

La determinación del tiempo de vida media del estado excitado la hemos realizado a varias temperaturas: 4, 10, 15, 20 y 25°C.

La muestra se ha preparado operando sobre una disolución que en un volumen final de 500 mL, contenía 3 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L⁻¹ y agua bidestilada hasta el enrase.

Esta disolución se transfirió a un frasco de polietileno y se añadieron 3 mL de disolución etanólica de morina 1.5x10⁻³%, la cantidad de NaOH necesaria para la obtención de un pH = 11.50 y 100 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Tras agitar durante 30 minutos, se filtró la disolución, transfiriéndose la resina a la cubeta de 1 mm.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 457$ nm, $\lambda_{em} = 525$ nm, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 1.3 y temperatura variable.

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla IV.5 y se han representado graficamente en las figuras IV.15, IV.16, IV.17, IV.18 y IV.19.

Tabla IV.5. Tiempo de vida media

		tx10 ³ (s)			
		0.01	0.02	0.03	0.04
T _a = 4°C	IFR	606.46	92.38	9.38	1.54
	ln IFR	6.41	4.53	2.24	0.43
.....					
T _a = 10°C	IFR	547.84	81.61	8.84	1.31
	ln IFR	6.30	4.40	2.18	0.27
.....					
T _a = 15°C	IFR	534.00	79.46	8.54	1.46
	ln IFR	6.28	4.37	2.14	0.38
.....					
T _a = 20°C	IFR	534.10	76.15	8.23	1.07
	ln IFR	6.28	4.33	2.11	0.07
.....					
T _a = 25°C	IFR	518.84	75.84	6.84	-0.15
	ln IFR	6.25	4.33	1.92	—

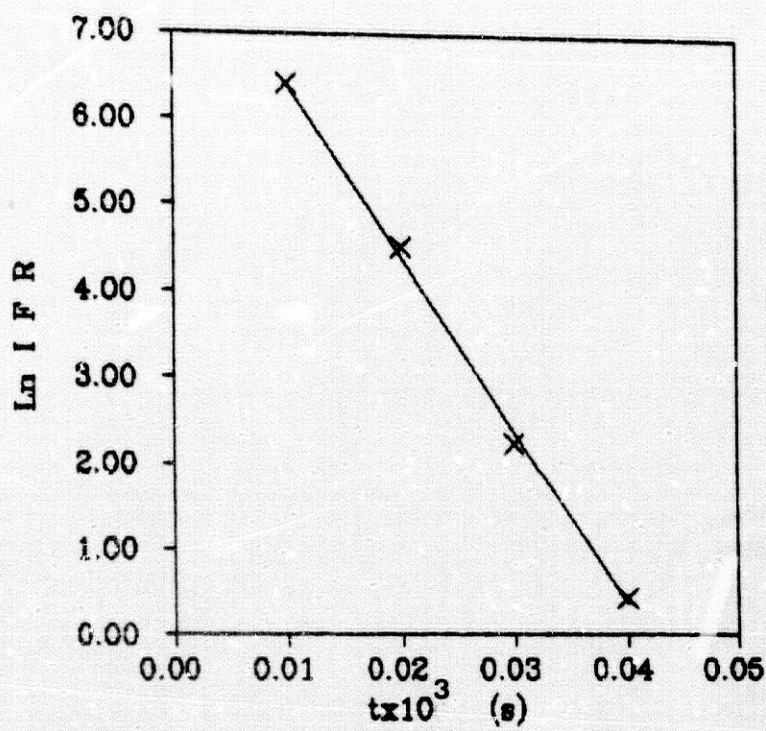


Figura IV.15. Tiempo de vida media. $T_a = 4^\circ\text{C}$.

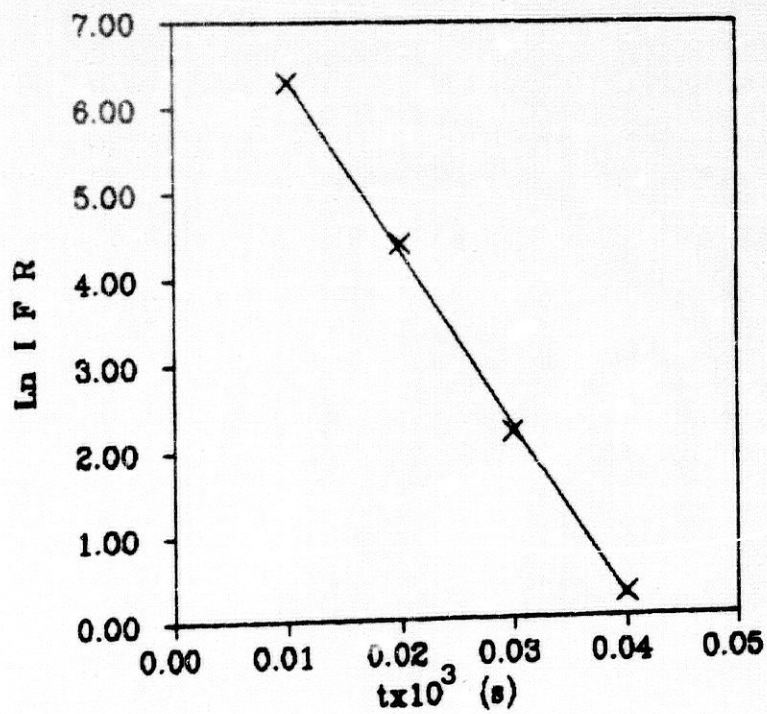


Figura IV.16. Tiempo de vida media. $T_a = 10^\circ\text{C}$.

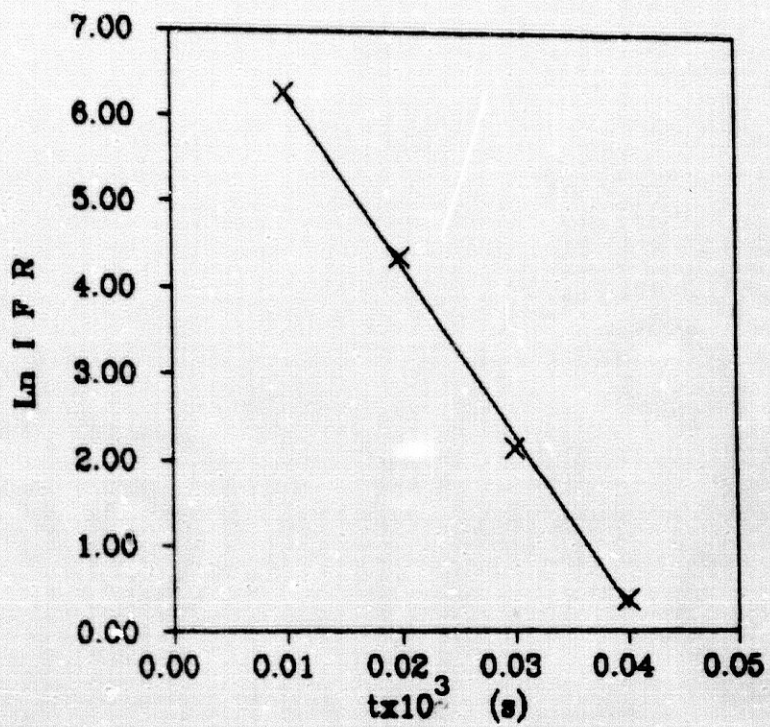


Figura IV.17. Tiempo de vida media. $T^a = 15^\circ\text{C}$.

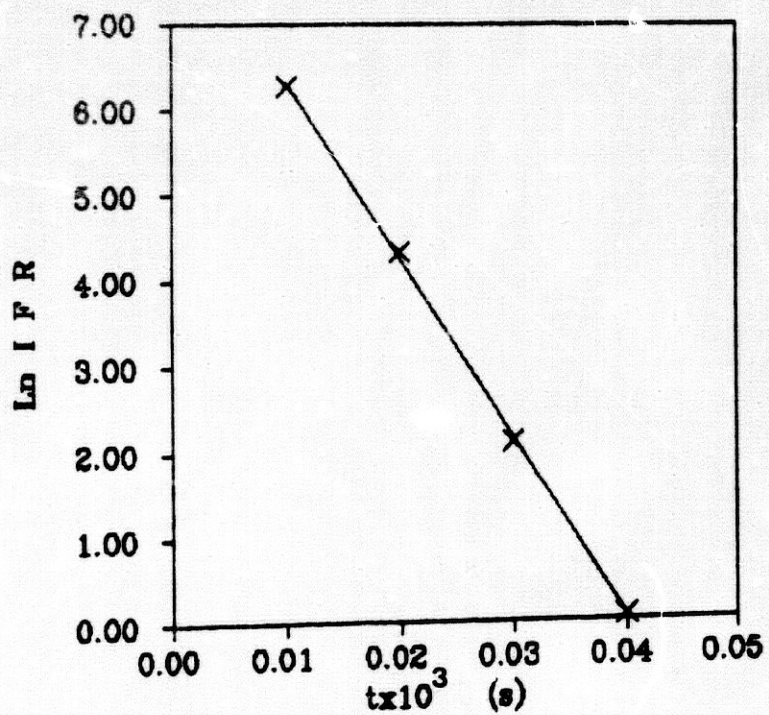
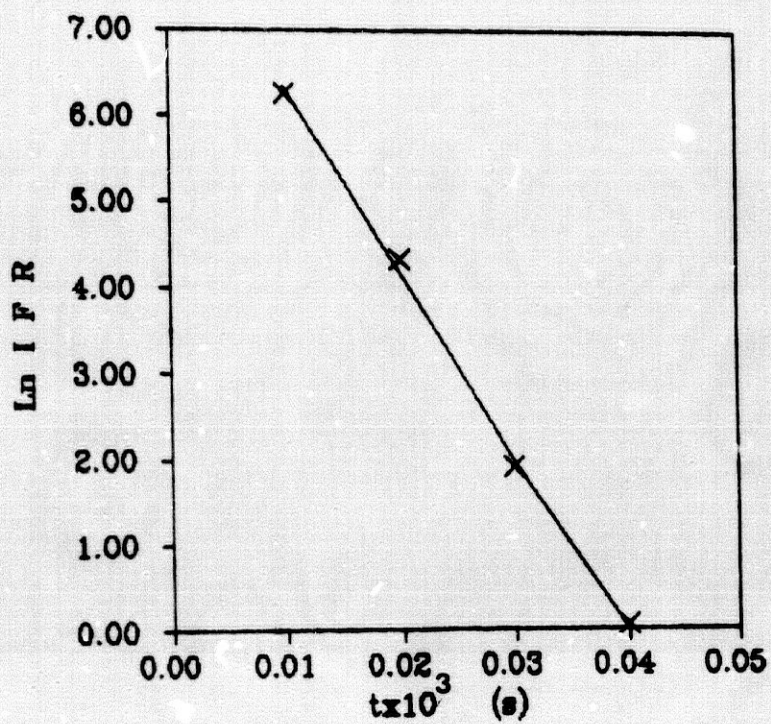


Figura IV.18. Tiempo de vida media. $T^a = 20^\circ\text{C}$.



De las anteriores figuras se deducen unos valores de τ , que se indican en la tabla IV.6.

Tabla IV.6. Tiempo de vida media a diferentes temperaturas

$\tau \times 10^6$ (s)	T° ($^{\circ}C$)
4.94	4
4.92	10
5.02	15
4.80	20
4.62	25

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

OPTIMIZACION DE VARIABLES

IV.7.1. INFLUENCIA DEL pH

La fluorescencia del complejo Be(II)-morina en disolución es máxima en medio fuertemente básico. Por ello se emplea en la mayoría de los estudios, NaOH a diferentes concentraciones (35,157,160,163). El estudio cualitativo de la fijación del complejo en cambiadores iónicos muestra también que el medio básico (NaOH) favorece la fluorescencia del mismo, por ello se inicia el estudio de la influencia del medio básico mediante el empleo de un tampón adecuado en la zona fuertemente básica donde el complejo desarrolla con más intensidad su fluorescencia.

IV.7.1.1. Elección del tampón

Ante la necesidad de tamponar el sistema en estudio, se ha realizado una experiencia encaminada a conocer la influencia del pH, fijado éste mediante la adición de las cantidades adecuadas de una disolución reguladora. Se han seleccionado aquellas que se emplean más a menudo para el estudio de éste sistema en disolución (tampón piperidina, NaOH 0.1 N, tampón fosfato). Los mejores resultados se obtuvieron con la disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$.

IV.7.1.2. Estudio del pH

Para realizar el estudio de la influencia del pH sobre la intensidad de fluorescencia del sistema, se preparó una serie de matraces aforados de 500 mL en los que se introdujeron 1 mL de disolución de Be(II) de 0.5 mg.L^{-1} y se enrasó con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 5 mL de disolución etanólica de morina $2 \times 10^{-3} \%$, 25 mL de disolución reguladora $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH comprendido entre 10.90 y 12.00 y 100 mg de resina QAE Sephadex A-25. La proporción de etanol en todos los casos es de $10^{-4}\%$.

Se prepararon los correspondientes blancos, que contenían los mismos reactivos pero sin berilio, y se sometió al mismo tratamiento.

Después de una agitación de 20 minutos, tiempo fijado arbitrariamente aunque considerado suficiente, se filtraron las disoluciones, se llenaron las cubetas y se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendijas de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.15 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.7 y se han representado graficamente en la figura IV.20. El pH de la disolución acuosa se determinó en todos los casos coincidiendo practicamente con el valor del pH de la disolución reguladora empleada en cada caso.

Tabla IV.7. Influencia del pH

pH	%IFR _(F)	%IFR _(B)	%ΔIFR
10.98	135.0	88.8	46.2
11.20	146.9	88.7	58.2
11.36	156.3	88.8	67.5
11.50	162.4	89.1	73.3
11.60	163.8	89.4	74.4
11.74	163.5	89.4	74.1
11.85	170.0	94.3	75.7
11.93	169.6	95.7	73.9
12.00	171.0	96.7	74.3

La observación de la figura IV.20, nos muestra un incremento de la diferencia de intensidad de fluorescencia hasta un pH de 11.40, siendo el intervalo óptimo para la formación y fijación del complejo el comprendido entre 11.40 y 12.00. Para futuras experiencias se ha escogido el valor de 11.50 como el pH óptimo de trabajo, empleando una disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ (0.4 M).

En la tabla IV.7, se puede apreciar una dependencia de la intensidad de fluorescencia de los blancos con el pH del medio.

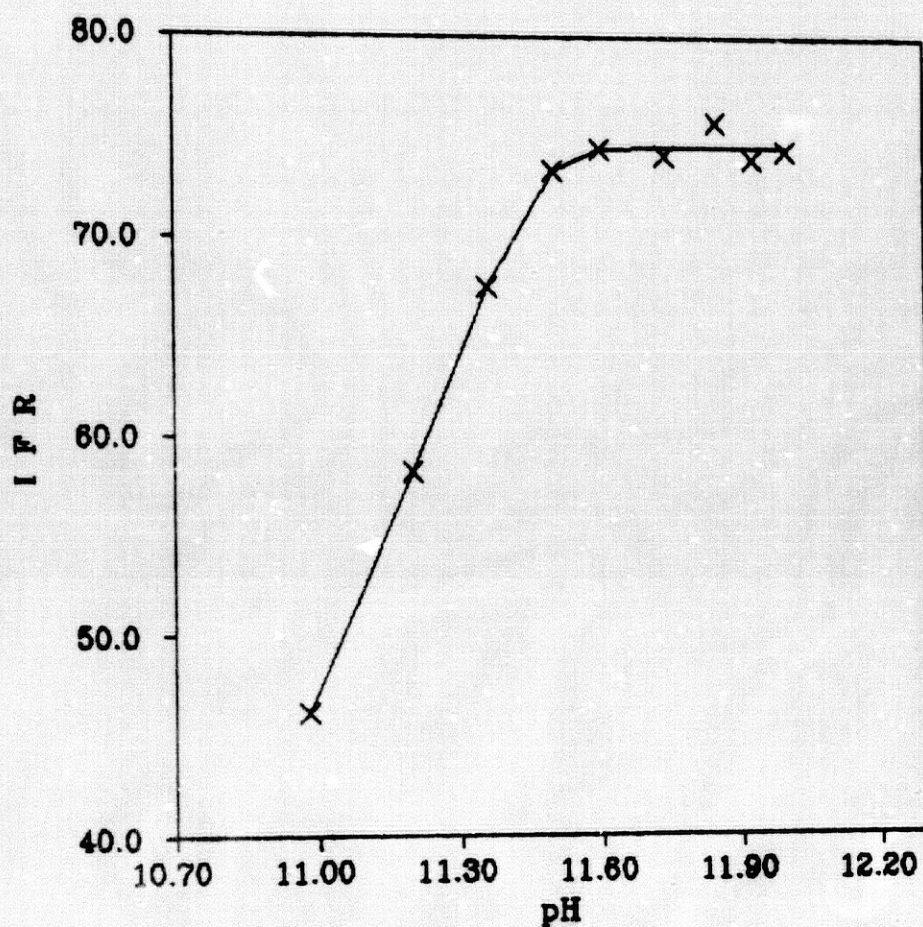


Figura IV.20. Influencia del pH con tampón $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$

Es de resaltar que el intervalo de pH óptimo en fase resina coincide con el propuesto por algunos autores para el mismo sistema en disolución. Así, *Sill y col.* (35,161) con tampón AEDT-piperidina o ADPT-piperidina, consideran para la formación del complejo un pH óptimo de 11.50.

Laitinen y Kivalo (157) estudian la influencia de la concentración de NaOH sobre la fluorescencia del complejo Be(II)-morina. Observan por una parte, un incremento rápido de la señal de fluorescencia de los blancos hasta un máximo alrededor de una concentración de NaOH de 0.015 N a partir de la cual hay un decrecimiento lento de la intensidad, y por otra, un cierto desplazamiento del máximo del complejo con respecto al blanco hasta una concentración de NaOH de 0.05 N y un decrecimiento menos pronunciado para concentraciones algo mayores de NaOH (0.1N). En ambos casos, blanco y complejo, el efecto de atenuación de fluorescencia provocado por la alta concentración de álcali es reversible ya que al acidificar la disolución los valores de fluorescencia se incrementan.

Brill (163) estudia una zona más amplia (hasta 1 N) y observa una dependencia similar del complejo formado a diferentes concentraciones de NaOH y elige una concentración de 0.1 N, para la cual la intensidad de fluorescencia es máxima.

El decrecimiento de la intensidad de fluorescencia observado en disolución por *Laitinen* (157) y que aparece a alta concentración de álcali, es debido, a su juicio, a la ionización de la molécula de morina, que origina de éste modo un ión negativo que no forma complejo con el berilio. Esto se corrobora con la reversibilidad del efecto de atenuación provocado por el NaOH.

La estrecha zona de pH estudiada por nosotros viene limitada hacia pH inferiores por la capacidad de tamponar de la disolución reguladora y hacia pH superiores por la desnaturalización que sufre el cambiador iónico en medio muy básico. Por ello, no es posible conocer la dependencia del sistema fijado en Sephadex a pH superior a 12.

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

Una vez establecido el pH óptimo, se ha estudiado la influencia que la concentración de disolución reguladora ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del complejo morina-Be(II) en fase sólida.

Para ello se preparó una serie de matraces aforados de 500 mL que contenían 1 mL de disolución de Be(II) de 0.5 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Las disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 5 mL de disolución etanólica de morina $2 \times 10^{-3} \%$, volúmenes crecientes de disolución reguladora $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 100 mg de resina QAE Sephadex A-25

Se prepararon los correspondientes blancos que no contenían Be(II) y fueron sometidos al mismo tratamiento.

Tras agitar durante un tiempo arbitrario de 20 minutos, se filtró la disolución y se midió el pH de la misma en todos los casos coincidiendo prácticamente con el pH de la disolución reguladora empleada para cada medida. A continuación, se llenaron las cubetas y se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendijas de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.05 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.8 y se han representado graficamente en la figura IV.21.

Tabla IV.8. Influencia de la concentración de la disolución reguladora. Fuerza iónica.

V. Tampón (mL)	%IFR _(F)	%IFR _(E)	% ΔIFR	Fuerza iónica (I)
5	56.1	31.2	24.9	0.102
10	56.9	31.0	25.9	0.205
15	56.0	31.0	25.0	0.307
20	54.9	30.9	24.0	0.410
25	53.0	29.8	23.2	0.512

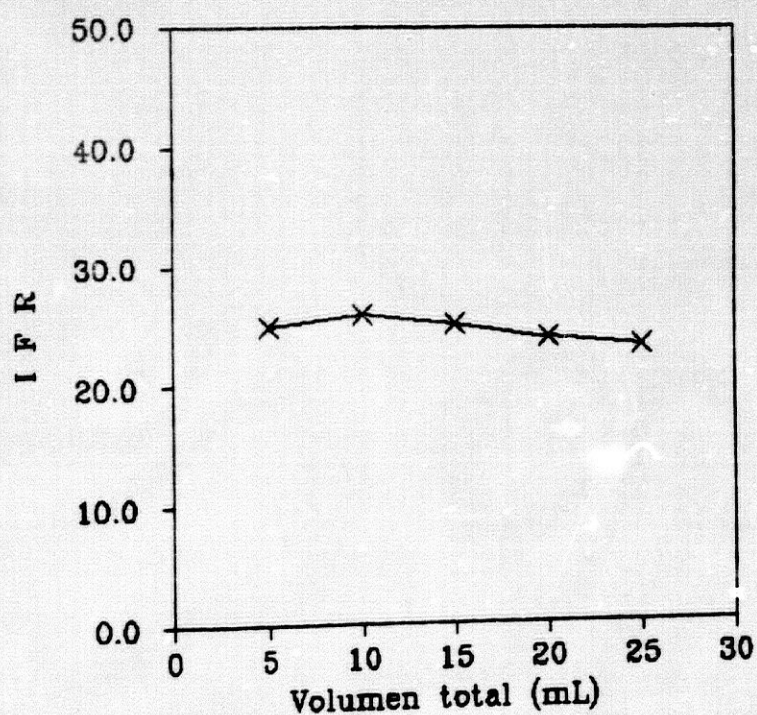


Figura IV.21. Influencia de la disolución reguladora sobre la intensidad de fluorescencia del sistema.

La observación de la figura IV.21, nos pone de manifiesto que la intensidad de fluorescencia del sistema en estudio es prácticamente independiente de la concentración de disolución reguladora. Se selecciona, no obstante, el volumen de 10 mL de disolución tampón para el cual es ligeramente mayor la intensidad de fluorescencia.

Con objeto de establecer la influencia que la fuerza iónica ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del sistema en estudio, se determinó ésta con el propio tampón.

Puesto que la fuerza iónica es $I = \sum C_i Z_i^2$ y $[PO_4Na_3] = 0.4 \text{ M}$ y $[PO_4H_3] = 1.25 \text{ M}$, se han estimado los valores de la fuerza iónica, para cada uno de los volúmenes de tampón añadidos y para un volumen final de 500 mL (tabla IV.8) y se representan en la figura IV.22.

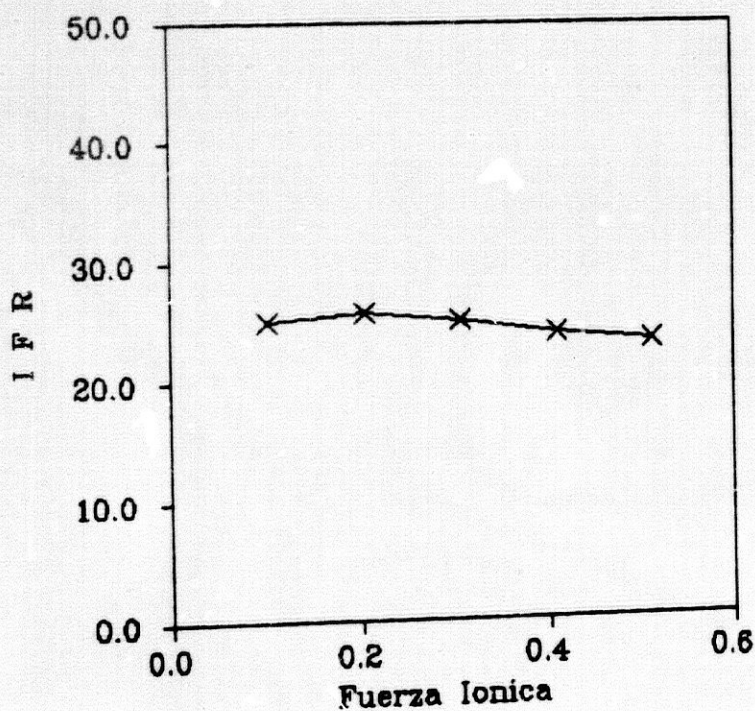


Figura IV.22. Influencia de la fuerza iónica sobre la intensidad de fluorescencia del sistema.

Puede deducirse, tambien, que la intensidad de fluorescencia es muy escasamente dependiente de la fuerza iónica en el intervalo estudiado, a partir de un valor próximo a 0.5 comienza a decrecer lentamente.

En disolución, la intensidad de fluorescencia del sistema se incrementa con la adición de sales tales como NaCl, NaClO₄ y Na₂SO₄, hasta que se hace constante para una concentración 1 N (157).

IV.7.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE REACTIVO

Una vez determinado el pH óptimo de trabajo, así como la concentración de la disolución reguladora más adecuada, se realizó el estudio de la influencia que ejerce la concentración del reactivo sobre la intensidad de fluorescencia del sistema en estudio.

Para ello, a una serie de matraces aforados de 500 mL se añadieron 3 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasó con agua bidestilada hasta el volumen indicado.

Estas disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno de 1 L de capacidad y se les añadieron las cantidades de etanol del 99.5%, disolución etanólica de morina del $5 \times 10^{-3}\%$, de la forma en que se especifica a continuación (tabla IV.9), al objeto de mantener constante el porcentaje etanólico del medio.

Tabla IV.9.

Matraz	Vol. Morina (mL)	Vol. Etanol (mL)
1	0.25	2.75
2	0.50	2.50
3	0.80	2.20
4	1.00	2.00
5	1.50	1.50
6	2.00	1.00
7	2.50	0.50
8	3.00	---

A continuación, se añadieron a cada uno de los frascos, 10 mL de disolución reguladora $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ y 100 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se prepararon los blancos correspondientes, que contenían los mismos reactivos salvo berilio y fueron sometidos al mismo tratamiento.

Tras agitar durante un tiempo arbitrario de 20 minutos, filtrar y llenar las cubetas, se midió su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.15 y temperatura 20°C.

