

T. Prov. - 16/80

T
16
31

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

DETERMINACION ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE FITOHORMONAS DERIVADAS DEL INDOL Y DEL NAFTALENO

TESIS DOCTORAL

M^a del Rosario Blanc Garcia
Granada, 1996

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
GRANADA	
Nº Documento	019680417
Nº Copia	121229491

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 2-8-96 ...
ENTRADA NUM. 1643

UNIVERSIDAD DE GRANADA
28/8/96
COMISION J.

DETERMINACION ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE FITOHORMONAS DERIVADAS DEL INDOL Y DEL NAFTALENO

por

M^a del Rosario Blanc Garcia

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

VISADA en Granada, a 18 de
Julio de 1996.

Fdo.- Prof. Dr. D. José Luis
Vilchez Quero y Prof. Dr. D.
Alberto Navalón Montón,
Profesores Titulares del
Dpartamento de Química
Analítica de la Universidad
de Granada.

MEMORIA presentada para
aspirar al Grado de Doctor en
Ciencias Químicas.

Granada, a 18 de Julio de
1996.

Fdo.- M^a del Rosario Blanc
García.
Licenciada en Ciencias,
Sección Químicas.

ÍNDICE

OBJETO DE LA TESIS	1
INTRODUCCIÓN	5
CAPÍTULO I. EXPERIMENTAL: DISOLUCIONES, INSTRUMENTACIÓN Y SOPORTES	42
I.-Reactivos, disoluciones e instrumentación	45
I.1.-Reactivos	45
I.2.-Disoluciones	46
I.3.-Soportes empleados	46
I.4.-Instrumentación	47
I.5.-Material de laboratorio	48
I.6.-Ordenadores y programas informáticos	48
CAPÍTULO II. ESTUDIO ESPECTROFLUORIMÉTRICO DE LOS ANALITOS	51
I.-Características espectrales	54
I.1.-Espectros de luminiscencia total	54
I.2.-Mapas de contorno	58
I.3.-Espectros bidimensionales	62
II.-Optimización de variables	66
II.1.-Influencia del pH	66
II.2.-Influencia del volumen de la disolución reguladora	70
II.3.-Influencia de la fuerza iónica	72
II.4.-Estudio de la estabilidad	74
II.5.-Influencia de la temperatura	76
II.6.-Influencia del porcentaje de etanol	81
II.7.-Resumen de la optimización de variables	83
III.-Parámetros analíticos	83
III.1.-Intervalo de aplicación. Rectas de calibrado	83
III.2.-Parámetros de calidad	87
IV.-Procedimiento operatorio	90

V.-Estudio de interferencias	91
VI.-Aplicaciones analíticas. Determinación de fitohormonas en muestras de agua. Validación de la exactitud del método	99
VI.1.-Determinación de fitohormonas en agua de Sierra Nevada (Lanjarón)	99
VI.1.1.-Procedimiento	101
VI.1.2.-Estudio de recuperación	106
VI.2.-Determinación de fitohormonas en agua potable de Granada	111
VI.2.1.-Procedimiento	114
VI.2.2.-Estudio de recuperación	119
VI.3.-Determinación de fitohormonas en agua de pozo de la Huerta de Santa María	123
VI.3.1.-Procedimiento	123
VI.3.2.-Estudio de recuperación	129
 CAPÍTULO III. DETERMINACIÓN DE MEZCLAS BINARIAS	 135
I.-Características espectrales	138
I.1.-Espectros de luminiscencia total	138
I.2.-Mapas de contorno	141
I.3.-Espectros bidimensionales	143
II.-Optimización de parámetros instrumentales	148
II.1.-Elección del factor de filtrado en la obtención de los espectros derivados	148
III.-Optimización de variables	151
III.1.-Estudio del pH	151
III.2.-Estudio de la estabilidad	152
III.3.-Influencia de la fuerza iónica	153
III.4.-Influencia de la temperatura	156
IV.-Calibrado y parámetros de calidad del método analítico	159
IV.1.-Rectas de calibrado	159
IV.1.1.-Rectas de calibrado de AIA	159
IV.1.2.-Rectas de calibrado de AIB	162

IV.1.3.-Rectas de calibrado de AIP	165
IV.1.4.-Rectas de calibrado de AHIA	168
IV.2.-Parámetros de calidad	172
V.-Procedimiento operatorio	174
VI.-Aplicaciones analíticas	175
VI.1.-Resolución de mezclas binarias de derivados indólicos en muestras sintéticas	175
VI.2.-Resolución de mezclas binarias de derivados indólicos en muestras de agua	178
VI.2.1.-Agua de Sierra Nevada (Lanjarón)	178
VI.2.2.-Agua potable de Granada	184
VI.2.3.-Agua de pozo de Santa María	189

CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ÁCIDO

INDOL-3-BUTÍRICO Y ÁCIDO 1-NAFTILACÉTICO 197

I.-Características espectrales	200
I.1.-Espectros de luminiscencia total	200
I.2.-Mapas de contorno	203
I.3.-Espectros bidimensionales	205
II.-Parámetros instrumentales	206
II.1.-Elección del factor de filtrado en la obtención de los espectros derivados	206
III.-Optimización de variables	207
III.1.-Influencia del pH	207
III.2.-Estudio de la estabilidad	209
III.3.-Influencia de la fuerza iónica	210
III.4.-Influencia de la temperatura	213
III.5.-Influencia del contenido en etanol	215
IV.-Calibrado y parámetros de calidad del método analítico	217
IV.1.-Rectas de calibrado	217
IV.1.1.-Rectas de calibrado del AIB	217

IV.1.2.-Rectas de calibrado del ANA	219
IV.2.-Parámetros de calidad	222
V.-Procedimiento operatorio	224
VI.-Aplicaciones analíticas	225
VI.1.-Determinación simultánea de AIB y ANA en mezclas sintéticas	225
VI.2.-Determinación simultánea de AIB y ANA en muestras reales	227
CAPÍTULO V. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO 1-NAFTILACÉTICO	231
I.-Estudio en fase sólida. Elección del soporte	235
II.-Características espectrales de Ácido 1-naftilacético fijado sobre Sephadex QAE-A-25	237
II.1.-Espectros de luminiscencia total	237
II.2.-Mapas de contorno	239
II.3.-Espectros bidimensionales	239
III.-Optimización de variables	240
III.1.-Estudio de la estabilidad	240
III.2.-Influencia del pH	241
III.3.-Influencia del volumen de tampon	243
III.4.-Influencia de la fuerza iónica	245
III.5.-Influencia de la temperatura	246
III.6.-Influencia del contenido de etanol	248
III.7.-Influencia del tiempo de equilibración de la resina	249
III.8.-Influencia de la velocidad de agitación	250
III.9.-Influencia de la cantidad de resina	251
III.10.-Influencia del volumen de agitación	253
III.11.-Resumen de la optimización de las variables para el ANA fijado sobre Sephadex QAE-A-25	255

IV.-Calibrado y parámetros de calidad	
del método analítico	256
IV.1.-Rectas de calibrado	256
IV.1.1.-Recta de calibrado para	
un volumen de 100 mL	257
IV.1.2.-Recta de calibrado para	
un volumen de 250 mL	259
IV.1.3.-Recta de calibrado para	
un volumen de 500 mL	260
IV.1.4.-Recta de calibrado para	
un volumen de 1000 mL	262
IV.2.-Parámetros de calidad	265
IV.3.-Estudio de la influencia de las	
rendijas de excitación y emisión	
sobre los parámetros estadísticos	
y de calidad del método	272
IV.4.-Cálculo del coeficiente de	
distribución (D) para el ANA	275
V.-Procedimiento operatorio	276
VI.-Selectividad: Estudio de interferentes	277
VII.-Aplicaciones analíticas	280
VII.1.-Determinaciones de ANA en	
formulaciones comerciales	280
VII.2.-Determinaciones de ANA en agua	
potable de la ciudad de Granada	286

CAPÍTULO VI. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO NAFTIL ACÉTICO

Y ÁCIDO NAFTALENAMIDA ACÉTICO	291
I.-Características espectrales	294
I.1.-Espectros de luminiscencia total	294
I.2.-Espectros bidimensionales	295
II.-Optimización de variables	297
II.1.-Estudio de la estabilidad del	
ANA fijado sobre resina QAE y del	
ANA-A en disolución	297

II.2.-Influencia del pH	298
II.3.-Influencia del tiempo de equilibración de la resina	301
II.4.-Influencia de la cantidad de resina	302
II.5.-Resumen de la optimización de las variables	303
III.-Calibrado y parámetros de calidad del método analítico	304
III.1.-Rectas de calibrado	304
III.2.-Parámetros de calidad	307
IV.-Procedimiento operatorio	309
V.-Aplicaciones analíticas	310
V.1.-Mezclas sintéticas	310
V.2.-Fitohormonas comerciales	311
V.3.-Aplicación a suelos	318
CONCLUSIONES	321
BIBLIOGRAFÍA	329

***OBJETO DE LA MEMORIA
DE DOCTORADO***

El objeto de esta Memoria de Doctorado consiste en la puesta a punto de metodología espectrofluorimétrica en disolución y en fase sólida para la determinación de las fitohormonas derivadas del indol: ácido indol-3-acético, ácido indol-3-butírico, ácido indol-3-propiónico y ácido 5-hidroxiindol-3-acético; y del naftaleno: ácido 1-naftilacético y 1-naftilacetamida.

Como se ha documentado en la Introducción de esta Memoria la tendencia en la práctica agrícola, debido a requerimientos medioambientales, va orientada hacia el uso creciente de fitohormonas y la disminución en el empleo de pesticidas. Hasta tal punto esta afirmación es cierta que el desarrollo de un país puede medirse por la relación fitohormona/pesticida consumida. Existe por tanto un interés creciente en el control de estos compuestos.

Todas las fitohormonas seleccionadas poseen propiedades fluorescentes muy parecidas por lo que su existencia conjunta en una matriz puede constituir mutua interferencia. Por otra parte el estudio bibliográfico realizado nos ha puesto de manifiesto la escasez de métodos fluorescentes para la determinación de estos compuestos. Por estas razones hemos centrado la investigación a realizar en los siguientes objetivos:

- 1.-Estudio de las propiedades fluorescentes de los analitos seleccionados y puesta a punto de métodos para su determinación individual.

2.-Resolución de las siguientes mezclas binarias de las fitohormonas derivadas del indol:

-Ácido indol-3-acético y ácido 5-hidroxiindol-3-acético.

-Ácido indol-3-butírico y ácido 5-hidroxiindol-3-acético.

-Ácido indol-3-propiónico y ácido 5-hidroxiindol-3-acético.

3.-Estudio de la fijación de estos analitos en distintos soportes sólidos de diverso tipo como C-18 y Sephadex QAE-A-25, DEAE-A-25, SP-C-25, G-15 y G-25.

4.-Resolución de la mezcla de las fitohormonas derivadas del naftaleno: ácido 1-naftil acético y 1-naftil acetamida.

5.-Aplicación de estos métodos a formulaciones comerciales, muestras de agua de diversa procedencia y suelo.

INTRODUCCIÓN

1.-DESARROLLO HISTORICO Y ACTIVIDAD BIOLOGICA

Actualmente se reconoce que la mayoría de la actividad fisiológica de las plantas está regulada por un conjunto de sustancias químicas denominadas *Hormonas*. La presencia en las plantas de este tipo de compuestos fue sugerida por primera vez por **Julius von Sachs** en la segunda mitad del siglo XIX cuando indicó que debían existir en las plantas "*sustancias formadoras de órganos que debían ser producidas en las hojas y transportadas hacia abajo al resto de la planta*". Las observaciones de este científico prefiguraron de modo notable el estudio intensivo de la regulación del crecimiento de las plantas realizado durante el siglo XX [1].

Simultáneamente, **Charles Darwin** estudió el efecto de la gravedad y de la iluminación lateral sobre el movimiento de las plantas, demostrando que los efectos de la luz y la gravedad sobre la incurvación tanto de las raíces como de los tallos estaban influidos por los correspondientes ápices, y que su influencia podía transmitirse a las otras partes de la planta. Al igual que **Sachs** sugirió que el crecimiento de las plantas debía de estar regulado por sustancias especiales.

Los estudios sobre tropismos de las plantas realizados por **Boysen-Jensen** (1910-1913) y por **Paal** (1919) pusieron de manifiesto la existencia real de los reguladores de crecimiento, sin embargo fue **Went** quien desarrolló una prueba biológica para determinar la cantidad de sustancia activa de los ápices. Debido al empleo de plántulas de *Avena* para esta prueba biológica, ésta acabó siendo conocida con el nombre de *Prueba de la curvatura de Avena*.

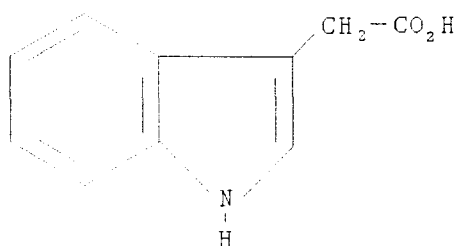
La aplicación de esta prueba a una amplia variedad de muestras condujo al hallazgo de que la orina humana es rica en una sustancia de crecimiento. Partiendo de 150 litros de orina humana **Kögl y Haagen-Smit** (1931) consiguieron aislar 40 mg de unos cris-

tales dotados de una actividad óptica 50.000 veces mayor que la de la orina de partida. El producto obtenido recibió el nombre de *auxina-A* (*ácido auxentriólico*).

En 1934, Kögl, Erxleben y Haagen-Smit aislaron otra sustancia activa a partir del aceite de embriones de trigo, encontrando que dicha sustancia tenía una estructura y una actividad muy parecidas a las correspondientes a la *auxina-A*, recibiendo por tanto el nombre de *auxina-B* (*ácido auxenolónico*).

En este mismo año, estos autores aislaron una segunda sustancia a partir de la orina humana que denominaron *heteroauxina*, compuesto que en la actualidad se denomina *ácido indol-3-acético* (AIA) (Figura 1). Este compuesto no era nuevo, ya que había sido descubierto y aislado en 1885 por E. Salkowski y H. Salkowski como producto en diversos procesos de fermentación.

Figura 1.- Estructura del ácido indol-3-acético



En la actualidad existen bastantes dudas sobre la existencia de la *auxina-A* y la *auxina-B*, pues desde su primer aislamiento por Kögl y colaboradores estos compuestos no han vuelto a ser aislados. Sin embargo, el AIA ha sido aislado en forma cristalina en repetidas ocasiones a partir de diferentes matrices.

A partir del descubrimiento y caracterización química del AIA, el gran número de investigaciones llevadas a cabo en el

campo de la regulación del crecimiento vegetal ha permitido conocer un gran número de compuestos tanto naturales como sintéticos que presentan una actividad fisiológica parecida al ácido indol-3-acético.

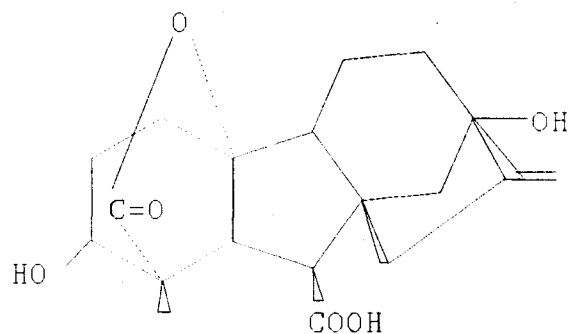
En 1954, la Sociedad Americana de Fisiólogos Vegetales propuso la siguiente definición para las *Hormonas Vegetales* o *Fito-hormonas*: *compuestos orgánicos distintos a los nutrientes que a bajas concentraciones regulan los procesos fisiológicos de las plantas. Normalmente, dichas hormonas se desplazan dentro de la planta desde un centro de producción a un lugar de acción.*

Generalmente, las fitohormonas se clasifican en cinco grandes grupos [2]:

* *Auxinas*: sustancias, generalmente parecidas al ácido indol-3-acético, que tienen la capacidad de estimular el ensanchamiento y el alargamiento de las células y de mantener la dominación apical.

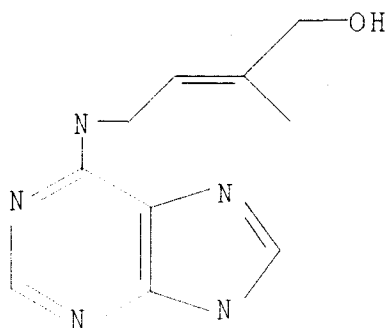
* *Giberelinas*: derivados diterpenoides, como el ácido giberélico (Figura 2), que tienen la capacidad de estimular el alargamiento de los tallos y el crecimiento de los frutos. Por otra parte, inducen la producción de enzimas para la germinación de las semillas.

Figura 2.- Estructura del ácido giberélico



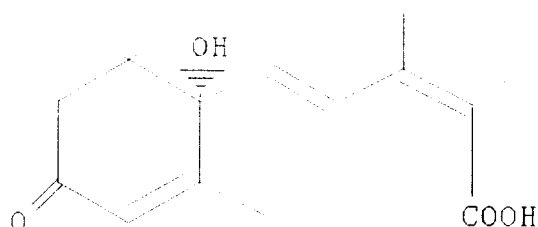
* *Citocininas*: adeninas sustituidas, parecidas a la zeatina (Figura 3), que tienen la capacidad de estimular la división celular o de inhibir la dominación apical del tallo principal.

Figura 3.- Estructura de la zeatina



* *Abscisinas*: compuestos derivados del ácido abscísico (Figura 4) que inducen la abscisión y el letargo y retardan el crecimiento vegetativo. En muchos casos inhiben la acción de las auxinas, giberelinas y citocininas.

Figura 4.- Estructura del ácido abscísico



* *Etileno*: regulador gaseoso que estimula el hinchamiento o crecimiento isodiamétrico de los tallos y las raíces.

A continuación del descubrimiento del ácido indol-3-acético, los trabajos de investigación se centraron fundamentalmente en

el conocimiento de su distribución en las plantas, transporte del compuesto por las plantas, estudio de sus efectos fisiológicos, biosíntesis de esta auxina y obtención de compuestos sintéticos que presentasen efectos fisiológicos similares.

Thimann, en 1934 puso de manifiesto que las máximas concentraciones de AIA se encontraban en las yemas y en los ápices de crecimiento de las hojas y las raíces. Sin embargo, se encuentra ampliamente distribuido por la planta, procedente de las regiones meristemáticas. La concentración de auxina desciende a medida que se pasa desde el ápice a la base del coleóptilo.

Por otra parte, este autor puso de manifiesto que la auxina se encuentra en la planta en dos formas diferentes, una susceptible de ser fácilmente extraída por métodos de difusión y otra mucho más difícil de extraer que requiere el empleo de disolventes orgánicos. A la primera la denominó *auxina libre* y a la segunda *auxina combinada*.

En 1959, **Audus** puso de manifiesto la existencia de una tercera forma de auxina para cuya extracción se requieren métodos más enérgicos que los de simple difusión o los de extracción directa con algún disolvente orgánico, como puede ser una hidrólisis básica en caliente o el empleo de enzimas proteolíticas (que hidrolizan las proteínas a las que puede encontrarse unida la auxina).

Actualmente se admite de modo general que la auxina combinada es la forma activa en el crecimiento mientras que la auxina libre corresponde a un exceso de auxina que se encuentra en equilibrio dinámico con la auxina combinada. Por tanto, la iniciación y la regulación del crecimiento pueden ser controladas gracias a distintos equilibrios establecidos entre la auxina libre y la combinada en varios centros de crecimiento de la planta. Muy probablemente, la auxina sea transportada en forma libre desde el lugar de formación a su zona de actividad.

Los experimentos de Darwin y de Boysen-Jensen demostraron que se daba un transporte de un estímulo activo desde el ápice a la base del coleóptilo, lo cual llevó a otros investigadores a admitir que el movimiento de este estímulo estaba polarizado. Experimentos realizados por Went (1928) y por Beyer (1928) permitieron sostener esta idea y durante muchos años se creyó que la circulación de la auxina en la planta era estrictamente polar, realizándose este movimiento en dirección basípeta, es decir, desde el ápice hasta la base.

En 1961, Jacobs demostró que existía también transporte de la auxina en dirección acrópeta (de la base al ápice), aunque dicho transporte era tan sólo un tercio del transporte en dirección basípeta. Asimismo encontró que parte de la auxina producida por las hojas era transportada por los tejidos del floema hasta otras partes de la planta, transporte netamente no polar.

El transporte de la auxina en los tejidos vegetales tiene lugar a velocidades suficientemente altas como para excluir la difusión como principal método de transporte. Además, el hecho de que la auxina pueda circular por la planta en contra de un gradiente de concentración pone de manifiesto que dicho transporte debe realizarse principalmente por otro mecanismo distinto al de difusión.

Aunque el verdadero mecanismo que interviene en el transporte de la auxina es todavía tema de controversia, algunos investigadores consideran que éste está regulado por una diferencia de potencial eléctrico entre el ápice y la base de coleóptilo. Sin embargo una importante objeción a esta teoría reside en el hecho de que cuando se aplica al coleóptilo un campo eléctrico externo transversal, la curvatura inicial se dirige hacia el polo positivo, lo que está en contradicción con la dirección que toman los tropismos naturales, que es el de la parte cargada negativamente.

Otros autores (**Gregory y Hancock**, 1955) consideran que el transporte de auxinas puede ser regulado hasta cierto punto por el metabolismo de la célula, es decir, que en él interviene la energía metabólica. Dichos investigadores encontraron que la falta de oxígeno inhibe el transporte de auxina. Esto también es cierto para el efecto de los inhibidores metabólicos.

De diversos estudios realizados por **Goldsmith** (1957 y 1966) con segmentos de coleóptilo de *Avena*, se desprende que la mayor parte de la circulación de auxina en la planta tiene lugar de dos modos diferentes: uno de ellos dependiente de la energía metabólica y el otro a favor de la simple difusión. El movimiento basípeto se produce en estos segmentos de *Avena* como resultado a la vez de la difusión y del transporte metabólico mientras que el movimiento acrópeto depende exclusivamente de la difusión pasiva. Esto puede ser puesto de manifiesto comparando el movimiento de la auxina en segmentos de coleóptilo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas.

El movimiento de la auxina en el sistema radical está también polarizado. Sin embargo, el movimiento de la auxina en las raíces, a diferencia del que tiene lugar en la parte aérea de la planta, es fundamentalmente acrópeto, alejándose por tanto del ápice de la raíz (**Wilkins y Scott**, 1968). El significado de esta diferencia entre la parte aérea y la raíz no está claro, pero en ambos casos parece que la auxina sufre sobre todo un transporte que la aleja de la zona de síntesis correspondiente.

En la actualidad se reconoce que los principales efectos fisiológicos que produce la auxina son [1]: a) alargamiento celular, b) dominancia apical, c) iniciación radicular, d) partenocarpia, e) abscisión, f) formación de callos y g) respiración.

El *alargamiento celular* se debe a algún tipo de modificación del sistema osmótico de la célula. Las teorías propuestas a partir de los estudios realizados han indicado que las auxinas pue-

den a) incrementar el contenido osmótico de la célula, b) incrementar la permeabilidad al agua de la célula, c) provocar una reducción de la presión de la pared, d) ocasionar un aumento de la síntesis de pared o e) inducir la síntesis de RNA o proteínas específicas, lo cual, a su vez, acarrearía un aumento de plasticidad y de extensión de la pared celular.

La *dominancia apical* se basa en que la yema apical o terminal de muchas plantas vasculares goza de un crecimiento muy activo, mientras que las yemas laterales permanecen inactivas. Existen muchas teorías acerca de esto. **Thiman** (1937) afirmó que las yemas laterales eran más sensibles a la auxina y que la concentración de auxina que estimula el crecimiento del tallo es inhibidora para el crecimiento de las yemas laterales.

Iniciación radicular, las raíces son mucho más sensibles a la auxina que los tallos y se puede obtener una auténtica estimulación del alargamiento de la raíz si se emplean concentraciones adecuadas. La aplicación a las raíces de concentraciones relativamente altas de auxina no solamente retarda el alargamiento sino que también provoca un incremento notable en el número de ramificaciones.

Partenocarpia, este fenómeno se basa en el desarrollo del fruto en ausencia de polinización. **Gustafson** (1939) se encontró con que en los ovarios de especies capaz de realizar partenocarpia de modo natural, el contenido en auxina es notablemente superior al que se encuentra en los ovarios de especies que precisan fecundación para producir fruto.

Abscisión, la influencia reguladora de las auxinas naturales sobre la abscisión de las hojas fue sospechada en primer lugar por **Laibach** (1933). **Addicott y Lynch** (1955) confirman que el ácido indol-3-acético es el factor regulador primario de la abscisión de los órganos de las plantas.

La auxina estimula la *respiración* de forma indirecta y existe una correlación entre el aumento de crecimiento debido al tratamiento con auxina y el aumento sufrido por la respiración.

Formación de callo, la auxina también puede ejercer una cierta actividad sobre la división celular. Por ejemplo, al aplicar ácido indol-3-acético al 1% sobre el pecíolo de la planta se provoca la formación de una hinchazón amarilla en la zona de aplicación debida al desarrollo de un tipo de tejido, el callo, producido por la rápida división de las células.

Bonnert en 1932 encontró que un moho, el *Rhizopus suinus*, incrementaba la producción de ácido indol-3-acético si se cultivaba en un medio que contuviera peptona. El aumento que se observaba en la síntesis de la auxina natural fue atribuido a la oxidación de los aminoácidos contenidos en la peptona. Tres años después **Thimann** demostró que este moho podía convertir un aminoácido, el *triptófano* en AIA. Desde entonces, se considera que el triptófano es el precursor primario del AIA.

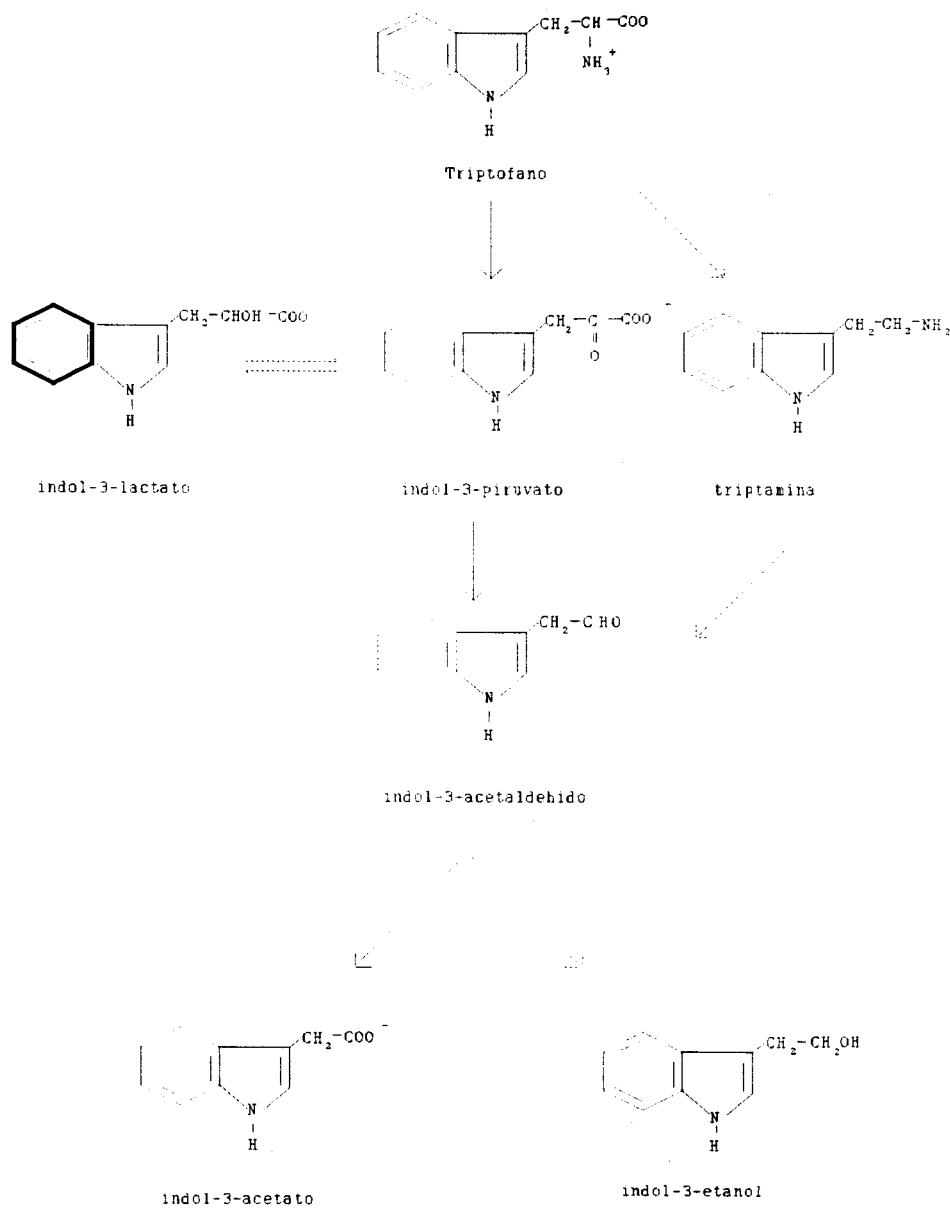
Por otra parte, las mejoras observadas en la obtención del AIA a partir de material vegetal, hirviendo éste o realizando la extracción a bajas temperaturas corroboraron la idea de **Skoog** y **Thimann** (1940) de que la producción de AIA era un proceso enzimático. En 1947, **Wildman** consiguió aislar, partiendo de hojas de espinaca, un sistema enzimático capaz de convertir el triptófano en AIA. Estudios detallados (**Wildman** y **Bonner**, 1948) sobre la presencia de un enzima capaz de convertir el triptófano en AIA en los coleóptilos de Avena pusieron de manifiesto la existencia de una estrecha relación entre la distribución de AIA y la del enzima.

