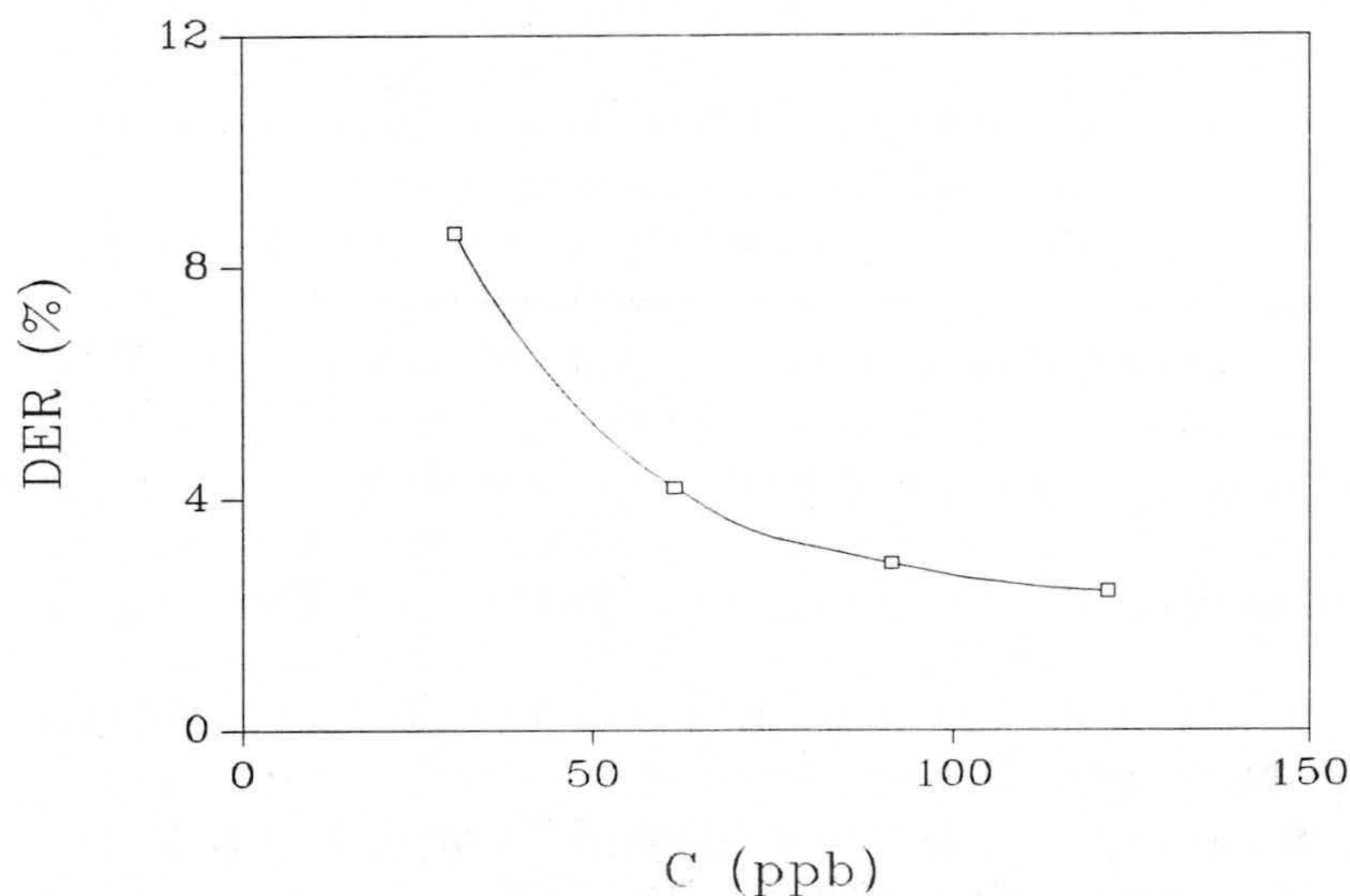


Figura V.12. Variación de la DER (%) con la concentración de Cd(II).

3.1.2.- Procedimiento operatorio propuesto

En matraz aforado de 100 mL de capacidad se introduce el volumen adecuado de disolución problema -de modo que la concentración de cadmio esté comprendida entre 7'34 y 121'66 ppb- y agua de ósmosis inversa hasta el enrase. A continuación, se trasvasa a una botella de polietileno de 1L de capacidad y se adicionan, en el siguiente orden: 3'4 mL de disolución de KI 1'154 M, 2 mL de disolución de PAR $4'10 \times 10^{-4}$ M, 10 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M de pH= 8'7 y 80 mg del

Sephadex QAE A-25. Se equilibra en un agitador rotatorio durante 10 minutos, se filtra la disolución, se recoge la fase sólida retenida en el filtro y se empaqueta en cubeta de vidrio óptico de 1 mm de paso de luz. Después de centrifugar la cubeta durante 30 segundos, se mide la absorbancia -frente a una cubeta conteniendo el soporte sólido equilibrado en agua de ósmosis inversa- a las longitudes de onda 504 y 750 nm. El blanco se prepara en idénticas condiciones pero exento de Cd(II). Finalmente, se obtiene la absorbancia neta como se ha indicado anteriormente.

Mediante interpolación de la absorbancia neta del complejo en la recta de calibrado, preparada en idénticas condiciones, se deduce la concentración de Cd(II) de la disolución problema.

3.2.- Método para 500 mL

3.2.1.- Optimización de KI y PAR utilizando los diseños de DOEHLERT

- Diseño I

La optimización de las concentraciones de PAR y KI se llevó a cabo sobre 35 ppb de Cd(II) utilizando un diseño de Doehlert cuyo nivel básico (0,0) se corresponde con las concentraciones 10^{-2} M de KI y $5'97 \times 10^{-6}$ M de PAR. Cada variación de una unidad en el valor codificado significa un cambio de $\pm 0'5 \times 10^{-2}$ M y $\pm 3'98 \times 10^{-6}$ M en las concentraciones de KI y PAR respectivamente (figura V.13).

Tras aplicar el procedimiento previamente descrito, las botellas se agitaron durante 20 minutos, obteniéndose los resultados de la tabla V.22.

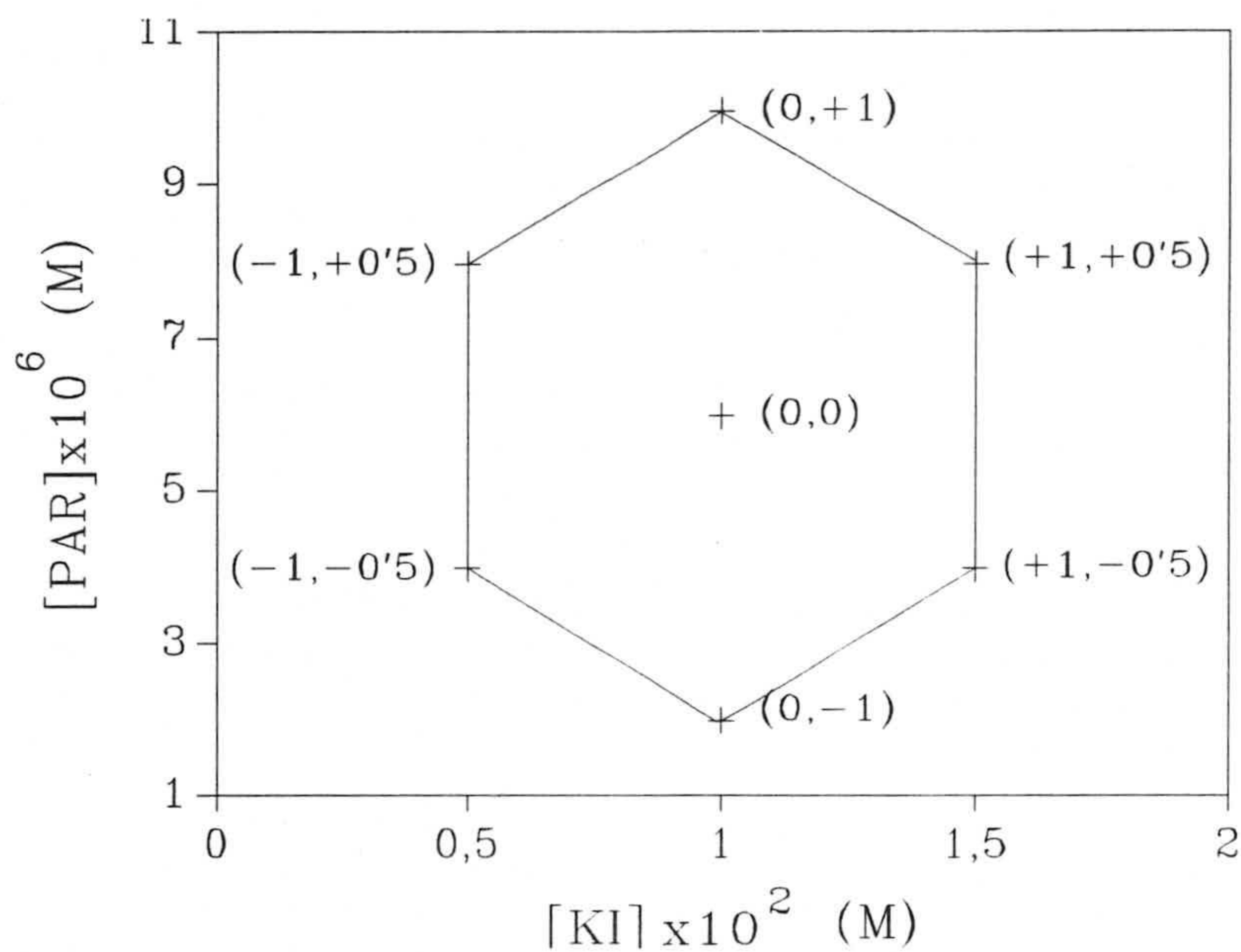


Figura V.13. Diseño I. Los valores codificados vienen entre paréntesis.

Tabla V.22. Variables y resultados correspondientes al diseño I.

Nº	V _{PAR} (mL)	[PAR]x10 ⁶	V _{KI} (mL)	[KI]x10 ²	A _{neta}
1	0'5	1'99 (-1)	1'0	1'0 (0)	1'1303
2	1'0	3'98 (-0'5)	1'5	1'5 (+1)	1'0587
3	1'0	3'98 (-0'5)	0'5	0'5 (-1)	1'4259
4	1'5	5'97 (0)	1'0	1'0 (0)	1'4042
5	2'0	7'96 (+0'5)	1'5	1'5 (+1)	1'1678
6	2'0	7'96 (+0'5)	0'5	0'5 (-1)	1'4881
7	2'5	9'95 (+1)	1'0	1'0 (0)	1'4501

* Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

Para ello, se procedió al análisis gráfico de los residuales. De la observación de las figuras correspondientes, se dedujo que se cumplían las condiciones de normalidad, homoscedasticidad e independencia para la aplicación del modelo.

Se puede observar que existe una buena concordancia entre los valores de la absorbancia neta predichos por el modelo y los obtenidos experimentalmente (tablas V.22 y V.23), $r^2 = 0'9804$.

Tabla V.23. Valores de las absorbancias predichas por el diseño I.

Nº	A _{neto} predicha	Nº	A _{neto} predicha
1	1'155	5	1'192
2	1'034	6	1'513
3	1'401	7	1'425
4	1'404	--	-----

* Análisis de la varianza

A partir de la tabla V.24, se puede deducir que ninguno de los efectos (lineales y/o cuadráticos) correspondientes a las concentraciones de PAR y KI es significativo. El término cruzado que relaciona las concentraciones de PAR y KI no es significativo y por tanto, no existe interacción entre dichas variables.

Tabla V.24. Análisis de la varianza.

Efecto	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P (%)
A: PAR	0'05479657	1	0'05479657	14'91	15'91
B: KI	0'11816406	1	0'11816406	32'15	10'96
AB	0'00054990	1	0'00054990	0'15	76'83
AA	0'00866400	1	0'00866400	2'36	36'20
BB	0'00972306	1	0'00972306	2'65	34'57
Error total	0'00367538	1	0'00367538		
Total (corr.)	0'18903069	6			

A partir de los resultados experimentales, se obtuvo la función polinómica correspondiente:

$$A_{\text{neta}} = 0'9968 + 0'1081[\text{PAR}] + 0'3105[\text{KI}] + 0'0118[\text{PAR}][\text{KI}] - 0'0072[\text{PAR}]^2 - 0'3623[\text{KI}]^2. \quad (1)$$

que recoge la relación existente entre la absorbancia neta con las concentraciones molares de PAR (multiplicada por 10^6) y de KI (multiplicada por 10^2). La representación gráfica de dicha ecuación, que muestra la superficie de respuesta correspondiente a este diseño, se recoge en la figura V.14. En ella, se observa la presencia de un máximo que como veremos a continuación, se confirma al aplicar el criterio de Lagrange.

* Cálculo del óptimo

La aplicación del criterio de Lagrange sobre la función indica la presencia de un máximo puesto que: $H(\text{PAR}, \text{KI}) = 0'0103 > 0$ y tanto $\partial^2 A / \partial [\text{PAR}]^2 = -0'0144 < 0$ como $\partial^2 A / \partial [\text{KI}]^2 = -0'7246 < 0$. Este máximo está localizado en la posición $7'96 \times 10^{-6}$ M en PAR y $0'56 \times 10^{-2}$ M en KI. Como se puede comprobar, el óptimo está comprendido dentro del dominio experimental, pero en un extremo. Por ello se planteó la realización

de un segundo diseño.

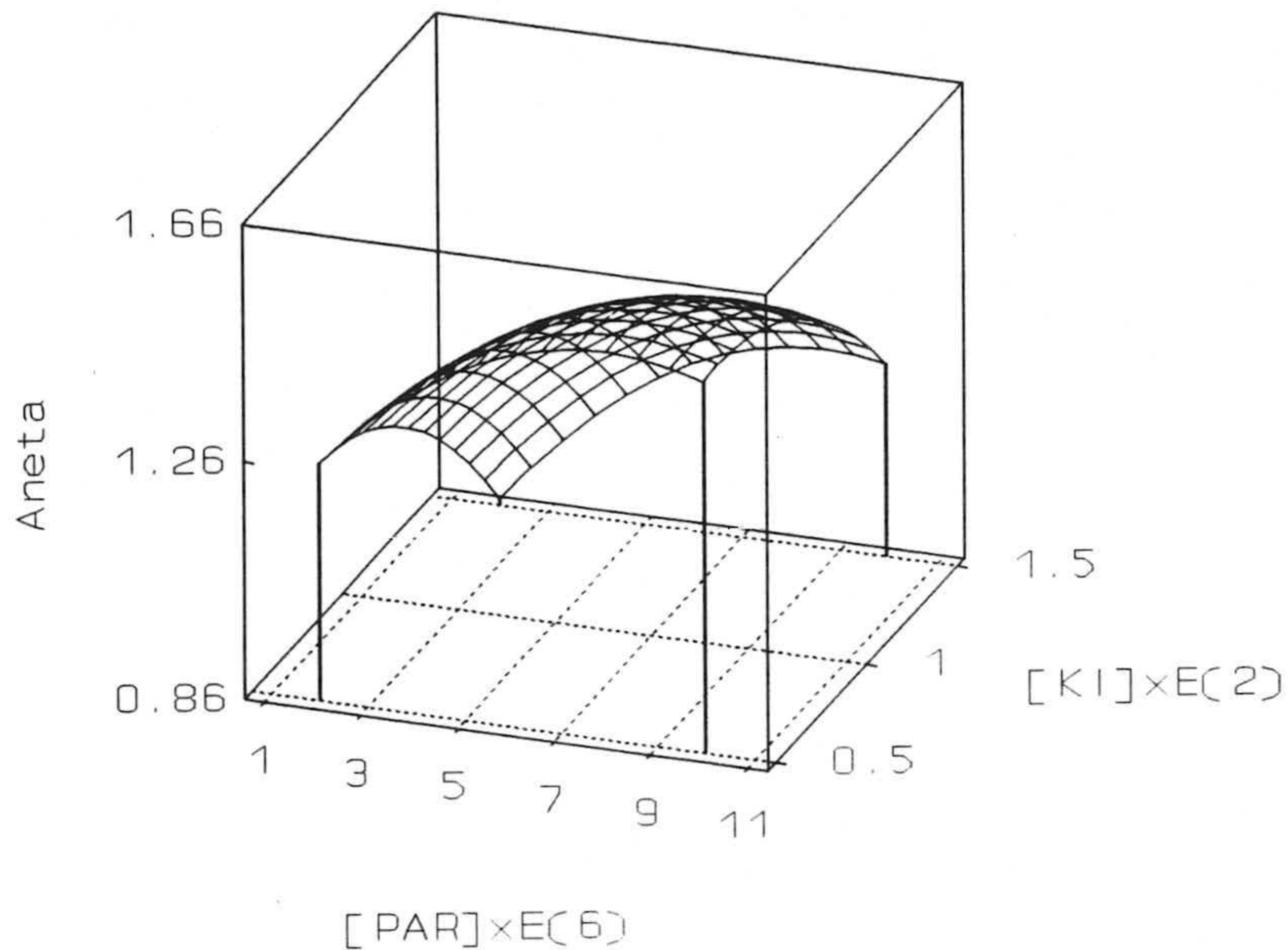


Figura V.14. Superficie de respuesta correspondiente al diseño I.

- Diseño II

Con el fin de recomprobar los valores calculados, se realiza un segundo diseño centrado sobre el óptimo anteriormente calculado, aprovechando cuatro de los puntos experimentales del diseño I (figura V.15).

Se procedió de la misma manera que en el apartado anterior. Los volúmenes de PAR y KI añadidos así como los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.25.

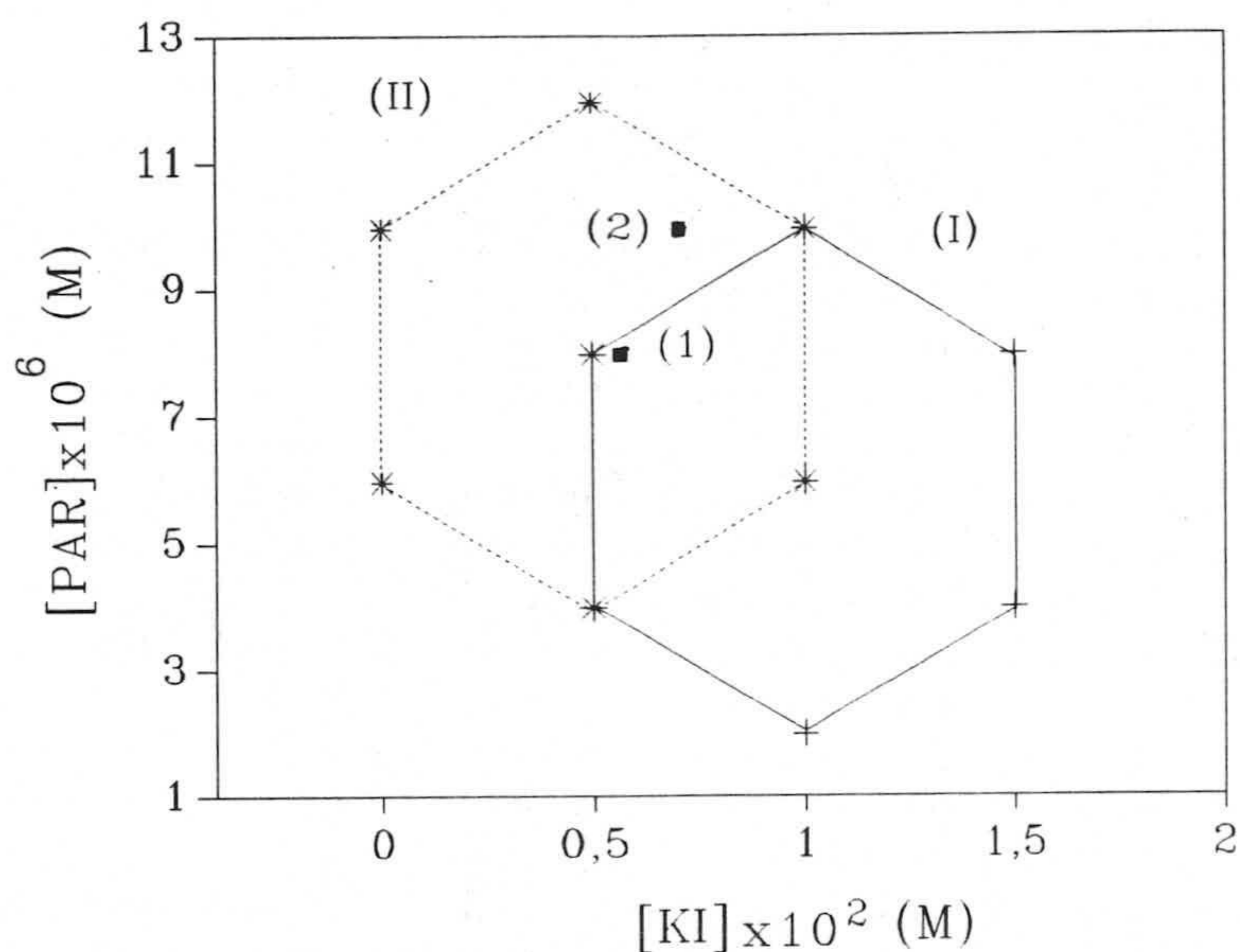


Figura V.15. Representación conjunta de los diseños I y II. (1): máximo estimado a partir del diseño I, (2): máximo obtenido a partir del diseño II.

Tabla V.25. Variables y resultados correspondientes al diseño II.

Nº	V _{PAR} (mL)	[PAR]x10 ⁶	V _{KI} (mL)	[KI]x10 ²	A _{neta}
3	0'5	3'98 (-0'5)	0'5	0'5 (-1)	1'4259
4	1'0	5'97 (0)	1'0	1'0 (0)	1'4042
8	1'0	5'97 (0)	0'0	0'0 (-2)	0'1255
6	1'5	7'96 (+0'5)	0'5	0'5 (-1)	1'4881
7	2'5	9'95 (+1)	1'0	1'0 (0)	1'4501
9	2'5	9'95 (+1)	0'0	0'0 (-2)	0'0456
10	3'0	11'94 (+1'5)	0'5	0'5 (-1)	1'4730

* Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas

Para tal fin, se procedió al análisis gráfico de los residuales. De la observación de éstas, se dedujo que no hay indicios de la no normalidad, heteroscedasticidad y/o dependencia para que no se cumpla el modelo.

Por otra parte, existe una buena concordancia entre los valores de la absorbancia neta predichos por el modelo (tabla V.26) y los obtenidos experimentalmente (tabla V.25), $r^2 = 0'9996$.

Tabla V.26. Valores de las absorbancias predichas por el diseño II.

Nº	A _{neto} predicha	Nº	A _{neto} predicha
3	1'439	7	1'464
4	1'391	9	0'059
8	0'112	10	1'459
6	1'488	--	-----

* Análisis de la varianza

A partir de la tabla V.27, se puede observar que tanto los efectos lineales como cuadráticos correspondientes a la concentración de KI, tienen significación ($P < 5\%$). El término cruzado que relaciona las concentraciones de PAR y KI no es significativo y por tanto, no existe interacción entre dichas variables.

Tabla V.27. Análisis de la varianza.

Efecto	SC	g.l.	MC	F _{cal}	P (%)
A: PAR	0'00030200	1	0'00030200	0'28	69'68
B: KI	1'79989056	1	1'79989056	1641'93	1'55
AB	0'00395641	1	0'00395641	3'61	30'40
AA	0'00099588	1	0'00099588	0'91	52'34
BB	0'61796783	1	0'61796783	563'74	2'64
Error total	0'00109620	1	0'00109620		
Total (corr.)	2'66066243	6			

A partir de las señales de la absorbancia neta (tabla V.25), se obtuvo la nueva función polinómica correspondiente:

$$A_{\text{neto}} = 0'0463 + 0'0256[\text{PAR}] + 3'9783[\text{KI}] + 0'0316[\text{PAR}][\text{KI}] - 0'0024[\text{PAR}]^2 - 2'8883[\text{KI}]^2. \quad (2)$$

que recoge la relación entre dicha señal con las concentraciones molares de PAR y KI (multiplicadas, respectivamente por 10^6 y 10^2). La representación gráfica de dicha ecuación, que muestra la superficie de respuesta, se recoge en la figura V.16. En ella, se observa la presencia del máximo buscado.

* Cálculo del óptimo

La aplicación del criterio de Lagrange sobre la función indica la presencia de un máximo puesto que: $H(\text{PAR}, \text{KI}) = 0'0267 > 0$ y tanto $\partial^2 A / \partial [\text{PAR}]^2 = -0'0048 < 0$ como $\partial^2 A / \partial [\text{KI}]^2 = -5'7766 < 0$, que está localizado en la posición $9'94 \times 10^{-6}$ M en PAR y $0'7 \times 10^{-2}$ M en KI. Como podemos observar, este máximo está muy próximo al encontrado a partir del diseño I.

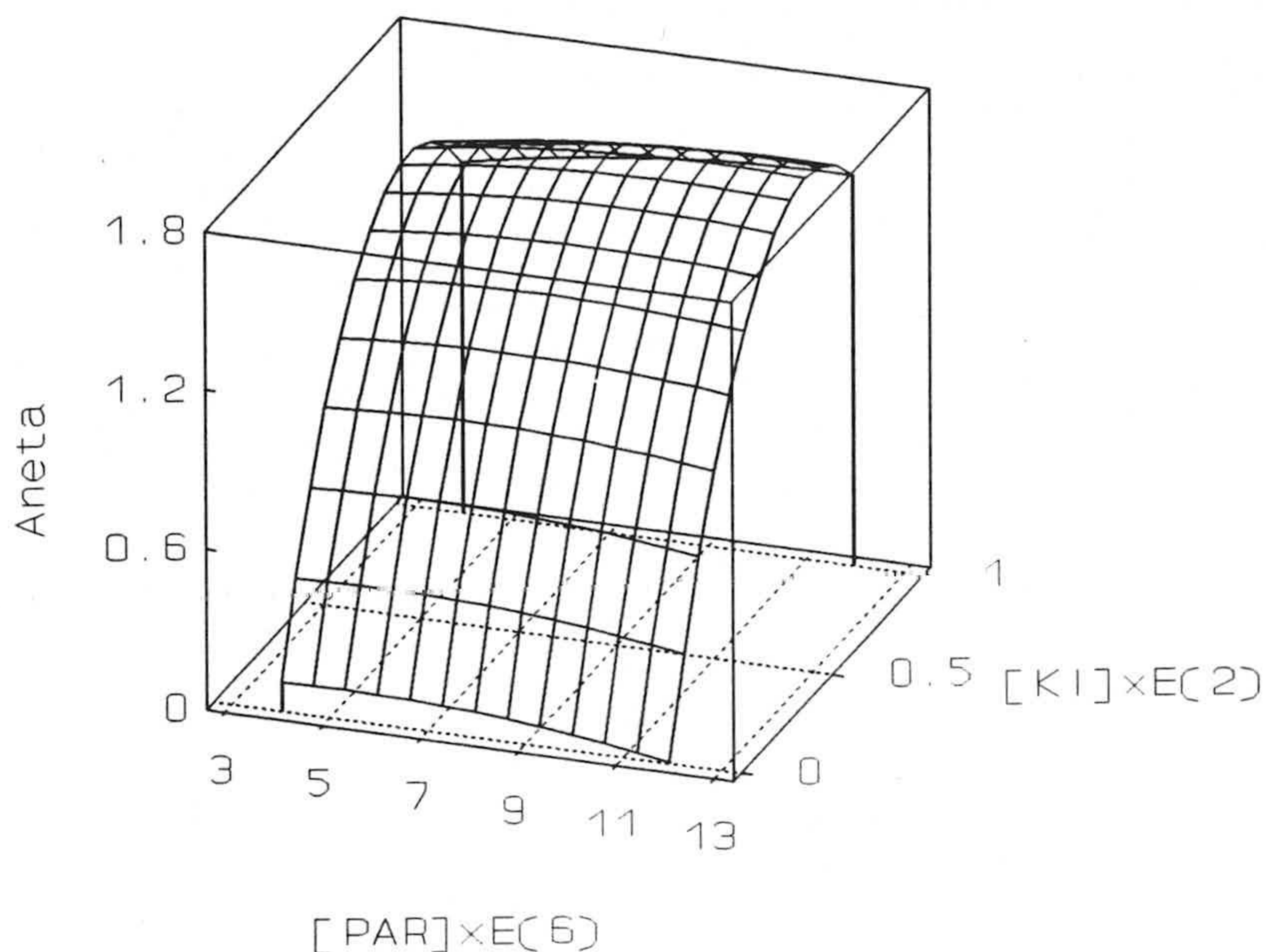


Figura V.16. Superficie de respuesta correspondiente al diseño II.

*** Variación de la concentración de PAR a $[KI] = \text{cte}$**

La ecuación que recoge la influencia de la concentración de PAR sobre la absorbancia neta, a una concentración constante de KI (0.7×10^{-2} M), es la siguiente:

$$A_{\text{neta}} = 1.4116 + 0.0477[\text{PAR}] - 0.0024[\text{PAR}]^2$$

como en los casos anteriores, la concentración molar de PAR está multiplicada por 10^6). En la tabla V.28, se recogen los valores predichos para la absorbancia neta al reemplazar en la ecuación anterior, la concentración de PAR por distintos valores y en la figura V.17, se muestra la representación gráfica de los datos de esta tabla. De la cual se deduce que

en el intervalo de concentraciones de PAR 7×10^{-6} y 12×10^{-6} M, la señal neta a penas varía, siendo su valor máximo a $9,95 \times 10^{-6}$ M.

Tabla V.28. Influencia de la concentración de PAR a $[KI] = 0,7 \times 10^{-2}$ M.

$[PAR] \times 10^6$	A_{neta} predicha	$[PAR] \times 10^6$	A_{neta} predicha
3'98	1'563	8'96	1'646
4'98	1'590	9'95	1'649
5'97	1'611	10'95	1'646
6'97	1'628	11'94	1'639
7'96	1'639	-----	-----

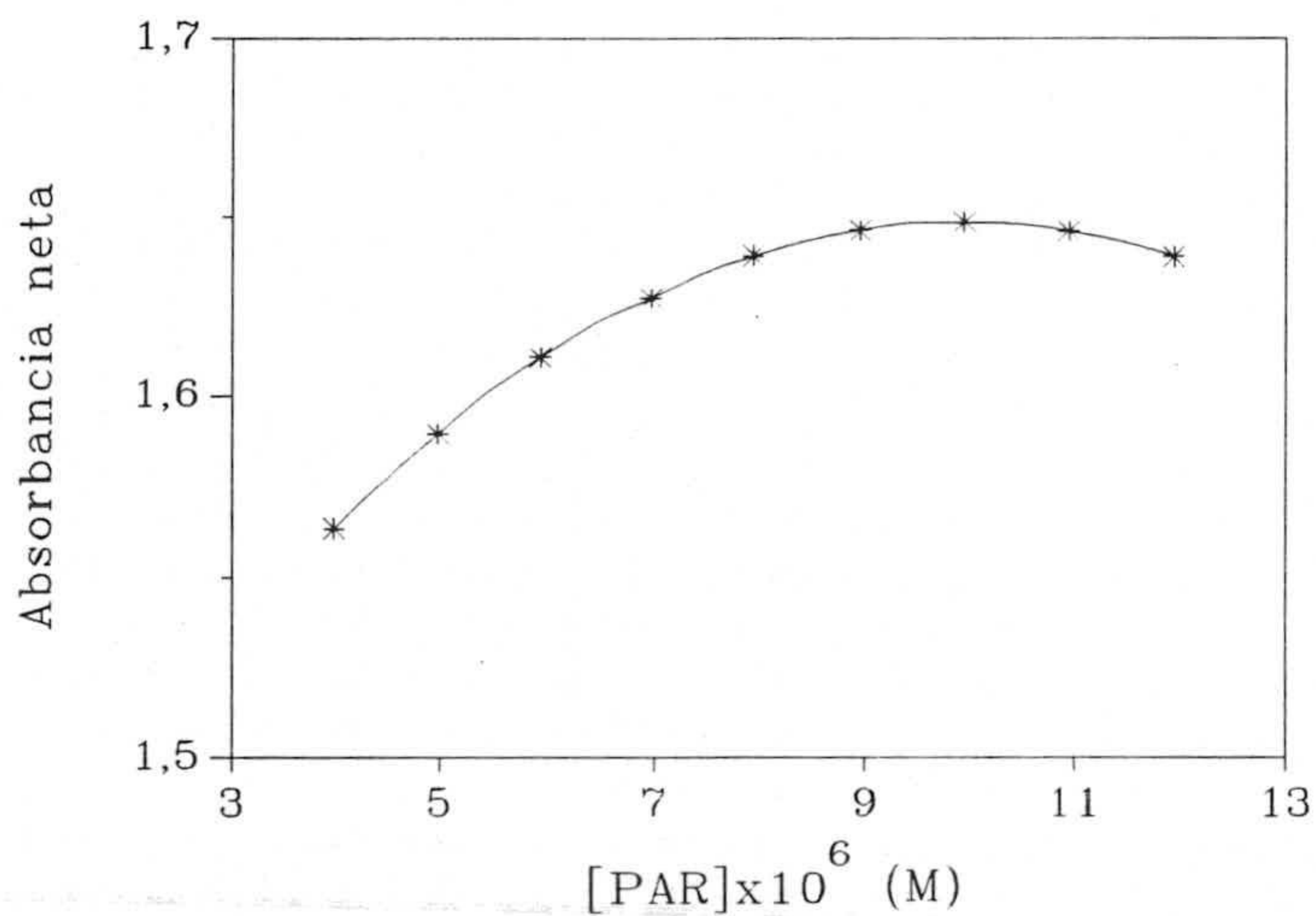


Figura V.17. Variación de la señal con la concentración de PAR a $[KI] = \text{cte.}$

*** Variación de la concentración de KI a [PAR] = cte**

La relación entre la absorbancia neta y la concentración molar de KI (multiplicada por 10^2), para una concentración de PAR de $9'95 \times 10^{-6}$ M, es:

$$A_{\text{neta}} = 0'0634 + 4'2927[\text{KI}] - 2'8883[\text{KI}]^2$$

En la tabla V.29, se recogen los valores predichos de absorbancia neta al reemplazar en la ecuación anterior, la concentración de KI por distintos valores. De la observación de la representación gráfica de dichos datos (figura V.18), se deduce que la máxima absorbancia corresponde al rango de concentraciones de KI comprendido entre $0'6 \times 10^{-2}$ y $0'9 \times 10^{-2}$ M.

Tabla V.29. Influencia de la concentración de KI a [PAR] = $9'95 \times 10^{-6}$ M.

[KI] $\times 10^2$	A_{neta} predicha	[KI] $\times 10^2$	A_{neta} predicha
0'0	0'063	0'6	1'599
0'1	0'464	0'7	1'653
0'2	0'806	0'8	1'649
0'3	1'091	0'9	1'587
0'4	1'318	1'0	1'472
0'5	1'488	-----	-----

Se eligen, para posteriores experiencias, unas concentraciones de KI y PAR, de $0'7 \times 10^{-2}$ M y 10^{-5} M respectivamente.

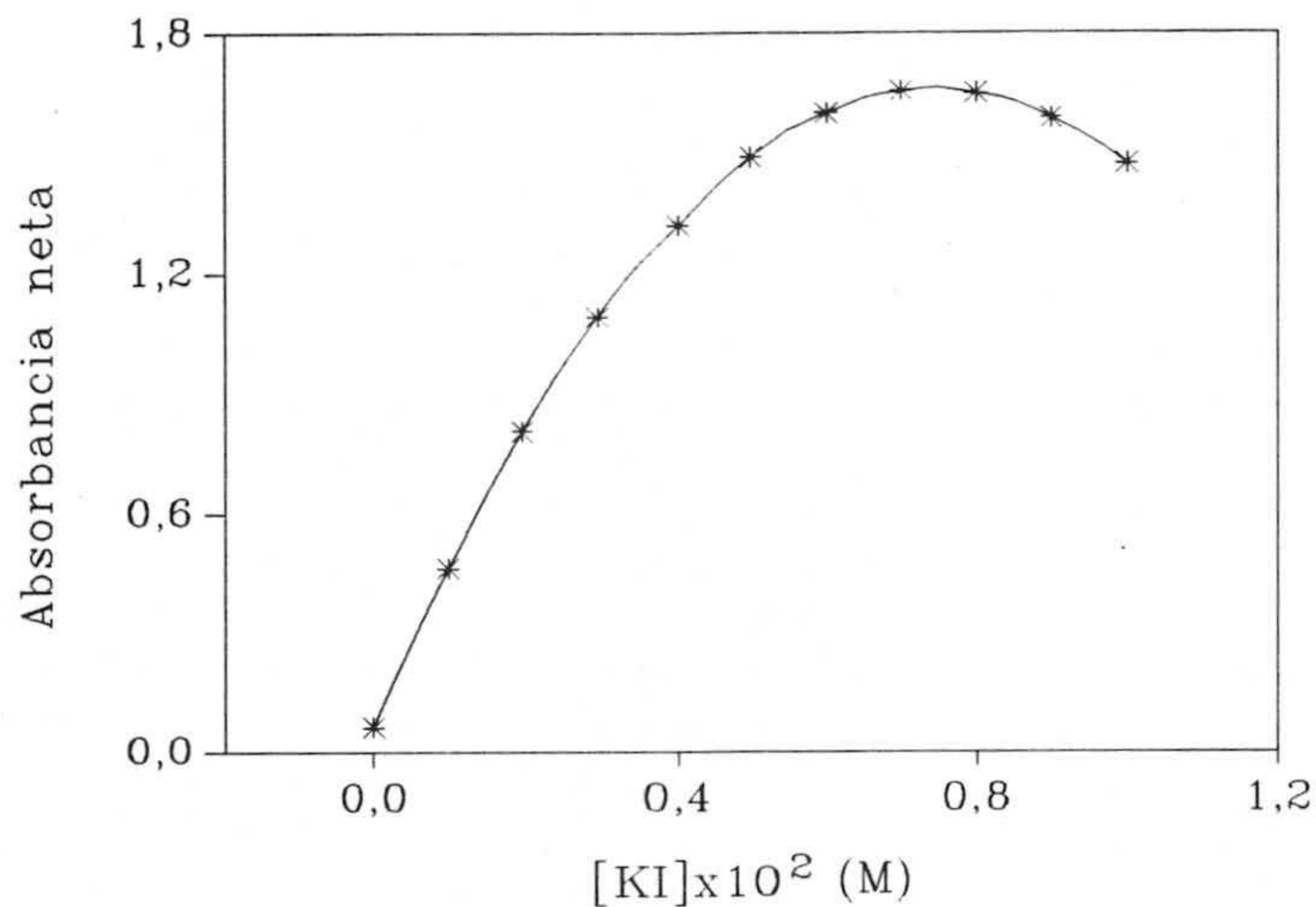


Figura V.18. Variación de la señal con la concentración de KI a [PAR] = cte.

3.2.2.- Influencia del tiempo de agitación

Para ver la influencia de dicho parámetro, se operó sobre 500 mL de disolución de Cd(II) de 17'3 ppb, a los que se añadieron 0'7 mL de disolución de KI 5'07 M, 1 mL de disolución de PAR $5'04 \times 10^{-3}$ M y 5 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'5 M de pH = 8'7.

Tras agitar durante tiempos variables y aplicar el procedimiento habitual, se obtuvieron los resultados de la tabla V.30.

Se observa que es necesario un tiempo de agitación de al menos 40 minutos para alcanzar la máxima absorbancia, tiempo que emplearemos en posteriores experiencias.

Tabla V.30. Influencia del tiempo de agitación.

t (min)	A_b	A	A_{neta}
10	0'4735	1'1316	0'6581
20	0'4957	1'3167	0'8210
30	0'5430	1'5015	0'9585
35	0'5513	1'5266	0'9753
40	0'5473	1'5095	0'9622
50	0'5942	1'5405	0'9463
60	0'5801	1'5335	0'9534

3.2.3.- Estabilidad del complejo fijado en el cambiador

Este estudio se ha llevado a cabo para 17'3 ppb de Cd(II), operando en la forma acostumbrada. Los resultados obtenidos, que se recogen en la tabla V.31, indican que el complejo se puede considerar estable durante al menos una hora. En adelante, el tiempo transcurrido entre la preparación del complejo fijado en la fase sólida y la medida de su absorbancia no superará este tiempo.

3.2.4.- Resumen de las variables optimizadas

Los valores óptimos encontrados en el estudio de las variables que afectan la formación y fijación del complejo de cadmio con el PAR en presencia de KI, para un volumen de 500 mL, se resumen en la tabla V.32.

Tabla V.31. Estabilidad del complejo en el cambiador

t(min)	A _{neta}	t(min)	A _{neta}
0	0'9005	25	0'9065
5	0'9015	30	0'9043
10	0'9049	40	0'9263
15	0'9141	50	0'9196
20	0'9054	60	0'9174

Tabla V.32. Resumen de las variables optimizadas para 500 mL.

Variable	Valor óptimo
[PAR]	$9'95 \times 10^{-6}$ M
[KI]	$0'70 \times 10^{-2}$ M
[Tampón], pH	$4'93 \times 10^{-3}$ M, 8'7
Tiempo de agitación	40 min.
Estabilidad	60 min.

3.2.5.- Calibrado del método. Parámetros de fiabilidad

Para comprobar el cumplimiento de la linealidad de la relación entre la absorbancia y la concentración de cadmio, se utilizaron tres réplicas de cada concentración. Mediante una calibración lineal univariante se realizó la regresión lineal de los datos obtenidos, empleando el método de mínimos cuadrados.

Para ello, se operó sobre 500 mL de agua de ósmosis inversa conteniendo cantidades variables y crecientes de la disolución de Cd(II) de 17'55 ppm, 0'7 mL de disolución de KI $5'07$ M, 1 mL de disolución de PAR $5'04 \times 10^{-3}$ M y 5 mL de disolución

reguladora ($\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$) 0'5 M de pH = 8'7.

Después de aplicar el procedimiento operatorio habitual, se obtuvieron los resultados que se muestran en la tabla V.33 y que se representan en la figura V.19.

Tabla V.33. Calibrado del método.

C_{Cd} (ppb)	A		
0'00	0'5546	0'5507	0'4890
10'39	1'0590	1'0981	1'0602
20'78	1'4956	1'6155	1'6181
31'17	2'0257	2'1074	2'0550
41'56	2'2913	2'3365	2'3594
51'95	2'6107	2'6315	2'6853

La comprobación del ajuste de los datos experimentales al modelo lineal, se llevó a cabo utilizando la estimación del fallo de ajuste, para lo cual se han medido tres réplicas de cada concentración de analito en el rango 0'00-51'95 ppb.

Cuando se introducen todos los datos experimentales (de 0'00 a 51'95 ppb), el ANOVA correspondiente da un test de curvatura (lack-of-fit) significativo ($P = 0'0\%$), lo que indica que existe al menos un punto que se aparta de la línea recta.

La eliminación de las señales correspondientes a la concentración de cadmio de 51'95 ppb no mejoró el test de curvatura ($P = 0'07\%$) ya que volvió a dar significativo, por lo que se eliminó también el conjunto de datos correspondientes a la concentración de cadmio de 41'56 ppb. En estas condiciones el test de curvatura no es significativo ($P = 60'1\%$), indicando que el límite superior del método es 31'17 ppb de Cd(II).

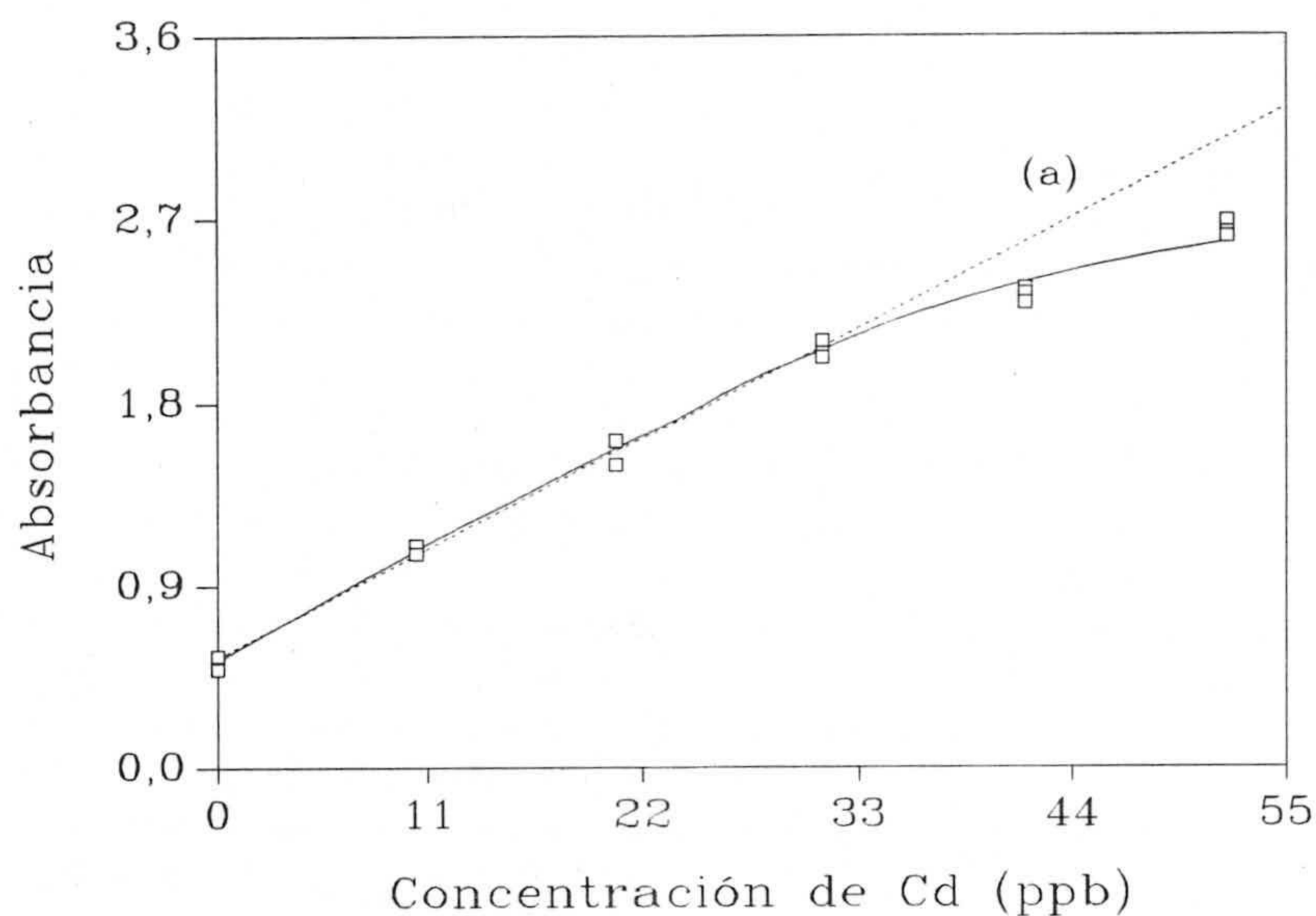


Figura V.19. Calibrado del sistema Cd-PAR en presencia de KI. a: recta de calibrado correspondiente a 0'00-31'17 ppb.