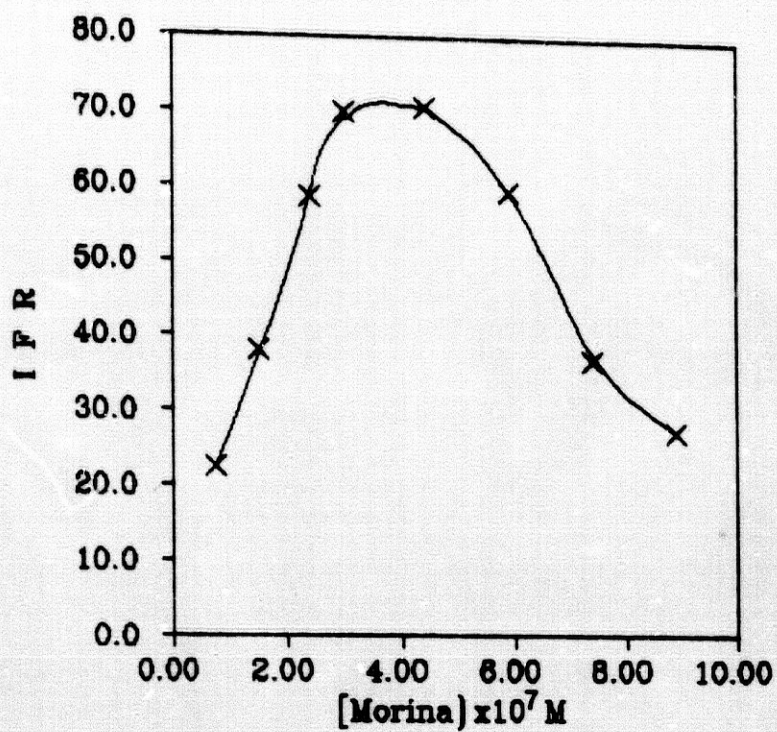
En la tabla IV.10 se muestran los resultados obtenidos y la dependencia de la concentración del reactivo con la diferencia de intensidad de fluorescencia entre el problema y el blanco y del blanco correspondiente, se muestra en la figura IV.23.

Tabla IV.10. Influencia de la concentración de reactivo

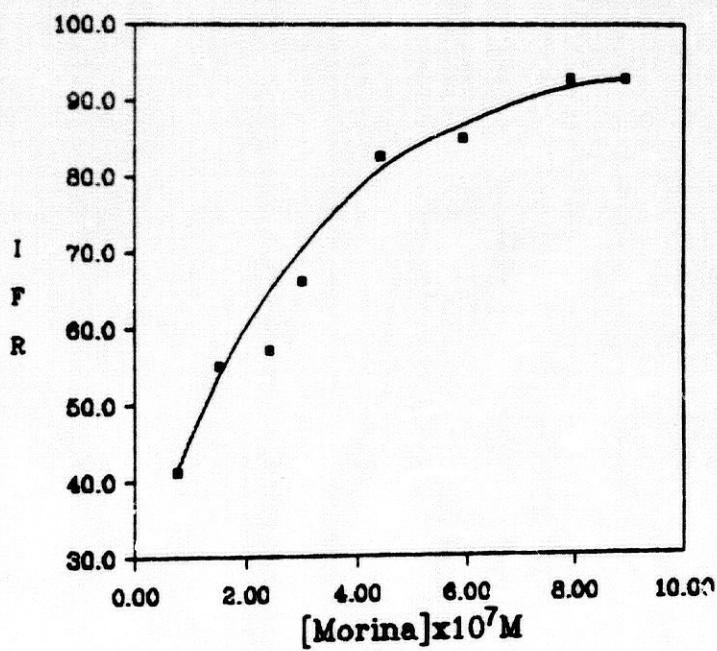
[morinal] $\times 10^7$ M	%IFR _(F)	%IFR _(B)	% Δ IFR
0.74	63.6	41.1	22.5
1.50	93.0	54.9	38.1
2.40	114.6	57.0	58.6
3.00	135.9	66.0	69.9
4.40	153.0	82.5	70.5
5.90	144.3	84.9	59.4
7.40	129.6	92.7	36.9
8.90	120.0	92.6	27.4

De la figura IV.23, puede deducirse por una parte, que la concentración óptima de morina es de 4.5×10^{-7} M, esto es, $1.5 \times 10^{-5}\%$. El valor máximo de la diferencia de intensidad de fluorescencia corresponde a una relación molar [morinal]/[Be(II)] \approx 7.

Por otra parte, se aprecia un incremento de la intensidad de fluorescencia de los blancos al aumentar la concentración de reactivo hasta que comienza a estabilizarse para una concentración superior a 7.0×10^{-7} M ($2.4 \times 10^{-5}\%$).



A



B

Figura IV.23. Influencia de la concentración de reactivo sobre la intensidad de fluorescencia del complejo (A) y del blanco (B)

El tipo de dependencia encontrado en fase sólida es similar al obtenido en disolución (35,157). La intensidad de fluorescencia de las muestras crece al aumentar la concentración de morina hasta alcanzar un máximo a partir del cual la señal de fluorescencia disminuye. También los blancos presentan comportamiento similar en disolución y en fase resina. Se incrementa la señal de fluorescencia hasta que se hace constante a partir de un valor de 10^{-3} % (35).

Sin embargo, la concentración de morina recomendada por varios investigadores en su estudio en disolución varía en un intervalo relativamente amplio. Esta variación se debe, la mayor parte de las veces, al grado de pureza del reactivo, no siendo valorables los estudios realizados con morina sin purificar. Así, *Sill y Willis* (35), que preparan una morina de alto grado de pureza, proponen una concentración óptima de 2.5×10^{-4} %, que es especialmente crítica. *Welford y Harley* (168) proponen una concentración final de 2.0×10^{-5} %, mientras *Laitinen y Kivalo* (157) alcanzan un máximo en la intensidad de fluorescencia para una concentración de morina de 10^{-3} %.

Hay dos posibles factores que inciden en el decrecimiento de la diferencia de intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración de morina. Por una parte, el efecto atenuación de la fluorescencia, observado también en disolución y de forma más acusada que en fase sólida, probablemente debido al efecto de reabsorción por la matriz sólida (morina fijada en Sephadex (169)). Por otra parte, el incremento de la intensidad de fluorescencia de los blancos que se observa al aumentar la concentración de reactivo hasta un valor de 7.0×10^{-7} M en que se mantiene constante (tabla IV.10), permite una mayor fijación en la resina del reactivo añadido. Este hecho concuerda con el estudio en disolución de la morina (159), en el que a altas concentraciones de la misma permanece constante la intensidad de fluorescencia.

IV.7.4. ESTABILIDAD DEL COMPLEJO EN FASE RESINA

Se ha establecido la influencia que el tiempo ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del sistema QAE Sephadex A.25-morina-Be(II) siguiendo el procedimiento operatorio que se describe a continuación.

A un matraz aforado de 500 mL se añadieron 3 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasó con agua bidestilada. Esta disolución se transfirió a un frasco de polietileno de 1 L de capacidad y se añadieron 1.5 mL de disolución etanólica de morina $5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 100 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Tras agitar la mezcla durante 20 minutos, filtrar y llenar la cubeta se registró la variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo (éste registro lo realiza automáticamente utilizando la opción correspondiente del fluorímetro empleado).

Las condiciones operatorias fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.05 y temperatura 20°C .

En la tabla IV.11 se recogen los valores obtenidos, tomados del registro gráfico realizado por el aparato, y se han representado graficamente en la figura IV.24.

Tabla IV.11. Estabilidad del complejo QAB-morina-Be(II)

<i>t</i> (min)	IFR (%)
0	57.0
5	57.0
10	55.0
15	53.5
20	53.0
25	53.3
30	53.0
35	53.0
40	53.0
45	53.0
50	53.0
55	53.0
60	53.0
65	52.1
70	51.3

La intensidad de fluorescencia decrece durante los primeros 15 minutos, siendo estable el sistema al menos durante una hora. En la bibliografía consultada, el complejo morina-Be(II) en disolución es estable al menos durante 60 minutos (160).

Se concluye que es necesario esperar unos 15 minutos para realizar la medida de fluorescencia en cada una de las experiencias posteriores.

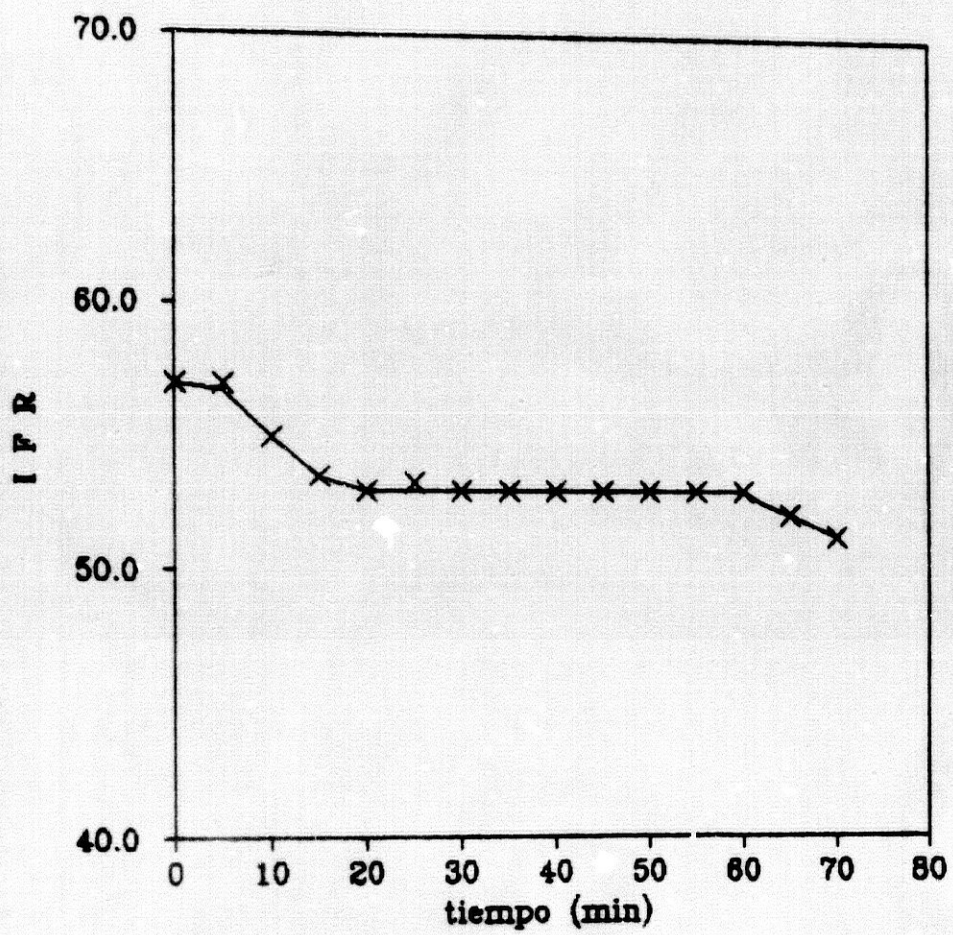


Figura IV.24. Estabilidad del complejo QAE-morina-Be(II)

IV.7.5. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

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

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

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

IV.7.5.1. Influencia de la temperatura sobre el proceso de cambio iónico del sistema morina-Be(II)

Con objeto de estudiar esta influencia, se preparó una serie de matraces aforados de 500 mL que contenían todos ellos 3 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

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

En consecuencia, las disoluciones se transfirieron a un vaso de precipitados de 1 L de capacidad y se añadieron 1.5 mL de disolución etanólica de morina $5 \times 10^{-3}\%$, 10 ml de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 100 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se sometió a una agitación de 20 minutos, manteniendo el sistema a una temperatura constante, distinta en cada caso.

Una vez transcurrido este tiempo, se filtró la disolución, transfiriéndose la resina a una cubeta de 1 mm de espesor y se realizó la medida de su intensidad de fluorescencia, una vez transcurridos 15 minutos a partir de los cuales se estabiliza la señal.

Las condiciones operatorias para su medida fueron:
 $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación 2.5 nm y rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.05 y temperatura de 20°C.

En la tabla IV.12 se recogen los resultados obtenidos, y se han representado gráficamente en la figura IV.25.

Tabla IV.12. Influencia de la temperatura sobre el proceso de cambio iónico.

T° ($^{\circ}C$)	IFR (%)
5	56.8
10	56.8
15	56.3
20	53.5
25	48.9
30	46.7
35	44.7
40	44.6
45	43.7
50	42.0

De la observación de la figura IV.25, puede deducirse que el proceso de cambio iónico depende de la temperatura de una forma complicada. En el rango comprendido entre 5 y 50°C la forma de la curva se ajusta a una ecuación polinómica tal como $IFR = 35.0 + 4.7 T - 0.3 T^2 + 8.0 \times 10^{-3} T^3 - 6.6 \times 10^{-5} T^4$ ($^{\circ}C$) (desviación estandar = 0.735). Esta dependencia puede deberse a un proceso complejo de fotooxidación aérea del complejo morina-Be(II). Proceso que se incrementa con la temperatura (159).

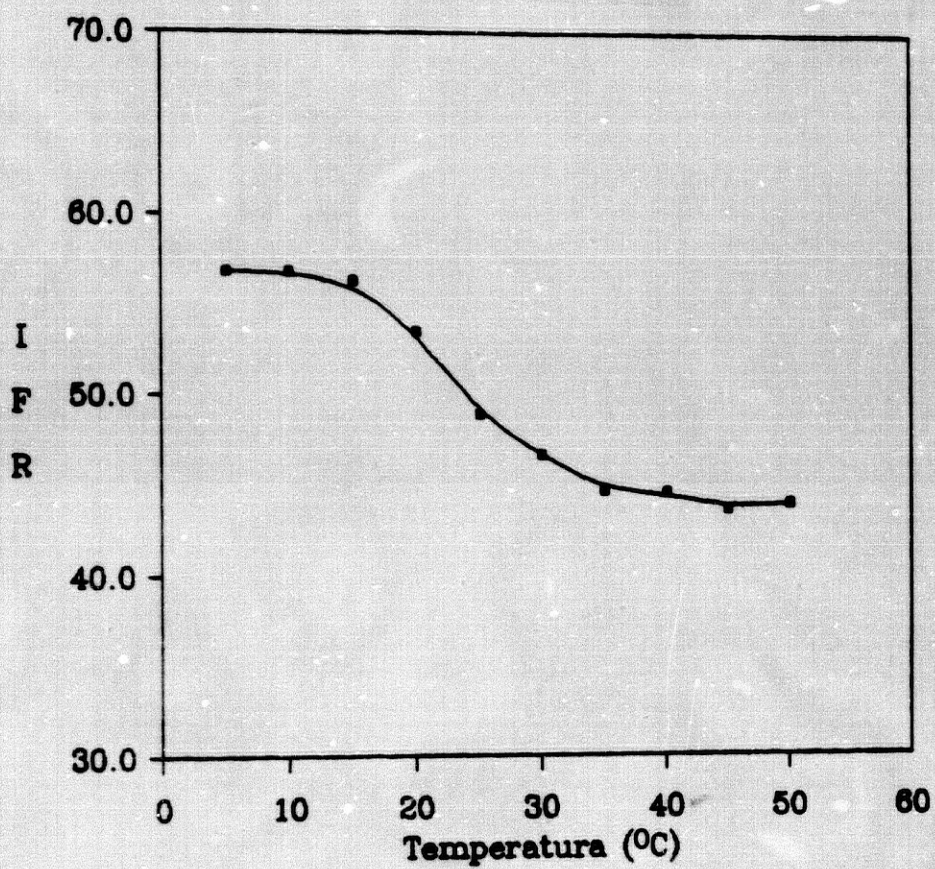


Figura IV.25. Influencia de la temperatura sobre el proceso de cambio iónico

IV.7.5.2. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia

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

Esta disolución se transfirió a un frasco de polietileno de 1 L de capacidad y se añadieron 1.5 mL de disolución etanólica de morina $5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de $\text{pH} = 11.50$ y 100 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se sometió a una agitación durante un tiempo de 20 minutos, transcurridos los cuales se filtró la disolución, transfiriéndose la resina a la cubeta de medida y se procedió, a los 15 minutos, a la lectura de su intensidad de fluorescencia.

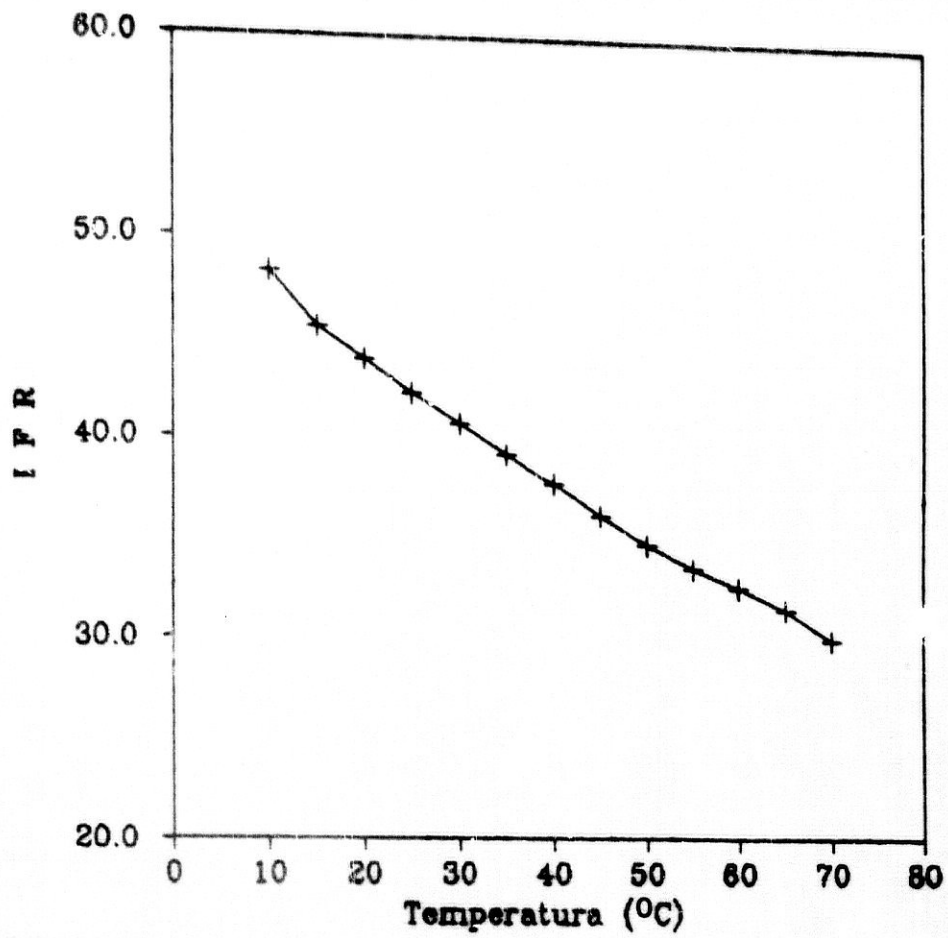
Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.05 y temperatura variable.

En la tabla IV.13 se recogen los resultados obtenidos al calentar el sistema y posteriormente enfriarlo con la ayuda de un termostato y se representan graficamente en la figura IV.26.

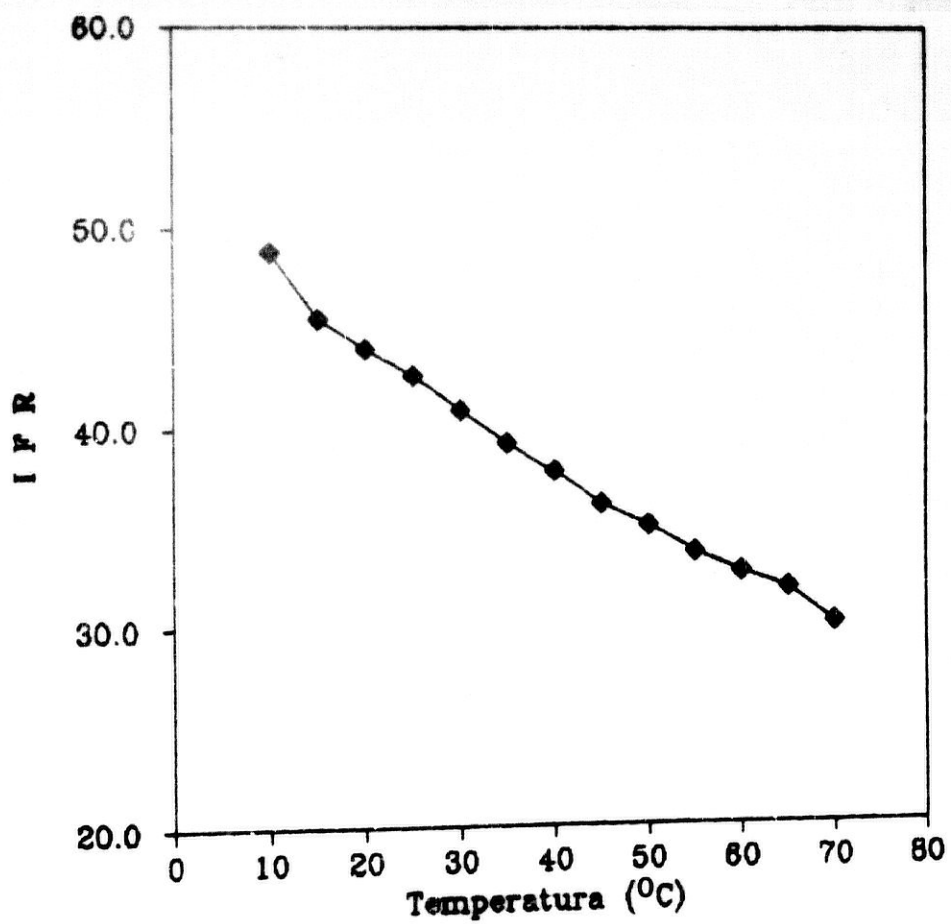
Tabla IV.13. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia.

<i>calentamiento</i>		<i>enfriamiento</i>	
$T^{\circ}(\text{C})$	IFR (%)	$T^{\circ}(\text{C})$	IFR (%)
10	48.2	70	30.1
15	45.5	65	31.9
20	43.9	60	32.7
25	42.2	55	33.7
30	40.7	50	35.0
35	39.2	45	36.1
40	37.8	40	37.8
45	36.2	35	39.2
50	34.8	30	40.9
55	33.6	25	42.6
60	32.7	20	44.0
65	31.6	15	45.5
70	30.1	10	48.8

De su observación puede deducirse que la intensidad de fluorescencia decrece cuando la temperatura del sistema se incrementa. Este decrecimiento corresponde a un 12% hasta 25°C, a un 21% hasta 40°C y a un 32% hasta 60°C. La ecuación experimental obtenida para el calentamiento es $\ln \text{IFR} = 3.94 - 0.008T (\text{C})$ ($r = 0.999$).



a



b

Figura IV.26. Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia a) calentamiento; b) enfriamiento

Este efecto observado en fase sólida es reversible, esto es enfriando nuevamente el sistema, la intensidad de fluorescencia recupera el valor inicial. Esto ocurre también en disolución. Además, se ha observado que el complejo morina-Be(II) presenta una dependencia de la intensidad de fluorescencia con la temperatura, del mismo tipo que en fase sólida. Por otra parte, a mayor concentración de berilio la dependencia se hace más marcada (157).

Se concluye que es necesario termostatar antes de realizar la medida de la fluorescencia. Hemos fijado la temperatura de trabajo en $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, próxima a la ambiente y fácilmente alcanzable mediante el empleo de un termostato.

IV.7.6. INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE CAMBIADOR IONICO

La experiencia se llevó a cabo preparando una serie de disoluciones a las que se añadieron cantidades crecientes de cambiador iónico comprendidas entre 50 y 300 mg.

Estas disoluciones contenían en un volumen final de 500 mL, 3 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} , enrasando con agua bidestilada.

Se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno, añadiéndose a cada uno de ellos, 1.5 mL de disolución etanólica de morina $5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y cantidades crecientes de cambiador iónico QAE Sephadex A-25.

Tras agitar durante 20 minutos, se filtraron las disoluciones y se llenaron las cubetas de medida.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia, que se realizó a los 15 minutos, fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.05 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se han recogido en la tabla IV.14 y se han representado gráficamente en la figura IV.27.

Tabla IV.14. Influencia de la cantidad de cambiador iónico.

m (mg)	IFR (%)
50	57.0
80	51.2
100	45.5
150	41.0
200	38.1
300	33.0

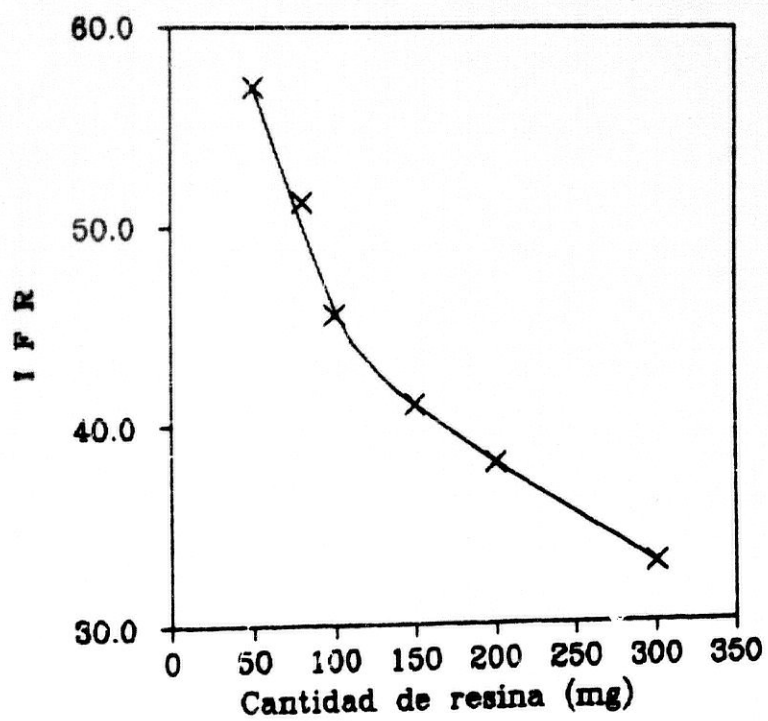


Figura IV.27. Influencia de la cantidad de resina

Como puede apreciarse en la figura IV.27, al aumentar la cantidad de resina añadida disminuye la intensidad de fluorescencia, para la concentración a la que se opera. Como consecuencia, la cantidad de cambiador iónico óptimo a utilizar debe ser la menor posible. Este valor viene limitado por la cantidad mínima necesaria para el llenado de la cubeta de medida, valor que hemos fijado en 80 mg.

IV.7.7. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACION

Dado que la Fluorimetría de Cambio Iónico exige una etapa previa de fijación del analito en el cambiador de iones, será necesario estudiar el tiempo de agitación necesario para que se alcance el equilibrio.

Para ello se utiliza un agitador rotativo de botellas que opera a una velocidad angular fija de 80 r.p.m. y variando el tiempo que permanece la disolución con el cambiador en agitación.

Se ha determinado la influencia para volúmenes de disolución de 250, 500 y 1000 mL respectivamente. El procedimiento operatorio para todos los volúmenes fué el mismo, así como las concentraciones finales de cada uno de los reactivos tal y como se describe a continuación.

En primer lugar se preparó una serie de matraces de 250 mL en los que se introdujeron 1 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasaron las disoluciones a frascos de polietileno y se añadieron 0.5 mL de disolución etanólica de morina $5 \times 10^{-3}\%$, 5 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Para el estudio de la influencia del tiempo de agitación cuando se emplean volúmenes de 500 mL, se diluyeron 2 mL de Be(II) 0.1 mg.L^{-1} con agua bidestilada hasta ese volumen.

Se transvasaron las disoluciones a sus correspondientes frascos de polietileno de 1 L de capacidad, y se les añadieron 1 mL de disolución etanólica de morina 5×10^{-3} %, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

En el caso de volumen final de 1000 mL se adicionaron 4 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Estas disoluciones se transfirieron a botellas de polietileno de 2 L de capacidad y se les añadieron 2 mL de disolución etanólica de morina 5×10^{-3} %, 20 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se prepararon los blancos correspondientes para cada volumen final que contenían los mismos reactivos, salvo Be(II) y fueron sometidos al mismo tratamiento.