Las posibles rutas metabólicas, para la obtención del AIA a partir del triptófano [3] (Figura 5), fueron propuestas por **Gordon** y **Nieva** en 1949 en base a sus estudios sobre incubación de extractos brutos de hojas de ananás con triptófano, triptamina

o ácido indol-3-pirúvico. Estos autores indican que el AIA puede formarse a partir del triptófano siguiendo dos caminos diferentes: 1) la desaminación del triptófano para formar *ácido indol-3-pirúvico* seguida de una descarboxilación para formar *indol-3-acetaldehído* 2) la descarboxilación del triptófano para dar *triptamina* seguida de una desaminación para dar *indol-3-acetaldehído*. Tanto por un camino como por el otro se llega a la formación de *indol-3-acetaldehído*, que debe ser considerado como el precursor inmediato del AIA en las plantas. Ambas cadenas de reacción han sido puestas de manifiesto en diferentes materiales vegetales. Por otra parte, el *indol-3-acetaldehído* es fácilmente oxidado para dar *ácido indol-3-acético*.

Actualmente se ha puesto de manifiesto la existencia en las plantas de otros productos laterales como son el *ácido indol-3-láctico* (en equilibrio con el *ácido indol-3-pirúvico*) y el *indol-3-etanol* (proveniente de reducción del *indol-3-acetaldehído*) y que la vía a través de la *triptamina* es de importancia secundaria.

Figura 5.- Posibles rutas metabólicas para la síntesis de AIA a partir de triptófano



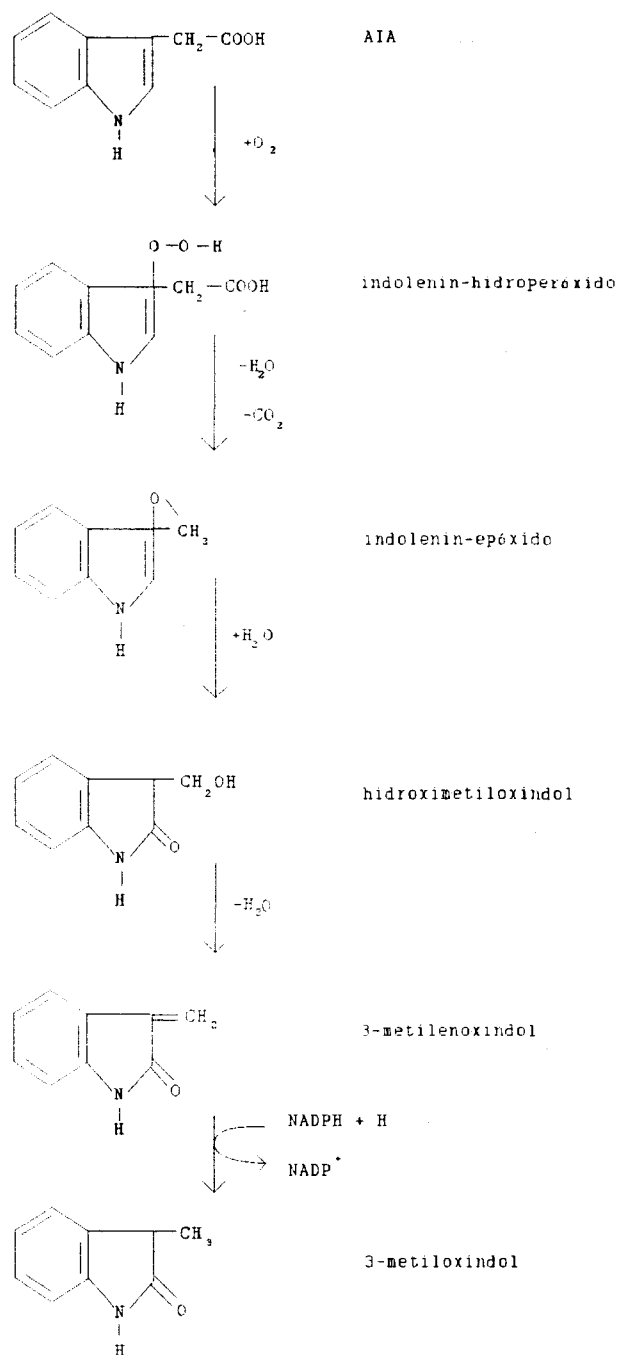
Por otra parte, se conocen los enzimas responsables de las distintas transformaciones, así, la transformación del triptófano a ácido indol-3-pirúvico se produce por acción de una *transaminasa*, la del ácido indol-3-pirúvico a indol-3-acetaldehído por acción de una α -*oxoácido-d Descarboxilasa* y el paso de indol-3-acetaldehído a ácido indol-3-acético por acción de una *aldehído-deshidrogenasa*.

Sin embargo, la presencia en algunas plantas de *indol-3-acetonitrilo* (IAN) en condiciones naturales parece indicar la existencia de otra vía de síntesis de AIA. Generalmente, el IAN no se encuentra en forma libre en las plantas, apareciendo siempre como constituyente de un tioglucósido, la *glucobrasicina*, que puede ser descompuesta por la *mirosinasa* y el IAN que queda libre se transforma con gran facilidad en AIA por acción de una *nitrilasa* (Figura 6) [3].

Respecto a la descomposición del AIA (Figura 7) [3] hay que indicar que ésta se produce por acción de un enzima constitutivo, no específico, que actúa frente al AIA como oxidasa (medio de oxidación, O_2) y frente a otros substratos como peroxidasa (medio de oxidación, H_2O_2). Esta *AIA-oxidasa* es una glucoproteína que es activada por el Mn(II) y por los monofenoles (tirosina, ácido *p*-hidroxibenzoico, canforol, etc...). Su acción es inhibida, en cambio, por *o*-difenoles (pirocatequina, ácido cafético, quercitina, etc...). De este modo es posible una amplia regulación del contenido de AIA a través del metabolismo de los compuestos fenólicos y de la actividad de la *fenoloxidas*.

En la célula la *AIA-oxidasa* debe encontrarse asociada con ribosomas y en este estado manifiesta propiedades alostéricas en relación con su actuación frente al AIA. Entre los productos de la oxidación del AIA destaca el *3-metilenoxindol* al cual se le atribuyen acciones fisiológicas especiales (generalmente efecto inhibidor). Por otra parte, su reducción a *3-metiloxindol* es considerada como una "reacción de desintoxicación".

Figura 7.- Descomposición enzimática del AIA



AUXINAS SINTÉTICAS

Tras el descubrimiento del AIA, se pensó que, si una estructura tan simple era capaz de producir respuestas tan notables sobre el crecimiento, tendría que haber más compuestos con propiedades análogas que actuaran de igual forma. Muchos investigadores comenzaron a ensayar diferentes moléculas para ver si tenían las propiedades descritas para el AIA, y así, pronto se descubrió que también era capaz de favorecer el crecimiento de las células una serie de compuestos tales como: el ácido indenoacético, el ácido 2-benzofuranacético, el ácido 3-benzofuranacético, el ácido 1-naftilacético, etc...[4].

Posteriormente, se vio que otros compuestos que poseían anillo indólico también resultaban activos, como el ácido 3-indolpirúvico y el ácido indolbutírico, algunos derivados del naftaleno como el ácido naftil-1-acético y el ácido naftoxi-2-acético. Por último, el hecho de que algunos ácidos fenoxiacéticos tenían actividad auxínica llevó al descubrimiento del 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) con una gran actividad. A partir de aquí se desarrolló una amplia gama de moléculas con actividad auxínica, como el ácido 2-metil,4-clorofenoxiacético (MCPA) y el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ambos con propiedades herbicidas cuando se emplean a concentraciones elevadas y utilizados como armas químicas en la guerra del Vietnam.

El primer intento por relacionar la estructura de estos compuestos sintéticos con su actividad como auxinas fue realizado por **Koepfli** y colaboradores en 1938. Estos autores llegaron a la conclusión de que para que un compuesto presente actividad auxínica se requiere de forma general que la molécula presente tres características: a) un anillo insaturado b) una cadena lateral que posea un grupo ácido y c) alguna relación espacial entre el anillo insaturado y la cadena lateral provista de un grupo ácido.

Sin embargo se observa que la presencia de algunos sustituyentes en distintas posiciones del anillo puede hacer desaparecer la actividad auxínica. Un ejemplo clásico es la del ácido *N*-acetil indol-3-acético en comparación con el ácido indol-3-acético, ya que no presenta actividad como auxina. Por otra parte el grupo ácido no necesariamente debe ser un grupo carboxílico, grupos ácidos como el sulfónico o el fosfónico pueden servir para satisfacer la segunda condición.

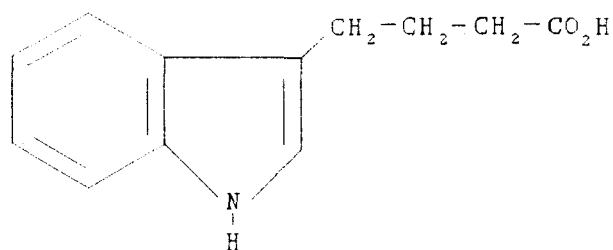
En 1955 **Thimann** y **Leopold** desarrollaron la teoría de la "separación de carga" indicando que los compuestos deben presentar en su estructura molecular una carga positiva (generalmente en un átomo de un anillo) que se encontrará a una distancia de 0.55 nm de la carga negativa del grupo ácido disociado (normalmente un grupo carboxílico). Esta distancia entre las cargas es característica de los compuestos con actividad auxínica ya sean derivados indólicos, fenoxiacéticos, benzoicos o picolínicos, e incluso en derivados sin anillo como es el caso de algunos derivados ditiocarbámicos.

Porter y **Thimann** en 1965 consideraron que los requerimientos estructurales para que los compuestos presentasen actividad auxínica estaban generalmente fundamentados en el hecho de que existiera la posibilidad de unión a un lugar con dimensiones estereo específicas, ya que la auxina activa entra en contacto con una superficie de estructura específica, cuya configuración y distribución de carga es exactamente complementaria a la de la molécula de auxina (unión por dos puntos).

Actualmente existe un amplio rango de especie químicas sintéticas que presentan actividad auxínica. Los principales grupos son los siguientes:

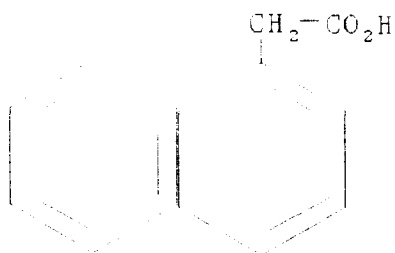
-Derivados indólicos: como el ácido indol-3-propiónico, el ácido indol-3-pirúvico y el ácido indol-3-butírico (Figura 8).

Figura 8.- Ácido indol-3-butírico.



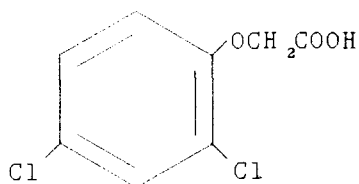
-Derivados del naftaleno: como el ácido 1-naftilacético (Figura 9), el ácido 2-naftilacético y el ácido 2-naftoxiacético.

Figura 9.- Ácido 1-naftilacético.



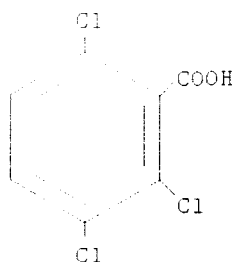
-Derivados fenoxiacéticos: como el ácido 4-clorofenoxi-acético, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (Figura 10), el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético y el ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético.

Figura 10.- Ácido 2,4-diclorofenoxiacético.



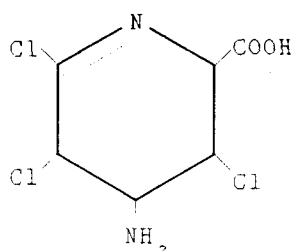
-Derivados benzoicos: como el ácido 2,4,6-triclorobenzoico y el ácido 2,3,6-triclorobenzoico (Figura 11).

Figura 11.- Ácido 2,3,6-triclorobenzoico.



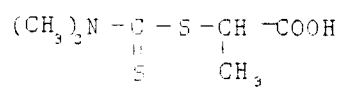
-Derivados picolínicos: como el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Figura 12).

Figura 12.- Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.



-Derivados ditiocarbámicos: como el ácido *N,N*-dimetil-2-metilditiocarbamato (Figura 13).

Figura 13.- Ácido *N,N*-dimetil-2-metilditiocarbamato.



2.-PROPIEDADES Y ANTECEDENTES ANALITICOS.

I.-FITOHORMONAS DERIVADAS DEL INDOL

* ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

Como se indica anteriormente el ácido indol-3-acético (AIA) es una fitohormona derivada del indol reguladora del crecimiento de las plantas perteneciente al grupo de las auxinas. Forma parte de la orina y se excreta aproximadamente 3 mg/día.

Síntesis.- Se puede preparar sintéticamente por dos formas distintas:

- a) Por reacción del indol con glicolato potásico a 250°C [5].
- b) A partir del indol y del ácido cloro acético [6].

Generalmente se comercializa en forma de polvo o disoluciones.

Propiedades.- Punto de fusión: 168-170°C. pK: 4.75. Soluble en etanol, eter y acetona. Insoluble en agua.

Métodos de análisis.- La determinación del ácido indol-3-acético tiene un marcado interés tanto en fisiología vegetal como en química clínica dado que, como se indicó anteriormente, se encuentra en las plantas y en la orina humana. Por otra parte se ha encontrado en tejido cerebral de algunos pacientes con diferentes tipos de cancer [7,8] y también afecta al sistema nervioso central [9]. Por tanto las matrices objeto del análisis de AIA son muy variadas y de muy diferente naturaleza. Salvo en las formulaciones comerciales donde, por sus características, las concentraciones son normalmente muy elevadas, en el resto de las matrices (fluidos biológicos, tejidos vegetales, aguas....) las cantidades de AIA presentes son a nivel de trazas por lo que se

hace necesario disponer de métodos suficientemente sensibles para poder determinarlo en este tipo de muestras.

Diferentes métodos han sido propuestos para la determinación de AIA utilizando diferentes técnicas entre las que sobresalen: cromatografía líquida de alta resolución, cromatografía de capa fina, cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas, espectrofluorimetría y espectrofotometría.

A continuación reseñamos los métodos encontrados en bibliografía.

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Hay varios métodos publicados que emplean distintos detectores, en la tabla 1 se muestran las características más sobresalientes de los principales métodos propuestos para la determinación de AIA, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

Como puede apreciarse en dicha tabla, en todos ellos se utiliza la detección espectrofluorimétrica como consecuencia de la fluorescencia nativa que presenta el analito en estudio en diferentes disoluciones.

Tabla 1.-Métodos de análisis para AIA por CLAR.

Detector	Eluyente	Matriz	L.D. ng/mL	ref
Fluoresc. λ_{ex} 254 nm	70% 0.01M AcONa, pH 4 30% Acetonitrilo	Fluido cerebro Sesos Plasma	0.12 0.5 2	10
Fluoresc. λ_{ex} 254 nm	93% 0.01M AcONa, pH 5 7% Acetonitrilo	Orina		10
Fluoresc. λ_{ex} 288 nm λ_{em} 340 nm	n-hexano/alc.isopropilo 95/5 en 0.5% ác. fórmico	Extractos de vegetales	5	11
Fluoresc. λ_{ex} 280 nm λ_{em} 350 nm	70% 0.01M AcONa, pH 4.3 30% metanol	Sesos	1	12
Fluoresc. λ_{ex} 278 nm λ_{em} 335 nm	0.005M ác. 1-pentano sulfónico, pH 3 Metanol/agua (7/3)	Sesos	4	13

Pastore y col. [14] proponen un método para determinar AIA mediante cromatografía en capa fina utilizando como eluyente $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$, 75/25/0.4 ó 75/25/0.2 v/v y como reactivo de spray el aldehído o-ftálico en medio sulfúrico. El límite de detección encontrado es de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La cromatografía de gases también ha sido utilizada para la cuantificación de AIA. Así, Cohen y col. [15] determinan AIA en plantas mediante GC-SIM-MS utilizando como patron interno [$^{13}\text{C}_6$]-AIA.

MÉTODOS ESPECTROFOSFORIMÉTRICOS

Winefordner y col. [16] han estudiado las características fosforescentes a temperatura ambiente de algunos derivados indólicos en función del pH. Estos autores proponen un método para determinar AIA, bien a pH neutro (λ_{ex} 286 nm y λ_{em} 450 nm) o a pH básico (λ_{ex} 288 nm y λ_{em} 450 nm), siendo el límite de detección encontrado 0.1 mg/L.

Ohkura y col. [17] proponen un método para determinar AIA basado en la adsorción de éste sobre un plato de cromatografía de capa fina impregnado con celulosa o alumina y posterior determinación fosforimétrica a temperatura ambiente con distintos reactivos. En la tabla 2 se muestran los máximos de excitación y de emisión y los límites de detección encontrados.

Tabla 2

Plato	Reactivo	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ nm	L.D. pmol/ μ L
Celulosa	Citrato sódico	290/450	11.0
	Acetato sódico	290/450	11.0
	Sucrose	290/450	33.0
	-----	290/450	20.0
Alumina	Citrato sódico	290/445	1.5
	Acetato sódico	290/445	2.0
	Sucrose	290/445	3.5
	-----	290/445	4.0

MÉTODOS ESPECTROFLUORIMÉTRICOS

Pastore y col. [18] determinan el AIA en formulaciones comerciales mediante espectrofluorimetría en medio sulfúrico con el reactivo aldehído o-ftálico con λ_{ex} 293, 353, 372 y 390 nm y λ_{em} 410 nm. El límite de detección es 2.30 ng/mL.

Sanchez y col. [19] trabajan en las mismas condiciones pero aplican la técnica de espectrofluorimetría sincrónica derivada, λ_{ex} 285 nm y λ_{em} 407 nm, el límite de detección disminuye siendo 0.8, 0.5 y 1.1 ng/mL para fluorescencia convencional, sincrónica con 1ª derivada y sincrónica con 2ª derivada respectivamente.

También Bukovac y col. [20] determinan espectrofluorimetricamente AIA en semillas de melocotón mediante α -indolpirona (λ_{ex} 452 nm y λ_{em} 480 nm) obteniendo como límite de detección 0.87 ng/mL. Utilizando espectrofluorimetría sincrónica ($\Delta\lambda$ 40 nm) obtienen un límite de detección de 0.65 ng/mL.

García Sanchez y col. [21] determinan el AIA utilizando como reactivo CuSO_4 en medio sulfúrico mediante fluorescencia convencional, sincrónica y derivada (λ_{ex} 400 nm, λ_{em} 475 nm, $\Delta\lambda$ 67 nm). Los límites de detección son: 12, 22, 3 y 3 ng/mL para fluorescencia convencional, sincrónica, 1ª derivada y 2ª derivada respectivamente.

* ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO

El ácido indol-3-butírico (AIB) es otra fitohormona derivada del indol perteneciente al grupo de las auxinas que favorece el enraizamiento de las plantas. Se fabrica en forma de polvo adherente o de pastillas solubles. Aparece en el metabolismo del AIA en plantas y en tejidos animales. Al igual que el AIA su determinación tiene interés en fisiología vegetal y en química clínica.

Síntesis.- Se puede sintetizar por:

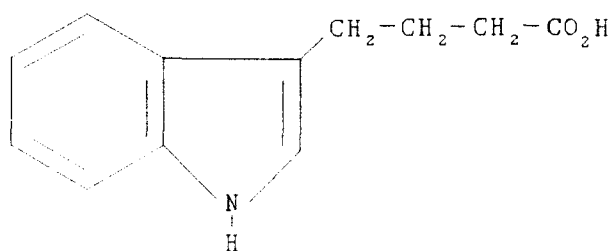
a) Calentando indol, γ -butirolactona y hidróxido sódico, acidificando después el producto [22].

b) Por descarboxilación del ácido 2-carboxiindol-butírico [23].

Propiedades.- Tiene un ligero olor característico. Punto de fusión: 123-125°C. Es prácticamente insoluble en agua y cloroformo, en cambio es soluble en alcohol, éter y acetona.

Estructura.- En la figura 14 se muestra su estructura.

Figura 14.-Estructura del ácido indol-3-butírico.



Métodos de análisis.-

Pastore y col. [14] determinan AIB mediante cromatografía en capa fina con distintos reactivos fluorogénicos de spray, utilizando como eluyente $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{COOH}$, 75/25/0.4 ó 75/25/-0.2 v/v. A continuación se enumeran los distintos reactivos fluorogénicos con los correspondientes límites de detección obtenidos:

o-ftaldehido/ H_2SO_4	12.5 mg/L
o-ftaldehido/2-mercaptoetanol/ H_2SO_4	100 mg/L
o-ftaldehido/cisteína	50 mg/L
H_2SO_4	10 mg/L

Como se indicó anteriormente **Winefordner** y col. [16] estudiaron la fosforescencia a temperatura ambiente de algunos derivados indólicos en función del pH. Entre ellos determinan AIB a pH neutro (λ_{ex} 287 nm y λ_{em} 448 nm) y a pH básico (λ_{ex} 286 nm y λ_{em} 450 nm), siendo el límite de detección encontrado de 0.25 mg/L.

Por último y al igual que el AIA, **Pastore** y col. [18] determinan AIB de formulaciones comerciales por fluorescencia convencional (λ_{ex} 347 nm y λ_{em} 404 nm) con o-ftaldehido en medio sulfúrico obteniendo un límite de detección de 8.0 ng/mL.

García Sanchez y col. [19] aplican la fluorescencia sincrónica y sincrónica derivada al mismo método obteniendo 0.22, 0.19 y 0.24 ng/mL como límite de detección por fluorescencia directa, sincrónica con 1ª derivada y 2ª derivada respectivamente.

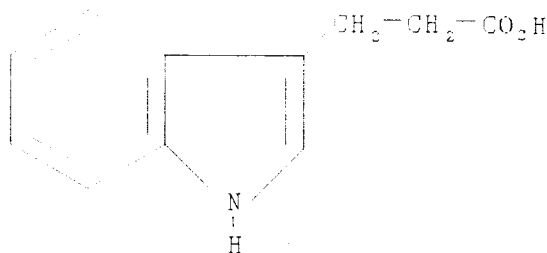
García Sanchez y col. [21] utilizan como reactivo CuSO_4 en medio sulfúrico. El límite de detección encontrado es de 6 ng/mL por fluorescencia convencional (λ_{ex} 400 nm y λ_{em} 534 nm) y de 13 ng/mL por fluorescencia sincrónica ($\Delta\lambda$ 134 nm).

* ÁCIDO INDOL-3-PROPIONICO

El ácido indol-3-propionico (AIP) es un derivado del indol que aparece en el metabolismo natural del AIA en plantas y tejidos de animales [19] y por ello también tiene interés en fisiología vegetal y en química clínica.

Estructura.- En la figura 15 se muestra su estructura.

Figura 15.- Estructura del ácido indol-3-propionico.



Métodos de análisis.-

Anderson y col. [10] determinan AIP en fluido cerebroespinal, sesos y plasma por cromatografía líquida de alta resolución con detector fluorimétrico. Utilizan como eluyente 70% de 0.01 M de acetato sódico pH=4 y 30% de acetonitrilo. El límite de

detección es 0.14, 0.14 y 0.35 ng/mL en fluido cerebroespinal, sesos y plasma respectivamente.

Al igual que el AIA y AIB, **Pastore** y col. [14] determinan AIP por cromatografía en capa fina con distintos reactivos fluorogénicos utilizando el eluyente descrito anteriormente. Los distintos reactivos junto con sus límites de detección obtenidos se muestran a continuación:

o-ftaldehido/H ₂ SO ₄	12.5 mg/L
o-ftaldehido/2-mercaptoetanol/H ₂ SO ₄	100 mg/L
o-ftaldehido/cisteina	50 mg/L
H ₂ SO ₄	10 mg/L

También hemos encontrado en bibliografía los mismos métodos espectrofluorimétricos para el AIP que para los anteriores derivados indólicos. Así tenemos que con el reactivo o-ftaldehido en medio sulfúrico [19] obtenemos como límite de detección 0.22, 0.18 y 0.27 ng/mL por fluorescencia directa (λ_{ex} 390 nm y λ_{em} 430 nm), sincrónica con 1ª derivada y 2ª derivada respectivamente.

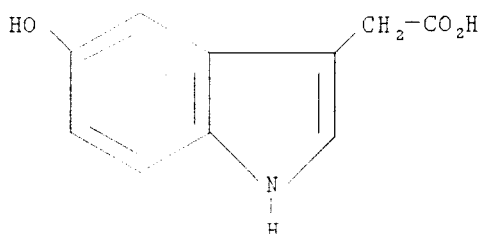
Utilizando el reactivo CuSO₄ en medio sulfúrico encontramos como límite de detección 12 y 13 ng/mL por fluorescencia convencional (λ_{ex} 443 nm y λ_{em} 526 nm) y sincrónica ($\Delta\lambda$ 83 nm) respectivamente [21].

* ÁCIDO 5-HIDROXIINDOL-3-ACÉTICO

El ácido 5-hidroxiindol-3-acético (AHIA) es un metabolito del triptofano que se forma a partir de la serotonina por la acción de la monoamino oxidasa en el hígado. El nivel de excreción en la orina es de 2 a 8 mg/día. La elevación de su contenido en orina está relacionada con la existencia de tumores carcinoides y procesos de metástasis, de ahí la importancia de su determinación [24].

Estructura.- En la figura 16 se muestra su estructura.

Figura 16.-Estructura del ácido 5-hidroxiindol-3-acético.



Métodos de análisis.- La importancia de la determinación del AHIA se debe a que como es el principal metabolito de la serotonina, su contenido puede considerarse como un índice valioso para estudiar el metabolismo orgánico de la serotonina. Se ha demostrado que los pacientes con carcinoides malignos excretan grandes cantidades de AHIA en la orina, como consecuencia de la excesiva formación de serotonina por el tumor carcinomatoso. Una amplia investigación de los más variados procesos clínicos ha demostrado que solamente en estos pacientes se encuentra una excrección elevada de AHIA, por lo que la determinación de AHIA urinario se puede considerar como un medio sencillo de diagnóstico de esta enfermedad [13].

El primer método de determinación de este compuesto encontrado en bibliografía data de 1955 y consiste en una reacción colorimétrica directamente sobre la orina, basada en la reacción del AHIA con el 1-nitroso-2-naftol [25].

En 1993, Mukerjee y col. [26] proponen otro método colorimétrico para la orina basado en la oxidación del AHIA con periodato sódico y posterior reacción con 3-metil-2-benzotiazolana para dar un complejo un complejo cuya longitud de onda máxima de absorción es 510 nm.

Pastore y col. en su trabajo de determinación de derivados del indol por cromatografía en capa fina [14] también determinan AHIA con los distintos reactivos fluorogénicos obteniendo los siguientes límites de detección:

o-ftaldehido/H ₂ SO ₄	10.0 mg/L
o-ftaldehido/2-mercaptoetanol/H ₂ SO ₄	5 mg/L
o-ftaldehido/cisteina	10 mg/L

Al igual que para el AIA Ohkura y col. [17] proponen un método para determinar AHIA basado en la adsorción de éste sobre un plato de cromatografía de capa fina impregnado con celulosa o alúmina y posterior determinación fosforimétrica a temperatura ambiente con distintos reactivos. En la tabla 3 se muestran los máximos de excitación y emisión y los límites de detección encontrados para las distintas condiciones estudiadas.

Tabla 3

Plato	Reactivo	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ nm	L.D. pmol/ μ L
Celulosa	Citrato sódico	310/450	6.0
	Acetato sódico	310/450	10.0
	Sucrose	310/450	20.0
	-----	310/460	19.0
Alumina	Citrato sódico	310/445	1.0
	Acetato sódico	310/445	1.5
	Sucrose	310/445	6.5
	-----	310/445	11.5

Los métodos más frecuente en bibliografía para la determinación del AHIA son los métodos cromatográficos y en especial aquellos que utilizan la cromatografía líquida de alta resolución. En la tabla 4 resumimos los trabajos encontrados de dicha técnica.

Tabla 4.-Métodos de análisis para AHIA por CLAR.

Detector	Eluyente	Matriz	L.D. ng/mL	ref
Fluoresc. λ_{ex} 254 nm	90% 0.01M AcONa, pH 4.3 10% Acetonitrilo	Fluido cerebro	1.1	10
Fluoresc. λ_{ex} 280 nm λ_{em} 350 nm	70% 0.01M AcONa, pH 4.3 30% metanol	Sesos	1.5	12
Fluoresc. λ_{ex} 278 nm λ_{em} 335 nm	0.005M ác. 1-pentano sulfónico, pH 3 Metanol/agua (7/3)	Sesos	6.0	13
Electro- química	Ác. cítrico Fosfato sódico pH 4.8 Metanol	Plasma		27
Fluoresc. λ_{ex} 285 nm λ_{em} 340 nm		Orina		28
Fluoresc. λ_{ex} 360 nm λ_{em} 460 nm	50 mM acetato pH 4.4 0.1 M $(NH_4)_2SO_4$	Orina		29
Fluoresc. λ_{ex} 295 nm λ_{em} 345 nm	Metanol/Acetato 14:86	Orina	200.0	30
Electro- química	50 mM Ác. Tricloroacét. 1.7 mM AEDT 1.2 mM Trietilamina pH 3 / Acetonitrilo 91/9	Orina		31

Miller y col. [32] proponen determinar el AHIA mediante espectrofluorimetría utilizando como reactivo el o-ftaldehído en etanol absoluto y en medio HCl, con λ_{ex} 360 nm y λ_{em} 470 nm.

Pastore y col. [18] aplican el mismo método pero en medio sulfúrico con aproximadamente las mismas condiciones (λ_{ex} 357 nm y λ_{em} 471 nm) y con un límite de detección de 2.3 ng/mL.