La ecuación de la recta de calibrado, es:

$$A = 0'5461 + 0'0491C_{Cd}$$

En la tabla V.34, se indican los principales parámetros estadísticos de dicha ecuación, mientras que en la figura V.19, se recoge su correspondiente representación (recta a).

Repetibilidad

Se procedió a medir la absorbancia de dos series de disoluciones conteniendo la primera, el blanco y la segunda 17'32 ppb de cadmio. Tras aplicar el procedimiento operatorio habitual a ambas series, se obtuvieron las señales cuyas medias y valor de

desviación estándar se recogen en la tabla V.35.

Tabla V.34. Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	12
m	3
$S_{R,C}$	0'0438
a	0'5461
S_a	0'0212
b	0'0491
S_b	0'0011
r^2 (%)	99'50

Tabla V.35. Repetibilidad del método de 500 mL.

	Blanco	Neta
C_{Cd} (ppb)	0'00	17'32
n	12	12
\bar{A}	0'5313	0'8429
S_{n-1}	0'0252	0'0413

C_{Cd} : concentración de cadmio a la cual se llevó el estudio; n : número de determinaciones.

Parámetros de fiabilidad

Utilizando los protocolos de la IUPAC [4] y de Cuadros Rodríguez y col. [5], se han calculado los parámetros de fiabilidad del método cuyos valores se recogen en la V.36. A partir de ésta, se observa que la sensibilidad analítica calculada con el protocolo de la IUPAC es similar a la calculada utilizando los datos de calibrado, debido a que la

desviación estándar obtenida en el estudio de repetibilidad es igual a la desviación estándar de la regresión.

Tabla V.36. Parámetros de fiabilidad.

Parámetro	Valor
- Linealidad	
"on-line" (%)	60'06
"off-line" (%)	98'76
- Sensibilidad	
IUPAC (unidad de abs./ppb)	0'0491
analítica (b/s_R) (ppb^{-1})	1'19
datos de calibrado (ppb)	0'89
- Límite de detección	
IUPAC (ppb)	1'54
datos de calibrado ⁽¹⁾ (ppb)	2'03
para $\alpha = \beta = 5\%$ ⁽²⁾ (ppb)	2'38
- Límite de cuantificación	
IUPAC (ppb)	5'13
datos de calibrado ⁽¹⁾ (ppb)	6'76
- Rango dinámico lineal, RDL⁽³⁾	2'02
- Precisión	
Repetibilidad (% DER)	4'9

⁽¹⁾: $s_{C_0} = 0'6761$; ⁽²⁾: tres determinaciones sobre la señal del blanco; ⁽³⁾: estimado a partir del intervalo de linealidad (1'54 y 31'17 ppb).

A partir del modelo de regresión lineal y de acuerdo con el protocolo establecido en el capítulo II, se ha evaluado la precisión del método propuesto. Los valores de concentración y de DER (%) de ésta se recogen en la tabla V.37.

Tabla V.37. Variación de la DER (%) con la concentración de cadmio.

C_i (ppb)	A_i	s_{C_i}	% DER(C)
10'39	1'0724	0'5763	5'6
20'78	1'5764	0'5764	2'8
31'17	2'0627	0'5807	1'9

3.2.6.- Procedimiento operatorio propuesto

En matraz aforado de 500 mL de capacidad se introduce el volumen de disolución problema que contenga una concentración de Cd(II) comprendida entre 5'13 y 31'17 ppb, y se enrasa con agua de ósmosis inversa. Se trasvasa a una botella de polietileno de 1L de capacidad añadiendo a continuación: 0'7 mL de disolución de KI 5'07 M, 1 mL de disolución de PAR $5'04 \times 10^{-3}$ M, 5 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'5 M, de pH = 8'7, y 80 mg de Sephadex QAE A-25. Después de equilibrar en un agitador rotatorio durante 40 minutos, se recoge la fase sólida, filtrando la disolución, y se empaqueta en cubetas de vidrio óptico de 1-mm de paso de luz. Finalmente y después de centrifugar las cubetas durante 30 segundos, se mide la absorbancia frente a una cubeta de referencia -conteniendo el cambiador equilibrado en agua de ósmosis inversa- a las longitudes de onda 504 y 750 nm. El blanco se prepara en idénticas condiciones pero exento de Cd(II). La absorbancia neta se obtiene como se ha indicado previamente.

La absorbancia neta del complejo se interpola en la recta de calibrado, preparada en idénticas condiciones y se obtiene la concentración de Cd(II) de la disolución problema.

3.2.7.- Robustez

Utilizamos un diseño factorial fraccionado saturado a dos niveles y centrado alrededor del óptimo, que se lleva a cabo con 7 variables y requiere un total de 8 puntos experimentales: se trata de un diseño 2^{7-4} (fracción 1/16). Se elige por una parte, como concentración de cadmio a ensayar el valor de 16'9 ppb, y por otra, una variación de $\pm 10\%$ sobre el valor de 5 variables experimentales (concentración de PAR, cantidad de soporte sólido, tiempo de agitación, concentración de KI y volumen final). La variación de pH es de $\pm 0'1$ unidades y, por último, se ha añadido 1 variable "fantasma" haciéndola confundir con la interacción más probable (cantidad de soporte-tiempo de agitación) y así completar la estructura del diseño.

En la tabla V.38 se indican las variables ensayadas, así como los valores que se asignan a cada una, mientras la estructura del diseño es la misma que aquella recogida en el capítulo IV, apartado 3.2.7.

Tabla V.38. Variables ensayadas en el estudio de robustez al $\pm 10\%$.

Variable	Valor inferior (-1)	Valor superior (+ 1)
A: [PAR]	$8'96 \times 10^{-6}$ M	$10'95 \times 10^{-6}$ M
B: Cantidad del soporte	72 mg	88 mg
C: Tiempo de agitación	36 min.	44 min.
D: [KI]	$0'77 \times 10^{-2}$ M	$0'63 \times 10^{-2}$ M
E: Volumen final	456 mL	557 mL
F: "Fantasma"	----	----
G: pH	8'6	8'8

Para llevar a cabo la realización de este diseño, se prepararon 8 botellas de polietileno de 1L de capacidad en las cuales se añadió, siguiendo el orden habitual, los volúmenes correspondientes de las siguientes disoluciones:

- Agua de ósmosis inversa.
- Cd(II) de 8'6 ppm.
- KI 1'77 M.
- PAR $2'5 \times 10^{-3}$ M.
- Tampón $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ (0'5 M) de pH 8'8 o bien 8'6.

En la tabla V.39 se recogen los resultados obtenidos tanto de la señal de analito como del blanco, así como de absorbancia neta.

Tabla V.39. Resultados del diseño factorial elaborado para el estudio de robustez al $\pm 10\%$.

Nº	A_b	A	A_{neta}
1	0'6527	1'4657	0'8130
2	0'4914	1'3600	0'8686
3	0'5747	1'5729	0'9982
4	0'6093	1'7903	1'1810
5	0'6760	1'6185	0'9425
6	0'4680	1'2084	0'7404
7	0'6292	1'7284	1'0992
8	0'5268	1'4623	0'9355

Para ver el efecto de curvatura, se calculó la absorbancia neta media de los 8 puntos del diseño utilizado, $\overline{A_{neta}}$, y se comprobó si ésta pertenece al intervalo de confianza de la señal neta predicha, \hat{A}_{neta} , por la ecuación de la recta de calibrado:

$$\overline{A_{neta}} \in \hat{A}_{neta} \pm t_{(\alpha; n-2 g.l.)} S_R$$

Al reemplazar cada parámetro por su correspondiente valor numérico en la

ecuación anterior ($\overline{A}_{neta} = 0'9473$, $\hat{A}_{neta} = 0'8445$, $t_{(5\%; 10 g.l)} = 2'228$ y $s_R = 0'0283$), obtenemos:

$$0'9473 \notin 0'8445 \pm 0'0631$$

y por consiguiente se concluye que existe curvatura significativa en el modelo.

Una vez comprobada la linealidad de los efectos principales de las variables experimentales, se calcularon dichos efectos y su desviación estándar, s_E (ecuación 34, capítulo II). Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.40, a partir de la cual se obtiene que, sólo los efectos principales debidos a las modificaciones (del $\pm 10\%$ en el valor nominal) de la cantidad de soporte sólido y del volumen final son significativos ya que son mayores, en valor absoluto, a $t_{(5\%; 10 g.l)} s_E$ (donde t es el valor de t de Student de una sola cola).

Tabla V.40. Efectos principales para la robustez al $\pm 10\%$.

Variable	Efecto	Significación
PAR	0'0319	No
Cantidad de soporte	-0'2124	Sí
Tiempo de agitación	0'0358	No
KI	-0'0414	No
Volumen final	0'1511	Sí
"Fantasma"	0'0365	No
pH	0'0222	No

$$t_{(5\%; 10 g.l)} = 1'812; s_E = s_R = 0'0283 \text{ y } t_{(5\%; 10 g.l)} s_E = 0'0513.$$

A continuación, se ha estimado la robustez al 5% para las dos variables experimentales que muestran efectos significativos. Los valores seleccionados, así como

los resultados obtenidos se recogen en las tablas V.41 y V.42, mientras que la estructura del diseño utilizado (2^{3-1}), se recoge en el capítulo IV, apartado 3.2.7.

Tabla V.41. Variables ensayadas para el estudio de robustez al $\pm 5\%$.

Variable	Valor inferior (-1)	Valor superior (+ 1)
A: Cantidad del soporte	76 mg	84 mg
B: Volumen final	481 mL	532 mL
C: "Fantasma"	-----	-----

Tabla V.42. Resultados del diseño factorial elaborado para el estudio de la robustez al $\pm 5\%$.

Nº	A _b	A	A _{neta}
1	0'5927	1'5295	0'9368
2	0'5703	1'5028	0'9325
3	0'5459	1'4001	0'8542
4	0'5671	1'4533	0'8862

Para comprobar el test de linealidad, se calculó la absorbancia neta media de los 4 experimentos del diseño utilizado, y se comprobó que dicha señal pertenece al intervalo de confianza de la señal neta predicha correspondiente a una concentración de cadmio de 16'9 ppb, tal y como se indica en la siguiente ecuación:

$$0'9024 \in 0'8445 \pm 0'0631$$

y por tanto, se concluye que no existe curvatura significativa en el modelo.

Finalmente, se calcularon los efectos principales de las variables experimentales, y se compararon con $t_{(5\%; 10 g.l)} S_E$. Los resultados obtenidos (tabla V.43) muestran que ninguno de los efectos principales debido a las modificaciones de la cantidad de soporte y del volumen final son significativos.

Tabla V.43. Efectos principales para la robustez al $\pm 5\%$.

Variable	Efecto	Significación
Cantidad de soporte	-0'0139	No
Volumen final	0'0645	No
"Fantasma"	-0'0182	No

$$t_{(5\%; 13 g.l)} = 1'812; S_E = \sqrt{2} S_R = 0'0400 \text{ y } t_{(5\%; 10 g.l)} S_E = 0'0725.$$

Por tanto, se concluye que el método analítico propuesto es robusto para una modificación del $\pm 10\%$ sobre el tiempo de agitación y las concentraciones de PAR o KI, de $\pm 0'1$ unidad sobre el valor de pH o del $\pm 5\%$ sobre la cantidad de soporte sólido y volumen final.

3.2.8.- Comparación con otros métodos

En la tabla V.44 se compara la absortividad molar de algunos métodos para la determinación espectrofotométrica de cadmio, con la correspondiente a los métodos propuestos en la presente Memoria. Se observa como el método propuesto (500 mL) es hasta 7 veces más sensible que el método en fase sólida que emplea también como reactivo PAR y es hasta 600 veces más sensible que el método que utiliza la ditizona.

Tabla V.44. Comparación de las sensibilidades de los métodos propuestos con la de otros métodos espectrofotométricos.

Reactivo	Absortividad molar (L/mol.cm)	Referencia
PCHA (en presencia de PAR)	$4'8 \times 10^4$	[6]
PAN (en presencia de TPPO)	$5'3 \times 10^4$	[7]
DPTH	$5'6 \times 10^4$	[8]
Ditizona	$8'8 \times 10^4$	[9]
RBE (en presencia de 2,2' bipyridine)	$1'0 \times 10^5$	[10]
5-Br-PADAP	$1'4 \times 10^5$	[11]
New Cadion (en presencia de OP)	$1'6 \times 10^5$	[12]
$\alpha, \beta, \gamma, \delta$ tetrakis (4-N-trimetilaminofenil) porfina	$5'8 \times 10^5$	[13]
PAR ¹ (previa fijación como CdI ₄ ²⁻) (200 mL)*	$7'3 \times 10^6$	[2]
PAR ¹ (100 mL)*	10^7	mét. propuesto
PAR ¹ (500 mL)*	$5'5 \times 10^7$	mét. propuesto

¹: Espectrofotometría en fase sólida; *: Absortividad molar aparente (valor estimado de la absorbancia del complejo sorbido sobre la fase sólida a partir de una disolución acuosa 1 M de Cd(II) y suponiendo que fue medida en una cubeta de 1 cm); **PCHA**: ácido N-fenilcinnamohidroxámico; **PAR**: 4-(2-piridilazo)-resorcinol; **PAN**: 1-(2-piridilazo)-2-naftol; **TPPO**: óxido de trifenilfosfina; **DPTH**: 1,5-bis(di-2-piridilmetilene)tiocarbonohidrazide; **Ditizona**: 1,5-difeniltiocarbazona; **RBE**: rose bengal extra; **5-Br-PADAP**: 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dimetilaminofenol; **New Cadion**: p-sulfonilbenzodiazamino-benceno; **OP**: surfactante no iónico.

3.3.- Selectividad

Con objeto de caracterizar la selectividad de los métodos propuestos, se ha estudiado en primer lugar el efecto que la presencia de especies extrañas ejerce en la determinación de Cd(II) con PAR y a continuación, se ha tratado de eliminar o reducir las interferencias utilizando enmascarantes.

3.3.1.- Estudio de las interferencias

Para llevar a cabo este estudio, se ha seguido el método propuesto para 100 mL. Se opera con disoluciones conteniendo 76 ppb de Cd(II) a las que se añaden cantidades variables del ión cuyo efecto se quiere ensayar. Para obtener la absorbancia neta, a cada una de las absorbancias obtenidas, en presencia del posible ión interferente, se le resta el valor del blanco promedio obtenido en el estudio de la reproducibilidad.

Tal y como se ha procedido en los capítulos anteriores, para comprobar si una especie es interferente o no, se ha establecido un intervalo de confianza para la señal analítica y se ha comprobado si las señales obtenidas en presencia de los iones extraños se incluyen en el mismo.

En este caso, se ha aplicado el modelo propuesto por García Campaña y col. [14] que utiliza los datos del calibrado para la obtención de un intervalo de confianza sobre la señal, correspondiente a la concentración de analito sobre la que se va a ensayar la interferencia. Este procedimiento se facilita con la utilización del programa "**ALAMIN**", que proporciona los intervalos de confianza para las concentraciones de analito utilizadas en el calibrado. En la tabla V.45, se recogen dichos intervalos para el caso en estudio.

Por ello, se ha elegido una variación del $\pm 7\%$ sobre la absorbancia neta predicha para definir el intervalo de confianza, dado que este porcentaje es el valor promedio deducido para todo el calibrado.

Tabla V.45. Intervalos de confianza sobre las señales predichas.

C_{Cd} (ppb)	A_{neta} predicha	s_{n-1}	Intervalo de confianza
30'42	0'2804	0'0388	$\pm 6'9\%$
60'83	0'5601	0'0382	$\pm 6'8\%$
91'25	0'8400	0'0388	$\pm 6'9\%$
121'66	1'1198	0'0405	$\pm 7'2\%$

El resumen de la tolerancia de los distintos iones ensayados, se recoge en la tabla V.46. A partir de ésta, se deduce que:

- Causan una gran interferencia los cationes Co(II), Cu(II), Ni(II), Mn(II) y Zn(II) debido a su reacción con el PAR.
- Los iones Al(III) y V(V) interfieren moderadamente.
- Tienen una tolerancia elevada todos los aniones, además del Ca(II) y el Mg(II).

3.3.2.- Selección de agentes enmascarantes

Con el fin de eliminar la interferencia producida por los diferentes iones extraños, se ensayaron algunos posibles enmascarantes, siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó en el sistema Zn(II)-PAR.

Los resultados obtenidos sobre la tolerancia de dichos agentes, así como su influencia sobre la señal del blanco, se resumen en la tabla V.47. A partir de la cual se deduce que:

Tabla V.46. Tolerancia de los iones extraños.

Ion Extraño	Tolerancia (ppb)
Cl ⁻	300000
Br ⁻ , CH ₃ COO ⁻ , CO ₃ ²⁻ , HCO ₃ ⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻	200000
Ca(II), IO ₃ ⁻ , Mg(II), SO ₃ ²⁻	100000
Al(III)	1000
V(V)	500
Cr(III)	100
Bi(III), Fe(III), Pb(II)	25
Mn(II)	10
Co(II)	5
Cu(II)	2
Ni(II), Zn(II)	< 2

- Los iones citrato, tiocianato y tiosulfato, son los únicos agentes enmascarantes que tienen influencia sobre el blanco, causando errores relativos superiores al $\pm 7\%$.

- Todos los agentes enmascarantes ensayados tienen una elevada tolerancia, admitiéndose como mínimo hasta una relación 650/1 en peso, con respecto al cadmio.

A continuación, se estudió si alguno de los compuestos citados permitía enmascarar a los iones interferentes.

Tabla V.47. Tolerancia de los agentes enmascarantes.

Especie	A_b	E.R (%) (*)	Tolerancia (ppm)
Tiourea	0'1740	-1'7	200
ión citrato	0'1421	-19'7	100
ión fluoruro	0'1784	0'8	
ión oxalato	0'1737	-1'9	
ión tartrato	0'1758	-0'7	
ión tiocianato	0'2068	16'8	
ión tiosulfato	0'1606	-9'3	
Acido ascórbico	0'1866	5'4	50

(*): error relativo de A_b frente al valor obtenido en el estudio de reproducibilidad del método, 0'1770.

Para ello, se operó sobre disoluciones conteniendo 76 ppb de Cd(II), cantidades no tolerables del ión interferente y una cantidad constante del agente enmascarante tolerada por el método.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla V.48, en la que se recoge, para cada agente enmascarante, su concentración y aquellos iones interferentes cuya tolerancia fue mejorada.

Como se puede observar en la tabla V.48, los agentes enmascarantes que mejoran la tolerancia de un mayor número de iones son el citrato, fluoruro y tiosulfato.

Tabla V.48. Eliminación de las interferencias.

Agente	C (ppm)	Ión (tolerancia)
Tiourea	200	Bi(III) (50 ppb) y Fe(III) (100 ppb)
Ión citrato	100	Co(II) y Pb(II) (50 ppb), Cu(II) (5 ppb) y Mn(II) (100 ppb)
Ión fluoruro	100	Bi(III) (50 ppb), Co(II) (25 ppb) y Fe(III) (200 ppb)
Ión oxalato	100	Bi(III) (50 ppb) y Mn(II) (25 ppb)
Ión tartrato	100	Bi(III) (50 ppb) y Co(II) (10 ppb)
Ión tiocianato	100	Bi(III) (50 ppb) y Co(II) (25 ppb)
Ión tiosulfato	100	Bi(III) (50 ppb), Co(II) (25 ppb) y Fe(III) (200 ppb)
Acido Ascórbico	50	Fe(III) (50 ppb)

3.3.3.- Ensayos de enmascaramiento

Para ver el efecto de los agentes enmascarantes seleccionados (citrato, fluoruro y tiosulfato) sobre un conjunto de iones interferentes, se obtuvo, por triplicado, la absorbancia de una muestra sintética que contiene 76 ppb de Cd(II), 5 ppb de Cu(II), 24 ppb de Co(II), 50 ppb de Bi(III), Mn(II) y Pb(II) y 95 ppb de Fe(III), realizando los siguientes tratamientos:

- 1: 100 ppm de citrato.
- 2: 100 ppm de fluoruro.
- 3: 100 ppm de tiosulfato.
- 4: mezcla binaria de citrato y fluoruro, 100 ppm de cada uno.

- 5: mezcla ternaria de citrato, fluoruro y tiosulfato, 100 ppm de cada uno.

También se obtuvieron, con fines comparativos, las absorbancias de disoluciones control que contenían 76 ppb de cadmio pero sin interferentes.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.49 y nos indican, en una primera lectura, que los enmascarantes, ni de forma individual ni en mezcla binaria y a concentración tolerada por el sistema, eliminan los efectos de los interferentes ensayados. Sin embargo, usando la mezcla ternaria se observa un aumento de las absorbancias de las disoluciones con interferentes, aunque paralelamente se produce una disminución de las absorbancias de las disoluciones de control.

Tabla V.49. Ensayos de enmascaramiento.

Tratamiento	A_{neta}					
	Control			Con interferentes		
1	0'6731	0'6471	0'6991	0'4949	0'4873	0'4630
2	0'7287	0'7585	0'6989	0'5725	0'4715	0'5169
3	0'6741	0'6991	0'6491	0'4919	0'4238	0'3823
4	0'6370	0'6885	0'6830	0'4691	0'4981	0'4280
5	0'6005	0'6391	0'6016	0'5545	0'5843	0'5354

Para una mayor objetividad en la interpretación de los resultados, se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) para la comparación de las absorbancias de los distintos tratamientos utilizados. Los resultados de esta comparación se recogen en las tablas V.50 y V.51.

Tabla V.50. ANOVA de dos vías.

Fuente de variación	S.C	g.l	M.C	F _{exp}	P (%)
Efectos principales:					
A: Entre control e interferente	0'2437	1	0'2437	217'2	0'00
B: Entre tratamientos	0'0173	4	0'0432	3'6	1'78
Interacción, AB	0'0311	4	0'0078	6'9	0'11
Residuales	0'0224	20	0'0011		
Total (corregido)	0'3145	29			

Tabla V.51. Análisis múltiple (método LDS 95%).

Efecto	Nivel	n _i	Media	Homogeneidad
Grupo	Control	15	0'6718	X
	Interferente	15	0'4916	X
Tratamiento	1	6	0'5774	X
	2	6	0'6245	X
	3	6	0'5534	X
	4	6	0'5673	X
	5	6	0'5859	X X

De la observación de dichas tablas y de la representación de los valores medios de absorbancia obtenidos para cada tratamiento (figura V.20), se deduce que para un nivel de significación del 95%:

- Existe diferencia significativa entre los distintos tratamientos tanto en el caso de las disoluciones de control como en las disoluciones con interferentes.

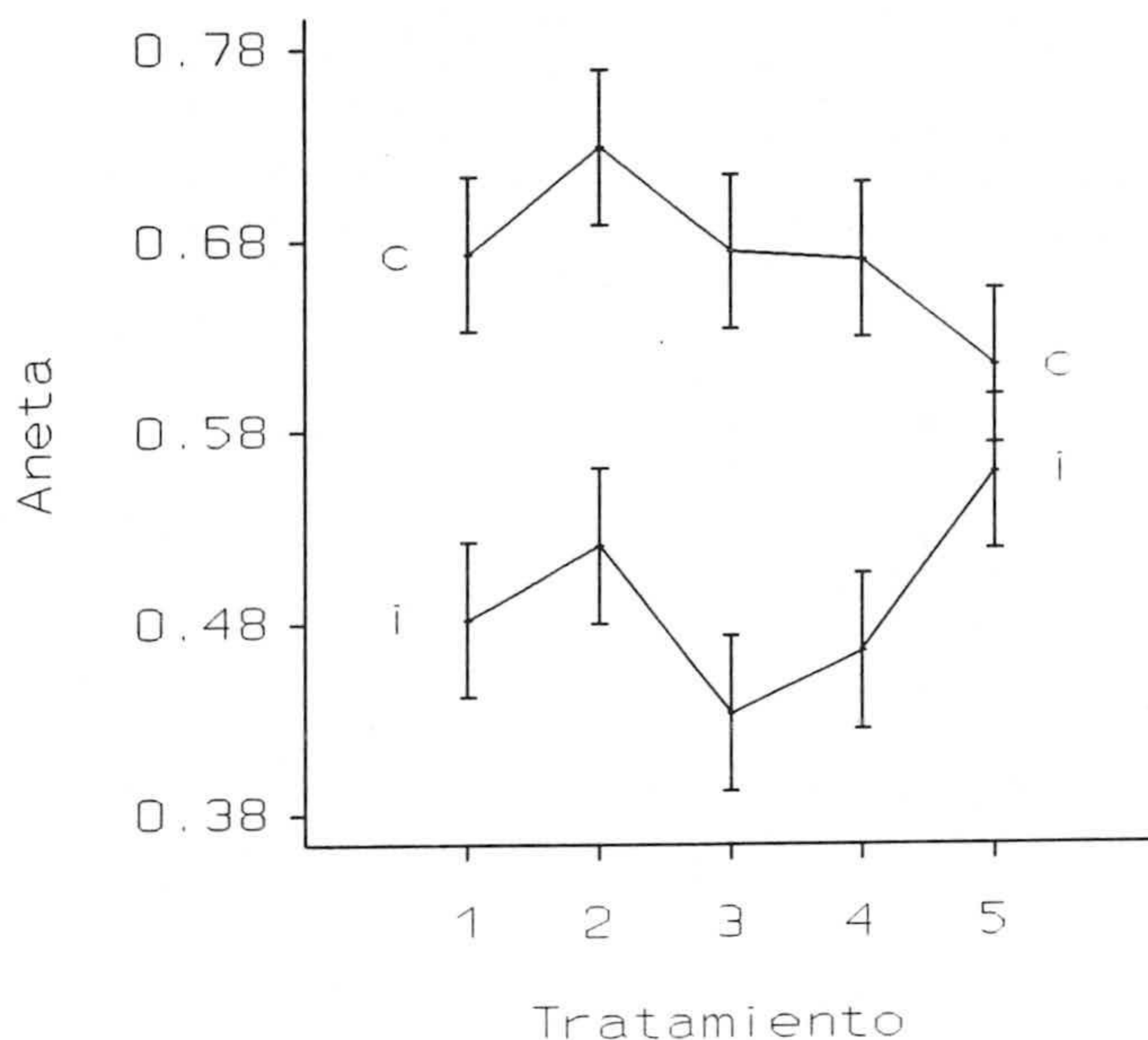


Figura V.20. Valores medios de absorbancia obtenidos frente al tratamiento utilizado. c: control; i: interferente.

- Existe un distinto comportamiento de algunos de los tratamientos según se utilicen sobre disoluciones control o sobre disoluciones con interferentes. Así, en las disoluciones control se produce un descenso en las absorbancias obtenidas salvo con el tratamiento con ión fluoruro, mientras que aunque las absorbancias obtenidas de las disoluciones con interferentes presentan un descenso general, es destacable el menor descenso para el tratamiento con mezcla ternaria.

- Por otra parte, merece indicarse la existencia de grupos de igual comportamiento dentro de los distintos tratamientos ensayados, así por ejemplo, se puede señalar un mismo comportamiento en el caso de la mezcla ternaria de enmascarantes y del ión fluoruro en el grupo de las disoluciones de interferentes.

- Finalmente, se puede comprobar que no existe diferencia significativa entre las absorbancias obtenidas para el grupo de control y el de interferentes, utilizando la mezcla ternaria como enmascarante.

En definitiva, del estudio de enmascaramiento mediante iones citrato, fluoruro y tiosulfato, se concluye lo siguiente:

* Los agentes enmascarantes probados individualmente ó en mezcla binaria aunque mejoran la señal de las disoluciones con interferentes, no eliminan la interferencia.

* La mezcla ternaria de los enmascarantes reduce significativamente el problema de la interferencia, aunque rebaja la sensibilidad del método.

* La interferencia puede ser eliminada si se utiliza una mezcla ternaria de los agentes enmascarantes tanto para la medida de la absorbancia de la disolución problema como para la obtención del calibrado estándar.

4.- DISTRIBUCIÓN DEL ANALITO ENTRE LA FASE SÓLIDA Y LA DISOLUCIÓN ACUOSA

Se han calculado los valores de la razón de distribución del cadmio en las condiciones experimentales para 100 y 500 mL de muestra operando de forma análoga a lo descrito en los anteriores capítulos.

En ambos casos, como la cantidad de cadmio que quedó en disolución fue inferior al límite de detección de los métodos, se utilizó este valor en el cálculo de la razón de distribución.

Los resultados obtenidos para ambos volúmenes de muestra se recogen en las tablas V.52 y V.53.

Tabla V.52. Razón de distribución para el método de 100 mL ($7'77 \times 10^{-5}$ mmoles de cadmio).

Determinación nº	$(A_{\text{neta}})_1$	mmol/g de Cd(II) en fase sólida	$(A_{\text{neta}})_2$	mmol/mL de Cd(II) en disolución	D (mL/g)
1	0'6430	$8'91 \times 10^{-4}$	-0'0336	$6'45 \times 10^{-8}$	13814
2	0'6129	$8'49 \times 10^{-4}$	-0'0430	$6'45 \times 10^{-8}$	13163
3	0'6834	$9'46 \times 10^{-4}$	-0'0422	$6'45 \times 10^{-8}$	14667

Condiciones experimentales: [PAR] = $7'08 \times 10^{-6}$ M; [KI] = $3'39 \times 10^{-2}$ M; 80 mg Sephadex QAE A-25; 15 minutos de agitación.

Tabla V.53. Razón de distribución para el método de 500 mL ($7'81 \times 10^{-5}$ mmoles de cadmio).

Determinación nº	$(A_{\text{neta}})_1$	mmol/g de Cd(II) en fase sólida	$(A_{\text{neta}})_2$	mmol/mL de Cd(II) en disolución	D (mL/g)
1	0'8296	$9'35 \times 10^{-4}$	0'0621	$1'37 \times 10^{-8}$	68248
2	0'8008	$9'02 \times 10^{-4}$	0'0623	$1'37 \times 10^{-8}$	65839
3	0'8061	$9'09 \times 10^{-4}$	0'0610	$1'37 \times 10^{-8}$	66350

Condiciones experimentales: [PAR] = $9'95 \times 10^{-6}$ M; [KI] = $0'7 \times 10^{-2}$ M; 80 mg Sephadex QAE A-25; 50 minutos de agitación.

Los valores medios, para $V = 100$ y 500 mL, son:

$$(1'4 \pm 0'2) \times 10^4 \text{ mL/g} \quad \text{y} \quad (6'9 \pm 0'3) \times 10^4 \text{ mL/g}$$

respectivamente.

Dados los elevados valores obtenidos para la razón de distribución, se puede considerar que, en las condiciones operatorias de ambos métodos, la fijación del cadmio en forma de complejo Cd(II)-PAR puede considerarse cuantitativa.

5.- FACTORES QUE MODIFICAN LA SENSIBILIDAD

La sensibilidad de los métodos en Espectrofotometría en Fase Sólida se incrementa cuanto mayor sea V/m_r , siendo V el volumen de muestra y m_r la masa del cambiador [15]. La concentración de analito en fase sólida, y en consecuencia la absorbancia, serán mayores cuanto mayor sea el volumen de disolución problema, siempre que la razón de distribución sea suficientemente alta.

5.1.- Volumen de muestra

Según lo recogido en el apartado anterior, al aumentar el volumen de fase acuosa que se equilibra con el cambiador aumenta el valor de la razón de distribución y esto aumenta la sensibilidad de la determinación. Así, se puede comprobar que de acuerdo con la expresión [16]:

$$\frac{S_{V_2}}{S_{V_1}} = \frac{(m_r D + V_1) V_2}{(m_r D + V_2) V_1}$$

y utilizando como razón de distribución el valor correspondiente a 100 mL, el aumento estimado de la sensibilidad correspondiente a 500 mL con relación a 100 mL es: 4'8. Valor que concuerda con el obtenido al dividir las razones de distribución para ambos

volumenes $\frac{D_{500}}{D_{100}} = 4'9$.

En la figura V.21, se representa la influencia del volumen de muestra sobre la absorbancia.

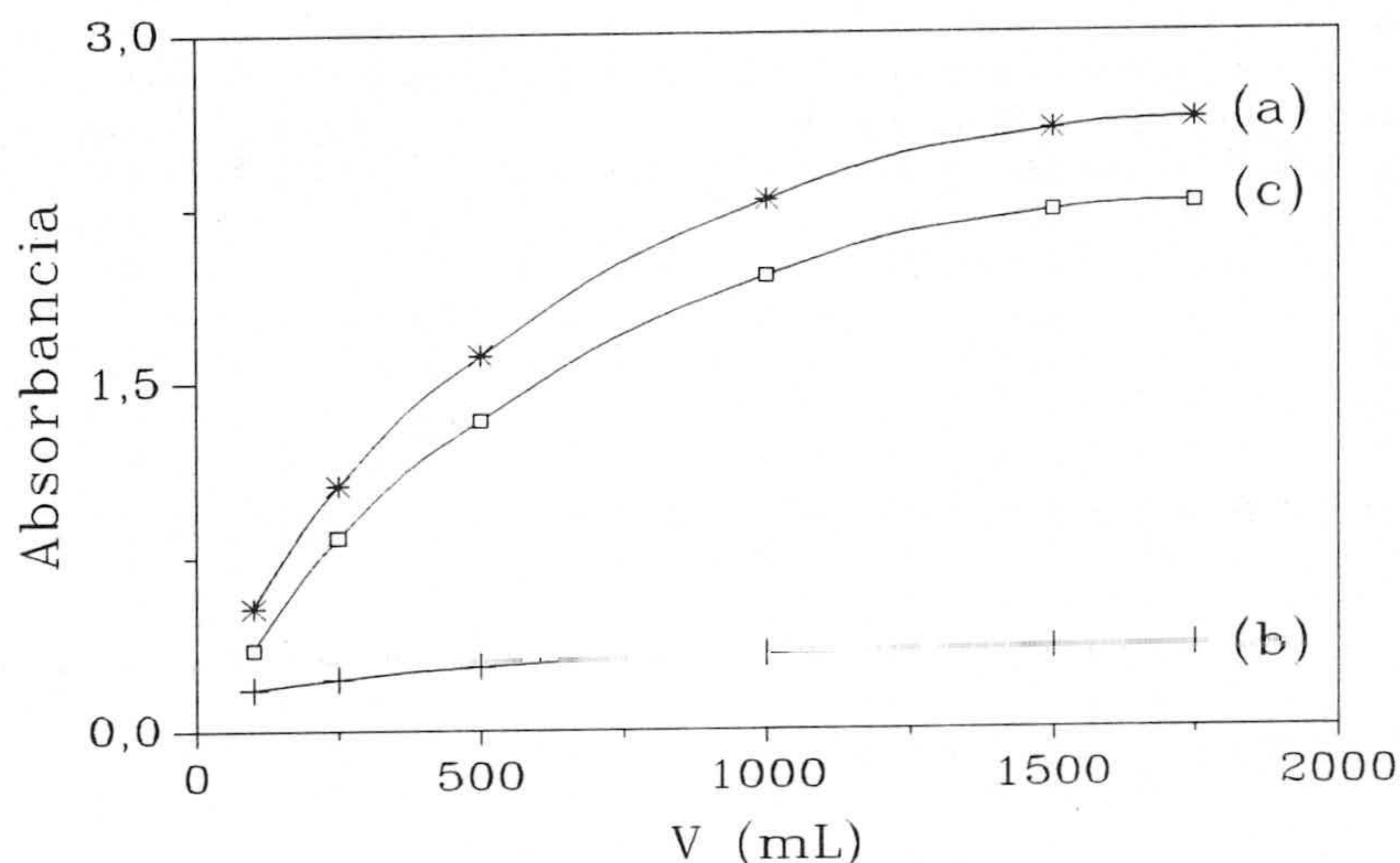


Figura V.21. Influencia del volumen de muestra. Influencia sobre la absorbancia de analito (a), de blanco (b) y neta (c). $C_{Cd} = 42'12$ ppb, $[KI] = 3'4 \times 10^{-2}$ M, $[PAR] = 7'1 \times 10^{-6}$ M, $[Tampón] = 2 \times 10^{-2}$ M (pH = 8'7), 80 mg de Sephadex QAE A-25. Las disoluciones se equilibraron durante un tiempo proporcional al incremento de volumen experimentado.

Conforme el volumen de muestra aumenta, la absorbancia neta del complejo crece hasta que se alcanza una constancia que corresponde a un volumen de 1500 mL, a partir del cual ya no se produce aumento apreciable de la señal. La estabilización de dicha señal, cuando se trabaja con volúmenes grandes, puede atribuirse al hecho de que para alcanzar el equilibrio en el sistema sería necesario un tiempo de agitación mayor.

5.2.- Cantidad de soporte sólido

La influencia que ejerce la cantidad de soporte sólido en el valor de la absorbancia del complejo se muestra en la figura V.22. En ella se observa como a medida que la cantidad del cambiador utilizada aumenta la absorbancia decrece. Esto es debido a la fijación de una cantidad constante de complejo sobre cantidades crecientes de

cambiador, lo que da lugar a su "dilución".

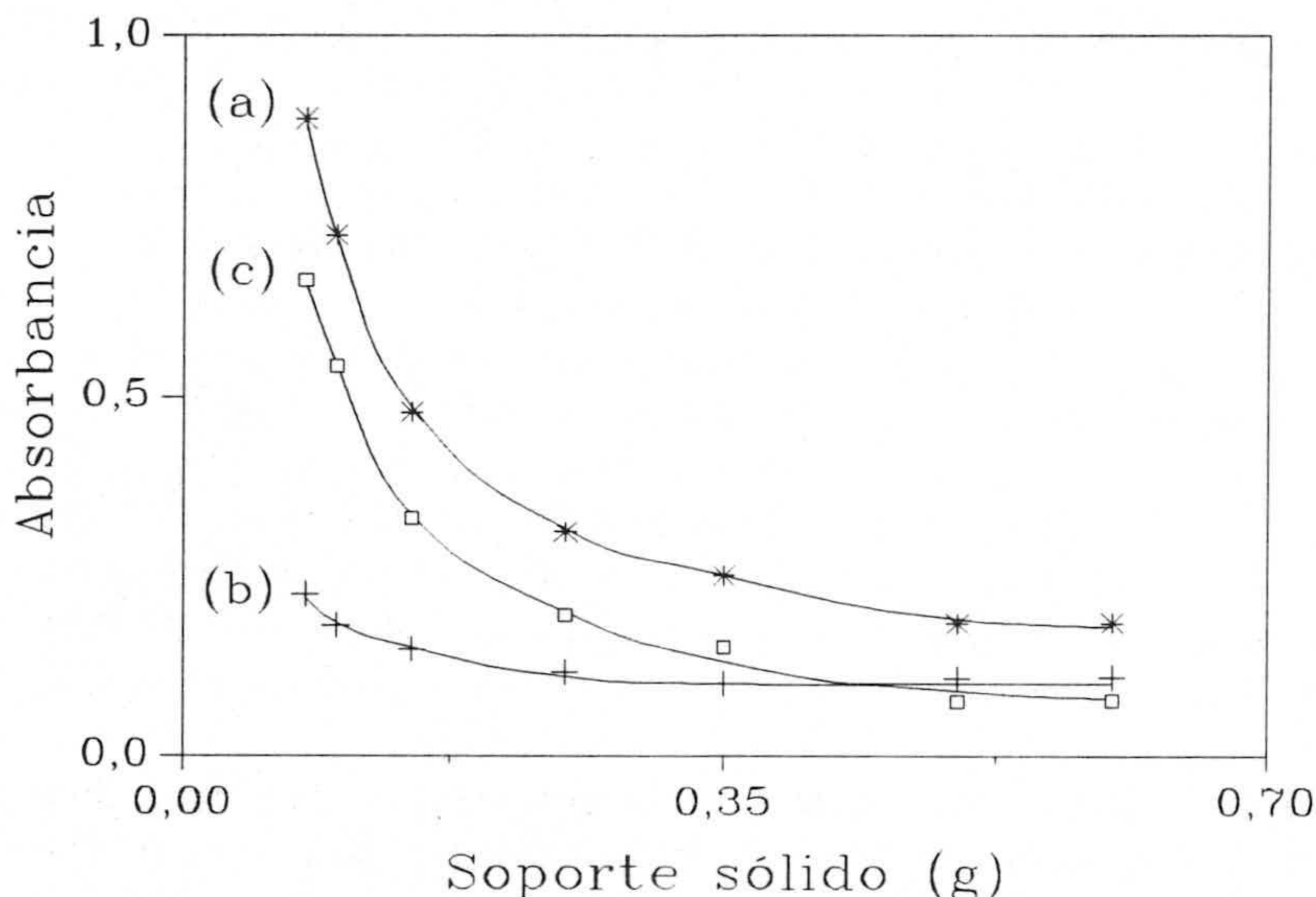


Figura V.22. Influencia de la cantidad de soporte sólido. Influencia sobre la absorbancia de analito (a), de blanco (b) y neta (c). $C_{Cd} = 75,7$ ppb, $[KI] = 3,4 \times 10^{-2}$ M, $[PAR] = 7,1 \times 10^{-6}$ M, $pH = 8,7$, $V = 115,4$ mL, $t_{agitación} = 10$ min.

Si se realiza la transformación logarítmica de los valores experimentales de la absorbancia neta y de la masa de soporte y se procede a un ajuste por mínimos cuadrados de los mismos (tabla V.54) se obtiene la ecuación:

$$\log A_{neta} = -1,380 - 1,105 \log m_r \quad (1)$$

siendo A_{neta} la absorbancia neta del complejo y m_r la masa del soporte sólido en gramos ($r^2 = 0,9910$).

Tabla V.54. Influencia de la cantidad de soporte sólido.

m_r (g)	A_{neta}	$\log m_r$	$\log A_{neta}$
0'08	0'6611	-1'097	-0'180
0'10	0'5434	-1'000	-0'265
0'15	0'3305	-0'824	-0'481
0'25	0'1954	-0'602	-0'709
0'30	0'1505	-0'452	-0'822
0'50	0'0774	-0'301	-1'111
0'60	0'0763	-0'222	-1'117

A partir de la ecuación 1, es posible estimar el valor de la absorbancia neta para cualquier cantidad de soporte, siempre que las condiciones de la experiencia sean las mismas y la cantidad del cambiador esté entre 0'08 y 0'60 g. Lo que permite seleccionar distintas cantidades de soporte en función bien de la cantidad de analito en la muestra o de otros parámetros, como puede ser la facilidad de manipulación.

La cantidad de soporte de 0'080 g es la que proporciona una máxima sensibilidad, al mismo tiempo que se maneja con comodidad en el proceso operatorio, y por tanto es la usada en todas las experiencias.

De la relación entre la absorbancia, A_{neta} , y la cantidad de soporte, m_r , se puede deducir el valor de la absortividad molar del complejo en la fase sólida. Según Yoshimura y Waki [15], la relación entre dichas variables viene dada por la ecuación:

$$A_{neta} = \epsilon_c l_R C_o V \frac{1}{(m_r + \frac{V}{D})}$$

donde ϵ_c es la absorptividad molar del complejo en la fase s3lida (kg/mol.cm), l_R es la longitud del paso de luz (cm), C_o la concentraci3n inicial de Cd(II) (mol/L), V el volumen de la disoluci3n (mL), D la raz3n de distribuci3n (mL/g) y m_r la masa del soporte s3lido (g). La fracci3n V/D puede ser despreciable frente a m_r cuando la cantidad de soporte es suficientemente grande, obteniendo de este modo la ecuaci3n aproximada que relaciona la absorptancia con la masa del cambiador:

$$A_{neta} = \epsilon_c l_R C_o V \frac{1}{m_r} \quad (2)$$

donde $\epsilon_c l_R C_o V$ es la pendiente de la recta obtenida al representar A_{neta} frente a $1/m_r$.

La representaci3n de nuestros datos, para cantidades de soporte iguales o superiores a 0'15 g, conduce a la ecuaci3n empírica:

$$A_{neta} = -0'012 + 0'052 \frac{1}{m_r} \quad (r^2 = 0'9904)$$

siendo por tanto $\epsilon_c l_R C_o V$ igual a 0'052. Si despejamos ϵ_c y operamos en la ecuaci3n resultante, se obtiene un valor de $6'7 \times 10^3$ kg/mol.cm para ϵ_c .

Al mismo tiempo, la absorptividad molar del complejo en la fase s3lida, ϵ_c , puede ser calculada a partir de la absorptividad molar aparente, ϵ , obtenida del calibrado ($1'03 \times 10^7$ L/mol.cm para el m3todo de 100 mL), seg3n la expresi3n:

$$\epsilon_c = \frac{\epsilon}{\frac{V}{(m_r + \frac{V}{D})}}$$

obteniéndose un valor de $7'9 \times 10^3$ Kg/mol.cm.

Como se observa, la concordancia entre los valores encontrados para ϵ_c es buena.