El procedimiento seguido para todos ellos fué el siguiente: se agitó durante períodos de tiempo crecientes, se filtró, se llenaron las cubetas y se midió, después de 15 minutos, su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia en todos los casos, fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se recogen en las tablas IV.15, IV.16 y IV.17, que se han representado gráficamente en la figura IV.28.

Tabla IV.15. Influencia del tiempo de agitación. Volumen: 250 mL.

t (min)	%IFR _(P)	%IFR _(E)	% Δ IFR
10	52.6	22.2	30.4
20	61.6	20.0	41.6
30	63.1	19.2	44.8
40	61.2	16.8	44.4
50	57.2	12.6	44.6
60	54.6	13.0	41.6
70	51.8	12.4	39.4
80	47.6	11.2	36.4

Tabla IV.16. Influencia del tiempo de agitación. Volumen: 500 mL.

t (min)	%IFR _(P)	%IFR _(E)	% Δ IFR
10	66.4	24.4	42.0
20	80.4	22.2	58.2
30	82.6	23.4	59.2
40	81.2	21.4	59.8
50	73.8	16.4	57.4
60	71.8	17.0	54.8
70	71.4	16.4	55.0
80	63.6	14.8	48.8

Tabla IV.17. Influencia del tiempo de agitación. Volumen: 1000 mL.

t (min)	%IFR _(F)	%IFR _(B)	% Δ IFR
10	95.2	28.0	67.2
20	99.4	28.0	71.4
30	99.2	28.2	71.0
40	93.6	25.0	68.6
50	88.0	23.0	65.0
60	83.0	20.2	62.8
70	78.8	18.0	60.8
80	75.2	18.0	57.2

Puede observarse en la figura IV.28 que no existe una marcada dependencia del tiempo de agitación con la diferencia intensidad de fluorescencia para los tres volúmenes finales ensayados.

No obstante, se aprecia un débil decrecimiento provocado por la descomposición oxidativa del complejo, a partir de unos 40 minutos de agitación, aproximadamente un 20% para 80 minutos, (el descenso en la medida de fluorescencia de los blancos en el mismo intervalo es ligeramente superior, del orden de un 30%).

Consideramos un tiempo óptimo de agitación de 30 minutos para los volúmenes de 250, 500 y 1000 mL de disolución.

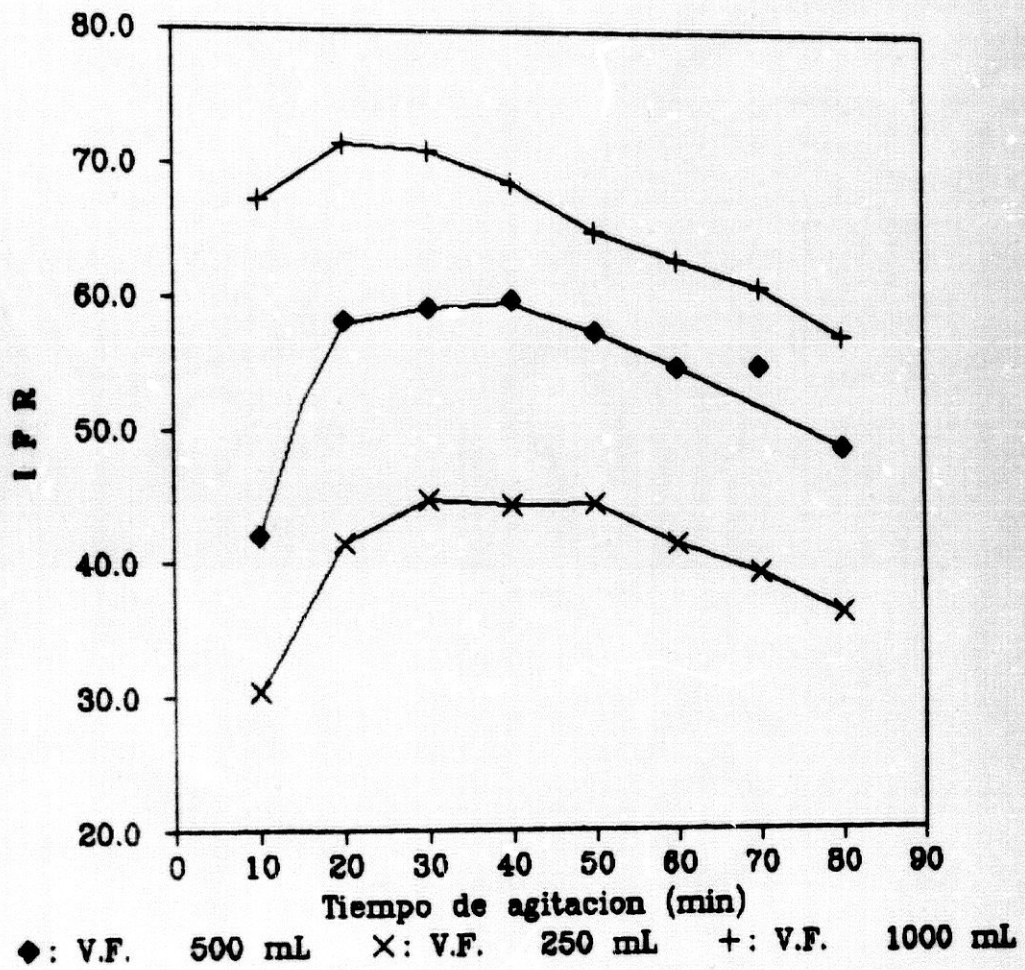


Figura IV.28. Influencia del tiempo de agitación para un volumen final de 250, 500 y 1000 mL

IV.7.8. ORDEN DE ADICION

Al objeto de conocer el orden de adición óptimo de los reactivos, para que la intensidad de fluorescencia del sistema sea máxima, se realizó la siguiente experiencia.

En todos los casos se añadió el analito en primer lugar así como la resina en último.

Para ello se prepararon una serie de matraces aforados de 500 mL que contenían 2mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase. Se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno de 1 L de capacidad y se añadió a cada uno de ellos, con diferente orden de adición (tabla IV.18), 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se prepararon los correspondientes blancos, en los que también se altera la secuencia en la adición de los reactivos, y se someten al mismo tratamiento que las muestras.

Tras agitar durante 30 minutos, filtrar y llenar las cubetas, se midió su intensidad de fluorescencia, al cabo de 15 minutos de espera.

Las condiciones operatorias para su medida fueron:
 $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C .

Tabla IV.18. Influencia del orden de adición.

orden de adición	%IFR _(E)	%IFR _(B)	% ΔIFR
Morina-Tampón	44.1	27.9	16.2
Tampón-Morina	45.0	28.1	16.9

Según muestran los resultados de la tabla IV.18, la intensidad de fluorescencia es independiente de la secuencia seguida en la adición de los reactivos, por lo que mantenemos el orden seguido en las anteriores experiencias que es Be(II)-Morina-Tampón-Resina.

IV.7.9. RESUMEN DE LA OPTIMIZACION DE VARIABLES

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

En segundo lugar, una vez elegidas las longitudes de onda de excitación y de emisión del sistema, se han optimizado aquellas variables que afectan a la intensidad de fluorescencia. En la siguiente tabla IV.19 se resumen las condiciones óptimas que se han seleccionado tras su estudio.

Tabla IV.10

<i>variable</i>	<i>condición optima</i>
rendija de excitación	2.5 nm
rendija de emisión	2.5 nm
longitud de onda de excitación	457 nm
longitud de onda de emisión	525 nm
pH	11.50
disolución reguladora	HPO ₄ ²⁻ /PO ₄ ³⁻
volumen disolución reguladora	10 mL
concentración de morina	1.5x10 ⁻⁵ %
estabilidad	entre 15 min y 1 hora
temperatura	20.0 ± 0.5°C
cantidad de cambiador iónico	80 mg
tiempo de agitación del sistema	30 min
orden de adición	Be(II)-Morina-Tampón-Resina

ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS

ANALITICAS DEL SISTEMA

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

Los métodos de espectrometría de fase sólida, al igual que ocurre en cualquier método de equilibrio heterogéneo, presentan una característica singular: su sensibilidad y límite de detección es función del volumen de problema empleado. Todo ello será verdad siempre que la razón de distribución presente un valor suficientemente alto.

Como consecuencia de esta característica, se podrán poner a punto métodos F.C.I. de acuerdo con las necesidades del problema a resolver. Si la concentración de analito en un problema concreto es pequeña, un aumento de volumen de muestra a tratar podrá permitirnos, dentro de ciertos límites, resolver su análisis.

Para estimar en la práctica el aumento de sensibilidad que permite un sistema dado, se estudia la señal analítica, IFR en nuestro caso, que origina la equilibración de volúmenes crecientes de analito, de la misma concentración, con la misma masa de cambiador de iones.

Al objeto de conocer cómo influye el volumen de disolución a tomar sobre la intensidad de fluorescencia, se prepararon dos series de disoluciones que en volúmenes finales, comprendidos entre 100 y 1750 mL, contenían cantidades crecientes de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} , de tal forma que

la concentración final después de enrasar con agua bidestilada, fuese siempre igual a $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ en un caso y $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II) en otro.

Las disoluciones se transfirieron a frascos de polietileno de 1 y 2 L de capacidad respectivamente, y se añadió a cada disolución la cantidad necesaria de disolución etanólica de morina $5 \times 10^{-3}\%$, para que la concentración de ésta fuese constante e igual a 2.96×10^{-7} M y 1.48×10^{-7} M respectivamente para ambas concentraciones de Be(II) añadidas, y el volumen de etanol adecuado para que el porcentaje etanólico en todas las muestras fuese el mismo (0.6%).

Asimismo, se añadieron cantidades crecientes de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 para mantener la fuerza iónica constante y 80 mg de QAE Sephadex A-25.

Tras una agitación de 30 minutos, se filtraron, se llenaron las cubetas y se procedió, después de 15 minutos, a la medida de la intensidad de fluorescencia

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 525$ nm, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.05 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos así como los volúmenes añadidos se recogen en la tabla IV.20 y se han representado gráficamente en la figura IV.29.

Tabla IV.20. Influencia del volumen final.

0.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II)

V. final (mL)	V. Be (II) (mL)	V. Morina (mL)	V. Etanol (mL)	V. Tampón (mL)	%IFR
100	0.2	0.10	0.50	2	10.0
250	0.5	0.25	1.25	5	17.5
500	1.0	0.50	2.50	10	24.9
750	1.5	0.75	3.75	15	30.5
1000	2.0	1.00	5.00	20	33.4
1250	2.5	1.25	6.25	25	36.8
1500	3.0	1.50	7.50	30	39.5
1750	3.5	1.75	8.75	35	39.5

0.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II)

V. final (mL)	V. Be (II) (mL)	V. Morina (mL)	V. Etanol (mL)	V. Tampón (mL)	%IFR
100	0.4	0.2	0.4	2	17.4
250	1.0	0.5	1.0	5	34.4
500	2.0	1.0	2.0	10	45.4
750	3.0	1.5	4.0	15	48.5
1000	4.0	2.0	5.0	20	51.0
1250	5.0	2.5	5.0	25	52.8
1500	6.0	3.0	6.0	30	54.1
1750	7.0	3.5	7.0	35	56.2

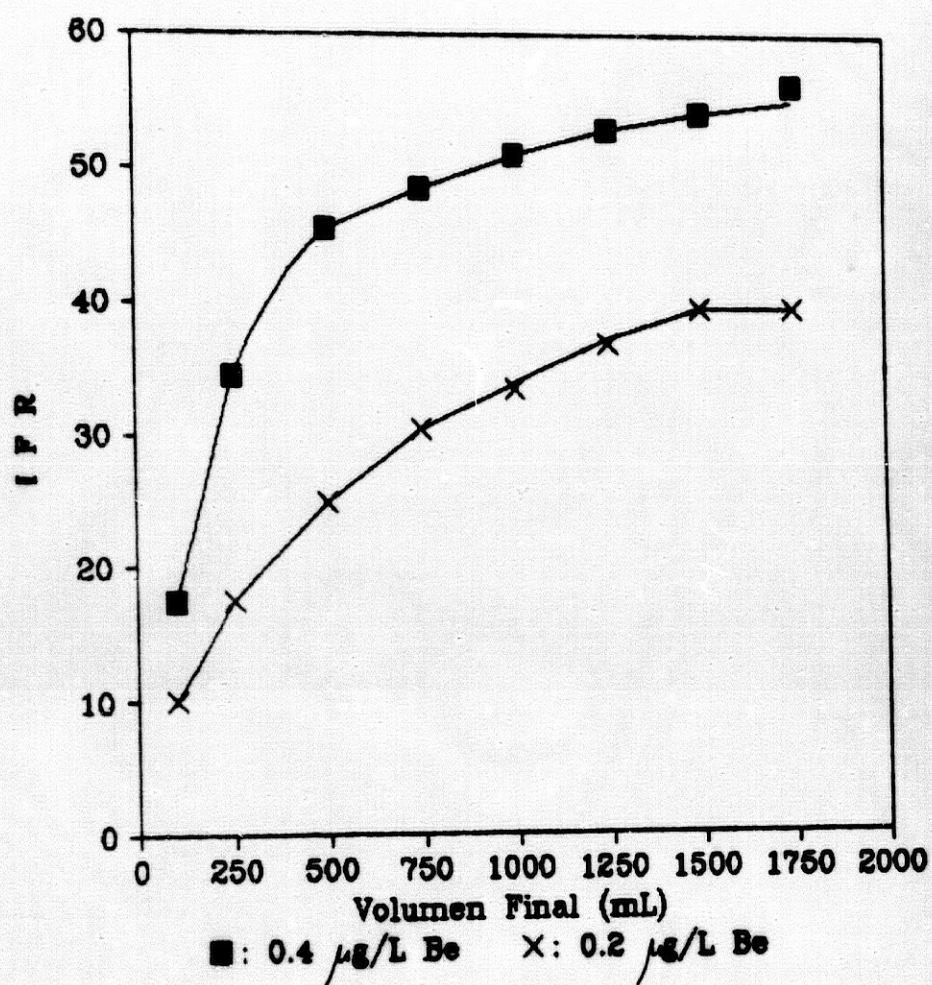


Figura IV.29. Influencia del volumen sobre la sensibilidad del método

La anterior figura IV.29, pone de manifiesto un incremento de la señal de fluorescencia con el volumen final de muestra (V), hasta que se hace prácticamente independiente del mismo para valores superiores a 1000 mL. Este hecho sugiere la necesidad de realizar el estudio de optimización de las diferentes variables que influyen en el proceso para cada volumen concreto de disolución.

La dependencia encontrada es de tipo exponencial por lo que se ensayó la ecuación: $IRF = A + B.e^{-CV}$. Suponiendo $A = B$ y linealizando de acuerdo con $\ln (IRF/A - 1) = CV$ se encuentra un buen ajuste. Así para $0.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II) , y $A = 40$, $C = -1.86 \times 10^{-3}$ y $r = 0.989$; para $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ y $A = 56$, $C = -1.95 \times 10^{-3}$ y $r = 0.977$. Las desviaciones en el ajuste de la recta son más grandes para altos volúmenes debido a la fluctuación en la medida de la fluorescencia. Esta fluctuación es del mismo orden que el ruido del fluorímetro en nuestras condiciones experimentales.

IV.8.2. RECTAS DE CALIBRADO

Una de las ventajas que posee la Fluorimetría de Cambio Iónico, como se indica en el apartado anterior, es la posibilidad de incrementar la sensibilidad y reducir el límite de detección de un método concreto aumentando el volumen de disolución empleado. En principio la magnitud de este volumen se encuentra limitada por el hecho de que su valor sea operativo desde el punto de vista práctico (0.5-10 L) y que el equilibrio en el proceso de fijación sea favorable.

Por todo ello hemos obtenido curvas de calibrado para diferentes valores de volumen de disolución: 250, 500 y 1000 mL, en un rango de concentraciones de Be(II) comprendido entre 0.1 y 0.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para el cual la intensidad de fluorescencia del sistema en estudio se ha demostrado que es función lineal de la concentración de Be(II).

IV.8.2.1. Recta de calibrado para un volumen final de 250 mL

Se preparó a tal fin, una serie de matraces aforados en los que se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} , comprendidos entre 0.25 y 1.75 mL y se enrasó con agua bidestilada hasta un volumen final de 250 mL.

Las disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 1.5 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 5 mL de disolución

reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se agitaron durante 30 minutos, se filtraron las disoluciones, se llenaron las cubetas y se midió su intensidad de fluorescencia, después de 15 minutos.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: λ_{exc} = 457 nm, λ_{em} = 525 nm, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.25 y temperatura 20°C.

Los datos obtenidos una vez restados del blanco se recogen en la tabla IV.21 y han sido representados gráficamente en la figura IV.30.

Tabla IV.21. Curva de calibrado: 250mL.

ppb Be(II)	%IFR
0	0
0.1	9.6
0.3	30.4
0.5	54.8
0.7	83.0

Existe una buena linealidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de Be(II), en el intervalo de concentraciones ensayado. La ecuación correspondiente a ésta recta de calibrado, ajustada por mínimos cuadrados, es:

$$\text{IFR} = 117.94 [\text{Be(II)}] - 2.18$$

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

El coeficiente de correlación encontrado es 0.997.

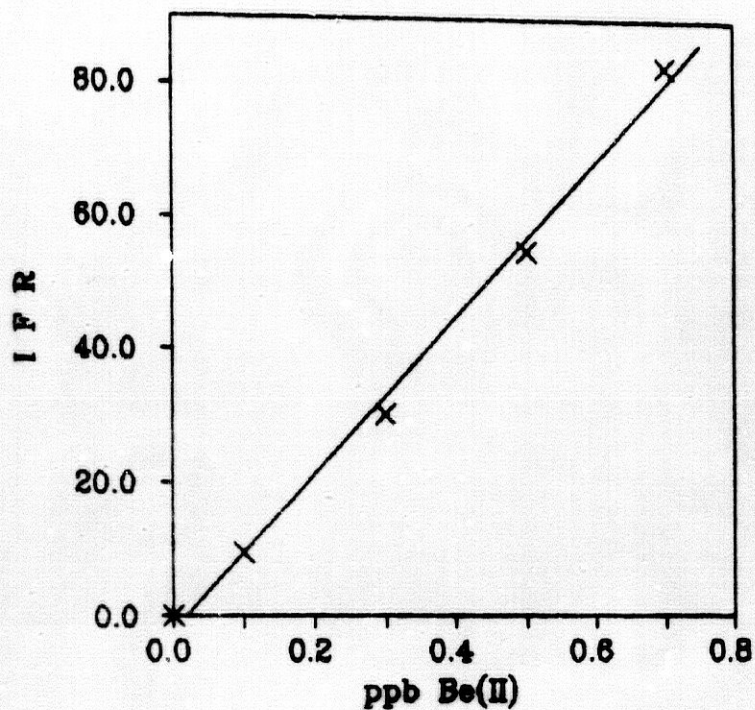


Figura IV.30. Recta de calibrado para un volumen final de 250 mL

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

A continuación se estableció la recta de calibrado para un volumen final de 500 mL. Para ello se preparó una serie de matraces aforados en los que se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de Be(II) de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, comprendidos entre 0.5 y 3.5 mL, y se enrasó con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución

reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se agitaron durante 30 minutos, se filtraron las disoluciones, se llenaron las cubetas y se midió a los 15 minutos su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: λ_{exc} = 457 nm, λ_{em} = 525 nm, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.25 y temperatura 20°C.

Los datos obtenidos una vez restados del blanco se recogen en la tabla IV.22 y se representan graficamente en la figura IV.31, donde puede apreciarse una buena linealidad entre la intensidad de fluorescencia y el intervalo de concentración de Be(II) ensayado.

Tabla IV.22. Curva de calibrado: 500 mL

ppb Be(II)	%IFR
0	0
0.1	13.9
0.3	40.6
0.5	64.9
0.7	86.5

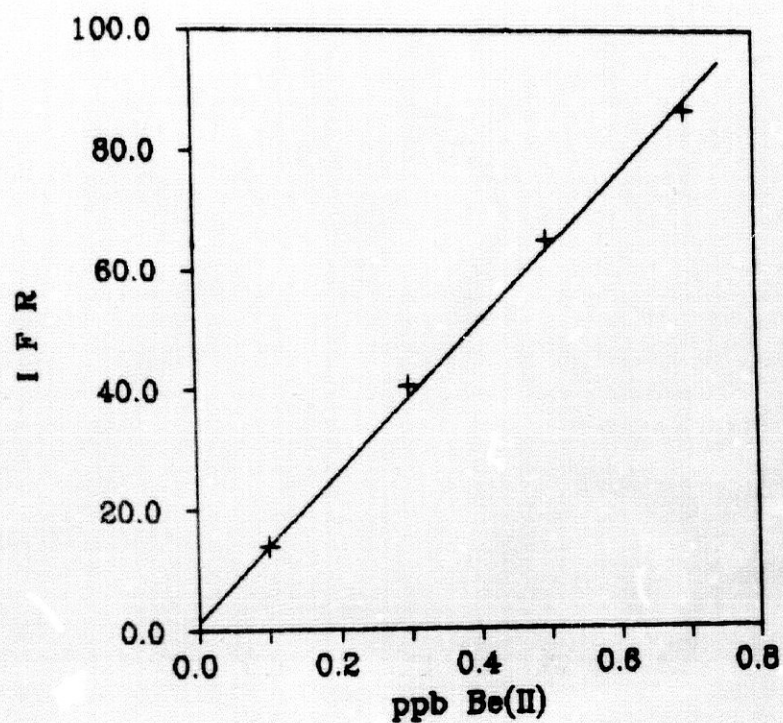


Figura IV.30. Recta de calibrado para un volumen final de 500 mL

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

$$\text{IFR} = 124.03 [\text{Be(II)}] + 1.49$$

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

El coeficiente de correlación encontrado es de 0.999.

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

Para un volumen final de 1000 mL, se añadieron diferentes volúmenes de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} , comprendidos entre 1 y 7 mL y se enrasó con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 6 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 20 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se agitaron durante 30 minutos, se filtraron las disoluciones, se llenaron las cubetas y se midió a los 15 minutos su intensidad de fluorescencia.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.25 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos una vez restados del blanco se recogen en la tabla IV.23 y se han representado graficamente en la figura IV.32.

Tabla IV.23. Curva de calibrado: 1000 mL.

ppb Be(II)	%IFR
0	0
0.1	11.4
0.3	35.2
0.5	68.7
0.7	100.8

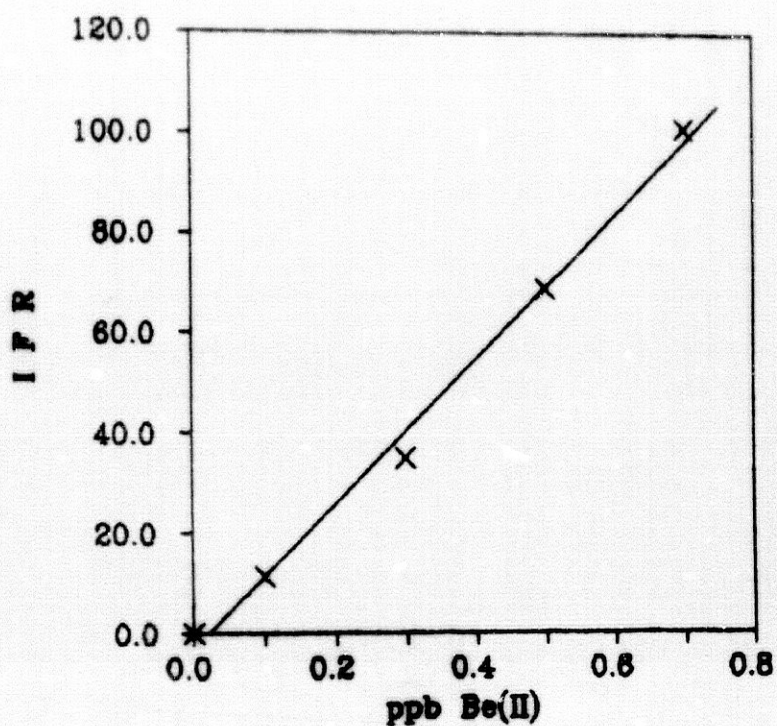


Figura IV.32. Recta de calibrado para un volumen final de 1000 mL

Se observa también en éste caso una buena linealidad entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de Be(II) estudiada.

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

$$IRF = 144.70 [Be(II)] - 3.08$$

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

El coeficiente de correlación encontrado es 0.997.

IV.8 2.4. Comparación de la sensibilidad de los diferentes volúmenes

Como ya se ha indicado, en fluorimetría de cambio iónico la sensibilidad se incrementa cuando se equilibran volúmenes de muestra mayores con una misma cantidad de resina (170). Este incremento puede estimarse, en la práctica, por la pendiente en las rectas de calibrado. En la tabla IV.24, se indican las correspondientes ecuaciones de estas curvas de calibrado.

Tabla IV.24. Ecuaciones de las curvas de calibrado

V. final (mL)	IFR = f[Be(II)] _{ppb}	coef. correlac.
250	IFR = 117.94 [Be(II)] - 2.18	0.997
500	IFR = 124.03 [Be(II)] + 1.49	0.999
1000	IFR = 144.70 [Be(II)] - 3.08	0.997

En ellas puede observarse, como era de esperar un aumento de la pendiente de la recta de calibrado y por tanto la sensibilidad del método, con el volumen de disolución.

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

La sensibilidad del método que se propone es muy superior a la de otros métodos en disolución que emplean morina como reactivo. Con objeto de comparar la sensibilidad del método en fase sólida y en disolución, se ha obtenido una recta de calibrado en disolución para el rango de concentraciones comprendido entre 50 y 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$, basándonos en el procedimiento descrito por Will (35).

En matraces de 50 mL se diluyen 2,5, 3, 4 y 5 mL de disolución de Be(II) de 1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase. Se toman asimismo 50 mL de agua bidestilada.

Las disoluciones se transfirieron a matraces de mayor volumen y se les añadieron 10 mL de disolución etanólica de morina 0.02% y 1 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50.

A continuación, en cubetas de 1 cm de espesor se procedió a la lectura de su intensidad de fluorescencia, que se realizó en las mismas condiciones experimentales empleadas en la obtención de la recta de calibrado en fase resina.

Los resultados obtenidos una vez restados del blanco se recogen en la tabla IV.25 y se han representado gráficamente en la figura IV.33.

Tabla IV.25. Recta de calibrado en disolución

ppb Be (II)	%IFR
0	0
50	8.2
60	9.0
80	11.3
100	15.0

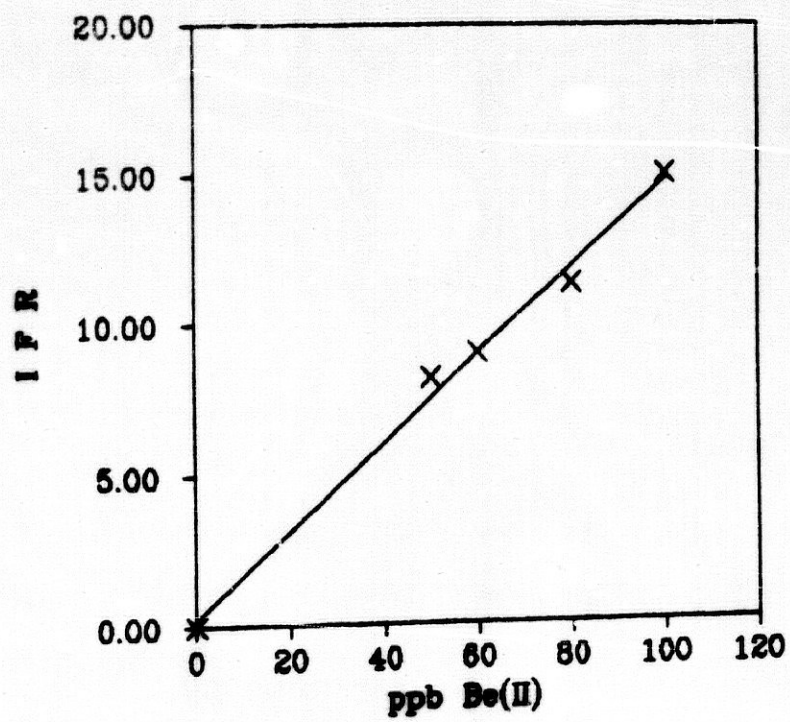


Figura IV.33. Recta de calibrado en disolución

La ecuación de la recta, ajustada por mínimos cuadrados, es la siguiente:

$$\text{IFR} = 0.14 [\text{Be(II)}] + 0.21$$

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

El coeficiente de correlación encontrado es 0.996.