Ishida y col. [33] aplican dos reactivos fluorogénicos nuevos como son la bencilamina (λ_{ex} 350 nm y λ_{em} 487 nm, l.d. 72 pmol/mL) y el 3,4-dimetoxibencilamina (λ_{ex} 352 nm y λ_{em} 478 nm, l.d. 2.4 nmol/mL).

II.-FITOHORMONAS DERIVADAS DEL NAFTALENO

* ÁCIDO 1-NAFTILACÉTICO

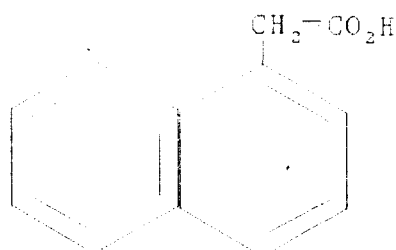
El ácido 1-naftilacético (ANA) es una fitohormona derivada del naftaleno que actúa como regulador del crecimiento de las plantas. El principal objetivo en el análisis de este tipo de sustancias es el control de cultivos agrícolas que van a ser consumidos por el hombre. Dada su baja toxicidad, los niveles de tolerancia de estos compuestos son relativamente altos en las legislaciones de varios países. A pesar de que pueden ser peligrosas si se ingieren en grandes cantidades.

Síntesis.- Se sintetiza a partir de naftaleno y ácido cloroacético [34] y también a partir del naftilacetonitrilo [35].

Propiedades.- Es un polvo incoloro cristalino, cuyo punto de fusión es 134-135°C. Su solubilidad a 20°C es 420 mg/Kg en agua; de 10.6 g/L en tetracloruro de carbono (26°C) y muy soluble en acetona, etanol y propanol.

Estructura.- En la figura 17 se muestra la estructura del ácido 1-naftilacético.

Figura....- Estructura del ácido 1-naftilacético.



Métodos de análisis.- Existen métodos volumétricos de determinación del ácido 1-naftilacético, como el método de **Rooney** [36]. **Baskakov** y col. [37] determinan ANA por volumetría previo proceso de saponificación, extracción con benceno y valoración con KOH 0.05 N.

Kreshkov y col. [38] proponen otro método volumétrico en medio metanol-alcohol isopropílico (1:2) basado en la valoración con metóxido de sodio.

También puede determinarse espectrofotométricamente, así **Nomura** [39] propone determinar ANA en disolución metanólica acidificada, midiendo la absorbancia a 223 nm. El rango dinámico lineal está comprendido entre 0.4-2.0 mg/L.

Young y col. [40] proponen un método para la determinación de residuos de ANA en piñas, mediante la extracción del ANA en éter de petróleo-éter etílico y posterior reextracción en agua. Las longitudes de onda de los máximos de absorción son 223, 272, 282 y 292 nm, el límite de detección es de 0.03 mg/L.

Las características espectrofluorimétricas del ANA fueron descritas en metanol y agua por primera vez por **Hornstein** [41].

Jollife y col. [42] determinan residuos de ANA en cítricos espectrofluorimétricamente pudiendo determinar hasta 0.1 mg/L de ANA. Posteriormente, el mismo autor [43], determina residuos de ANA en manzanas con una sensibilidad de 0.01 mg/L.

García Sanchez y col. [44] determinan ANA en manzanas por espectrofluorimetría convencional y de derivadas en un medio 50% etanol/agua, a pH 9, a una longitud de onda de excitación de 275 nm y emisión de 330 nm. Los límites de detección encontrados son de 4, 1.1 y 1.6 ng/mL para fluorescencia convencional, primera derivada y segunda derivada respectivamente.

Por otra parte, el ANA puede determinarse en diferentes medios disolventes mediante fosforescencia a baja temperatura. **Sanders y Winefordner** [45] localizan el máximo de excitación a 295 nm y el máximo de emisión a 510 nm, calculando un tiempo de vida de la emisión de 2.8 s y límite de detección de $4 \cdot 10^{-4}$ mg/L, todo ello en etanol absoluto. Más tarde los mismos autores [46] utilizando como disolvente etanol:agua (10:90 v/v) establecen dos máximos de excitación 230 y 297 nm y tres máximos de emisión localizados a 484, 514 y 550 nm. El tiempo de vida media es de 2.7 s y el límite de determinación 0.2 mg/L.

También se ha usado la fosforescencia a temperatura ambiente estudiando el ANA absorbido en papel de filtro [46], en medio etanol:agua (10:90 v/v). Los máximos de excitación se localizan a 233 y 299 nm y los tres máximos de emisión a 494, 516 y 554 nm, estableciéndose el límite de detección en 2 mg/L.

Su y col. [47] determinan ANA en mezclas sintéticas de pesticidas y sustancias tóxicas, utilizando la fosforescencia a temperatura ambiente con la presencia de diferentes átomos pesados.

Por último, **Zhang y col.** [48] realizan estudios sobre la fosforescencia a temperatura ambiente de ANA utilizando ciclodextrinas.

Diversos métodos cromatográficos han sido propuestos para la determinación de ANA en diferentes matrices. A continuación se enumeran los más representativos:

-Residuos de ANA han sido determinados en patatas por combinación de cromatografía de gases y espectrofotometría UV [49].

-Por cromatografía gas-líquido se determina residuos de ANA en aceitunas [50], midiéndose a 360 nm y pudiéndose determinar hasta 0.1 mg/L.

-Por cromatografía de gases y detección de captura de electrones [51] se determina residuos de ANA en concentraciones de 0.1 mg/L en peras y manzanas.

-Moy y Wheaton [52] determinaron residuos de ANA en naranjas y mandarinas por HPLC con detección fluorimétrica con un límite de detección de 0.008 mg/L.

-Krause [53] determina ANA por CLAR con detección fluorimétrica (λ_{ex} 288 nm y λ_{em} 330 nm). El rango dinámico lineal está comprendido entre 0.5 y 15 ng de ANA.

-Se determina ANA en manzanas [54] mediante CLAR utilizando como fase móvil metanol-agua y detección fotométrica a 283 nm. El límite de detección es de 20 ng/g.

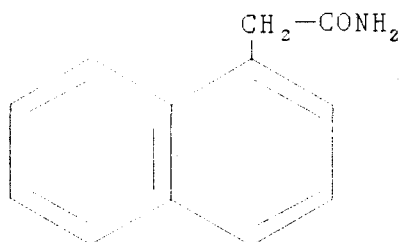
* 1-NAFTILACETAMIDA

El 1-naftilacetamida (ANA-A) es una fitohormona derivada del naftaleno que actúa como reguladora del crecimiento de plantas y normalmente se encuentra junto al ácido 1-naftilacético.

Propiedades.- Forma cristales incoloros de punto de fusión de 180°C y es ligeramente soluble en agua y soluble en éter, acetona, ácido acético y en alcohol.

Estructura.- La estructura del ANA-A se muestra en la figura 18.

Figura 18.- Estructura del ANA-A.



Métodos de análisis.- Son escasos los métodos propuestos para el análisis del ANA-A debido a que la atención se ha centrado casi exclusivamente en el ANA. **Sigrist** y col. [43] determinan fluorimétricamente el ANA-A en manzanas hidrolizándolo a ANA con una sensibilidad de 0.025 mg/L.

Cochrane y col. [55] utilizan CLAR con detección fotométrica y fluorimétrica para determinar ANA-A en manzanas obteniendo una sensibilidad de 10 ng/mL y de 100 ng/mL para la detección fluorimétrica y fotométrica respectivamente.

García Sanchez y col. [56] aplican la metodología de fluorescencia sincrónica derivada para la determinación de residuos de ANA-A en manzanas obteniendo como límite de detección 0.6 ng/mL.

CAPÍTULO I
EXPERIMENTAL: DISOLUCIONES,
INSTRUMENTACIÓN Y SOPORTES.

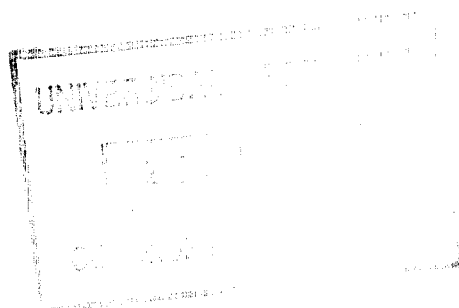
I.-REACTIVOS, DISOLUCIONES E INSTRUMENTACIÓN.

I.1.-REACTIVOS.

- Ácido Indol-3-Acético, SIGMA
- Ácido Indol-3-Propiónico, SIGMA
- Ácido Indol-3-Butírico, SIGMA
- Ácido 5-Hidroxiindol-3-Acético, SIGMA
- Ácido 1-Naftilacético, SIGMA
- Ácido 1-Naftilacetamida, SIGMA
- Ácido Giberélico, SIGMA
- Ziram, SIGMA
- Ácido Clorhídrico, PANREAC 35% purísimo.
- Hidróxido Sódico, MERCK p.a.
- Cloruro Sódico, MERCK p.a.
- Perclorato Sódico, MERCK p.a.
- Fosfato Disódico, MERCK p.a.
- Fosfato Monosódico, MERCK p.a.
- Sulfito Sódico, MERCK p.a.
- AEDT, MERCK p.a.
- Hipoclorito Sódico, CARLO ERBA.
- Titrisol patrón de Silice, MERCK.
- Titrisol patrón de Nitrato, MERCK.
- Titrisol patrón de Sulfato, MERCK.
- Titrisol patrón de Calcio, MERCK.
- Titrisol patrón de Magnesio, MERCK.
- Titrisol patrón de Sodio, MERCK.
- Titrisol patrón de Potasio, MERCK.
- Titrisol patrón de Hierro, MERCK.
- Titrisol patrón de Aluminio, MERCK.

Disolventes:

- Etanol absoluto 99,5%, PANREAC.
- Agua desionizada.



I.2.-DISOLUCIONES.

-Disoluciones de Ácido 3-acético indol, Ácido 3-propiónico indol, Ácido 3-butírico indol, Ácido 5-hidroxi-3-acético indol, Ácido 1-naftilacético y 1-naftilacetamida de 100 mg.L^{-1} preparadas disolviendo $0,0250 \text{ g}$ de sustancia en 250 mL de etanol absoluto.

Las disoluciones de trabajo se preparan a partir de estas por simple dilución con etanol absoluto.

-Disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{-2}$ preparada a partir de 100 mL de Na_2HPO_4 $0,1 \text{ M}$ al 50% etanol/agua y el volumen adecuado de NaH_2PO_4 $0,1 \text{ M}$ al 50% etanol/agua.

-Disolución de HCl 1 M .

-Disolución de NaOH $0,2 \text{ M}$.

-Disolución de NaCl 5 M .

-Disolución de NaClO_4 5 M .

-Disolución de AEDT 1 g.L^{-1} .

-Disolución de Na_2SO_3 $0,1 \text{ g.L}^{-1}$.

I.3.-SOPORTES EMPLEADOS.

Los soportes sólidos empleados son de diverso tipo como C-18 y Sephadex QAE-A-25, DEAE-A-25, SP-C-25, G-15 y G-25.

Se utiliza resina de cambio aniónico fuerte Sephadex QAE A-25 (Sigma) en ciclo cloruro con una capacidad de $3,0 \pm 0,4 \text{ meq.g}^{-1}$.

El Sephadex es un cambiador iónico, sustancia natural o sintética, portadora de grupos iónicos fijos, capaz de intercambiar contraiones ligados a ella por cantidades equivalentes de otros iones en disolución.

Su estructura consiste en una matriz insoluble formada por cadenas dextrano entrecruzadas mediante epíclorhidrina, que tiene unidos, mediante enlace eter, ciertos grupos cargados, dietil-(2-

hidroxi-propil)aminoetil, que están asociados a contraiones móviles (Cl^-).

Su caracter hidrofílico radica en el gran número de grupos hidroxilo que posee en su estructura, razón por la cual se produce el hinchamiento de este tipo de geles en medio acuoso y en disolución de electrolitos.

Se encuentran disponibles en tres grados de porosidad diferentes que responden a las denominaciones 15, 25 y 50. Empleamos una porosidad intermedia (25) ya que los de mayor porosidad sufren un mayor hinchamiento presentando dificultades para su empaquetamiento.

I.4.-INSTRUMENTACIÓN.

-Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 provisto de:

-Lámpara de descarga modulada de Xenón de 20 kW.

-Monocromadores Monk-Gillieson cuyo intervalo de longitud de onda es de 200 nm a 800 nm en el orden cero para excitación y de 200 nm a 900 nm en el orden cero para emisión.

-Curva de corrección de Rhodamina que está almacenada para corregir la respuesta del fotomultiplicador de referencia.

-Fotomultiplicador Gated.

-Fluorescence Data Manager Software.

-Desionizador de agua SETA compuesto por un equipo de ósmosis inversa mod. BL-A3 y un equipo de cambio iónico mod. SETAPUR-4E.

-Agitador rotativo de botellas Agitaser mod. 2000 de velocidad de rotación variable en el intervalo de 0-100 rpm.

-Ultrasonidos Selecta.

-pH-metro digital Crison mod. 517.

-Balanza analítica Mettler mod. AE 163.

-Termostato Thermomix 1441.

-Bomba Büchi B 169.

I.5.-MATERIAL DE LABORATORIO.

- Matraces aforados (clase A) Afora de diferentes volúmenes.
- Pipetas aforadas y graduadas de distintos volúmenes, clase A.
- Vasos de precipitado de diferente capacidad.
- Botellas de vidrio Schott de diferente capacidad.
- Goteros provistos de tetinas para el empaquetamiento de la resina en la cubeta de medida.
- Cubetas de fluorescencia STARNA (tipo 1-Q-1-6) de 1 cm y 1 mm de paso de luz para las medidas en disolución y en fase sólida respectivamente.
- Embudos filtrantes provistos de placa de vidrio sinterizado.

I.6.-ORDENADORES Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS.

- Ordenador personal 386SX con:
 - 4 Mbytes de memoria RAM.
 - Disco duro de 80 Mbytes.
 - Unidades de disco flexible de 5^{1/4} y 3^{1/2} pulgadas.
 - Targeta gráfica Super VGA.
- Impresora Canon BJ-300 y Hewlett Packard Laserjet III.
- Programas empleados:
 - Wordperfect V 5.1.
 - Harvard Graphics V 3.00 (Bistream Inc. 1991).
 - Grapher V 1.75 (Golden Softwar Inc. 1988).
 - Surfer V 4.13 (Golden Softwar Inc. 1989), adaptado y modificado por nosotros.
 - Statgraphics V 6.0
 - ALAMIN (Ana García Campaña. Tesis doctoral. Universidad Granada 1995).
- La recogida y tratamiento de datos se ha realizado mediante el programa Fluorescence Data Manager (Perkin-Elmer).

La comunicación con el espectrofluorímetro se ha establecido mediante una interface R-232C, vía puerto serie, permitiendo el registro de cualquier tipo de espectro, sea de fluorescencia o de fosforescencia. Los espectros fueron almacenados en discos flexibles de 3^{1/2} pulgadas para su posterior tratamiento con los programas anteriormente citados.

CAPÍTULO II

*ESTUDIO ESPECTROFLUORIMÉTRICO
DE LOS ANALITOS*

En este capítulo abordamos el estudio individual de cada una de las fitohormonas seleccionadas: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido indol-3-propiónico (AIP), ácido 5-hidroxiindol-3-acético (AHIA), ácido 1-naftilacético (ANA) y 1-naftilacetamida (ANA-A); con objeto de establecer las características fluorescentes así como la influencia que ejercen las diferentes variables químicas sobre ellas.

Debido a la baja solubilidad de las fitohormonas seleccionadas en agua se ha elegido etanol absoluto como disolvente para preparar las disoluciones patrón, evitando así posteriores problemas de miscibilidad con el agua, ya que nuestro estudio se va a realizar en este medio. El estudio se ha realizado en medio etanol-agua al 50%.

I.-CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES.

I.1.-ESPECTROS DE LUMINISCENCIA TOTAL.

Para conseguir una descripción completa de las características fluorescentes de un determinado compuesto, se requiere un espectro tridimensional, en el cual uno de los ejes es la escala de la longitud de onda de excitación; un segundo eje, representa la longitud de onda de emisión, y el tercero, es el eje de intensidades. Tales espectros son conocidos como espectros de excitación/emisión o espectros de luminiscencia total.

Este espectro de luminiscencia total es una proyección que contiene n espectros individuales superpuestos. En nuestro caso la obtención de los mismos ha sido posible gracias a la comunicación, vía puerto serie (RS-232 C), establecida entre el espectrofluorímetro y un ordenador tipo PC; a un programa de recogida y tratamiento de datos (FLDM) y a un programa de representación tridimensional (GOLDEN SURFER). Mediante un programa BASIC escrito en el dialecto de FLDM se registran una serie de espectros de emisión con un incremento de λ_{exc} constante. Estos espectros son transformados en un fichero de formato .GRD compatible con el GOLDEN SURFER mediante un programa PASCAL.

Para la obtención de los espectros tridimensionales de las fitohormonas se prepararon disoluciones de $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ en un volumen final de 10 mL al 50% etanol/agua de cada uno de ellos a partir de disoluciones etanólicas intermedias de 1mg.L^{-1} , para lo cual se pipeteo 0.25 mL de dichas disoluciones, 4.75 mL de etanol y se enrasó con agua bidestilada. A continuación se procedió al registro de los espectros en las siguientes condiciones:

- Intervalo de emisión entre 290 y 410 nm.
- Intervalo de excitación entre 200 y 280 nm.
- $-\Delta\lambda_{exc}$ 2 nm.
- Rendijas de excitación y emisión de 5 nm.
- Velocidad de barrido 240nm.min^{-1} .

-Número de barridos 40.

Con objeto de obtener el espectro de luminiscencia neto del sistema y hacer desaparecer la línea Rayleigh de la representación se registró el espectro del blanco (disolución al 50% etanol/agua) en las mismas condiciones, para a continuación restárselo al sistema.

El resultado se muestra en la figuras II.1, II.2, II.3 II.4, II.5 y II.6.

FIGURA II.1.-Espectro tridimensional del AIA.

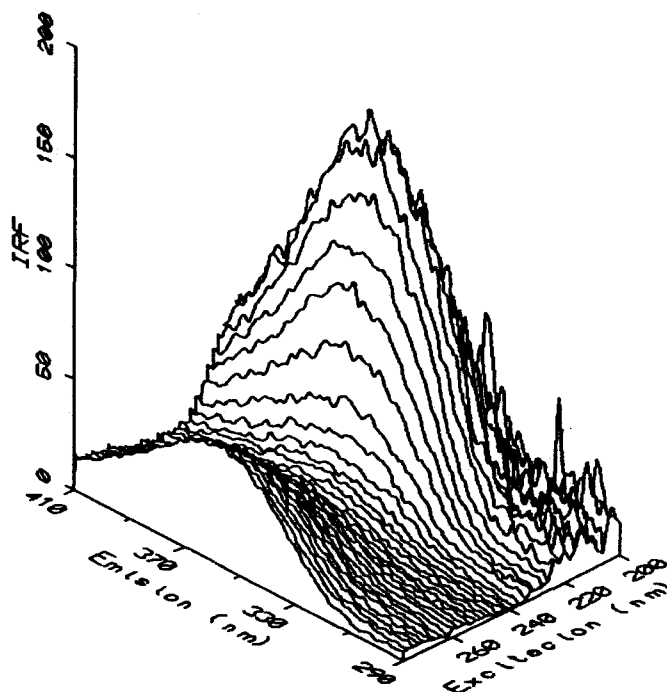


FIGURA II.2.-Espectro tridimensional del AIB.

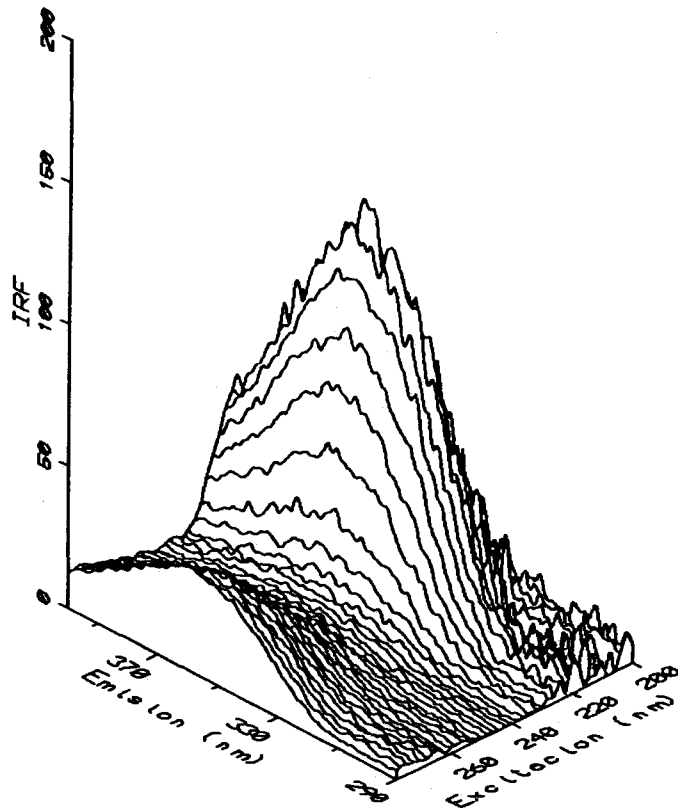


FIGURA II.3.-Espectro tridimensional del AIP.

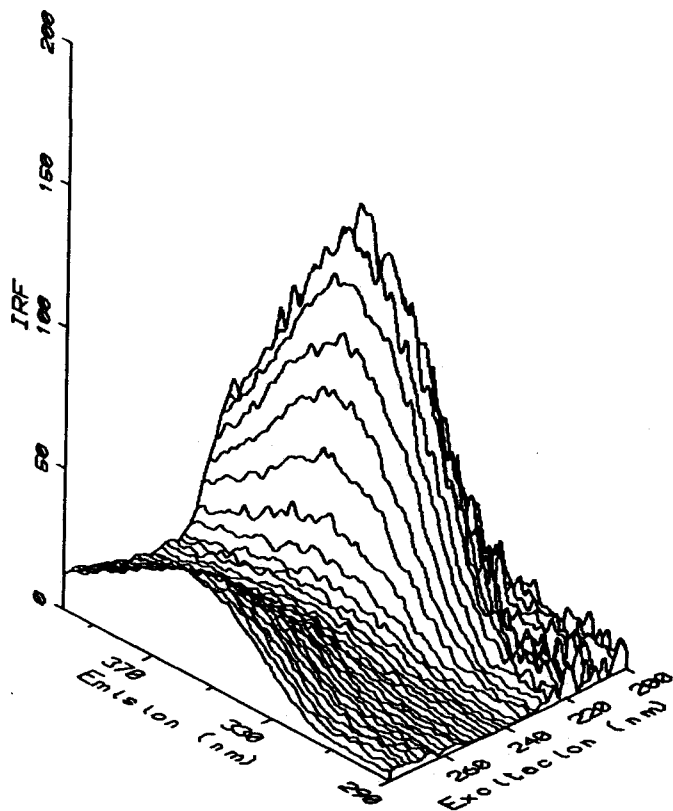


FIGURA II.4.-Espectro tridimensional del AHIA.

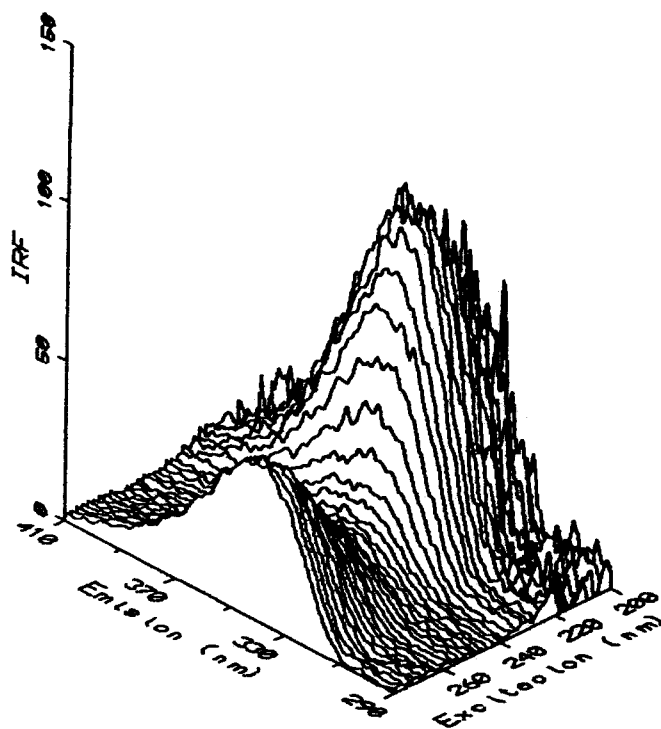


FIGURA II.5.-Espectro tridimensional del ANA.

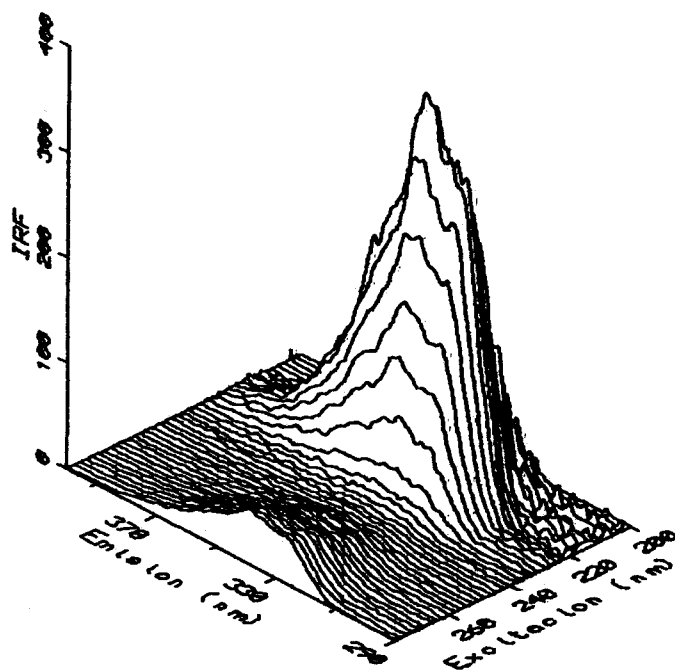
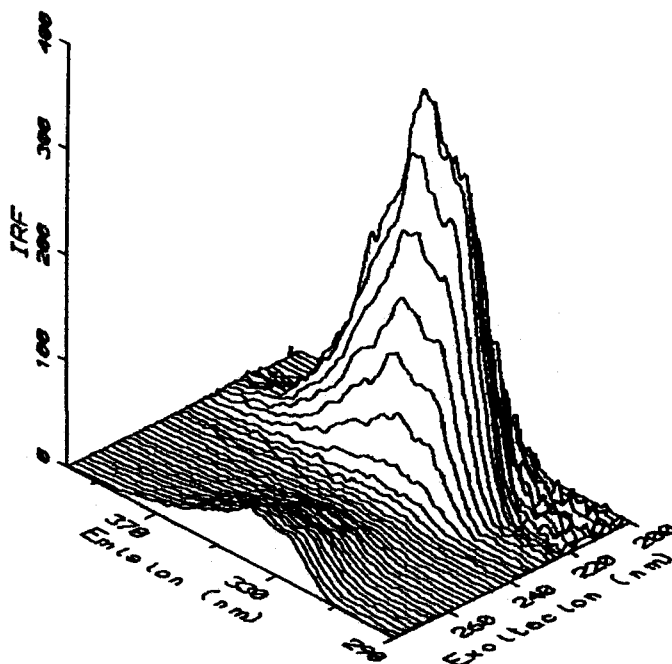


FIGURA II.6.-Espectro tridimensional del ANA-A.



I.2.-MAPAS DE CONTORNO (TOPOGRAMAS).

Un segundo método para representar los espectros de luminiscencia total es mediante curvas de nivel o topogramas.

Esta posibilidad también está contemplada en las opciones de GOLDEN SURFER. Los dos ejes normales representan las longitudes de onda de excitación y de emisión mientras que las intensidades se expresan con una serie de curvas de nivel. Este sistema presenta ventajas importantes pues permite, entre otras cosas, determinar el máximo del sistema con gran precisión, calcular el intervalo de longitud de onda óptimo para la obtención de espectros sincrónicos y trazar la ruta más conveniente cuando se trabaja en fluorescencia sincrónica de ángulo variable o asincrónica.

A continuación se muestran las curvas de nivel de las fitohormonas estudiadas.

FIGURA II.7.-Topograma del AIA.

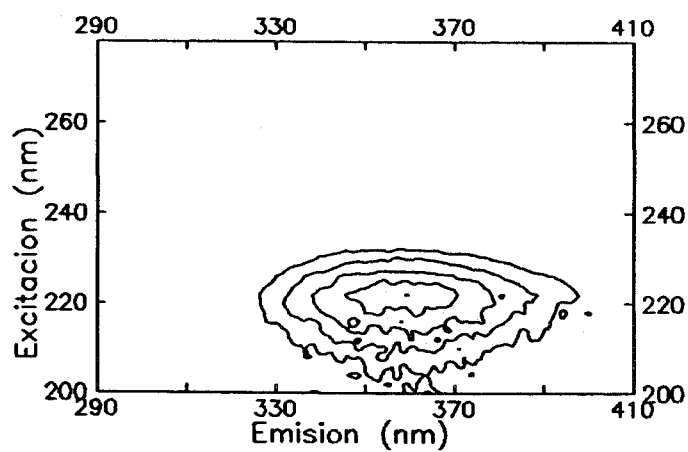


FIGURA II.8.-Topograma del AIB.