6.- APLICACIONES ANALÍTICAS

Con objeto de estudiar la aplicabilidad de los métodos propuestos a la determinación de cadmio en el medio ambiente, se analizaron dos muestras sintéticas:

- * Muestra 1: Una disolución conteniendo algunos de los componentes (mayoritarios y minoritarios) de las aguas naturales.
- * Muestra 2: Agua de lluvia simulada, SRM 2694 I [17].

6.1.- Muestra 1

La determinación de Cd(II) en esta muestra, cuya composición química se recoge en la tabla V.55, se llevó a cabo en presencia de la mezcla ternaria de citrato, fluoruro y tiosulfato (20 ppm cada uno de ellos), usada como agente enmascarante.

Se realizó un calibrado estándar -por duplicado- en presencia de dicha mezcla ternaria de enmascarantes. La ecuación de la recta de calibrado obtenida es:

$$A = 0'3178 + 0'0417C_{Cd}$$

cuyos principales parámetros estadísticos se recogen en la tabla V.56.

Tabla V.55. Composición química de la muestra 1.

Ión	Concentración (ppb)
Ca(II)	2700'00
Cd(II)	17'30
Cl ⁻	402'00
Cu(II)	1'00
Fe(III)	10'00
Mg(II)	300'00
Mn(II)	5'00
Ni(II)	1'00
NO ₃ ⁻	9920'00
Pb(II)	10'00
SO ₄ ²⁻	19770'00
Zn(II)	1'00

Tabla V.56. Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	10
m	2
$s_{R,C}$	0'0436
a	0'3178
s_a	0'0239
b	0'0417
s_b	0'0014
r^2 (%)	99'10

Siguiendo el método propuesto para 500 mL, se operó sobre 500 mL de muestra de agua sintética (tabla V.55) a los que se añadieron 1 ml de disolución de mezcla ternaria de agentes enmascarantes 10 g/L y los demás reactivos. Los blancos correspondientes con su contenido en iones y con la mezcla de enmascarantes pero exentos de Cd(II), se prepararon de la misma manera.

En la tabla V.57 se recogen las absorbancias netas obtenidas, la concentración media de cadmio recuperada, así como el porcentaje de error relativo de ésta frente a la concentración de cadmio puesta (17'3 ppb).

Tabla V.57. Resultados obtenidos para la muestra 1.
Concentración de cadmio puesta 17'3 ppb.

A_{neta}	Cadmio hallado (ppb) $\bar{C}_{Cd} \pm s_{n-1}$	E.R (%)
0'7097 0'6786 0'6974	16'6 ± 0'4	-4'0

La comparación del valor medio de la concentración de cadmio hallada, 16'6 ppb, con el valor de referencia, 17'3 ppb, llevada a cabo con el test t de Student da un P(C) = 7'8%, lo que indica que no existen diferencias significativas entre ambos resultados y por tanto, se acepta la veracidad del método propuesto para esta muestra sintética.

6.2.- Muestra 2

De forma similar a lo indicado en el Capítulo III se preparó el patrón SRM 2694 I [17] y cuya composición se recoge en el apéndice (tabla A.1).

Para llevar a cabo la aplicación del procedimiento propuesto, se realizó previamente una recta de calibrado del método para 500 mL utilizando 80 mg de soporte sólido. La ecuación correspondiente a dicha recta de calibrado ajustada por el método de mínimos cuadrados es:

$$A = 0'6378 + 0'0490C_{Cd}$$

donde la concentración de Cd(II) viene expresada en ppb.

Se utilizó el paquete informático "QUIMIO" para la comparación de las pendientes, de esta recta de calibrado con la que se realizó anteriormente (apartado 3.2.5), dicho test indicó que no hay diferencia significativa entre ambas pendientes.

En la tabla V.58, se indican los principales parámetros estadísticos de la ecuación de calibrado.

Tabla V.58. Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	4
m	1
$s_{R,C}$	0'0536
a	0'6378
s_a	0'0449
b	0'0490
s_b	0'0024
r^2 (%)	99'54

La aplicación del método propuesto se llevó a cabo preparando una muestra diluida (1000 veces) y conteniendo 14'6 ppb de Cd(II). A partir de ésta, se hicieron dos calibrados, uno de adición de patrón y otro de Youden. En la tabla V.59, se recogen los datos obtenidos en las distintas series de medidas que constituyen la determinación de cadmio en dicha muestra y en la figura V.23 se muestran las representaciones gráficas

de las mismas.

Tabla V.59. Calibrados para la determinación de Cd(II) en SRM 2694 I.

Calibrado	V_{muestra} (mL)	C_{Cd} (ppb) añadida	A		
De adición de patrón (CA)	200	0'00	0'9994	0'9480	0'9695
	200	6'77		1'3600	
	200	13'54		1'6993	
	200	20'31		2'1521	
De Youden (CY)	100	-----		0'8063	
	150	-----		0'8447	
	200	-----		0'9723	
	250	-----		1'0602	
	300	-----		1'2032	
	400	-----		1'4409	
	500	-----		1'5720	

Los principales parámetros calculados para las rectas correspondientes a los calibrados establecidos, se indican en la tabla V.60.

Tabla V.60. Parámetros estadísticos de los dos calibrados establecidos.

Parámetro	CA	CY
n	6	7
a	0'9689	0'5694
b	0'0570	1'0437
$s_{R,C}$	0'0307	0'0350

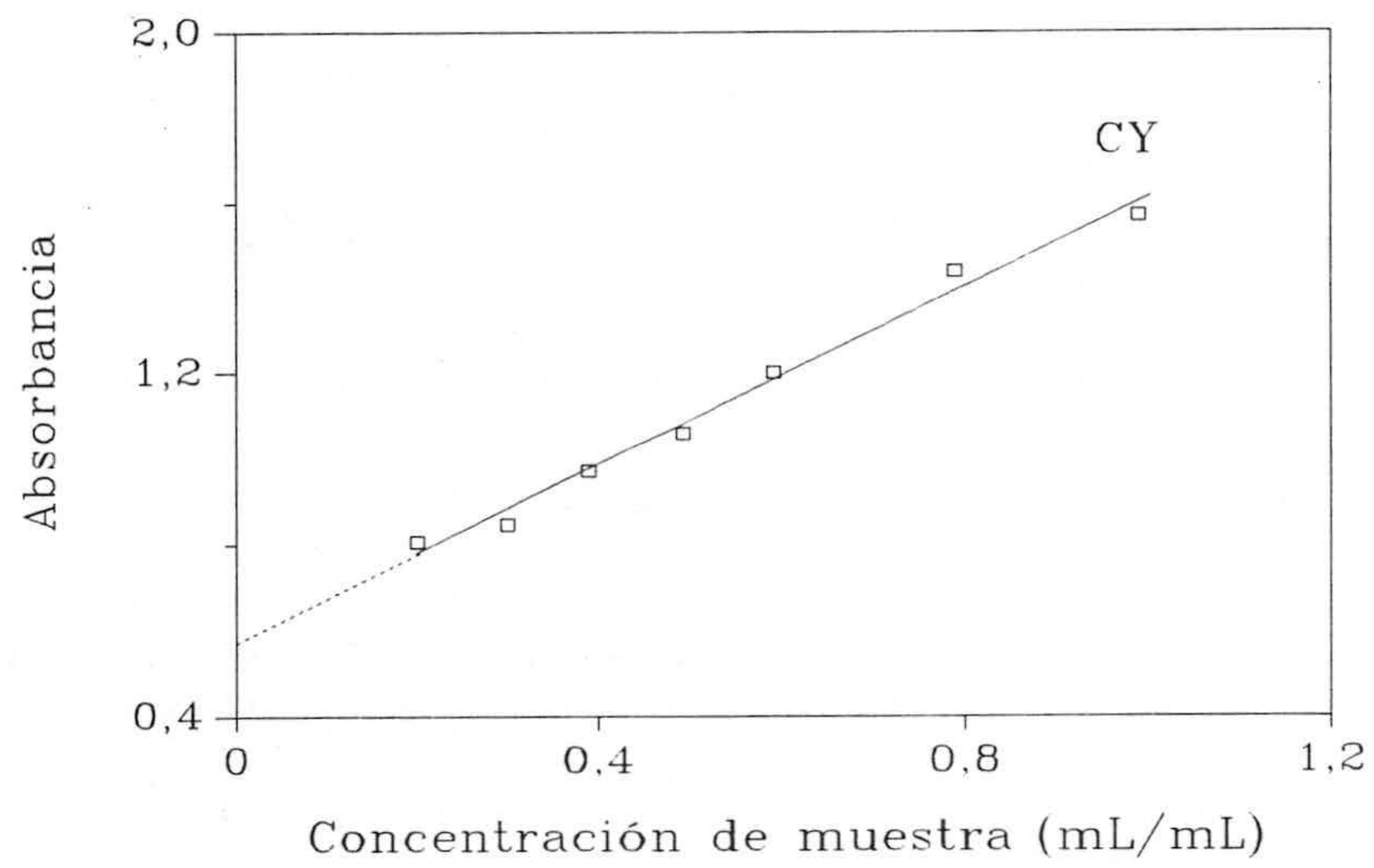
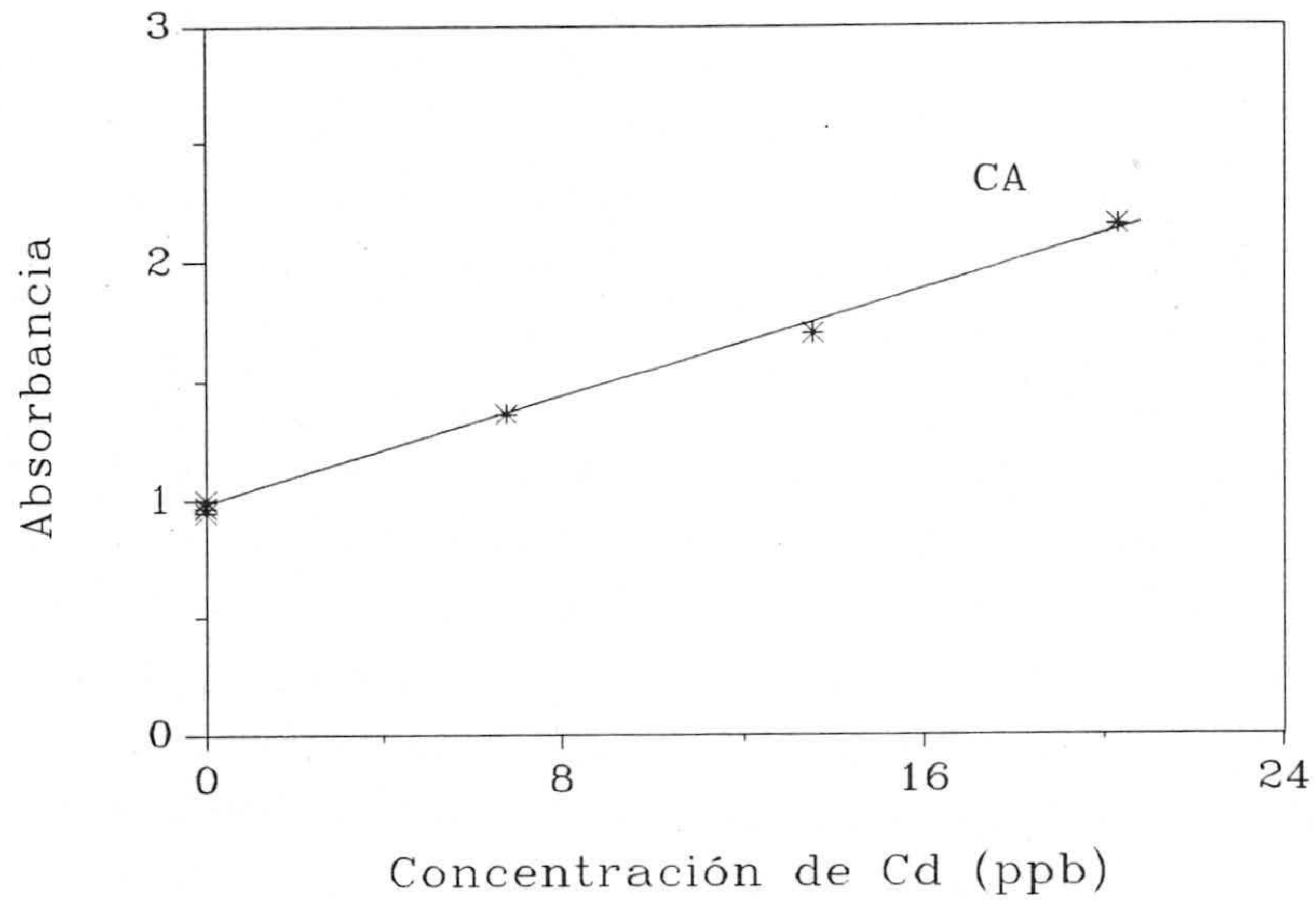


Figura V.23. Rectas correspondientes a los calibrados establecidos para validar la determinación de cadmio en SRM 2694 I.

Puesto que:

$$a_{CY} = 0'5694 \in (0'5877 \pm 0'3305)$$

se concluye que no existe componente de error sistemático constante y por tanto $BY=0$.

Por extrapolación a $A=0$ de los tres valores de la absorbancia, una vez restada a_{CE} , se obtiene tanto el contenido en cadmio en cada una de las disoluciones preparadas como el contenido final en la muestra teniendo en cuenta el factor de dilución $f_{dil} = 506'7/200$. En la tabla V.61 se recogen los resultados obtenidos.

Tabla V.61. Contenido en cadmio en SRM 2694 I.
Concentración de cadmio puesta 14'6 ppb.

Determinación nº	$A=0$	$C_{disolución}$ (ppb)	$C_{muestra}$ (ppb)
1	0'9994	6'34	16'1
2	0'9480	5'44	13'8
3	0'9695	5'82	14'7

Por tanto, el contenido en cadmio en SRM 2694 I, expresado como $\bar{C}_{muestra} \pm s_{n-1}$ es:

$$C_{Cd} = (14'9 \pm 1'2) \text{ ppb}$$

La comparación del valor medio de la concentración de cadmio hallada, 14'9 ppb, con el valor de referencia, 14'6 ppb, llevada a cabo con el test t de Student da un $P(C) = 72'9\%$, lo que indica que no existen diferencias significativas entre ambos resultados y por tanto, se acepta la veracidad del método propuesto para esta muestra sintética.

Ensayos de recuperación

Una vez comprobada la igualdad de pendientes de las rectas de calibrado estándar y de adición de patrón ($P(b) = 2'6\%$) y con el fin de comprobar la veracidad del método propuesto, se prepararon a partir de la muestra SRM 2694 I, dos disoluciones 1000 veces más diluidas (A y B), conteniendo 21'4 y 30'0 ppb de Cd(II) respectivamente. Se tomaron alícuotas de 200 mL de estas disoluciones y se operó siguiendo el procedimiento habitual. Los resultados obtenidos para ambas disoluciones, se recogen en la tabla V.62.

Tabla V.62. Resultados obtenidos para las muestras sintéticas A (21'4 ppb) y B (30'0 ppb).

Muestra sintética	A	Cadmio hallado (ppb) $C_{muestra} \pm S_{n-1}$	$\bar{\mathcal{R}}$ (%)
A	1'0337 1'0607 1'0666	21'5 \pm 0'9	100'4
B	1'2327 1'1812 1'2126	29'5 \pm 1'4	98'5

Las recuperaciones medias obtenidas se contrastan frente a 100 utilizando el test t de Student. De dicho test se concluye que las recuperaciones medias son significativamente iguales a 100, con valores de $P(\bar{\mathcal{R}})$ de 88'3 y 61'7% respectivamente, y por lo tanto el método propuesto es veraz.

BIBLIOGRAFÍA

- [1].- S. Shibata, "2-Puridylazo Compounds in Analytical Chemistry", en: H.A. Flaschka, A.J. Barnard, "Chelates in Analytical Chemistry". Vol. IV, 116-164. Ed. Marcel Dekker, INC., New York, 1972.
- [2].- K. Yoshimura, S. Ohashi, *Memoirs of the Faculty of Science, Kyushu University*, Ser. C, **11(2)**, 181-188, 1978.
- [3].- Monografía A.E.F.I., "Validación de Métodos Analíticos", Hewlett-Packard Eds., 1989.
- [4].- IUPAC. Analytical Chemistry Division, *Spectochim. Acta B*, **33B**, 242-245, 1978.
- [5].- L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, M. Román Ceba, *Anal. Lett.*, **26**, 1243-1258, 1993.
- [6].- Y.K. Agrawal, T.A. Desai, *Analyst*, **111**, 305-307, 1986.
- [7].- B. Raman, V.M. Shinde, *Analyst*, **115**, 93-98, 1990.
- [8].- A.M. García Rodríguez, A.G. De Torres, J.M. Cano Pavón, C. Bosch Ojeda, *Talanta*, **40(12)**, 1861-1866, 1993.
- [9].- T. Kiriyaama, R. Kuroda, *Mikrochim. Acta*, Parte I, 405-407, 1985.
- [10].- C.F. Ishak, R.T. Pflaum, *Analyst*, **113**, 941-944, 1988.
- [11].- S. Shibata, *Anal. Chim. Acta*, **82**, 169-173, 1976.
- [12].- X.C. Qiu, Y.Q. Zhu, J.P. Yan, *Analyst*, **113**, 1329-1331, 1988.
- [13].- M. Komata, J.I. Itoh, *Talanta*, **35(9)**, 723-724, 1988.
- [14].- A.M. García Campaña, L. Cuadros Rodríguez, C. Jimenéz Linares, F. Allés Barrero, M. Román Ceba, *Anal. Lett.*, **28(2)**, 369-380, 1995.
- [15].- K. Yoshimura, H. Waki, *Talanta*, **32(5)**, 345-352, 1985.
- [16].- K. Yoshimura, S. Ohashi, *Talanta*, **25**, 103-107, 1978.
- [17].- W.F. Koch, G. Marinenko, R.C. Paule, *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **91**, 33-41, 1986.

CAPÍTULO VI

DETERMINACIÓN DE CINC Y CADMIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA EN FASE SÓLIDA.

La determinación simultánea de cinc y cadmio es de gran importancia puesto que ambos metales suelen encontrarse conjuntamente en la naturaleza. La relación existente entre ambos metales difiere de una muestra a otra, pero suelen existir mayores cantidades de cinc que de cadmio [1]. Murillo y Lemus [2] determinaron simultáneamente dichos metales por espectrofotometría derivada de primer y segundo orden utilizando como reactivo el 1'2'3-ciclohexanotriona-1'3-dioxima-3-tiosemicarbazona (CTDT).

En las condiciones de trabajo estudiadas y seleccionadas en los capítulos IV y V, donde se recoge la determinación individual de cinc y cadmio, respectivamente, sería inviable pensar en una determinación simultánea de ambos metales mediante la medida directa utilizando los espectros de absorción de los complejos de PAR, ya que existe un gran solapamiento entre dichos espectros.

El uso de la Espectrofotometría Derivada en Fase Sólida (EDFS) [3-5] permite diferenciar señales solapadas de compuestos fijados en fase sólida, por lo que constituye una herramienta importante para proponer métodos de determinación simultánea de ambos metales, sin previa separación.

En el presente capítulo nos proponemos desarrollar un método para la determinación simultánea de cinc y cadmio con 4-(2-piridilazo)resorcinol como reactivo, en presencia de yoduro potásico, utilizando EDFS y para un volumen de 500 mL.

1.- OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES QUÍMICAS QUE AFECTAN LA FIJACIÓN SIMULTÁNEA DE CINC Y CADMIO

1.1.- Variables químicas que afectan la fijación simultánea de cinc y cadmio

De los estudios realizados anteriormente sobre la fijación de los complejos Zn(II)-PAR y Cd(II)-PAR, en presencia de KI sobre el soporte Sephadex QAE A-25 (capítulos IV y V respectivamente), se eligen las siguientes condiciones de las variables químicas para la determinación simultánea de Zn(II) y Cd(II), en un volumen final de 500 mL, mediante Espectrofotometría Derivada en Fase Sólida:

- pH = 8'7 (5 mL de la disolución reguladora H_3BO_3/NaH_2BO_3 0'5 M)
- Orden de adición: KI + PAR + Tampón.
- Cambiador: 80 mg de Sephadex QAE A-25.
- Tiempo de agitación: 40 minutos.

Dado que estas variables causan efectos similares sobre los sistemas Zn(II)-PAR y Cd(II)-PAR estudiados individualmente, se ha considerado innecesario reoptimizarlas en este capítulo.

1.2.- Concentraciones de PAR y KI

A partir del estudio llevado a cabo sobre el efecto que las concentraciones de PAR y KI ejercen sobre la absorbancia de los respectivos complejos de cinc y cadmio, utilizando los diseños Doehlert (diseño II, capítulo IV y V), para un volumen de 500 mL, se pueden obtener dos importantes conclusiones:

- Tanto en el sistema Zn(II)-PAR como en el Cd(II)-PAR ni los efectos lineales, ni los cuadráticos correspondientes a la concentración del PAR eran significativos.

- El único sistema, donde los efectos lineales y los cuadráticos correspondientes a la concentración de KI eran significativos, fue el Cd(II)-PAR.

Con los datos de dichos estudios, es posible estimar las concentraciones más adecuadas para la determinación simultánea de ambos metales.

1.2.1.- Concentración de PAR

Puesto que la concentración de PAR no tenía efecto importante, en el rango ensayado, sobre los dos sistemas estudiados individualmente, era necesaria mayor concentración de PAR para la determinación de cadmio y teniendo en cuenta, que de forma general, las muestras naturales de agua en las que existen ambos analitos, presentan concentraciones de cinc superiores a las de cadmio, se estimó oportuno elegir una concentración de PAR que permitiera aumentar la sensibilidad en la determinación de cadmio utilizando una concentración de $9'95 \times 10^{-6}$ M -máxima para este reactivo en el diseño II (capítulo V, método 500 mL)- aún a costa de rebajar la sensibilidad de cinc.

1.2.2.- Concentración de KI

Para ver la influencia de la concentración de KI, se prepararon tres disoluciones conteniendo 4'93 ppb de Zn(II) la primera, 15'57 ppb de Cd(II) la segunda y la mezcla de ambos metales la tercera. A continuación, se añadieron a todas las disoluciones, volúmenes crecientes y variables de la disolución de KI 2'5 M, 1 mL de la disolución de PAR $4'98 \times 10^{-3}$ M y 5 mL de la disolución tampón (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'5 M de pH = 8'7. El blanco correspondiente, en ausencia de cinc y cadmio, se preparó de la misma manera.

Después de agitar todas las botellas durante 40 minutos, se aplicó el procedimiento operatorio. Las absorbancias netas obtenidas se recogen en la tabla (VI.1) y se representan en la figura (VI.1).

Tabla VI.1. Concentración de KI.

[KI]x10 ² M	A ^{Zn(II)} _{500 nm}	A ^{Cd(II)} _{504 nm}	A ^{Mezcla} _{502 nm}
0'35	0'6561	0'9088	1'5438
0'70	0'6549	0'7828	1'3646
1'20	0'6628	0'6975	1'3515

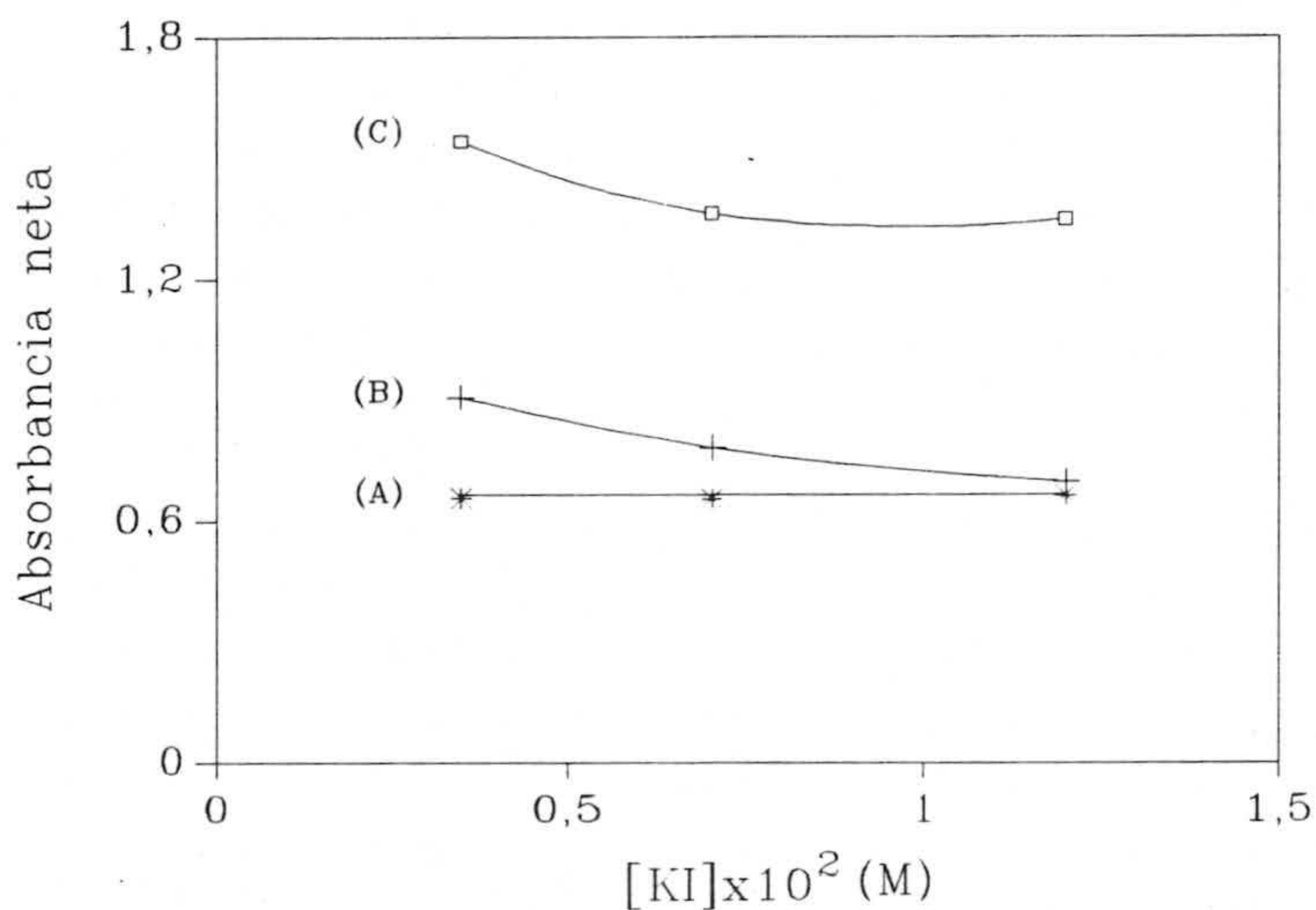


Figura VI.1. Concentración de KI. (A): cinc; (B): cadmio y (C): mezcla de ambos metales.

A la vista de la representación gráfica, y debido a que la absorbancia neta correspondiente al sistema Zn(II)-PAR es independiente de la concentración del haluro, se estimó conveniente trabajar con una concentración de KI de 0'35x10⁻² M, con el fin de obtener la mayor absorbancia para el complejo de Cd(II).

2.- DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CINCO Y CADMIO POR ESPECTROFOTOMETRÍA DERIVADA EN FASE SÓLIDA

Para el estudio de la resolución de la mezcla binaria compuesta por cinc y cadmio se prepararon tres disoluciones conteniendo 4'93 ppb de Zn(II) la primera, 15'57 ppb de Cd(II) la segunda y la mezcla de ambos metales la tercera. A continuación, se añadieron a todas las disoluciones, 0'7 mL de la disolución de KI 2'5 M, 1 mL de la disolución de PAR $4'98 \times 10^{-3}$ M y 5 mL de la disolución tampón (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'5 M de pH = 8'7. El blanco correspondiente, exento de Zn(II) y Cd(II), se preparó de la misma manera.

Tras agitar todas las botellas durante 40 minutos, se obtuvieron los espectros de absorción de la figura VI.2.

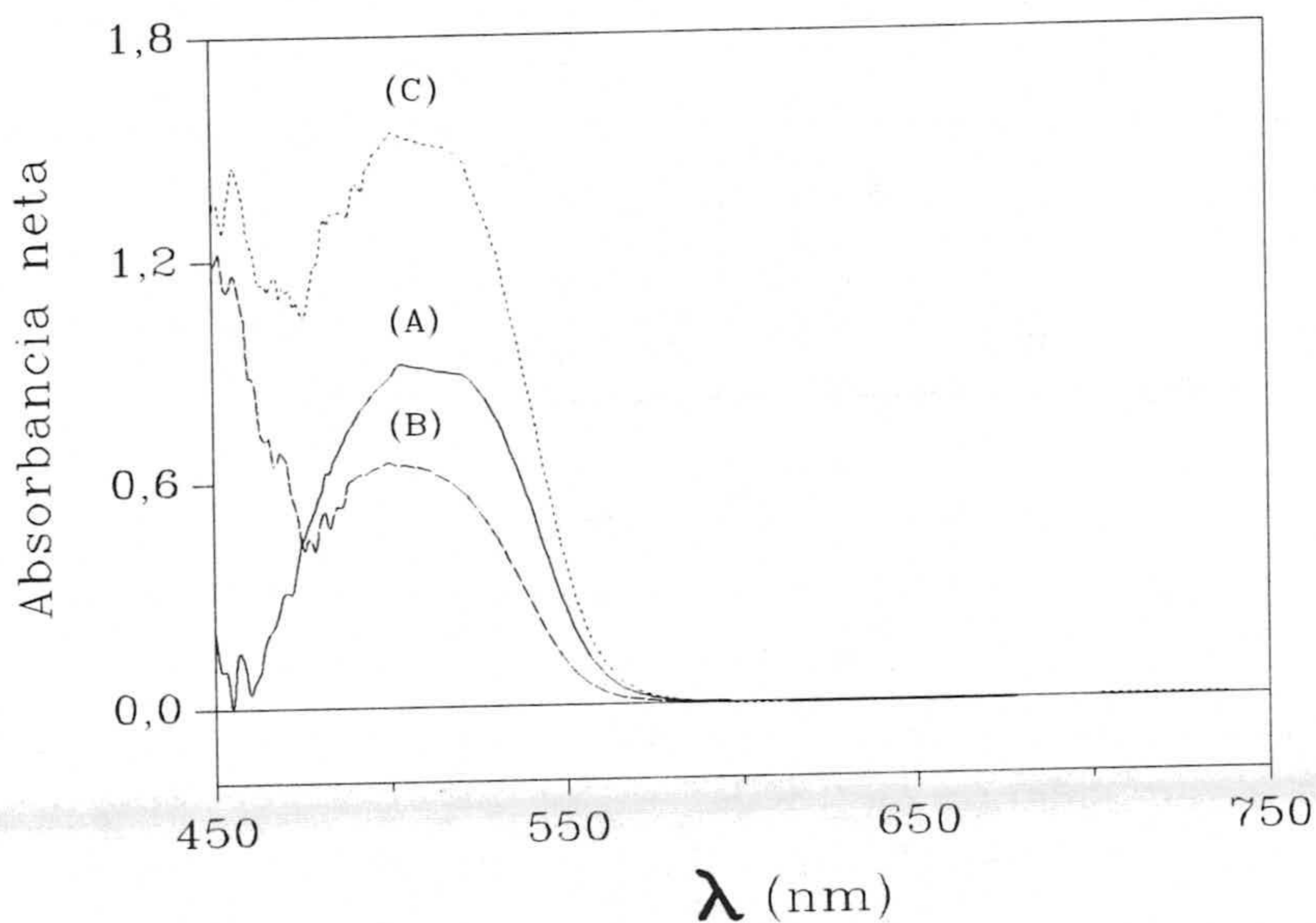


Figura VI.2. Espectros de absorción. (A): 15'57 ppb de cadmio; (B): 4'93 ppb de cinc y (C): mezcla de ambos metales.

Se observa, a partir de dicha figura, que los complejos de cinc y de cadmio tienen máximos de absorción a 500 y 504 nm respectivamente, mientras que el espectro de la mezcla de ambos metales, suma de los espectros individuales de cinc y cadmio, presenta su máximo de absorción a 502 nm.

El grado de solapamiento existente entre los espectros de los dos complejos impide la determinación simultánea de ambos iones en sus mezclas por medidas espectrofotométricas directas. Por este motivo se ha empleado la espectrofotometría derivada en fase sólida para poder realizar dicha determinación.

2.1.- Obtención de los espectros derivados

Para resolver una mezcla mediante EDFS, se pueden utilizar varios procedimientos tales como la técnica del "zero-crossing" [6], el "método de la regresión lineal a múltiples longitudes de onda" [7] o el "método de derivadas de espectros divididos" [8]. En el presente trabajo se utilizó la técnica del "zero-crossing" para resolver la mezcla de los complejos Zn(II)-PAR y Cd(II)-PAR en presencia de KI.

Para ello y a partir de los espectros de absorción del apartado anterior se obtienen los espectros derivados de primer a cuarto orden.

De las derivadas realizadas, la mejor resolución se obtuvo con la segunda derivada (figura VI.3). En ésta, se puede observar como es posible determinar simultáneamente cinc y cadmio en sus mezclas binarias por espectrofotometría derivada en fase sólida empleando la técnica de *zero-crossing*, realizando la medida en la segunda derivada a 540'5 nm para el complejo de cinc (${}^2D_{540'5}$), ya que la señal del espectro derivado de segundo orden de la mezcla coincide con la señal del espectro derivado de segundo orden de cinc a esa longitud de onda. Por su parte, la determinación de cadmio se realiza midiendo en la segunda derivada a 537'2 nm (${}^2D_{537'2}$), ya que a esta longitud de onda la señal del espectro derivado de segundo orden de la mezcla, coincide con la señal del espectro derivado de segundo orden de cadmio. Se cumple además que ambos analitos se pueden determinar con el mismo orden de la derivada.

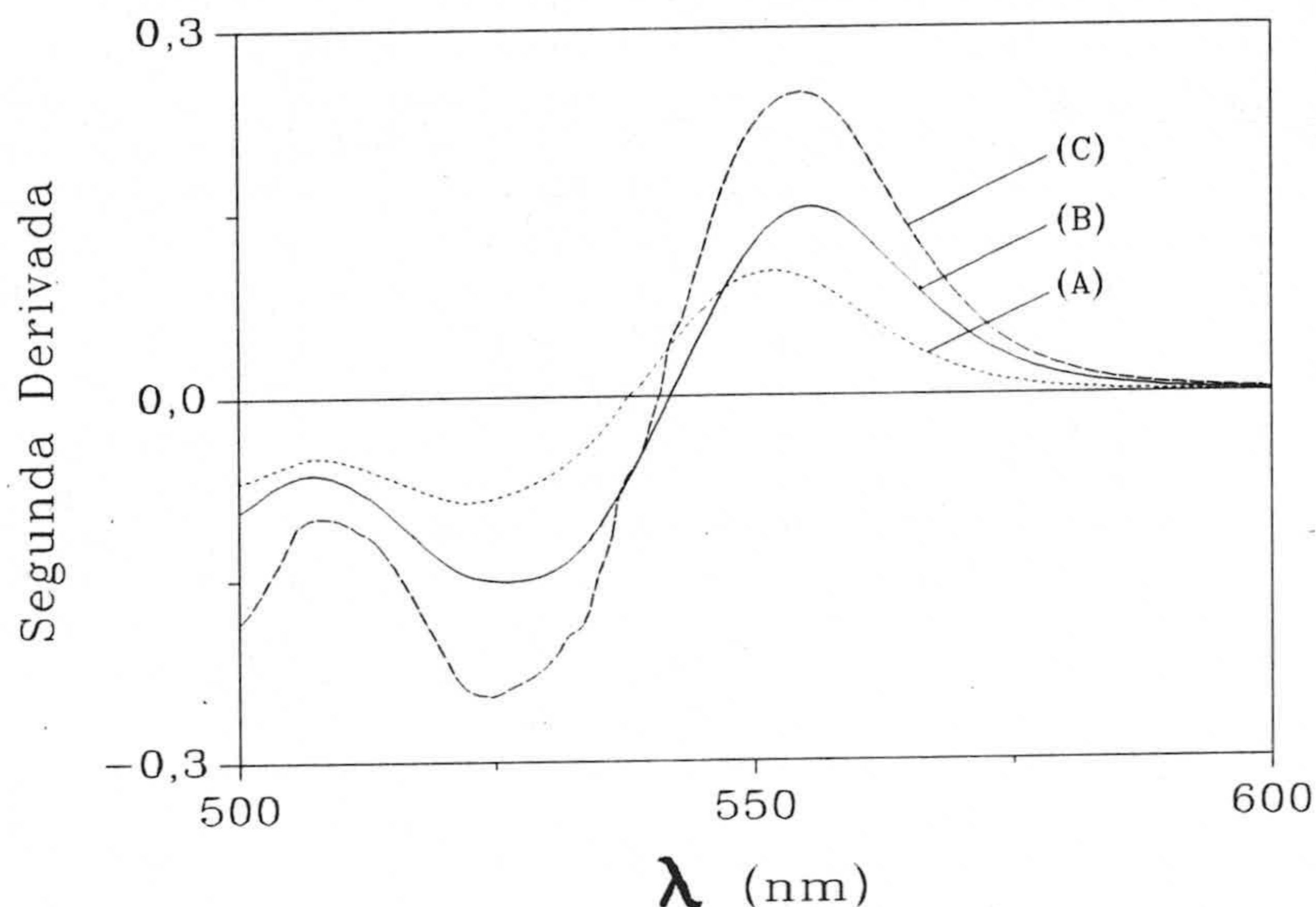


Figura VI.3. Espectros derivados de segundo orden. (A): 4'93 ppb de cinc; (B): 15'57 ppb de cadmio y (C): mezcla de ambos metales.

2.2.- Selección de las condiciones instrumentales óptimas para la determinación de mezclas de complejos de cinc y cadmio por espectrofotometría derivada en fase sólida

El estudio de la influencia de los parámetros instrumentales, se ha llevado a cabo en la forma tradicional, es decir, variando el parámetro en estudio y manteniendo constantes los valores de los restantes.

Las variables instrumentales que afectan a la obtención de espectros derivados son: la velocidad de barrido, el factor de filtrado y el incremento de longitudes de onda usado para obtener dichos espectros derivados.

2.2.1.- Influencia de la velocidad de barrido

El espectrofotómetro utilizado permite obtener los espectros de absorción con velocidades de barrido entre 7'5 y 2880 nm/min.

Para estudiar la influencia de la velocidad de barrido sobre la señal de la segunda derivada se registró un espectro de una mezcla de 4'93 ppb de Zn(II) y 8'12 ppb de Cd(II) en fase sólida a diferentes velocidades de barrido, pudiéndose comprobar que esta variable no influye en el intervalo de 120-480 nm/min. A partir de esta última, hay un decrecimiento de la señal y por tal razón optamos por registrar los espectros a una velocidad de 480 nm/min.

2.2.2.- Elección del factor de filtrado en la obtención de los espectros derivados

Un inconveniente de la técnica de espectroscopía derivada es que la relación entre la señal analítica y el ruido de fondo disminuye progresivamente a medida que se aumenta el orden de derivación. Por ello y para usar la derivada como técnica de trabajo analítico, es necesario introducir un filtrado de la señal que permite controlar el incremento en el ruido resultante al derivar el espectro.

El filtrado es por lo tanto un factor muy importante en espectroscopía derivada y depende de la razón de filtrado (razón entre la anchura del pico filtrado y el número M de datos correspondientes a la semianchura de banda) y también del número de veces que se realiza el filtrado. En el programa utilizado para tal fin se aplica el método de filtrado de datos basados en el procedimiento de mínimos cuadrados simplificado de Savitzky-Golay [9,10].

Se pueden emplear factores de filtrado comprendidos entre 5 y 49 puntos, que ajustan cada punto a un polinomio cuadrático o cúbico a través de sucesivas ventanas de datos que se utilizan para determinar el mejor punto central. A medida que aumentamos el factor de filtrado, el proceso es más efectivo, a costa de perder alguna información.

Para optimizar el factor de filtrado, se preparó en las condiciones operatorias ya establecidas, dos disoluciones conteniendo 7'89 ppb de Zn(II) la primera y 8'12 ppb de Cd(II) la segunda. Los espectros de absorción registrados a una velocidad de 480 nm/min, midiendo frente a un blanco de referencia preparado de forma análoga en ausencia de cinc y cadmio, se filtraron a través de diferente número de puntos experimentales (5-49 puntos) y a partir de éstos se obtuvieron las segundas derivadas con $\Delta\lambda = 5$ nm.

El suavizado de 19 puntos experimentales fue suficiente para eliminar el ruido sin perder información del espectro. Por consiguiente, los espectros de segunda derivada se obtendrán a partir de espectros de absorción una vez realizado el filtrado de 19 puntos experimentales.

2.2.3.- Influencia del incremento de la longitud de onda

El programa empleado genera los espectros derivados utilizando el método de Savitzky-Golay. En éste es necesario optimizar el valor de $\Delta\lambda$ para obtener dichos espectros derivados.

Para optimizar el valor de esta variable se obtiene el espectro derivado de segundo orden a partir del espectro de absorción de una mezcla, conteniendo 4'93 ppb de Zn(II) y 15'57 ppb de Cd(II), filtrado a través de 19 puntos experimentales y variando sistemáticamente el valor de $\Delta\lambda$.

En los espectros derivados de segundo orden obtenidos (figura VI.4), se observa que el aumento de $\Delta\lambda$ no modifica apreciablemente la señal del espectro derivado, salvo a partir de un valor de $\Delta\lambda = 5$ nm en el que la amplitud del espectro derivado disminuye. Consecuencia de ello, fue la elección de $\Delta\lambda = 5$ nm, correspondiente a 25 puntos, para la obtención del espectro derivado de segundo orden.

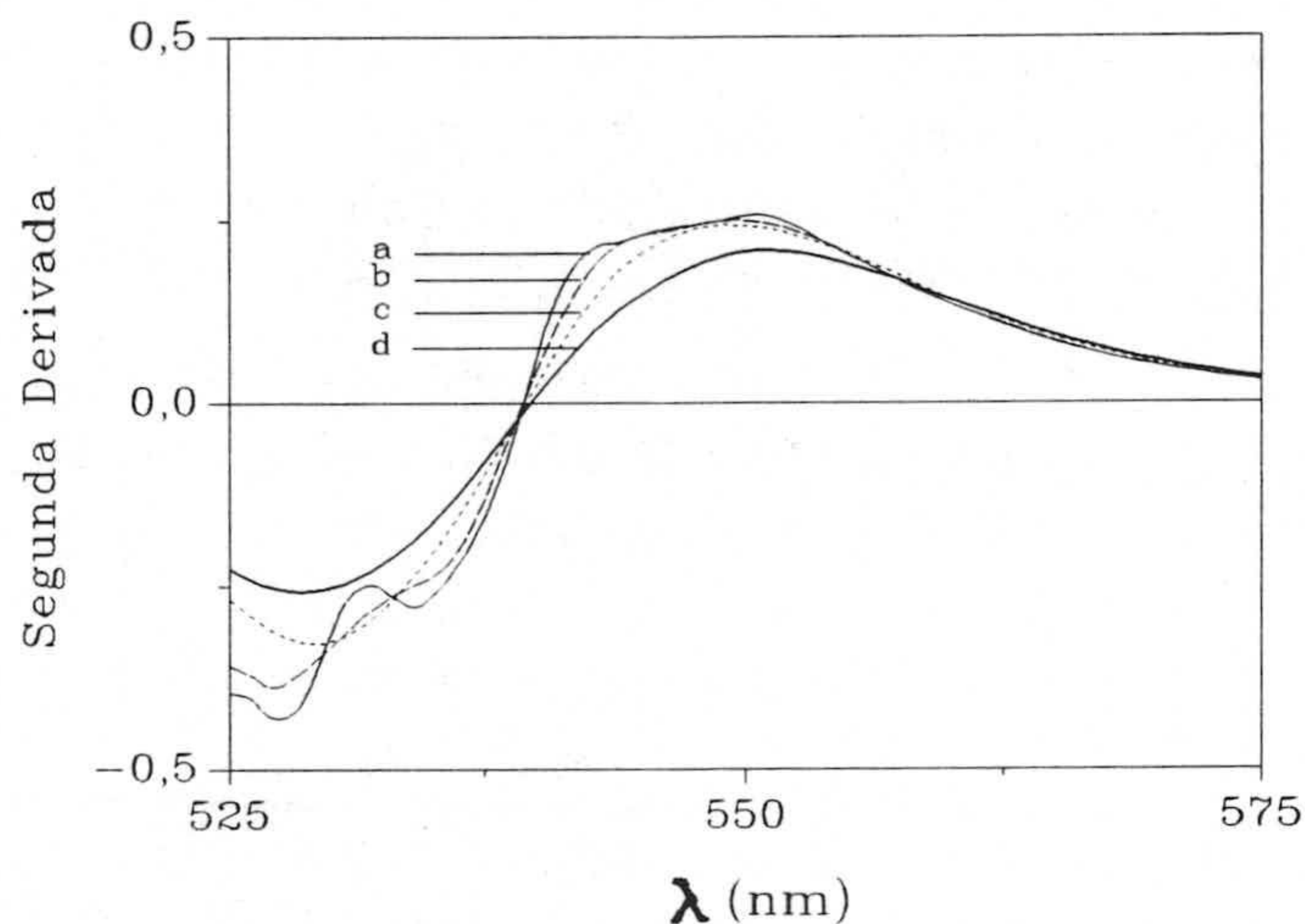


Figura VI.4. Espectros derivados de segundo orden de una mecla a diferentes incrementos de longitud de onda. a: 13; b: 17; c: 25 y d: 37 puntos.