La comparación de los resultados de sensibilidad obtenidos nos permiten resaltar el gran aumento de ésta que se obtiene al operar en fase resina, respecto al que se obtiene en disolución (para 500 mL). Como puede observarse la relación de las pendientes de las rectas de calibrado es 886.

$$\frac{\text{pendiente método FCI}}{\text{pendiente método en disolución}} = 886$$

IV.8.3. METODOS PROPUESTOS PARA LA DETERMINACION DE Be(II)

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

IV.8.3.1. Método propuesto para un volumen final de 250 mL

- *Disolución problema*

La disolución problema se prepara introduciendo en un matraz aforado de 250 mL el volumen necesario de disolución problema de forma que la concentración final de Be(II) esté comprendida entre 0.1 y 0.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$, y agua bidestilada hasta el enrase.

La disolución se transfiere a un frasco de polietileno y se le añade 1.5 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 5 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A.25.

Se agita durante 30 minutos, se filtra y se llena la cubeta de medida.

Se mide la intensidad de fluorescencia en las mismas condiciones operatorias empleadas en la recta de calibrado.

- Recta de calibrado

La recta de calibrado se obtiene preparando 5 disoluciones con una concentración de Be(II) de 0, 0.1, 0.3, 0.5 y 0.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para lo cual en matraces aforados de 250 mL se pipetea 0.25, 0.75, 1.25 y 1.75 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasa con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfieren a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añade 1.5 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 5 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A.25.

Las disoluciones se agitan durante 30 minutos, se filtran y se recogen las bolitas de resina por filtración bajo succión y con la ayuda de una pipeta se empaquetan en una cubeta de 1 mm de espesor junto con un pequeño volumen del filtrado.

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

La intensidad de fluorescencia para la muestra y el blanco se mide siempre después de 15 minutos, cuando la medida es estable.

Las condiciones operatorias son: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm y temperatura 20°C.

IV.8.3.2. Método propuesto para un volumen final de 500 mL

- Disolución problema

La disolución problema se prepara introduciendo en un matraz aforado de 500 mL el volumen necesario de disolución problema de forma que la concentración final de Be(II) esté comprendida entre 0.1 y 0.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$, y agua bidestilada hasta el enrase.

La disolución se transfiere a un frasco de polietileno y se le añaden 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50, y 80 mg de resina QAE Sephadex A.25.

Se agita durante 30 minutos, se filtra y se llena la cubeta de medida.

Se mide la intensidad de fluorescencia en las mismas condiciones operatorias empleadas en la recta de calibrado.

- *Recta de calibrado*

La recta de calibrado se obtiene preparando 5 disoluciones con una concentración de Be(II) de 0, 0.1, 0.3, 0.5 y $0.7 \mu\text{g.L}^{-1}$, para lo cual en matraces aforados de 500 mL se pipetea 0.5, 1.5, 2.5 y 3.5 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasa con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfieren a sus correspondientes frascos de polietileno de 1 L de capacidad y se les añade 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Las disoluciones se agitan durante 30 minutos, se filtran y se recogen las bolitas de resina por filtración bajo succión y con la ayuda de una pipeta se empaquetan en una cubeta de 1 mm de espesor junto con un pequeño volumen del filtrado.

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

La intensidad de fluorescencia para la muestra y el blanco se mide siempre después de 15 minutos, cuando la medida es estable.

Las condiciones operatorias son: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm y temperatura 20°C .

IV.8.3.3. Método propuesto para un volumen final de 1000 mL

- *Disolución problema*

La disolución problema se prepara introduciendo en un matraz aforado de 1000 mL el volumen necesario de disolución problema de forma que la concentración final de Be(II) esté comprendida entre 0.1 y 0.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$, y agua bidestilada hasta el enrase.

La disolución se transfiere a un frasco de polietileno y se le añade 6 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 20 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50, y 80 mg de resina QAE Sephadex A.25.

Se agita durante 30 minutos, se filtra y se llena la cubeta de medida.

Se mide la intensidad de fluorescencia en las mismas condiciones operatorias empleadas en la recta de calibrado.

- *Recta de calibrado*

La recta de calibrado se obtiene preparando 5 disoluciones con una concentración de Be(II) de 0, 0.1, 0.3, 0.5 y 0.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$, para lo cual en matraces aforados de 1000 mL se pipetea 1, 3, 5 y 7 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasa con agua bidestilada.

Las disoluciones se transfieren a sus correspondientes frascos de polietileno de 2 L de capacidad y se les añade 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 20 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Las disoluciones se agitan durante 30 minutos, se filtran y se recogen las bolitas de resina por filtración bajo succión y con la ayuda de una pipeta se empaquetan en una cubeta de 1 mm de espesor junto con un pequeño volumen del filtrado.

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

La intensidad de fluorescencia para la muestra y el blanco se mide siempre después de 15 minutos, cuando la medida es estable.

Las condiciones operatorias son: λ_{exc} = 457 nm, λ_{em} = 525 nm, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm y temperatura 20°C.

IV.8.4. ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS METODOS

El protocolo de cualquier método en espectrofluorimetría de cambio iónico, lo podemos esquematizar en las cinco etapas operatorias siguientes:

- a) *Preparación de la disolución.*
- b) *Agitación.*
- c) *Filtración.*
- d) *Empaquetamiento de la resina.*
- e) *Medida de la intensidad de fluorescencia.*

La incertidumbre de la aplicación del método vendrá determinada por la de cada una de sus etapas, sin embargo un análisis detenido de las mismas, nos hace pensar que, para un operador adiestrado, será la etapa d) la que mayor incertidumbre origina. Por ello, hemos creído conveniente establecer antes de la reproducibilidad del método, la reproducibilidad de ésta etapa en concreto.

IV.8.4.1. Reproducibilidad del empaquetamiento

Para estudiarla se diluyeron 1.5 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} hasta 500 mL con agua bidestilada, disolución que se transfirió a un frasco de polietileno de 1 L de capacidad y se añadieron 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 200 mg de resina QAE Sephadex A.25.

Se preparó también un blanco que contenía todos los reactivos salvo el Be(II), y otro blanco que sólo contenía la resina en 500 mL de agua bidestilada. Todas las disoluciones fueron sometidas al mismo tratamiento.

Tras agitar durante 30 minutos, se filtraron, se transfirió la resina a la cubeta y se realizó la medida de su intensidad de fluorescencia, a los 15 minutos que es cuando la medida es estable.

El proceso se repitió 10 veces, vaciando la cubeta y volviéndola a llenar con la misma resina. Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C . Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.26.

Tabla IV.26. Reproducibilidad del empaquetamiento.

ppb Be (II)	%IFR _(F)	%IFR _(B)	%IFR _(R)
0.3	43.3	28.3	6.2
0.3	42.1	27.9	6.2
0.3	44.1	28.2	6.2
0.3	43.8	28.3	6.2
0.3	43.8	28.5	6.3
0.3	44.0	27.7	5.9
0.3	44.3	27.5	6.1
0.3	44.4	27.4	6.3
0.3	42.4	28.4	6.2
0.3	43.7	28.7	6.2
$\overline{\text{IFR}} (\%)$	43.6	28.1	6.2
σ_{n-1}	0.77	0.44	0.11
DSR (%)	1.8	1.6	1.8

Por tanto, la desviación estandar relativa será:

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

El estudio de la reproducibilidad del empaquetamiento nos proporciona unos valores de la desviación estandar relativa de 1.8 % para el complejo fijado en la resina, 1.6 % para el blanco y 1.8 % para la resina sólo.

IV.8.4.2. Influencia de la centrifugación del sistema sobre la reproducibilidad del empaquetamiento

Al objeto de mejorar la reproducibilidad del empaquetamiento de la resina en la cubeta de medida, se procede a centrifugar la cubeta a diferentes tiempos y a distintas revoluciones, antes de realizar la medida de la intensidad de fluorescencia.

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

Se transvasaron a sus frascos de polietileno y se añadió a cada uno de ellos 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Después de agitar durante 30 minutos, filtrar y llenar las cubetas de medida, se centrifugan las cubetas a diferentes tiempos y revoluciones, según se indica en las tablas IV.27 y IV.28.

La intensidad de fluorescencia se mide en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 25°C .

Tabla IV.26. Influencia del tiempo de centrifugación.

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

$t \text{ (s)}$	$\%IFR_{(P)}$	$\%IFR_{(B)}$	$\% \Delta IFR$
0	46.1	29.2	16.9
15	47.9	31.8	16.1
30	50.0	33.9	16.1
45	51.9	33.0	18.9
60	50.8	33.0	17.8
75	50.1	32.9	17.2
90	50.0	34.0	16.0
120	49.1	34.0	15.1
150	49.9	33.8	16.1
180	49.0	34.0	15.0

Tabla IV.27. Influencia de la velocidad angular sobre la IFR.

$t = 45 \text{ s}$

r.p.m.	$\%IFR_{(P)}$	$\%IFR_{(B)}$	$\% \Delta IFR$
0	47.0	31.0	16.0
750	51.1	33.8	17.3
1500	52.0	34.9	17.1
3000	52.0	35.0	17.0
3750	50.5	34.9	15.6
5000	51.0	35.8	15.2

Los resultados obtenidos en ésta experiencia ponen de manifiesto que la intensidad de fluorescencia relativa de las muestras sometidas a centrifugación, no aumenta sensiblemente con respecto a la de las muestras sin centrifugar.

IV.8.4.3. Reproducibilidad del empaquetamiento de las muestras centrifugadas

Los resultados anteriores se corroboran con los obtenidos en el estudio de la reproducibilidad del empaquetamiento (tabla IV.29), en el que se procede a centrifugar las muestras durante 45 s a 750 r.p.m..

Tabla IV.29. Reproducibilidad del empaquetamiento, una vez centrifugadas las muestras. Volumen final 500 mL.

ppb Be (II)	%IFR _(F)	%IFR _(B)	%IFR _(R)
0.3	44.5	29.1	6.1
0.3	44.3	29.6	6.1
0.3	46.2	30.1	6.2
0.3	45.0	30.1	6.2
0.3	45.1	30.6	6.3
0.3	45.8	29.3	6.0
0.3	46.0	29.9	6.1
0.3	46.1	29.8	6.3
0.3	44.3	30.9	6.1
0.3	45.7	29.6	6.2
$\overline{\text{IFR}}(\%)$	45.3	29.9	6.2
σ_{n-1}	0.75	0.55	0.10
DSR (%)	1.7	1.8	1.6

Los valores de la desviación estandar relativa es de 1.7 % para el complejo fijado en la resina, 1.6 % para el blanco y 1.6 % para la resina sola. Se comprueba, por lo tanto, que la centrifugación de la resina en la cubeta no mejora la precisión del método y por tanto no se efectuará.

IV.8.4.4. Reproducibilidad del método

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

En primer lugar se prepararon 10 matraces aforados de 250 mL, en los que se introdujeron 0.75 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Las disoluciones se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno y se les añadieron 1.5 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3} \%$, 5 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 200 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Tras una agitación de 30 minutos se filtraron las disoluciones y tras llenar las cubetas se midió su intensidad de fluorescencia a los 15 minutos.

Para determinar la reproducibilidad de la técnica en un volumen final de 500 mL, se tomaron 10 matraces aforados en los que se introdujeron 1.5 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y se enrasaron con agua bidestilada.

Una vez en sus frascos de polietileno, se les añadieron 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3} \%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 200 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Las disoluciones se agitaron durante 30 minutos y se filtraron, llenándose las cubetas y midiéndose por último su intensidad de fluorescencia, después de 15 minutos de espera.

Por último, en 10 matraces aforados de 1000 mL de capacidad se diluyeron 3 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L⁻¹ y se enrasaron con agua bidestilada.

Se transvasaron a frascos de polietileno de 2 L de capacidad y se les adicionaron 6 mL de disolución etanólica de morina 1.5x10⁻³%, 20 mL de disolución reguladora de HPO₄²⁻/PO₄³⁻ de pH = 11.50 y 200 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se agitaron durante 30 minutos, se filtraron y se llenaron las cubetas para proceder a la medida de su intensidad de fluorescencia, a los 15 minutos.

Las condiciones operatorias para su medida fueron, en los tres casos: λ_{exc} = 457 nm, λ_{em} = 525 nm, rendija de excitación 2.5 nm, rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.30.

Tabla IV.30. Reproducibilidad del método.

ppb Be(II)	%IFR ₂₅₀	%IFR ₅₀₀	%IFR ₁₀₀₀
0.3	33.1	44.2	49.2
0.3	32.6	43.2	48.3
0.3	33.4	44.2	48.6
0.3	34.2	42.8	49.0
0.3	33.1	42.5	48.9
0.3	34.5	43.8	47.7
0.3	33.2	43.3	48.3
0.3	33.4	42.9	48.0
0.3	33.9	44.1	49.4
0.3	33.2	43.1	49.3
$\overline{\text{IFR}}(\%)$	33.5	43.4	48.7
σ_{n-1}	0.57	0.62	0.58
DSR (%)	1.7	1.4	1.2

Por consiguiente, la precisión del método para una concentración de Be(II) de $0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ es de 1.7, 1.4 y 1.2 % para 250, 500 y 1000 mL respectivamente, expresada como desviación estandar relativa. Según los resultados antes obtenidos (tablas IV.26 y IV.30) parece que una de las principales contribuciones a la reproducibilidad es la variabilidad en el empaquetamiento de la resina.

Se comprobó asimismo, que la centrifugación de las muestras en las condiciones optimizadas, no mejora los resultados para los tres volúmenes ensayados, lo cual corrobora los resultados encontrados al estudiar la influencia de la centrifugación sobre la reproducibilidad del empaquetamiento.

IV.8.5. LIMITES DE DETECCION Y DE DETERMINACION DE LOS METODOS PROPUESTOS

El concepto de *límite de detección*, basado en el tratamiento estadístico del blanco o disolución de referencia, fué adoptado por la I.U.P.A.C. en 1975 (171) y por el A.C.S. (Subcommittee on Environmental Analytical Chemistry) en 1980 (172).

El límite de detección de un procedimiento analítico, se puede definir como la menor concentración " C_L " ó cantidad " q " que puede ser detectada en una disolución problema con una seguridad razonable.

De acuerdo con ambos organismos a éste límite de detección expresado como C_L le corresponde una señal analítica X_L definida por:

$$X_L = X_s + k \sigma_s \quad (IV.1)$$

siendo:

- X_s : el valor medio de la respuesta del blanco.
- σ_s : la desviación estandar calculada a partir de las medidas de la magnitud analítica de al menos siete disoluciones de referencia preparadas siguiendo el procedimiento analítico.
- K : un factor numérico seleccionado de acuerdo con el nivel de confianza deseado.

La concentración C_L se encuentra relacionada con el valor de X_L por la siguiente expresión:

$$C_L = (X_L - X_B)/m \quad (IV.2)$$

en la que:

m : es la sensibilidad analítica.

Sustituyendo la ecuación IV.1 en la IV.2 se tiene:

$$C_L = (k \cdot \sigma_B)/m \quad (IV.3)$$

Este valor de C_L será un fiel reflejo del límite de detección cuando m se encuentre bien definida y el valor de la ordenada en el origen de la curva de calibrado sea esencialmente cero.

El uso de $k = 3$ en la expresión IV.3, permite un nivel de confianza de 99.68% y así se asegura que una magnitud analítica $X_L \geq X_B + 3\sigma_B$ sea debida a la presencia de analito en una disolución problema y no a fluctuaciones del blanco.

El concepto de *límite de cuantificación* es la concentración de un analito que corresponde a una señal analítica, X_Q , definida por:

$$X_Q = X_B + K \sigma_B$$

recomendándose para esta definición un valor mínimo de $K = 10$.

La concentración C_Q correspondiente a este límite de cuantificación vendrá dada por:

$$C_Q = 10 \sigma_B/m \quad IV.4$$

Para la determinación de estos parámetros analíticos en los métodos que emplean volúmenes de 250, 500 y 1000 mL, se operó en la forma que se señala. Para un volumen final de 250 mL se prepararon 10 matraces aforados de 250 mL que contenían agua bidestilada. Se transfirieron a sus correspondientes frascos de polietileno, y se les añadieron 1.5 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3} \%$, 5 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Las disoluciones se agitaron durante 30 minutos, se filtraron, se llenaron las cubetas y se realizó la medida de la intensidad de fluorescencia.

Para el método de 500 mL se transvasaron a frascos de polietileno, 10 matraces de agua bidestilada de 500 mL y se añadieron 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3} \%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Las disoluciones se agitaron durante 30 minutos, se filtraron y se llenaron las cubetas de medida para proceder a la medida de la intensidad de fluorescencia.

Por último, para un volumen de 1000 mL se adicionaron 6 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3} \%$, 20 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Las disoluciones se agitaron durante 30 minutos, se filtraron y se llenaron las cubetas de medida.

La medida de la intensidad de fluorescencia se realizó, en todos los casos, después de 15 minutos de espera, cuando es estable la señal. Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

En la tabla IV.31 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla IV.31. Límite de detección y de determinación.

Muestra	%IFR ₂₅₀	%IFR ₅₀₀	%IFR ₁₀₀₀
1	34.4	51.9	54.8
2	34.9	52.0	56.4
3	32.7	51.7	56.6
4	33.0	51.8	55.1
5	32.9	51.5	55.8
6	34.1	50.4	55.8
7	32.9	51.8	55.0
8	33.4	51.5	54.3
9	33.2	50.9	56.3
10	34.0	49.6	54.8
$\overline{\%IFR}$	33.5	51.3	55.5
σ_{n-1}	0.75	0.78	0.79
CL ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.02	0.02	0.02
Ca ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.06	0.06	0.06

El límite de detección, calculado a partir de IV.3, es de $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Be(II) para 250, 500 y 1000 mL, ya que el valor de las pendientes en la recta de calibrado provoca diferencias sólo en la tercera cifra decimal que no se considera aquí significativa (0.019 , 0.019 y $0.016 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para cada volumen, respectivamente).

Por lo tanto, si la intensidad de fluorescencia en una muestra de 250 mL es $\text{IRF} > 33.5 + (3 \times 0.75) = 35.8$, en una muestra de 500 mL es $\text{IRF} > 51.3 + (3 \times 0.78) = 53.7$ y en una de 1000 mL es $\text{IRF} > 55.5 + (3 \times 0.79) = 57.9$, podemos afirmar con una certeza del 99,86% que el Be(II) está presente en dicha muestra.

El límite de cuantificación calculado a partir de la ecuación IV.4 es de $0.06 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II) para 250, 500 y 1000 mL de muestra.

IV.8.5.1. Comparación con otros métodos

El método propuesto presenta un límite de detección de $0.020 \mu\text{g.L}^{-1}$, muy inferior a los propuestos en la bibliografía para los métodos que estudian el mismo sistema en disolución.

En la tabla IV.32, se comparan el límite de detección de aquellos métodos fluorimétricos más sensibles que emplean morina como reactivo para la determinación de berilio.

Tabla IV.32. Métodos fluorimétricos para la determinación de Be(II) que emplean morina

Limite de detección ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Referencia	Condiciones
8.3	(160)	aislan el berilio por precipitación
0.5	(163)	fluorimetría en disolución
0.3	(157)	aislan el berilio por precipitación y posterior extracción (acetilacetona)
0.15	(35)	fluorimetría en disolución
0.02	ésta Memoria	F.C.I.

Por otra parte lo hemos comparado con otros métodos basados en la formación de quelatos, para la determinación fluorimétrica de berilio. Para la comparación hemos escogido aquellos métodos que son más sensibles y se indican en la tabla

IV.33. Observamos en la misma que el límite de detección más bajo se logra por la técnica de F.C.I..

Tabla IV.33. Metodos fluorimétricos para la determinación de Be(II).

reactivo	Límite de detección ^a ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	Referencia
1-amino-4-hidroxiantraquinona + α -ciclodextrina	3	(173)
Ac. o-(salicilidenamino)benzoico	2	(174)
o-piridinofenol	1.6	(175)
6-metil-1-hidroxiantrona ^b	1	(176)
2-etil-3-metil-5-hidroxicromona ^b	1	(177)
2-hidroxi-4-metilanilina-N-2- hidroxi-5-metilbencilidina	1	(178)
Ac. o-(salicilidenamino)-3,5- dimetilbenceno arsónico ^b	1	(179)
Ac. 2-quinizarin sulfónico	1	(180)
Ac. o-(salicilidenamino)benceno arsónico ^b	0.9	(181)
6-(4-metilsalicilidenamino)-m- cresol	0.8	(182)
Ac. resorciliden-o-aminofenil arsónico	0.4	(183)
Ac. o-(salicilidenamino)-2- hidroxi-benceno sulfónico	0.4	(184)
2-etil-5-hidroxi-7-metoxi- isoflavona ^b	0.4	(185)
Ac. 2-hidroxi-3-naftoico ^b	0.18	(186)
4-hexiloxisalicilaldehído 4-etoxi- salicilidenhidrazona ^c	0.1	(187)
Morina- FCI	0.02	ésta Memoria

^a o mínima concentración empleada en el calibrado.

^b procedimiento de extracción.

^c fluorescencia de excitación sincrónica.

IV.8.6. SENSIBILIDAD DE LOS METODOS PROPUESTOS

El término *sensibilidad* es, aún hoy día, una de las cuestiones más controvertidas dentro del contexto de la Química Analítica y disciplinas allegadas.

El concepto de sensibilidad de un procedimiento analítico se define como la derivada de la magnitud analítica dependiente de la concentración de analito, respecto de dicha concentración. De esta forma el valor de la sensibilidad está siendo aceptado como el de la pendiente de la curva de calibrado, el cual se denomina de acuerdo con la I.U.P.A.C. como *sensibilidad analítica*. Sin embargo, la medida de la sensibilidad no debe restringirse al simple cálculo de esta pendiente ya que las dispersiones originadas en la línea de calibración influirán notoriamente en la misma. Así, de acuerdo con García-Sánchez y Cruces-Blanco (188), la sensibilidad se define como la relación existente entre ésta pendiente y la desviación normal del método. Lógicamente, la sensibilidad se incrementará con el valor de dicha pendiente y la desviación normal, esto es, con el aumento de la precisión. Esta magnitud, por tanto, es un excelente criterio para la comparación de técnicas y métodos analíticos ya que a mayor sensibilidad serán más cortos los intervalos de confianza y, consecuentemente, se obtendrá una mayor precisión.

Utilizando los datos aportados por las experiencias anteriores (curvas de calibrado) hemos realizado el cálculo de la sensibilidad de este método para los distintos volúmenes de disolución empleados, encontrando los resultados que se recogen en la tabla IV.34.

Tabla IV.34. Sensibilidad analítica

Volumen disolución (mL)	sensibilidad analítica ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
250	0.005
500	0.005
1000	0.004

IV.8.7. RESUMEN DE LOS PARAMETROS ANALITICOS

En la tabla IV.35 se resumen los parámetros analíticos calculados para los tres volúmenes finales.

Tabla IV.35. Parámetros analíticos.

parámetro	250 mL	500 mL	1000 mL
ordenada en el origen	-2.2	1.5	-3.1
pendiente	117.94	124.03	144.70
rango lineal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.10-0.70	0.10-0.70	0.10-0.70
coeficiente de correlación	0.997	0.999	0.996
límite de detección ($k = 3$) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.02	0.02	0.02
límite de determinación ($k = 10$) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.06	0.06	0.06
RSD (%)	1.7	1.4	1.2
sensibilidad analítica	0.005	0.005	0.004

INFLUENCIA DE IONES EXTRANOS
ELIMINACION DE INTERFERENCIAS

IV.9.1. INFLUENCIA DE IONES EXTRAÑOS

Se ha estudiado la influencia que la presencia de los iones más frecuentes en aguas, causa en la determinación de Be(II) por el método operatorio propuesto en fase resina. Se han elegido estos iones porque es precisamente en aguas, naturales o no, donde se pretende aplicar los métodos propuestos. Asimismo, se han seleccionado otros iones que pueden actuar como enmascarantes y ayudar a eliminar las posibles interferencias.

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

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

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

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas IV.36-IV.47 y en las figuras IV.34-IV.45.