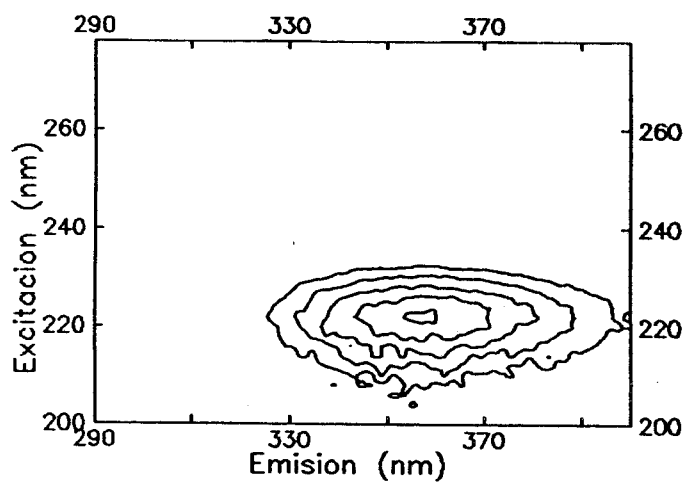


FIGURA II.9.-Topograma del AIP.

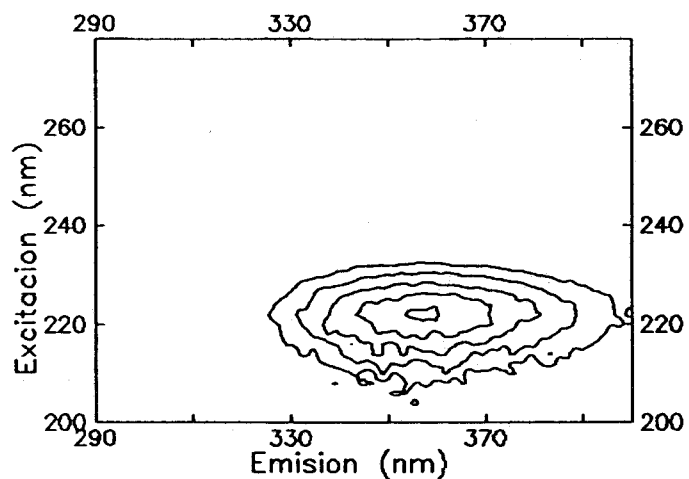


FIGURA II.10.-Topograma del AHIA.

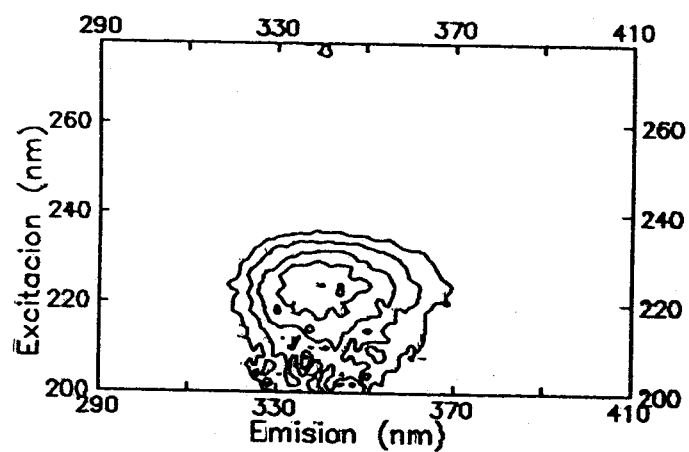


FIGURA II.11.-Topograma del ANA.

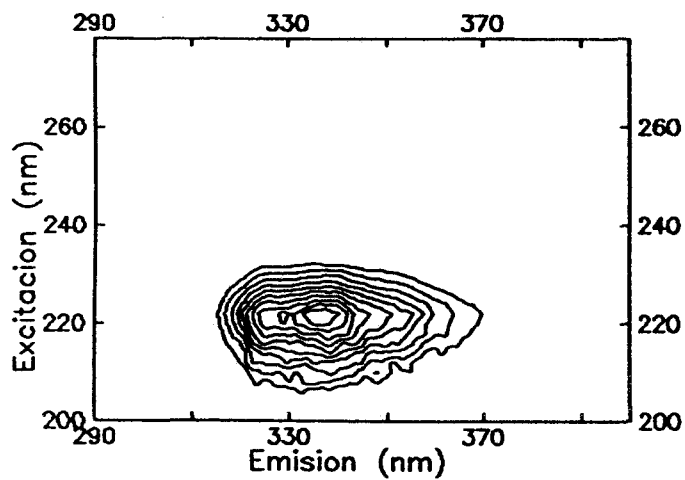
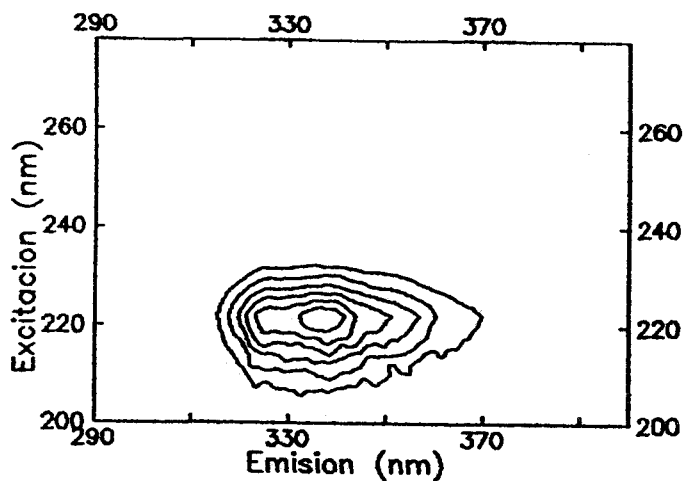


FIGURA II.12.-Topograma del ANA-A.



I.3.-ESPECTROS BIDIMENSIONALES.

El espectro de luminiscencia total, como se ha indicado anteriormente, nos permite tener una visión global del comportamiento fluorescente del sistema y poder elegir la características espectrales óptimas, extrayendo mediante la opción correspondiente del programa utilizado, los espectros de emisión y excitación más intensos del conjunto. Así se obtuvieron los espectros bidimensionales representados a continuación, de los cuales se seleccionó la longitud de onda de trabajo, para la máxima intensidad, tanto de excitación como de emisión.

FIGURA II.13.-Espectros de excitación (---) y emisión (—) del AIA.

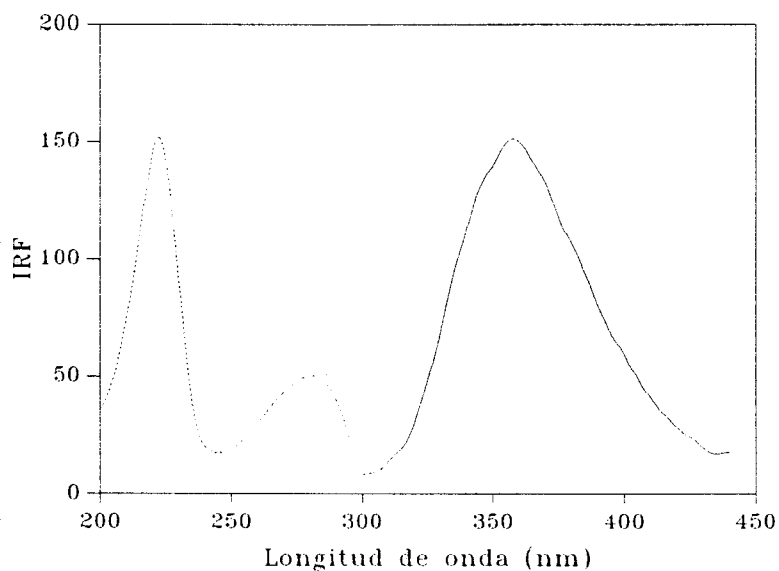


FIGURA II.14.-Espectros de excitación (---) y emisión (—) del AIB.

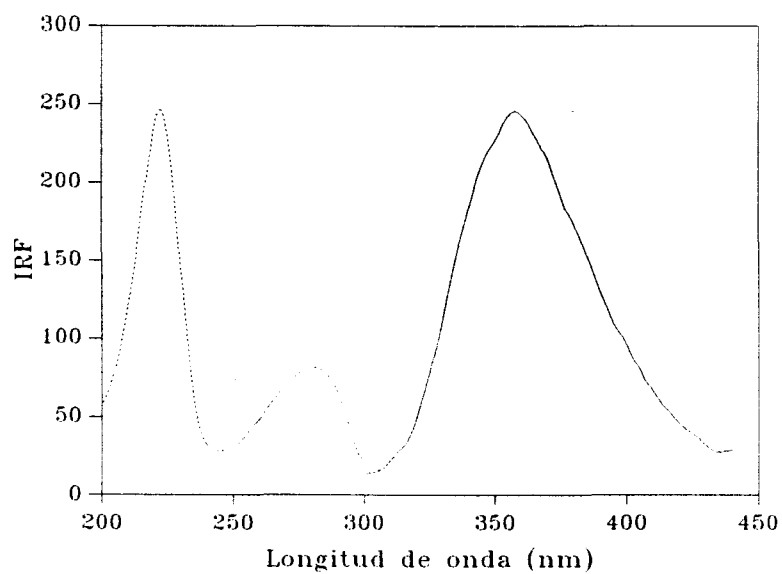


FIGURA II.15.-Espectros de excitación (---) y emisión (—) del AIP.

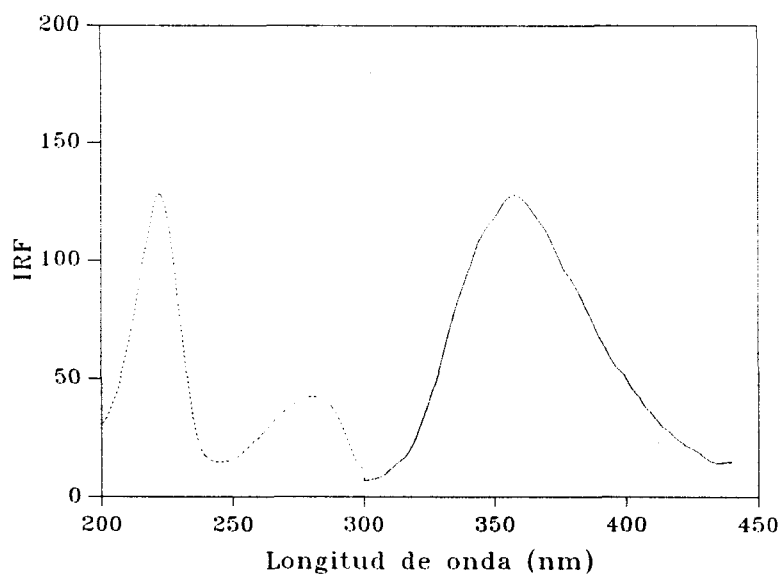


FIGURA II.16.-Espectros de excitación (---) y emisión (—) del AHIA.

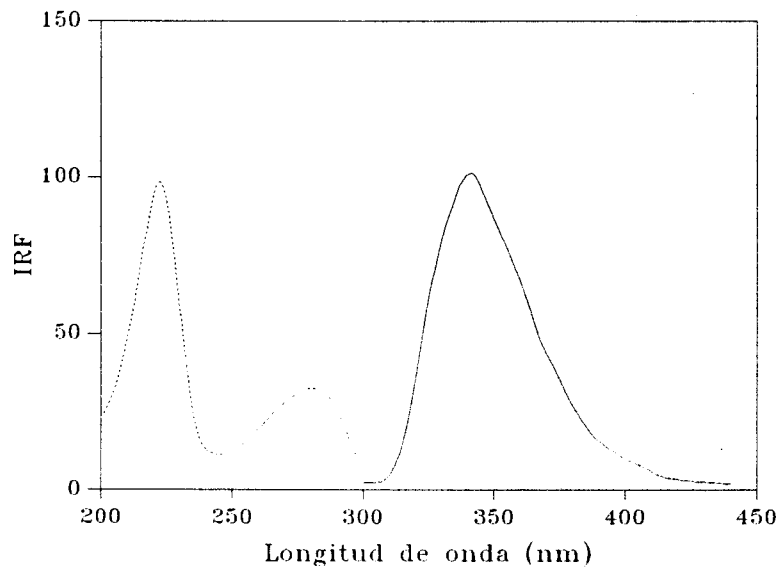


FIGURA II.17.-Espectros de excitación (---) y emisión (—) del ANA.

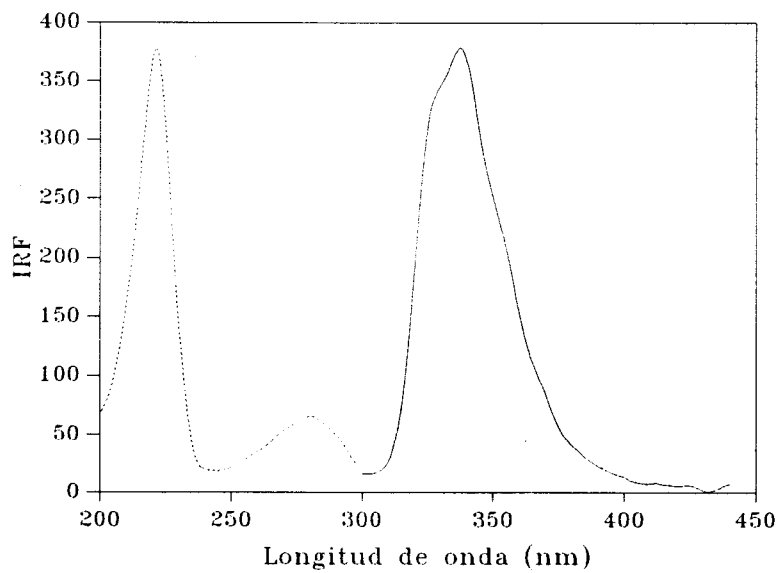
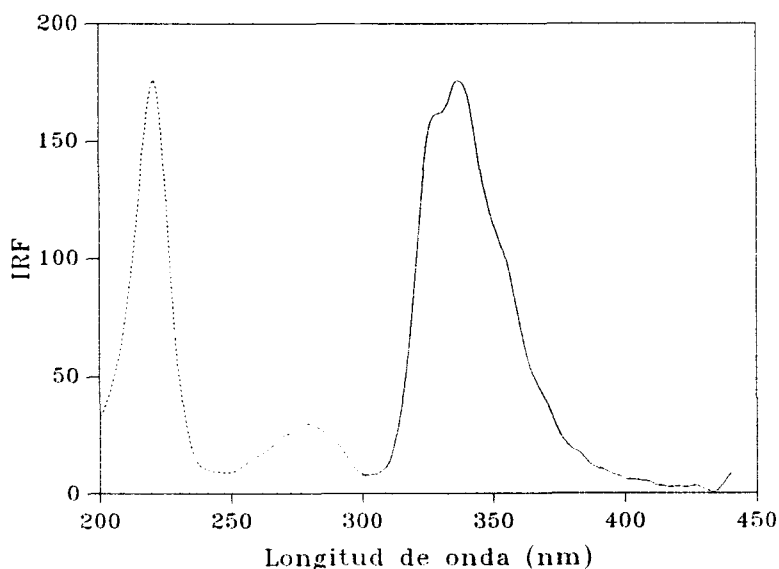


FIGURA II.18.-Espectros de excitación (---) y emisión (—) del ANA-A.



En la tabla II.1 se indican las longitudes de onda máxima de excitación y de emisión así como la relación intensidad relativa de fluorescencia / concentración de cada uno de los analitos estudiados.

TABLA II.1

Fitohormonas	λ_{exc} nm	λ_{em} nm	IRF/Conc.
IAA	222	359	5.63
AIB	222	359	9.83
AIP	222	359	4.69
AHIA	222	341	2.28
ANA	222	337	15.55
ANA-A	222	337	6.50

De la observación de la anterior tabla II.1 y figuras II.13-II.18 puede deducirse que todas las fitohormonas en estudio presentan espectros de excitación de morfología similar con un máximo situado a 222 nm. El AIA, AIB e AIP presentan así mismo espectros de emisión de morfología muy parecida con un máximo situado

a 359 nm. Por su parte el ANA y ANA-A presentan espectros de emisión idénticos con un máximo a 337 nm. El AHIA se diferencia de las anteriores en la posición del máximo que pasa a 341 nm.

Por otra parte el ANA posee el mayor rendimiento relativo de fluorescencia (15.55) y el AHIA el menor (2.28).

II.-OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.

Con objeto de establecer la posibilidad de la determinación individual de estos analitos a muestras reales, estudiamos la influencia que ejercen las distintas variables químicas sobre la intensidad relativa de fluorescencia.

Las variables seleccionadas son: la acidez del medio, posible empleo de disolución reguladora, fuerza iónica, estabilidad de los analitos, temperatura y porcentaje de etanol utilizado.

II.1.-INFLUENCIA DEL PH DEL MEDIO.

Para estudiar la posible influencia que ejerce la acidez del medio sobre la intensidad de fluorescencia de las fitohormonas en disolución se realizó la siguiente experiencia:

Se preparó en una serie de matraces aforados de 100 mL en los que se introdujeron respectivamente 5 ml de disolución etanólica de $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ para cada fitohormona, excepto para el ANA que se pipetearon 2.5 mL, 45 mL de etanol absoluto (47.5 mL en el caso del ANA), 50 mL de agua bidestilada y se enrasó con etanol-agua al 50%. Dicha disolución se transfirió a un vaso de precipitado de 200 mL y mediante la adición de pequeños volúmenes de ácido clorhídrico e hidróxido sódico de concentración adecuada, se ajustó el pH al valor deseado en cada caso. A continuación se registrarón los espectros de excitación y emisión con las siguientes condiciones operatorias:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} nm	222	222	222	222	222	222
Intervalo _{exc}	200-300	200-300	200-300	200-300	200-300	200-300
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-400	300-400
Rendijas _{exc/em}	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

La experiencia se repitió sucesivamente para cada valor del pH seleccionado en el intervalo comprendido entre pH=1.0 y 14.0.

En la tabla II.2 y en la figura II.19 se muestra la máxima intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de cada fitohormona.

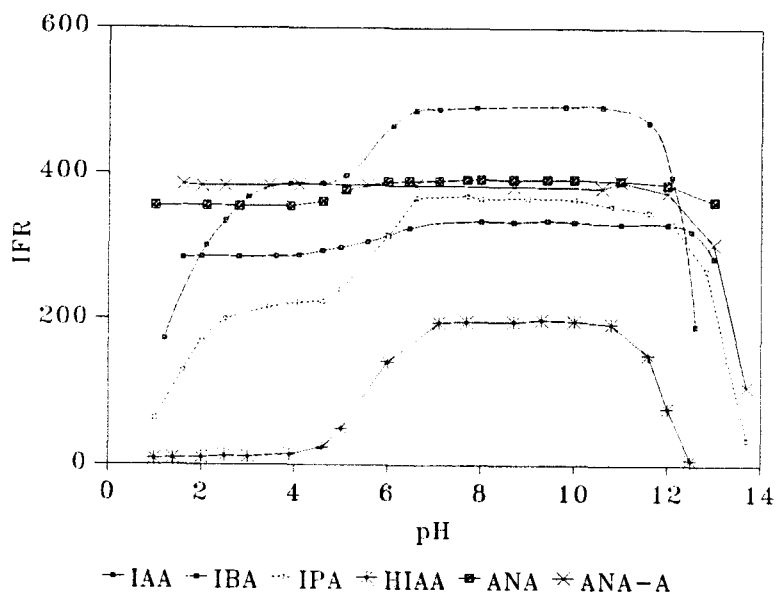
TABLA II.2.-Influencia del pH del medio.

fitohormona	pH	IFR	pH	IFR
AIA	1.62	283.64	6.46	324.64
	2.01	285.59	8.05	334.12
	2.84	284.86	8.71	333.39
	3.63	285.59	9.42	334.85
	4.12	287.29	10.15	333.47
	4.67	293.38	11.09	330.58
	5.03	298.01	12.10	330.15
	5.56	305.56	12.54	321.77
	6.06	314.58	13.11	285.10
AIB	1.20	173.30	6.60	485.71
	2.11	300.42	7.12	488.26
	2.51	333.54	7.90	490.80
	3.05	366.65	9.80	492.07
	3.91	384.81	10.60	492.07
	4.60	385.47	11.65	470.46
	5.10	396.56	12.10	395.45
	6.15	464.93	12.60	192.03
AIP	1.62	129.78	7.70	368.27
	2.06	173.48	8.00	364.42
	2.44	200.37	9.05	365.35
	3.44	216.05	10.10	363.97
	4.03	222.77	10.80	355.08
	4.62	223.89	11.70	346.90
	5.05	240.70	12.19	331.70
	5.97	313.53	12.83	268.60
	6.61	365.06	13.30	141.23
6.91	365.92	13.70	36.06	
AHIA	1.00	8.19	7.00	196.25
	1.40	9.54	7.80	196.79
	2.10	10.52	8.60	196.98
	2.60	12.46	9.30	199.64
	3.15	11.35	10.10	197.71
	3.90	14.94	10.70	194.38
	4.61	24.07	11.50	151.59
	5.10	49.78	12.11	78.12
6.00	142.08	12.50	7.76	
ANA	1.00	354.52	7.70	391.40
	2.10	354.82	8.00	391.73
	2.80	354.03	8.70	391.60
	3.90	354.39	9.42	391.51
	4.60	360.39	10.00	391.47
	5.10	376.60	11.00	390.50
	6.00	388.07	12.00	384.71
	6.46	388.93	13.00	361.52
7.10	389.40			

TABLA II.2.-Continuación.

ANA-A	1.60	384.04	8.70	381.45
	2.00	382.70	10.60	380.18
	2.50	382.23	11.00	389.02
	3.44	382.71	12.00	373.87
	4.10	383.74	13.00	304.41
	5.56	383.38	13.70	107.77
	6.60	382.82		

FIGURA II.19.-Influencia del pH.



Los resultados obtenidos nos permiten deducir las siguientes conclusiones:

-Las longitudes de onda de excitación y emisión permanecen constantes en el intervalo de pH en el que cada analito muestra fluorescencia.

-El ANA y ANA-A presentan elevada intensidad relativa de fluorescencia a pH inferior a 11, decreciendo al aumentar el valor de aquel.

-Las fitohormonas derivadas del indol presentan máxima intensidad relativa de fluorescencia en el intervalo de pH compren-

dido entre 7 y 11, disminuyendo aquella para valores superiores e inferiores de este.

-El AHIA no presenta fluorescencia a pH inferior a 4.

II.2.-INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA.

Ante la conveniencia de fijar el pH del medio como se ha puesto de manifiesto en la experiencia anterior, se ha seleccionado el sistema HPO_4^{-2} 0.1 M / $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua como el más adecuado en todos los casos, ya que no ejerce ninguna influencia sobre la intensidad relativa de fluorescencia del sistema respecto a la obtenida cuando se emplea HCl o NaOH para fijar el pH del mismo. Hemos estudiado la influencia que el volumen de disolución reguladora ejerce sobre la intensidad de fluorescencia de las fitohormonas.

Para tal fin se preparó una serie de matraces aforados de 10 mL para cada fitohormona que contenían $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, para lo cual se pipeteó 0.5 mL de una disolución de 1mg.L^{-1} de cada uno de ellos (excepto para el ANA que su contenido era de $25 \mu\text{g.L}^{-1}$), volúmenes crecientes de la disolución reguladora y el volumen necesario de etanol absoluto y agua bidestilada para obtener una disolución al 50% etanol-agua, enrasando con etanol-agua al 50%.

Se registrarán los espectros de emisión con las siguientes condiciones operatorias:

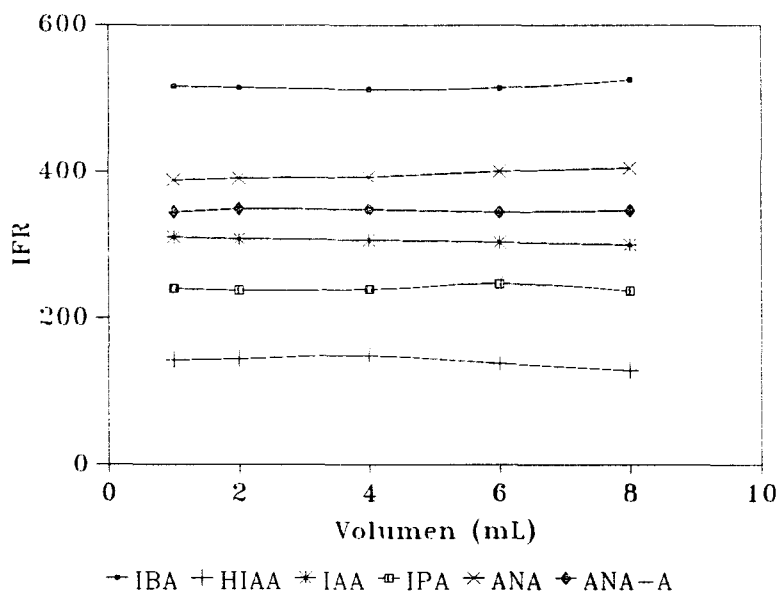
Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
$\lambda_{\text{exc}} \text{nm}$	222	222	222	222	222	222
$\lambda_{\text{em}} \text{nm}$	359	359	359	341	337	337
Intervalo λ_{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de cada fitohormona. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla II.3 y se representan en la figura II.20.

TABLA II.3.-Influencia del volumen de disolución reguladora.

Volumen mL	IFR					
	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
1	310.90	516.15	240.37	143.24	389.24	345.26
2	308.13	514.94	237.92	144.71	391.36	349.54
4	306.75	512.40	239.39	148.79	393.48	348.51
6	303.36	514.27	247.10	138.09	401.26	345.54
8	300.21	525.55	237.19	129.17	405.50	347.15

FIGURA II.20.-Influencia del volumen de disolución reguladora.



La observación de los resultados obtenidos pone de manifiesto que la intensidad de fluorescencia permanece constante para el volumen de disolución reguladora ensayado. Elegimos 2 mL para experiencias posteriores ya que éste volumen asegura la constancia del pH óptimo del sistema.

II.3.-INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA.

Se ha realizado el estudio de la influencia que la fuerza iónica del medio ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del sistema empleando dos sales diferentes NaCl y NaClO₄.

Para ello se prepararon dos series de matraces aforados de 10 mL para cada fitohormona conteniendo 50 µg.L⁻¹, para lo cual se introdujeron en cada uno de ellos 0,5 mL de disolución de 1 mg.L⁻¹ de cada fitohormona (excepto para el ANA que su contenido era de 25 µg.L⁻¹), 2 mL de disolución reguladora HPO₄⁻² 0,1 M/-H₂PO₄⁻¹ 0,1 M a pH 8 en etanol-agua al 50%, cantidades crecientes de NaCl 5 M ó NaClO₄ 5 M, volumen necesario de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y disolución de etanol-agua al 50% para enrasar.

Se registrarán los espectros de emisión en las siguientes condiciones operatorias:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En las tablas II.4 y II.5 se muestra la máxima intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión correspondiente a cada fitohormona y se representa en las figuras II.21 y II.22.

TABLA II.4.-Fuerza iónica (NaCl).

[NaCl] (M)	IFR					
	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
0.1	311.93	512.48	250.47	150.44	389.54	349.51
0.2	312.17	515.72	260.98	155.06	388.45	349.11
0.4	313.12	509.55	249.63	154.45	387.67	347.56
0.6	314.73	506.32	252.99	150.44	387.15	348.64
0.8	314.07	510.40	261.40	149.44	387.15	347.56
1.0	314.78	506.32	242.06	144.94	387.15	346.87
1.5	312.53	506.32	242.48	148.52	388.19	348.51
2.0	309.66	511.69	245.53	156.43	387.89	349.81

FIGURA II.21.-Fuerza iónica (NaCl).

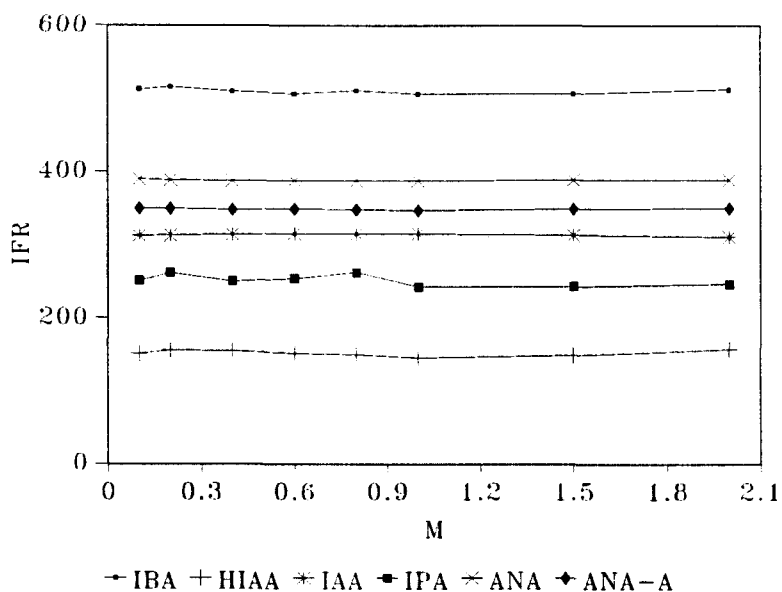
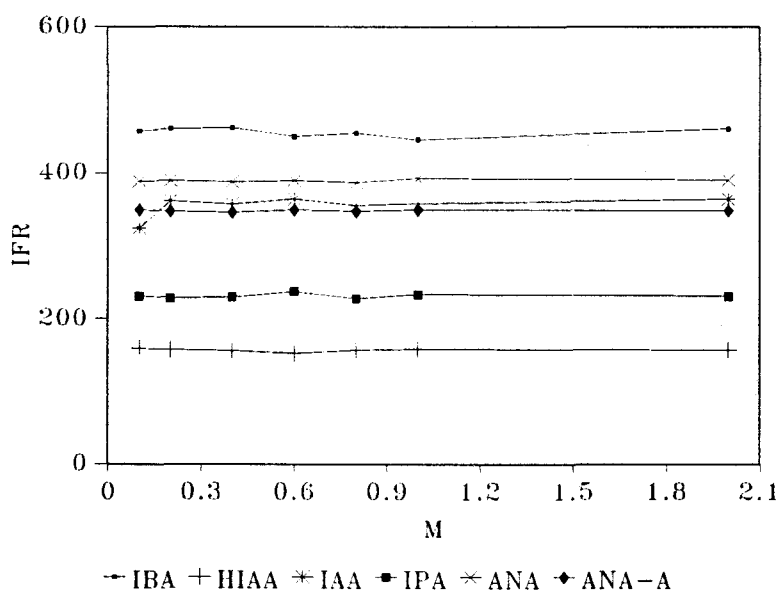


TABLA II.5.-Fuerza iónica (NaClO_4)

[NaClO_4]	IFR					
	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
0.1	323.87	456.61	230.37	158.97	388.22	348.56
0.2	360.87	460.24	227.92	157.06	388.73	347.12
0.4	356.25	461.45	229.39	155.45	387.22	345.28
0.6	363.18	449.35	247.10	151.44	389.23	348.36
0.8	355.09	454.19	237.19	156.44	386.72	346.58
1.0	357.40	455.72	243.06	157.94	392.24	348.65
2.0	363.59	459.93	242.21	156.43	389.73	347.68

FIGURA II.22.-Fuerza iónica (NaClO_4).