2.3.- Selección de la longitud de onda de medida

Una vez elegidos los valores de las variables instrumentales, es necesario reconsiderar las longitudes de onda adecuadas para medir la señal derivada. A tal fin, se procedió al filtrado de los espectros de la figura VI.2 a través de 19 puntos experimentales y se obtuvieron los espectros derivados de segundo orden con un incremento de longitudes de onda de 25 puntos experimentales (figura VI.5), comprobándose la permanencia de las longitudes de onda de medida seleccionadas, a 537'2 nm la señal de cinc es prácticamente nula mientras que la de cadmio presenta una señal apreciable (h_1), y a 540'5 nm la señal de la segunda derivada de cadmio es cero, mientras que la de cinc presenta una señal apreciable (h_2).

Por tanto, midiendo la señal de la segunda derivada a 537'2 nm (${}^2D_{537'2}$) se puede determinar cadmio en presencia de cinc y para la determinación de cinc en presencia de cadmio se mide la segunda derivada a 540'5 nm (${}^2D_{540'5}$).

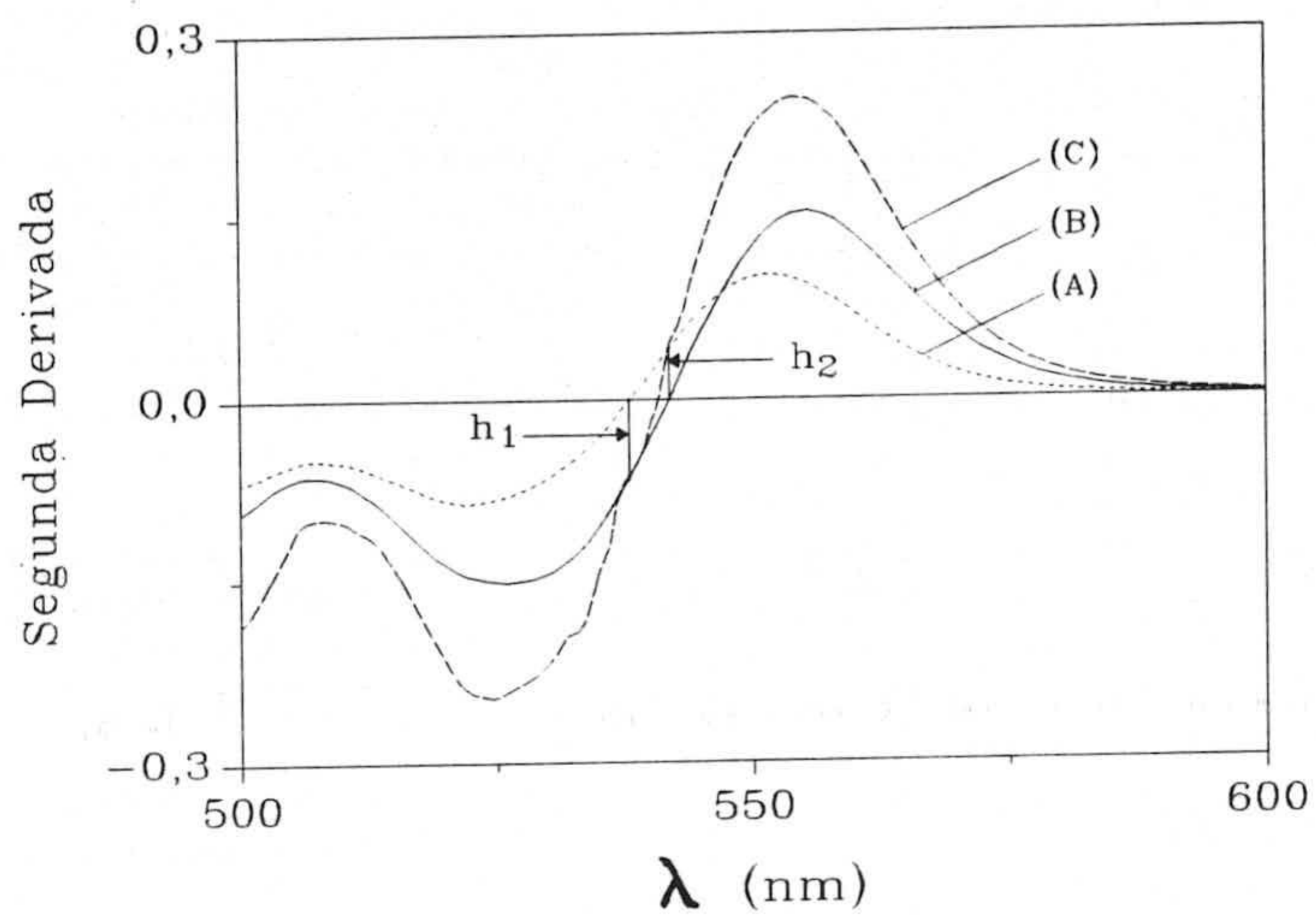


Figura VI.5. Espectros derivados de segundo orden. (A): 4'93 ppb de cinc; (B): 15'57 ppb de cadmio y (C): mezcla de ambos metales.

3.- ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL SISTEMA. PARÁMETROS DE FIABILIDAD DEL MÉTODO

Teniendo en cuenta los resultados aportados por las experiencias previas de optimización, se realizó el establecimiento de funciones de calibrado a partir de las señales derivadas del espectro para cada analito, tanto en ausencia como en presencia de cantidades crecientes del otro analito, con el fin de comprobar la independencia entre las señales analíticas de ambos iones metálicos.

3.1.- Rectas de calibrado para los complejos de cadmio y cinc

3.1.1.- Cumplimiento de la ley de Lambert-Beer

Se obtuvieron las rectas de calibrado, siguiendo el procedimiento operatorio anteriormente citado. Para ello, se prepararon dos series de disoluciones: la primera serie contenía concentraciones crecientes de cadmio, entre 3'38 y 40'62 ppb y la segunda serie contenía entre 0'99 y 15'79 ppb de cinc. En ambos casos, se añadieron las concentraciones de los reactivos que se optimizaron previamente.

Tras agitar las botellas durante 40 minutos y registrar los espectros de absorción a una velocidad de 480 nm/min. (figuras VI.6 y VI.7), se obtuvieron las absorbancias netas que se recogen en la tabla VI.2.

Después de filtrar los espectros a través de 19 puntos experimentales, se obtuvieron los espectros derivados de segundo orden con un $\Delta\lambda = 5$ nm y que se muestran en la figura VI.8. En dichos espectros se mide la señal a 537'2 nm ($^2D_{537'2}$), observándose que ésta aumenta con la concentración de cadmio puesta. Por otra parte, se comprueba que los espectros derivados de cadmio presentan una señal casi nula a 540'5 nm, en el rango de concentraciones estudiado.

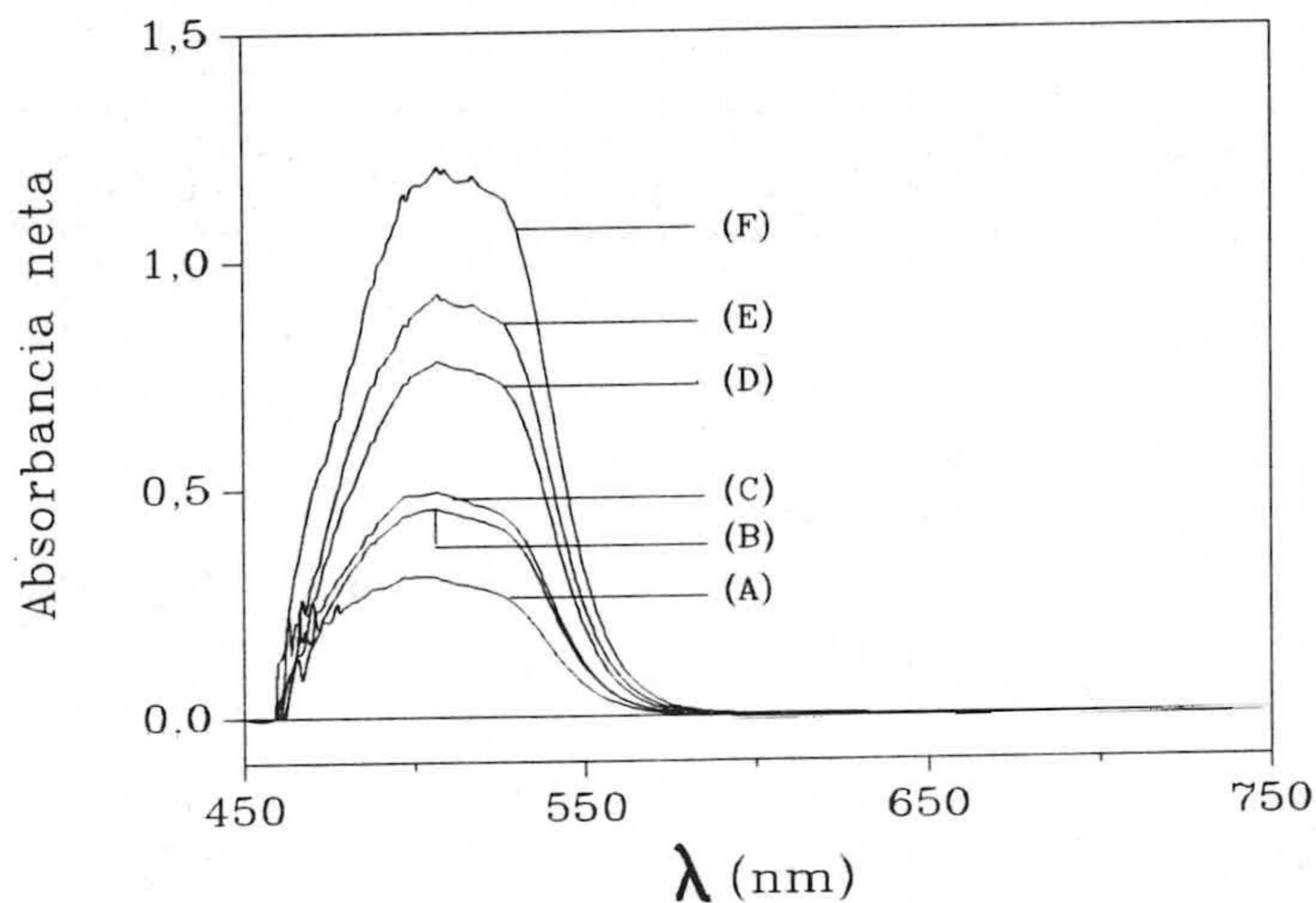


Figura VI.6. Espectros de absorción del complejo de cadmio. (A): 3'38; (B): 6'77; (C): 8'12; (D): 13'54; (E): 15'57 y (F): 20'31 ppb.

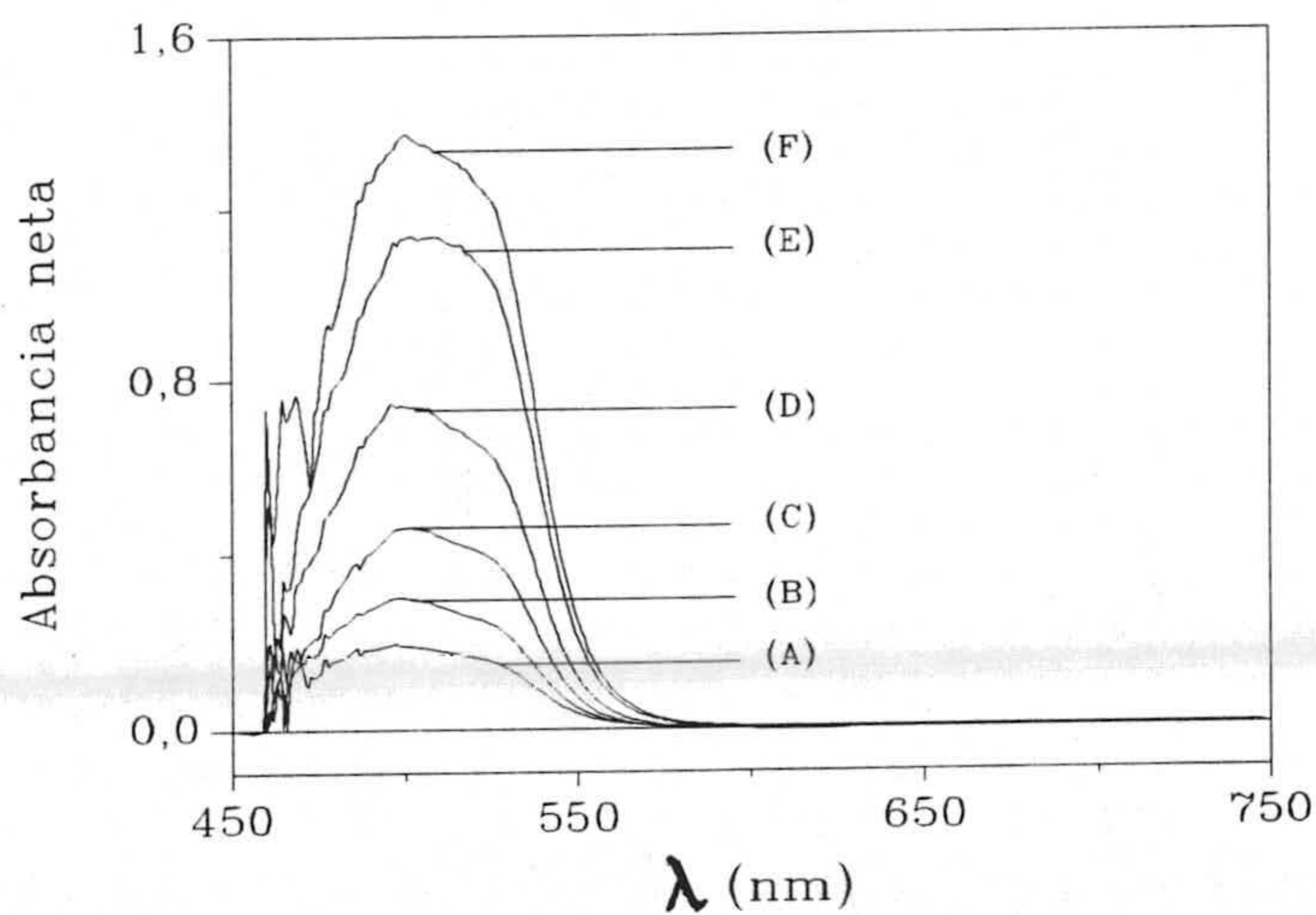


Figura VI.7. Espectros de absorción del complejo de cinc. (A): 0'99; (B): 1'97; (C): 3'95; (D): 5'92; (E): 9'87 y (F): 11'84 ppb.

Tabla VI.2. Rectas de calibrado de cadmio y cinc.

$A_{\text{neta}} = A_{504 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}$		$A_{\text{neta}} = A_{500 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}$	
C_{Cd} (ppb)	A_{neta}	C_{Zn} (ppb)	A_{neta}
3'38	0'3096	0'99	0'1910
6'77	0'4563	1'97	0'2998
8'12	0'4907	3'95	0'4619
13'54	0'7687	5'92	0'7405
15'57	0'9088	7'89	0'9754
20'31	1'1778	9'87	1'1325
27'01	1'4815	11'84	1'3747
33'85	1'6842	13'81	1'4777
40'62	1'7348	15'79	1'5190

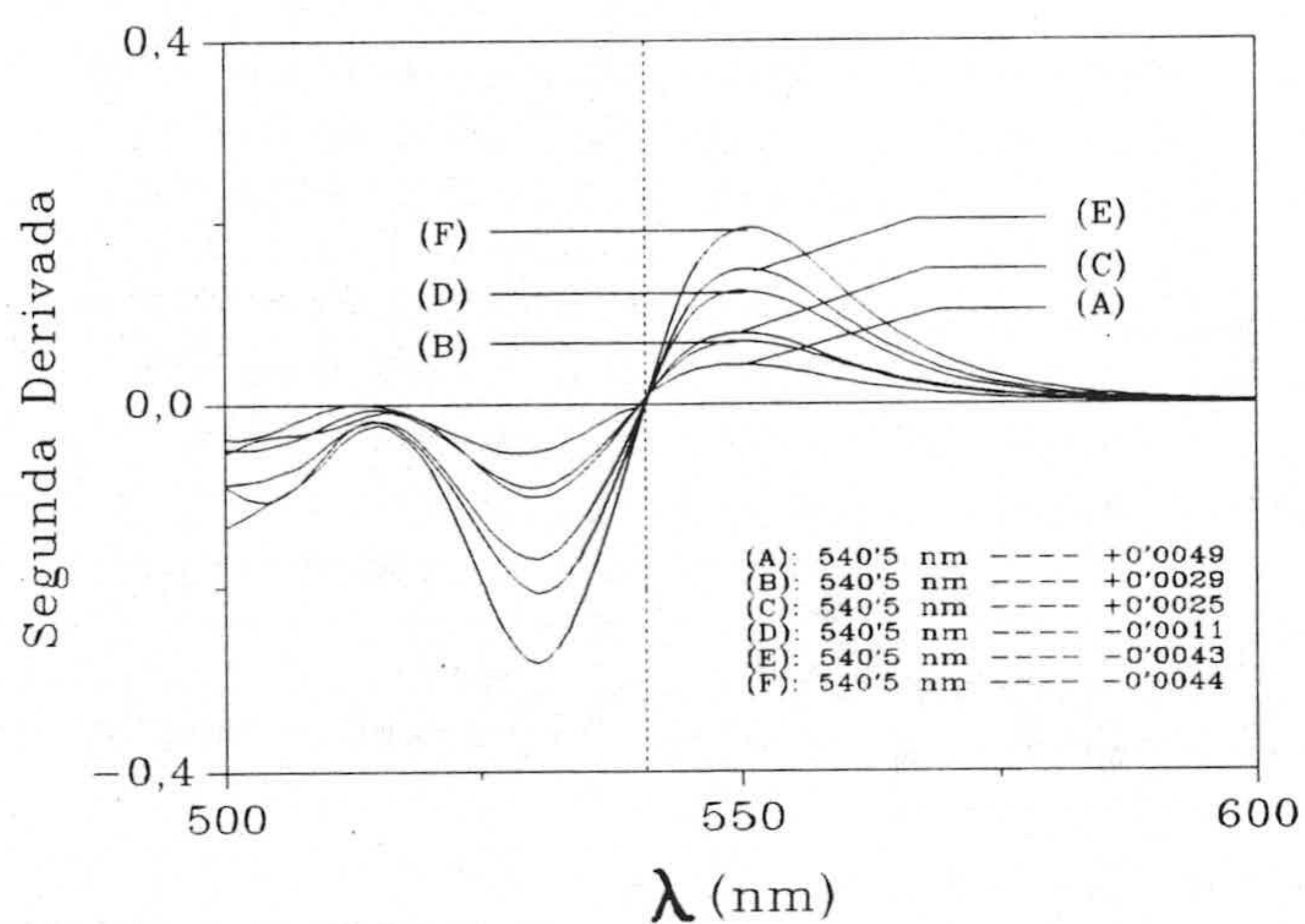


Figura VI.8. Espectros derivados de segundo orden del complejo de cadmio. (A): 3'38; (B): 6'77; (C): 8'12; (D): 13'54; (E): 15'57 y (F): 20'31 ppb. Comprobación de la λ de medida.

En la tabla VI.3, se reúnen los valores de las intensidades de medida $^2D_{537'2}$ frente a la concentración de cadmio puesto.

Tabla VI.3. Recta de calibrado para el cadmio.

C_{Cd} (ppb)	$^2D_{537'2 \text{ nm}}$
3'38	0'0162
6'77	0'0380
8'12	0'0437
13'54	0'0799
15'57	0'1000
20'31	0'1287
27'08	0'2239
33'85	0'2761
40'62	0'3635

Como no es posible usar el test de curvatura (lack-of-fit) ya que no existen réplicas, se ha recurrido a la utilización de la regresión por mínima mediana de cuadrados. La aplicación de dicha regresión, llevada a cabo con el programa "**PROGRESS**", a los datos de la tabla VI.3, nos indicó la presencia de 3 puntos que no se alinean con los demás, son aquellos que corresponden a las concentraciones de 27'08, 33'85 y 40'62 ppb. Estos puntos son "outlier-leverage" ya que los dos índices, el residuo estandarizado (RS) y el índice robusto (RD) sobrepasan el límite 2'5. Por consiguiente, el límite superior corresponde a la concentración de 20'31 ppb de cadmio.

Los principales parámetros estadísticos de la ecuación de la recta de calibrado, una vez aplicada la regresión por mínimos cuadrados se recogen en la tabla VI.4.

Tabla VI.4. Parámetros estadísticos de la ecuación de calibrado de cadmio.

Parámetro	Valor
n	6
m	1
$s_{R,C}$	$2'81 \times 10^{-3}$
a	$-8'32 \times 10^{-3}$
s_a	$2'53 \times 10^{-3}$
b	$6'74 \times 10^{-3}$
s_b	$0'20 \times 10^{-3}$
r^2 (%)	99'66

En la figura VI.9 se muestran algunos espectros derivados de segundo orden para distintas concentraciones de cinc. En ellos se mide la señal a $540'5 \text{ nm}$ ($^2D_{540'5}$), observándose que ésta aumenta al aumentar la concentración de cinc puesto. Por otra parte, se comprueba también que los espectros derivados de cinc presentan una señal casi nula a $537'2 \text{ nm}$, en el rango de concentraciones estudiado.

En la tabla VI.5 se reúnen tanto los valores de las intensidades de medida $^2D_{540'5}$ como las concentraciones de cinc correspondientes.

La aplicación de la regresión por mínima mediana de cuadrados a los datos de la tabla VI.5, nos indicó la presencia de 3 puntos que corresponden a las concentraciones de 7'89, 13'81 y 15'79 ppb. El primero es un "outlier" (su correspondiente RS es superior a 2'5) y los otros dos son "outlier-leverage" (sus RS y RD sobrepasan el límite 2'5). Por consiguiente, el límite superior corresponde a la concentración de 11'84 ppb de cinc.

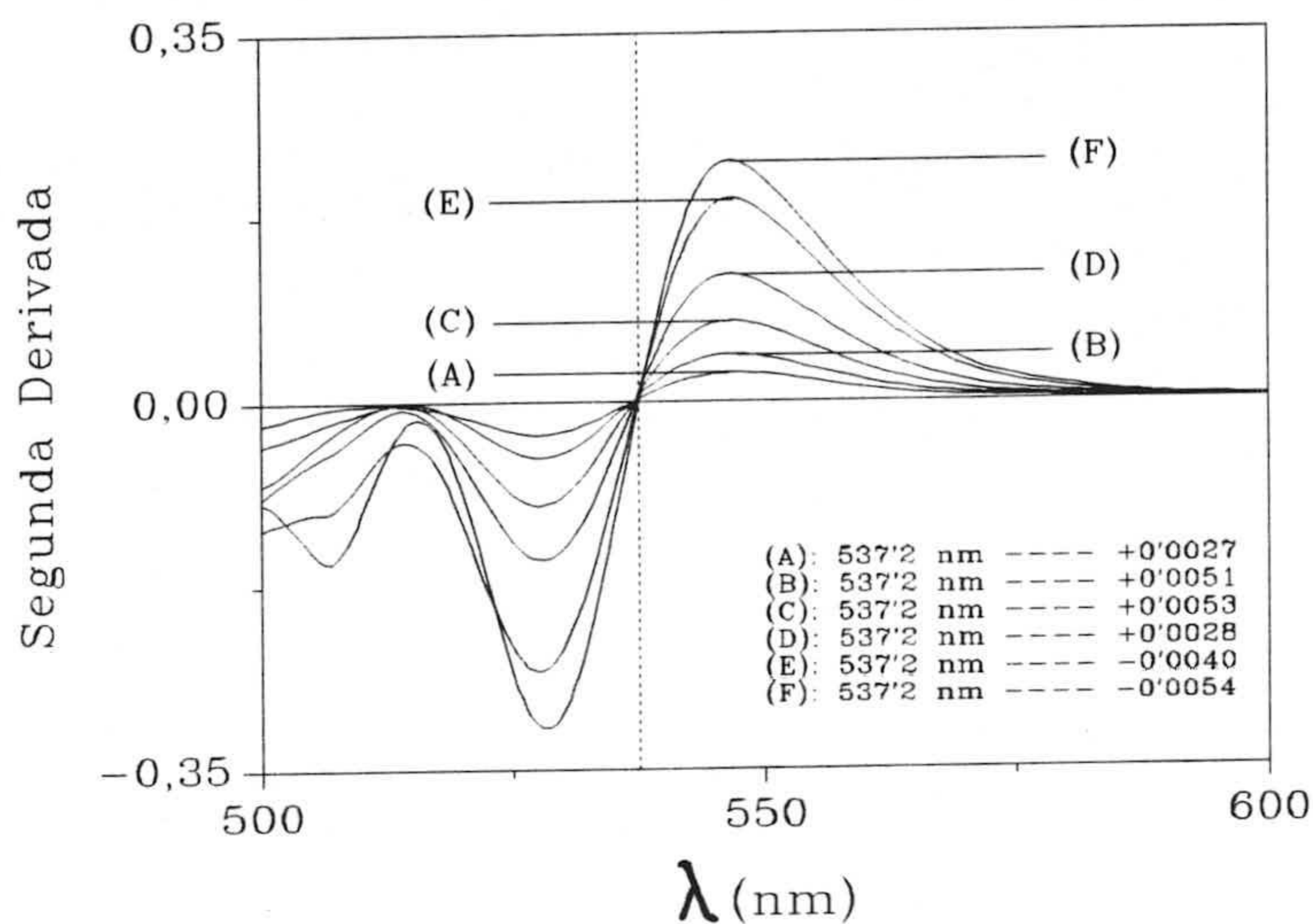


Figura VI.9. Espectros derivados de segundo orden del complejo de cinc. (A): 0'99; (B): 1'97; (C): 3'95; (D): 5'92; (E): 9'87 y (F): 11'84 ppb. Comprobación de la λ de medida.

Tabla VI.5. Recta de calibrado para el cinc.

C_{Zn} (ppb)	${}^2D_{540'5 \text{ nm}}$
0'99	0'0154
1'97	0'0272
3'95	0'0454
5'92	0'0703
7'89	0'0919
9'87	0'1055
11'84	0'1237
13'81	0'1285
15'79	0'1241

En la tabla VI.6 se indican los principales parámetros estadísticos de la ecuación

de la recta de calibrado una vez aplicada la regresión por mínimos cuadrados.

Tabla VI.6. Parámetros estadísticos de la ecuación de calibrado de cinc.

Parámetro	Valor
n	6
m	1
$s_{R,C}$	$2'42 \times 10^{-3}$
a	$7'22 \times 10^{-3}$
s_a	$1'74 \times 10^{-3}$
b	$9'97 \times 10^{-3}$
s_b	$0'25 \times 10^{-3}$
r^2 (%)	99'76

3.1.2.- Rectas de calibrado para cadmio en presencia de concentraciones constantes de cinc

Se establecieron las rectas de calibrado de cadmio, en presencia de dos concentraciones distintas de cinc, procediendo de la misma manera que en el apartado anterior. Los resultados obtenidos se reflejan en las tablas VI.7 y VI.8.

Tabla VI.7. Señales derivadas para cadmio en presencia de 1'97 ppb de cinc.

C_{Cd} (ppb)	${}^2D_{537'2 \text{ nm}}$
0'00	-0'0052
3'38	0'0163
6'77	0'0351
13'54	0'0766
20'31	0'1219

Tabla VI.8. Señales derivadas para cadmio en presencia de 5'92 ppb de cinc.

C_{Cd} (ppb)	${}^2D_{537'2 \text{ nm}}$
0'0	-0'0064
3'4	0'0185
6'8	0'0420
13'5	0'0868
20'3	0'1367

En la tabla VI.9 aparecen recogidas las ecuaciones correspondientes a las rectas de calibrado obtenidas de la segunda derivada para cadmio.

Tabla VI.9. Rectas de calibrado de cadmio en presencia de una concentración constante de cinc.

C_{Zn} (ppb)	Ecuación de la recta	r^2 (%)
0'00	$6'74 \times 10^{-3} C_{Cd} - 8'32 \times 10^{-3}$	99'7
1'97	$6'21 \times 10^{-3} C_{Cd} - 5'75 \times 10^{-3}$	99'9
5'92	$6'98 \times 10^{-3} C_{Cd} - 5'90 \times 10^{-3}$	99'9

3.1.3.- Rectas de calibrado para cinc en presencia de concentraciones constantes de cadmio

De forma similar, se establecieron rectas de calibrado para cinc en presencia de dos concentraciones distintas de cadmio. Los resultados obtenidos se recogen en las siguientes tablas.

En la tabla VI.12 se recogen los resultados obtenidos para las rectas de calibrado de cinc.

Tabla VI.10. Señales derivadas para cinc en presencia de 6'77 ppb de cadmio.

C_{Zn} (ppb)	${}^2D_{540'5 \text{ nm}}$
0'00	0'0085
0'99	0'0184
1'97	0'0320
2'96	0'0372
4'93	0'0609
5'92	0'0632
6'91	0'0777
8'88	0'0854
11'84	0'1183

Tabla VI.11. Señales derivadas para cinc en presencia de 10'15 ppb de cadmio.

C_{Zn} (ppb)	${}^2D_{540'5 \text{ nm}}$
0'00	0'0103
0'99	0'0222
3'95	0'0507
6'91	0'0693
8'88	0'0868

Tabla VI.12. Rectas de calibrado de cinc en presencia de una concentración constante de cadmio

C_{Cd} (ppb)	Ecuación de la recta	r^2 (%)
0'00	$9'96 \times 10^{-3} C_{Zn} + 7'22 \times 10^{-3}$	99'8
6'77	$9'01 \times 10^{-3} C_{Zn} + 1'13 \times 10^{-2}$	99'0
10'15	$8'38 \times 10^{-3} C_{Zn} + 1'31 \times 10^{-2}$	99'2

3.1.4.- Comparación de las pendientes de las distintas rectas obtenidas

La comparación de las pendientes, realizada mediante el programa "QUIMIO", de las rectas de calibrado de cadmio en ausencia y en presencia de concentraciones constantes de cinc, indica que son estadísticamente iguales. De manera similar, se compararon las pendientes de las rectas de calibrado de cinc en ausencia y en presencia de cadmio, obteniéndose que son estadísticamente iguales. En todos los casos, se obtuvieron valores de P(b) superiores al 1%.

3.2.- Parámetros de fiabilidad

A continuación y para caracterizar el método analítico, pasamos a determinar sus parámetros de fiabilidad basándonos en los criterios de la IUPAC [11] y de Cuadros Rodríguez y col. [12].

Linealidad

Dado que no existen réplicas, no es posible determinar el valor que caracteriza a la linealidad "in-line" pero sí el valor de la linealidad "on-line":

- a).- Para el Cd(II): Lin. = 97'50 %.
- b).- Para el Zn(II): Lin. = 97'03 %.

Sensibilidad

En la tabla VI.13, se recogen los valores de la sensibilidad del método, tal y como se han definido en el capítulo II, tanto para el cadmio como para el cinc. Como se puede observar, el método para la determinación de cinc es 1'5 más sensible que el de cadmio.

Tabla VI.13. Sensibilidad del método.

Sensibilidad	Cadmio	Cinc
IUPAC (unidad de señal/ppb)	$6'74 \times 10^{-3}$	$9'97 \times 10^{-3}$
Analítica ^(*) (b/s _R) (ppb ⁻¹)	3'32	4'94
Datos de calibrado (ppb)	0'42	0'24

(^{*}): calculadas a partir de los valores de la desviación estándar sobre la señal de 6'77 ppb de Cd(II) y 2'96 ppb de Zn(II), $s_R = 2'03 \times 10^{-3}$ y $2'02 \times 10^{-3}$ respectivamente, (tabla VI.17).

Límite de detección

Los límites de detección del método, tanto para el cadmio como para el cinc, se recogen en la tabla VI.14. En ésta, se puede observar como el límite de detección de cinc es inferior a aquel de cadmio independientemente del criterio utilizado.

Tabla VI.14. Límite de detección del método.

Límite de detección	Cadmio	Cinc
IUPAC ⁽¹⁾ (ppb)	0'32	0'19
Datos de calibrado ⁽²⁾ (ppb)	1'62	0'92
Para $\alpha = \beta = 0'05$ ⁽³⁾ (ppb)	2'28	1'22

(¹): teniendo en cuenta que los valores de la desviación estándar sobre las señales del blanco, $s_{R_0} = 7'41 \times 10^{-4}$ y $6'45 \times 10^{-4}$ para el Cd(II) y el Zn(II) respectivamente, (tabla VI.16); (²): calculados a partir de $s_{c_0} = 0'5411$ y $0'3067$ para el Cd(II) y Zn(II) respectivamente; (³): para probabilidades de falsos positivo y negativo del 95 % y teniendo en cuenta una determinación sobre la señal del blanco, tanto para el Cd(II) como para Zn(II).

Límite de cuantificación

En la tabla VI.15, se recogen los límites de cuantificación del método.

Tabla VI.15. Límite de cuantificación del método.

Límite de cuantificación	Cadmio	Cinc
IUPAC ⁽¹⁾ (ppb)	1'07	0'65
Datos de calibrado ⁽²⁾ (ppb)	5'41	3'07

⁽¹⁾: los valores de la desviación estándar sobre las señales del blanco, $s_{Ro} = 7'41 \times 10^{-4}$ y $6'45 \times 10^{-4}$ para el Cd(II) y el Zn(II) respectivamente, (tabla VI.16); ⁽²⁾: calculados a partir de $s_{co} = 0'5411$ y $0'3067$ para el Cd(II) y Zn(II) respectivamente.

Rango dinámico lineal

El rango dinámico lineal, teniendo en cuenta los límites inferiores de 0'32 y 0'19 ppb y los límites superiores de 20'31 y 11'84 ppb, para el cadmio y cinc respectivamente, es:

- a).- Para el Cd(II): **RDL = 6'347.**
 b).- Para el Zn(II): **RDL = 6'231.**

Precisión

- Repetibilidad del blanco

La repetibilidad se estudió preparando 10 soluciones de ensayo de manera que todas ellas contenían 0'7 mL de disolución de KI 2'5 M, 1 mL de disolución de PAR

4.98×10^{-3} M, 5 mL de tampón $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0.5 M de pH 8.7 y 80 mg de Sephadex QAE A-25, aplicándose a continuación el procedimiento habitual.

Los espectros de absorción registrados entre 750 y 400 nm, con una velocidad de barrido de 480 nm/min, se filtraron a través de 19 puntos experimentales y se obtuvieron los espectros derivados de segundo orden con $\Delta\lambda = 5$ nm. Se midió la señal derivada a las dos longitudes de onda 537.2 y 540.5 nm. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VI.16.

Tabla VI.16. Repetibilidad para el blanco.

Estadístico	${}^2D_{537.2 \text{ nm}}$	${}^2D_{540.5 \text{ nm}}$
Señal _{media}	0.0358	0.0437
S_{R_0}	7.21×10^{-4}	6.45×10^{-4}
DER (%)	2.0	1.5

- Repetibilidad a 6.77 ppb de cadmio y 2.96 ppb de cinc

Se realizó un estudio estadístico de las señales derivadas de 12 soluciones de ensayo idénticas, conteniendo 6.77 ppb de Cd(II) y 2.96 ppb de Zn(II), y a las cuales se añaden los demás reactivos. Los resultados se recogen en la tabla VI.17.

Tabla VI.17. Repetibilidad a 6.77 ppb de Cd(II) y 2.96 ppb de Zn(II).

Estadístico	${}^2D_{537.2 \text{ nm}}$	${}^2D_{540.5 \text{ nm}}$
Señal _{media}	0.0338	0.0435
S_R	2.03×10^{-3}	2.02×10^{-3}
DER (%)	6.0	4.6

A estos valores de desviación estándar relativa sobre la señal del cadmio y de cinc les corresponden unos valores de desviación estándar relativa sobre la concentración de 4'4 % y 6'8 %, respectivamente.

- Utilizando los datos del calibrado, se calcularon los valores de la desviación estándar sobre la concentración, así como sus correspondientes DER(C) [12]. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VI.18.

Tabla VI.18. Valores de la desviación estándar relativa para cada uno de los valores de concentración de cadmio y de cinc utilizado para establecer el calibrado.

C _{Cd} (ppb)	s _C	% DER(C)	C _{Zn} (ppb)	s _C	% DER(C)
3'88	0'5043	14'9	0'99	0'2897	29'3
6'77	0'4690	6'9	1'97	0'2784	14'1
8'12	0'4626	5'7	3'95	0'2665	6'7
13'54	0'4534	3'3	5'92	0'2625	4'4
15'57	0'4721	3'0	9'87	0'2815	2'8
20'31	0'5240	2'6	11'84	0'3011	2'5

Selectividad

Un aspecto importante a la hora de establecer un nuevo método de análisis es el conocimiento cuantitativo de la influencia que la presencia de iones extraños pueda ejercer sobre la determinación del elemento objeto de estudio, en nuestro caso el análisis simultáneo de Cd(II) y Zn(II), que se aborda en éste capítulo.

En los estudios individuales de dichos iones realizados anteriormente (capítulos IV y V) dentro del apartado sobre la selectividad, se pudo comprobar que únicamente algunos cationes presentaban una alta interferencia en la determinación individual de los mismos, por lo cual se consideró suficiente estudiar en este capítulo solamente la

influencia de aquellos cationes en la determinación simultánea de cadmio y cinc.

Para este estudio, se operó con disoluciones conteniendo 6'77 ppb de Cd(II) y 2'96 ppb de Zn(II) a las cuales se añaden cantidades crecientes del ión extraño cuyo efecto se quiere ensayar. Aplicándose a continuación el procedimiento operatorio propuesto. Los blancos, exentos de cinc, cadmio e intereferente, se prepararon de la misma manera.

Tal y como se señaló en el Capítulo II, se ha comprobado si la señal analítica del analito en presencia de la especie intereferente está incluida dentro de un intervalo de confianza ($R_i \pm s^*$). En este caso, R_i vienen definidos por los valores medios de la señal analítica obtenida en el estudio de repetibilidad (tabla VI.17), para 6'77 ppb de Cd(II) y 2'96 ppb de Zn(II), respectivamente; y para s^* se selecciona el valor de $2'03 \times 10^{-3}$, de manera que en el intervalo están incluidas todas las señales que no originan errores relativos superiores al 7%, no considerando intereferentes por tanto aquellas concentraciones de ión extraño que producían un error igual o inferior a ese valor. Se ha elegido este intervalo debido a que se utilizan datos de la repetibilidad, que en este caso el dato más desfavorable presenta DER del 6% (tabla VI.17), y se ha aumentado en un orden de magnitud, a fin de asimilarlo a datos de reproducibilidad (normalmente en EFS, la DER sobre las señales obtenidas en el estudio de reproducibilidad es superior en un orden de magnitud a la DER obtenida en la repetibilidad).

En la tabla VI.19 se resumen los datos de tolerancia, para los distintos iones extraños, obtenidos con el criterio adoptado. A partir de dicha tabla, se observa que:

- Los iones Cr(III) y Al(III) tienen una elevada tolerancia admitiéndose como mínimo una relación 17/1 en peso, respecto al cinc.

- Los iones Cu(II), Mn(II), Ni(II) y V(V) interfieren seriamente en la determinación de cadmio y cinc admitiéndose unas relaciones inferiores a 1 (en peso), tanto respecto al Cd(II) como al Zn(II).

Tabla VI.19. Tolerancia de los iones extraños.

Ión extraño	Tolerancia (ppb)	
	Cd(II)	Zn(II)
Al(III)	1000	50
Cr(III)	5	100
Bi(III)	5	2
Fe(III)	2	5
Co(II)	2	< 1
Pb(II)	1	< 1
Cu(II), Mn(II), Ni(II) y V(V)	< 1	< 1

3.3.- Procedimiento operatorio propuesto

La disolución de ensayo se prepara introduciendo en frascos de polietileno de 1L de capacidad 500 mL de disolución problema conteniendo cadmio entre 1'07 y 20'31 ppb, y cinc entre 0'65 y 11'84 ppb, 0'7 mL de KI de concentración 2'534 M, 1 mL de PAR de concentración $4'975 \times 10^{-3}$ M, 5 mL de H_3BO_3/NaH_2BO_3 (0'5 M) de pH 8'7 y 80 mg de Sephadex QAE A-25.

Tras agitar las botellas durante 40 minutos, se recoge la fase sólida por filtración y se empaqueta en cubetas de vidrio óptico de 1-mm de paso de luz. Finalmente, después de centrifugar las cubetas durante 30 segundos, se registran los espectros de absorción midiendo frente a un blanco de referencia, preparado de forma análoga, entre 750 y 400 nm, con una velocidad de barrido de 480 nm/min. Se filtran los espectros a través de 19 puntos experimentales y se obtienen los espectros derivados de segundo orden con un $\Delta\lambda = 5$ nm. Se mide la segunda derivada del espectro de orden cero a las longitudes de onda de 537'2 y 540'5 nm.

Mediante interpolación de las señales de segunda derivada de los complejos Cd(II)-PAR y Zn(II)-PAR en la recta de calibrado, preparada en idénticas condiciones y con

concentraciones de cadmio y cinc comprendidas entre 1'07 y 20'31 ppb, y 0'65 y 11'84 ppb respectivamente, se deduce las concentraciones de Cd(II) y de Zn(II) de la disolución problema.

4.- DETERMINACIÓN DE CADMIO Y CINCO EN MEZCLAS BINARIAS

Con objeto de comprobar la aplicabilidad del procedimiento operatorio propuesto, se prepararon mezclas binarias de cadmio y cinc en distintas concentraciones. Para ello y en frascos de polietileno de 1L de capacidad se añadieron 500 mL de agua de ósmosis inversa y concentraciones variables de cada uno de los metales, entre 3'38 y 20'31 ppb para cadmio y 0'99 y 8'88 ppb para cinc. Tras proceder como se indica en el procedimiento operatorio propuesto, se obtuvieron las señales de la segunda derivada. En la tabla VI.20 aparecen reflejados los valores recuperados para los dos elementos.

Tabla VI.20. Determinación de cadmio y cinc en mezclas preparadas.

C_{Cd}/C_{Zn}	C_{Cd}			C_{Zn}		
	Puesto (ppb)	Hallado (ppb)	% \mathcal{R}	Puesto (ppb)	Hallado (ppb)	% \mathcal{R}
0'33	3'38	3'98	118	5'92	6'04	102
0'57	6'77	7'08	105	6'91	7'08	102
0'67	6'77	7'47	110	5'92	5'62	95
0'67	10'15	11'77	116	8'88	7'99	90
0'80	6'77	6'96	103	4'93	5'39	109
1'33	6'77	6'69	99	2'96	3'01	102
1'33	13'54	14'11	104	5'92	5'42	92
1'49	10'15	10'64	105	3'95	4'37	111
2'00	20'31	21'52	106	5'92	5'42	92
4'00	6'77	6'71	99	0'99	1'12	113

En dicha tabla se comprueba que para las relaciones molares de C_{Cd}/C_{Zn} ensayadas, las recuperaciones encontradas, son satisfactorias en todos los casos.

5.- DETERMINACIÓN DE CADMIO Y CINCO EN UN AGUA MINERAL

Con objeto de comprobar la veracidad del método propuesto para la determinación simultánea de cadmio y cinc, se ha aplicado a un agua mineral ("Bezoya", procedente de Ortigosa del Monte -Segovia) cuyo contenido en iones se indica en la tabla A.2 del apéndice. La validación del método se llevó a cabo utilizando la metodología de adición de patrón propuesta por Cuadros Rodríguez y col. [13], tanto para el cadmio como para el cinc.

Puesto que el contenido de cadmio de este agua es inferior al límite de detección del método establecido para este analito, se ha añadido una concentración de 6'86 ppb de dicho ión metálico con el fin de poder analizar la muestra para ambos analitos.

5.1.- Calibrado de adición de patrón

A 250 mL de muestra se le adicionaron 250 mL de agua de ósmosis inversa y cantidades crecientes de Cd(II) y Zn(II), a continuación se aplicó el procedimiento operatorio propuesto. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VI.21.

5.2.- Calibrado de Youden

Se tomaron volúmenes crecientes de agua mineral y se completaron con agua de ósmosis inversa hasta un volumen final de 500 mL. Trás introducir estas disoluciones en botellas de polietileno de 1L de capacidad, se aplicó el procedimiento operatorio propuesto, obteniéndose los resultados recogidos en la tabla VI.22.

Tabla VI.21. Calibrado de adición de patrón, $V_{\text{muestra}} = 250 \text{ mL}$.

C_{Cd} (ppb)	C_{Zn} (ppb)	${}^2D_{537'2 \text{ nm}}$	${}^2D_{540'6 \text{ nm}}$
0'00	0'00	0'0230	0'0171
1'69	1'18	0'0378	0'0302
3'38	2'27	0'0457	0'0420
5'08	3'36	0'0537	0'0493
6'77	4'44	0'0651	0'0642

Tabla VI.22. Calibrado de Youden.

Concentración de muestra (mL/mL)	${}^2D_{537'2 \text{ nm}}$	${}^2D_{540'6 \text{ nm}}$
0'20	0'0081	0'0068
0'39	0'0201	0'0123
0'59	0'0298	0'0177
0'79	0'0426	0'0217
0'99	0'0507	0'0283

Los parámetros estadísticos correspondientes a las ecuaciones de las rectas de calibrado estándar (CE), de adición de patrón (CA) y de Youden (CY), tanto para cadmio como para cinc, se recogen en las tablas VI.23 y VI.24 respectivamente.

5.3.- Comprobación de la veracidad del método

El tratamiento de los datos del calibrado estándar, de adición de patrón y de Youden (tablas VI.23 y VI.24) utilizando el protocolo estadístico indicado en el Capítulo II, permitió llegar a la conclusión de que el método es veraz ya que las concentraciones obtenidas para ambos analitos utilizando los calibrados CE y CA son significativamente iguales (tablas VI.25 y VI.26).

Tabla VI.23. Parámetros estadísticos para el cadmio.

Parámetro	CE	CA	CY
n	6	5	5
m	1	1	1
a	$-8'32 \times 10^{-3}$	$25'05 \times 10^{-3}$	$-1'93 \times 10^{-3}$
b	$6'74 \times 10^{-3}$	$5'91 \times 10^{-3}$	0'0544
$s_{R,C}$	$2'81 \times 10^{-3}$	$2'17 \times 10^{-3}$	$1'35 \times 10^{-3}$

Tabla VI.24. Parámetros estadísticos para el cinc.