Tabla IV.36. Interferencia del ión NO_3^- para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C (\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/C_{\text{Be(II)}})$	Er (%)
NO_3^-	0.4	0.4	0	0.2
	4	0.4	1	0.5
	40	0.4	2	1.7
	400	0.4	3	2.8
	4000	0.4	4	3.5
	40000	0.4	5	24.9

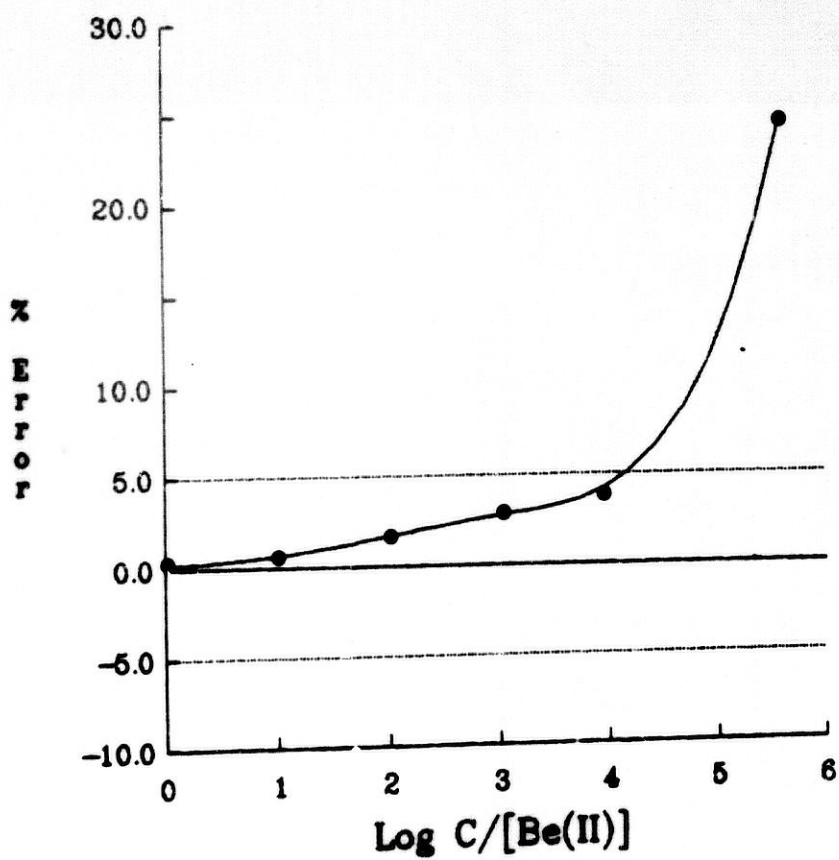


Figura IV.34. Interferencia de NO_3^-

Tabla IV.37. Interferencia del ión Cl^- para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C (\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/C_{\text{Be(II)}})$	Er (%)
Cl^-	0.4	0.4	0	0
	4	0.4	1	-1.2
	40	0.4	2	-0.8
	400	0.4	3	3.7
	4000	0.4	4	4.0
	8000	0.4	4.3	4.9
	400000	0.4	6	12.8

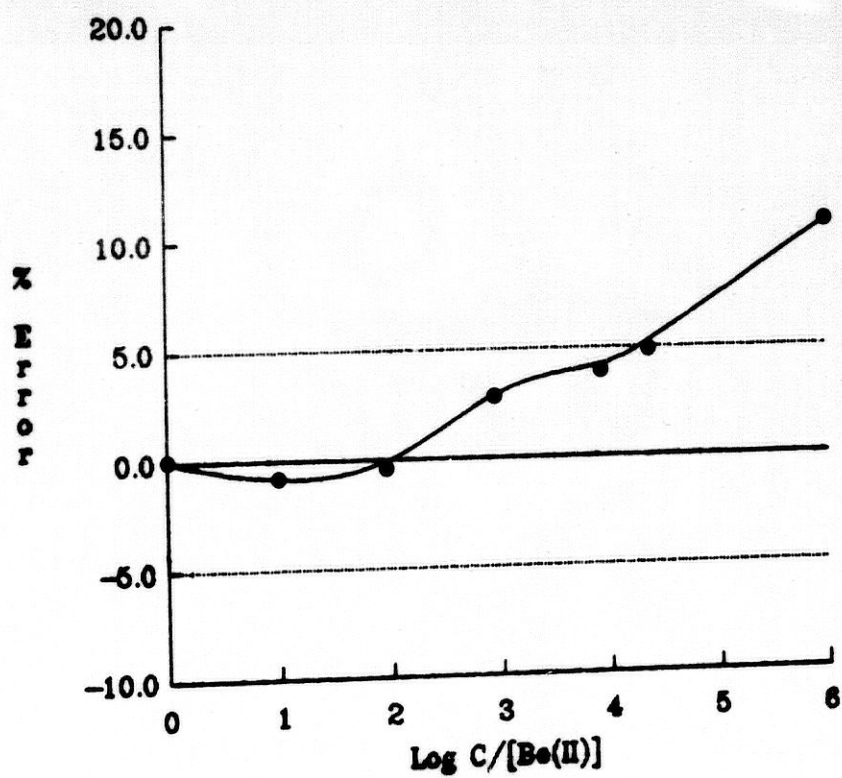


Figura IV.35. Interferencia de Cl^-

Tabla IV.38. Interferencia del ión F^- para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C (\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C / C_{\text{Be(II)}})$	Er(%)
F^-	0.4	0.4	0	0
	4	0.4	1	1.6
	40	0.4	2	1.6
	400	0.4	3	1.4
	4000	0.4	4	1.8
	40000	0.4	5	7.4

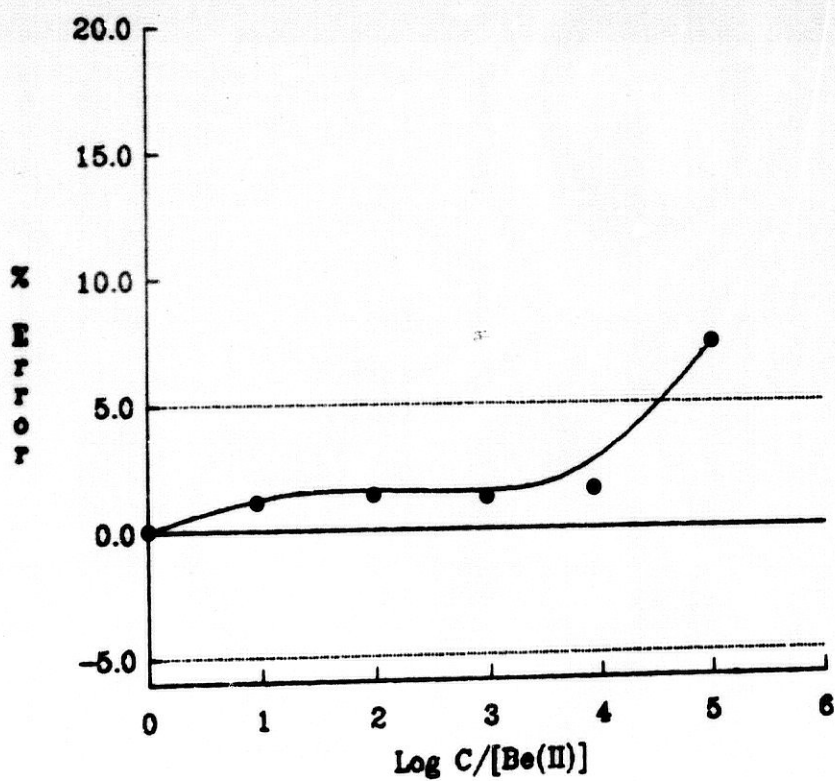


Figura IV.36. Interferencia de F^-

Tabla IV.39. Interferencia del ión SO_4^{2-} para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C (\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/C_{\text{Be(II)}})$	Er (%)
SO_4^{2-}	0.4	0.4	0	0.3
	4	0.4	1	0
	40	0.4	2	0.5
	400	0.4	3	1.1
	4000	0.4	4	3.7
	20000	0.4	4.7	5.0
	40000	0.4	5	14.4

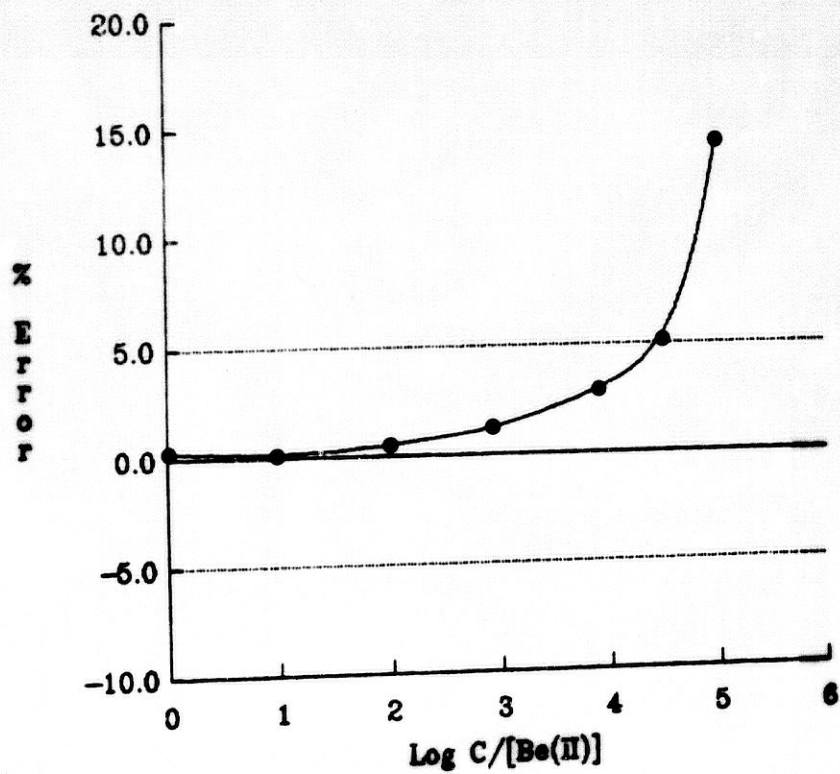


Figura IV.37. Interferencia de SO_4^{2-}

Tabla IV.40. Interferencia del ión CO_3^{2-} para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C (\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/C_{\text{Be(II)}})$	Er(%)
CO_3^{2-}	0.4	0.4	0	-0.9
	4	0.4	1	-1.1
	40	0.4	2	-1.8
	400	0.4	3	2.1
	4000	0.4	4	4.9
	100000	0.4	5.4	6.8

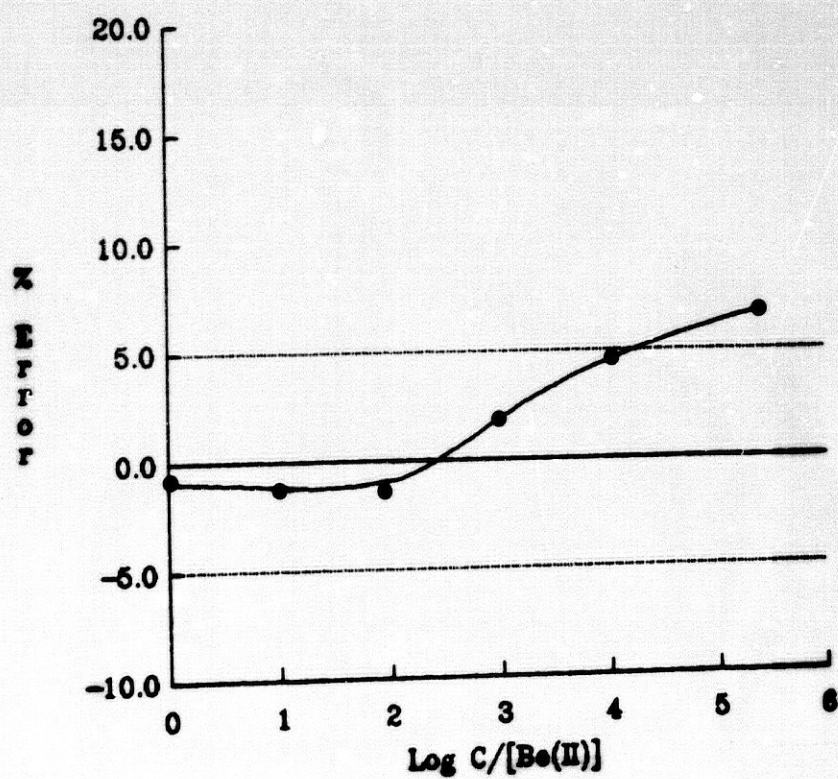


Figura IV.38. Interferencia de CO_3^{2-}

Tabla IV.41. Interferencia del ión Ca(II) para una concentración de 0.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C(\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{Be(II)}(\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log(C/C_{Be(II)})$	Er (%)
Ca(II)	0.4	0.4	0	0
	4	0.4	1	-3.3
	40	0.4	2	-4.2
	400	0.4	3	-5.1
	2000	0.4	3.7	-14.6
	4000	0.4	4	-27.7

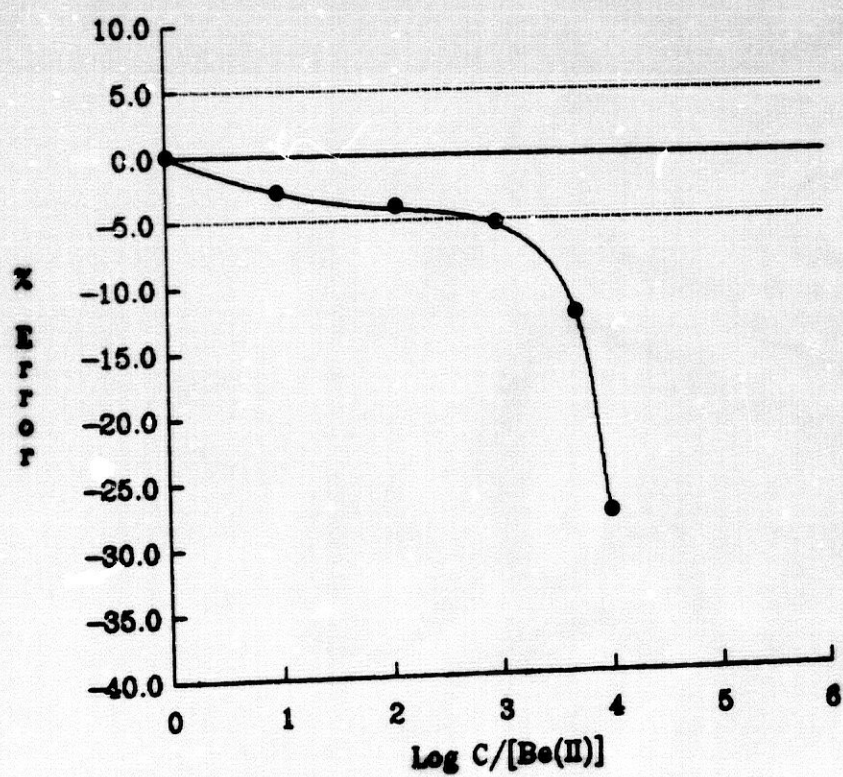


Figura IV.39. Interferencia de Ca(II)

Tabla IV.42. Interferencia del ión Al(III) para una concentración de 0.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C(\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}}(\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/C_{\text{Be(II)}})$	Er(%)
Al(III)	0.4	0.4	0	1.7
	4	0.4	1	4.9
	40	0.4	2	9.3
	400	0.4	3	15.0
	4000	0.4	4	24.6

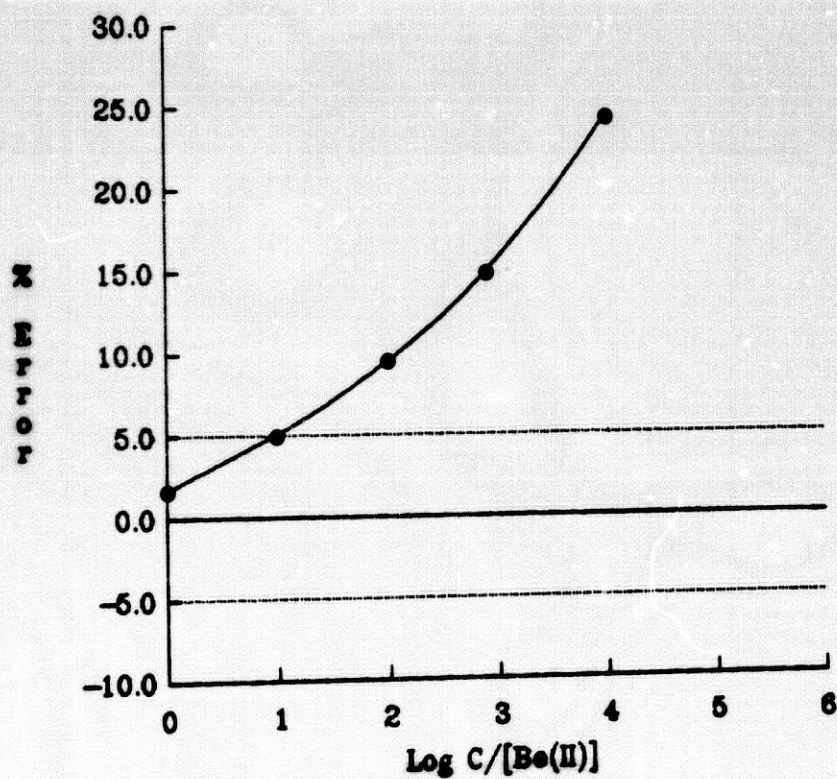


Figura IV.40. Interferencia de Al(III)

Tabla IV.43. Interferencia del ión Fe(III) para una concentración de 0.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C(\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}}(\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log(C/C_{\text{Be(II)}})$	Er (%)
Fe(III)	0.4	0.4	0	-3.0
	4	0.4	1	-3.5
	40	0.4	2	-17.1
	400	0.4	3	-32.5
	4000	0.4	4	-63.2

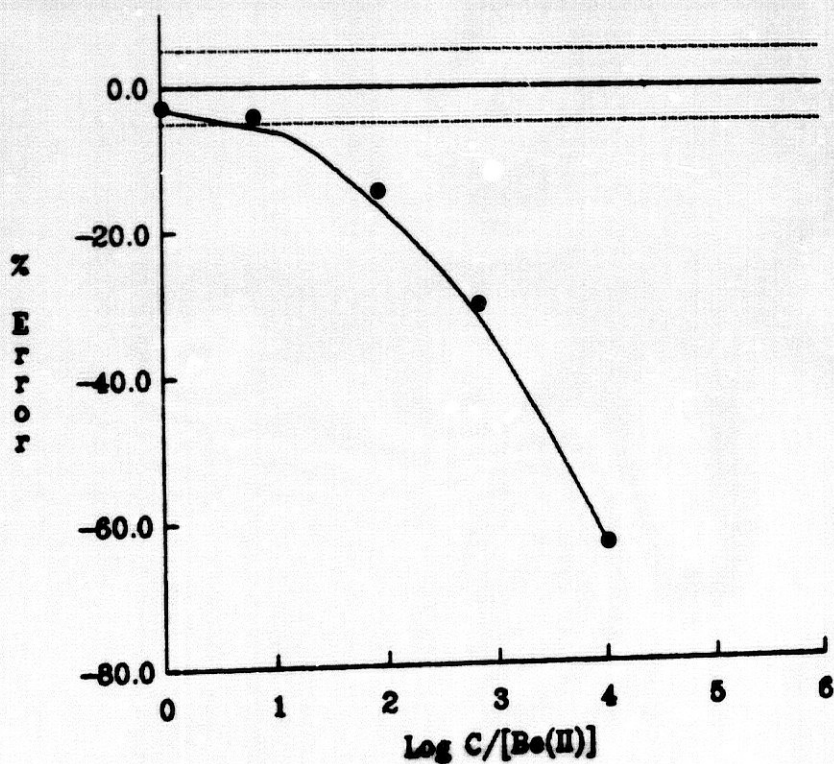


Figura IV.41. Interferencia de Fe(III)

Tabla IV.44. Interferencia de ión Mg(II) para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C (\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/C_{\text{Be(II)}})$	Er (%)
Mg(II)	0.4	0.4	0	0
	4	0.4	1	-1.6
	40	0.4	2	-3.0
	400	0.4	3	-8.8
	4000	0.4	4	-14.4

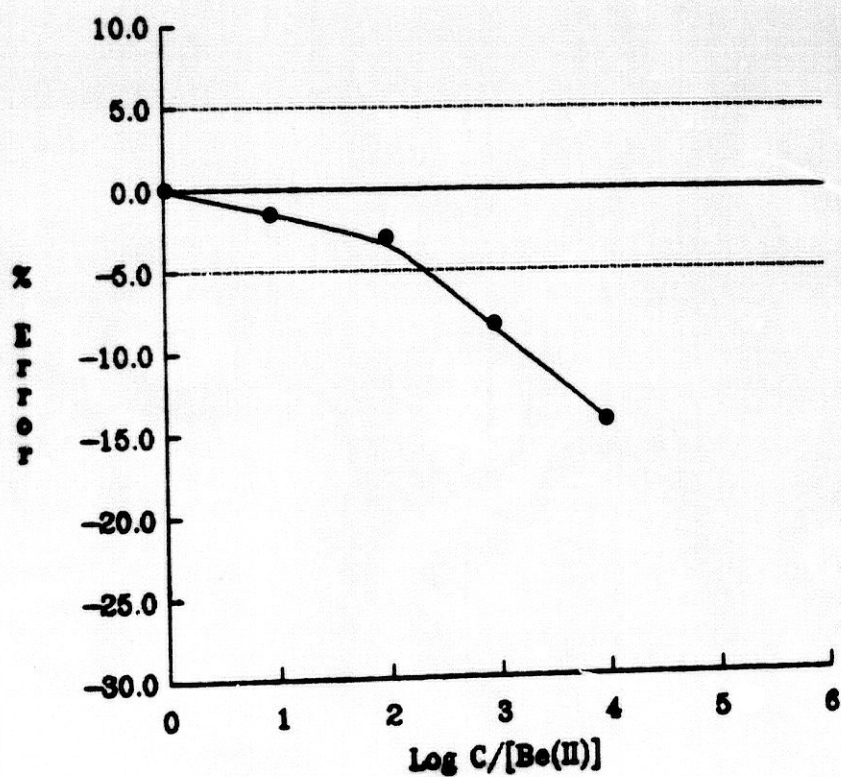


Figura IV.42. Interferencia de Mg(II)

Tabla IV.45. Interferencia del ión SiO_3^{2-} para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C(\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}}(\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log(C/C_{\text{Be(II)}})$	Er(%)
SiO_3^{2-}	0.4	0.4	0	0
	4	0.4	1	1.9
	40	0.4	2	2.1
	400	0.4	3	2.6
	4000	0.4	4	3.8
	8000	0.4	4.3	6.2

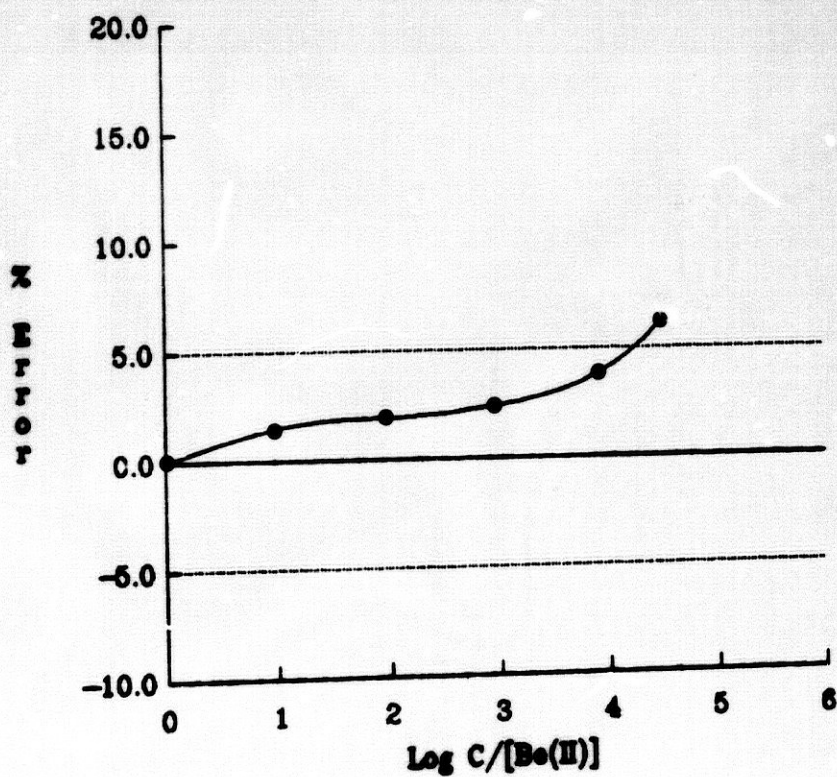


Figura IV.43. Interferencia de SiO_3^{2-}

Tabla IV.46. Interferencia de AEDT para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C (\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/C_{\text{Be(II)}})$	Er (%)
AEDT	0.4	0.4	0	0
	4	0.4	1	0
	40	0.4	2	0.9
	400	0.4	3	3.3
	4000	0.4	4	4.2
	40000	0.4	5	8.9

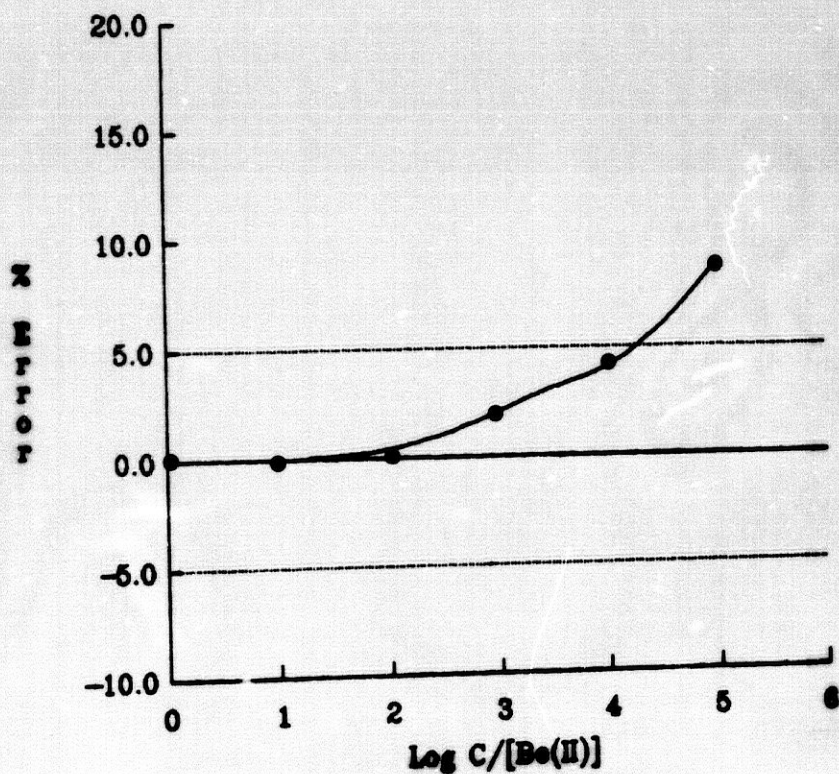


Figura IV.44. Interferencia de AEDT

Tabla IV.47. Interferencia del ión BF_4^- para una concentración de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio.

Ión	$C (\mu\text{g.L}^{-1})$	$C_{\text{Be(II)}} (\mu\text{g.L}^{-1})$	$\log (C/C_{\text{Be(II)}})$	Er (%)
BF_4^-	0.4	0.4	0	0
	4	0.4	1	0.2
	40	0.4	2	1.2
	400	0.4	3	3.6
	4000	0.4	4	4.8
	40000	0.4	5	8.1

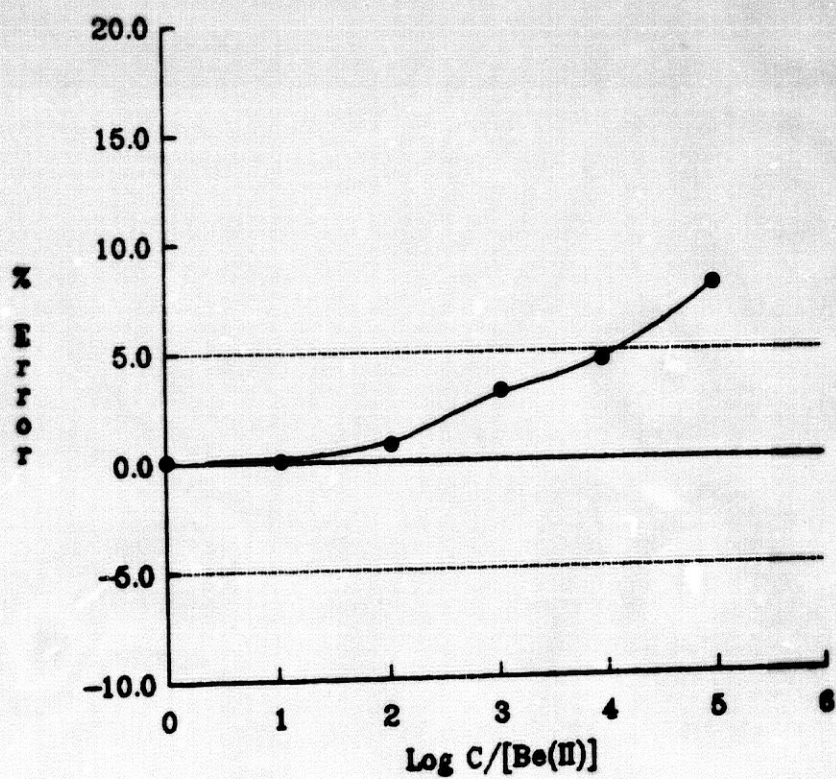


Figura IV.45. Interferencia de BF_4^-

En la tabla IV.48, se resumen los datos de tolerancia para los distintos iones extraños obtenidos a partir de las figuras IV.34-IV.45, con el criterio adoptado.