De la observación de las figuras II.21 y II.22 podemos concluir que la fuerza iónica no influye sobre la intensidad de fluorescencia de las fitohormonas en estudio.

II.4.-ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD.

Para establecer la estabilidad de las fitohormonas con el tiempo se preparó una disolución de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$, para lo cual se introdujeron en un matraz de 10 mL 0,5 mL de disolución de 1mg.L^{-1} de fitohormona (excepto para el ANA que su contenido era de $25 \mu\text{g.L}^{-1}$), 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{-2} $0,1 \text{M}/\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$

0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, volumen necesario de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y disolución al 50% etanol-agua para enrasar.

Se registraron los espectros de emisión periódicamente en las siguientes condiciones operatorias:

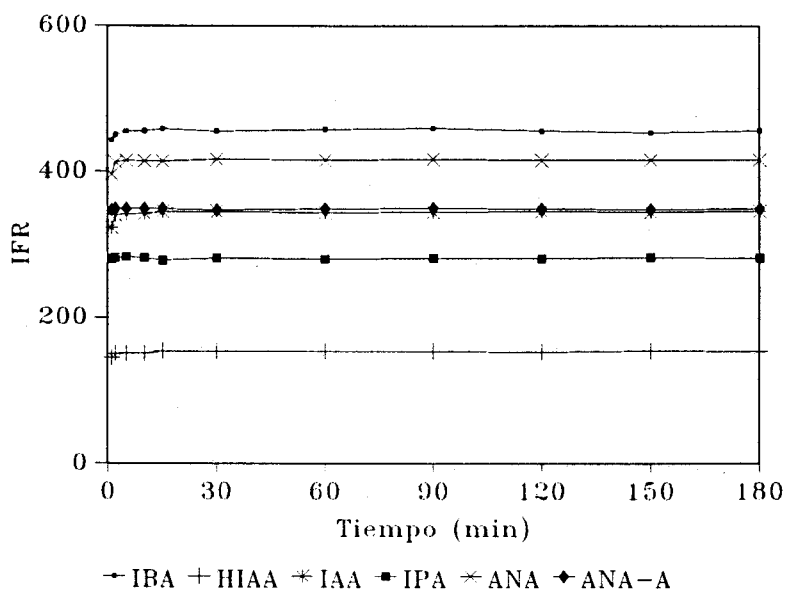
Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Inter- valo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-400	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En la tabla II.6 se muestra la máxima intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de cada fitohormona y se representa en la figura II.23.

TABLA II.6.-Estabilidad de las fitohormonas.

Tiempo (min)	IFR					
	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
1	322.78	442.91	284.81	143.92	395.67	347.21
5	322.78	449.24	281.64	143.92	412.00	348.56
10	329.11	465.06	287.97	150.25	414.66	349.12
15	341.77	455.56	281.64	150.25	413.98	348.51
30	344.93	458.73	278.48	153.41	414.25	348.75
45	344.93	455.56	281.64	153.41	416.48	347.15
60	343.92	462.25	280.36	152.96	415.22	348.54
90	344.58	459.58	281.54	153.21	416.89	349.47
120	345.21	455.68	280.99	152.36	415.21	348.51
150	344.26	453.48	282.36	153.54	415.58	347.85
180	345.10	456.45	281.58	152.99	415.88	349.14

FIGURA II.23.-Estabilidad de las fitohormonas.



De la tabla II.6 y figura II.23 podemos concluir que a partir de un minuto después de la preparación de las disoluciones de las fitohormonas estas son estables hasta al menos 3 horas.

II.5.-INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Para tal fin se preparó una disolución de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (excepto para el ANA que es de $25 \mu\text{g.L}^{-1}$) y se registraron los espectros de emisión para cada fitohormona, variando la temperatura, en las siguientes condiciones operatorias:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
$\lambda_{\text{exc}} \text{ nm}$	222	222	222	222	222	222
$\lambda_{\text{em}} \text{ nm}$	359	359	359	341	337	337
Inter- valo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En la tabla II.7 se muestra la máxima intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de cada fitohormona al calentar el sistema y en la tabla II.8 al enfriar el sistema con ayuda de un termostato, y se representan gráficamente en la figuras II.24, II.25, II.26, II.27, II.28 y II.29.

TABLA II.7.-Influencia de la temperatura, calentamiento.

°C	IFR					
	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
5	325.13	468.70	257.65	333.00	415.95	375.95
10	324.21	442.60	256.62	329.92	411.99	371.99
15	320.98	420.80	255.59	329.61	407.11	367.11
20	320.06	405.00	253.27	323.12	405.80	365.80
25	319.13	379.62	251.47	311.84	401.73	361.73
30	315.44	360.94	250.96	305.90	396.67	356.67
35	312.67	343.65	248.90	299.22	390.54	350.54
40	305.48	314.69	246.33	282.53	385.95	345.95
45	296.51	293.60	242.47	266.70	381.30	341.30
50	285.74	271.70	239.54	253.46	376.53	336.53
55	277.48	237.00	234.21	239.62	369.43	329.43
60	273.89	206.20	232.97	224.58	365.83	325.83

TABLA II.8.-Influencia de la temperatura, enfriamiento.

°C	IFR					
	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
60	276.94	207.70	232.97	228.26	365.83	325.83
55	284.51	233.30	235.63	251.29	373.85	333.85
50	295.44	278.50	242.58	272.70	382.10	342.10
45	304.28	311.80	248.62	294.49	390.02	350.02
40	316.05	340.30	249.51	319.47	399.44	359.44
35	323.62	376.70	254.66	341.88	409.51	369.54
30	333.53	406.80	259.89	362.39	419.00	379.14
25	338.94	431.50	260.18	384.10	425.24	385.24
20	344.35	455.50	261.34	400.23	433.98	393.98
15	350.36	474.20	265.70	424.05	441.21	401.21
10	355.17	496.90	266.86	441.03	448.18	408.18
5	357.09	507.20	265.99	462.40	453.21	415.41

FIGURA II.24.-Influencia de la temperatura sobre AIA.

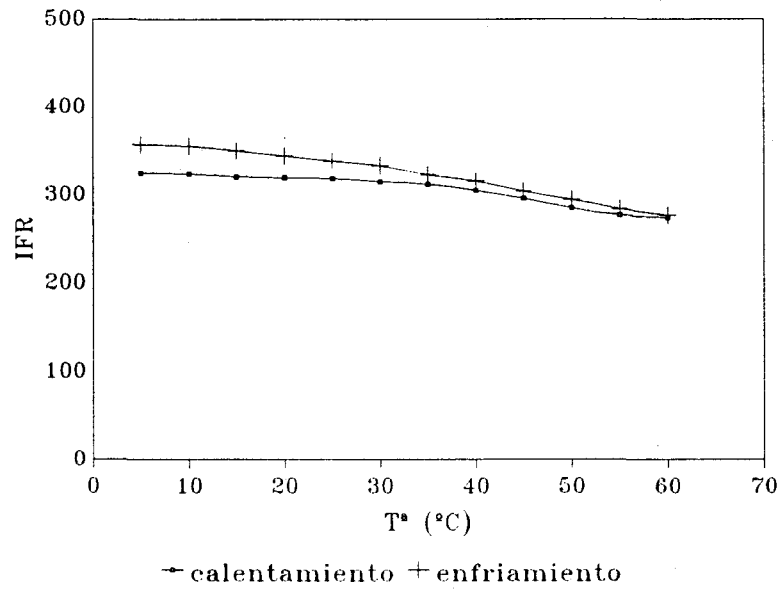


FIGURA II.25.-Influencia de la temperatura sobre AIB.

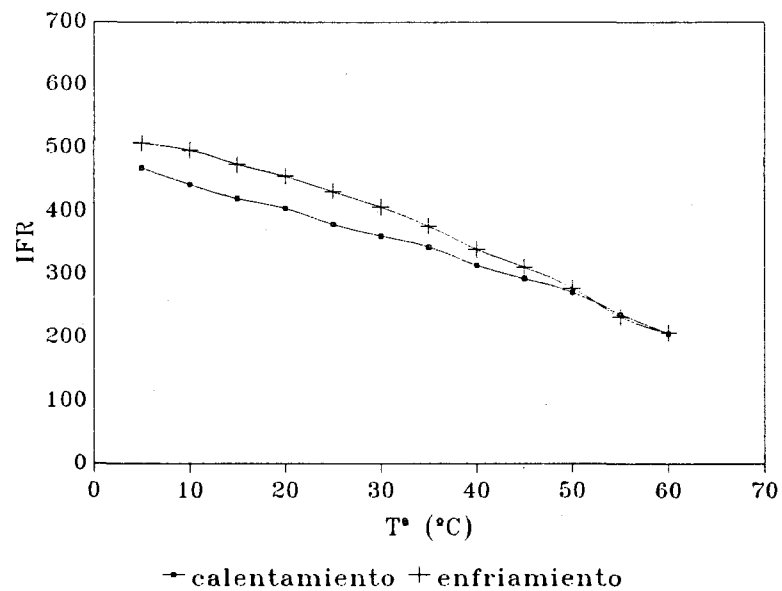


FIGURA II.26.-Influencia de la temperatura sobre AIP.

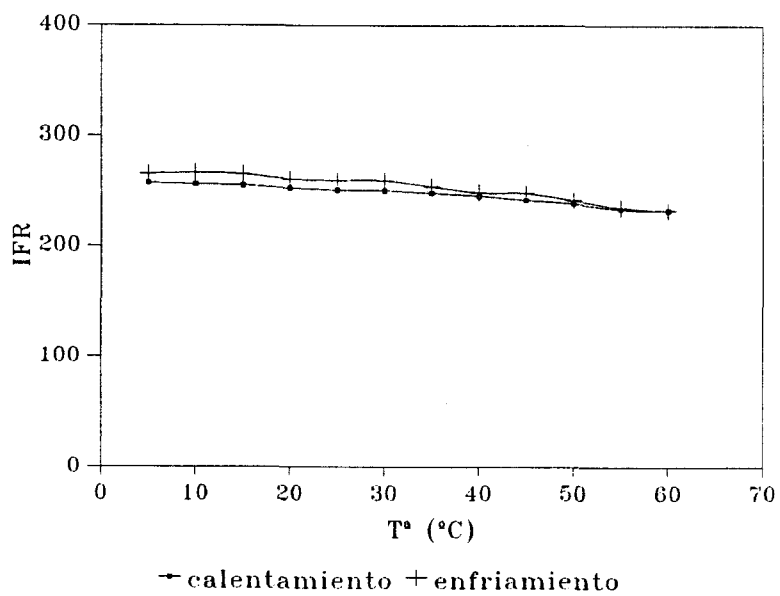


FIGURA II.27.-Influencia de la temperatura sobre AHIA.

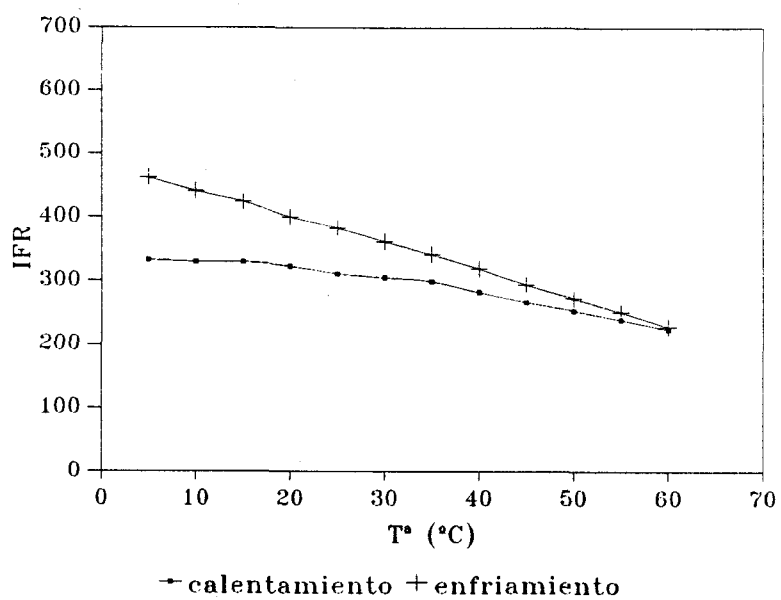


FIGURA II.28.-Influencia de la temperatura sobre ANA.

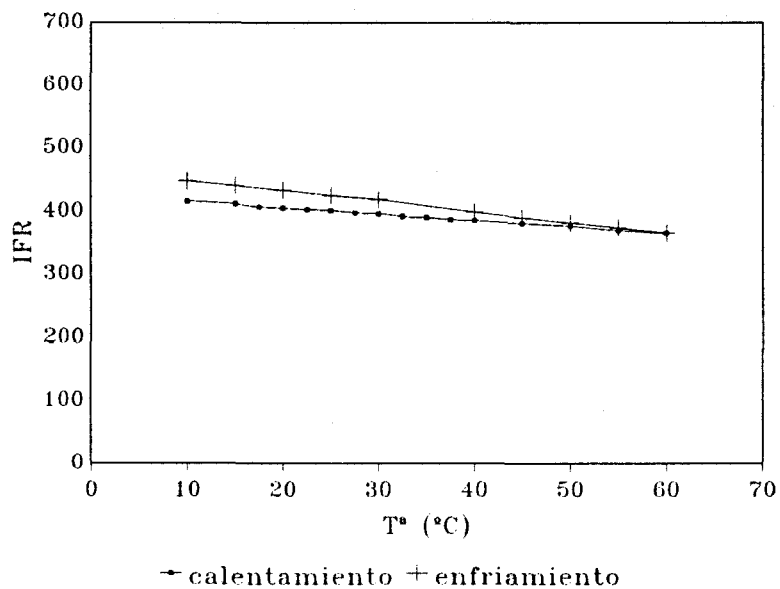
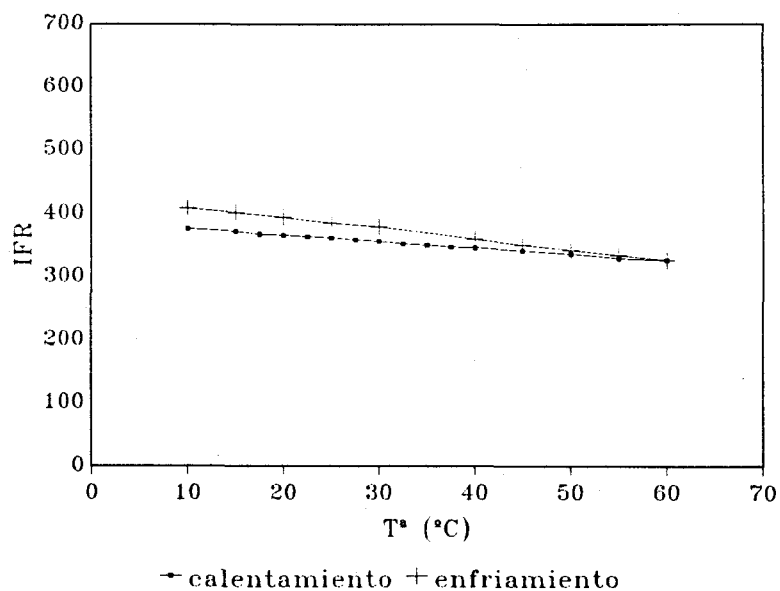


FIGURA II.29.-Influencia de la temperatura sobre ANA-A.



De las figuras II.24-II.29 se deduce que la intensidad relativa de fluorescencia decrece cuando la temperatura incrementa, ya que el aumento de la frecuencia de choques a temperatura elevada aumenta la probabilidad de desactivación por conversión externa. Esto nos obliga a fijar su valor. Se ha elegido como temperatura de trabajo $20.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, próxima a la temperatura ambiente y fácil de conseguir mediante el empleo de un simple termostato.

II.6.-INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE ETANOL.

Teniendo en cuenta que las disoluciones de trabajo de las fitohormonas van a contener un cierto volumen de etanol proveniente de la disolución patrón y que vamos a trabajar con muestras acuosas, tenemos que estudiar la influencia que el porcentaje etanol/agua puede ejercer sobre la intensidad relativa de fluorescencia.

Para ello se prepararon para cada fitohormona disoluciones que contenían $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (excepto para el ANA que contenía $25 \mu\text{g.L}^{-1}$) con diferentes porcentajes de etanol/agua y se registraron los espectros de emisión en las siguientes condiciones operatorias:

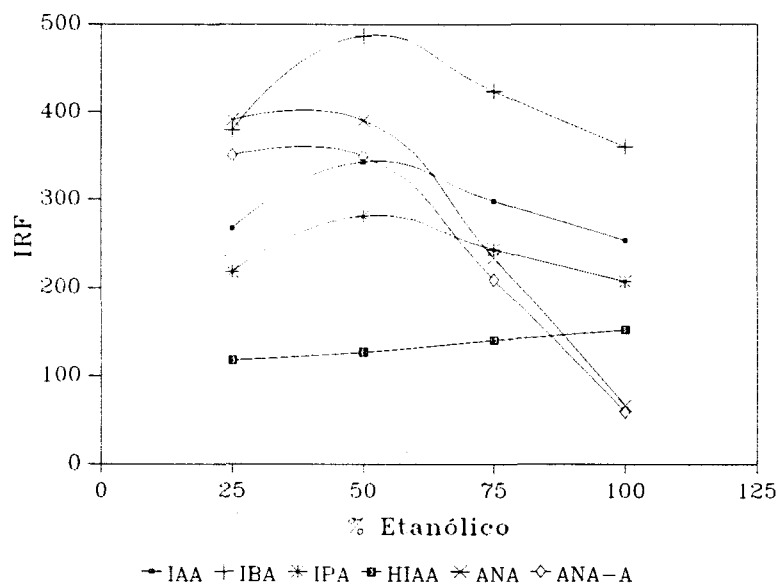
Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
$\lambda_{\text{exc}} \text{nm}$	222	222	222	222	222	222
$\lambda_{\text{em}} \text{nm}$	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En la tabla II.9 se muestra la máxima intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión para cada fitohormona. Se representa gráficamente en la figura II.30.

TABLA II.9.-Influencia del porcentaje etanólico.

% Etanólico	IRF					
	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
25	267.54	379.86	218.30	118.11	391.24	350.54
50	343.25	487.21	281.25	127.10	390.99	349.87
75	298.41	423.69	243.60	140.57	234.14	209.40
100	253.82	360.38	207.20	152.31	66.34	59.33

FIGURA II.30.-Influencia del porcentaje etanólico.



De la tabla anterior tenemos que para el AIA, AIB e AIP la intensidad máxima de fluorescencia se da para el 50% etanol/agua, para el AHIA la intensidad de fluorescencia aumenta al aumentar el porcentaje etanólico y para el ANA y ANA-A la intensidad de fluorescencia es máxima hasta el 50%. Por todo ello elegimos como porcentaje etanólico óptimo de trabajo el 50% etanol/agua.

II.7.-RESUMEN DE LA OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.

En la tabla II.10 se resumen los valores óptimos encontrados en las experiencias anteriores y que a partir de ahora van a ser utilizados en todas y cada una de las determinaciones a realizar.

TABLA II.10.-Resumen de la optimización de variables.

Variable	Valor óptimo
pH	8
Disolución reguladora	$\text{HPO}_4^{-2}/\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0.1 M
Fuerza iónica	No influye
Estabilidad	Hasta 3 horas
Temperatura	$20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$
% etanólico	50%

III.-PARÁMETROS ANALÍTICOS.

Una vez optimizadas todas las variables que pueden afectar a la intensidad de la emisión de fluorescencia de las fitohormonas, indicamos el procedimiento utilizado en las diferentes experiencias dirigidas a establecer el calibrado y los parámetros de calidad de los métodos propuestos.

III.1.-INTERVALO DE APLICACIÓN. RECTAS DE CALIBRADO.

Con el fin de determinar el intervalo en el que la señal de fluorescencia depende linealmente de la concentración de las fitohormonas en estudio, preparamos una experiencia en la que se procedió a medir la fluorescencia de una serie de disoluciones que contenían cantidades crecientes de fitohormonas.

Para ello se preparó una serie de matraces aforados de 10 mL para cada fitohormona, con tres réplicas para cada nivel de concentración. En cada matraz de 10 mL se introdujeron volúmenes

crecientes de disolución de 1 mg.L^{-1} de fitohormona, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{-2} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etano-agua, volumen necesario de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasón con disolución etanol-agua al 50%.

Se registró el espectro de emisión a 20°C en las siguientes condiciones operatorias:

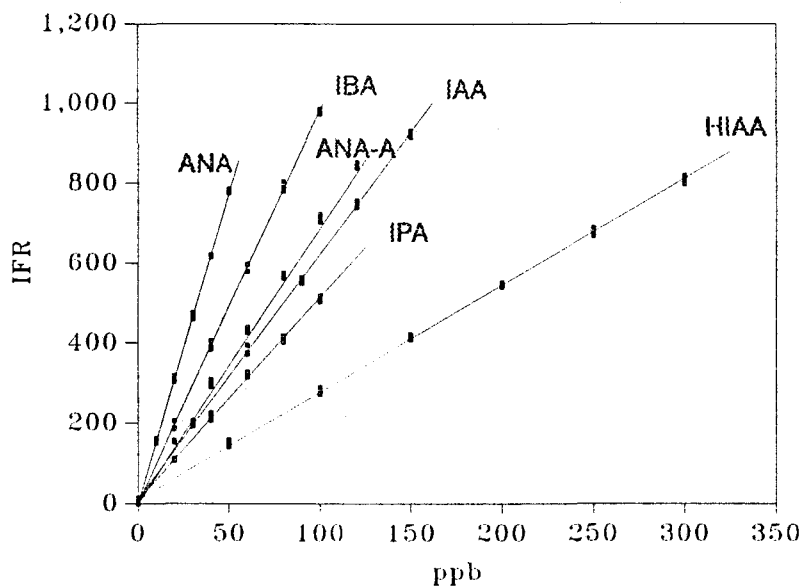
Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
$\lambda_{\text{exc}} \text{ nm}$	222	222	222	222	222	222
$\lambda_{\text{em}} \text{ nm}$	359	359	359	341	337	337
Inter- valo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Los datos obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla II.11 y se representan en la figura II.31.

TABLA II.11.-Influencia de la concentración de las fitohormonas.

Analito	mL	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IFR		
AIA	0.0	0	5.32	-1.74	13.87
	0.3	30	200.81	207.19	191.98
	0.6	60	394.90	372.36	376.81
	0.9	90	550.38	564.08	557.14
	1.2	120	740.56	758.04	750.02
	1.5	150	921.26	915.89	930.65
AIB	0.0	0	-1.84	2.17	3.87
	0.2	20	187.75	186.80	205.74
	0.4	40	384.52	405.24	390.94
	0.6	60	597.55	578.95	595.60
	0.8	80	781.42	790.02	804.54
	1.0	100	973.84	985.24	980.08
AIP	0.0	0	3.50	10.93	-1.16
	0.2	20	111.35	106.70	109.03
	0.4	40	225.41	206.79	217.65
	0.6	60	315.25	328.40	318.53
	0.8	80	415.55	402.39	418.84
	1.0	100	502.69	517.63	510.92
AHIA	0.0	0	5.64	2.61	-1.12
	0.5	50	158.23	147.57	140.31
	1.0	100	275.72	271.64	289.94
	1.5	150	420.60	414.98	409.12
	2.0	200	544.88	539.42	551.88
	2.5	250	675.08	689.12	669.08
	3.0	300	798.25	820.16	809.98
ANA	0.0	0	1.03	-0.89	2.11
	0.1	10	158.12	149.73	161.03
	0.2	20	319.30	310.98	304.84
	0.3	30	464.31	460.72	473.88
	0.4	40	620.76	617.91	615.85
	0.5	50	783.31	775.73	786.20
ANA-A	0.0	0	16.06	-0.34	3.98
	0.2	20	151.87	157.26	156.18
	0.4	40	290.91	298.70	308.38
	0.6	60	438.37	428.87	426.50
	0.8	80	575.58	571.02	562.97
	1.0	100	723.37	703.37	716.24
	1.2	120	848.98	839.07	852.89

FIGURA II.31.-Rectas de calibrado de las fitohormonas.



En la tabla II.12 se muestran las ecuaciones de la recta de calibrado para cada fitohormona deducida de la regresión por mínimos cuadrados y en la tabla II.13 se muestran los principales parámetros estadísticos de estas.

TABLA II.12.-Rectas de calibrado de las fitohormonas.

Fitohormona	Ecuación de la recta
AIA	11.67 + 6.10 [AIA]
AIB	0.06 + 9.83 [AIB]
AIP	9.12 + 5.06 [AIP]
AHIA	9.78 + 2.68 [AHIA]
ANA	0.22 + 15.56 [ANA]
ANA-A	12.96 + 6.98 [ANA-A]

TABLA II.13.-Parámetros estadísticos.

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
n	18	18	18	21	18	21
m	3	3	3	3	3	3
$s_{\text{f.r.c}}$	9.01	8.59	8.04	8.25	5.25	7.80
a	11.67	0.06	9.12	9.78	0.22	12.96
s_a	3.76	3.59	3.36	3.24	2.19	3.07
b	6.10	9.83	5.06	2.68	15.56	6.98
s_b	0.04	0.06	0.06	0.02	0.07	0.04
DSR(b)	0.68%	0.60%	1.10%	0.67%	0.45%	0.57%
lack of fit	28.80%	75.00%	15.60%	48.20%	50.70%	30.20%
R ²	99.93%	99.94%	99.81%	99.91%	99.97%	99.93%

Como podemos observar en la tabla II.13, para cada una de las fitohormonas el test de curvatura es no significativo ya que el valor "p" correspondiente al lack of fit es mayor que el 5% para todas ellas.

III.2.-PARÁMETROS DE CALIDAD.

El rango dinámico lineal viene dado por los límites superior e inferior (ld) del intervalo de concentraciones de aplicación del método analítico.

La linealidad mide el grado de ajuste de los valores de señal medidos sobre la recta de calibrado. Habitualmente la linealidad se suele deducir a través de la desviación estándar de los residuales, $s_{\text{R.c.t}}$, de los coeficientes de correlación, r , y de determinación, r^2 , (expresados en tanto por ciento) y por la diferencia 1-DSR(b) expresada en forma de porcentaje [57], donde DSR(b) es la desviación estándar relativa de la pendiente.

La sensibilidad se puede expresar de tres formas:

-Sensibilidad de calibrado dada por la pendiente de la recta de calibrado (recomendada por la IUPAC) lo cual tiene como inconveniente que las dispersiones originadas en la recta de calibrado influiran notoriamente en la misma.

-Sensibilidad analítica dada por la expresión s_R/b [58] donde s_R indica la desviación estándar de las medidas de la señal analítica a una concentración dada por lo que no es muy adecuado si lo que se pretende es caracterizar un método analítico ya que su valor depende de la concentración de analito.

-Sensibilidad analítica calculada a partir de la regresión de los datos del calibrado que viene dada por $s_{R,c}/b$ [57] que nos indica la máxima diferencia de concentración que es estadísticamente discernible en cualquier punto de la recta de calibrado.

La **precisión** mide el grado de incertidumbre que podemos esperar de los resultados analíticos obtenidos a partir de un calibrado. Viene expresada como desviación estándar relativa ($DSR=s_c/c$) expresada en tanto por ciento y se puede calcular a partir de las medidas realizadas para establecer la recta de calibrado [57], calculando la desviación estándar de los valores de concentración ensayados utilizando el análisis de la regresión. El modelo nos permite representar los datos obtenidos para cada valor de concentración y, por interpolación, estimar la precisión para cualquier valor de concentración del intervalo lineal. Como primer punto de la gráfica podemos añadir el valor de la desviación estándar relativa del límite de cuantificación que por definición le corresponde un 10%.

El **límite de detección** y el **límite de cuantificación** se han calculado según la recomendación de la IUPAC [59], para ello se mide la señal de fluorescencia de diez blancos a los cuales se les aplicó el procedimiento operatorio y se realizó un estudio estadístico. Para calcular dichos parámetros la desviación estándar de las señales de fluorescencia medidas se multiplica por 3, si se trata del límite de detección, o por 10, si se trata del límite de cuantificación, y se divide entre la pendiente de la recta de calibrado.

En la tabla II.14 se muestran las medidas de las señales de fluorescencia de los blancos y la desviación estándar para las distintas fitohormonas en estudio.