Parámetro	CE	CA	CY
n	6	5	5
m	1	1	1
a	$7'22 \times 10^{-3}$	$17'50 \times 10^{-3}$	$1'70 \times 10^{-3}$
b	$9'97 \times 10^{-3}$	$10'20 \times 10^{-3}$	0'0265
$s_{R,C}$	$2'42 \times 10^{-3}$	$1'87 \times 10^{-3}$	$6'45 \times 10^{-4}$

Tabla VI.25. Comprobación de la veracidad para el cadmio.

Parámetro	CE	CA
s^2	$s_{CE}^2 = s_{CA}^2$ ($P(s) = 34'93 \%$), $s_p = 2'56 \times 10^{-3}$	
b	$b_{CE} = b_{CA}$ ($P(b) = 14'88 \%$), $b_p = 6'64 \times 10^{-3}$	
a'	-0'0071	0'0227
Blanco de Youden	$a_{CY} \epsilon (-7'10 \pm 10'60) \times 10^{-3}$ No existe componente de error sistemático constante, BY=0	
C_{Cd} (ppb)	3'75	3'71
	$C_{Cd;CE} = C_{Cd;CA}$ ($P(C) = 87'68 \%$)	

Tabla VI.26. Comprobación de la veracidad para el cinc.

Parámetro	CE	CA
s^2	$s_{CE}^2 = s_{CA}^2$ ($P(s) = 34'93 \%$), $s_p = 2'20 \times 10^{-3}$	
b	$b_{CE} = b_{CA}$ ($P(b) = 74'09 \%$), $b_p = 0'0100$	
a'	0'0070	0'0176
Blanco de Youden	$a_{CY} \epsilon (7'00 \pm 7'29) \times 10^{-3}$ No existe componente de error sistemático constante, $BY = 0$	
C_{Zn} (ppb)	1'54	1'59
	$C_{Zn;CE} = C_{Zn;CA}$ ($P(C) = 73'68 \%$)	

5.4.- Contenido analítico de cadmio en la muestra

Una vez comprobada la validez del método para el cadmio, realizamos un número repetitivo de análisis de la muestra (cuatro determinaciones) según el procedimiento habitual. Las concentraciones deducidas de las señales obtenidas de la segunda derivada, teniendo en cuenta el factor de dilución ($f_{dil} = 506'7/250 = 2'03$), se recogen en la tabla VI.27.

Tabla VI.27. Determinación de Cd(II) en agua mineral. $V_{muestra} = 250$ mL.

Nº	${}^2D_{637'2 \text{ nm}}$	C_{Cd} (disolución) (ppb)	C_{Cd} (muestra) (ppb)
1	0'0230	3'70	7'51
2	0'0227	3'65	7'41
3	0'0240	3'85	7'82
4	0'0199	3'24	6'58

Por tanto, el contenido de cadmio, expresado como $\bar{C}_{muestra} \pm s_{n-1}$ es:

$$C_{Cd} = (7'3 \pm 0'5) \text{ ppb}$$

La comparación de la media muestral con el valor de cadmio añadido, $C_{Cd;puesto} = 6'86$ ppb, a través de un test t (tabla VI.28) indica que no hay diferencia significativa entre el valor de la concentración de cadmio hallada y la puesta, por lo que se confirma que el método propuesto para la determinación simultánea de cadmio y cinc es válido para este tipo de agua.

Tabla VI.28. Comparación de los contenidos de cadmio en el agua mineral.

Estadístico	Valor
$C_{Cd;puesto}$ (ppb)	6'86
$C_{Cd;hallado}$ (ppb)	7'30
grados de libertad	3
$t_{cal}(C)$	1'775
$P(C)$	17'40

5.6.- Contenido analítico de cinc en la muestra

Una vez comprobada la validez del método para el cinc, realizamos un número repetitivo de análisis de la muestra (tres determinaciones) según el procedimiento habitual.

En la tabla VI.29 se recogen las concentraciones obtenidas teniendo en cuenta el factor de dilución ($f_{dil} = 506'7/250 = 2'03$).

Tabla VI.29. Determinación de Cd(II) en agua mineral. $V_{\text{muestra}} = 250 \text{ mL}$.

Nº	$^2D_{540'5 \text{ nm}}$	C_{Zn} (disolución) (ppb)	C_{Zn} (muestra) (ppb)
1	0'0174	1'57	3'18
2	0'0170	1'53	3'10
3	0'0171	1'54	3'12

Por tanto, el contenido de cinc, expresado como $\bar{C}_{\text{muestra}} \pm s_{n-1}$ es:

$$C_{\text{Zn}} = (3'13 \pm 0'04) \text{ ppb}$$

Este resultado concuerda con aquel obtenido en la determinación individual por Espectrofotometría en Fase Sólida (capítulo IV), lo que confirma que el método propuesto permite la determinación simultánea de ambos analitos.

BIBLIOGRAFÍA

- [1].- J.A. Murillo, J.M. Lemus, Bull. Soc. Chim. Belg., **99(5)**, 315-324, 1990.
- [2].- K. Yoshimura, S. Ohashi, Memoirs of the Faculty of Science, Kyushu University, Ser. C, **11(2)**, 181-188, 1978.
- [3].- L.F. Capitán Vallvey, I. de Orbe Paya, M. Carmen Valencia, J.J. Berzas Nevado, Quím. Anal., **12**, 141-145, 1993.
- [4].- L.F. Capitán Vallvey, I. de Orbe Paya, M. Carmen Valencia, Anal. Chim. Acta, **282**, 75-80, 1993.
- [5].- L.F. Capitán Vallvey, I. de Orbe Paya, M. Carmen Valencia, J.J. Berzas Nevado. Mikrochim. Acta, **111**, 223-229, 1993.
- [6].- B. Morelli, Analyst, **113**, 1077-1082, 1988.
- [7].- M. Blanco, J. Gene, H. Iturriaga, S. MasPOCH, J. Riba, Talanta, **34**, 987-993, 1987.
- [8].- F. Salinas, J.J. Berzas Nevado, A. Espinosa Mansilla, Talanta, **37**, 347-351, 1990.
- [9].- A. Savitzky, M.J.E. Golay, Anal. Chem., **36**, 1627-1639, 1964.
- [10].- H.H. Madden, Anal. Chem., **50**, 1383-1386, 1978.
- [11].- IUPAC. Analytical Chemistry Division, Spectrochim. Acta B, **33B**, 242-245, 1978.
- [12].- L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, M. Román Ceba, Anal. Lett., **26**, 1243-1258, 1993.
- [13].- L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, F. Allés Barrero, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, J. Assoc. Off. Anal. Chem., **78**, 471-476, 1995.

CAPÍTULO VII

CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS IMPLICADOS EN LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE Zn(II) Y Cd(II) CON PAR.

En este capítulo se recogen los estudios llevados a cabo para establecer la naturaleza de los complejos involucrados en los métodos analíticos de EFS propuestos en esta Memoria para la determinación de Zn(II) y Cd(II) mediante el PAR, y que comprenden:

- Espectros de absorción visible de las especies fijadas en el cambiador.
- Estudio de la estequiometría de los complejos.
- Cálculo de los protones liberados en el proceso.
- Síntesis y estudio de complejos sólidos.
- Estudio de los espectros IR de los complejos y del ligando sobre el Sephadex.
- Cálculos de orbitales moleculares de los complejos.

1.- ESPECTROS DE ABSORCIÓN EN EL VISIBLE DEL LIGANDO Y DE LOS COMPLEJOS FIJADOS EN EL SEPHADEX

1.1.- Espectros de absorción del ligando

Según se ha recogido en la Introducción de esta memoria, en disolución acuosa existen diferentes especies químicas del PAR (H_3L^+ , H_2L , HL^- y L^{2-}) dependiendo del pH del medio, cuyos espectros de absorción ultravioleta-visible están bien establecidos [1].

Sobre un cambiador de aniones, como es el Sephadex QAE, las especies que se fijan en mayor extensión serán las que lo hagan por intercambio iónico, es decir, las aniónicas, HL^- y L^{2-} en este caso. En la fijación de estas especies influye el pH de la disolución, pero también otros factores como la fuerza iónica o la selectividad del cambiador, determinada en gran medida por la carga de la especie. También podrían fijarse sobre estos soportes especies no cargadas, simplemente por fenómenos de adsorción, aunque en una extensión muy inferior.

Para establecer los espectros de absorción de las especies del PAR fijadas sobre el cambiador, se han equilibrado 80 mg de Sephadex QAE con 100 mL de disolución 8×10^{-6} M de PAR (10^{-2} M en KI, para mantener la composición iónica análoga a la de los métodos analíticos) y de diferentes valores de pH: 3'0, 4'5, 8'7 y 9'6. En las figuras VII.1 y VII.2 se recogen los espectros de absorción en fase sólida obtenidos, así como los espectros correspondientes a sus disoluciones recogidas después de separar el cambiador (disoluciones del mismo valor de pH). La comparación de los espectros nos ha permitido hacer las asignaciones recogidas en la tabla VII.1, en total concórdancia con lo encontrado en bibliografía.

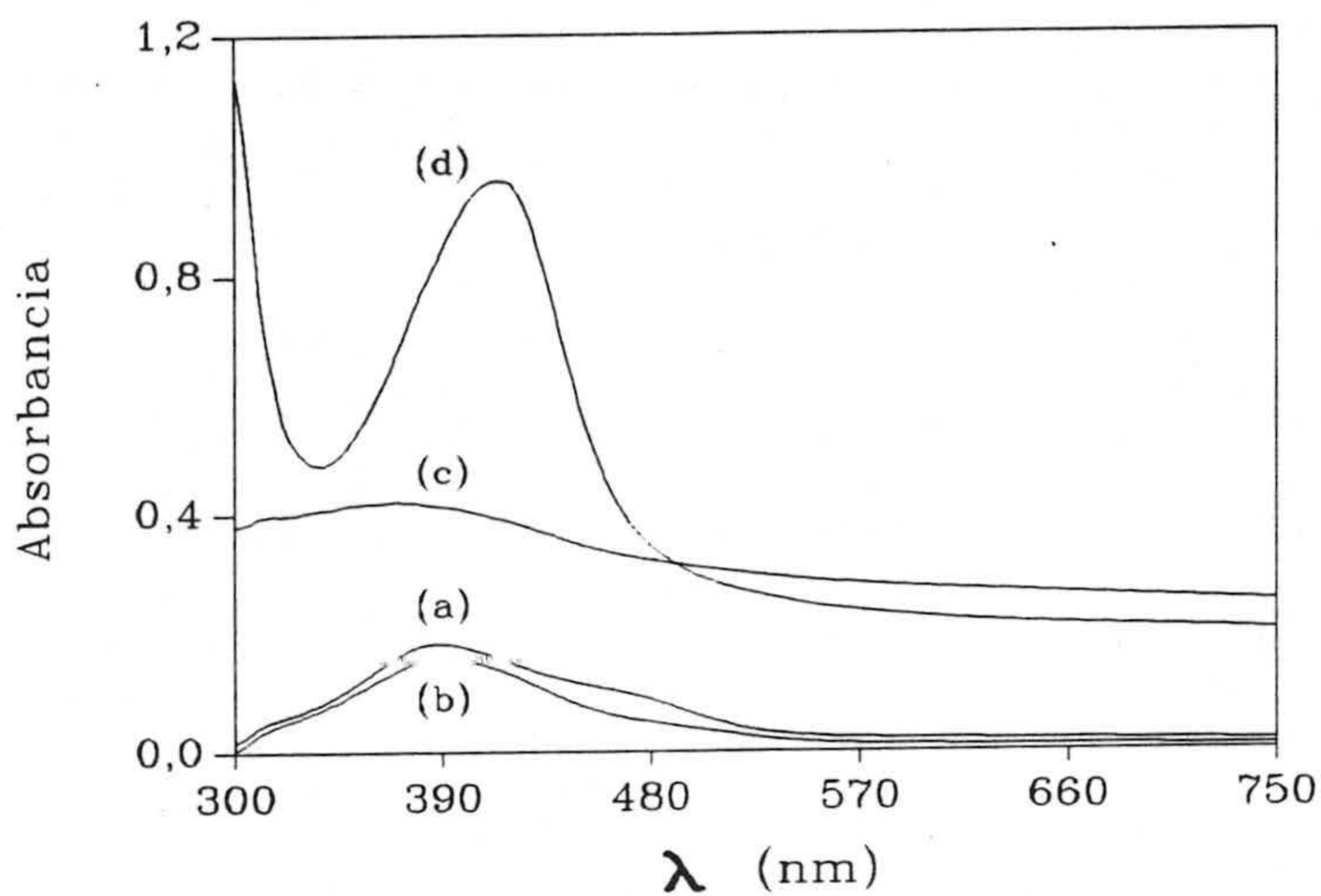


Figura VII.1. Espectros de absorción del PAR. Espectros en disolución a pH 3'0 (a) y 4'5 (b). Espectros en fase sólida a pH 3'0 (c) y 4'5 (d).

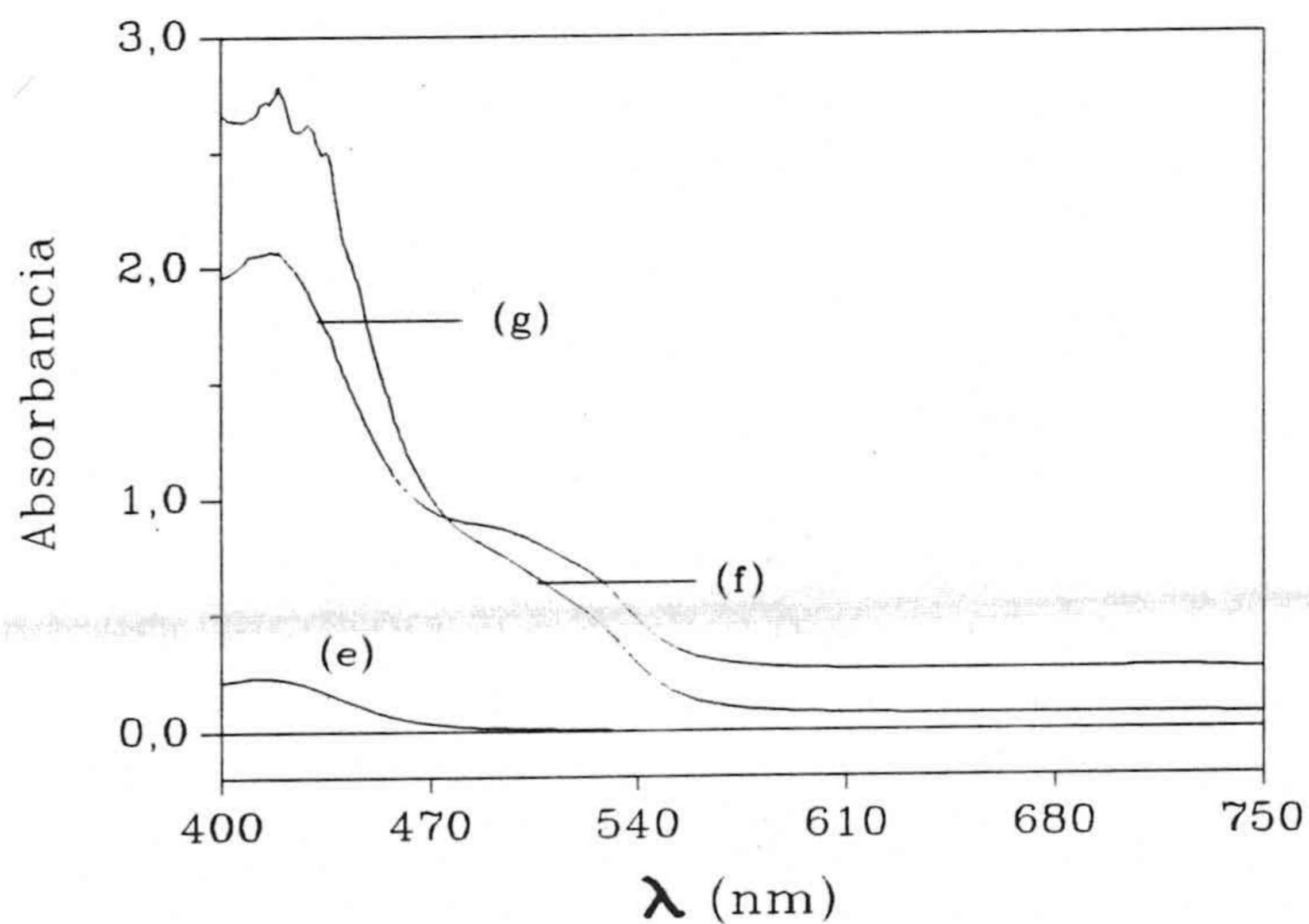


Figura VII.2. Espectros de absorción del PAR. Espectro en disolución a pH 8'7 (e). Espectros en fase sólida a pH 8'7 (f) y 9'6 (g).

Tabla VII.1. Máximos de absorción del PAR.

Especie	Fase sólida	Disolución
H ₃ L ⁺	----	397 (395)
H ₂ L	374	388 (383)
HL ⁻	415	414 (415)
L ²⁻	500	----- (485)

Entre paréntesis, los datos encontrados por Geary [2].

Como puede verse en la figura VII.2, a pH 8'7, óptimo para la aplicación de los métodos analíticos propuestos en capítulos anteriores, la absorbancia máxima en fase sólida se encuentra a 415 nm, indicando que la especie predominante en el cambiador es la HL⁻ (con el grupo p-OH disociado). También se obtiene una pequeña absorbancia a 500 nm, indicando la fijación en el Sephadex de la especie L²⁻ (con ambos grupos OH disociados) aunque en poca extensión. Si se tiene en cuenta el valor de la constante de disociación del grupo o-OH (entre 11'34 y 12'5) en disolución acuosa [1] sin duda hemos de concluir que el proceso de fijación (o el equilibrio de intercambio iónico) favorece la disociación del o-OH del PAR.

1.2.- Espectros de absorción de los complejos

Como se ha mostrado en los capítulos anteriores, los complejos del Par con Zn(II) y con Cd(II) fijados sobre el cambiador, presentan espectros de absorción netos con una única banda en el visible y con máximos de absorción a 500 nm, en el caso del Zn(II), y a 504 nm en el del Cd(II), mientras que en disolución estos máximos se encuentran a 492 y 496 nm, respectivamente. La similitud del máximo de absorción de los complejos con la mostrada por la especie L²⁻ del ligando indicaría que es dicha especie la que forma parte de los citados complejos.

Por otra parte, según se puso de manifiesto en el estudio de las variables que condicionan la formación y fijación de los complejos, la presencia de los iones I^- no modifica sus espectros de absorción. Esto parece indicar que los iones I^- no forman parte de los complejos.

2.- ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO Zn-PAR

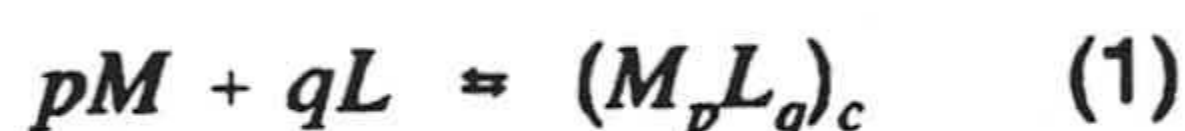
Para determinar la estequiometría del complejo formado entre Zn(II) y PAR en presencia de KI, se han utilizado los métodos de Holme-Langmyhr [3] y Bent-French [4].

2.1.- Método de Holme-Langmyhr

Según los mismos autores [5], este método exige para su aplicación la presencia de una sola especie en el medio. La comprobación de dicha condición, se lleva a cabo mediante el examen de los espectros registrados operando en presencia de un exceso de metal o de ligando.

Fundamento para su aplicación en EFS

Sean a y b las concentraciones iniciales de metal M y ligando L respectivamente, en un volumen total de disolución constante, V , que se equilibra con una masa de cambiador, m_r (Kg). La reacción de formación y fijación del complejo M_pL_q sería:



De acuerdo con la ley de acción de masas:

$$K = \frac{[M]^p [L]^q}{[M_p L_q]_c} \quad (2)$$

donde $[M_p L_q]_c$ viene expresada en mol/Kg de cambiador.

Las concentraciones de los reactantes en el equilibrio, teniendo en cuenta que la razón de distribución, D , es elevada, son:

$$[M] = a - p [M_p L_q]_c \frac{m_r}{V} \quad (3) \quad \text{y} \quad [L] = b - q [M_p L_q]_c \frac{m_r}{V} \quad (4)$$

Según la ley de Lambert-Beer:

$$[M_p L_q]_c = \frac{A_{neta}}{\epsilon_c l} \quad (5)$$

siendo A_{neta} la absorbancia neta del complejo, ϵ_c la absortividad molar del complejo en el cambiador y l el paso de luz en cm.

A partir de la combinación de las ecuaciones 2, 3 y 5 se obtiene:

$$\left(a - p \frac{A_{neta} m_r}{\epsilon_c l V}\right)^p [L]^q = K \frac{A_{neta}}{\epsilon_c l} \quad (6)$$

Cuando el equilibrio 1 está desplazado a la derecha, es decir, manteniendo la concentración de metal, a , constante y aumentando la concentración de ligando, b , la concentración límite del complejo sería:

$$\lim_{b \rightarrow \infty} [M_p L_q]_c = \frac{a}{p} \frac{V}{m_r} \quad (7)$$

que le corresponde una absorbancia neta límite de $A_{neta,o}$.

Combinando 5 y 7, obtenemos:

$$\varepsilon_c l = p \frac{A_{neta,o}}{a} \frac{m_r}{V} \quad (8)$$

que con la ecuación 5, daría:

$$[M_p L_q]_c = \frac{a}{p} \frac{A_{neta}}{A_{neta,o}} \frac{V}{m_r} \quad (9)$$

A partir de la combinación de las expresiones 2, 3, 4 y 9 se obtiene la ecuación:

$$K = \frac{(a - a \frac{A_{neta}}{A_{neta,o}})^p (b - a \frac{q}{p} \frac{A_{neta}}{A_{neta,o}})^q}{\frac{a}{p} \frac{A_{neta}}{A_{neta,o}} \frac{V}{m_r}} \quad (10)$$

que reescrita de otra forma y elevándola a la raíz emésima, daría:

$$\frac{1}{[L]^{q/p}} = \frac{1}{(b - a \frac{q}{p} \frac{A_{neta}}{A_{neta,o}})^{q/p}} = (\frac{1}{K} p a^{p-1})^{1/p} (1 - \frac{A_{neta}}{A_{neta,o}}) (\frac{A_{neta,o}}{A_{neta}})^{1/p} (\frac{m_r}{V})^{1/p} \quad (11)$$

La representación gráfica de $1/(b - a \frac{q}{p} \frac{A_{neta}}{A_{neta,o}})^{q/p}$ frente a $1/A_{neta}$ nos dará una única

línea recta para la estequiometría correcta del complejo, siendo curvas el resto de las representaciones correspondientes a los demás valores de q/p .

La aplicación de este método se basa también en la aproximación $A_{neta} = A_{neta,o}$ [3], puesto que se varía la concentración del ligando que se mantiene en exceso. Dicha aproximación se cumple para valores de $1/A_{neta}$ próximos a $1/A_{neta,o}$ (en el intervalo $1/A_{neta,o}$ y $2/A_{neta,o}$).

Aplicación del método

El examen de los espectros obtenidos, al operar tanto con un exceso de metal como de ligando (figura VII.3, espectro 1 y 2, respectivamente), nos indicó la existencia de una sola especie ya que ni la forma de los espectros ni la posición del máximo están influenciados por el cambio de la razón molar entre los reactantes (ligando/metal) y por tanto podemos aplicar el método.

A continuación, se prepararon diversas disoluciones, según el procedimiento habitual, que para un volumen final de 100 mL contenían 0'8 mL de disolución de Zn(II) $7'65 \times 10^{-5}$ M, volúmenes crecientes de PAR $6'27 \times 10^{-5}$ M, 2 mL de disolución de KI 0'1 M y 10 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M de pH = 8'7. En todos los casos, se prepararon los blancos correspondientes.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VII.2. A partir de éstos, se calcularon los valores de $1/(b - a \frac{q}{p})^{q/p}$ (con la aproximación $A_{neta} = A_{neta,o}$) para distintos valores de q/p (tabla VII.3) y se representaron frente a $1/A_{neta}$ (figura VII.4 a VII.8).

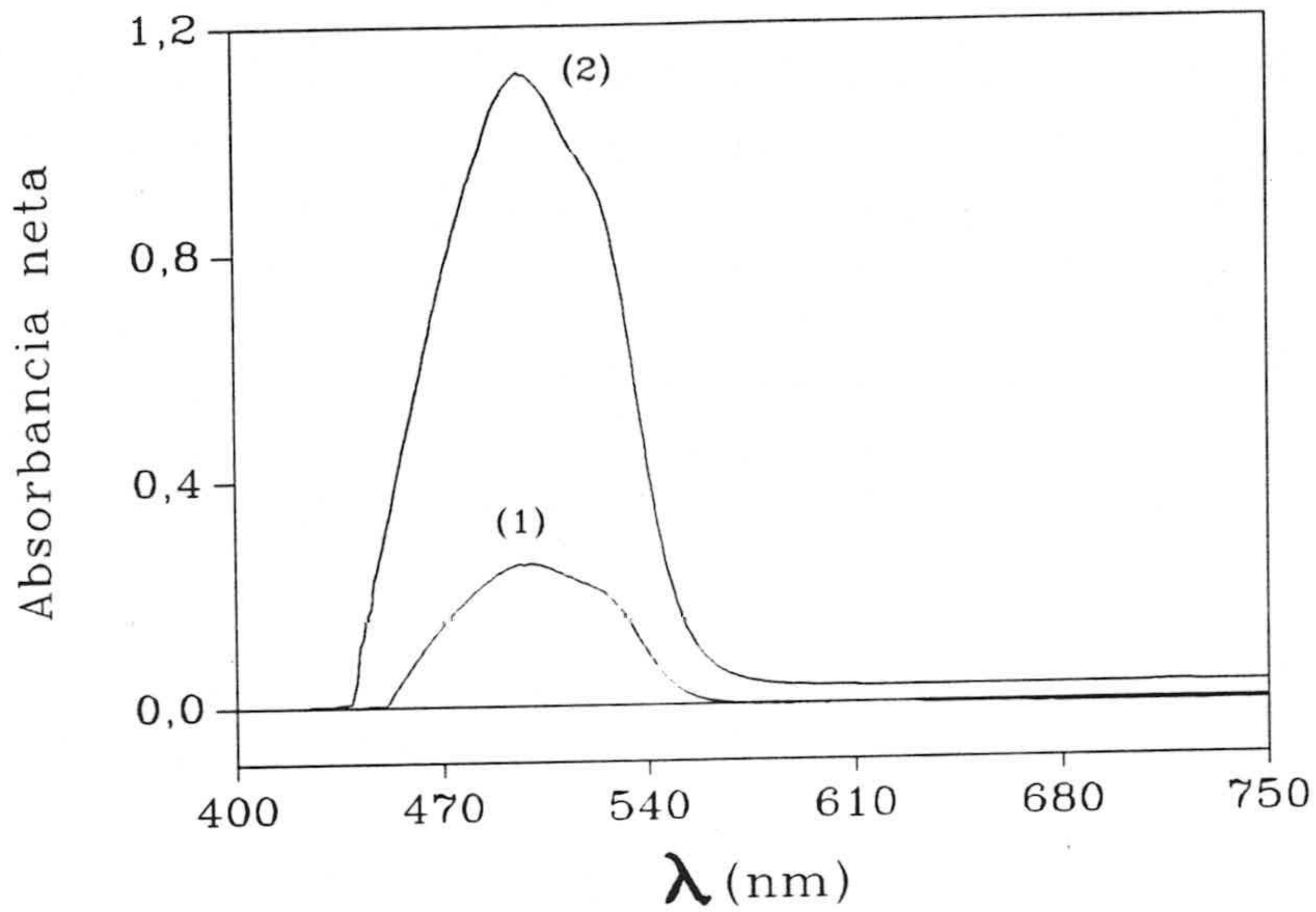


Figura VII.3. Espectros netos de absorción en fase sólida del sistema Zn(II)-PAR en presencia de KI. (1): $[Zn(II)]/[PAR] = 10^{-7}$; (2): $[PAR]/[Zn(II)] = 4^{-8}$.

Tabla VII.2. Variación de la concentración de PAR. $[Zn(II)] = a = 6.12 \times 10^{-7} M$.

V_{PAR} (mL) $6.27 \times 10^{-5} M$	$[PAR] = b$ $\times 10^6 M$	A_{neta}	V_{PAR} (mL) $6.27 \times 10^{-5} M$	$[PAR] = b$ $\times 10^6 M$	A_{neta}
3'0	1'88	0'9850	4'0	2'51	1'0731
3'2	2'01	1'0243	4'2	2'63	1'0780
3'3	2'08	1'0370	4'5	2'82	1'0835
3'5	2'19	1'0522	4'7	2'95	1'0871
3'7	2'32	1'0551	---	---	-----

Tabla VII.3. Método de HOLME-LANGMYHR.

$1/A_{neta}$	$q/p = 1/3$ $\frac{1}{(b - \frac{a}{3})^{1/3}}$	$q/p = 1/2$ $\frac{10^{-2}}{(b - \frac{a}{2})^{1/2}}$	$q/p = 1$ $\frac{10^{-6}}{(b - a)}$	$q/p = 2$ $\frac{10^{-12}}{(b - 2a)^2}$	$q/p = 3$ $\frac{10^{-19}}{(b - 3a)^3}$
1'015	84'19	7'97	0'79	2'32	1173'93
0'976	82'12	7'66	0'72	1'62	18'98
0'964	81'23	7'53	0'69	1'40	7'80
0'950	79'56	7'29	0'63	1'07	2'25
0'948	77'89	7'05	0'59	0'83	0'88
0'932	75'69	6'74	0'53	0'60	0'33
0'928	74'42	6'56	0'50	0'51	0'20
0'923	72'58	6'31	0'45	0'39	0'11
0'920	71'41	6'15	0'43	0'34	0'07

Se puede observar a partir de las figuras que se obtiene una línea recta para $q/p = 2$, siendo su ecuación:

$$\frac{1}{(b - 2a)^2} = -1'94 \times 10^{13} + 2'15 \times 10^{13} \frac{1}{A_{neta}} \quad (12)$$

con un coeficiente de determinación $r^2 = 0'9882$.

Por tanto, la aplicación del método de Holme-Langmyhr nos indica una estequiometría metal:ligando, 1:2, en el caso en que el complejo sea mononuclear.

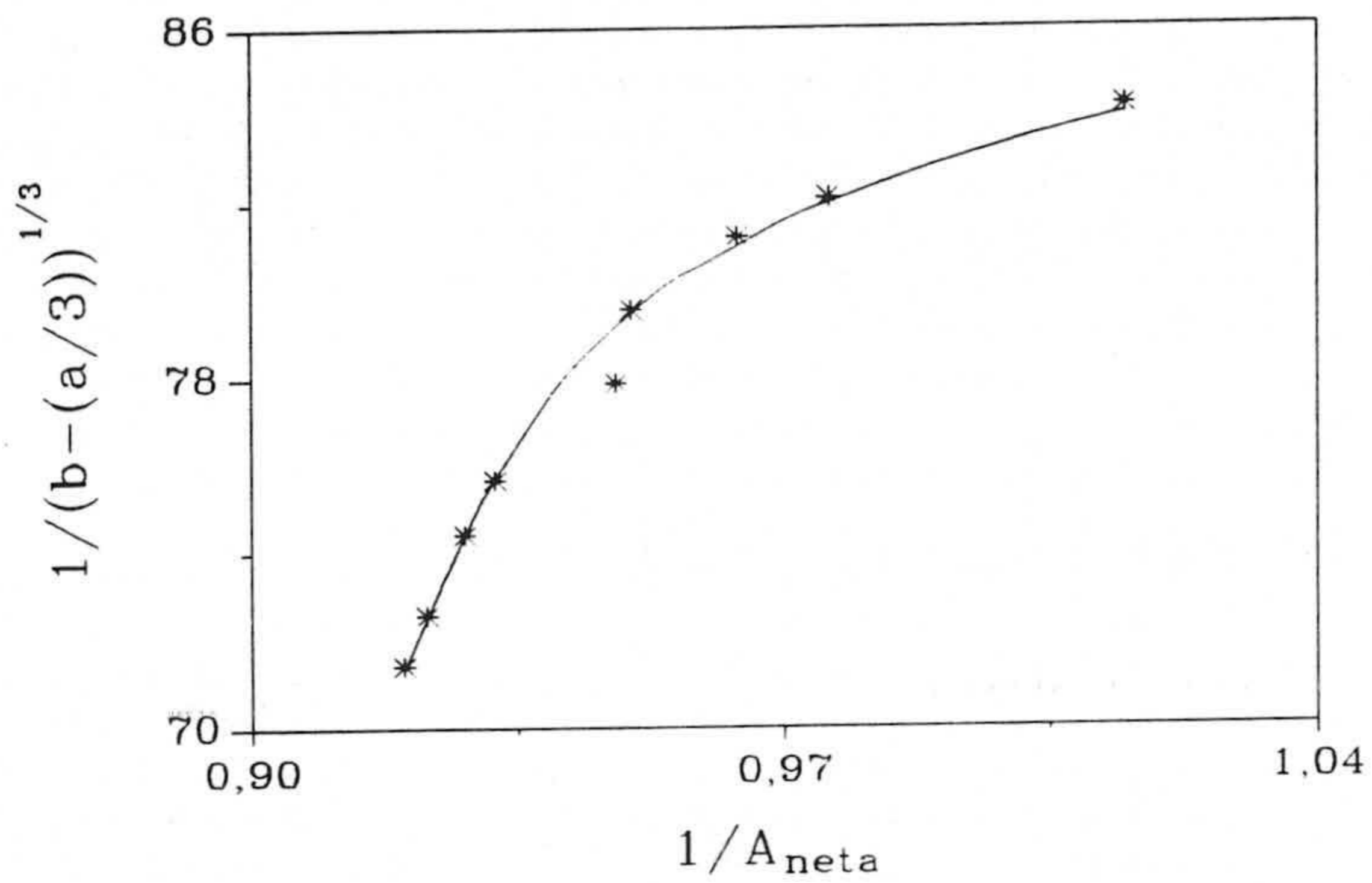


Figura VII.4. Método de Holme-Langmyhr para el sistema Zn(II)-PAR en presencia de KI y en fase sólida. Curva experimental correspondiente a $q/p = 1/3$.

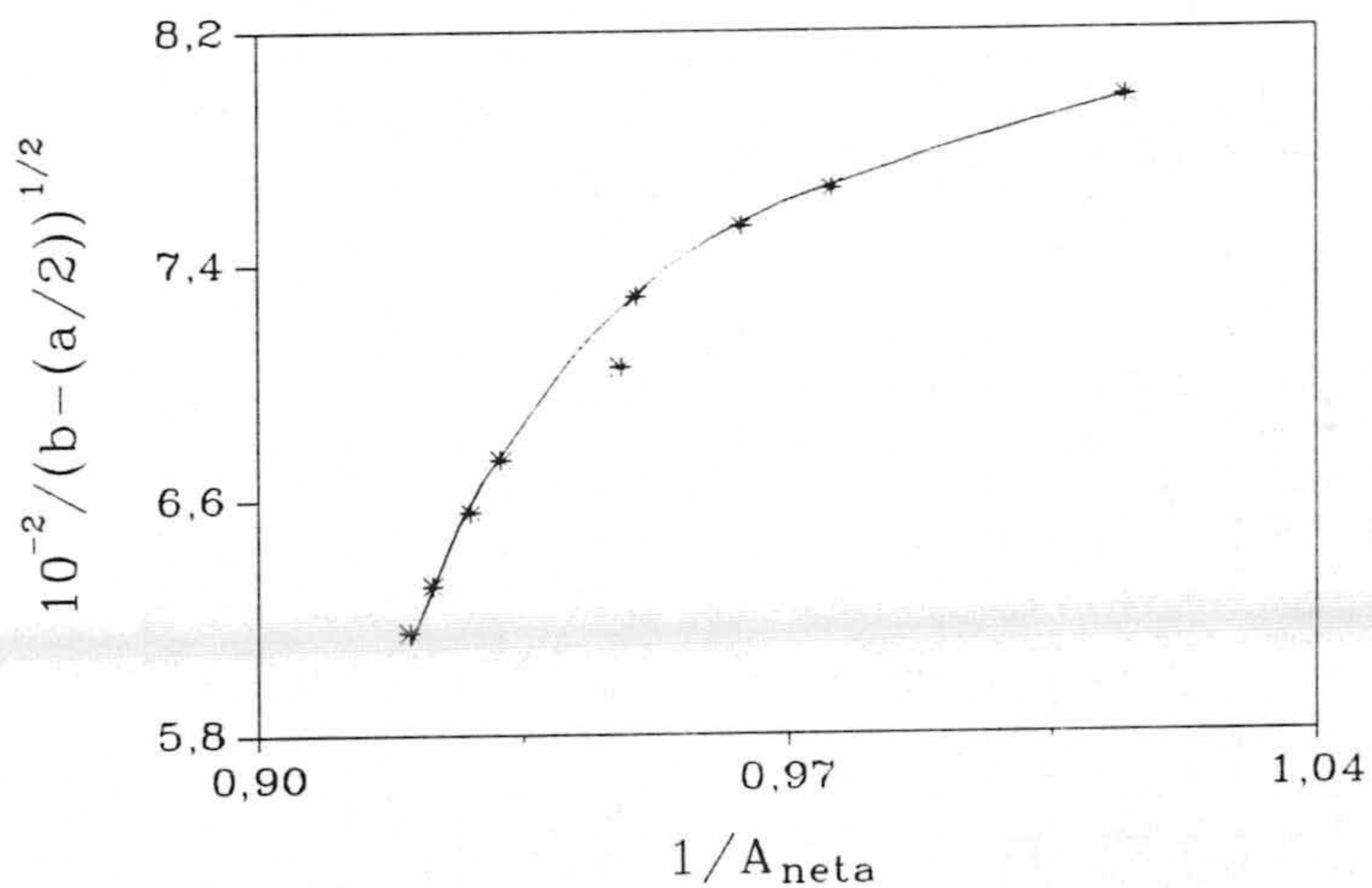


Figura VII.5. Método de Holme-Langmyhr para el sistema Zn(II)-PAR en presencia de KI y en fase sólida. Curva experimental correspondiente a $q/p = 1/2$.

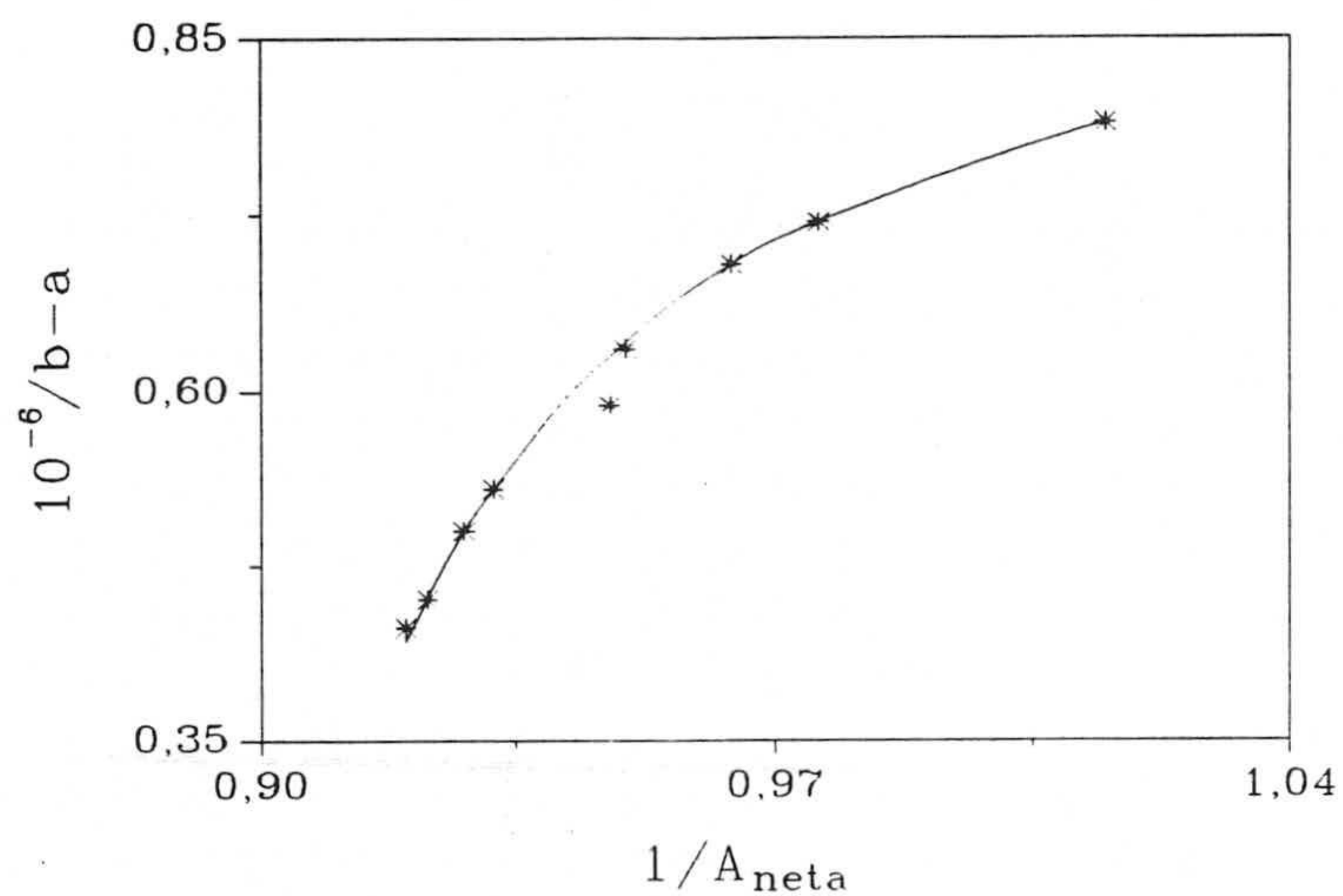


Figura VII.6. Método de Holme-Langmyhr para el sistema Zn(II)-PAR en presencia de KI y en fase sólida. Curva experimental correspondiente a $q/p = 1$.

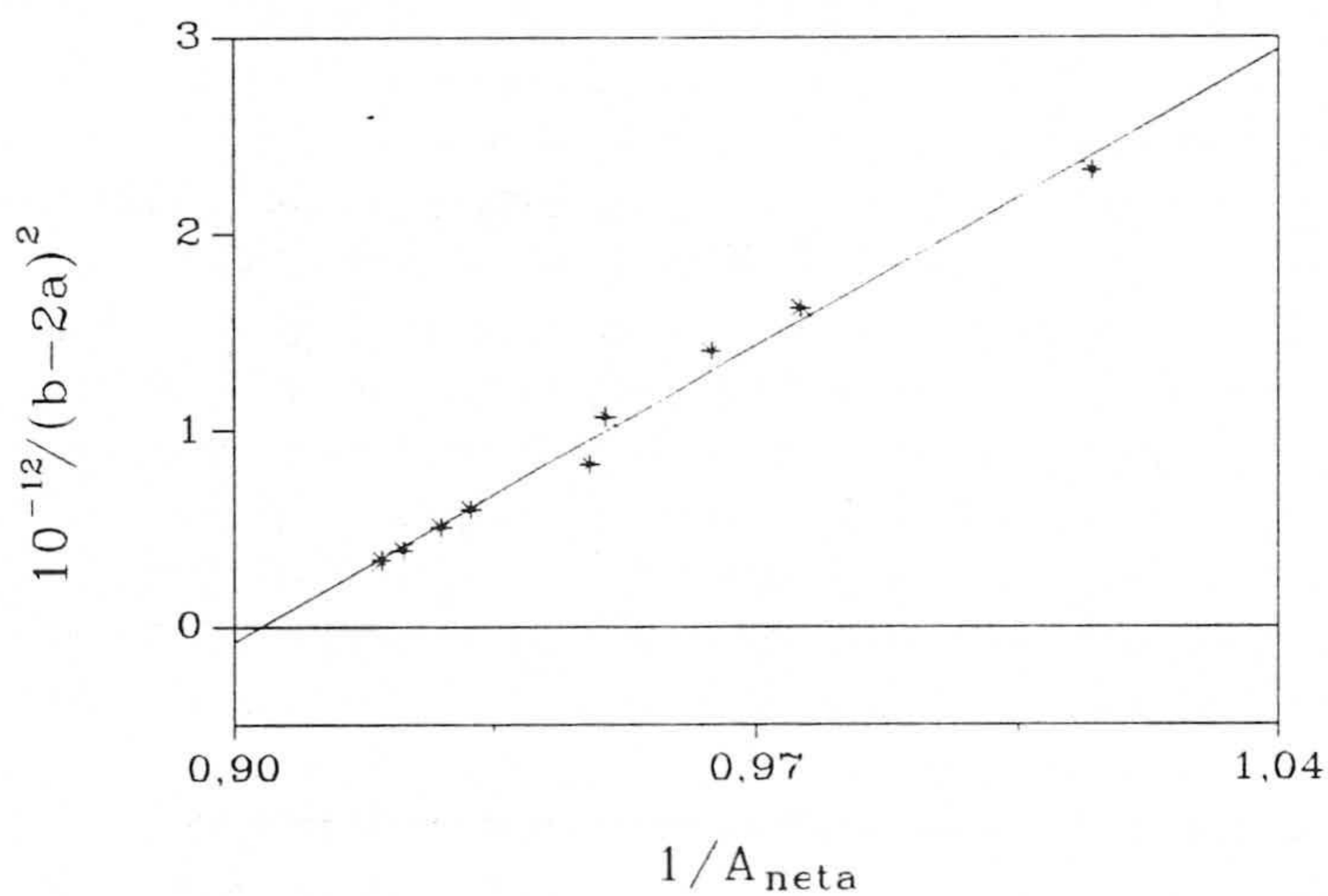


Figura VII.7. Método de Holme-Langmyhr para el sistema Zn(II)-PAR en presencia de KI y en fase sólida. Curva experimental correspondiente a $q/p = 2$.