Tabla IV.48. Tolerancia de los iones extraños.

Ión extraño	Tolerancia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
F ⁻	32000
SO ₄ ²⁻	20000
Cl ⁻	12000
AEDT	10000
NO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	8000
SiO ₃ ²⁻	6000
BF ₄ ⁻	4000
Ca(II)	400
Mg(II)	90
Fe(III), Al(III)	5

De la observación de la anterior tabla IV.48 y figuras IV.34-IV.45, puede deducirse:

- El ión fluoruro no interfiere en relación en peso de ión extraño/Be(II) igual o inferior a 80000.
- Presentan interferencia moderada: SO₄²⁻, Cl⁻, AEDT, NO₃⁻, CO₃²⁻, SiO₃²⁻ y BF₄⁻ cuya relación en peso sea igual ó inferior a 10000.
- Causan una gran interferencia la presencia de los iones Ca(II), Mg(II), Fe(III) y Al(III). Dado que su concentración en las aguas a analizar es superior a las tolerancias determinadas en el

estudio, se procede con la ayuda de enmascarantes a eliminar la posible interferencia de cada uno de ellos.

- Todos los iones interfieren de forma positiva, salvo el Ca(II) , Fe(III) y Mg(I) que lo hacen de forma negativa. En disolución se observa que estos iones interfieren también de forma negativa, esto es, disminuyendo la señal de fluorescencia con respecto a la muestra de referencia de berilio (35,157,161).

IV.9.2. ELIMINACION DE INTERFERENCIAS

Los iones cuya presencia produce mayor interferencia en la determinación de Be(II) por el método propuesto son: Ca(II), Mg(II), Fe(III) y Al(III). Los niveles de estos iones en las muestras de agua seleccionadas para su análisis, son superiores a las tolerancias (tabla IV.48), lo que no permite la determinación de Be(II) en la misma por el método propuesto. Por tanto, es necesario proceder a su eliminación previa recurriendo para ello a la ayuda de agentes enmascarantes.

El método operatorio seguido ha sido siempre el mismo. En primer lugar, se ha establecido la posible interferencia de los agentes enmascarantes seleccionados (pag 288, 296 y 297) y con estos datos se ha estudiado la influencia que concentraciones crecientes de ión interferente produce para diversas cantidades constantes de aquel.

IV.9.2.1. Eliminación de la interferencia debida a Al(III)

Una concentración igual o superior a $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III) interfiere en la determinación de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio por el método propuesto. Para eliminar la interferencia de Al(III) hemos recurrido al empleo de enmascarantes. Para ello seleccionamos tetrafluoroborato sódico (NaBF_4) entre varios

usados (F^- , AEDT, TEA, etc) y que basa su actuación en la formación de fluorocomplejos de aluminio.

Para preparar el $NaBF_4$, se disuelven 1.8 g de borax ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) junto con 3.2 g de NaF en agua bidestilada hasta unos 80 mL. A continuación se añade ácido acético hasta que el pH sea alrededor de 5 y se enrasa con bidestilada hasta 100 mL. Si se pipetea 6.06 mL de ésta disolución y enrasamos hasta 100 mL la disolución resultante será de 1 g.L^{-1} (19).

En primer lugar, se ensayó la posible interferencia provocada por este ión y se comprobó que la tolerancia del BF_4^- es de $4000 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (tabla IV.48). A continuación, se ha procedido a eliminar la interferencia producida por 4, 40 y $200 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III).

1.- Con el fin de enmascarar la interferencia provocada por la presencia de $4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III) en la determinación de $0.4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II) por el método propuesto, se realiza la siguiente experiencia.

En una serie de matraces aforados de 500 mL se diluyen 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y 2 mL de disolución de Al(III) de 1 mg.L^{-1} , de forma que en el volumen final hay $4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III) y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasan las disoluciones a botellas de polietileno de 1 L de capacidad y se añaden a cada una de ellas volúmenes crecientes de BF_4^- de 100 mg.L^{-1} .

Se prepara asimismo una disolución añadiendo 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta un volumen final de 500 mL. La medida de su intensidad de fluorescencia es la referencia para calcular la interferencia producida por la presencia de aluminio. Se transfiere a una botella de polietileno y se someten todas las muestras al siguiente tratamiento.

Se añaden 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se agitan durante 30 minutos, se filtran y se mide su intensidad de fluorescencia, después de 15 minutos.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C. En la tabla IV.49 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla IV.49. Eliminación de la interferencia de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III)

ppb BF_4^-	ppb Al(III)	Er(%)
40	4	4.8
400	4	3.2

2.- Al objeto de eliminar la interferencia provocada por $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III) en la determinación de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II) se realiza la siguiente experiencia.

En una serie de matraces aforados de 500 mL se diluyen 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y 2 mL de disolución de Al(III) de 10 mg.L^{-1} , de forma que en el volumen final hay $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III) y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasan las disoluciones a botellas de polietileno de 1 L de capacidad y se añaden a cada una de ellas volúmenes crecientes de BF_4^- de 100 mg.L^{-1} .

Se prepara asimismo una disolución añadiendo 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta un

volumen final de 500 mL. Las muestras se someten al mismo tratamiento indicado anteriormente y se mide su intensidad de fluorescencia en las mismas condiciones. En la tabla IV.50 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla IV.50. Eliminación de la interferencia de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III)

ppb BF_4^-	ppb Al(III)	Er(%)
40	40	3.8
400	40	4.1

3.- Con el fin de enmascarar la interferencia provocada por $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III) en la determinación de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II) se realiza la siguiente experiencia.

En una serie de matraces aforados de 500 mL se diluyen 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y 1 mL de disolución de Al(III) de 100 mg.L^{-1} , de forma que en el volumen final hay $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III) y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasan las disoluciones a botellas de polietileno de 1 L de capacidad y se añaden a cada una de ellas volúmenes crecientes de BF_4^- de 100 mg.L^{-1} .

Se prepara asimismo una disolución añadiendo 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta un volumen final de 500 mL. Las muestras se someten al mismo tratamiento indicado anteriormente y se mide su intensidad de fluorescencia en las mismas condiciones. En la tabla IV.51 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla IV.51. Eliminación de la interferencia de $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III)

ppb BF_4^-	ppb Al(III)	Er(%)
40	200	5.0
400	200	4.4

Como puede observarse en las anteriores tablas IV.48, IV.49 y IV.50, la cantidad óptima de BF_4^- para eliminar la interferencia de Al(III) provocada por un contenido hasta $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ es de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$. Esta cantidad de agente enmascarante nos permite analizar con seguridad las muestras de agua posteriormente seleccionadas.

IV.9.2.2. Eliminación de la interferencia debida a Fe(III)

Dado que una concentración de Fe(III) igual o superior a $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ interfiere en la determinación de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio por el método propuesto, ensayamos la adición de algún agente enmascarante para la eliminación de la interferencia.

En la bibliografía consultada, la presencia de Fe(III) en la determinación de Be(II) con morina en disolución, provoca una disminución en la señal de fluorescencia (35,161) por lo que se trata con trietanolamina, que forma complejo con el Fe(III), en medio básico, que no absorbe radiación en la región visible. Como la radiación de excitación y de emisión del complejo Be(II)-morina están en la zona visible, se elimina completamente la

interferencia de hierro. No obstante, la interferencia del hierro puede eliminarse también por adición de $C_2O_4^{2-}$, citrato, CN^- , F^- , PO_4^{3-} , CCN^- . Hemos seleccionado para la eliminación de este catión el fluoruro sódico.

Se estudió, en primer lugar, la posible interferencia provocada por este ión, estimándose que la tolerancia del F^- es de $32000 \mu g.L^{-1}$ (tabla IV.48).

Con objeto de estudiar en la práctica la eliminación de la interferencia de hierro(III) con fluoruro, se realizan diversas experiencias en las que se determina la cantidad óptima de fluoruro necesaria para la eliminación de la interferencia de diversas cantidades de hierro(III). Las cantidades estudiadas son 4, 40 y $400 \mu g.L^{-1}$ de Fe(III).

1.- Con el fin de eliminar la interferencia provocada por la presencia de $4 \mu g.L^{-1}$ de Fe(III) en la determinación de $0.4 \mu g.L^{-1}$ de Be(II) por el método propuesto, se realiza la siguiente experiencia.

En una serie de matraces aforados de 500 mL se diluyen 2 mL de disolución de Be(II) de $0.1 mg.L^{-1}$ y 2 mL de disolución de Fe(III) de $1 mg.L^{-1}$, de forma que en el volumen final hay $4 \mu g.L^{-1}$ de Fe(III) y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasan las disoluciones a botellas de polietileno de 1 L de capacidad y se añaden volúmenes crecientes de disolución de F^- de $1 g.L^{-1}$.

Se prepara asimismo una disolución diluyendo 2 mL de disolución de Be(II) de $0.1 mg.L^{-1}$ en un volumen final de 500 mL, que se emplea como referencia para calcular la interferencia producida por la presencia de hierro. Se transfiere a una botella de polietileno y se someten todas las muestras al siguiente tratamiento.

Se añaden 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de HPO_4^{2-}/PO_4^{3-} de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se agitan durante 30 minutos, se filtran y se mide su intensidad de fluorescencia, después de 15 minutos.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación 2.5 nm y rendija de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla IV.52.

Tabla IV.52. Eliminación de la interferencia de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Fe(III)

ppb F^-	ppb Fe(III)	Er(%)
4000	4	0.6
6000	4	2.0
10000	4	2.9

2.- Con el fin de enmascarar la interferencia provocada por la presencia de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Fe(III) en la determinación de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II) se realiza la siguiente experiencia.

En una serie de matraces aforados de 500 mL se diluyen 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y 2 mL de disolución de Fe(III) de 10 mg.L^{-1} , de forma que en el volumen final hay $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Fe(III) y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasan las disoluciones a botellas de polietileno de 1 L de capacidad y se añaden volúmenes crecientes de disolución de F^- de 1 g.L^{-1} .

Se prepara asimismo una disolución diluyendo 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} en un volumen final de 500 mL, que se emplea como referencia para calcular la interferencia producida por la presencia de hierro. Se transfiere a una botella de polietileno y se someten todas las muestras al tratamiento indicado para medir su intensidad de fluorescencia. Los resultados se resumen en la tabla IV.53.

Tabla IV.53. Eliminación de la interferencia de $40 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Fe(III)

ppb F^-	ppb Fe(III)	Er (%)
4000	40	-1.8
6000	40	1.5
10000	40	2.8

3.- Con el fin de enmascarar la interferencia provocada por la presencia de $400 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Fe(III) en la determinación de $0.4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II) se realiza la siguiente experiencia.

En una serie de matraces aforados de 500 mL se diluyen 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y 2 mL de disolución de Fe(III) de 100 mg.L^{-1} , de forma que en el volumen final hay $400 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Fe(III) y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasan las disoluciones a botellas de polietileno de 1 L de capacidad y se añaden volúmenes crecientes de disolución de F^- de 1 g.L^{-1} .

Se prepara asimismo una disolución diluyendo 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} en un volumen final de 500 mL,

que se emplea como referencia para calcular la interferencia producida por la presencia de hierro. Se transfiere a una botella de polietileno y se someten todas las muestras al tratamiento indicado para medir su intensidad de fluorescencia. Los resultados se resumen en la tabla IV.54.

Tabla IV.54. Eliminación de la interferencia de $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Fe(III)

ppb F^-	ppb Fe(III)	Er(%)
4000	400	-24.0
20000	400	-24.0

Se deduce, por tanto, que la interferencia de Fe(III) producida por una concentración igual a $4 \mu\text{g.L}^{-1}$ e inferior a $40 \mu\text{g.L}^{-1}$, se elimina con la presencia de fluoruro (FNa) en el medio, por lo que no es necesario recurrir a otros agentes. Para ello se añade en el agua problema una concentración de 4mg.L^{-1} lo que asegura la eliminación de la interferencia de Fe(III) hasta un nivel de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$, concentración que al ser muy superior a la presente en las aguas analizadas, nos asegura un margen de confianza suficiente.

IV.9.2.3. Eliminación de la interferencia debida al Ca(II)

Una concentración de calcio igual o superior a $400 \mu\text{g.L}^{-1}$ interfiere en la determinación de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio por el método propuesto, cantidad muy inferior a la habitualmente presente en las aguas naturales. Por ello, para eliminar la interferencia debida a este ión, ensayamos el uso del ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) como agente enmascarante. En disolución, el calcio disminuye la señal de fluorescencia (35) en la determinación de berilio con morina, por lo que se añade AEDT. Otros posibles agentes enmascarantes podrían ser citrato, tartrato, F^- .

En primer lugar, se ensayó la posible interferencia provocada por el AEDT y se comprobó que su tolerancia es de $10000 \mu\text{g.L}^{-1}$ (tabla IV.48).

Como la concentración en calcio(II) en las aguas naturales se suele encontrar comprendido entre 2 y 30mg.L^{-1} , se realizan una serie de experiencias encaminadas a establecer la concentración de agente enmascarante necesaria en cada caso.

1.- Con el fin de enmascarar la interferencia provocada por la presencia de 2mg.L^{-1} de Ca(II) en la determinación de $0.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Be(II) se realiza la siguiente experiencia.

En una serie de matraces aforados de 500 mL se introducen 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1mg.L^{-1} y 1 mL de disolución de Ca(II) de 1g.L^{-1} , de forma que en el volumen final hay 2mg.L^{-1} de Ca(II) y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasan las disoluciones a botellas de polietileno de 1 L de capacidad y se añaden cantidades crecientes de AEDT de 1g.L^{-1} .

Se prepara asimismo una disolución diluyendo 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1mg.L^{-1} en un volumen final de 500 mL,

que se emplea como referencia para calcular la interferencia producida por la presencia de calcio. Se transfiere a una botella de polietileno y se someten todas las muestras al siguiente tratamiento.

Se añaden 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se agitan durante 30 minutos, se filtran y se mide su intensidad de fluorescencia, después de 15 minutos.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla IV.55.

Tabla IV.55. Eliminación de la interferencia de 2 mg.L^{-1} de Ca(II)

ppm AEDT	ppm Ca(II)	Er(%)
5	2	-14.3
8	2	-14.3
10	2	-14.3
20	2	-19.4
100	2	3.2

2.- Para la eliminación de la interferencia provocada por la presencia de 20 mg.L^{-1} de Ca(II), se ensayan cantidades superiores de AEDT.

Para ello, en una serie de matraces aforados de 500 mL se diluyen 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y 10 mL de disolución de Ca(II) de 1 g.L^{-1} , de forma que en el volumen final hay 20 mg.L^{-1} de Ca(II) y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasan las disoluciones a botellas de polietileno de 1 L de capacidad y se añaden cantidades crecientes de AEDT- Na_2 sólido. Una vez disuelto se continúa la experiencia como se indica a continuación.

Se prepara asimismo una disolución diluyendo 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} en un volumen final de 500 mL, que se emplea como referencia para calcular la interferencia producida por la presencia de calcio. Se transfiere a una botella de polietileno y se someten todas las muestras al tratamiento indicado anteriormente.

Los resultados obtenidos se indican en la tabla IV.56.

Tabla IV.56. Eliminación de la interferencia de 20 mg.L^{-1} de Ca(II)

ppm AEDT	ppm Ca(II)	Er (%)
400	20	13.2
600	20	11.1
800	20	0.4

3.- Para la eliminación de la interferencia provocada por la presencia de 30 mg.L^{-1} de Ca(II), se ensayan cantidades superiores de AEDT.

Para ello, en una serie de matraces aforados de 500 mL se diluyen 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y 15 mL de disolución de Ca(II) de 1 g.L^{-1} , de forma que en el volumen final hay 30 mg.L^{-1} de Ca(II) y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasan las disoluciones a botellas de polietileno de 1 L de capacidad y se añaden cantidades crecientes de AEDT- Na_2 sólido. Una vez disuelto se continúa la experiencia como se indica a continuación.

Se prepara asimismo una disolución diluyendo 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} en un volumen final de 500 mL, que se emplea como referencia para calibrar la interferencia producida por la presencia de calcio. Se transfiere a una botella de polietileno y se someten todas las muestras siguiente tratamiento descrito.

Los resultados se indican en la tabla IV.57.

Tabla IV.57. Eliminación de la interferencia de 30 mg.L^{-1} de Ca(II)

ppm AEDT	ppm Ca (II)	Er (%)
800	30	-6.9
1000	30	-4.7
1200	30	-0.2

Se observa en todos los ensayos que la interferencia de Ca(II) se elimina con AEDT. Como grandes cantidades de AEDT interfieren (tolerancia $10000 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) y es necesaria una alta concentración de este agente enmascarante para eliminar la

interferencia, la cantidad de AEDT a añadir es función del contenido en Ca(II). Así para un nivel de calcio de 20 mg.L^{-1} es necesario un exceso de 40 veces (w/w), mientras que para 2 mg.L^{-1} de Ca(II) es necesario un exceso de 50 veces (w/w).

IV.9.2.4. Eliminación de la interferencia debida al Mg(II)

Una concentración de igual o superior a $90 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Mg(II) interfiere en la determinación de $0.4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de berilio por el método propuesto. Por ello, para eliminar la interferencia de Mg(II) ensayamos ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) como agente enmascarante.

Se ensaya la cantidad de AEDT optimizada para la eliminación de la interferencia de Ca(II) en las aguas a analizar. El estudio se hace en presencia de 30 mg.L^{-1} de Ca(II) ya que éste es un acompañante habitual del magnesio.

Para ello, en una serie de matraces aforados de 500 mL se diluyen 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} y 15 mL de disolución de Ca(II) de 1 g.L^{-1} , de forma que en el volumen final haya 30 mg.L^{-1} de Ca(II), además se añaden a cada matraz 10 mL de disolución de Mg(II) de 1 g.L^{-1} , de forma que en el volumen final haya 20 mg.L^{-1} y agua bidestilada hasta el enrase.

Se transvasan las disoluciones a botellas de polietileno de 1 L de capacidad y se añaden 0.6 g de AEDT (1200 mg.L^{-1}).

Se prepara asimismo una disolución diluyendo 2 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} en un volumen final de 500 mL, que se emplea como referencia para calcular la interferencia producida por la presencia de magnesio y calcio. Se transfiere a una botella de polietileno y se someten todas las muestras al siguiente tratamiento.

Se añaden 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3} \%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se agitan durante 30 minutos, se filtran y se mide su intensidad de fluorescencia, después de 15 minutos.

Las condiciones operatorias para su medida fueron: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.1 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla IV.58.

Tabla IV.58. Eliminación de la interferencia de Ca(II) y Mg(II)

ppm Mg(II)	ppm Ca(II)	ppm AEDT	Er(%)
20	30	800	-7.9
20	30	1000	-5.6
20	30	1200	2.7

La presencia de hasta 30 mg.L^{-1} de Ca(II) y hasta 20 mg.L^{-1} de Mg(II) se elimina con la adición de 1200 mg.L^{-1} de AEDT. No obstante, es de señalar que si los contenidos son muy diferentes será necesario un estudio previo para la eliminación de la interferencia de éstos.

IV.9.2.5. Eliminación de la interferencia debida al cloro

Se ha observado que la habitual presencia de cloro en las aguas tratadas (agua de grifo) provoca una disminución de la intensidad de fluorescencia, debido a la oxidación de la morina.

Para eliminar la presencia de cloro en el agua de grifo se emplea carbón activo. Se añaden 5 g de carbón activo a 500 mL de muestra de agua, y se mantienen en contacto, por agitación, durante aproximadamente 5 minutos. A continuación se filtra a través de una membrana de papel de filtro de 0.45 μm (Millipore). Se comprueba en el filtrado la ausencia de cloro mediante el ensayo con o-tolidina en medio ácido, observándose que no aparece la característica coloración amarilla.

APLICACIONES ANALITICAS

IV.10.1. APLICACIONES ANALITICAS

El estudio de la aplicabilidad de los métodos propuestos, entendemos que es clave en la Espectrometría en Fase Sólida por ser uno de los fines de esta nueva metodología analítica. Para ello, la ligera mayor complejidad experimental que presenta debe ir compensada por una adecuada aplicación a muestras reales.

Se ha planteado la aplicación de éste método a la determinación de Be(II) en aguas de diversas procedencias. Como ejemplos se han seleccionado tres tipos diferentes: *agua de manantial*, de la que a su vez se eligieron dos, una de media mineralización (Lanjarón) y otra de baja (Ortigosa del Monte), *agua de pantano* y *agua urbana tratada*.

IV.10.1.1. Procedimiento propuesto para el análisis de aguas

Se toman 500 mL de muestra de agua en un frasco de polietileno, se añaden 2 mL de disolución de BF_4^- 0.01 mg.L^{-1} , 2 mL de disolución de F^- de 1 mg.L^{-1} , la cantidad de AEDT- Na_2 necesario para eliminar la interferencia de calcio y magnesio y una vez disuelto, se añaden 3 mL de disolución etanólica de morina de $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de HPO_4^{2-} / $\text{H}_2\text{O}_4^{2-}$ de $\text{pH} = 11.50$ (en el caso de agua bruta es necesario añadir 60 mL para mantener el pH) y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

La mezcla se agita mecánicamente durante 30 minutos, y los siguientes pasos son los que se indican en el procedimiento operativo.

Se emplea el método de adición de patrón o la medida directa referida a la recta de calibrado (si las pendientes de ambas rectas son del mismo orden), para determinar el contenido de Be(II) en las aguas.

IV.10.1.2. Procedimientos empleados para la determinación de la composición de las aguas estudiadas

Para la determinación de SO_4^{2-} se utiliza el método turbidimétrico (190) para lo cual se precipita con ión Ba^{2+} en condiciones tales que se formen cristales de tamaño uniforme de BaSO_4 , que deben mantenerse en suspensión homogénea durante un período de tiempo que resulte suficiente para medir la turbidez que la misma produzca. El contenido en SO_4^{2-} de cada muestra se calcula a partir de la curva de calibrado previamente obtenida.

El procedimiento empleado para la determinación de cloruros (190) es el clásico método volumétrico de Mohr que se basa en la formación de una sal de plata insoluble y en el uso de cromato como indicador.

La determinación de Ca(II) y Mg(II) (191) se hace por medida de absorción atómica utilizando llama de aire-acetileno.

La determinación de Na(I) y K(I) (190) se hace por fotometría de llama.

La determinación de Al(III) se lleva a cabo por absorción atómica (191). Por su baja concentración se preconcentra por extracción en metilisobutilcetona en presencia de oxina. La llama utilizada es de óxido nitroso-acetileno.

Igual ocurre para la determinación de Fe(III) (191), se preconcentra con dietilditiocarbamato sódico (DDC) extrayendo con metilisobutilcetona. La medida se hace por absorción atómica en llama de óxido nitroso-acetileno.

IV.10.1.3. Determinación de Be(II) en aguas de manantial

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

1.- AGUA DE ORTIGOSA DEL MONTE.

En primer lugar se ha aplicado el método propuesto al agua de manantial de Ortigosa del Monte, cuya composición media en componentes mayoritarios hemos establecido, señalándose los valores encontrados en la tabla IV.59 junto con la técnica utilizada.

Tabla IV.59. Composición del agua de Ortigosa del Monte

<i>Especie</i>	<i>Concentración (mg. L⁻¹)</i>	<i>Técnica aplicada</i>
Bicarbonatos (HCO ₃ ⁻)	10.0	Volumetría ac-base (190)
Sodio (Na ⁺)	4.4	Espect. Emisión (190)
Calcio (Ca ²⁺)	2.0	Absorción Atómica (191)
Nitratos (NO ₃ ⁻)	0.9	Polarografía (192)
Cloruros (Cl ⁻)	0.8	Volumetría precip. (190)
Magnesio (Mg ²⁺)	0.2	Absorción Atómica (191)
Aluminio (Al ³⁺)	0.015	Absorción Atómica (191)
Hierro (Fe ³⁺)	0.003	Absorción Atómica (191)

De acuerdo con la tolerancia que presenta el método para Be(II) propuesto, interfieren las concentraciones de Ca(II), Mg(II), Al(III) y Fe(III) presentes en el agua a analizar, por lo que será necesario eliminar la interferencia de éstos. Para ello, se escogen aquellas cantidades de agentes enmascarantes, estudiados en el apartado IV.9.2, que forman complejos con los iones interferentes permitiendo la determinación de Be(II). Añadiendo $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de BF_4^- se eliminan la interferencia de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Al(III). La adición de 4 mg.L^{-1} de F^- suprime la posible interferencia del Fe(III), cuya concentración se encuentra en el límite de tolerancias del método. Por último, la concentración de Ca(II) y Mg(II) presente en el agua se elimina añadiendo 100 mg.L^{-1} de AEDT.

IV.10.1.3.1. Método analítico empleado y resultados

Como método analítico de trabajo se ha empleado la medida directa referida a la recta de calibrado.

- MEDIDA DIRECTA

Para la determinación del contenido de Be(II) en el agua de Ortigosa del Monte, se tomaron 500 mL de la misma a los que se añadieron la cantidad de agentes enmascarantes que se indican: 2 mL de disolución de BF_4^- de 0.01 g.L^{-1} , 2 mL de disolución de F^- de 1 g.L^{-1} y 5 mL de disolución de AEDT de 10 g.L^{-1} .

A continuación se añadieron 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de $\text{pH} = 11.50$ y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se preparó también un blanco de agua bidestilada al que se le añadieron los mismos reactivos y se sometió al mismo tratamiento.

Se agitó durante 30 minutos y los siguientes pasos fueron los que se indican en el método operatorio.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.25 y temperatura 20°C.

El proceso se repite tres veces y los valores de la intensidad de fluorescencia se trasladaron a la recta de calibrado previamente obtenida, cuyos resultados se indican en la tabla IV.60.

Tabla IV.60. Recta de calibrado

ppb Be (II)	%IFR
0	0
0.1	8.0
0.3	36.7
0.5	72.2
0.7	94.8

La recta de calibrado obtenida corresponde a la siguiente ecuación, una vez ajustada por mínimos cuadrados:

$$\text{IFR} = 141.85 [\text{Be(II)}] - 3.05 \quad r = 0.996$$

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

El límite de determinación correspondiente a éstas condiciones (presencia de enmascarantes) es de:

$$k = 10 \times 0.87 / 141.85 = 0.06 \mu\text{g.L}^{-1}$$

Los resultados obtenidos en la determinación de Be(II) en el agua de Ortigosa del Monte se indican en la tabla IV.61.

Tabla IV.61. Contenido de Be(II) en el agua de Ortigosa del Monte

Vol. agua bidest. (mL)	Vol. Problema (mL)	%IFR
500	---	121.8
---	500	115.8
---	500	118.8
---	500	119.3

Las tres medidas de intensidad de fluorescencia son similares a las obtenidas para el blanco, por lo que el contenido de Be(II) en agua de Ortigosa del Monte es inferior a $0.06 \mu\text{g.L}^{-1}$, valor que corresponde al límite de determinación calculado en éste caso.

2.- AGUA DE LANJARON.

En el agua de Lanjarón, la composición media en componentes mayoritarios se da en la tabla IV.62, junto con las técnicas empleadas para su determinación.