TABLA II.14.-Repetitividad de la señal de fluorescencia del blanco.

Muestra	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
1	14.89	12.51	20.13	19.54	33.88	37.97
2	15.52	13.27	19.18	19.54	29.32	31.64
3	15.20	13.65	20.13	20.64	37.21	28.48
4	14.57	12.89	19.69	20.61	39.15	28.48
5	14.89	12.89	19.69	19.32	34.27	28.48
6	14.89	12.51	20.62	19.54	30.71	33.32
7	15.84	12.51	19.23	20.61	38.10	31.64
8	15.52	12.51	19.76	20.61	32.25	37.97
9	15.52	13.27	19.69	20.58	36.05	31.64
10	15.20	12.89	20.09	20.61	34.77	36.96
IFR _{media}	15.20	12.89	19.82	20.16	34.57	32.66
σ_{n-1}	0.39	0.40	0.44	0.58	3.18	3.81

En la tabla II.15 se resumen los parámetros analíticos calculados para las distintas fitohormonas.

TABLA II.15.- Parámetros analíticos.

Param.	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
RDL ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.64-150	0.41-100	0.87-100	2.17-300	2.04-50	5.46-120
LIN(%) ^a	99.32	99.40	98.90	99.33	99.55	99.39
S _{anal} ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^b	1.48	0.87	1.59	3.08	0.34	1.12
DSR(%) ^c	1.04	0.91	1.62	1.26	0.85	1.15
LD ^d ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.19	0.12	0.26	0.65	0.61	1.64
LC ^e ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.64	0.41	0.87	2.17	2.04	5.46

^a Linealidad calculada por la expresión $\{1-\text{DSR}(b)\}$

^b Sensibilidad analítica calculada por la expresión $s_{r,c}/b$

^c Precisión calculada por la expresión $\text{DSR}=s/c$ en el punto central de la recta de calibrado.

- ° Límite de detección.
- ° Límite de cuantificación.

De la observación de la tabla II.15 se deduce lo siguiente:

-El AHIA posee el mayor rango dinámico lineal ($0.65-300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y el ANA el menor ($0.61-50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

-El ANA es la fitohormona con mayor sensibilidad ($0.34 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y el AHIA con menor ($3.08 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

-El AIB posee el menor límite de detección ($0.12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y ANA-A el mayor ($1.64 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

IV.-PROCEDIMIENTO OPERATORIO.

Una vez optimizadas las variables experimentales y establecidos los parámetros de calidad de los métodos analíticos propuestos para la determinación de las fitohormonas en estudio, indicamos el procedimiento operatorio recomendado para realizar análisis de dichas fitohormonas en muestras reales.

Procedimiento: En un matraz de 10 mL se introdujo el volumen de disolución de muestra necesario como para que el contenido en fitohormona en dicha muestra esté comprendido dentro del rango dinámico lineal de dicha fitohormona, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, el volumen necesario de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se preparó un blanco en las mismas condiciones.

Se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia, según de que fitohormona se trate, a 20°C con las siguientes condiciones operatorias:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

V.-INTERFERENCIAS.

Se denominan interferencias a las perturbaciones químicas que pueden alterar la detección cualitativa y/o determinación cuantitativa de analitos en una muestra. El interferente es el agente químico que origina la interferencia, produciendo un error sistemático en el resultado del análisis del analito en la muestra dentro del rango de aplicación del método.

El parámetro de calidad de un método analítico que nos informa de dichas interferencias es la **selectividad** que en la práctica analítica se representa a través de la cuantificación de la interferencia producida por una especie química concreta en la determinación de un analito en un procedimiento dado, de modo que puede establecerse un nivel máximo de interferente que no produce interferencia.

La estrategia a seguir para decidir si una sustancia produce o no interferencia en la determinación de un analito determinado será el medir la señal analítica correspondiente a la concentración de analito en presencia de una concentración concreta del posible interferente. Si el valor obtenido de señal no está incluida en el intervalo de confianza deducido a partir del calibrado, se produce un error sistemático superior al error experimental del método analítico y por tanto concluimos que es interferente y dicha interferencia puede ser positiva, si la señal es superior o negativa si la señal es inferior. En cambio, si la señal pertenece al intervalo de confianza calculado, concluimos que no hay interferencia. Por lo tanto el primer paso es calcular

el intervalo de confianza sobre la señal esperada para cada concentración de fitohormona ensayada en el calibrado. El segundo paso es estimar el nivel de tolerancia de interferentes para lo cual se establece una experiencia en la que se mide la señal instrumental, para una determinada disolución patrón de analito con diferentes concentraciones decrecientes de interferente, hasta lograr que al menos dos medidas consecutivas estén incluidas en el intervalo de confianza de la señal.

Con los datos obtenidos se puede llegar al valor de la concentración de tolerancia graficamente, se representa el error cometido sobre la señal predicha correspondiente frente al logaritmo de la concentración de interferente entre la concentración de analito. El resultado puede ser una línea recta o una curva que se extrapola para hallar el punto de corte con la línea horizontal, superior o inferior, que indica la banda del error experimental del método. Dicho punto de corte nos dá el nivel de tolerancia del interferente expresado en concentración.

Para abordar dicho estudio hemos de tener en cuenta el medio en el que se va a aplicar nuestro método, la naturaleza y concentración aproximadas de las especies existentes en el mismo. Por ello vamos a estudiar como interferentes las siguientes sustancias:

- Los iones presentes en el agua.
- Las fitohormonas que pueden presentarse junto con las fitohormonas estudiadas en las formulaciones comerciales.
- Pesticidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos.

De un estudio anterior [60] obetenemos que pesticidas fluorescentes tales como el o-fenilfenol, carbaril, morestan, benomilo, 1-naftol y carbendazima no interfieren por mostrar fluorescencia a distintas longitudes de onda y a distinto pH. Lo mismo ocurre con los HAP como naftaleno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno,

benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno y benzo[e]pireno [61].

ESTUDIO DE LAS INTERFERENCIAS.

En primer lugar, como hemos indicado anteriormente, se calcula los intervalos de confianza sobre la señal esperada para cada concentración de fitohormona ensayada. En la tabla II.16 se indican los intervalos calculados con una confianza del 95% a partir de los datos del calibrado.

TABLA II.16.-Intervalos de confianza sobre la señal.

Fitohormona	[] $\mu\text{g.L}^{-1}$	R ^a	s _R ^b	$\pm\Delta R^c$	$\pm ICR^d$
AIA	30	194.77	9.44	16.49	8.47
	60	377.87	9.23	16.20	4.29
	90	560.97	9.23	16.20	2.89
	120	744.06	9.44	16.49	2.22
	150	927.16	9.76	17.05	1.84
AIB	20	196.76	9.00	15.72	7.99
	40	393.46	8.85	15.45	3.93
	60	590.16	8.85	15.45	2.61
	80	786.85	9.00	15.72	2.00
	100	983.55	9.31	16.26	1.65
AIP	20	110.37	8.42	14.71	13.32
	40	211.62	8.28	14.45	6.83
	60	312.88	8.28	14.45	4.62
	80	414.13	8.42	14.71	3.55
	100	515.38	8.71	15.21	2.95
AHIA	50	143.55	8.63	14.92	10.39
	100	277.33	8.49	14.68	5.29
	150	411.10	8.44	14.60	3.55
	200	544.87	8.49	14.68	2.69
	250	678.65	8.63	14.92	2.20
	300	812.42	8.86	15.32	1.89
ANA	10	155.80	5.51	9.62	6.17
	20	311.37	5.41	9.44	3.03
	30	466.95	5.41	9.44	2.02
	40	622.53	5.51	9.62	1.54
	50	778.11	5.69	9.93	1.28
ANA-A	20	152.61	8.17	14.13	9.26
	40	292.77	8.03	13.88	4.74
	60	431.92	7.99	13.81	3.20
	80	571.57	8.03	13.88	2.43
	100	711.22	8.17	14.13	1.99
	120	850.87	8.38	14.49	1.70

^a Señal predicha.

^b Desviación estándar de la señal.

^c $s_R \cdot t(\alpha=0.05, n-2 \text{ gl}, 1 \text{ cola})$.

^d Intervalo de confianza de la señal en tanto por ciento ($\Delta R/R * 100$).

A continuación vamos a estimar el nivel de tolerancia de las especies e iones que aparecen mas abundantemente en muestras naturales.

Para ello se preparó una serie para cada interferente y para cada fitohormona como sigue: en matraces de 10 mL se introdujo

un volúmen de disolución patrón tal que el contenido de fitohormona fuese el punto medio de la recta de calibrado de dicha fitohormona, concentraciones decrecientes de interferente, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, el volumen necesario de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución etanol-agua al 50%.

Se preparó un blanco en las mismas condiciones.

Se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia, según de que fitohormona se trate, con las siguientes condiciones operatorias a 20°C:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

Se calculó el tanto por ciento de error cometido para cada concentración de interferente y en la tabla II.17 se indica la concentración de tolerancia para cada interferente calculada graficamente como hemos indicado anteriormente.

TABLA II.17.-Tolerancia para las especies interferentes ensayadas.

Interf.	Nivel de tolerancia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)					
	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
AIA(+) ¹	----	<1	<1	<1	<1	<1
AIB(+)	<1	----	<1	<1	<1	<1
AIP(+)	<1	<1	----	<1	<1	<1
AHIA(+)	<1	<1	<1	-----	<1	<1
ANA(-) ²	10.7	11.3	12	5.3	----	<1
ANA-A(-)	<1	<1	<1	<1	<1	---
GA(-)	715	755	845	475	750	750
Cloro(-)	<100	<100	<100	222	<100	<100
Silice(+)*	>50000	>50000	>50000	23775	>50000	>50000
Na ⁺ (+)	179575	169105	300000	>200000	180000	180000
K ⁺ (-)	6370	6730	11970	21190	7230	7250
NO ₃ ⁻¹ (-)	<500	<500	500	<500	<500	<500
Ca ⁺² (+)*	40200	37860	47660	<5000	40000	40000
Mg ⁺² (-)	100000	100000	100000	25000	100000	100000
SO ₄ ⁻² (+)	75000	75000	75000	>500000	75000	75000
Fe ⁺³ (-)	2260	2130	3010	1000	2000	2000
Al ⁺³ (-)	1425	1200	1175	1000	1500	1500

TABLA II.17.-Continuación.

Interf.	Nivel de tolerancia (mg·L ⁻¹)
o-fenilfenol	> 700.00
Carbaril	> 120.00
Morestan	> 0.26
Benomilo	> 4.00
Carbendazima	> 8.00
Naftaleno	> 30.00
Acenaftileno	> 3.90
Fluoreno	> 1.98
Fenantreno	> 1.00
Fluoranteno	> 0.20
Pireno	> 0.13
Criseno	> 0.002
Benzo[a] antraceno	> 0.006
Benzo[k] fluoranteno	> 0.001
Benzo[a] pireno	> 0.003
Dibenzo[a,h] antraceno	> 0.0005
Benzo[e] pireno	> 0.006

¹ Interferencia positiva.

² Interferencia negativa.

* Interferencia negativa para el AHIA.

De la observación de la tabla II.17 obtenemos las siguientes conclusiones:

-Las fitohormonas derivadas del indol y del naftaleno van a interferirse mutuamente.

-Las especies iónicas van a interferir dependiendo de la naturaleza de la muestra analizar.

-Los pesticidas y los hidrocarburos policíclicos aromáticos estudiados tienen un comportamiento parecido para cada uno de los analitos, su nivel de tolerancia es mayor que su solubilidad en todos los casos.

VI.-APLICACIONES ANALÍTICAS: DETERMINACIÓN DE FITOHORMONAS EN MUESTRAS DE AGUA. VALIDACIÓN DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO.

Para comprobar la aplicabilidad de los métodos analíticos anteriormente propuestos, aplicamos y validamos la determinación de fitohormonas en una serie de muestras de agua de diversas procedencia como son:

- Agua de Sierra Nevada (Lanjarón).
- Agua potable de Granada.
- Agua de pozo de la Huerta de Santa Maria (Vega de Granada).

VI.1.-DETERMINACIÓN DE FITOHORMONAS EN AGUA DE SIERRA NEVADA (LANJARÓN).

Con objeto de estudiar las posibles interferencias previamente determinamos el contenido iónico de esta agua en mg.L⁻¹ que se muestra en la tabla II.18.

TABLA II.18.-Contenido iónico del agua de Sierra Nevada (Lanjarón).

Ión	mg.L ⁻¹	Técnica aplicada	Referencia
Ca ⁺²	32.0	A.A	62
Mg ⁺²	12.0	A.A	62
Al ⁺³	0.005	A.A	62
Fe ⁺³	0.020	A.A	62
Na ⁺	6.0	Espect. Emisión	63
K ⁺	1.0	Espect. Emisión	63
HCO ₃ ⁻¹	130.0	Valoración	63
SO ₄ ⁻²	20.0	Turbidimetría	63

De acuerdo con los valores de tolerancia de la tabla II.17, en la muestra objeto de análisis, el Ca⁺² interfiere en la deter-

minación de AHIA ya que se encuentra en una concentración que está por encima del límite de tolerancia establecido para este catión, por lo que es necesario eliminar la posible interferencia antes de proceder a la determinación. Diferentes experiencias orientativas nos han permitido seleccionar AEDT como enmascarante de dicho interferente, para lo cual se opera como se indica a continuación: en matraces de 10 mL se introdujo un volumen de disolución patrón tal que el contenido de AHIA sea el punto medio de la recta de calibrado de dicho derivado indólico, 30 mg.L⁻¹ de Ca⁺², concentraciones crecientes de AEDT, 2 mL de disolución reguladora HPO₄⁻² 0,1 M/H₂PO₄⁻¹ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, el volumen necesario de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución etanol-agua al 50%.

Se preparó un blanco en las mismas condiciones operatorias.

Se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión con las condiciones operatorias del AHIA.

En la tabla II.19 se resumen los resultados obtenidos.

TABLA II.19.

AHIA μg.L ⁻¹	Ca ⁺² mg.L ⁻¹	AEDT mg.L ⁻¹	Error (%)
150	30	0	-22.62
150	30	80	-11.51
150	30	100	-6.80
150	30	150	-3.27
150	30	200	-5.30
150	30	300	-13.52

De la tabla II.19 puede deducirse que para eliminar la interferencia debida a la presencia de Ca⁺² es necesario añadir una concentración de 150 mg.L⁻¹ de AEDT (relación molar AEDT:Ca⁺² = 1:1.86) a nuestra muestra problema.

Con objeto de comprobar el efecto que puede ejercer la matriz sobre la señal de fluorescencia, realizamos una experiencia en la que se midió la señal de fluorescencia correspondiente a una determinada concentración de cada fitohormona en presencia de una concentración de matriz del 50%.

Procedimiento

En matraces de 10 mL se introdujeron volúmenes de disolución de fitohormona tal que la concentración resultante estuviera comprendido en el rango dinámico lineal de dicha fitohormona, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, 4 mL de muestra tratada con AEDT, etanol absoluto para obtener una concentración al 50% y se enrasó con disolución etanol-agua al 50%.

Se preparó un blanco en las mismas condiciones.

Se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión según de que fitohormona se tratase, con las siguientes condiciones operatorias a 20°C:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En la tabla II.20 se recogen las intensidades relativas de fluorescencia registradas, 3 réplicas para cada fitohormona, comparándolas con la señal que se obtiene cuando la matriz es agua bidestilada.

TABLA II.20.

Fitohormona	Matriz					
	Agua de Lanjarón			Agua bidestilada		
AIA (90 ppb)	631.83	627.86	624.10	550.38	564.08	557.14
AIB (50 ppb)	360.95	363.01	357.46	609.25	613.67	606.12
AIP (60 ppb)	160.98	164.12	157.28	315.25	328.40	318.53
AHIA (150 ppb)	480.14	485.72	489.15	420.60	414.98	409.12
ANA (25 ppb)	172.65	168.75	177.91	388.45	385.04	391.57
ANA-A (60 ppb)	235.04	237.88	230.55	429.31	426.54	436.99

Podemos observar que la matriz provoca una disminución o un aumento de la señal de fluorescencia de las fitohormonas con respecto a la señal registrada cuando se utiliza agua bidestilada. Para discernir si ese aumento o disminución es debido a un efecto matriz (producido por un error proporcional), a un efecto interferente (producido por un error constante) o a ambos, establecemos nuevos calibrados en presencia de una cantidad constante de matriz (50%). Para dicho calibrado se realiza el procedimiento indicado anteriormente.

En la tabla II.21 se indican las intensidades relativas de fluorescencia medidas cuando se varía la concentración de las fitohormonas en estudio en una concentración de agua de Lanjarón del 50%.

TABLA II.21.

Fitohormona	Concentración $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR		
AIA	0	21.89	25.12	16.11
	45	321.58	326.25	333.49
	90	631.83	627.86	624.10
	135	934.62	926.47	927.00
AIB	0	-0.13	-1.77	4.21
	25	179.09	184.11	173.33
	50	360.95	363.01	357.46
	75	541.34	546.05	537.35
	100	720.98	723.68	715.93
AIP	0	9.12	5.36	15.87
	25	72.15	76.84	67.54
	50	135.21	140.87	132.06
	75	196.23	202.69	192.11
	100	260.25	264.95	257.91
AHIA	0	9.59	12.50	5.27
	75	251.16	247.65	244.21
	150	480.14	485.72	489.15
	225	729.84	725.11	722.98
	300	958.96	962.35	965.41
ANA	0	-1.79	2.05	-3.24
	10	68.15	65.10	72.98
	20	136.54	132.04	141.23
	30	204.99	207.64	200.45
	40	277.84	281.24	273.41
	50	345.02	340.58	348.57
ANA-A	0	-1.17	3.87	9.45
	20	81.25	82.54	76.79
	40	155.24	158.85	153.24
	60	234.16	237.08	231.85
	80	310.28	313.95	307.58
	100	385.26	389.11	383.51
	120	461.25	464.84	460.35

Todos los calibrados presentan un test de curvatura no significativo, con unos valores de P superiores al 5%: 64.77% (AIA), 87.26% (AIB), 96.73% (AIP), 84.24% (AHIA), 77.75% (ANA) y 96.33% (ANA-A).

En la tabla II.22 se muestran los parámetros estadísticos y de calidad más representativos junto con los obtenidos para la recta de calibrado encontrada en agua bidestilada.

TABLA II.22.-Comparación de los parámetros estadísticos y de calidad.

Anal.	Parámetro	Matriz	
		Agua bidestilada	Agua de Lanjarón
AIA	Estadístico		
	n	18	12
	$S_{R,c}$	9.009	4.543
	a	11.67	11.49
	s_a	3.76	2.19
	b	6.10	6.72
	s_b	0.04	0.03
	R^2	99.93	99.98
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.32	99.61
	Sens. (ppb)	1.47	0.68
	LD (ppb)	0.19	1.53
DSR (90ppb)%	1.04	0.49	
AIB	Estadístico		
	n	18	15
	$S_{R,c}$	8.592	3.649
	a	0.06	0.055
	s_a	3.59	1.63
	b	9.83	7.21
	s_b	0.06	0.03
	R^2	99.94	99.98
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.40	99.37
	Sens. (ppb)	0.87	0.86
	LD (ppb)	0.12	1.88
DSR (50ppb)%	0.91	1.09	
AIP	Estadístico		
	n	18	15
	$S_{R,c}$	8.035	4.188
	a	9.12	9.94
	s_a	3.36	1.87
	b	5.06	2.51
	s_b	0.06	0.03
	R^2	99.81	99.81
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	98.91	98.78
	Sens. (ppb)	1.59	1.67
	LD (ppb)	0.26	3.66
DSR (50ppb)%	1.62	2.10	

TABLA II.22.-Continuación.

Anal.	Parámetro	Matriz	
		Agua bidestilada	Agua de Lanjarón
AHIA	Estadístico		
	n	21	15
	$s_{R,c}$	8.246	3.383
	a	9.77	9.09
	s_a	3.24	1.51
	b	2.67	3.18
	s_b	0.02	0.01
	R^2	99.91	99.99
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.093	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.33	99.74
	Sens. (ppb)	3.08	1.06
LD (ppb)	0.65	2.33	
DSR(150ppb)%	1.26	0.45	
ANA	Estadístico		
	n	18	18
	$s_{R,c}$	5.255	3.572
	a	0.22	-1.22
	s_a	2.20	1.49
	b	15.56	6.92
	s_b	0.07	0.05
	R^2	99.97	99.92
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.55	99.29
	Sens. (ppb)	0.34	0.52
LD (ppb)	0.61	1.10	
DSR (30ppb)%	0.85	1.09	
ANA-A	Estadístico		
	n	21	21
	$s_{R,c}$	7.803	2.927
	a	12.96	3.94
	s_a	3.07	1.15
	b	6.98	3.82
	s_b	0.04	0.02
	R^2	99.93	99.97
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.093	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.39	99.58
	Sens. (ppb)	1.12	0.77
LD (ppb)	1.64	1.60	
DSR (60ppb)%	1.15	0.78	

De la tabla II.22 se puede deducir que la linealidad es prácticamente igual para todas las fitohormonas en estudio para el agua de Lanjarón y agua bidestilada. La sensibilidad analítica y la desviación estándar relativa de la concentración indistintamente aumenta, disminuye o permanece prácticamente igual y el límite de detección aumenta para el agua de Lanjarón.

Para cada una de las fitohormonas comprobamos que la ordenada en el origen del calibrado con la muestra agua de Lanjarón pertenece al intervalo de confianza para la ordenada en el origen del calibrado con patrones ($a \pm t_{\alpha, n-2, bil} \cdot s_a$). En cambio para la pendiente ocurre todo lo contrario, es decir, para cada una de las fitohormonas la pendiente del calibrado con la muestra de agua de Lanjarón no pertenece al intervalo de confianza de la pendiente del calibrado con patrones ($b \pm t_{\alpha, n-2, bil} \cdot s_b$), para AIA y AHIA aumenta y para AIB, AIP, ANA y ANA-A disminuye.

De estos datos se deduce la presencia de un efecto matriz, ya que las ordenadas en el origen son iguales y las pendientes son distintas por lo que tenemos un error proporcional por acción de los componentes del agua de Lanjarón [64]. Por ello para realizar un análisis de fitohormonas en dicha agua, es necesario aplicar el calibrado correspondiente con adición de patrón.

ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto, realizamos análisis sobre tres muestras distintas de agua de Lanjarón dopadas con una concentración conocida de fitohormona.

Procedimiento: En un matraz de 10 mL se introdujo un volumen de disolución de muestra tratada con AEDT tal que el contenido de dicha muestra fuese del 50% y el contenido de fitohormona estuviese comprendido en el rango dinámico lineal de dicha fitohormona en la muestra, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, el volumen necesario de

etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con una disolución al 50% etanol-agua.

Se preparó así mismo un blanco.

Se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión según de que fitohormona se tratase, con las siguientes condiciones operatorias a 20°C:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} .nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} .nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En la tabla II.23 se muestran los valores de intensidad relativa de fluorescencia obtenidos, la cantidad de fitohormona añadida y encontrada, así como el tanto por ciento de recuperación para cada una de las tres réplicas de cada análisis.

TABLA II.23.-Estudio de recuperación.

Muestra	AIA añad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	AIA encon. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	25	181.23	25.24	100.96
		178.15	24.79	99.16
		182.04	25.36	101.44
2	75	512.79	74.55	99.40
		509.12	74.01	98.68
		518.25	75.37	100.49
3	125	857.54	125.83	100.66
		845.64	124.05	99.24
		842.15	123.54	98.83

Muestra	AIB añad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	AIB encon. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	20	148.65	20.62	103.10
		141.57	19.64	98.20
		140.88	19.54	97.70
2	50	365.42	50.70	101.40
		358.84	49.79	99.58
		356.05	49.40	98.80
3	80	579.61	80.42	100.53
		573.91	79.63	99.54
		570.76	79.19	98.99

Muestra	AIP añad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	AIP encon. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	20	61.25	20.47	102.35
		60.98	20.36	101.80
		59.64	19.83	99.15
2	50	138.52	51.29	102.58
		134.84	49.82	99.64
		132.75	48.99	97.98
3	80	212.38	80.76	100.95
		208.06	79.03	98.79
		209.47	79.60	99.50

Muestra	AHIA añad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	AHIA enc. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	50	165.82	49.29	98.58
		170.29	50.70	101.40
		172.52	51.40	102.80
2	150	490.15	151.30	100.87
		492.15	151.95	101.30
		483.51	149.22	99.48
3	250	800.86	249.03	99.61
		795.51	247.35	98.94
		805.34	250.44	100.18

TABLA II.23.-Continuación.

Muestra	ANA añad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	ANA encon. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	15	104.15	15.23	101.53
		99.56	14.56	97.09
		101.40	14.83	98.86
2	30	205.52	29.87	99.57
		201.64	29.31	97.70
		207.75	30.20	100.67
3	45	311.38	45.17	100.38
		308.06	44.69	99.31
		314.47	45.62	101.38

Muestra	ANA-Aañad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	ANA-Aenc. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	20	77.82	19.34	96.70
		80.29	19.99	99.95
		82.52	20.57	102.85
2	60	235.15	60.53	100.88
		233.15	60.00	100.00
		237.51	61.14	101.90
3	100	384.86	99.72	99.72
		389.51	100.93	100.93
		385.34	99.84	99.84

El valor medio de todos los porcentajes de recuperación para el AIA, AIB, AIP, AHIA, ANA y ANA-A son respectivamente: 99.87%, 99.76%, 100.30%, 100.35%, 99.61% y 100.31%.

Para comprobar si este valor difiere significativamente del 100%, realizamos un test de comparación de una media frente a un valor de referencia [65]. Los valores de la recuperación media, la desviación estándar y el estadístico se muestran en la tabla II.24.

TABLA II.24.

	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
R_{media}	99.87	99.76	100.30	100.35	99.61	100.31
s_R	1.017	1.685	1.663	1.357	1.549	1.714
t_{exp}^a	0.383	0.427	0.541	0.774	0.755	0.542
P %	71.14	68.04	60.32	46.12	47.18	60.26

$$^a t_{exp} = (R - R_m) \cdot n^{1/2} / s_R$$

Se concluye que la recuperación media no difiere significativamente de 100% con un $P > 20\%$ en todos los casos, por tanto el método es aplicable a la determinación de fitohormonas en Agua de Lanjarón.

VI.2.-DETERMINACIÓN DE FITOHORMONAS EN AGUA POTABLE DE GRANADA.

Con objeto de estudiar las posibles interferencias previamente determinamos el contenido iónico de esta agua en mg.L⁻¹ que se muestra en la tabla II.25.

TABLA II.25.-Contenido iónico del agua potable de Granada.

Ión	mg.L ⁻¹	Técnica aplicada	Referencia
Ca ⁺²	25.60	A.A	62
Mg ⁺²	6.00	A.A	62
Al ⁺³	0.56	A.A	62
Fe ⁺³	0.02	A.A	62
Na ⁺	2.6	Espect. Emisión	63
K ⁺	1.7	Espect. Emisión	63
NO ₃	2.4	Polarografía	66
SO ₄ ⁻²	29.70	Turbidimetría	63
Cl ₂	0.60	Valoración	63
Silice	4.60	Espectrofotomet.	63

De acuerdo con los valores de tolerancia de la tabla II.17, en la muestra objeto de análisis, el Ca⁺² interfiere en la determinación de AHIA y el Cl₂ interfiere en la determinación de todas las fitohormonas en estudio, ya que se encuentran en una concentración que está por encima del límite de tolerancia establecido para estos iones, por lo que es necesario eliminar las posibles interferencias antes de proceder a la determinación. Para ello el Ca⁺² se elimina como indicamos en la pág 49, y para eliminar el Cl₂ se emplea su reacción con SO₃⁻², previamente hemos de estudiar si a su vez el SO₃⁻² interfiere, para lo cual operamos como sigue: en matraces de 10 mL se introdujo un volumen de disolución patrón tal que el contenido de fitohormona fuese el punto medio del rango dinámico lineal de dicha fitohormona, concentraciones crecientes de SO₃⁻², 2 mL de disolución reguladora HPO₄⁻² 0,1 M/H₂PO₄⁻¹

0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución etanol-agua al 50%.

Se preparó un blanco en las mismas condiciones.

Se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión, según de que fitohormona se trate, con las siguientes condiciones operatorias a 20°C:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} .nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} .nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En la tabla II.26 se resumen los resultados obtenidos.

TABLA II.26.

SO ₃ ²⁻ mg.L ⁻¹	Error %					
	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
1	-1.23	-1.65	-1.12	-0.87	1.25	0.98
2	-2.65	-2.15	-1.98	-1.24	0.51	-1.12
4	-3.24	-2.98	-3.05	-2.13	-0.84	-2.07
8	-4.96	-4.21	-4.54	-2.58	-1.98	-2.75

De la tabla II.26 deducimos que el SO₃²⁻ no interfiere en la determinación de las fitohoronas en estudio. Para eliminar el Cl₂ con SO₃²⁻ operamos como sigue: en matraces de 10 mL se introdujo un volumen de disolución patrón tal que el contenido de fitohormona fuese el punto medio del rango dinámico lineal de dicha fitohormona, 0.6 mg.L⁻¹ de Cl₂, concentraciones crecientes de SO₃²⁻, 2 mL de disolución reguladora HPO₄²⁻ 0,1 M/H₂PO₄⁻¹ 0,1 M a pH 8 al

50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se preparó un blanco en las mismas condiciones.

Se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión, según de que fitohormona se trate, con las siguientes condiciones operatorias a 20°C:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En la tabla II.27 se resumen los resultados obtenidos.

TABLA II.27.