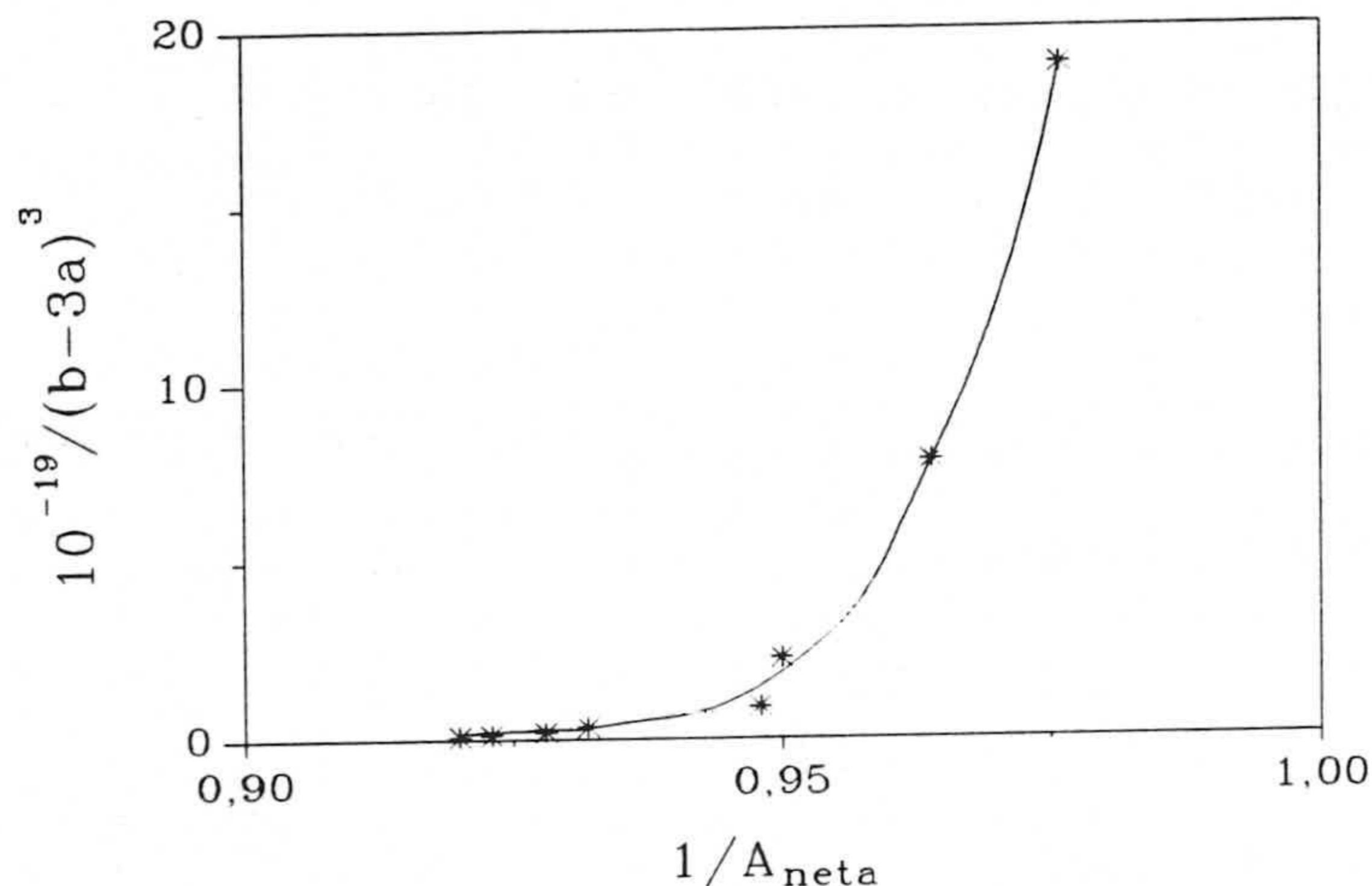


Figura VII.8. Método de Holme-Langmyhr para el sistema Zn(II)-PAR en presencia de KI y en fase sólida. Curva experimental correspondiente a $q/p=3$.

2.2.- Método de Bent-French

La aplicación de este método [4] exige que la concentración inicial de ligando (o de metal) sea constante y en mucho exceso respecto a la concentración de metal (o de ligando) que se varía, de tal forma que la concentración de complejo venga dada por el componente en defecto.

Para su aplicación en EFS consideramos, como en el método anterior, la reacción de formación y fijación del complejo M_pL_q en el cambiador. Tomando logaritmo decimal a la expresión de la ley de acción de masas y teniendo en cuenta la ley de Lambert-Beer:

$$\log A_{neta} = p \log[M] + q \log[L] + \log \frac{\epsilon_c l}{K} \quad (13)$$

donde cada parámetro tiene el significado indicado en el apartado anterior.

- Si se mantiene constante la concentración de ligando y se varia la de metal, al representar gráficamente $\log A_{neta}$ frente a $\log [M]$, se obtiene una línea recta cuya pendiente es p .

- Si ahora mantenemos constante la concentración de metal y variamos la de ligando, y representando gráficamente $\log A_{neta}$ frente a $\log [L]$, obtenemos una línea recta cuya pendiente es q .

Aplicación del método

Experiencia 1: Concentración de PAR constante.

Para ello se prepararon diversas disoluciones, según el procedimiento habitual, que para un volumen final de 100 mL contenían volúmenes crecientes de disolución de Zn(II) $7'65 \times 10^{-5}$ M, 2 mL de disolución de PAR $3'92 \times 10^{-4}$ M, 2 mL de disolución de KI 0'1 M y 10 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M de pH = 8'7. En este caso, solamente se preparó un blanco con todos los reactivos pero sin Zn(II).

En la tabla VII.4 se recogen los resultados obtenidos. Dichos datos se ajustan a una línea recta cuya ecuación es:

$$\log A_{neta} = 6'19 + 1'00 \times \log [Zn(II)]$$

siendo el coeficiente de determinación $r^2 = 0'9978$. La pendiente (p) de dicha ecuación es perfectamente igual a 1.

Tabla VII.4. Método de BENT-FRENCH. Experiencia 1.

V_{Zn} (mL) $7'65 \times 10^{-5}$ M	$[Zn(II)] \times 10^7$ M	A_{neta}	$\log [Zn(II)]$	$\log A_{neta}$
0'2	1'53	0'2363	-6'82	-0'63
0'4	3'06	0'4473	-6'51	-0'35
0'6	4'59	0'7135	-6'34	-0'15
0'8	6'12	0'9481	-6'21	-0'02
1'0	7'65	1'1550	-6'12	0'06

Experiencia 2: Concentración de Zn(II) constante.

Para ello se prepararon diversas disoluciones, según el procedimiento habitual, que para un volumen final de 100 mL contenían 2 mL de disolución de Zn(II) $3'06 \times 10^{-5}$ M, volúmenes crecientes de disolución de PAR $6'1 \times 10^{-5}$ M, 2 mL de disolución de KI 0'1 M y 10 mL de disolución reguladora (H_3BO_3/NaH_2BO_3) 0'2 M de pH = 8'7. Los blancos correspondientes se prepararon de la misma manera pero exentos de Zn(II).

Los resultados obtenidos que se reflejan en la tabla VII.5, se ajustan a una línea recta cuya ecuación es:

$$\log A_{neta} = 12'66 + 2'18 \times \log [PAR]$$

siendo su coeficiente de determinación $r^2 = 0'9716$. La pendiente (q) de dicha ecuación es igual a 2.

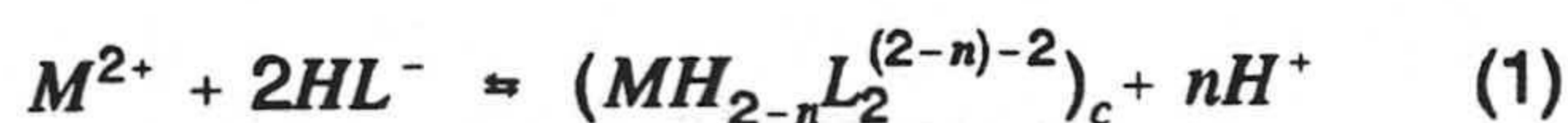
Tabla VII.5. Método de BENT-FRENCH. Experiencia 2.

V_{PAR} (mL) $6'1 \times 10^{-5} M$	$[PAR] \times 10^7 M$	A_{neta}	$\log [PAR]$	$\log A_{neta}$
0'1	0'61	0'0012	-7'21	-2'92
0'2	1'22	0'0025	-6'91	-2'60
0'3	1'83	0'0080	-6'74	-2'10
0'6	3'66	0'0430	-6'44	-1'37
0'9	5'49	0'0689	-6'26	-1'16
1'2	7'32	0'2760	-6'14	-0'56

Puesto que $q=2$ y $p=1$, estos resultados estan en buena concordancia con lo encontrado al aplicar el método de Holme-Langmyhr ($q/p=2$). Por tanto el complejo formado tiene la siguiente estequiometría: $Zn PAR_2$.

3.- CÁLCULO DEL NÚMERO DE PROTONES LIBERADOS EN EL PROCESO

Para calcular el número de protones liberados en la formación y fijación del complejo en el cambiador, partimos del equilibrio global, teniendo en cuenta la estequiometría calculada:



que le corresponde una constante global:

$$K_{eq} = \frac{[MH_{2-n}L_2^{-n}]_c [H^+]^n}{[M^{2+}] [HL^-]^2} \quad (2)$$

expresión que puede ser reordenada, una vez tomado el logaritmo decimal, en la forma:

$$\log \frac{[MH_{2-n}L_2^{-n}]_c}{[M^{2+}]} = \log K_{eq} + 2\log[HL^-] + npH \quad (3)$$

La absorbancia neta medida para cada valor de pH , A_{neta} , es proporcional a la concentración de complejo en la fase sólida, mientras que $(A_{neta})_m - A_{neta} \frac{m_r}{V}$ es proporcional a la concentración de metal en disolución, donde $(A_{neta})_m$ es la absorbancia neta máxima del complejo fijado.

Por lo tanto, se puede escribir la expresión 3 en la forma [6]:

$$\log \frac{A_{neta}}{(A_{neta})_m - A_{neta}} = cte + npH$$

Si se representa gráficamente $\log \frac{A_{neta}}{(A_{neta})_m - A_{neta}}$ frente al pH , se obtendrá una línea

recta cuya pendiente corresponderá al número de protones, n , liberados durante el proceso de formación y fijación del complejo.

Aplicación

Tomando de la tabla IV.8 los valores de la absorbancia neta para cada valor de pH , en la zona de influencia de éste ($6'00 < pH < 7'15$), y el promedio de los valores de la absorbancia neta en la plataforma de máxima complejación ($A_{neta)_m} = 0'7815$), se

han obtenido los valores para $\log \frac{A_{neta}}{A_{neta)_m} - A_{neta}}$ en función del pH (tabla VII.6).

Tabla VII.6. Determinación del número de protones liberados por mol de complejo.

pH	A_{neta}	$\log \frac{A_{neta}}{A_{neta)_m} - A_{neta}}$
6'00	0'0651	-1'04
6'08	0'1000	-0'83
6'30	0'2648	-0'29
6'46	0'4314	0'09
6'72	0'4904	0'23
6'82	0'6184	0'58
6'89	0'5907	0'49
7'01	0'6905	0'88
7'15	0'7300	1'15

La representación de $\log \frac{A_{neta}}{A_{neta)_m} - A_{neta}}$ frente a pH es una línea recta de pendiente

1'8 ($r^2 = 0'9748$). Por tanto concluimos que, en nuestras condiciones operatorias, se liberan dos protones por mol de complejo formado y fijado en la fase sólida y que la fórmula de éste es: ML_2^{2-} .

4.- ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO Cd-PAR

Para determinar la estequiometría del complejo formado entre Cd(II) y PAR en presencia de KI, se ha utilizado el método de Harvey-Manning (o de la relación de pendientes) [7].

Para ello, suponemos la reacción de formación y de fijación del complejo en el cambiador, que la podemos escribir:



donde M , L y M_pL_q representan respectivamente, el metal, el ligando y el complejo.

- Si la concentración de L es constante y se encuentra en gran exceso para que la disociación del complejo sea despreciable y la concentración del complejo (mol/Kg), en el equilibrio, sea proporcional a la concentración de ión metal añadido, se tiene:

$$[M_pL_q]_c = \frac{[M] V}{p m_r} \quad (2)$$

siendo $[M]$ la concentración total de metal. La absorbancia neta medida será:

$$A_{neta_1} = \epsilon_c l [M_pL_q]_c = \frac{\epsilon_c l V [M]}{m_r p} \quad (3)$$

cuya pendiente es $\frac{\epsilon_c l V}{p m_r}$ y donde V es el volumen total de disolución (constante) que se equilibra con una masa de cambiador, m_r (Kg); ϵ_c la absortividad molar del complejo en el cambiador y l el paso de luz en cm.

- Si lo que se mantiene ahora constante y en gran exceso es la concentración de M y se representa A_{neta} en función de las concentraciones de M añadidas:

$$A_{neta_2} = \epsilon_c l [M_p L_q]_c = \frac{\epsilon_c l V [L]}{m_r q} \quad (4)$$

con una pendiente $\frac{\epsilon_c l V}{q m_r}$.

La razón de las pendientes es:

$$\frac{pendiente_1}{pendiente_2} = \frac{\epsilon_c l V / p m_r}{\epsilon_c l V / q m_r} = \frac{q}{p} \quad (5)$$

que nos da la relación existente entre las pendientes, p y q .

Aplicación del método

Experiencia 1: Concentración de PAR constante.

En la tabla VII.7 se recogen los valores tomados de la tabla V.33 correspondientes a la absorbancia neta para cada valor de concentración de Cd(II), perteneciente al intervalo lineal del método.

Tabla VII.7. Método de Harvey-Manning. Experiencia 1.

[Cd(II)]x10 ⁷ M	<i>A_{neta}</i>
0'00	0'0000
0'92	0'5410
1'85	1'0450
2'77	1'5313

La pendiente de la representación de la absorbancia neta frente a la concentración de Cd(II), obtenida ajustando por mínimos cuadrados los puntos experimentales, es $5'52 \times 10^6$ con un coeficiente de determinación, $r^2 = 0'9994$.

Experiencia 2: Concentración de Cd(II) constante.

Para tal fin, se prepararon según el procedimiento habitual matraces conteniendo 1 ppm de Cd(II), a la cual se añadieron 1 mL de KI 3'5 M, volúmenes crecientes de una disolución de PAR $2'51 \times 10^{-4}$ M y 5 mL de disolución reguladora H_3BO_3/NaH_2BO_3 0'5 M de pH = 8'7, enrasando finalmente a 500 mL con agua de ósmosis inversa. Los blancos, exentos de Cd(II), se prepararon de la misma manera.

Tras agitar 40 minutos, se obtuvieron los resultados que se recogen en la tabla VII.8.

En este caso, la pendiente obtenida al representar la absorbancia neta frente a la concentración de PAR es $2'81 \times 10^6$ y cuyo coeficiente de determinación $r^2 = 0'9892$.

En la figura VII.9 se han representado los valores de la absorbancia neta frente a la concentración del componente a variar.

Tabla VII.8. Método de Harvey-Manning. Experiencia 2.

[PAR] $\times 10^7$ M	A_{neta}
1'00	0'4352
2'51	0'9238
5'02	1'8326
7'53	2'3252
10'00	2'9837

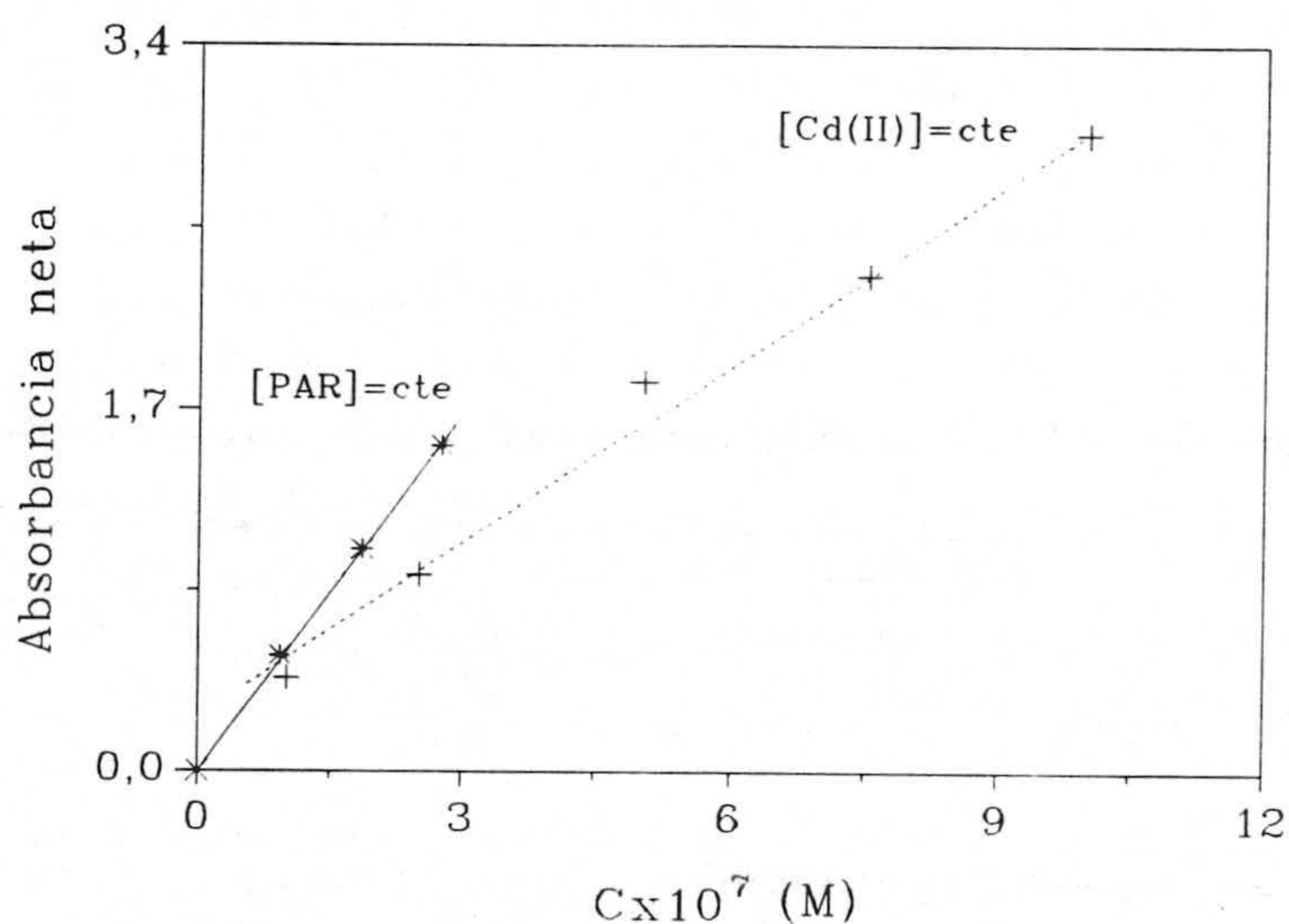


Figura VII.9. Método de Harvey-Manning para el sistema Cd(II)-PAR en presencia de KI y en fase sólida.

La relación de pendientes, 1'96, nos indica una estequiometría 2:1 (ligando:metal) para el complejo formado y fijado en el cambiador, en concordancia con la obtenido por Shibata [1].

5.- SÍNTESIS Y ESTUDIO DE COMPLEJOS SÓLIDOS

5.1.- Síntesis de los complejos sólidos

5.1.1.- Complejo sólido Zn-PAR

Se disuelven 0'268 g de la sal monosódica del 4-(2-piridilazo)resorcinol monohidratada (1'05 mmoles) en 15 mL de agua y se agregan sobre una disolución de 0'068 g (0'50 mmoles) de $ZnCl_2$ en 5 mL de agua acidificada con HCl. Lentamente y con agitación se adiciona amoníaco diluido hasta que se observa precipitación (pH = 3'9). Se agita unos minutos más y se deja en reposo unas 15 horas. Finalmente se filtra el precipitado formado en crisol de vidrio molido, se lava con agua y se seca a vacío sobre $CaCl_2$. Se obtiene un sólido amorfo de color granate oscuro.

- Rendimiento para $Zn(C_{11}H_8N_3O_2)_2 \cdot H_2O$: 84%.

- Análisis elemental:

* Experimental: C, 51'92; N, 16'08; H, 3'39; Zn, 12'2%.

* Calculado para $Zn(C_{11}H_8N_3O_2)_2 \cdot H_2O$: C, 51'60; N, 16'42; H, 3'52; Zn, 12'8%.

5.1.2.- Complejo sólido Cd-PAR

Se prepara una disolución de 0'257 g (1 mmol) de $3CdSO_4 \cdot 8H_2O$ en 5 mL de agua con unas gotas de H_2SO_4 . Sobre ésta se añade lentamente y agitando una disolución de 0'520 g (2'04 mmoles) de la sal monosódica del 4-(2-piridilazo)resorcinol monohidratada y a continuación unas gotas de NH_3 con lo que se observa la aparición de un precipitado de color granate (pH = 3'8). Se agita unos minutos y se deja en reposo unas 15 horas. Finalmente se filtra el precipitado formado en crisol de vidrio molido, se lava con agua

y se seca a vacío sobre CaCl_2 .

- Rendimiento para $\text{Cd}(\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O} = 70\%$.

- Análisis elemental:

* Experimental: C, 47'68; N, 14'75; H, 3'28; Cd, 17'9%.

* Calculado para $\text{Cd}(\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 47'26; N, 15'04; H, 3'22; Cd, 20'1%.

5.2.- Análisis térmico

Para hacer el estudio termogravimétrico de los complejos (figuras VII.10 y VII.11) se pesaron 4'801 mg del complejo de Zn y 9'232 mg del de Cd.

Los dos complejos se presentan como hidratos y, como puede verse en los diagramas TG, la deshidratación tiene lugar de manera paulatina desde el inicio de la calefacción, siendo el agua inespecífica, en ambos casos.

Una vez deshidratados, los sólidos estudiados son estables térmicamente hasta temperaturas superiores a 250 °C, siendo más estable el complejo de Zn que el de Cd. En ambos casos, a partir de esa temperatura se inicia su descomposición pirolítica que como se puede observar en las curvas de DTG tiene lugar principalmente en dos etapas, finalizando ésta a unos 700 °C, quedando ZnO y CdO como residuos.

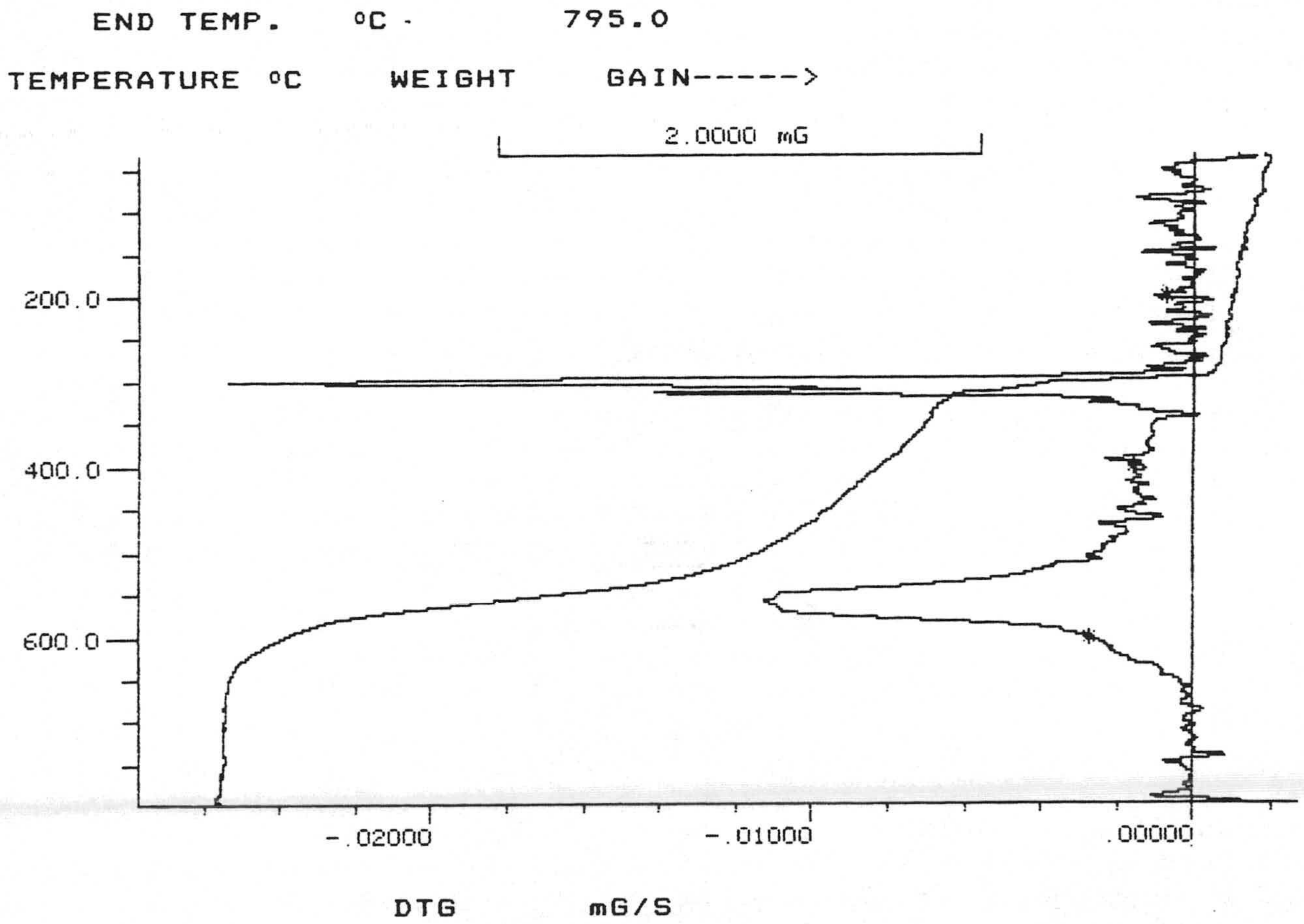


Figura VII.10. Diagrama de TG del complejo Zn-PAR.

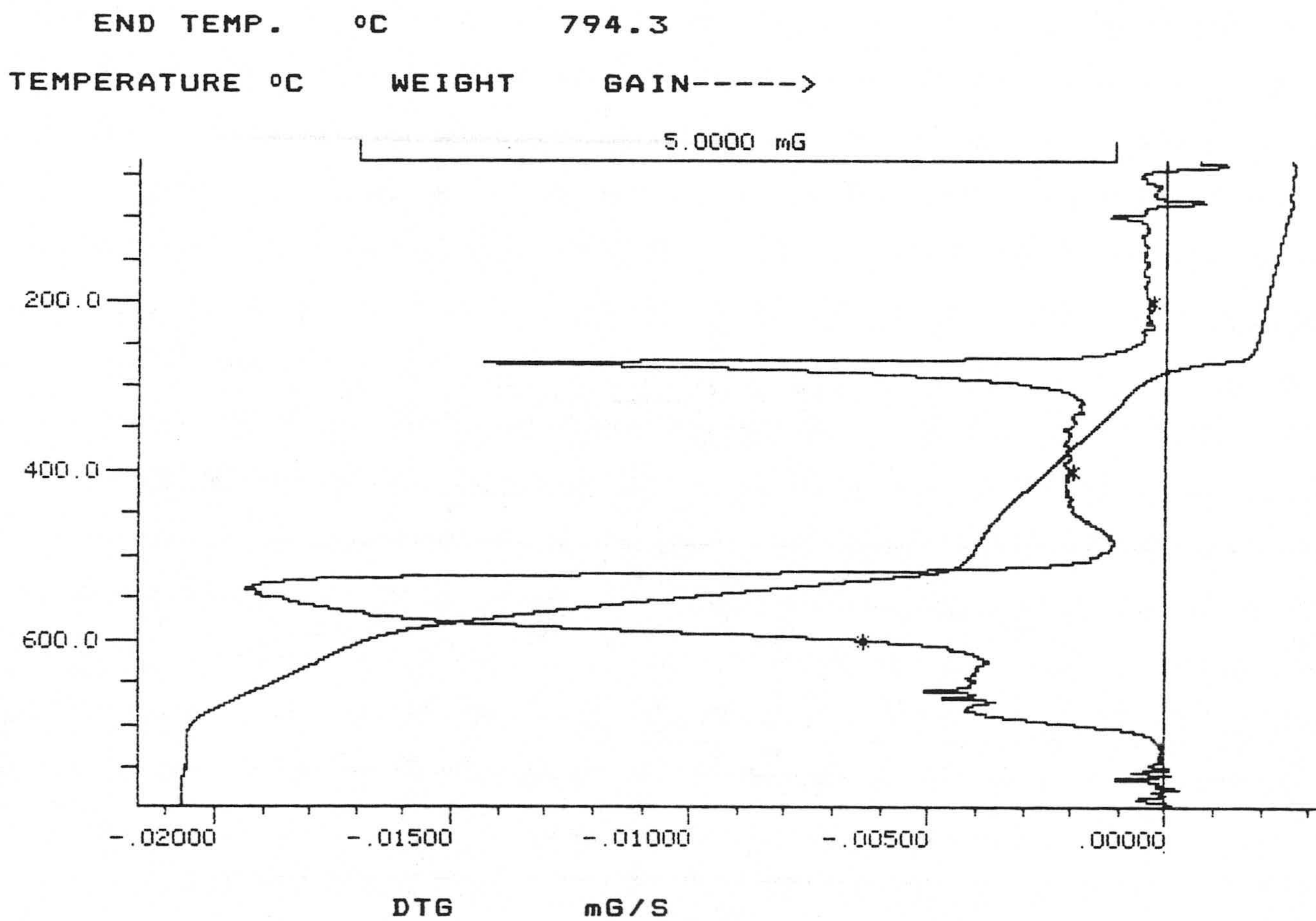


Figura VII.11. Diagrama de TG del complejo Cd-PAR.

5.3.- Medidas de conductancia eléctrica

Las conductancias molares obtenidas para los complejos disueltos en dimetilformamida (2.5×10^{-4} M) a diferentes tiempos (tabla VII.9) indican que los complejos en estudio son no electrolitos [8]. Los valores relativamente altos obtenidos podrían justificarse por la disociación parcial de los grupos p-OH del anillo de resorcinol.

Tabla VII.9. Medidas de conductancia molar a diferentes tiempos.

t (h)	Λ_m (cm ² /Ω.mol)	
	Zn-PAR	Cd-PAR
0	50	44
24	46	44
72	46	48

5.4.- Espectros de absorción en el visible

Se han registrado los espectros de absorción de los complejos sólidos Zn-PAR y Cd-PAR en dimetilformamida (DMF) en la zona 400-700 nm. La concentración de complejo fue 5×10^{-5} M en ambos casos. Los espectros obtenidos se recogen en las figuras VII.12 y VII.13.

En dichas figuras se puede observar que los máximos de absorción se encuentran a 513 y 522 nm para el complejo de cinc y el de cadmio, respectivamente. Este desplazamiento de los máximos hacía mayores longitudes de onda (efecto batocrómico) podría deberse a la utilización de dimetilformamida como disolvente.

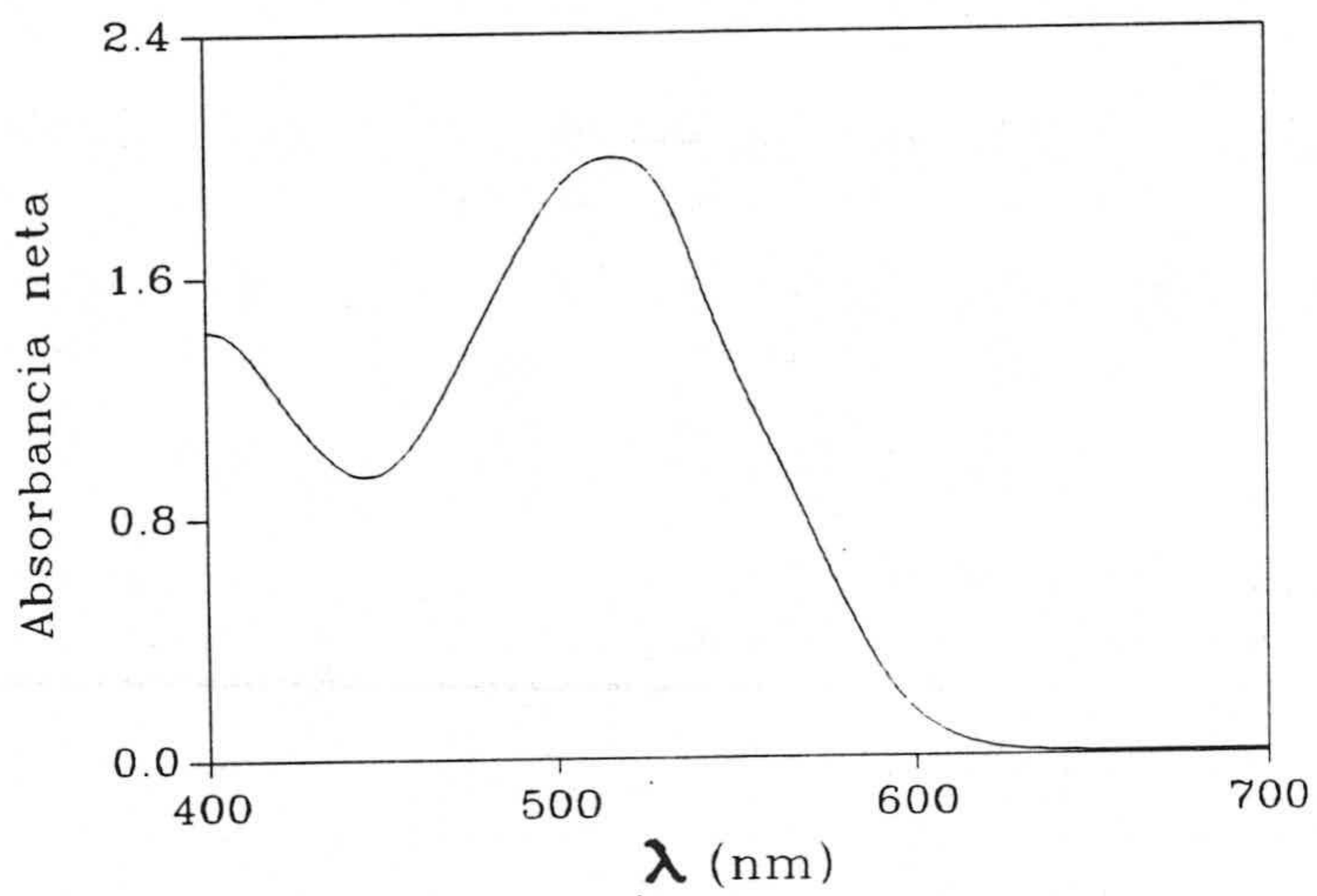


Figura VII.12. Espectro de absorción en el visible de Zn(II) en DMF.

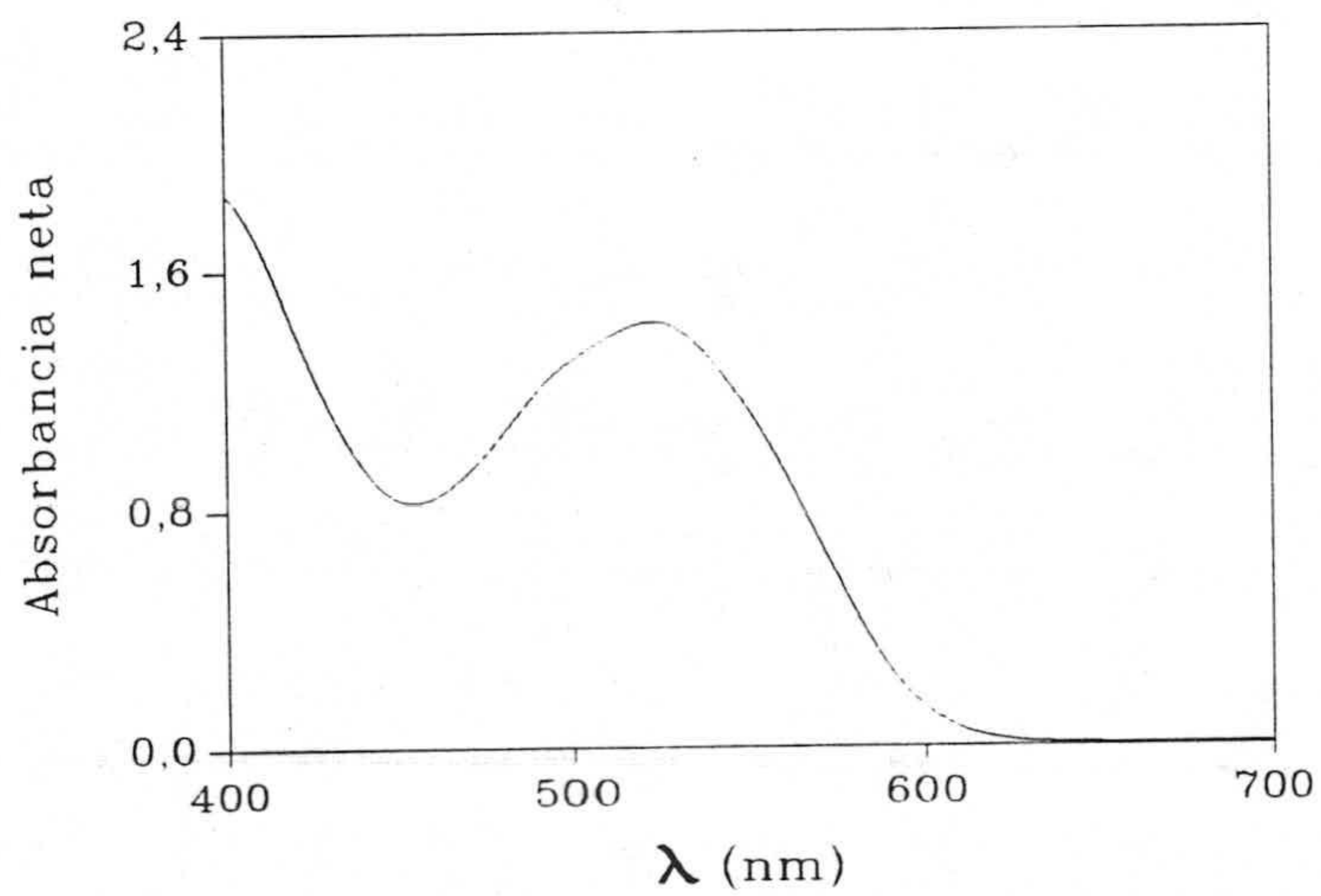


Figura VII.13. Espectro de absorción en el visible de Cd(II) en DMF.

5.5.- Espectros infrarrojos

Los espectros IR de los complejos y de la sal sódica del PAR se recogen en las figuras A.9 a A.11 del apéndice. A continuación se comentan las asignaciones realizadas tras estudiar comparativamente dichos espectros y consultar la bibliografía pertinente.

La banda ancha que aparece en el espectro del ligando entre 3400 y 2900 cm^{-1} puede atribuirse a la vibración de tensión ν_{OH} del agua y del grupo o-OH del anillo de resorcinol, siendo característica de fenoles con diferentes asociaciones inter e intramoleculares [9]. En los complejos, la banda del agua aparece centrada entre 3500 y 3450 cm^{-1} y contiene además la vibración de tensión del grupo p-OH del anillo de resorcinol, dado que los sólidos fueron aislados en medio ácido.

Las vibraciones de los anillos aromáticos, resorcinol y piridínico, dan lugar a un conjunto de bandas en el espectro del ligando entre 1632 y 1447 cm^{-1} . En los complejos aparecen desplazadas algunas hacia menores frecuencias (unos 20 cm^{-1} en la primera de ellas), indicando la coordinación del ligando a través del N-piridínico [10].

La coordinación a través del N del grupo azo se pone de manifiesto por la presencia en los espectros de los complejos de una fuerte banda hacia 1350 cm^{-1} atribuible a la vibración de tensión N=N. El gran aumento de intensidad de esta banda con respecto al ligando se atribuye, de acuerdo con asignaciones previas [11,12], a la gran asimetría introducida en el grupo azo por la coordinación con uno sólo de los átomos de N del grupo.

La absorción en la región 1350-1100 cm^{-1} , originada principalmente por diversos modos de tensión y deformación C-O, C-N y C-H, se afecta por la coordinación. Así, las fuertes bandas a 1332 y 1218 cm^{-1} en el espectro del ligando se desplazan hacia menores frecuencias con cambios en intensidad y en el número de bandas en los complejos.

Finalmente, los espectros obtenidos en polietileno, barriendo la zona entre 650 y 180 cm^{-1} , no muestran claramente bandas atribuibles a las vibraciones de tensión N-Zn ni N-Cd.

6.- ESPECTROS IR DE LOS COMPLEJOS Y DEL LIGANDO FIJADOS EN EL SEPHADEX

Para obtener los espectros infrarrojos del Par y de sus complejos, retenidos en el cambiador iónico, se procedió como se indica a continuación:

En primer lugar se prepararon disoluciones 10^{-2} M de los complejos y del PAR (25 mL) de pH 8'5-8'7 y se agitaron con 0'25 g de Sephadex QAE durante aproximadamente 90 min., para alcanzar la fijación cuantitativa. Tras filtrar y secar en desecador sobre CaCl_2 , a temperatura ambiente, se tomaron porciones para obtener los espectros IR, tanto en KBr como en polietileno, en manera análoga a lo indicado en el apartado anterior. Con fines comparativos, también se obtuvieron espectros IR del propio cambiador en ciclo Cl^- .

Los espectros obtenidos se recogen en las figuras A.12 a A.15 del apéndice.

La vibración de tensión de los grupos ν_{OH} de la estructura de polidextrano aparece como una banda intensa y ancha entre 3700 y 3000 cm^{-1} en todos los espectros, solapando las ν_{OH} del anillo de resorcinol en los espectros del ligando o de los complejos fijados sobre el soporte.

La vibración de tensión C-H alifático de la estructura polimérica y de los grupos de cambio iónico ($-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$) aparece en todos los casos como dos bandas anchas a 2977 y sobre 2925 cm^{-1} .

La banda que aparece en el espectro del Sephadex a 1648 cm^{-1} , asignable a ν_{OH} , es característica de compuestos hidratados. Esta banda aparece como un hombro en los espectros de los complejos y del Par fijados sobre el cambiador a 1650-1640 cm^{-1} .

Las bandas anchas e intensas que aparecen en todos los espectros sobre 1140 y 1110 cm^{-1} pueden ser atribuidas a vibraciones $\nu_{\text{C-O}}$ de los grupos alcohol y eter del soporte polimérico.

Los espectros del Par y de los complejos fijados sobre el Sephadex son bastante similares, destacándose fundamentalmente las bandas correspondientes al cambiador, ya comentadas. No obstante, tras comparar con los espectros IR de la sal sódica del PAR y de los complejos sólidos aislados (comentados en el apartado anterior) se han podido identificar en ellos, además, algunas bandas características de sus propias estructuras según se recoge en la tabla VII.10, mostrando los mismos cambios atribuibles a la complejación. Así, cabe destacar la vibración de tensión $\text{N}=\text{N}$, que aparece también como una banda intensa en los complejos fijados en el Sephadex, y como débil en el ligando.

Los espectros obtenidos en polietileno, barriendo la zona de 650-180 cm^{-1} , tampoco muestran bandas atribuibles a las vibraciones de tensión N-Zn ni N-Cd .

Tabla VII.10. Bandas de absorción IR (cm^{-1}) de los complejos y del PAR.

Asignación	PAR (sal monosódica)	PAR-Sephadex	Zn(PAR) ₂	Zn(PAR) ₂ - Sephadex	Cd(PAR) ₂	Cd(PAR) ₂ -Sephadex
ν_{OH}	3400-2900	--- ¹	3479	--- ¹	3457	--- ¹
$\nu_{\text{C=C}}$ Y $\nu_{\text{C=N}}$	1632, 1601, 1577, 1563, 1494 ² , 1447	1616, 1595, 1572, 1474 ² , 1442	1613 ² , 1602 ² , 1544, 1513, 1478, 1447	1618, 1590, 1560, 1477 ²	1613, 1599, 1543, 1506, 1477, 1446	1616, 1589, 1558, 1475
$\nu_{\text{N=N}}$	1367	1365	1357 ²	1377 ²	1352 ²	1367 ²
$\nu_{(\text{C-O,C-N})}$ Y $\delta_{(\text{C-O,C-N,C-H})}$	1332, 1218 ²	1330, 1216 ² , 1145 ³ , 1116 ³ , 1011 ³	1324, 1249 ² , 1206 ² , 1182, 1146, 1118	1303, 1224 ² , 1186, 1145 ³ , 1109 ³ , 1006 ³	1316, 1245 ² , 1202 ² , 1177 ² , 1146, 1115	1302, 1219 ² , 1186, 1144 ³ , 1121 ³ , 1011 ³

¹: Englobada en la ν_{OH} del Sephadex.

²: Fuerte.

³: Presentes en el espectro del Sephadex como dos bandas anchas centradas a 1136 y 1015 cm^{-1} .

7.- CÁLCULO DE ORBITALES MOLECULARES Y CONCLUSIONES DEL ESTUDIO

En los apartados anteriores, se ha establecido la estequiometría de los complejos en el cambiador como 1:2 (metal:PAR). Además, para el Zn(II), se ha comprobado la liberación de dos protones por mol de complejo formado y fijado en el soporte. Por tanto, sería posible una fórmula ML_2^{2-} para los complejos, en donde L es el PAR con los dos grupos hidroxilo desprotonados. El PAR actuaría como ligando tridentado enlazándose al ión metálico por el nitrógeno piridínico, por uno de los nitrógenos del grupo azo (el más lejano al anillo heterocíclico) y por el grupo o-hidroxilo previamente desprotonado. Se originan, en consecuencia, cuatro metalociclos de cinco eslabones.