Tabla IV.62. Composición del agua de Lanjarón

Especie	Concentración (mg. L ⁻¹)	Técnica aplicada
Bicarbonatos (HCO ₃ ⁻)	130.0	Volumetría ac-base (190)
Calcio (Ca ²⁺)	32.0	Absorción Atómica (191)
Sulfatos (SO ₄ ²⁻)	20.0	Turbidimetría (190)
Magnesio (Mg ²⁺)	12.0	Absorción Atómica (191)
Potasio (K ⁺)	1.0	Espect. Emisión (190)
Aluminio (Al ³⁺)	0.005	Absorción Atómica (191)
Hierro (Fe ³⁺)	0.02	Absorción Atómica (191)

De acuerdo con la tolerancia que presenta el método para Be(II) propuesto, interfieren Ca(II), Mg(II), Al(III) y Fe(III), por lo que será necesario eliminar la interferencia de éstos. Para ello, se escogen aquellas cantidades de agentes enmascarantes estudiados en el apartado IV.9.2. Añadiendo 40 µg.L⁻¹ de BF₄⁻ se elimina la posible interferencia de Al(III) cuya concentración se encuentra en el límite de tolerancias del método. Se añade 4 mg.L⁻¹ de F⁻ que suprime el Fe(III) interferente y, por último, la concentración de Ca(II) y Mg(II) presente en el agua exige 1200 mg.L⁻¹ de AEDT.

IV.10.1.3.2. Método analítico y resultados

Como método analítico de trabajo se empleó el de la curva de calibrado con adición de patrón.

- ADICION DE PATRON

Para la determinación de Be(II) en el agua de Lanjarón, se realizó una recta de calibrado por adición de patrón de la siguiente manera. Se tomaron en cuatro matraces aforados, 500 mL de agua a analizar y una vez transferidos a frascos de polietileno, se añadieron 2 mL de disolución de BF_4^- de 0.01 g.L^{-1} , 2 mL de disolución de F^- de 1 g.L^{-1} , 0.6 g de AEDT y una vez disuelto, se añaden a cada uno de ellos 0, 0.25, 0.50 y 1.50 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} .

A continuación se adicionan 3 mL de disolución etálica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de $\text{pH} = 11.50$ y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25. Se preparó también un blanco de agua bidestilada que no contenía berilio.

Se agitan durante 30 minutos y se sigue el procedimiento tal y como se describe en el método operatorio.

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

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{exc} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.25 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla IV.63, y se ha representado graficamente en la figura IV.46, la recta de calibrado de mejor ajuste.

Tabla IV.63. Contenido de Be(II) en el agua de Lanjarón

Vol. agua bidest. (mL)	Vol. Problema (mL)	Be(II) añadido ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%IFR
500	---	----	0
---	500	----	9.5
---	500	0.05	11.8
---	500	0.10	15.0
---	500	0.30	35.3
.....			
500	---	----	0
---	500	----	8.3
---	500	0.05	11.3
---	500	0.10	17.8
---	500	0.30	34.8
.....			
500	---	----	0
---	500	----	9.0
---	500	0.05	14.0
---	500	0.10	18.8
---	500	0.30	36.8

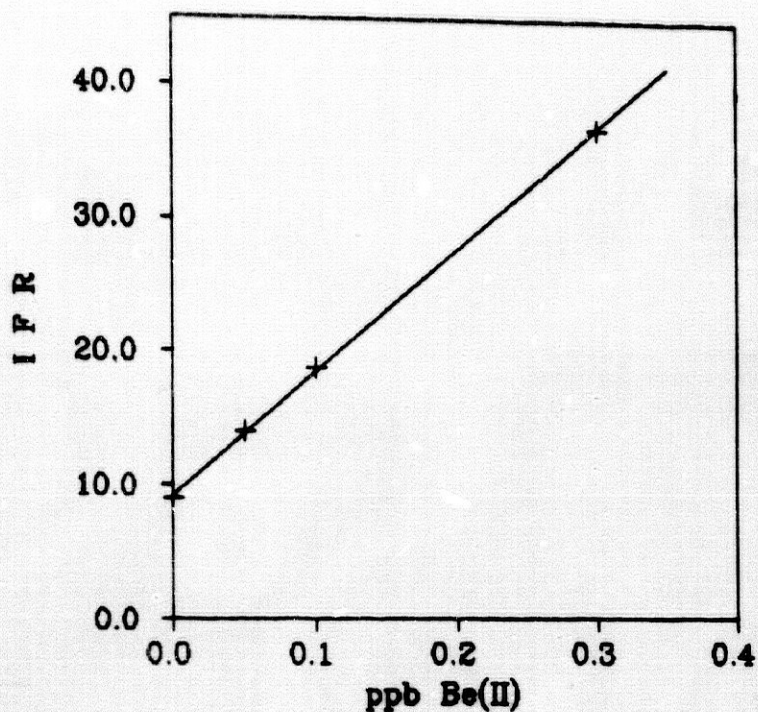


Figura IV.46. Recta de calibrado por adición de patrón

Ajustando las rectas obtenidas por mínimos cuadrados se obtienen los resultados que se indican en la tabla IV.64.

Tabla IV.64.

$IFR = f[Be(II)]$	coef. correlac.	$[Be(II)]$ ($\mu g \cdot L^{-1}$)
$IFR = 7.86 + 89.04 [Be(II)]$	0.992	0.12
$IFR = 7.89 + 89.88 [Be(II)]$	0.997	0.10
$IFR = 9.28 + 91.93 [Be(II)]$	0.999	0.09

El valor medio de la concentración de Be(II) encontrada es: $0.10 \pm 0.01 \mu\text{g.L}^{-1}$.

El límite de determinación en este caso se calcula a partir del valor medio de la pendiente de las rectas de calibrado por adición de patrón y es:

$$k = 10 \times 0.87 / 90.62 = 0.09 \mu\text{g.L}^{-1}$$

Al realizar la determinación de Be(II) en el agua de Lanjarón mediante el método de adición de patrón, se observó una disminución en la pendiente con respecto a la de la recta de calibrado. Esta pérdida de sensibilidad debida al efecto matriz producido por el conjunto de iones presentes en el agua, así como la influencia de la fuerza iónica, puede evaluarse por el cociente entre las pendientes de la recta de calibrado y la media de la pendiente de las rectas de adición de patrón.

El valor medio de la pendiente de las rectas de calibrado por adición de patrón es de 90.62. Por lo que la pérdida de sensibilidad evaluada es del orden de 1.4.

IV.10.1.4. Determinación de Be(II) en agua de pantano

El agua procede del pantano de Quentar (Granada), dónde se recogió con fecha de 2 de Mayo de 1988. En el momento de la toma de muestra se añadió HClO_4 como conservante (0.25 mL/1000 mL). Ya en el laboratorio se filtró a través de una membrana de Millipore de $0.45\text{-}\mu\text{m}$, y se almacenó en un frasco de polietileno perfectamente limpio y a 4°C .

La muestra de agua recogida para el estudio se analizó previamente, mediante las técnicas adecuadas en cada caso, que ya antes se describen, y presenta el contenido que se indica en la siguiente tabla IV.65.

Tabla IV.65. Composición del agua de pantano

<i>Especie</i>	<i>Concentración (mg. L⁻¹)</i>	<i>Técnica aplicada</i>
Calcio (Ca ²⁺)	31.0	Absorción Atómica (191)
Sulfatos (SO ₄ ²⁻)	18.5	Turbidimetría (190)
Magnesio (Mg ²⁺)	16.0	Absorción Atómica (191)
Nitratos (NO ₃ ⁻)	2.5	Polarografía (192)
Silice (SiO ₃ ²⁻)	5.8	Espectrofotomet. (190)
Hierro (Fe ³⁺)	0.017	Absorción Atómica (191)
Aluminio (Al ³⁺)	0.016	Absorción Atómica (191)
Fosfatos (PO ₄ ³⁻)	<0.07	Espectrofotomet. (190)

Como en anteriores casos interfieren Ca(II), Mg(II), Al(III) y Fe(III) en la determinación del contenido en Be(II) presente en el agua, es necesario añadir las cantidades de reactivos enmascarantes que se deducen en el estudio de la eliminación de interferentes. Así, es necesario añadir 40 µg.L⁻¹ de BF₄⁻, 4000 µg.L⁻¹ de F⁻ y 1200 mg.L⁻¹ de AEDT al agua de pantano para someterla posteriormente al procedimiento indicado en el método propuesto. Se observó, por otra parte, que para mantener el pH de la disolución era necesario añadir 60 mL de disolución reguladora.

IV.10.1.4.1. Método analítico empleado y resultados

El método analítico empleado en ésta ocasión es por una parte el de la medida directa referida a la recta de calibrado y por otra el de adición de patrón, al objeto de comparar resultados.

- MEDIDA DIRECTA

En primer lugar, para la medida directa se tomaron 500 mL de agua a analizar y se añadieron 2 mL de disolución de BF_4^- de 0.01 g.L^{-1} , 2 mL de disolución de F^- de 1 g.L^{-1} , 0.6 g de AEDT y una vez disuelto, se añaden a cada uno de ellos 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 60 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de $\text{pH} = 11.50$ y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25. Se preparó asimismo un blanco de agua bidestilada que no contenía berilio y que fué sometido al mismo tratamiento.

Las muestras se equilibraron durante 30 minutos y se sometieron al mismo tratamiento indicado en el procedimiento operatorio.

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

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.25 y temperatura 20°C .

Los resultados se indican en la tabla IV.66.

Tabla IV.66. Contenido de Be(II) en el agua de pantano

Vol. agua bidest. (mL)	Vol. Problema (mL)	%IFR
500	---	108.0
---	500	105.0
---	500	107.3
---	500	108.7

Las tres medidas de intensidad de fluorescencia presentaron unos valores semejantes a los obtenidos para el blanco. •

- ADICION DE PATRON

Para la determinación de Be(II) en el agua del pantano de Quentar, se realizó una recta de adición de patrón de la siguiente manera. Se tomaron en cuatro matraces aforados, 500 mL de agua a analizar y una vez transferidos a frascos de polietileno, se añadieron 2 mL de disolución de BF_4^- de 0.01 g.L^{-1} , 2 mL de disolución de F^- de 1 g.L^{-1} , 0.6 g de AEDT y una vez disuelto, se añaden a cada uno de ellos 0, 2, 3 y 4 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} . A continuación se adicionan 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 60 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25. Se preparó también un blanco de agua bidestilada que no contenía berilio.

Se agitan durante 30 minutos y se sigue el procedimiento tal y como se describe en el método operatorio.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.25 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla IV.67.

Tabla IV.67. Contenido en Be(II) en el agua de Quentar

Vol. agua bidest. (mL)	Vol. Problema (mL)	Be(II) añadido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	%IFR
500	---	----	0
---	500	----	-5.5
---	500	0.4	18.5
---	500	0.6	39.0
---	500	0.8	53.5

Ajustando la recta obtenida por mínimos cuadrados se obtiene la función:

$$\text{IFR} = 74.64 [\text{Be(II)}] - 7.21 \quad r = 0.994$$

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

Para calcular el límite de determinación en la aplicación del método para este agua, tenemos en cuenta la pendiente de la recta de calibrado por adición de patrón.

$$K = 10 \times 0.78/74.64 = 0.10 \mu\text{g.L}^{-1}$$

El contenido de Be(II) es menor de $0.10 \mu\text{g.L}^{-1}$, valor del límite de determinación calculado en éste caso.

Al realizar la determinación de Be(II) en el agua bruta mediante el método de adición de patrón, se observó una disminución en la pendiente con respecto a la de la recta de calibrado. El cociente de pendientes calculado es 1.7.

IV.10.1.5. Determinación de Be(II) en agua urbana

Para la toma de muestra de agua urbana de Granada, con fecha de 4 de Abril de 1988, se dejó fluir el agua durante un periodo de tiempo de 15 minutos que se estimó conveniente para conseguir que la muestra fuera representativa. A continuación se añadió HClO_4 como conservante (0.25 mL/1000mL) y se almacenó en un frasco de polietileno perfectamente limpio y a 4°C.

Posteriormente se sometió a la muestra a la eliminación del cloro presente que interfiere en la señal de fluorescencia, por el procedimiento indicado en el apartado IV.9.2.5.

La muestra de agua reservada para el estudio se analizó previamente, mostrando el contenido en los componentes mayoritarios que se indica en la tabla IV.68, así como la técnica empleada en cada caso para su análisis.

Tabla IV.68. Composición del agua urbana

<i>Especie</i>	<i>Concentración (mg. L⁻¹)</i>	<i>Técnica aplicada</i>
Calcio (Ca^{2+})	25.6	Absorción Atómica (191)
Sulfatos (SO_4^{2-})	18.7	Turbidimetría (190)
Magnesio (Mg^{2+})	6.0	Absorción Atómica (191)
Nitratos (NO_3^-)	1.8	Polarografía (192)
Silice (SiO_2^{2-})	5.1	Espectrofotomet. (190)
Hierro (Fe^{3+})	0.020	Absorción Atómica (191)
Aluminio (Al^{3+})	0.160	Absorción Atómica (191)
Fosfatos (PO_4^{3-})	<0.07	Espectrofotomet. (190)

Se observa que los iones que producen mayor interferencia en el método propuesto, se hallan presentes en concentraciones superiores a la tolerancia permitida para cada uno de ellos, por lo que es necesario añadir los agentes enmascarantes estudiados en su caso. Las cantidades de cada uno y de acuerdo con el estudio realizado es de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de BF_4^- , $4000 \mu\text{g.L}^{-1}$ de F^- y 1200mg.L^{-1} de AEDT.

IV.10.1.5.1. Método analítico y resultados

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

- MEDIDA DIRECTA

Para la determinación de Be(II) en el agua de grifo, se preparan tres muestras tal y como se indica a continuación.

Para el análisis se toman 500 mL de muestra de agua tratada y se añaden 2 mL de disolución de BF_4^- de 0.01g.L^{-1} , 2 mL de disolución de F^- de 1g.L^{-1} , 0.6 g de AEDT y una vez disuelto, se añaden a cada uno de ellos 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de $\text{pH} = 11.50$ y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Las muestras se agitaron durante 30 minutos y fueron sometidas al mismo tratamiento indicado en el procedimiento operatorio.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.25 y temperatura 20°C .

Se realizan tres medidas consecutivas de la muestra y su medida se refiere a la recta de calibrado previamente obtenida y cuyos resultados se resumen en la tabla IV.69.

Tabla IV.69. Recta de calibrado

ppb Be(II)	%IFR
0	0
0.1	12.4
0.3	36.8
0.5	61.1
0.7	85.8

La recta de calibrado obtenida corresponde a la siguiente ecuación, una vez ajustada por mínimos cuadrados:

$$\text{IFR} = 122.37 [\text{Be(II)}] + 0.06 \quad r = 0.999$$

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

Los resultados obtenidos en la determinación de Be(II) en el agua urbana de Granada se indican en la tabla IV.70.

Tabla IV.70. Contenido de Be(II) en el agua urbana

%IFR	ppb [Be(II)]
13.5	0.11
9.8	0.08
11.1	0.09

El valor medio del contenido de Be(II) encontrado en el agua urbana de Granada es de $0.09 \pm 0.01 \mu\text{g.L}^{-1}$.

El límite de determinación experimental en éste caso es de:

$$k = 10 \times 0.87 / 122.37 = 0.07 \mu\text{g.L}^{-1}$$

- ADICION DE PATRON

Para la determinación de Be(II) en el agua de grifo, se realizó también una recta de adición de patrón para lo cual se tomaron en cuatro matraces aforados, 500 mL de agua a analizar y una vez transferidos a frascos de polietileno, se añadieron 2 mL de disolución de BF_4^- de 0.01 g.L^{-1} , 2 mL de disolución de F^- de 1 g.L^{-1} , 0.6 g de AEDT y una vez disuelto, se añaden a cada uno de ellos 0, 0.5 y 1.5 mL de disolución de Be(II) de 0.1 mg.L^{-1} . A continuación se adicionan 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25. Se preparó también un blanco de agua bidestilada que no contenía berilio.

Se agitan durante 30 minutos y se sigue el procedimiento tal y como se describe en el método operatorio.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.25 y temperatura 20°C .

Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla IV.71, y se ha representado gráficamente en la figura IV.47, la recta de mejor ajuste.

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

Vol. agua bidest. (mL)	Vol. Problema (mL)	Be(II) añadido ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	%IFR
500	---	----	0
---	500	----	10.3
---	500	0.1	20.0
---	500	0.3	42.3

500	---	----	0
---	500	----	8.2
---	500	0.1	20.0
---	500	0.3	40.0

500	---	----	0
---	500	----	11.5
---	500	0.1	23.3
---	500	0.3	50.0

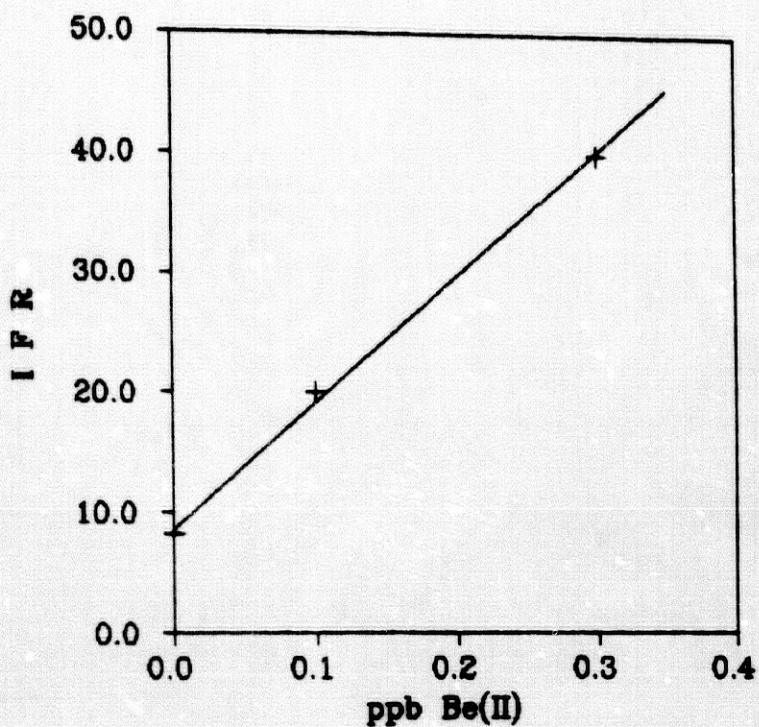


Figura IV.47. Recta de calibrado por adición de patrón

Las rectas de calibrado por adición de patrón obtenidas corresponden a ecuaciones, una vez ajustadas por mínimos cuadrados, que se resumen en la tabla IV.72, junto con el contenido de Be(II) que se deduce.

Tabla IV.72.

$IFR = f[Be(II)]$	coef. correlac.	$[Be(II)]$ ($\mu g. L^{-1}$)
$IFR = 107.36 [Be(II)] + 9.88$	0.999	0.10
$IFR = 105.14 [Be(II)] + 8.71$	0.999	0.08
$IFR = 129.07 [Be(II)] + 11.06$	0.999	0.09

El valor medio para el contenido de Be(II) en el agua de grifo de Granada, mediante el método de adición de patrón es de $0.09 \pm 0.01 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Al determinar la concentración de berilio por ambos métodos analíticos se observa que la pendiente de la recta de calibrado es del mismo orden que la obtenida por adición de patrón, el cociente calculado es de 1.2.

En la tabla IV.73, se resumen los contenidos en el análisis de aguas.

Tabla IV.73. Contenido de Be(II) en las aguas analizadas

agua	contenido de Be(II) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
	medida directa*	adición de patrón*
mineral Bezoya	<0.06	----
mineral Lanjarón	----	0.10 ± 0.01
bruta Quentar	<0.10	<0.10
grifo Granada	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01

* *media de tres determinaciones*

IV.10.1.6. ESTUDIO DE RECUPERACION

La muy baja concentración de Be(II) encontrada hacen que no hallamos comparado los resultados con ninguno de los métodos propuestos. Con los medios disponibles en el Departamento de Química Analítica, la única vía ha sido la preconcentración y el posterior análisis.

Por esta razón comprobamos la exactitud del método en la aplicación a muestras reales, realizando el siguiente estudio de recuperación de berilio.

IV.10.1.6.1. Agua mineral de Ortigosa del Monte

Para comprobar la validez del método se ha realizado un estudio de recuperación, consistente en adicionar a 500 mL de agua de Ortigosa del Monte las concentraciones de agentes enmascarantes indicadas en IV.9.2 y distintas cantidades de Be(II) de concentración conocida (0.20, 0.40 y 0.60 $\mu\text{g.L}^{-1}$) y operando según el método propuesto para el volumen indicado, medir la intensidad de fluorescencia a una $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ excitando a una longitud de onda de 457 nm, con una anchura de rendijas de 2.5 nm, factor de sensibilidad de 0.25 y manteniendo constante la temperatura a 20°C.

En la siguiente tabla IV.74, se indican los resultados obtenidos en la recta de calibrado a la que se refieren los resultados del estudio.

Tabla IV.74. Recta de calibrado

ppb Be (II)	%IFR
0	0
0.1	13.4
0.3	46.3
0.5	86.1
0.7	126.5

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

$$\text{IFR} = 181.99 [\text{Be(II)}] - 3.78 \quad r = 0.998$$

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

Los resultados obtenidos, así como el tratamiento estadístico, se recogen en la tabla IV.75 y IV.76.

Tabla IV.75. Estudio de recuperación.

cantidad añadida ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%IFR	cantidad encontrada ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%recuperado
0.20	29.7	0.18	90.0
	28.7	0.18	90.0
	34.0	0.21	105.0
0.40	66.3	0.39	97.5
	64.3	0.37	92.5
	70.5	0.41	102.5
0.60	102.0	0.58	96.7
	108.1	0.61	101.7
	103.6	0.59	98.3

Tabla IV.76. Estudio estadístico

[Be(II)] ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	σ_{n-1}	%recuperado
0.19	0.02	95.0
0.39	0.02	97.5
0.59	0.02	98.9

A la vista de los datos reflejados en las tablas IV.75 y IV.76, correspondientes a los resultados obtenidos, podemos deducir que el porcentaje de recuperación es aceptable para las condiciones de trabajo establecidas.

IV.10.1.6.2. Agua mineral de Lanjarón

Para éste estudio se toman 500 mL de agua de Lanjarón, que se transfieren a unos frascos de polietileno, se añaden las cantidades de interferentes adecuadas, y se adicionan cantidades de Be(II) de concentración conocida (0.10, 0.30 y 0.50 $\mu\text{g.L}^{-1}$) y 3 mL de disolución etanólica de morina $1.5 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ de pH = 11.50 y 80 mg de resina QAE Sephadex A-25.

Se equilibran durante 30 minutos y se tratan de la misma forma descrita en el procedimiento operatorio.

Las condiciones operatorias para la medida de la intensidad de fluorescencia fueron: $\lambda_{\text{exc}} = 457 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$, rendija de excitación y de emisión 2.5 nm, factor de sensibilidad 0.25 y temperatura 20°C.

El valor de la concentración se obtiene mediante su lectura en la recta de adición de patrón, que se indica en la tabla IV.77.

Tabla IV.77. Recta de calibrado por adición de patrón

ppb Be(II)	%IFR
0	0
0.05	3.0
0.1	9.5
0.3	26.5

Una vez ajustada por mínimos cuadrados, se obtiene la siguiente función:

$$\text{IFR} = 89.88 [\text{Be(II)}] - 0.36 \quad r = 0.997$$

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

Los resultados obtenidos, así como el tratamiento estadístico, se recogen en la tabla IV.78 y IV.79.

Tabla IV.78. Estudio de recuperación.

<i>cantidad añadida</i> <i>($\mu\text{g.L}^{-1}$)</i>	<i>%IFR</i>	<i>cantidad encontrada</i> <i>($\mu\text{g.L}^{-1}$)</i>	<i>%recuperado</i>
0.10	17.6	0.20	100.0
	18.1	0.21	110.0
	17.0	0.19	90.0
0.30	32.8	0.37	90.0
	35.6	0.40	100.0
	34.7	0.39	96.7
0.50	53.6	0.60	100.0
	54.5	0.61	102.0
	54.7	0.61	102.0

Tabla IV.79. Estudio estadístico

[Be(II)] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	σ_{n-1}	%recuperado
0.20	0.01	100.0
0.39	0.02	95.6
0.61	0.01	101.3

Se deduce de las tablas anteriores, un porcentaje de recuperación aceptable para las condiciones de trabajo establecidas.

IV.10.1.6.3. Agua del pantano de Quentar (Granada)

Para comprobar la validez del método, también en éste agua, se ha realizado un estudio de recuperación. Para ello, a 500 mL de muestra de agua, se añaden las concentraciones de agentes enmascarantes adecuadas y distintas cantidades de Be(II) de concentración conocida (0.20, 0.40 y 0.60 $\mu\text{g.L}^{-1}$) y operando según el método descrito para el volumen de 500 mL, se mide la intensidad de fluorescencia a 525 nm, excitando a 457 nm, con una anchura en las rendijas de excitación de 2.5 nm, factor de sensibilidad de 0.25 y temperatura de 20°C.

Los valores de intensidad de fluorescencia referidos a la recta de adición de patrón (de mayor coeficiente de correlación), nos permite determinar los porcentajes de recuperación para cada concentración de berilio añadida.

La ecuación de la recta de calibrado por adición de patrón, se indica en la tabla IV.80 y se ha obtenido en las mismas condiciones operatorias.

Tabla IV.80. Recta de calibrado por adición de patrón

ppb Be(II)	%IFR
0	0
0.4	24.0
0.6	44.5
0.8	59.0

Una vez ajustada por mínimos cuadrados, la función es la siguiente:

$$\text{IFR} = 74.64 [\text{Be(II)}] - 1.71 \quad r = 0.994$$

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

Los resultados obtenidos así como el tratamiento estadístico de los mismos, se reflejan en la tabla IV.81 y IV.82.

Tabla IV.81. Estudio de recuperación.

cantidad añadida ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%IFR	cantidad encontrada ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%recuperado
0.20	12.5	0.19	95.0
	14.0	0.21	105.0
	11.7	0.18	90.0%
0.40	28.1	0.40	100.0
	25.9	0.37	92.5
	26.7	0.38	95.0
0.60	45.3	0.63	105.0
	43.8	0.61	101.7
	42.3	0.59	98.3

Tabla IV.82. Estudio estadístico

[Be (II)] ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	σ_{n-1}	%recuperado
0.19	0.02	96.7
0.38	0.02	95.8
0.61	0.02	101.7

Según puede observarse, los porcentajes de recuperación son aceptables para las condiciones de trabajo establecidas.

IV.10.1.6.4. Agua urbana (Granada)

Para éste estudio se toman 500 mL de agua de grifo tratada y se transfieren a frascos de polietileno, se trata de la forma indicada, y se añaden diferentes cantidades de Be(II) de concentración conocida (0.10, 0.30 y 0.50 $\mu\text{g.L}^{-1}$) y operando según el método operatorio propuesto, se mide la intensidad de fluorescencia a 525 nm, excitando a 457 nm, con una anchura de rendijas de 2.5 nm, factor de sensibilidad de 0.25 y temperatura de 20°C.

A partir de los valores de intensidad de fluorescencia obtenidos, se refieren a la recta de calibrado, cuyos datos aparecen en la tabla IV.83.

Tabla IV.83. Recta de calibrado

ppb Be(II)	%IFR
0	0
0.1	12.4
0.3	36.8
0.5	61.1
0.7	85.8

Una vez ajustada por mínimos cuadrados viene dada por la siguiente ecuación:

$$\text{IFR} = 122.37 [\text{Be(II)}] + 0.06 \quad r = 0.999$$

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

Los resultados obtenidos así como el tratamiento estadístico se resumen en la tabla IV.84 y IV.85.