Cl ₂ mg.L ⁻¹	SO ₃ ²⁻ mg.L ⁻¹	Error %					
		AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
0.60	0	-55.84	-51.62	-56.37	-59.44	-60.54	-59.87
0.60	1	-1.57	-1.84	-1.25	-1.03	-1.54	-1.67
0.60	2	-2.28	-2.61	-2.06	-1.43	-1.88	-2.15
0.60	4	-2.94	-2.76	-3.21	-2.81	-2.68	-3.58

De la tabla II.27 deducimos que para eliminar el efecto interferente del Cl₂ basta con añadir 1 mg.L⁻¹ de SO₃²⁻ a la muestra problema.

Una vez eliminadas las interferencias con objeto de comprobar el efecto que puede ejercer la matriz sobre la señal de fluorescencia, realizamos una experiencia en la que se midió la señal

de fluorescencia correspondiente a una determinada concentración de cada fitohormona en presencia de una concentración de matriz del 50%.

Procedimiento

En un matraz de 10 mL se introdujo un volúmen de disolución de fitohormona tal que la concentración resultante esté comprendido en el rango dinámico lineal de dicha fitohormona, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, 4 mL de muestra tratada con AEDT y SO_3^{2-} , etanol absoluto para obtener una concentración del 50% y se enrasó con disolución al 50% etanol/agua.

Se preparó un blanco en las mismas condiciones.

Se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión según de que fitohormona se tratase, con las siguientes condiciones operatorias a 20°C:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En la tabla II.28 se recogen las intensidades relativas de fluorescencia registradas, 3 réplicas para cada fitohormona, comparándolas con la señal que se obtiene cuando la matriz es agua bidestilada.

TABLA II.28.

Analito	Matriz					
	Agua potable			Agua bidestilada		
AIA (90 ppb)	646.17	642.02	639.27	550.38	564.08	557.14
AIB (50 ppb)	237.14	239.58	243.70	609.25	613.67	606.12
AIP (60 ppb)	202.65	198.64	205.87	315.25	328.40	318.53
AHIA (150 ppb)	255.19	258.75	251.69	420.60	414.98	409.12
ANA (25 ppb)	185.24	180.54	176.77	388.45	385.04	391.57
ANA-A (60 ppb)	262.64	269.74	265.42	429.31	426.54	436.99

Podemos observar que la matriz provoca una disminución o un aumento de la intensidad relativa de fluorescencia de las fitohormonas con respecto a la intensidad registrada cuando se utiliza agua bidestilada. Para discernir si ese aumento o disminución es debido a un efecto matriz (error proporcional), a un efecto interferente (error constante) o a ambos, establecemos nuevos calibrados en presencia de una cantidad constante de matriz (50%). Para dicho calibrado se realiza el procedimiento operatorio indicado anteriormente.

En la tabla II.29 se indican las intensidades relativas de fluorescencia cuando se varía la concentración de las fitohormonas en una concentración de agua potable del 50%.

TABLA II.29.

Fitohormona	Concentración $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR		
AIA	0	10.94	14.15	6.22
	45	327.21	322.57	332.35
	90	646.17	642.06	639.27
	135	956.23	952.17	950.75
AIB	0	0.06	1.87	3.63
	25	121.02	124.86	118.11
	50	237.14	239.58	243.70
	75	359.49	355.69	363.39
	100	479.06	474.81	482.16
AIP	0	9.12	5.06	12.94
	25	99.61	96.48	92.11
	50	184.02	188.76	181.20
	75	270.84	273.79	266.41
	100	358.51	362.91	356.01
AHIA	0	13.31	10.05	6.95
	75	132.87	136.12	129.56
	150	255.19	258.75	251.69
	225	386.58	380.15	376.24
	300	498.81	501.87	505.16
ANA	0	-5.49	0.21	2.50
	10	65.64	63.25	70.98
	20	139.12	143.05	135.87
	30	211.35	205.31	213.24
	40	283.87	287.64	280.91
	50	356.41	358.52	350.21
ANA-A	0	-3.43	2.25	0.58
	20	91.25	94.54	87.94
	40	176.48	180.64	174.95
	60	265.51	268.94	261.54
	80	350.64	354.21	348.57
	100	437.64	441.62	435.00
	120	525.64	530.94	522.13

Todos los calibrados presentan un test de curvatura no significativo, con unos valores de P superiores al 5%: 39.08% (AIA), 86.62% (AIB), 93.96% (AIP), 83.44% (AHIA), 67.56% (ANA) y 72.45% (ANA-A).

En la tabla II.30 se muestran los parámetros estadísticos y de calidad más representativos junto con los obtenidos para la recta de calibrado encontrada en agua bidestilada.

TABLA II.30.-Comparación de los parámetros estadísticos y de calidad.

Anal.	Parámetro	Matriz	
		Agua bidestilada	Agua potable
AIA	Estadístico		
	n	18	12
	$S_{R,c}$	9.009	3.895
	a	11.67	11.90
	s_a	3.76	1.88
	b	6.10	6.98
	s_b	0.04	0.02
	R^2	99.93	99.99
	$t_{\alpha,n-2,bl}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.32	99.68
	Sens. (ppb)	1.47	0.56
	LD (ppb)	0.19	1.26
DSR (90ppb)%	1.04	0.41	
AIB	Estadístico		
	n	18	15
	$S_{R,c}$	8.592	3.113
	a	0.06	0.485
	s_a	3.59	1.39
	b	9.83	4.79
	s_b	0.06	0.02
	R^2	99.94	99.97
	$t_{\alpha,n-2,bl}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.40	99.56
	Sens. (ppb)	0.87	0.61
	LD (ppb)	0.12	1.33
DSR (50ppb)%	0.91	0.77	
AIP	Estadístico		
	n	18	15
	$S_{R,c}$	8.035	3.353
	a	9.12	8.954
	s_a	3.36	1.50
	b	5.06	3.50
	s_b	0.06	0.02
	R^2	99.81	99.94
	$t_{\alpha,n-2,bl}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	98.91	99.30
	Sens. (ppb)	1.59	0.96
	LD (ppb)	0.26	2.10
DSR (50ppb)%	1.62	1.21	

TABLA II.30.-Continuación.

Anal.	Parámetro	Matriz	
		Agua bidestilada	Agua potable
AHIA	Estadístico		
	n	21	15
	$s_{R,c}$	8.246	3.436
	a	9.77	9.85
	s_a	3.24	1.54
	b	2.67	1.64
	s_b	0.02	0.01
	R^2	99.91	99.97
	$t_{\alpha,n-2,b}$	2.093	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.33	99.49
	Sens. (ppb)	3.08	2.09
	LD (ppb)	0.65	4.58
DSR(150ppb)%	1.26	0.89	
ANA	Estadístico		
	n	18	18
	$s_{R,c}$	5.255	3.724
	a	0.22	-3.09
	s_a	2.20	1.57
	b	15.56	7.15
	s_b	0.07	0.05
	R^2	99.97	99.92
	$t_{\alpha,n-2,b}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.55	99.28
	Sens. (ppb)	0.34	0.52
	LD (ppb)	0.61	1.11
DSR (30ppb)%	0.85	1.10	
ANA-A	Estadístico		
	n	21	21
	$s_{R,c}$	7.803	3.196
	a	12.96	2.01
	s_a	3.07	1.26
	b	6.98	4.37
	s_b	0.04	0.02
	R^2	99.93	99.97
	$t_{\alpha,n-2,b}$	2.093	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.39	99.60
	Sens. (ppb)	1.12	0.73
	LD (ppb)	1.64	1.54
DSR (60ppb)%	1.15	0.75	

De la tabla II.30 podemos deducir que la linealidad es prácticamente igual para todas las fitohormonas en estudio en agua potable y agua bidestilada. La sensibilidad analítica y la desviación estándar relativa de la concentración indistintamente aumenta, disminuye o permanece prácticamente igual y el límite de detección aumenta para el agua potable.

Para cada una de las fitohormonas comprobamos que la ordenada en el origen del calibrado con la muestra de agua potable pertenece al intervalo de confianza para la ordenada en el origen del calibrado con patrones ($a \pm t_{\alpha, n-2, bi} \cdot s_a$). En cambio para la pendiente ocurre todo lo contrario, es decir, para cada una de las fitohormonas la pendiente del calibrado con la muestra de agua potable no pertenece al intervalo de confianza de la pendiente del calibrado con patrones ($b \pm t_{\alpha, n-2, bi} \cdot s_b$), para el AIA aumenta y para AIB, AIP, AHIA, ANA y ANA-A disminuye.

De estos datos se deduce la presencia de un efecto matriz, ya que las ordenadas en el origen son iguales y las pendientes distintas lo que nos indica un error proporcional por acción de los componentes del agua potable de Granada. Por ello para realizar un análisis de fitohormonas en dicha agua, es necesario aplicar el calibrado correspondiente con adición de patrón.

ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto, realizamos análisis sobre tres muestras distintas de agua potable de Granada dopadas con una concentración conocida de fitohormona.

Procedimiento: En un matraz de 10 mL se introdujo un volumen de disolución de muestra tal que el contenido de dicha muestra sea del 50% y el contenido de fitohormona esté comprendido en el rango dinámico lineal de dicha fitohormona en la muestra, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M / $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua

desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se preparó un blanco en las mismas condiciones.

Se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión, según de que fitohormona se tratase, con las siguientes condiciones operatorias a 20°C:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{em} nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En la tabla II.31 se muestran las intensidades relativas de fluorescencia obtenidos, la cantidad de fitohormona añadida y encontrada, así como el tanto por ciento de recuperación para cada una de las tres réplicas de cada análisis.

TABLA II.31.-Estudio de recuperación.

Muestra	AIA añad. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IFR	AIA encon. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	25	188.30	25.26	101.04
		183.54	24.57	98.28
		185.61	24.87	99.48
2	75	530.84	74.30	99.07
		539.07	75.48	100.64
		528.14	73.91	98.55
3	125	891.85	125.99	100.79
		879.06	124.16	99.33
		875.91	123.71	98.97

TABLA II.31.-Continuación.

Muestra	AIB añad. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IFR	AIB encon. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	20	98.11	20.39	101.95
		95.41	19.83	99.15
		94.88	19.72	98.60
2	50	243.51	50.77	101.54
		240.93	50.23	100.46
		234.58	48.90	97.80
3	80	389.24	81.21	101.51
		382.49	79.80	99.75
		379.81	79.24	99.05
Muestra	AIP añad. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IFR	AIP encon. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	20	79.13	20.06	100.30
		77.25	19.52	97.60
		78.68	19.93	99.65
2	50	184.15	50.08	100.16
		186.34	50.71	101.42
		180.20	48.96	97.92
3	80	287.43	79.61	99.51
		283.64	78.53	98.16
		292.61	81.09	101.36
Muestra	AHIA añad. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IFR	AHIA enc. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	50	94.11	51.30	102.60
		91.02	49.42	98.84
		92.21	50.14	100.28
2	150	259.61	152.06	101.37
		251.97	147.41	98.27
		255.32	149.45	99.63
3	250	419.37	249.33	99.73
		426.31	253.56	101.42
		417.78	248.37	99.35
Muestra	ANA añad. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IFR	ANA encon. $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	15	106.16	15.28	101.87
		101.87	14.68	97.87
		108.10	15.55	103.67
2	30	210.39	29.86	99.53
		206.71	29.34	97.80
		215.13	30.52	101.73
3	45	319.20	45.07	100.15
		314.51	44.42	98.71
		323.12	45.62	101.38

TABLA II.31.-Continuación.

Muestra	ANA-Aañad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	ANA-Aenc. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	20	88.31	19.75	98.75
		93.10	20.84	104.20
		90.79	20.32	101.60
2	60	262.30	59.56	99.27
		267.45	60.74	101.23
		265.30	60.25	100.42
3	100	440.25	100.28	100.28
		437.05	99.55	99.55
		438.53	99.89	99.89

El valor medio de todos los porcentajes de recuperación para el AIA, AIB, AIP, AHIA, ANA y ANA-A son respectivamente: 99.57%, 99.98%, 99.56%, 100.16%, 100.30% y 100.58%.

Para comprobar si este valor difiere significativamente del 100%, realizamos un test de comparación de una media frente a un valor de referencia [65]. Los valores de la recuperación media, la desviación estándar y el estadístico se muestran en la tabla II.32.

TABLA II.32.

	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
R_{media}	99.57	99.98	99.56	100.16	100.30	100.58
s_R	1.010	1.464	1.419	1.390	2.010	1.631
t_{exp}	1.277	0.041	0.930	0.345	0.448	1.067
P %	23.74	96.82	37.96	73.90	66.60	31.72

$$t_{exp} = (R - R_m) \cdot n^{1/2} / s_R$$

De la tabla II.32 deducimos que la recuperación media no difiere significativamente de 100% con un $P > 5\%$ en todos los casos, por tanto el método es aplicable a la determinación de fitohormonas en Agua potable de Granada.

VI.3.-DETERMINACIÓN DE FITOHORMONAS EN AGUA DE POZO DE LA HUERTA DE SANTA MARIA.

Con objeto de estudiar las posibles interferencias previamente determinamos el contenido iónico de esta agua en mg.L⁻¹ que se muestra en la tabla II.33.

TABLA II.33.-Contenido iónico del agua de pozo.

Ión	mg.L ⁻¹	Técnica aplicada	Referencia
Ca ⁺²	5.00	A.A	62
Mg ⁺²	0.42	A.A.	62
Al ⁺³	0.02	A.A.	62
Fe ⁺³	0.13	A.A.	62
Na ⁺	26.25	Espect. Emisión	63
K ⁺	6.00	Espect. Emisión	63
NO ₃	0.50	Polarografía	66
SO ₄ ⁻²	75.00	Turbidimetría	63
Silice	12.22	Espectrofotometria	63

De acuerdo con los valores de tolerancia de la tabla II.17, en la muestra objeto de análisis observamos que no hay interferentes.

Con objeto de comprobar el efecto que puede ejercer la matriz sobre la intensidad de fluorescencia, realizamos una experiencia en la que se midió la intensidad de fluorescencia correspondiente a una determinada concentración de cada fitohormona en presencia de una concentración de matriz del 50%.

Procedimiento

En un matraz de 10 mL se introdujo un volumen de disolución de fitohormona tal que la concentración resultante estuviese comprendida en el rango dinámico lineal dicha fitohormona, 2 mL

de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ H_2PO_4^- 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, 4 mL de disolución muestra, etanol absoluto para obtener una concentración al 50% y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se preparó un blanco en las mismas condiciones.

Se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión, según de que fitohormona se tratase, con las siguientes condiciones operatorias a 20°C:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5

En la tabla II.34 se recogen las intensidades de fluorescencia registradas, 3 réplicas para cada fitohormona, comparándolas con la intensidad que se obtiene cuando la matriz es agua bides-tilada.

TABLA II.34.

Fitohormona	Matriz					
	Agua de pozo			Agua bidestilada		
AIA (90 ppb)	199.65	192.21	196.87	550.38	564.08	557.14
AIB (50 ppb)	139.80	135.24	142.97	609.25	613.67	606.12
AIP (60 ppb)	60.51	63.98	68.20	315.25	328.40	318.53
AHIA (150 ppb)	203.85	208.18	212.34	420.60	414.98	409.12
ANA (25 ppb)	58.21	55.10	60.03	388.45	385.04	391.57
ANA-A (60 ppb)	70.15	75.10	73.85	429.31	426.54	436.99

De la tabla II.34 deducimos que la matriz provoca una disminución o un aumento de la intensidad de fluorescencia de las fitohormonas con respecto a la intensidad registrada cuando se utiliza agua bidestilada. Para discernir si ese aumento o disminución es debido a un efecto matriz (error proporcional), a un efecto interferente (error constante) o a ambos, establecemos nuevos calibrados en presencia de una cantidad constante de matriz 50%. Para dicho calibrado se realiza el procedimiento operativo indicado anteriormente.

En la tabla II.35 se indican las intensidades relativas de fluorescencia medidas cuando se varía la concentración de las fitohormonas en una concentración de agua de pozo del 50%.

TABLA II.35.

Fito-hor-mona	Concentración $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR		
AIA	0	9.35	15.97	13.33
	40	101.27	110.68	105.73
	80	199.65	192.21	196.87
	120	294.87	290.08	300.67
	160	382.95	386.27	389.19
AIB	0	0.06	0.96	-0.89
	25	68.86	69.93	71.25
	50	139.80	135.24	142.97
	75	212.50	209.67	205.61
	100	277.38	279.54	282.75
AIP	0	9.12	5.37	12.94
	25	32.18	34.03	41.23
	50	60.51	63.98	68.20
	75	90.89	96.54	89.27
	100	120.31	125.01	117.68
AHIA	0	8.26	5.84	12.89
	75	113.46	109.06	106.24
	150	203.85	208.18	212.34
	225	313.22	307.10	303.79
	300	403.01	406.19	410.34
ANA	0	3.31	-1.65	5.10
	10	25.15	21.96	28.74
	20	45.87	50.64	43.57
	30	67.47	70.54	65.84
	40	90.45	92.54	85.64
	50	110.85	115.68	107.24
ANA-A	0	1.10	2.74	4.04
	20	25.64	29.51	23.51
	40	50.98	53.48	48.15
	60	72.61	74.51	69.64
	80	98.15	101.87	95.56
	100	122.54	126.54	117.25
	120	145.62	139.52	148.32

Todos los calibrados presentan un test de curvatura no significativo, con unos valores de P superiores al 5%: 47.24% (AIA), 97.80% (AIB), 96.97% (AIP), 97.31% (AHIA), 99.07% (ANA) y 92.08% (ANA-A).

En la tabla II.36 se muestran los parámetros estadísticos y de calidad más representativos junto con los obtenidos para la recta de calibrado encontrada en agua bidestilada.

TABLA II.36.-Comparación de los parámetros estadísticos y de calidad.

Anal.	Parámetro	Matriz	
		Agua bidestilada	Agua de pozo
AIA	Estadístico		
	n	18	15
	$s_{R,c}$	9.009	4.084
	a	11.67	12.11
	s_a	3.76	1.83
	b	6.10	2.34
	s_b	0.04	0.02
	R^2	99.93	99.92
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.32	99.20
	Sens. (ppb)	1.47	1.75
	LD (ppb)	0.19	3.82
DSR (90ppb)%	1.04	1.40	
AIB	Estadístico		
	n	18	15
	$s_{R,c}$	8.592	2.398
	a	0.06	-0.079
	s_a	3.59	1.07
	b	9.83	2.80
	s_b	0.06	0.02
	R^2	99.94	99.95
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.40	99.37
	Sens. (ppb)	0.87	0.86
	LD (ppb)	0.12	1.88
DSR (50ppb)%	0.91	1.09	
AIP	Estadístico		
	n	18	15
	$s_{R,c}$	8.035	3.558
	a	9.12	8.46
	s_a	3.36	1.59
	b	5.06	1.12
	s_b	0.06	0.03
	R^2	99.81	99.31
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	98.91	97.68
	Sens. (ppb)	1.59	3.17
	LD (ppb)	0.26	6.94
DSR (50ppb)%	1.62	4.03	

TABLA II.36.-Continuación.

Anal.	Parámetro	Matriz	
		Agua bidestilada	Agua de pozo
AHIA	Estadístico		
	n	21	15
	$s_{R,c}$	8.246	3.557
	a	9.77	9.55
	s_a	3.24	1.59
	b	2.67	1.32
	s_b	0.02	0.01
	R^2	99.91	99.94
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.093	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.33	99.35
	Sens. (ppb)	3.08	2.68
	LD (ppb)	0.65	5.89
DSR(150ppb)%	1.26	1.13	
ANA	Estadístico		
	n	18	18
	$s_{R,c}$	5.255	3.052
	a	0.22	2.94
	s_a	2.20	1.28
	b	15.56	2.17
	s_b	0.07	0.04
	R^2	99.97	99.40
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.120	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.55	98.06
	Sens. (ppb)	0.34	1.41
	LD (ppb)	0.61	3.02
DSR (25ppb)%	0.85	2.95	
ANA-A	Estadístico		
	n	21	21
	$s_{R,c}$	7.803	2.975
	a	12.96	2.62
	s_a	3.07	1.17
	b	6.98	1.19
	s_b	0.04	0.02
	R^2	99.93	99.65
	$t_{\alpha,n-2,bi}$	2.093	
	Calidad		
	Lineal. (%)	99.39	98.63
	Sens. (ppb)	1.12	2.51
	LD (ppb)	1.64	5.25
DSR (60ppb)%	1.15	2.64	

De la tabla II.36 obtenemos que la linealidad es prácticamente igual para todas las fitohormonas en estudio para el agua de pozo y agua bidestilada. La sensibilidad analítica y la desviación estándar relativa de la concentración indistintamente aumenta, disminuye o permanece prácticamente igual y el límite de detección aumenta para el agua de pozo.

Para cada una de las fitohormonas comprobamos que la ordenada en el origen del calibrado con la muestra de agua de pozo pertenece al intervalo de confianza para la ordenada en el origen del calibrado con patrones ($a \pm t_{\alpha, n-2, bil} \cdot s_a$). En cambio para la pendiente ocurre todo lo contrario, es decir, para cada una de las fitohormonas la pendiente del calibrado con la muestra de agua de pozo no pertenece al intervalo de confianza de la pendiente del calibrado con patrones ($b \pm t_{\alpha, n-2, bil} \cdot s_b$), disminuye para todas las fitohormonas.

De estos datos se deduce la presencia de un efecto matriz ya que las ordenadas en el origen son iguales y las pendientes son distintas lo que nos indica un error proporcional por acción de los componentes del agua de pozo. Por ello para realizar un análisis de fitohormonas en dicha agua, es necesario aplicar el calibrado correspondiente con adición de patrón.

ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto, realizamos análisis sobre tres muestras distintas de agua de pozo dopadas con una concentración conocida de fitohormona.

Procedimiento: En un matraz de 10 mL se introdujo un volumen de disolución de muestra tal que el contenido de dicha muestra sea del 50% y el contenido de fitohormona esté comprendido en el rango dinámico lineal de dicha fitohormona en la muestra, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ H_2PO_4^- 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua

desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se preparó un blanco en las mismas condiciones.

Se registro el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión según de que fitohormona se tratase, con las siguientes condiciones operatorias a 20°C:

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
λ_{exc} nm	222	222	222	222	222	222
λ_{em} nm	359	359	359	341	337	337
Intervalo _{em}	300-440	300-440	300-440	300-440	300-440	5/5
Rendijas exc/em	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	

En la tabla II.37 se muestran los valores de intensidad relativa de fluorescencia obtenidos, la cantidad de fitohormona añadida y encontrada, así como el tanto por ciento de recuperación para cada una de las tres réplicas de cada análisis.

TABLA II.37.-Estudio de recuperación.

Muestra	AIA añad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	AIA encon. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	25	71.23	25.27	101.08
		69.61	24.58	98.32
		70.25	24.85	99.40
2	75	185.62	74.16	98.88
		187.20	74.84	99.79
		190.12	76.08	101.44
3	125	301.54	123.71	98.97
		306.43	125.80	100.64
		308.91	126.86	101.49
Muestra	AIB añad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	AIB encon. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	20	56.23	20.14	100.70
		54.67	19.58	97.90
		57.11	20.46	102.30
2	50	135.62	48.54	97.08
		137.51	49.21	98.42
		142.51	51.00	102.00
3	80	224.13	80.20	100.25
		226.34	80.99	101.24
		220.15	78.77	98.46
Muestra	AIP añad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	AIP encon. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	20	31.02	20.13	100.65
		30.21	19.41	97.05
		31.68	20.72	103.60
2	50	63.25	48.90	97.80
		66.32	51.64	103.28
		65.03	50.49	100.98
3	80	99.37	81.13	101.41
		97.68	79.62	99.52
		96.51	78.58	98.22

TABLA II.37.-Continuación.

Muestra	AHIA añad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	AHIA enc. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	50	74.24	48.83	97.66
		75.11	49.49	98.98
		76.03	50.18	100.36
2	150	205.64	148.03	98.69
		209.31	150.80	100.53
		210.67	151.82	101.21
3	250	335.97	246.42	98.57
		343.25	251.91	100.76
		337.85	247.84	99.14
Muestra	ANA añad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	ANA encon. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	15	34.87	14.71	98.07
		37.21	15.79	105.26
		35.11	14.82	98.80
2	30	66.31	29.20	97.33
		68.27	30.11	100.37
		70.10	30.95	103.17
3	45	101.59	45.46	101.02
		98.30	43.94	97.64
		100.05	44.75	99.44
Muestra	ANA-Aañad. $\mu\text{g.L}^{-1}$	IFR	ANA-Aenc. $\mu\text{g.L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	20	27.10	20.57	102.85
		26.75	20.28	101.40
		27.80	21.16	105.80
2	60	70.81	57.30	95.50
		72.25	58.51	97.52
		75.15	60.95	101.58
3	100	118.30	97.21	97.21
		120.70	99.23	99.23
		125.12	102.94	102.94

El valor medio de todos los porcentajes de recuperación para el AIA, AIB, AIP, AHIA, ANA y ANA-A son respectivamente: 100.00%, 99.82%, 100.28%, 99.54%, 100.12% y 100.45%.

Para comprobar si este valor difiere significativamente del 100%, realizamos un test de comparación de una media frente a un valor de referencia [65]. Los valores de la recuperación media,

la desviación estándar y el estadístico se muestran en la tabla II.38.

TABLA II.38.

	AIA	AIB	AIP	AHIA	ANA	ANA-A
R_{media}	100.00	99.82	100.28	99.54	100.12	100.45
s_R	1.194	1.900	2.327	1.204	2.668	3.313
t_{exp}	0.000	0.284	0.361	1.146	0.135	0.407
P %**	100.00	78.34	72.76	28.50	89.60	69.46

$$t_{exp} = (R - R_n) \cdot n^{1/2} / s_R$$

De la tabla II.38 obtenemos que la recuperación media no difiere significativamente de 100% con un $P > 5\%$ en todos los casos, por tanto el método es aplicable a la determinación de fitohormonas en agua de pozo de la Huerta de Santa María.

CAPÍTULO III
DETERMINACIÓN DE MEZCLAS BINARIAS



En el capítulo anterior se han estudiado las propiedades fluorescentes de las fitohormonas seleccionadas en esta Memoria y la influencia que ejercen las distintas variables químicas llegándose a proponer distintos métodos para su determinación individual. Se ha puesto de manifiesto el solapamiento espectral que poseen los derivados indólicos AIA, AIB, AIP y AHIA, llegando a presentar los tres primeros espectros de excitación y emisión idénticos y muy similares en el caso del cuarto.

En este capítulo abordamos el estudio de las mezclas binarias:

- Acido indol-3-acético/Acido 5-hidroxiindol-3-acético.
- Acido indol-3-butírico/Acido 5-hidroxiindol-3-acético.
- Acido indol-3-propiónico/Acido 5-hidroxiindol-3-acético.

El interés de la resolución de estas mezclas estriba, además de su interés medioambiental, en que tanto el AIA como el AIP y el AHIA son productos del metabolismo del triptófano como se indicó en la Introducción. Para realizar este estudio se ha hecho uso de la espectrofluorimetría derivada ya que ésta técnica presenta la selectividad necesaria para resolver mezclas de compuestos cuyos espectros de fluorescencia convencionales están muy solapados.

I.-CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES.

Para abordar el análisis de uno o más compuestos por técnicas fluorescentes, precisamos, en primer lugar, conocer de forma exhaustiva su comportamiento fluorescente. Para ello, el primer paso necesario es la obtención de los espectros de luminiscencia total de cada uno de los sistemas por separado y posteriormente el de su mezcla. La observación de estos espectros nos permitirá seleccionar, de entre las distintas modalidades que ofrece el análisis por fluorescencia, la más adecuada para nuestro caso.

I.1.-ESPECTROS DE LUMINISCENCIA TOTAL.

Los espectros de luminiscencia total de las fitohormonas derivadas del indol se han establecido en el capítulo anterior. En este capítulo nos hemos limitado a la obtención del espectro de luminiscencia total de las mezclas en las mismas condiciones experimentales, para lo cual se prepararon tres disoluciones, una para cada mezcla binaria, de $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ en un volumen final de 10 mL al 50% etanol/agua de cada uno de ellos a partir de disoluciones etanólicas de 1 mg.L^{-1} , para lo cual se pipeteo 0.25 mL de dichas disoluciones, la proporción adecuada de etanol absoluto y agua bidestilada para obtener una concentración del 50% y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua. A continuación se procedió al registro de los espectros en las siguientes condiciones:

- Intervalo de emisión entre 290 y 410 nm.
- Intervalo de excitación entre 200 y 280 nm.
- $\Delta\lambda_{\text{exc}}$ 2 nm.
- Rendijas de excitación y emisión de 5 nm.
- Velocidad de barrido 240 nm.min^{-1} .
- Número de barridos 40.

Con objeto de obtener el espectro de luminiscencia neto del sistema y hacer desaparecer la línea Rayleigh de la representación se registró el espectro del blanco (disolución al 50% eta-

nol/agua) en las mismas condiciones, para a continuación restar-
selo al sistema. El resultado se muestran en la figura III.1,
figura III.2 y figura III.3.

FIGURA III.1.-Espectro tridimensional de la mezcla AIA y AHIA.