Las cargas residuales sobre los p-hidroxilo desprotonados permiten la fijación de los complejos sobre los grupos de cambio del Sephadex QAE.

A la vista de lo anterior, pensamos que un estudio de orbitales moleculares (OM) considerando un complejo de estequiometría ML_2^{2-} nos ayudaría a proponer una geometría para los mencionados complejos de Zn(II) y Cd(II) con PAR.

El cálculo de orbitales moleculares (semiempírico), realizado según se recoge en el capítulo I de esta Memoria, nos ha permitido estimar los valores de las distancias y los ángulos de enlace de los complejos (en la figura VII.14 se representa el de Zn, ya que las geometrías obtenidas para ambos son similares). Los datos más relevantes de dicho cálculo se recogen en las tablas VII.11 y VII.12.

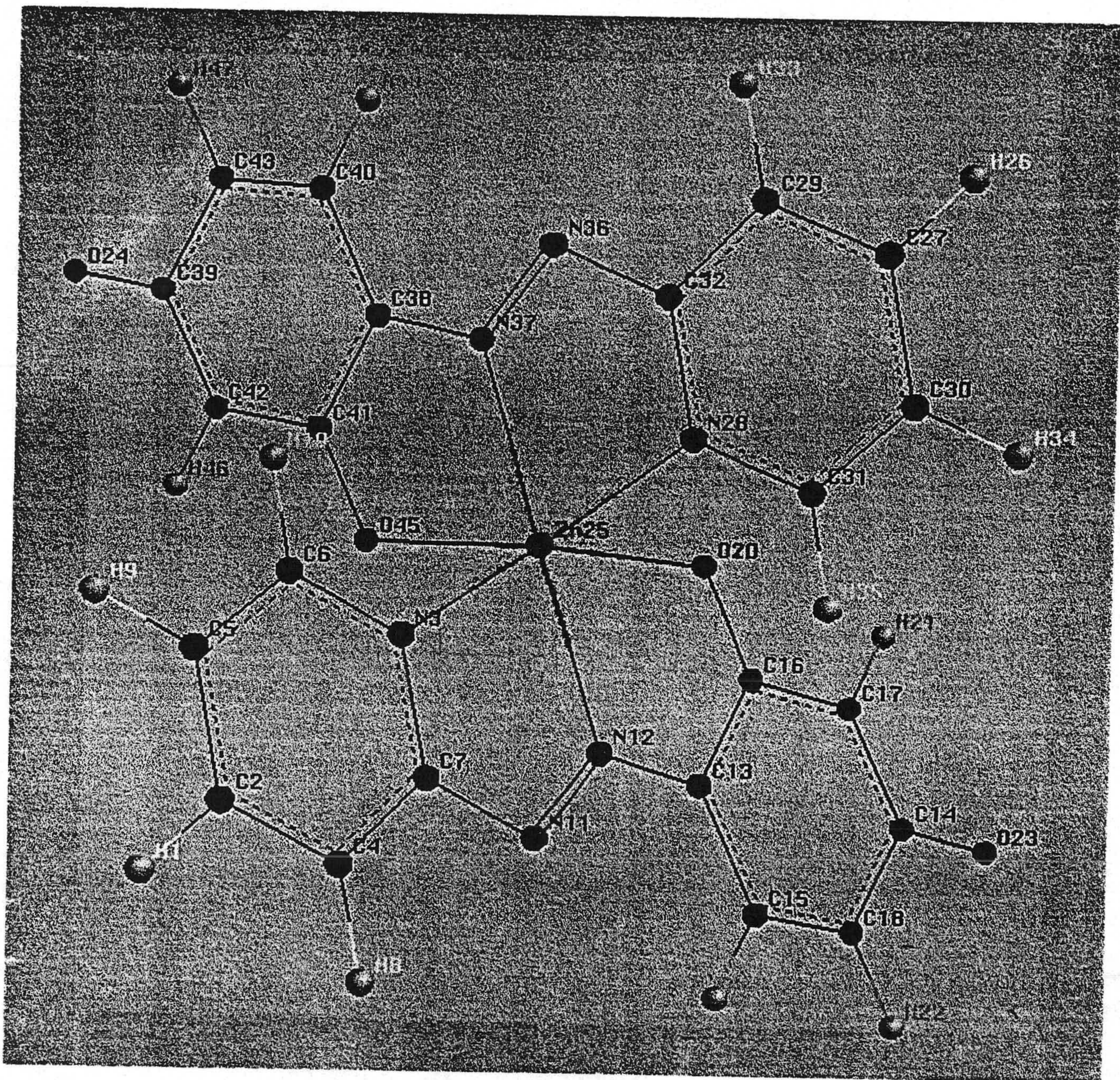


Figura VII.14. Estructura del complejo Zn-PAR₂.

Tabla VII.11. Valores de las distancias de enlace (en Angstrom) obtenidos con el Hamiltoniano PM3(tm) para los complejos Zn-PAR y Cd-PAR (*).

Distancia	Zn-PAR	Cd-PAR	Distancia	Zn-PAR	Cd-PAR
M--O ₂₀	2'205	2'287	N ₃₇ --N ₃	3'448	3'874
M--N ₁₂	2'161	2'528	N ₁₂ --N ₃	2'634	2'869
M--N ₃	2'244	2'650	O ₂₀ --C ₁₆	1'284	1'283
M--N ₃₇	2'161	2'529	N ₁₂ --C ₁₃	1'322	1'330
M--O ₄₅	2'205	2'287	N ₁₁ --C ₁₇	1'391	1'386
M--N ₂₈	2'244	2'652	N ₃ --C ₇	1'391	1'389
O ₂₀ --N ₃₇	3'493	4'351	N ₁₂ --N ₁₁	1'337	1'335
O ₂₀ --N ₁₂	2'720	2'710	C ₁₆ --C ₁₃	1'499	1'497

Tabla VII.12. Valores de las ángulos de enlace (en grados) obtenidos con el Hamiltoniano PM3(tm) para los complejos Zn-PAR y Cd-PAR (*).

Ángulo	Zn-PAR	Cd-PAR
N ₃ -M-O ₄₅	90'83	94'38
N ₃ -M-N ₃₇	103'00	96'80
N ₃ -M-O ₂₀	150'30	130'80
N ₃ -M-N ₁₂	73'40	62'50
N ₃ -M-N ₂₈	93'01	92'47
O ₄₅ -M-N ₂₈	150'34	130'74
O ₄₅ -M-N ₃₇	77'05	68'27
O ₂₀ -M-N ₃₇	106'27	129'17
O ₂₀ -M-O ₄₅	100'19	116'36
N ₁₂ -M-N ₃₇	174'98	151'25

(*): para la numeración, vease figura VI.14.

A partir de este estudio podemos proponer una estructura octaédrica distorsionada para ambos complejos, teniendo en cuenta las siguientes observaciones, en comparación con el modelo teórico, figura VII.15, que corresponde a un octaedro regular:

- El valor del ángulo diedro $O_{20}-N_{37}-N_3-N_{12}$ es de aproximadamente 0° ($0'14$ para el complejo de Zn y $9'14$ para el de Cd), lo que indica que los átomos que forman dicho ángulo están en un mismo plano. En éste, también se encuentra el metal ya que el valor del ángulo de enlace $N_{12}-M-N_{37}$ es de aproximadamente 180° .

- Los ángulos de enlace N_3-M-O_{45} y N_3-M-N_{28} , son de aproximadamente 90° .

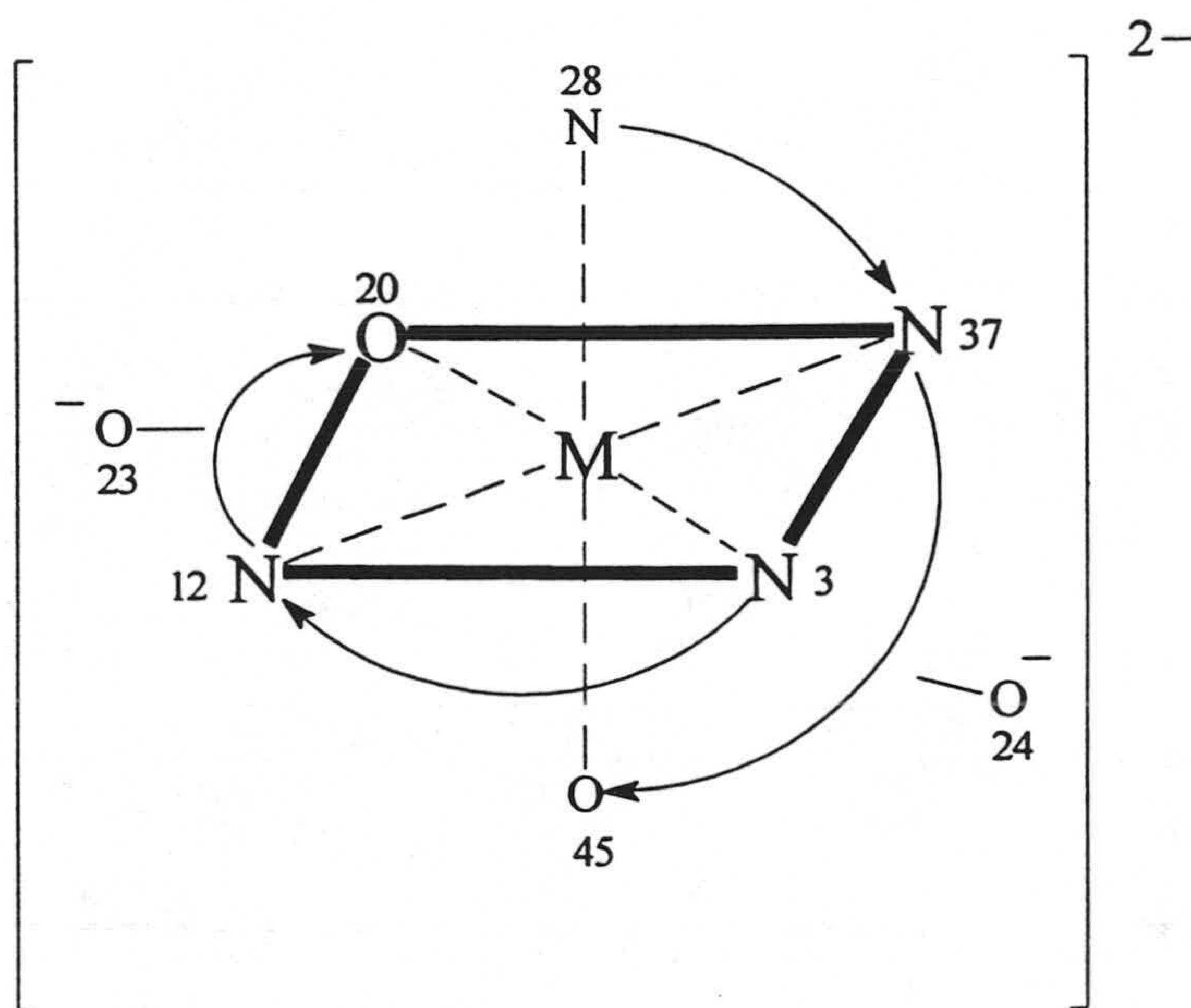


Figura VII.15. Octaedro regular. M: Zn o Cd.

Por otra parte, la distorsión encontrada en el octaedro formado en el complejo de Cd frente al octaedro regular es más pronunciada que en el caso del complejo de Zn. Así:

- Los ángulos de enlace formados por el metal y los átomos que lo rodean (N_3-M-N_{12} y N_3-M-O_{20}) se apartan más de los 90° y 180° teóricos más en el complejo de Cd que en el de Zn.

- Los valores de las distancias de enlace entre estos átomos ($N_{37}-N_3$ y $O_{20}-N_{37}$) indican que los lados del polígono están también más deformados en el complejo de Cd.

Hay que señalar finalmente que en los complejos formados (tanto de cinc como de cadmio) las dos moléculas de ligando se sitúan en planos perpendiculares, siendo los ángulos de enlace N_3MN_{28} , N_3MN_{37} y N_3MO_{45} de, aproximadamente, 90° . Este hecho queda claramente reflejado en la figura VII.16.

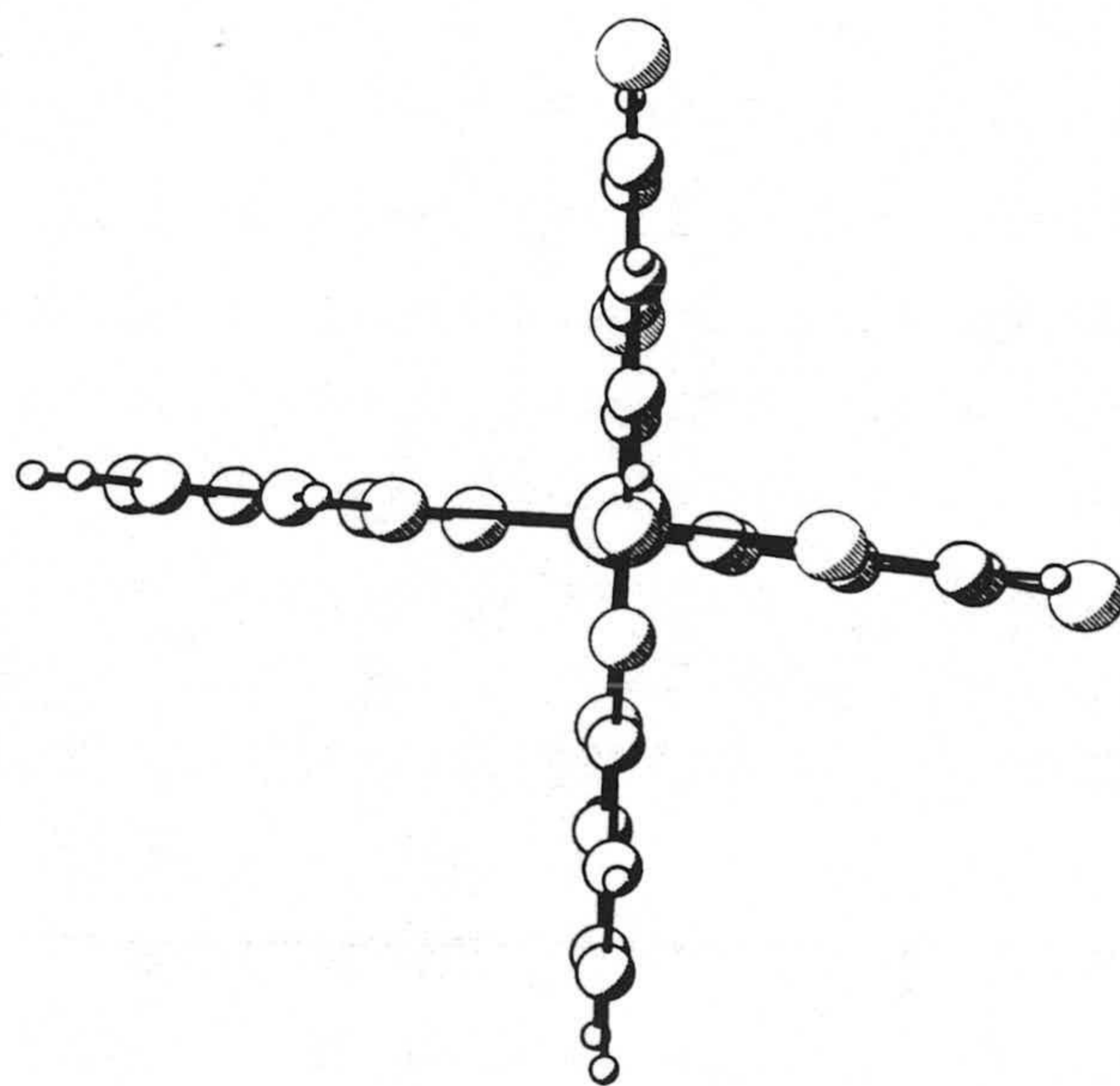
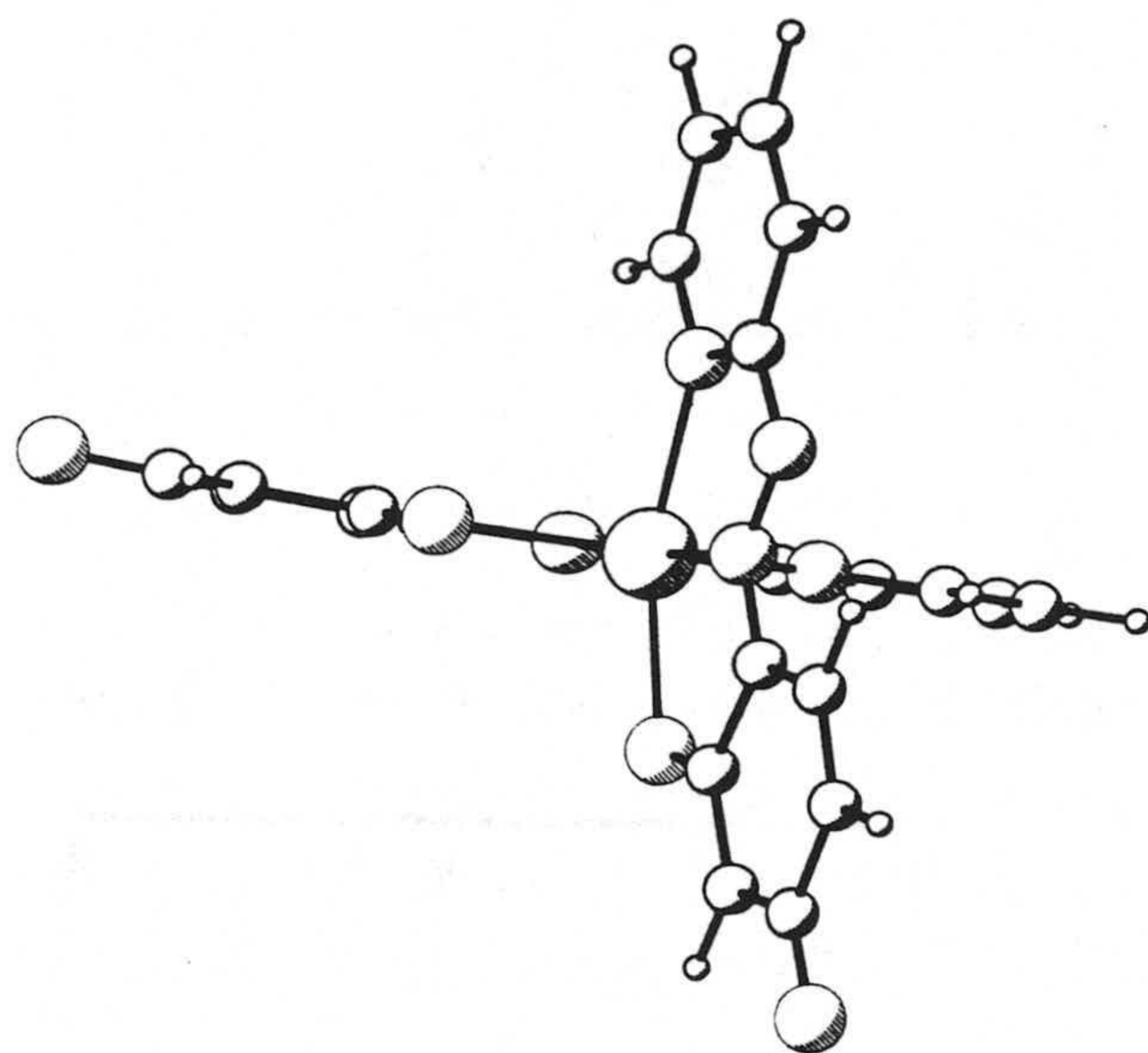


Figura VII.16. Disposición espacial del complejo ZnPAR₂.

BIBLIOGRAFÍA

- [1].- S. Shibata, "2-Pyridylazo Compounds in Analytical Chemistry", en: H.A. Flaschka, A.J. Barnard, "Chelates in Analytical Chemistry". Vol.IV, 116-164. Ed. Marcel Dekker, INC., New York, 1972.
- [2].- W.J. Geary, G. Nickless, F.H. Pollard, *Anal. Chim. Acta*, **27**, 71-79, 1962.
- [3].- A. Holme, F.J. Langmyhr, *Anal. Chim. Acta*, **36**, 383-391, 1966.
- [4].- H.E. Bent, C.L. French, *J. Amer. Chem. Soc.*, **63**, 568-572, 1941.
- [5].- F.J. Langmyhr, A. Holme, *Anal. Chim. Acta*, **35**, 220-223, 1966.
- [6].- D. Nonova, B. Evtimova, *Anal. Chim. Acta*, **62**, 456-461, 1972.
- [7].- A.E. Harvey, D.L. Manning, *J. Amer. Chem. Soc.* **72**, 4488-4493, 1950.
- [8].- J.V. Quagliano, J. Fujita, G. Franz, J.P. Philips, J.A. Walmsloy, S.Y. Tyres, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 3770-3775, 1961.
- [9].- E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl y W. Simon, "Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos" Ed. Alhambra, Madrid, 1988.
- [10].- L.F. Capitán Vallvey, C. Jiménez Linares, L. Cuadros Rodríguez, *Can. J. Chem.*, **60(13)**, 1713-1719, 1982.
- [11].- M. Siroki, Lj. Maric, Z. Stefanac, M.J. Herak, *Anal. Chim. Acta*, **75**, 101-109, 1975.
- [12].- R.G. Denning, J. Thacher, *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 5917-5918, 1968.

APÉNDICE

En este apéndice se recogen algunas gráficas correspondientes a la comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas en el estudio de la optimización de PAR y KI por el diseño Doehlert (diseño I), tanto para el cinc como para el cadmio, en los métodos propuestos para 100 mL, los espectros IR de los complejos sólidos aislados y fijados en el cambiador, el proceso de purificación de pararosanilina, así como la composición de las muestras analizadas en esta Memoria.

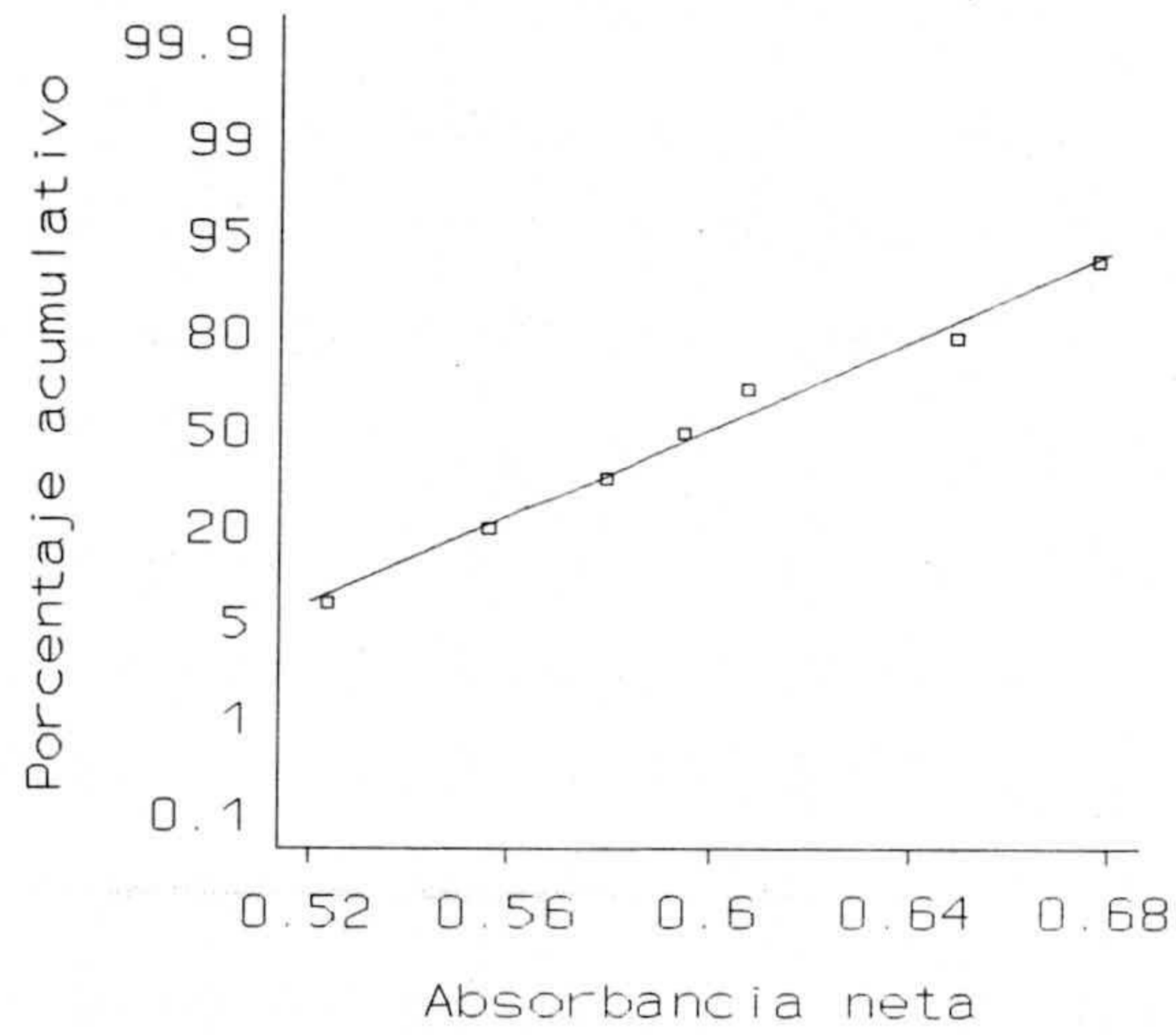


Figura A.1. Gráfica de probabilidad normal de las señales netas. Diseño Doehlert I, método de cinc (V = 100 mL).

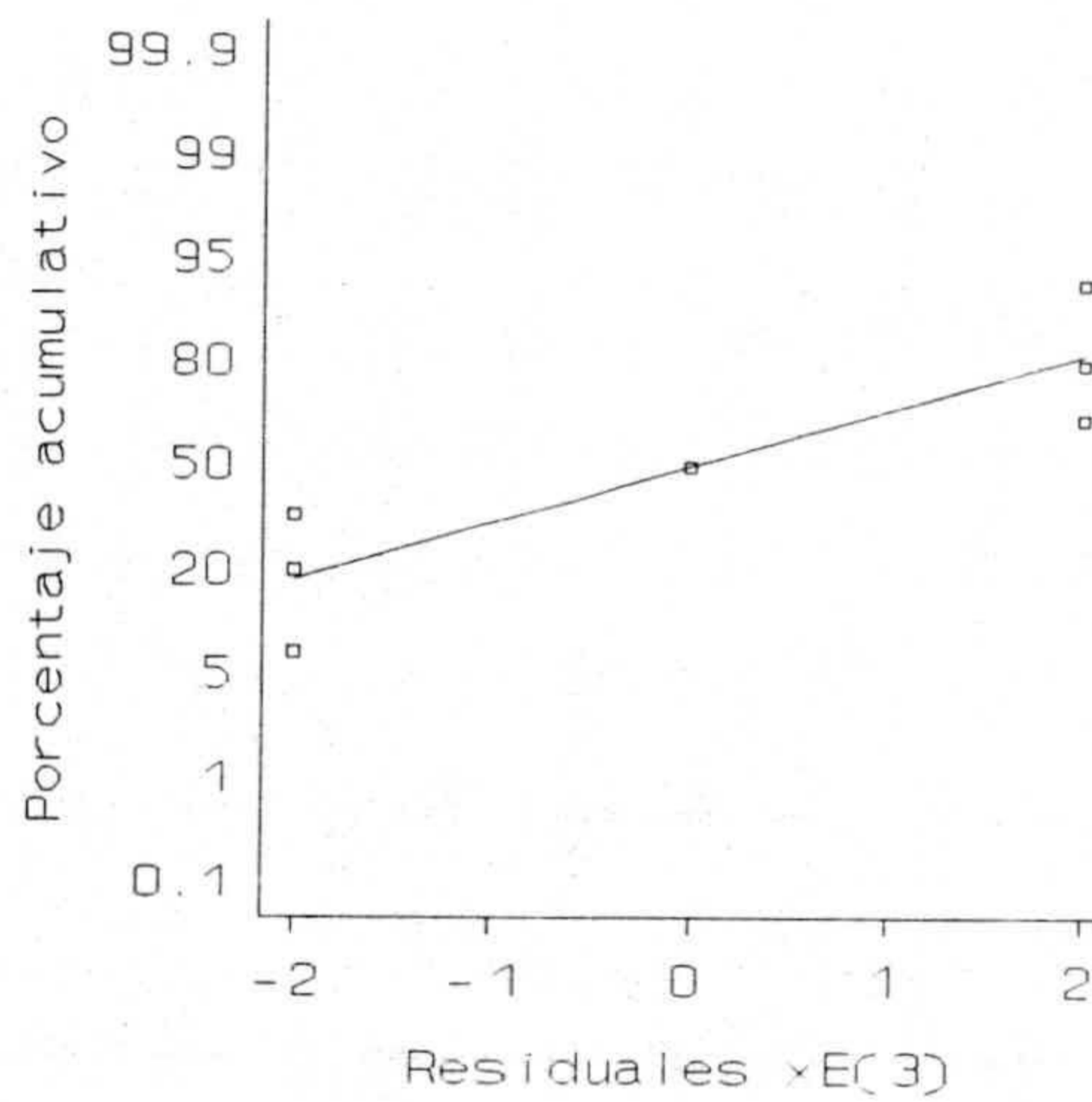


Figura A.2. Gráfica de probabilidad normal de los residuos. Diseño Doehlert I, método de cinc (V = 100 mL).

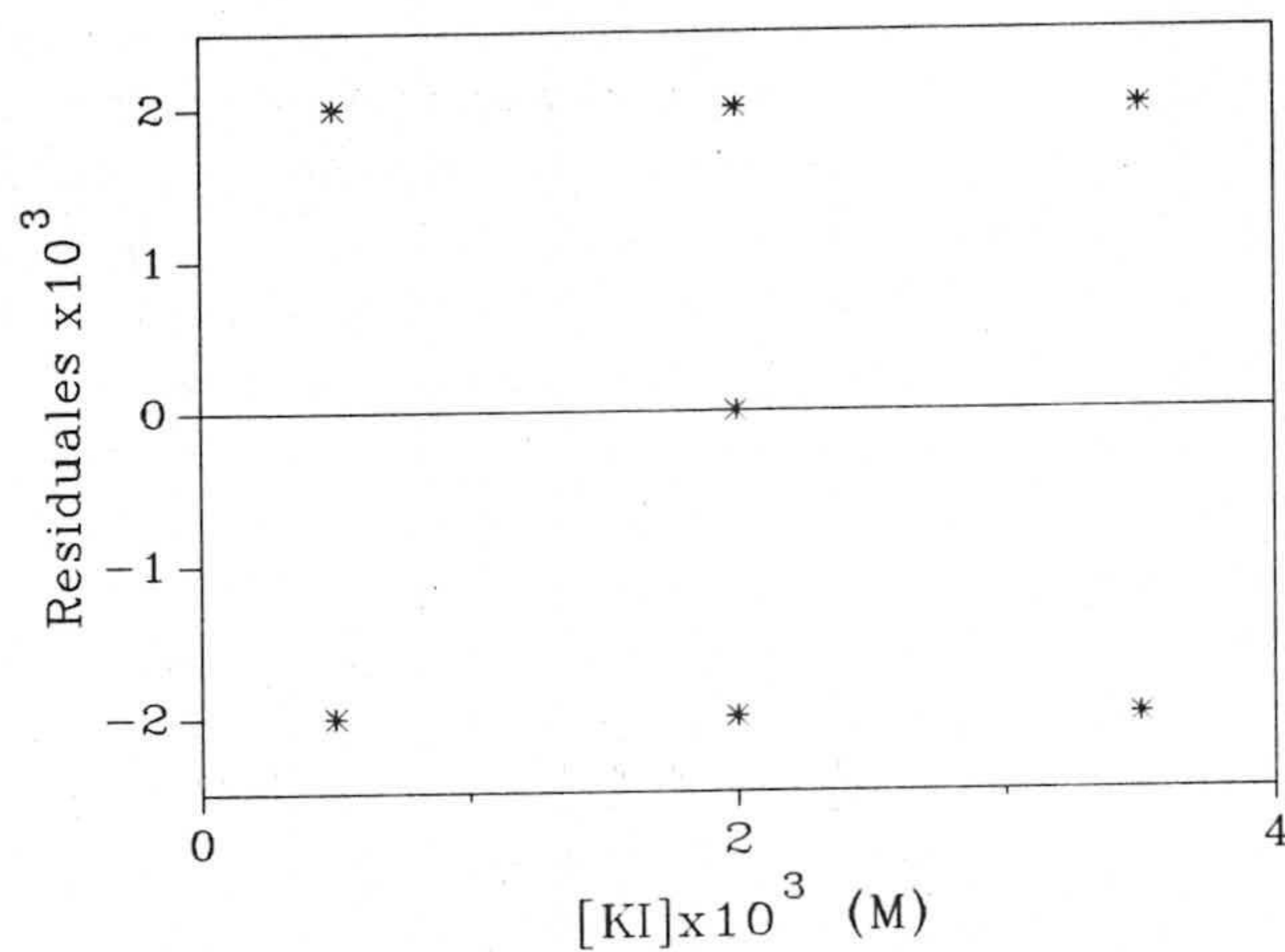


Figura A.3. Gráfica de residuos frente a la concentración de KI. Diseño Doehlert I, método de cinc (V = 100 mL).

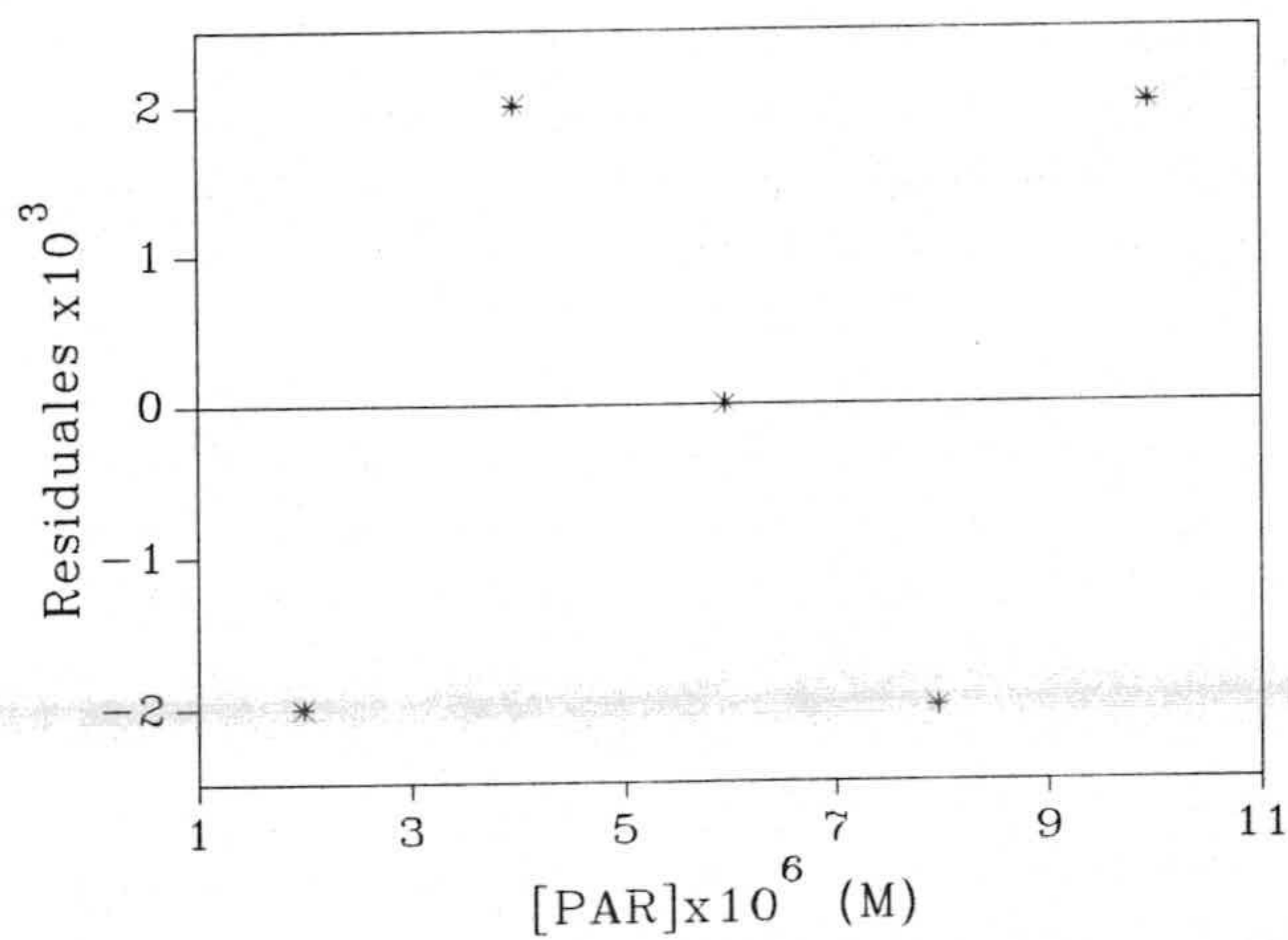


Figura A.4. Gráfica de residuos frente a la concentración de PAR. Diseño Doehlert I, método de cinc (V = 100 mL).

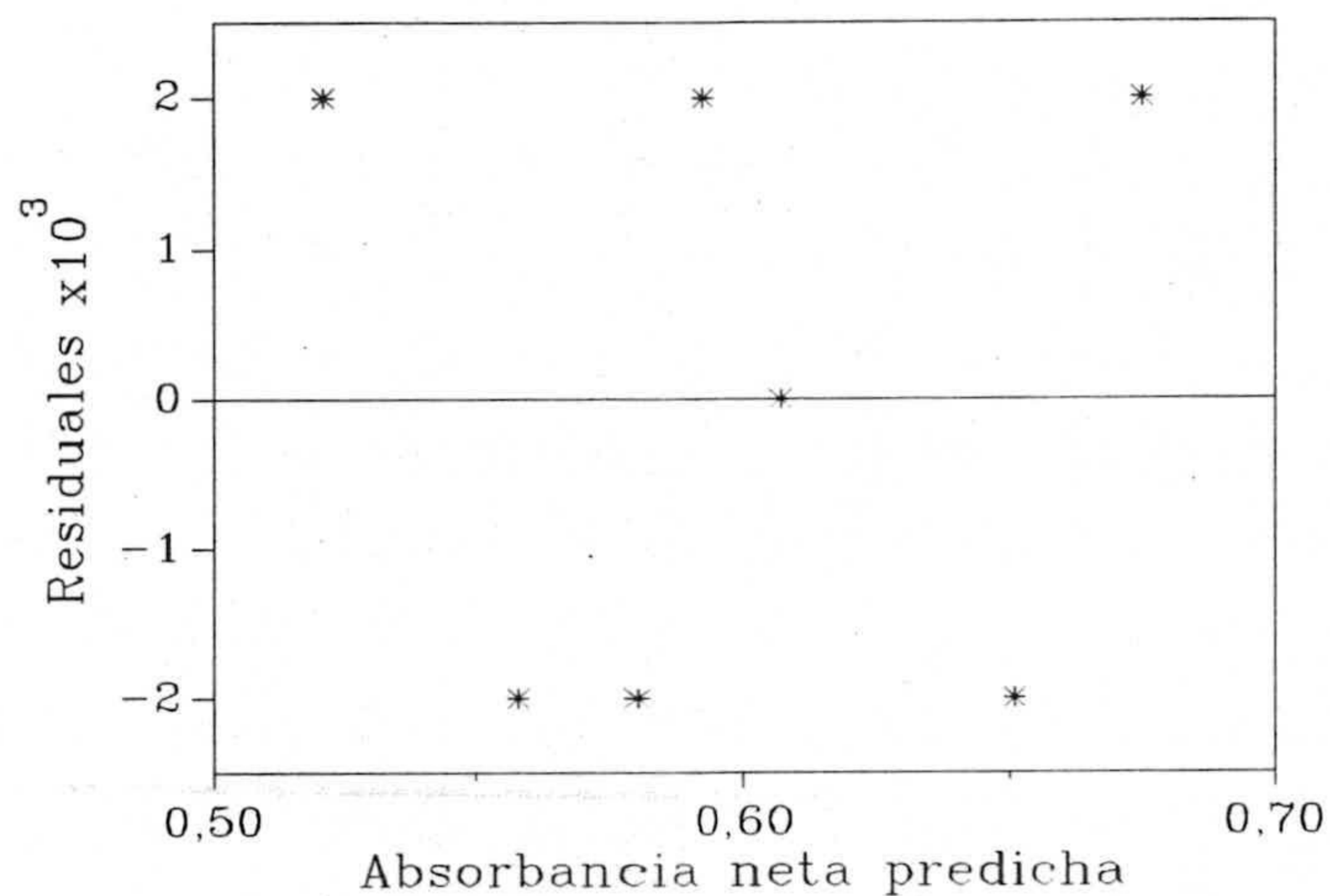


Figura A.5. Gráfica de residuos frente a las señales netas predichas. Diseño Doehlert I, método de cinc (V = 100 mL).

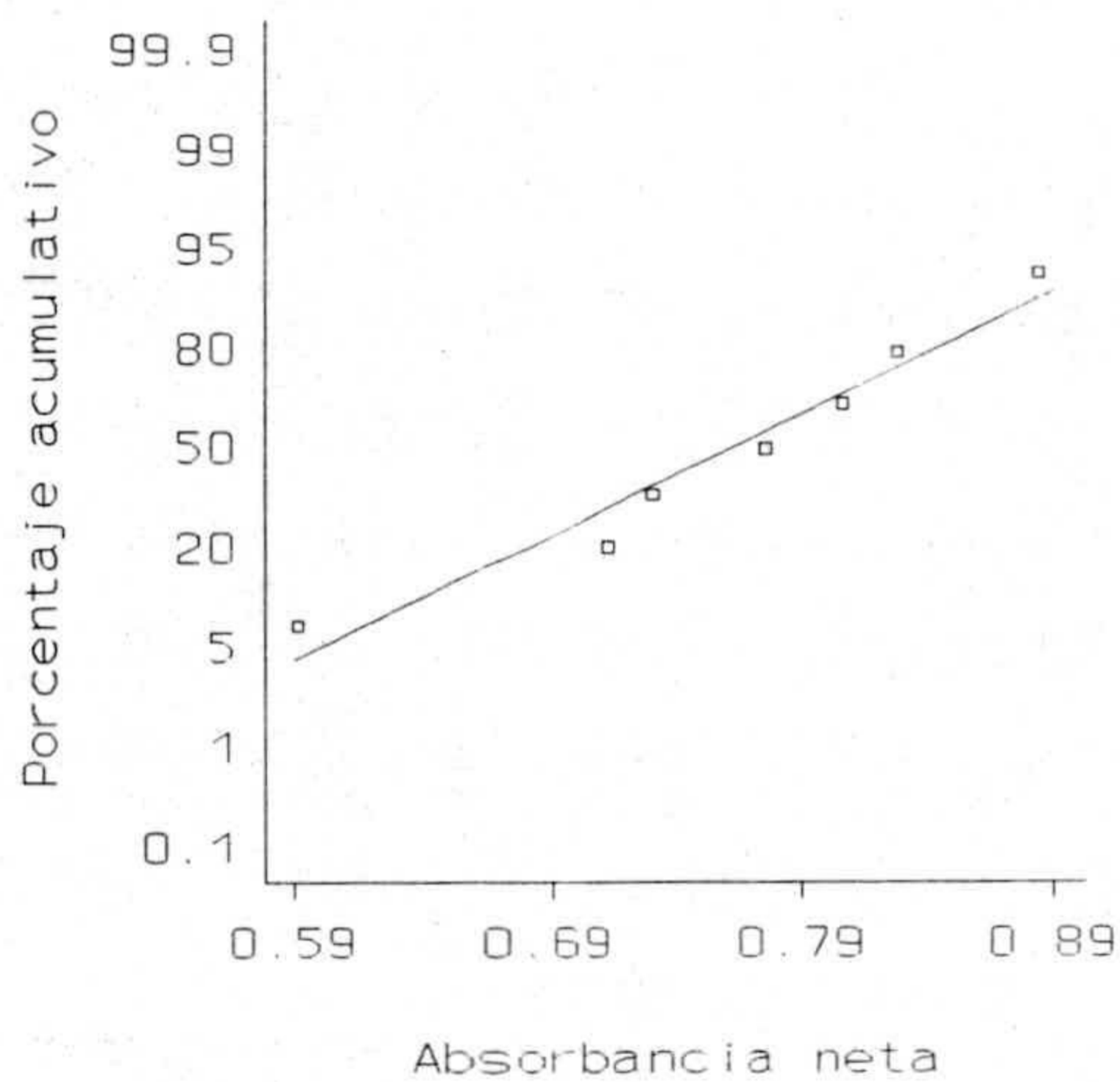


Figura A.6. Gráfica de probabilidad normal de las señales netas. Diseño Doehlert I, método de cadmio (V = 100 mL).