Tabla IV.84. Estudio de recuperación.

cantidad añadida ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%IFR	cantidad encontrada ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	%recuperado
0.10	24.0	0.19	100.0
	24.8	0.20	110.0
	22.8	0.18	90.0
0.30	49.6	0.40	103.3
	48.5	0.39	100.0
	49.3	0.40	103.3
0.50	73.9	0.60	102.0
	75.1	0.61	104.0
	72.8	0.59	100.0

Tabla IV.85. Estudio estadístico

[Be (II)] ($\mu\text{g. L}^{-1}$)	σ_{n-1}	%recuperado
0.19	0.01	100.0
0.40	0.01	102.2
0.60	0.01	102.0

Según indican los resultados obtenidos, el porcentaje de recuperación es aceptable en las condiciones de trabajo establecidas.

En la tabla IV.86, se resumen los resultados obtenidos del análisis de las aguas.

Tabla IV.85. Resultados del estudio de recuperación

agua	cantidad añadida ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	cantidad encontrada* ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	%recuperado
=====			
Agua mineral (Ortigosa del Monte)	0.20	0.19	95.0
	0.40	0.39	97.5
	0.60	0.59	98.9
.....			
Agua mineral (Lanjarón)	----	0.10	----
	0.10	0.20	100.0
	0.30	0.39	95.6
	0.50	0.61	101.3
.....			
agua de grifo.	----	0.09	----
	0.10	0.19	100.0
	0.30	0.40	102.2
	0.50	0.60	102.0
.....			
agua bruta (Quentar)	0.20	0.19	96.7
	0.40	0.38	95.8
	0.60	0.61	101.7
=====			

* Los datos son la media de tres determinaciones

C A P I T U L O V

ESTUDIO DEL SISTEMA

MORINA- Al(III) -SEPHADEX SP C-25
MEDIANTE ESPECTROFLUORIMETRIA DE
CAMBIO IONICO (F.C.I.)

V.1. INTRODUCCION

El análisis de aluminio mediante fluorescencia molecular ha sido ampliamente estudiado habiéndose propuesto un gran número de métodos (27). Uno de los conjuntos de métodos más conocidos posiblemente sea el que emplea morina como reactivo (49,51). La reacción de aluminio con morina es la base de un procedimiento sensible y relativamente selectivo para el análisis del primero, pero presenta varios inconvenientes en la práctica. Los más importantes son: a) altos valores de blancos de reactivo, b) interferencia de varias especies comunes y c) dependencia de la señal analítica con la temperatura (193).

Por otra parte, considerando que el aluminio produce efectos tóxicos importantes como la encefalopatía aluminica (enfermedad neurológica progresiva y muy frecuentemente fatal), es evidente la necesidad de disponer de métodos de análisis de trazas de este elemento, que hagan posible su control en agua, en disoluciones de diálisis y en suero.

En este capítulo, abordamos el problema de la mejora de métodos para análisis de aluminio basados en el empleo de la morina mediante la técnica de Fluorimetría de Cambio Iónico, la cual combina la medida de la fluorescencia difusa transmitida de la resina donde se ha preconcentrado el analito, a partir de una disolución muy diluída, y en forma de quelato fluorescente.

Estudiamos en primer lugar la fijación del complejo morina-aluminio en una resina de cambio catiónico, mediante esta técnica, siendo el método que a continuación se propone un perfeccionamiento del empleado en disolución. Mediante el empleo de esta técnica logramos mayor sensibilidad, menores límites de detección y más bajos niveles de interferencia que en disolución.

El método propuesto se ha aplicado a la determinación de aluminio en aguas naturales. Su importancia es decisiva si se tiene en cuenta los efectos nocivos que provoca en el organismo la ingestión de este metal en cualquiera de sus sales, presente en las aguas.

Por otra parte, en enfermos dializados se ha observado el cuadro de encefalopatía dialítica (194), descrita casi exclusivamente en pacientes en diálisis periódica aunque también se han descrito algunos casos antes de entrar en diálisis. Los síntomas iniciales incluyen pequeños cambios en la personalidad, disminución de la memoria reciente y, sobre todo, trastornos del habla. Con la progresión de la enfermedad se presenta una conducta psicótica con alucinaciones y ensimismamiento, conduciendo a un deterioro intelectual con demencia global. El cerebro de estos pacientes contiene hasta 11 veces más aluminio que los valores normales, habiéndose implicado fuertemente la toxicidad del aluminio como causa de éste síndrome.

Probablemente el síndrome de demencia de diálisis que se presenta en la actualidad en pacientes que nunca han recibido altas cantidades de aluminio a través de baños de diálisis, procede de la ingesta oral, durante largo tiempo, de grandes cantidades de hidróxido de aluminio empleado como quelante de los fosfatos ingeridos en la dieta. En la mayoría de los casos, la evolución natural de la enfermedad progresa a la muerte en unos 6-9 meses. Se ha observado mejoría de ésta encefalopatía dialítica con supresión de la ingesta de hidróxido de aluminio, con el empleo de la desferroxiamina como quelante del aluminio y con el trasplante renal.

El electroencefalograma es de ayuda diagnóstica, pero es evidente la utilidad de una determinación precisa de los niveles de aluminio y su posible incremento en suero, orina y líquido cefalorraquídeo.

También se ha demostrado que se absorbe algo de aluminio durante el tratamiento con antiácidos conteniendo aluminio (195). Es el caso del sulfato de sucrosa, que se comercializa como un agente protector de la mucosa en el tratamiento de la úlcera gástrica y duodenal.

Se ha estudiado la incidencia de encefalitis dialítica en el oeste de Escocia (196) donde la concentración de aluminio en el agua suministrada está incrementada debido a la adición de sulfato de aluminio. Se ha comprobado que los pacientes con encefalitis dialítica contienen un nivel de aluminio elevado en el suero, y se ha encontrado una relación entre la concentración de aluminio en el suero y la concentración de aluminio en el agua suministrada. Se concluye que el síndrome es debido a la intoxicación por aluminio, siendo la principal fuente la presencia de éste metal en el agua a partir de la cual se prepara el fluido de diálisis.

Hoy día la toxicidad del Al en enfermos de riñón es un problema reconocido a nivel mundial, ya que puede originar importantes trastornos biológicos (demencia, osteomalacia fracturante y anemias microcíticas), en muchos casos irreversibles (197).

Considerando los efectos tóxicos secundarios del aluminio y el desconocimiento de su metabolismo, es evidente la necesidad de disponer de métodos de análisis de trazas de este elemento, que hagan posible su control en agua, en disoluciones de diálisis y en suero a fin de evitar cualquier posible riesgo en los enfermos de riñón dializados. Además es preciso estudiar el posible mecanismo de acción y toxicidad del aluminio para lo

cual es imprescindible igualmente disponer de tales métodos de alta sensibilidad.

La determinación de Al en agua o suero se ha venido realizando principalmente por Absorción atómica con Horno de Grafito, especialmente para análisis rutinarios. Sin embargo, los resultados obtenidos y el considerable número de trabajos al respecto que se han publicado y siguen apareciendo demuestra la dificultad de estos análisis, derivadas fundamentalmente de problemas de reproducibilidad por contaminantes, pipeteo manual, pérdidas de Al en la etapas previas a la atomización, etc. Esta situación ha propiciado la investigación de técnicas más selectivas tales como la Espectrometría Atómica de Emisión por Plasma (ICP-AES) para tales determinaciones.

Las características analíticas de este complejo han permitido que este reactivo haya sido empleado por varios autores para la determinación espectrofluorimétrica de Al(III) en disolución (72-74,127,162,198,199). En la Tabla V.1, se resumen las características de algunos de éstos métodos.

Tabla V.1. Características de algunos métodos en disolución.

VARIABLES	AUTORES			
	<i>J.M. Escriche(127)</i>	<i>F.H. Hernandez(94)</i>	<i>F.Will(34)</i>	<i>L.A.Saarl(198)</i>
pH	3,7-3,8	3,7-3,8	3±0,3	4,8
Tampón	AcH/AcNa	HCl/KCl	AcH	AcH/AcNa
λ_{exc} (nm)	430	418	440	420
λ_{em} (nm)	495	495	525	488
Interferencias	$SiO_3^{2-}, Pb^{2+}, Zn^{2+}$	$Be^{2+}, Zn^{2+}, Pb^{2+}, Fe^{3+}, Cu^{2+}, F^-$	$Cr^{3+}, Cu^{2+}, PO_4^{3-}, F^-$	$Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+}, Be^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}$
Límite de detección(ppb)	0,2	0,1	0,25	27
Técnica empleada	adición de agente surfactante	extracción en MIBK		inmovilizado sobre celulosa

V.2. EXPERIMENTAL

Reactivos

- Gel de cambio catiónico Sephadex SP C-25, en ciclo sodio.

- Disolución patrón de Al(III) de 0.1 g.L^{-1} , preparada a partir de $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, en HNO_3 $6.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ y contrastada mediante valoración con EDTA, usando naranja de xilenol como indicador. Se conserva en un frasco de polietileno.

Todas las demás disoluciones de Al(III) se prepararon diariamente, a partir de ésta por dilución con agua bidestilada.

- Disolución de morina (2',3,4',5,7-pentahidroxi-flavona) al 0.02% en etanol del 99.5%. La morina empleada fue purificada por el procedimiento descrito en el capítulo III.

Las demás disoluciones de morina se prepararon a partir de ésta por dilución en etanol del 99.5%, siendo necesario prepararlas diariamente.

- Disoluciones reguladoras de ácido acético y acetato sódico de diversos valores de pH, preparadas a partir de una disolución de CH_3COONa 0.1M (6.804 g en 500 mL de agua bidestilada) y la cantidad de CH_3COOH necesaria para la obtención del pH deseado.

- Disoluciones reguladoras de hidrógeno ftalato potásico y ácido clorhídrico ó hidróxido sódico de diversos valores de pH, preparadas a partir de una disolución de hidrógeno ftalato potásico 0.1M (10.21 g en 500 mL de agua bidestilada) y la cantidad de ClH ó NaOH necesaria hasta obtener el pH deseado.

- Disoluciones reguladoras de ácido cloroacético y cloroacetato sódico de diversos valores de pH, a partir de una disolución 0.1M de ácido cloroacético (4.72 g en 500 mL de agua bidestilada) y la cantidad de NaOH necesaria para conseguir el pH deseado.

- Disolución de iones de 1 g.L^{-1} en ión, preparadas por disolución de las sales que se indican en la tabla V.2.

Tabla V.2.

<i>ión</i>	<i>sal empleada</i>
NO_3^-	NaNO_3
SO_4^{2-}	Na_2SO_4
Cl^-	NaCl
F^-	NaF
CO_3^{2-}	$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$
PO_4^{3-}	$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
Ca (II)	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Mg (II)	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
Fe (III)	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$
Cu (II)	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Todos los reactivos empleados son de calidad reactivo unos y suprapuros cuando fué necesario.

V.3. GEOMETRIA DEL SISTEMA DE MEDIDA

V.3.1. Estudio del ángulo de incidencia de la radiación

Analogamente a lo estudiado en el capítulo anterior se situó el sistema de tal forma que el plano de la cubeta coincidiese con la dirección de la ventana de medida (θ). A continuación se registraron los espectros de emisión incrementando éste ángulo de 5° en 5° en el sentido de las agujas del reloj, hasta realizar un giro completo de 360° .

El estudio se repitió para los distintos valores de la rendija de excitación.

La muestra se preparó diluyendo 4 mL de disolución Al(III) de 0.1 mg.L^{-1} en un matraz aforado de 500 mL y enrasando con agua bidestilada. A continuación, se transvasó la disolución a un frasco de polietileno de 1 L de capacidad y se adicionaron 2 mL de disolución etanólica de morina $6.2 \times 10^{-3}\%$, 10 mL de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de pH = 5.00, tampón empleado en disolución (46) y zona de pH óptima según se deduce del estudio cualitativo previo y 100 mg de resina SP C-25.

Tras agitar durante 15 minutos, filtrar y llenar la cubeta se procedió a la medida de la intensidad de fluorescencia en las diferentes posiciones.

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

rendija de excitación 2.5; 5; 10 y 15 nm, rendija de emisión 2.5nm, factor de sensibilidad 0.5 y temperatura 20°C.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V.3 y se han representado graficamente en las figuras V.1, V.2, V.3 y V.4.

Tabla V.3. Influencia del angulo

<i>Rendija exc. (nm)</i>	2.5	5	10	15
<i>Angulo (θ)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>
0	3.0	2.5	2.1	1.9
5	3.5	3.0	2.6	2.3
10	9.1	8.3	4.2	6.5
15	16.3	16.3	8.1	11.6
20	20.2	20.4	12.0	15.0
25	24.1	22.8	17.3	18.1
30	26.0	23.7	22.0	20.9
35	27.4	24.0	24.8	23.1
40	27.5	25.1	26.0	23.9
45	27.5	25.2	26.0	24.2
50	25.8	24.3	25.8	24.0
55	23.9	21.8	25.7	22.7
60	22.5	21.0	23.4	20.0
65	17.9	18.6	19.8	16.3
70	13.2	11.9	15.0	13.2
75	7.0	8.1	10.8	9.7
80	4.1	2.6	7.3	6.0
85	1.2	1.2	3.1	3.0
90	1.0	2.4	1.1	1.2
95	3.2	6.9	2.1	2.0

Rendija exc. (nm)	2.5	5	10	15
Angulo (θ)	IFR(%)	IFR(%)	IFR(%)	IFR(%)
100	6.1	5.1	4.0	4.1
105	8.6	12.2	6.2	7.0
110	14.5	16.3	9.8	10.2
115	19.9	22.6	13.1	14.2
120	34.5	31.0	19.0	20.0
125	50.1	41.9	26.8	26.3
130	67.7	56.0	34.8	30.9
135	85.0	64.2	40.3	32.1
140	68.0	61.0	38.6	31.1
145	45.7	45.1	30.0	25.0
150	33.3	29.9	22.3	17.3
155	21.1	17.1	16.2	12.1
160	12.7	11.2	11.5	7.2
165	12.7	11.2	6.6	5.0
170	5.9	5.1	4.0	3.1
175	2.0	2.1	1.2	2.0
180	1.6	1.3	1.1	1.0
185	2.1	3.2	2.8	3.8
190	4.0	4.8	5.0	6.0
195	8.7	8.1	9.2	10.1
200	14.0	13.0	12.2	13.2
205	19.1	18.2	17.2	16.4
210	22.4	21.5	19.8	19.8
215	25.0	23.4	24.4	23.0
220	26.4	25.0	26.0	25.4
225	27.1	25.0	26.6	25.0
230	26.9	24.9	26.0	24.1
235	26.9	24.6	25.1	22.2
240	25.1	22.0	23.2	19.8

<i>Rendija exc. (nm)</i>	2.5	5	10	15
<i>Angulo (θ)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>	<i>IFR(%)</i>
245	23.4	19.1	20.3	16.3
250	20.0	14.7	17.9	13.1
255	14.6	9.0	13.0	8.2
260	8.9	5.0	8.1	6.3
265	4.2	2.1	5.2	4.4
270	0.6	1.0	2.0	2.0
275	1.7	2.3	3.1	3.8
280	4.0	4.0	5.0	6.0
285	10.1	7.5	8.3	7.9
290	16.7	13.0	11.1	12.3
295	24.0	21.1	16.9	16.6
300	33.1	29.7	24.1	20.7
305	46.3	40.5	30.0	25.7
310	63.2	54.6	38.2	30.6
315	84.9	64.1	40.3	32.2
320	78.3	58.2	38.6	30.9
325	58.0	41.4	29.5	26.1
330	43.1	30.5	23.2	20.3
335	27.9	23.7	18.7	17.4
340	18.5	16.5	13.4	12.3
345	11.4	9.6	8.2	8.0
350	7.3	6.3	5.4	5.1
355	4.2	3.5	2.9	2.6
360	1.5	1.3	1.1	1.0

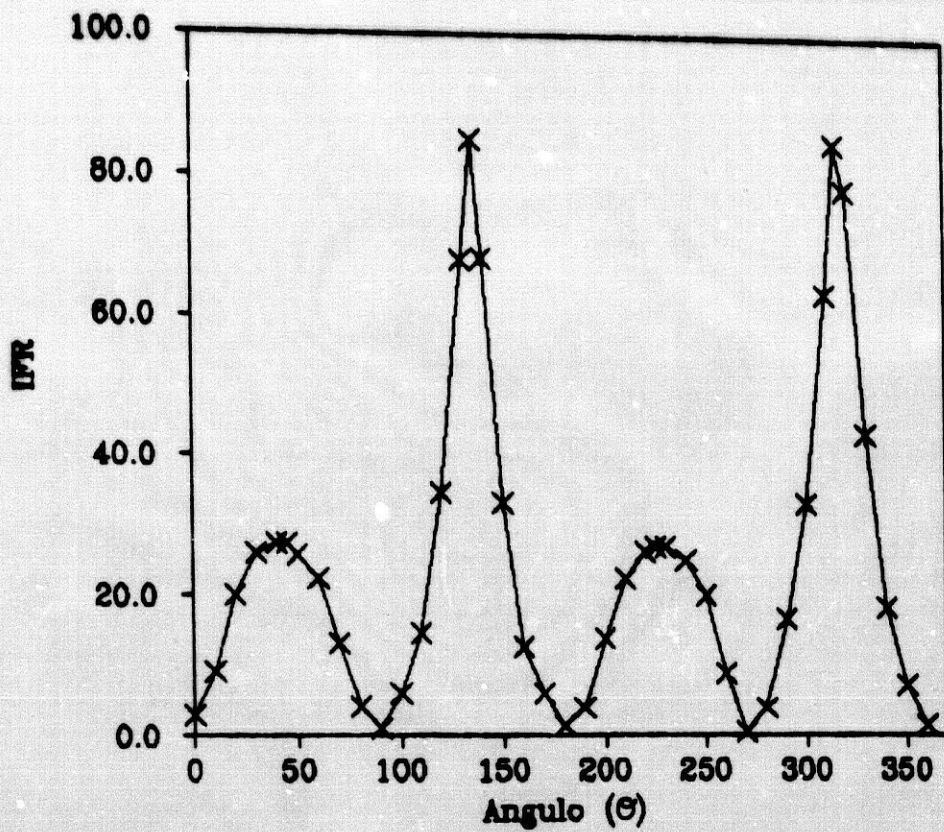


Figura V.1. Influencia del ángulo. Rendija de excitación 2.5 nm

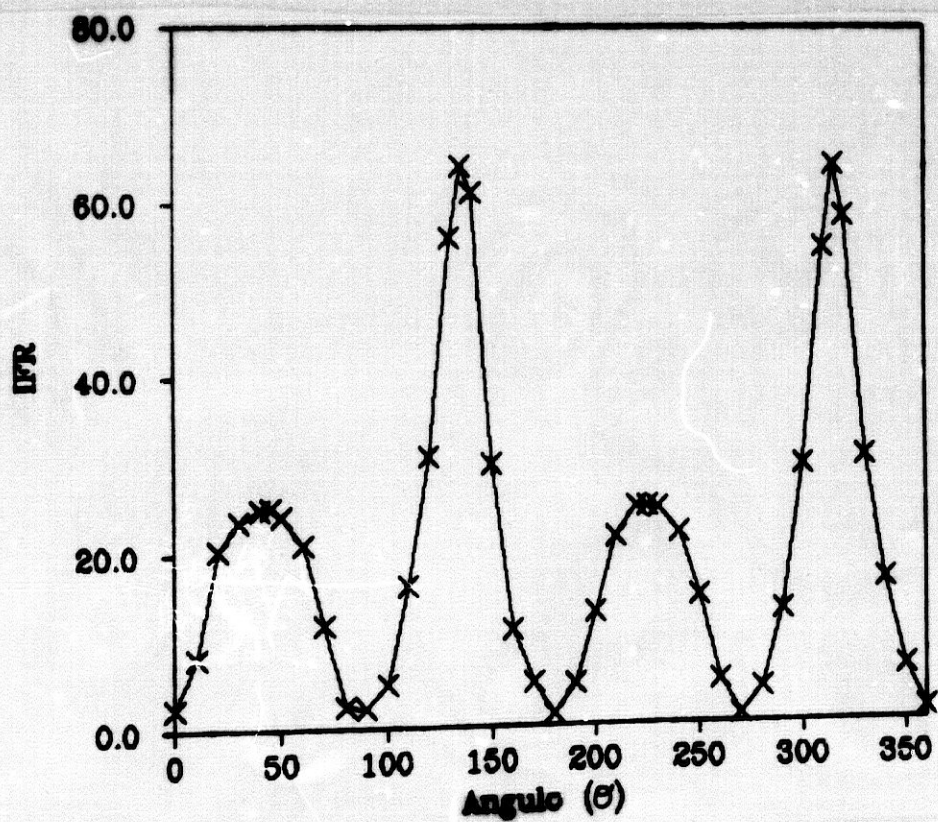


Figura V.2. Influencia del ángulo. Rendija de excitación 5 nm

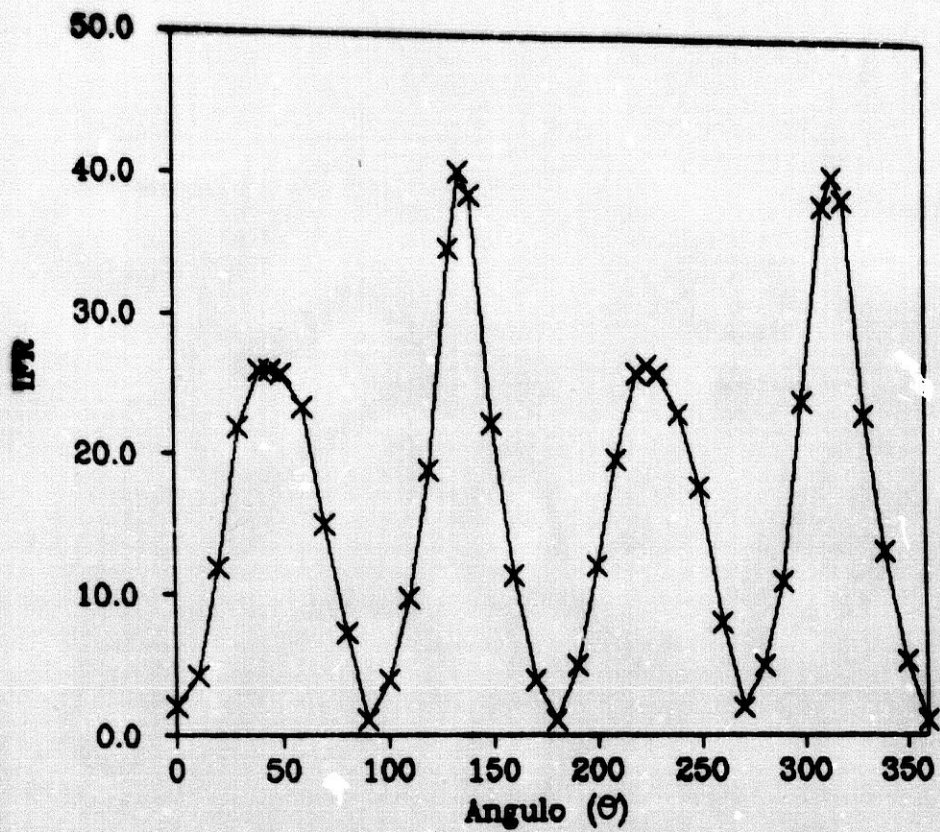


Figura V.3. Influencia del ángulo. Rendija de excitación 10 nm

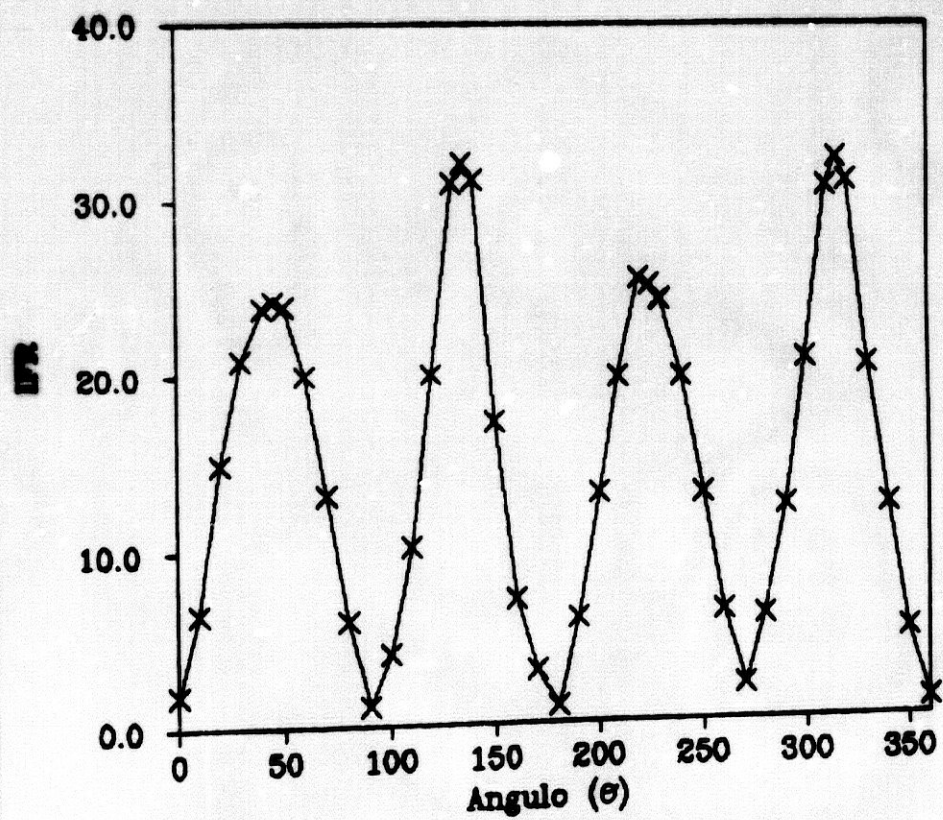


Figura V.4. Influencia del ángulo. Rendija de excitación 15 nm

La observación de las anteriores figuras nos permite comprobar:

- 1) La existencia de cuatro posiciones de la cubeta perfectamente definidas correspondientes a $\theta_1 = 45^\circ$; $\theta_2 = 135^\circ$; $\theta_3 = 225^\circ$ y $\theta_4 = 315^\circ$, donde la intensidad de emisión es máxima.
- 2) Los valores de la intensidad de fluorescencia de los máximos son iguales dos a dos, coincidiendo las medidas más altas con las posiciones $\theta_2 = 135^\circ$ y $\theta_4 = 315^\circ$ en las que la cubeta recibe el haz de excitación por una cara y se efectúa la medida de luminiscencia por la otra (luminiscencia difusa transmitida).
- 3) Cuando la excitación y medida de la fluorescencia se realiza en la misma cara de la cubeta, lo que ocurre para $\theta_1 = 45^\circ$ y $\theta_3 = 225^\circ$, se observa asimismo dos máximos de menor intensidad (luminiscencia difusa reflejada).
- 4) Los valores con intensidad mínima coincide con θ igual a 0° , 90° , 180° , 270° y 360° .
- 5) Al variar las rendijas de excitación se observa que al aumentar ésta, disminuye la intensidad de luminiscencia.

Nuevamente se comprueba que es favorable medir la fluorescencia difusa transmitida.