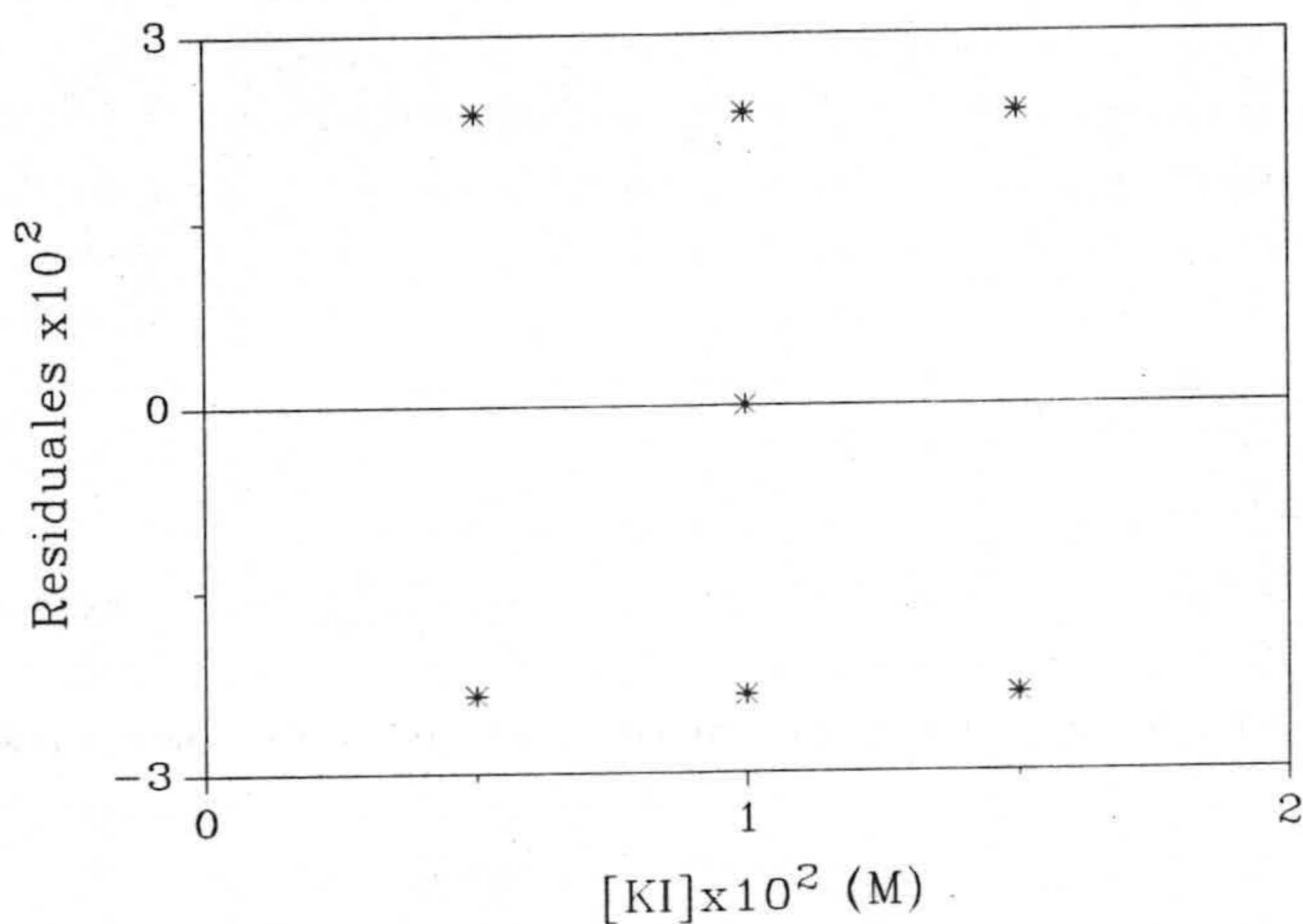


Figura A.7. Gráfica de residuos frente a la concentración de KI. Diseño Doehlert I, método de cadmio ($V = 100 \text{ mL}$).

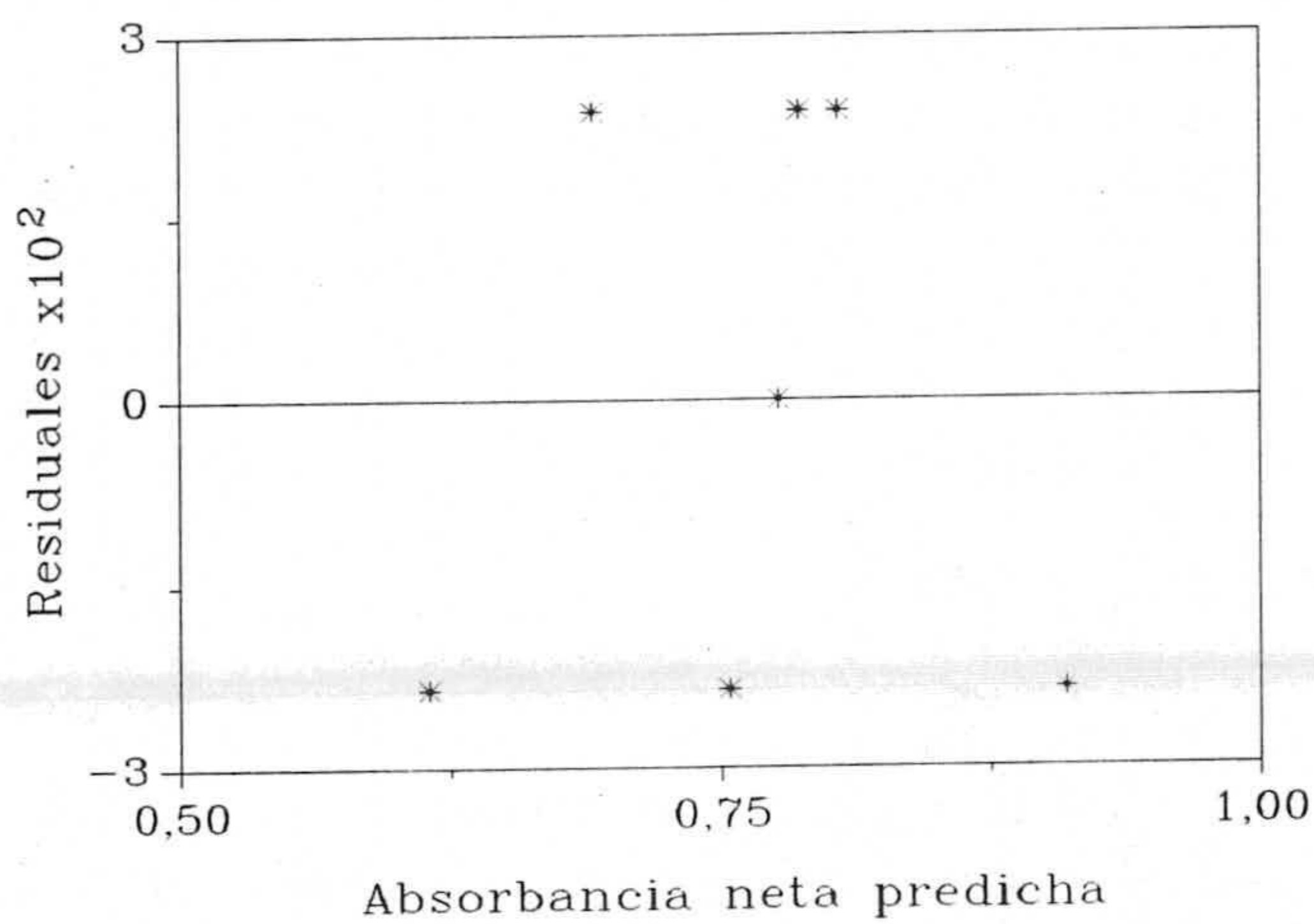


Figura A.8. Gráfica de residuos frente a las señales netas predichas. Diseño Doehlert I, método de cadmio ($V = 100 \text{ mL}$).

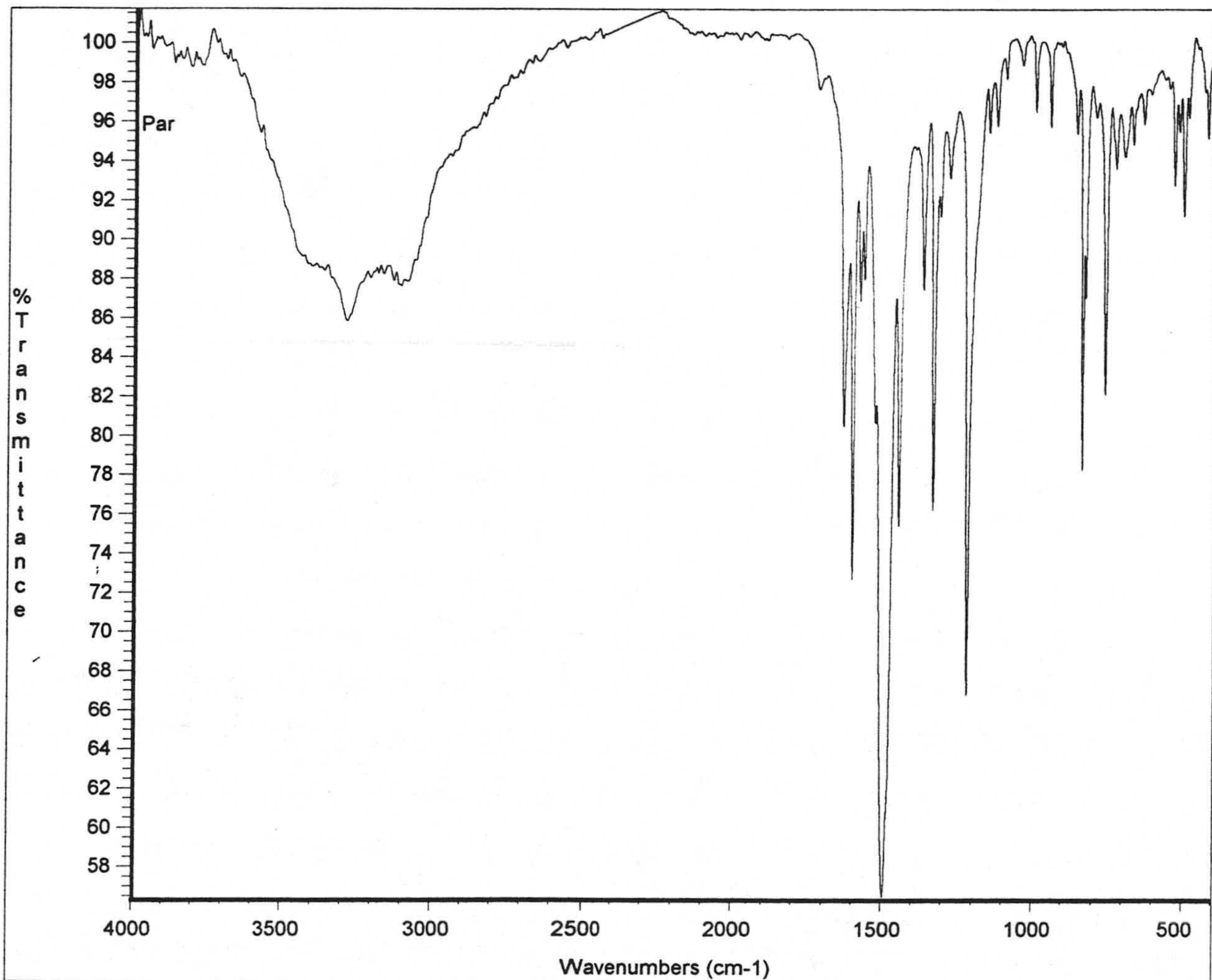


Figura A.9. Espectro IR del PAR (sal monosódica).

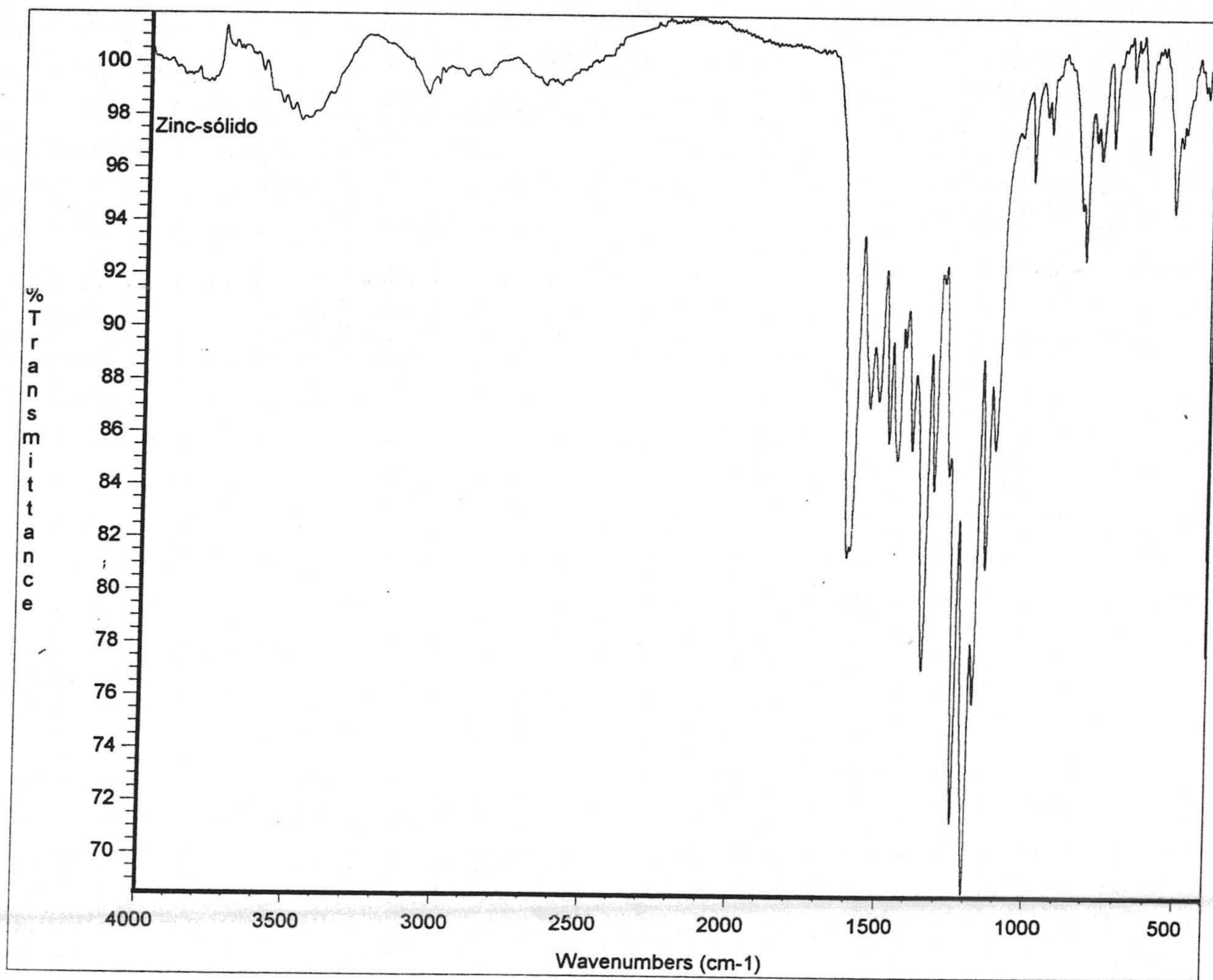


Figura A.10. Espectro IR del complejo de Zn(II).

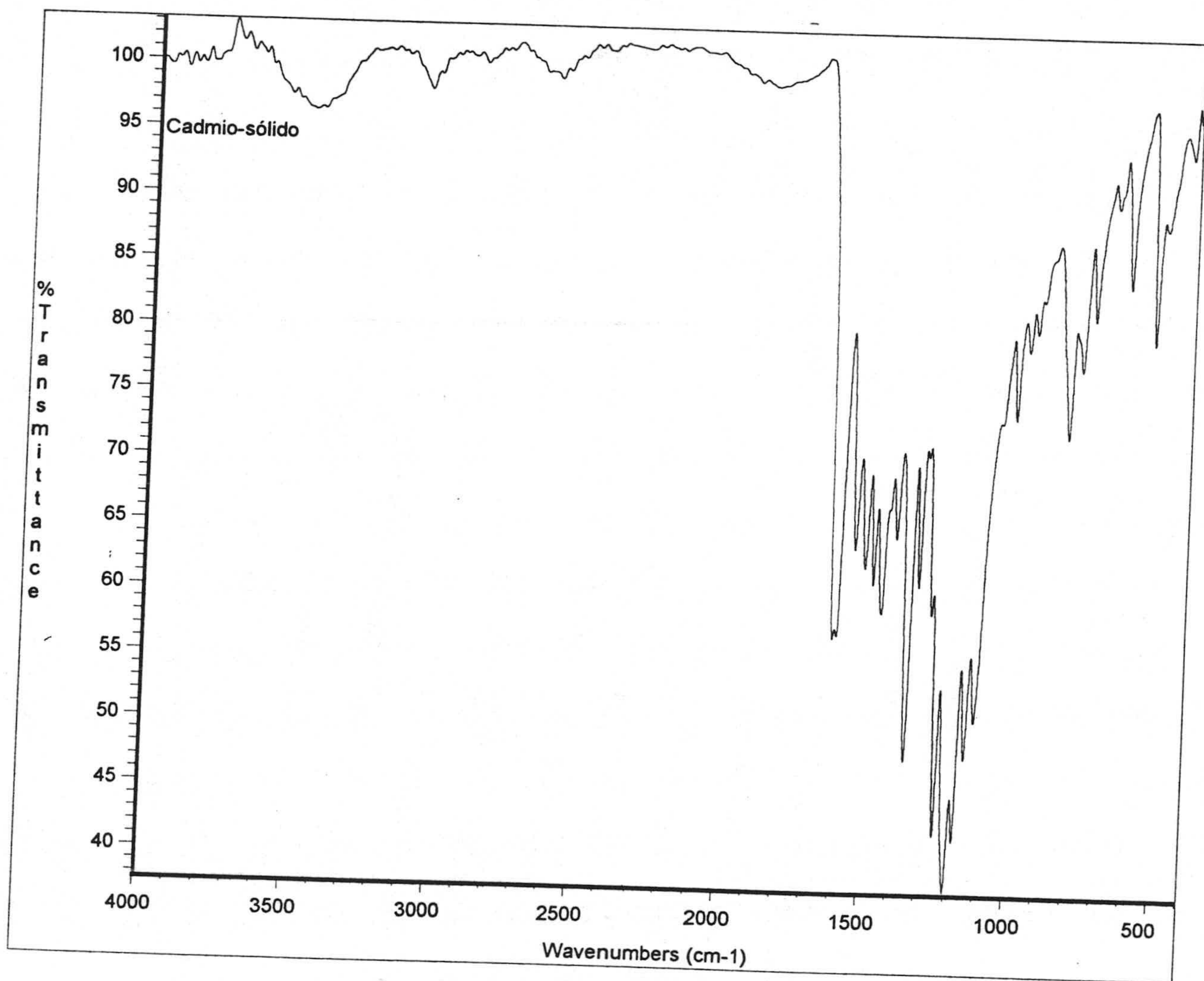


Figura A.11. Espectro IR del complejo de Cd(II).

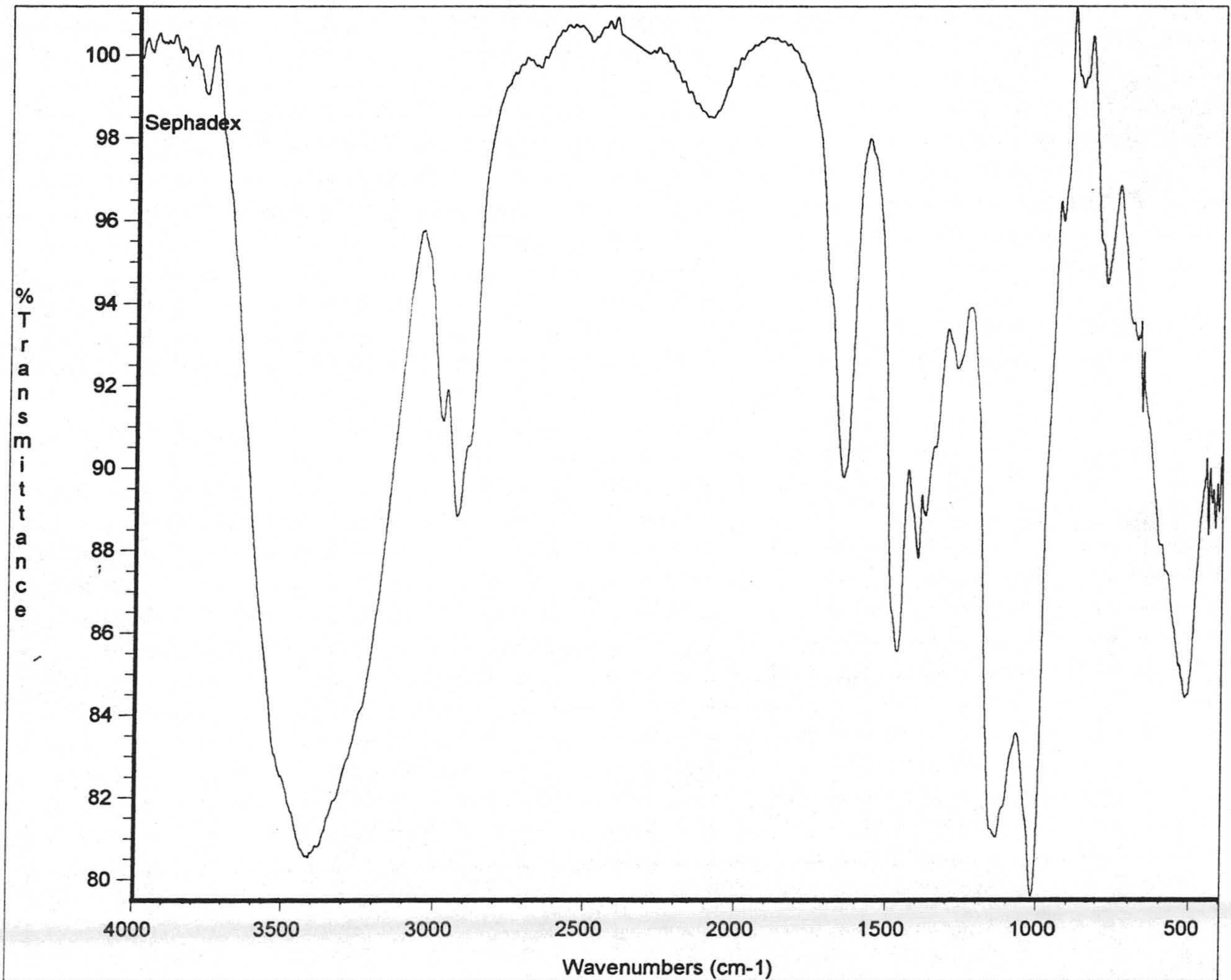


Figura A.12. Espectro IR del cambiador Sephadex QAE-A-25.

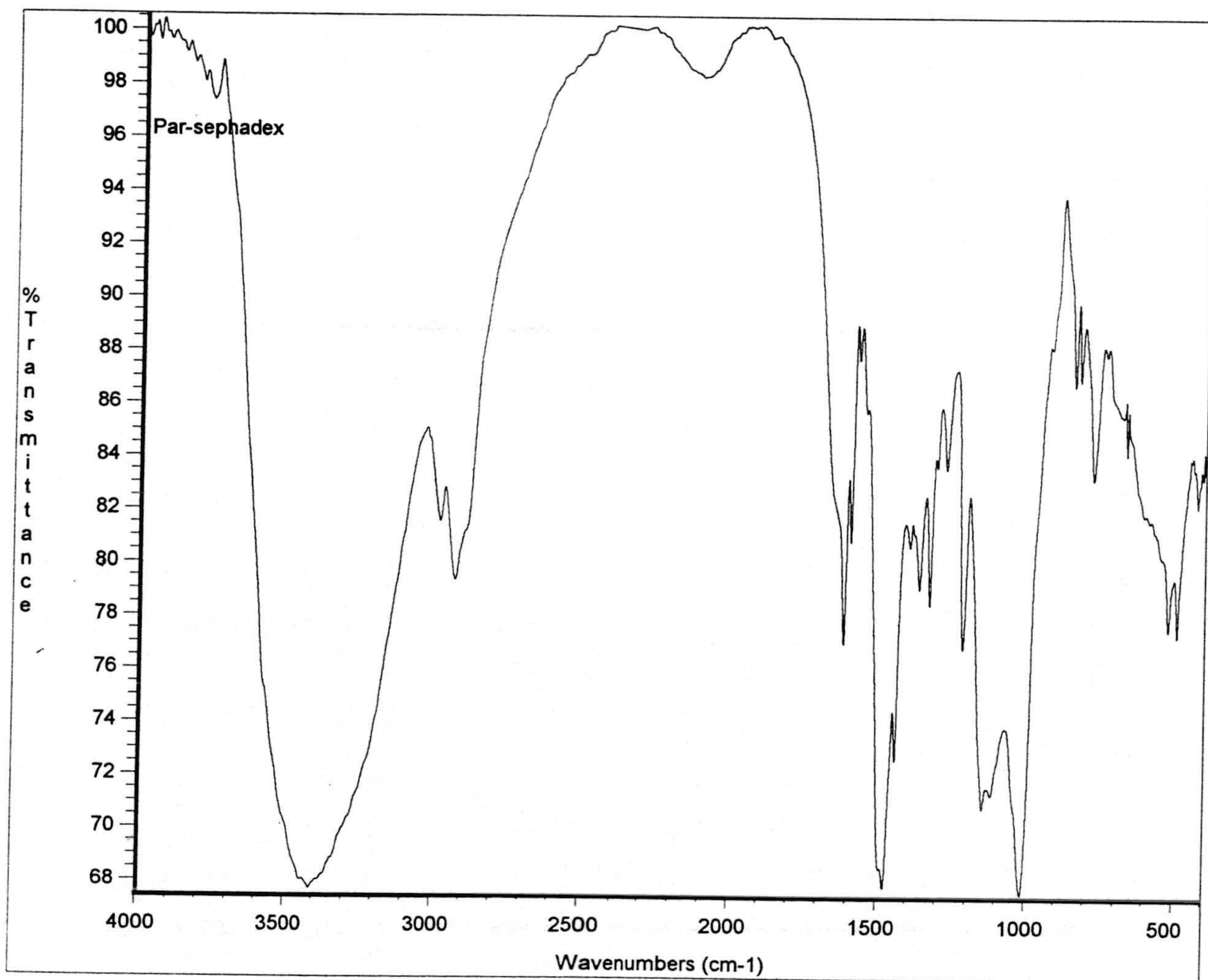


Figura A.13. Espectro IR del PAR fijado en el cambiador.

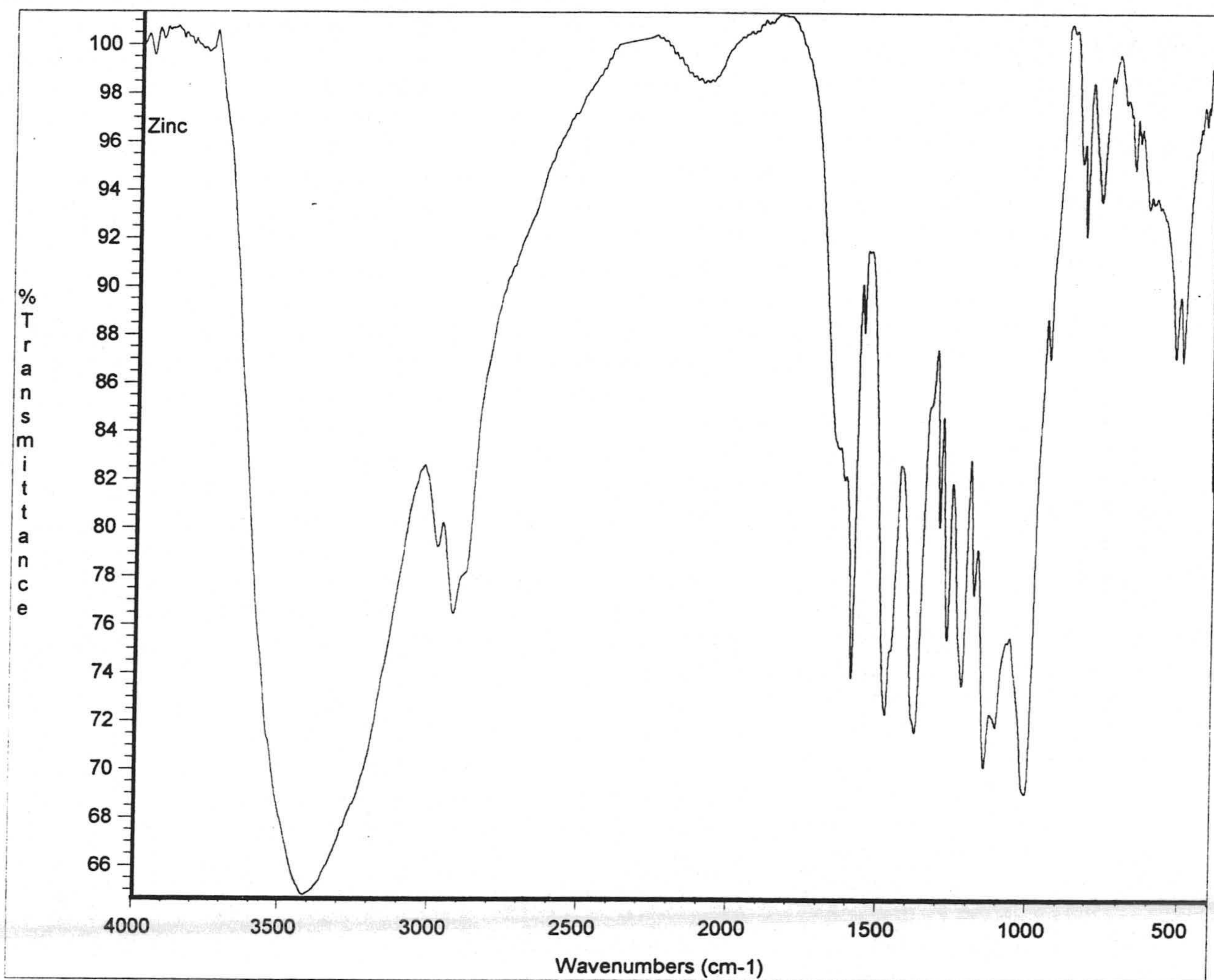


Figura A.14. Espectro IR del complejo de Zn(II) fijado en el cambiador.

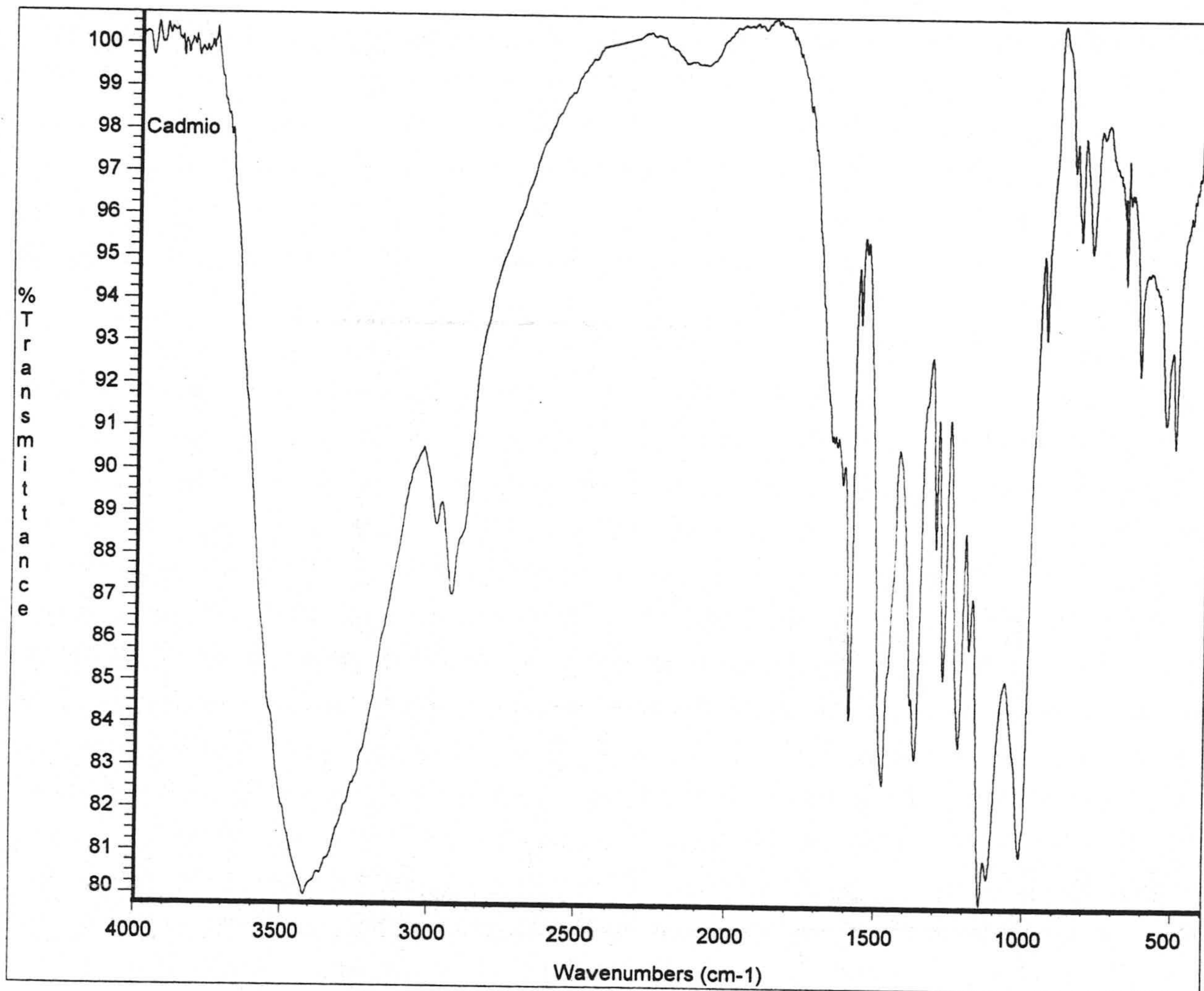


Figura A.15. Espectro IR del complejo de Cd(II) fijado en el cambiador.

1.- PURIFICACIÓN DE LA p-ROSANILINA

Debido a las impurezas que contiene el bote de este reactivo, ha sido necesario llevar a cabo una etapa de purificación de dicho reactivo según el procedimiento de Scaringelli y col. [1].

Para ello y en un embudo de decantación de 1L, se equilibraron 300 mL de Butanol-1 con otros 300 mL de HCl 1M y se separaron cada uno en un vaso de 400 mL. A continuación, se pesan 0'2 g de cloruro de p-rosanilina y se disuelven en 100 mL de HCl que ha sido equilibrado con el Butanol.

Se introduce la disolución de p-rosanilina disuelta en el HCl_{eq} en un embudo de 500 mL y se le añaden 100 mL de Butanol_{eq}. Se agita la mezcla durante 4 min. y se deja separar las fases por decantación, despreciando la fase orgánica. El proceso se repite 4 veces, añadiendo a la fase acuosa 40 mL de Butanol_{eq} y agitando durante 4 min. En todos los casos, se desprecia la fase orgánica.

Finalmente, se añaden 20 mL de Butanol_{eq} a la fase acuosa, se agita la mezcla durante 2 min. y se deja reposar. Se recoge la fase acuosa, por filtración en algodón, sin llevar ningún dilución. Se determina así la concentración de p-rosanilina (en %):

$$\% \text{ p-rosanilina} = 0'2 \%$$

2.- COMPOSICIÓN DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

En esta memoria se utilizaron varios tipos de muestras dependiendo de la determinación a realizar. Hay que señalar que en ningún momento fue necesario utilizar un tratamiento previo a las muestras analizadas.

2.1.- Muestra de agua de lluvia simulada

La muestra preparada en el laboratorio, de acuerdo con la composición del patrón SRM 2694 I [2] pero 1000 veces más concentrada, fue mantenida a pH= 4'3 y bajo refrigeración (7-8 °C). El contenido iónico del agua se recoge en la tabla A.1.

Tabla A.1. Contenido iónico del agua de lluvia simulada.

Ión	C (ppm)
F ⁻	53
Cl ⁻	212
NO ₃ ⁻	438
SO ₄ ²⁻	22
Na ⁺	196
K ⁺	50
NH ₄ ⁺	101
Ca(II)	15
Mg(II)	20

2.2.- Muestra de agua mineral

Según la reglamentación Técnico-Sanitaria del R.D 1164/1991, una agua es considerada de mineralización:

- muy débil si su contenido en residuo seco es inferior a 50 mg/L.
- débil si su contenido en residuo seco es comprendido entre 50 y 500 mg/L.

Procedente del manantial Bezoya y envasada en Ortigosa Del Monte (Segovia), ésta agua está clasificada dentro del tipo de "agua de mineralización muy débil" puesto

que la marca "Bezoya" declara en su etiqueta que su residuo seco es de 27 mg/L.

El contenido iónico del agua Bezoya aportado por el envasador, se recoge en la tabla A.2.

Tabla A.2. Contenido iónico del agua Bezoya.

Ión	C (ppm)
Ca(II)	2'7
Mg(II)	0'3
Na(I)	2'3
NO ₃ ⁻	2'8
HCO ₃ ⁻	10'2
Cl ⁻	0'4
Sílice	10'1

2.3.- Muestra de leche

La composición de la leche UHT (Under High Temperature), "RAM", elaborada por la Lacteria Española Renedo de Piélagos Cantabria y envasada en Tetra Brik, se recoge en la tabla A.3.

Tabla A.3. Composición de la leche "RAM".

Especie	C (ppm)
Hidratos de carbono	520000
Proteínas	310000
Grasas	180000
Calcio	1250
Fósforo	900
Magnesio	180
Vitamina E	10
Cinc	9
Vitamina A	0'8
Vitamina D	0'005

BIBLIOGRAFÍA

- [1].- F.P. Scaringelli, B.E. Saltzman, S.A. Frey, *Anal. Chem.*, **39**, 1709-1719, 1967.
[2].- W.F. Koch, G. Marinenko, R.C. Paule, *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, **91**, 33-41, 1986.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

Primera:

Se ha comprobado la utilidad de la Espectrofotometría en fase sólida para la determinación de sulfito en agua de lluvia en base a su reacción con p-rosanilina y formaldehído en medio ácido.

1.1. Tras seleccionar la resina Dowex 1x8 como soporte adecuado para la fijación del producto de reacción, el ácido p-rosanilinmetilsulfónico, se han estudiado las condiciones más favorables para llevar a cabo la reacción. En dichas condiciones, el espectro de absorción en fase sólida del compuesto muestra un solo máximo de absorción a 565 nm, destacando la escasa absorbancia del blanco.

1.2. Los resultados obtenidos nos han permitido proponer una nueva metodología EFS para la determinación de sulfito que, en función del tamaño de grano de la resina utilizada, presenta una doble alternativa para su aplicación. La tabla siguiente recoge los parámetros de fiabilidad obtenidos empleando las técnicas quimiométricas apropiadas.

Parámetros analíticos	Resina Dowex 1X8	
	100-200 mallas	200-400 mallas
Rango de concentración (ppb)	3'8-65'0	2'7-50'0
Término independiente	0'0648	0'1723
Sensibilidad (ppb ⁻¹)	0'016	0'031
Límite de detección (ppb)	1'2	0'8
DER (%)	3'6	1'7
Linealidad "on-line" (%)	99'2	99'7

1.3. Los estudios llevados a cabo sobre agua de lluvia simulada nos han permitido comprobar la influencia de la matriz sobre la absorbancia desarrollada y obtener conclusiones de tipo práctico acerca del muestreo y de la estabilidad del sulfito durante y después de la toma de muestra. Los porcentajes de recuperación alcanzados en agua de lluvia simulada son satisfactorios.

1.4. El método propuesto presenta mejor linealidad y menor desviación estándar relativa, en todo el rango de concentraciones, que el método en disolución basado en la misma reacción. Es más sensible, e igualmente veraz. Ha sido aplicado con éxito a la determinación de sulfito en muestras reales de agua de lluvia, recogidas en condiciones previamente establecidas y sobre morfina para estabilizar el analito. También ha sido aplicado a muestras de agua mineral.

Segunda:

Las reacciones de complejación entre el 4-(2-piridilazo)resorcinol y los iones Zn(II) y Cd(II) han permitido proponer nuevos métodos espectrofotométricos en fase sólida para la determinación de dichos iones.

Para la optimización de algunas de las variables experimentales de los sistemas se han aplicado diseños de Doehlert, demostrándose que éstos poseen una estructura adecuada para dicho propósito.

2.1. Se ha comprobado que los complejos se fijan más intensa y rápidamente sobre Sephadex QAE-A-25 que sobre los demás soportes ensayados y que, en condiciones óptimas de pH y de concentración de reactivos, muestran máximos de absorción a 500 nm, el complejo de cinc, y a 504 nm, el de cadmio. Por razones de selectividad y para disminuir la absorbancia del blanco, estos estudios se han llevado a cabo en presencia de yoduro potásico. Por otra parte, la fijación de los complejos en la fase sólida genera un gran aumento en la sensibilidad de la reacción, con respecto a la desarrollada en disolución.

2.2. La utilización de la metodología de los diseños de Doehlert ha permitido obtener la función que relaciona la absorbancia con las concentraciones de PAR y de KI, en ambos sistemas. El análisis de las funciones de respuesta ha proporcionado los valores óptimos de dichas variables. Además, se han estimado las superficies de respuesta correspondientes.

Se puede concluir que el empleo de esta metodología de optimización basada en diseños experimentales multidimensionales (con un pequeño número de experimentos) es especialmente adecuada para la EFS.

2.3. Mediante técnicas quimiométricas se han obtenido los parámetros de fiabilidad de los métodos propuestos que se recogen en las tablas siguientes. Los estudios de robustez, llevados a cabo usando diseños factoriales, indican que los dos métodos analíticos son robustos para modificaciones del 10 o 5% de los valores óptimos de la mayor parte de las variables experimentales.

Parámetros analíticos	Método para cinc
Rango de concentración (ppb)	1'1-7'8
Término independiente	0'6161
Sensibilidad (ppb ⁻¹)	0'1427
Límite de detección (ppb)	0'3
DER (%)	2'1
Linealidad "on-line" (%)	98'8

Parámetros analíticos	Método para cadmio
Rango de concentración (ppb)	5'1-31'2
Término independiente	0'5461
Sensibilidad (ppb ⁻¹)	0'0491
Límite de detección (ppb)	1'5
DER (%)	4'9
Linealidad "on-line" (%)	98'8

2.4. Se ha estudiado sistemáticamente el efecto producido por la presencia de especies potencialmente interferentes en la determinación de los dos analitos. Los métodos EFS propuestos para la determinación de los iones Zn(II) y Cd(II) se han aplicado a muestras sintéticas, a distintos tipos de aguas y a leche, obteniéndose en todos los casos buenos resultados. Finalmente, ambos métodos han sido validados mediante métodos de referencia o utilizando la metodología de adición de patrón.

Tercera:

El uso de la Espectrofotometría derivada en fase sólida, que consigue diferenciar señales solapadas de compuestos fijados en el soporte, nos ha permitido proponer un nuevo método para la determinación simultánea de cinc y cadmio, sin etapa de separación previa alguna.

3.1. Se han optimizado las variables químicas del sistema para obtener la máxima absorbancia de los complejos de ambos iones de forma simultánea, y las variables instrumentales para conseguir la diferenciación de ambas señales, mediante la obtención de los espectros derivados.

3.2. Eligiendo la segunda derivada como la más resolutive y las longitudes de onda de medida obtenidas mediante la técnica de "zero-crossing", se ha propuesto un nuevo método para la determinación simultánea de los dos iones, cuyas características analíticas se recogen a continuación:

Parámetros analíticos	Valor	
	Zn(II)	Cd(II)
Longitud de onda de medida (nm)	${}^2D_{540'5}$	${}^2D_{537'2}$
Rango de concentración (ppb)	0'6-11'8	1'1-20'3
Término independiente	$7'22 \times 10^{-3}$	$-8'32 \times 10^{-3}$
Sensibilidad (ppb ⁻¹)	$9'97 \times 10^{-3}$	$6'74 \times 10^{-3}$
Límite de detección (ppb)	0'2	0'3
DER (%)	4'6	6'0
Linealidad "on-line" (%)	97'0	97'5

3.3. El método propuesto se ha aplicado a la determinación de cinc y cadmio en muestras de agua mineral, con cadmio adicionado, con resultados satisfactorios. La validación se realizó mediante la metodología de adición de patrón.

Cuarta:

Se han llevado a cabo estudios para establecer la naturaleza de los complejos involucrados en los métodos analíticos de Espectrofotometría en fase sólida propuestos para la determinación de Zn(II) y de Cd(II) mediante 4-(2-piridilazo)resorcinol.

4.1. Se ha estudiado la estequiometría de los complejos Zn(II)-PAR y Cd(II)-PAR fijados en la fase sólida, resultando ser 1:2 en ambos casos. Asimismo, se ha comprobado, para el cinc, la liberación de dos protones por mol de complejo formado y fijado en el soporte y por tanto es posible proponer una fórmula ML_2^{2-} para dichos

complejos, en donde L es el PAR con los dos grupos hidroxilo desprotonados. Las cargas residuales permiten la fijación de los complejos sobre los grupos de cambio del Sephadex QAE. Por otra parte, los iones I^- no forman parte de dichos complejos.

4.2. Se han aislado los complejos sólidos que forma el 4-(2-piridilazo)resorcinol con los iones $Zn(II)$ y $Cd(II)$. Tras la identificación de dichos complejos y el estudio de algunas de sus propiedades, con ayuda de las técnicas instrumentales habituales, se ha comprobado que ambos responden a una fórmula $M(PAR)_2 \cdot H_2O$. El PAR actúa como ligando tridentado enlazándose al ión metálico por el nitrógeno piridínico, por uno de los nitrógenos del grupo azo (el más lejano al anillo heterocíclico) y por el grupo o-hidroxilo previamente desprotonado.

4.3. Se propone una estructura octaédrica distorsionada para los complejos en estudio, en base a los resultados anteriores. Esta propuesta viene reforzada por los estudios de orbitales moleculares realizados sobre las moléculas de los complejos usando un modelo semiempírico diseñado para metales de transición, PM3(tm).

Es de destacar, que en los complejos formados las dos moléculas de ligando se sitúan en planos prácticamente perpendiculares y que la distorsión encontrada en el complejo de cadmio frente al octaedro regular es más pronunciada que en el complejo de cinc.