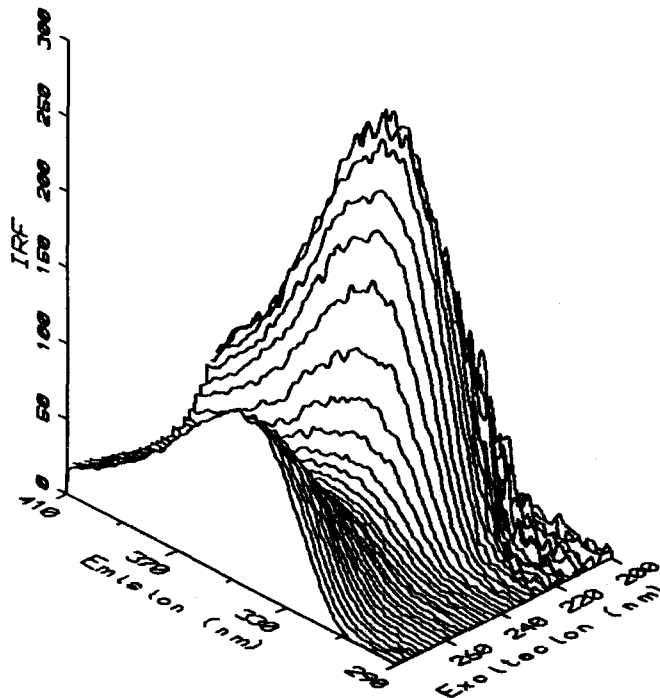


FIGURA III.2.-Espectro tridimensional de la mezcla AIB y AHIA.

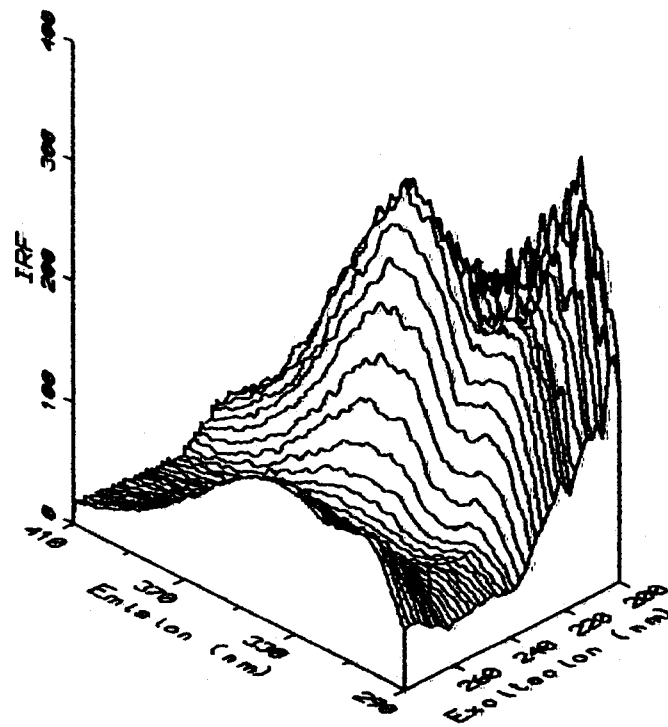
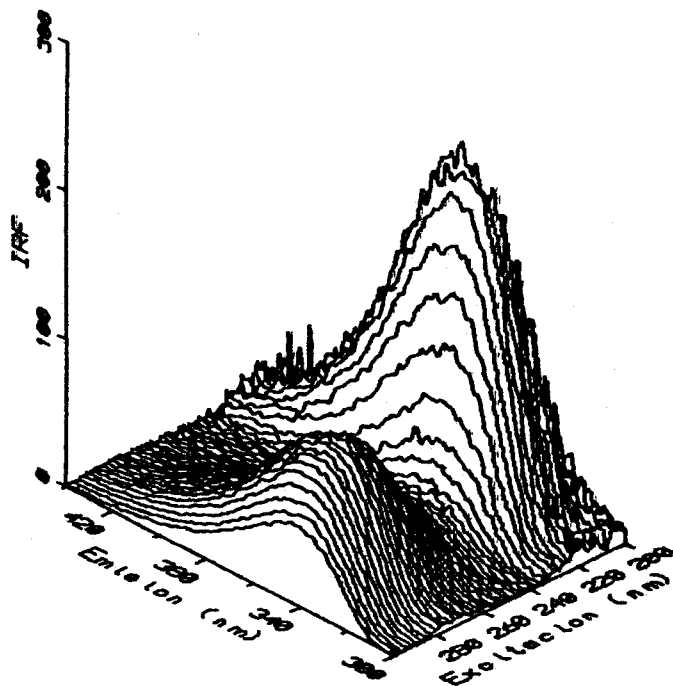


FIGURA IV.3.-Espectro tridimensional de la mezcla AIP y AHIA.



En las figuras III.1, III.2 y III.3 observamos que el máximo de los tridimensionales de las tres mezclas binarias se desplaza con respecto al máximo obtenido en los tridimensionales de los derivados del indol individualmente.

I.2.-MAPAS DE CONTORNO (TOPOGRAMAS).

De la experiencia anterior se obtienen las curvas de nivel o mapas de contorno de cada uno de los tres sistemas. Se representan en las figuras III.4, III.5 y III.6.

FIGURA III.4.-Topograma de la mezcla AIA y AHIA.

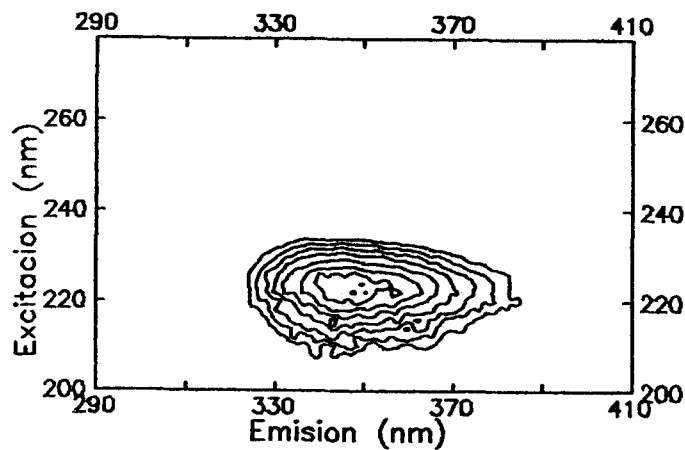


FIGURA III.5.-Topograma de la mezcla AIB y AHIA.

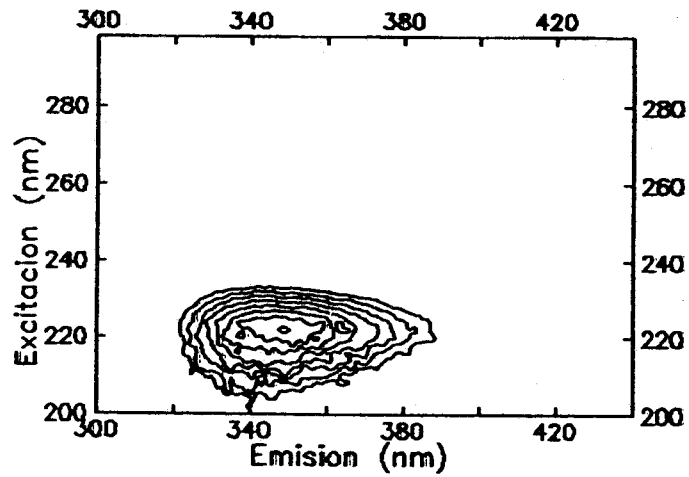
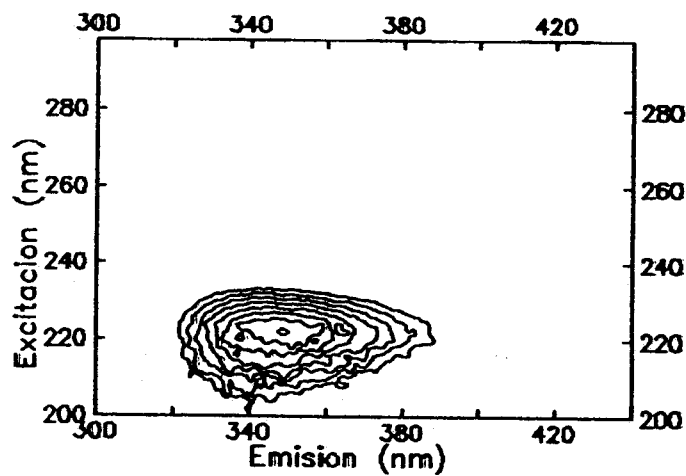


FIGURA III.6.-Topograma de la mezcla AIP y AHIA.



De la observación de las figuras III.4, III.5 y III.6 confirmamos que se produce un desplazamiento de la longitud de onda de emisión para las mezclas binarias, obteniendo un máximo a una longitud de onda de emisión intermedia entre la de los derivados indólicos que forman la mezcla binaria. La longitud de onda de excitación permanece constante ya que es la misma para los dos derivados indólicos que forman la mezcla.

I.3.-ESPECTROS BIDIMENSIONALES.

En la figura III.7 se representan los espectros de emisión de AIA y AHIA y de la mezcla de ambos. En la figura III.8 los espectros de emisión de AIB y AHIA y de la mezcla de ambos y en la figura III.9 los espectros de emisión de AIP y AHIA y de la mezcla de ambos. Estos espectros de emisión individuales corresponden a los representados en el capítulo anterior en las figuras II.13, II.14, II.15 y II.16 y los espectros de emisión de las mezclas corresponden a las mismas muestras preparadas para registrar los espectros de luminiscencia total.

FIGURA III.7.-Espectros de emisión de AIA (···), AHIA (—) y la mezcla de ambos (---).

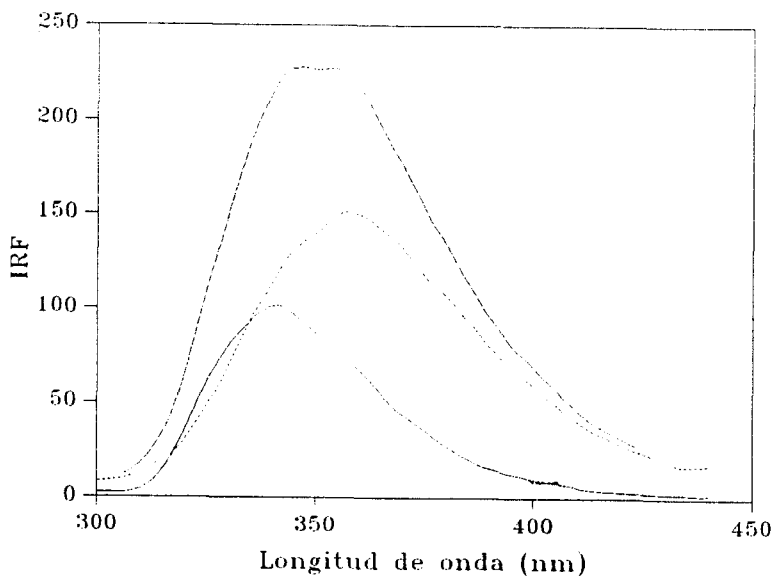


FIGURA III.8.-Espectros de emisión de AIB (···), AHIA (—) y la mezcla de ambos (---).

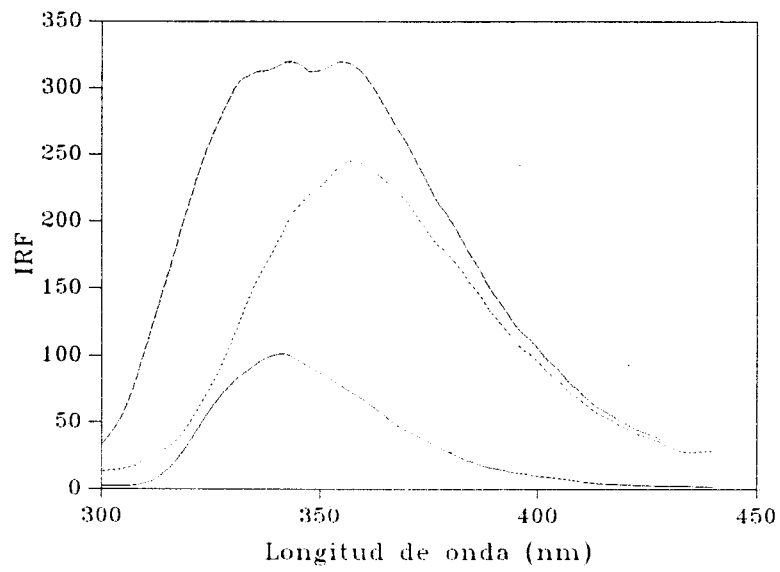
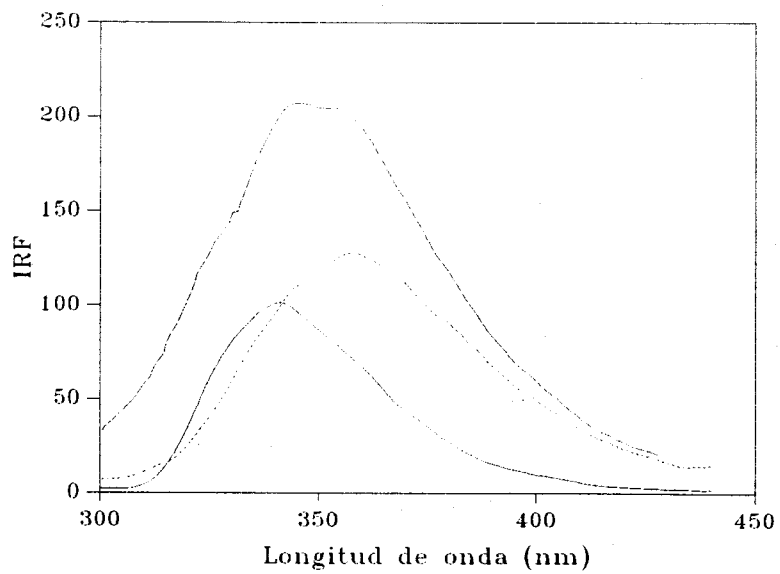


FIGURA III.9.-Espectros de emisión de AIP (···), AHIA (—) y la mezcla de ambos (---).



De la observación de las figuras III.7, III.8 y III.9 comprobamos que la longitud de onda de emisión de las mezclas binarias es intermedia (350 nm) entre la longitud de onda de emisión de los derivados indólicos individuales (359 y 341 nm respectivamente).

Dado el considerable solapamiento de los espectros de emisión, como podemos observar en las figuras III.7-III.9, la determinación de ambos analitos cuando se encuentran presentes en la misma muestra, conllevaría dificultades considerables. La resolución de la mezcla podría hacerse de una manera convencional, es decir, midiendo la emisión de fluorescencia total de la mezcla a las dos longitudes de onda de emisión de cada uno de los analitos, y resolviendo el sistema de ecuaciones correspondientes, por supuesto, el método requiere un conocimiento exacto de la emisión de cada uno de los compuestos a las longitudes de onda de medida.

Por otra parte cuando los espectros están muy solapados, que es el caso que nos ocupa, los errores cometidos pueden ser muy apreciables. Estas dificultades pueden ser soslayadas empleando la técnica de derivadas. En las figuras III.10, III.11 y III.12 se representa la primera derivada de las mezclas en estudio.

FIGURA III.10.-Primera derivada de los espectros de emisión de AIA (—), AHIA (···) y de la mezcla (---).

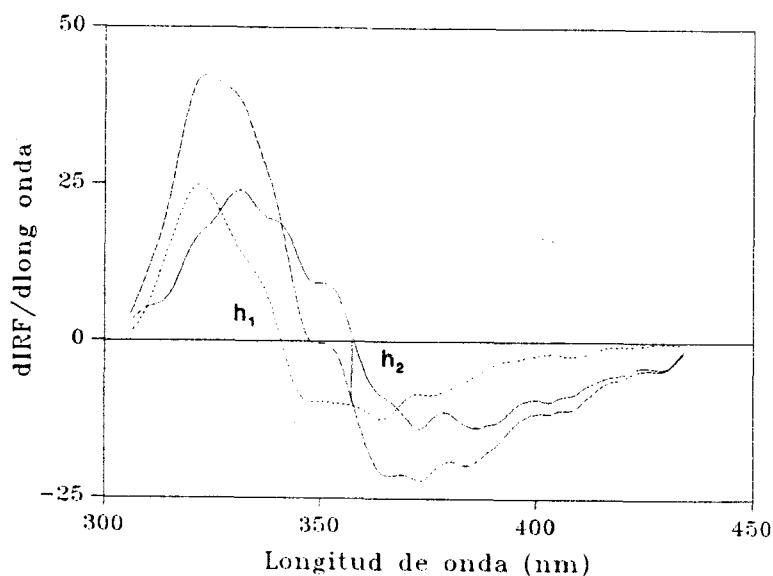


FIGURA III.11.-Primera derivada de los espectros de emisión de AIB (—), AHIA (---) y de la mezcla (···).

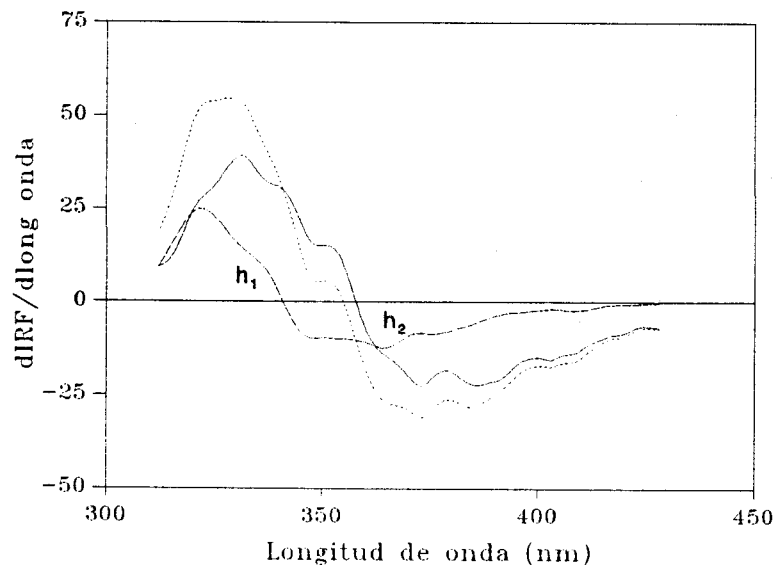
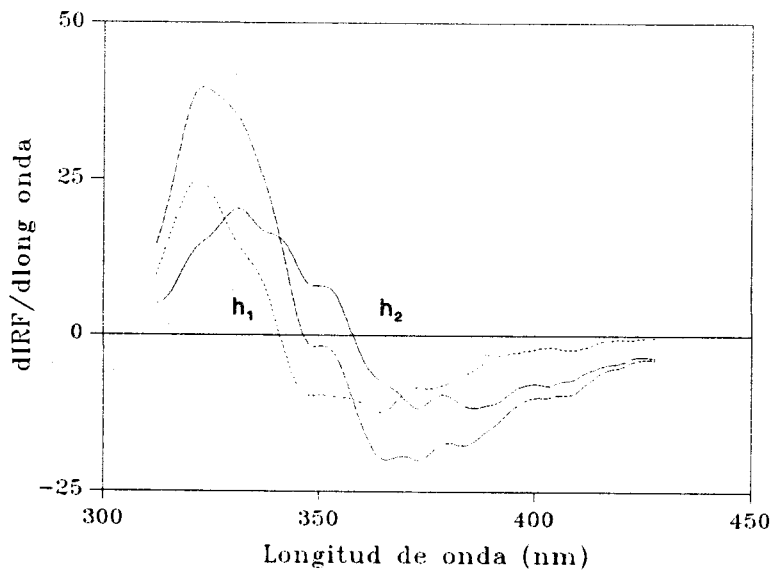


FIGURA III.12.-Primera derivada de los espectros de emisión de AIP (—), AHIA (···) y de la mezcla (---).



Mediante la técnica de medida en el punto de corte "zero crossing" se eligen las longitudes de onda adecuadas para poder realizar medidas proporcionales a las concentraciones de los analitos y poder así establecer las correspondientes rectas de calibrado.

Esta técnica consiste en medir el valor absoluto del espectro derivado total a un valor de longitud de onda correspondiente al punto de corte con el eje de abcisas del espectro del componente que interfiere.

Asumiendo que la derivada de un espectro mezcla es equivalente a la suma de las derivadas de los espectros individuales, cuando la magnitud de la derivada de uno de los analitos es cero, la contribución de dicho analito al espectro derivado de la mezcla es nula y, consecuentemente, el otro analito puede medirse libre de la interferencia del primero. Del mismo modo ocurre al contrario.

Las medidas h_1 y h_2 en la primera derivada del espectro de la mezcla, deber ser proporcionales a las concentraciones de los analitos en estudio respectivamente. En consecuencia, las longitudes de onda a las que se han medido estas señales, serán las longitudes de onda analíticas, para llevar a cabo la determinación. En la tabla III.1 se indican dichas longitudes de onda analíticas para cada analito.

TABLA III.1.-

Mezcla	λ_{em}
AIA/AHIA	341/359
AIB/AHIA	341/359
AIP/AHIA	341/359

II.-OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS INSTRUMENTALES.

II.1.-Elección del factor de filtrado en la obtención de los espectros derivados.

Matemáticamente puede demostrarse que la relación entre la señal analítica y el ruido se hace más pequeña a medida que aumenta el orden de derivación. Por ello, para usar como técnica de trabajo analítica la derivación, es necesario llevar a cabo un filtrado de la señal para controlar el incremento en el ruido que es un resultado inevitable de la derivación de un espectro.

El filtrado de una señal analítica puede usarse también en espectroscopía normal pero es usualmente innecesario. Sin embargo, el filtrado es un factor muy importante en espectroscopía derivada pues el incremento en el ruido causado por el proceso de diferenciación es fundamentalmente debido a un incremento en el ruido de "alta frecuencia". Así, este ruido es especialmente fácil de reducir mediante un proceso de filtrado de "baja frecuencia".

En el proceso de filtrado se hace una convolución de la serie de datos con una función de filtrado consistente en una serie de coeficientes proporcionales. Cada punto de la serie de datos filtrados es una combinación lineal de un grupo de puntos adyacentes de la serie de datos sin filtrar, multiplicando cada uno por un coeficiente proporcional.

En nuestro caso, para la obtención tanto de los espectros derivados como para el posterior suavizado de los mismos, hemos usado el programa FL Data Manager suministrado por la casa Perkin Elmer para controlar el espectrofluorímetro LS-50. Este programa aplica el método de filtrado y diferenciación de datos basado en el procedimiento de mínimos cuadrados simplificado de Savitzky-Golay [67].

Se pueden emplear factores comprendidos entre 5 y 149 puntos, que ajustan cada punto a un polinomio cuadrático o cúbico a través de sucesivas ventanas de datos que se utilizan para determinar el mejor punto central.

A medida que aumentamos el factor de filtrado, el proceso de filtración es más efectivo, a costa de perder resolución. Con objeto de comprobar como afectaba el factor de filtrado a los espectros derivados, se ensayó con el espectro correspondiente a la derivada de orden uno de una de las mezclas vista anteriormente. Los espectros resultantes se pueden observar en la figura III.13.

FIGURA III.13.a.-Factor de filtrado de 5 puntos.

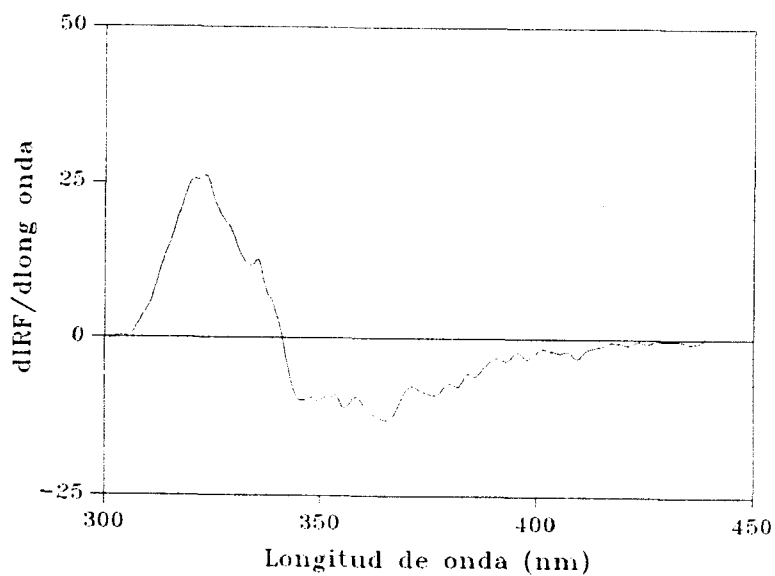


FIGURA III.13.b.-Factor de filtrado de 13 puntos.

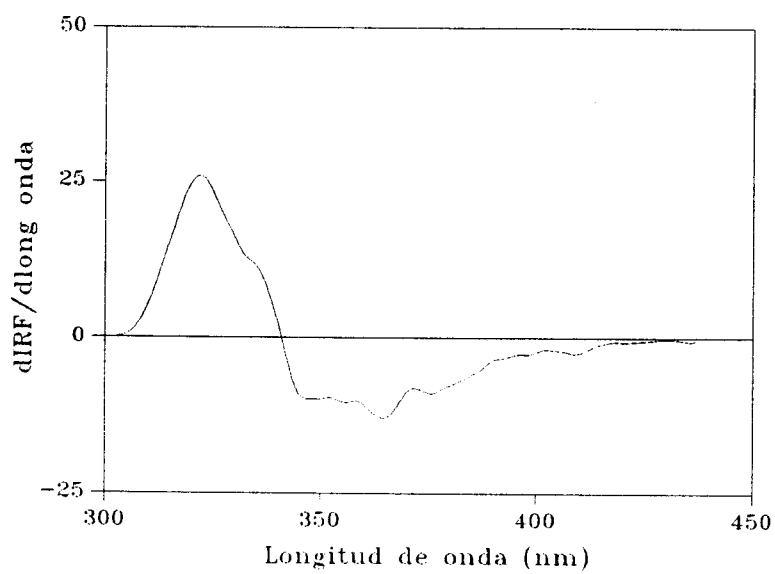


FIGURA III.13.c.-Factor de filtrado de 19 puntos.

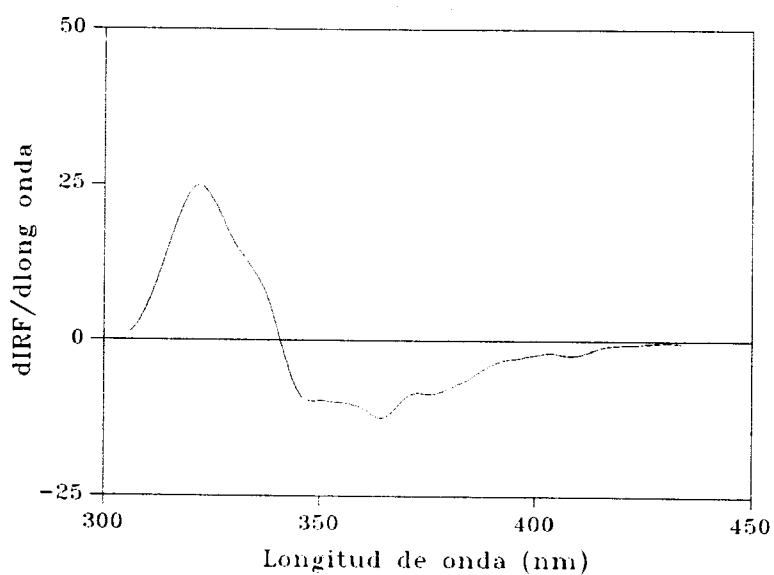
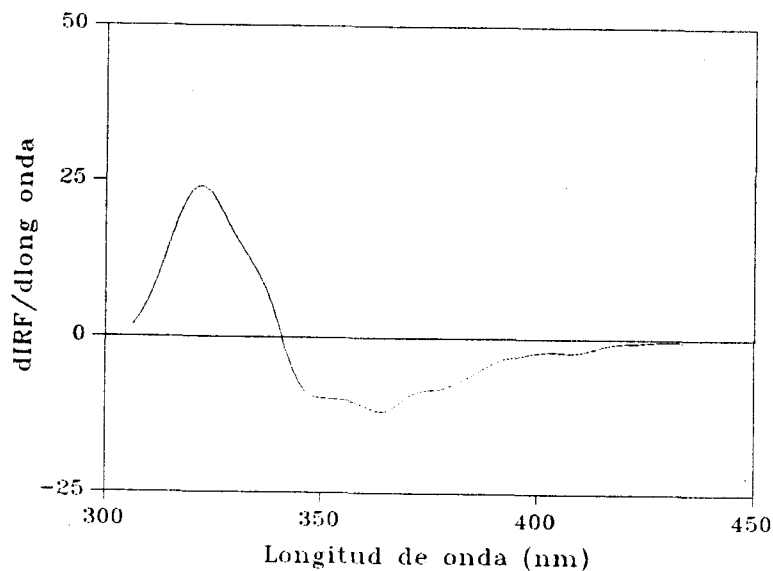


FIGURA III.13.d.-Factor de filtrado de 25 puntos.



Claramente puede observarse que la señal obtenida al efectuar la primera derivada está prácticamente exenta de ruido cuando el factor de filtrado es igual o superior a 19 puntos. Es por ello que elegimos un factor de filtrado de 19 puntos para la obtención de la primera derivada minimizando así la pérdida de sensibilidad que conllevaría el uso de un mayor número de puntos.

III.-OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.

III.1.-ESTUDIO DEL PH.

En el estudio de la influencia del pH sobre la intensidad de fluorescencia realizado en el capítulo II se ha puesto de manifiesto que las fitohormonas derivadas del indol presentan máxima intensidad relativa de fluorescencia en el intervalo de pH comprendido entre 7 y 11, por lo tanto las mezclas binarias de dichas fitohormonas presentan el mismo comportamiento. Por ello para experiencias posteriores se fija el pH añadiendo 2 mL del sistema HPO_4^{2-} 0.1 M / H_2PO_4^- 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua como se estudió en el capítulo II.

III.2.-ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD.

Para estudiar la estabilidad de las mezclas binarias de las fitohormonas derivadas del indol en disolución al 50% etanólica se preparó una disolución para cada mezcla binaria que contenía 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cada derivado indólico, para lo cual se introdujo en un matraz de 10 mL 0,5 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de cada derivado indólico, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión para cada mezcla binaria periódicamente con rendijas de excitación y emisión de 5 nm y λ_{ex} 222 nm.

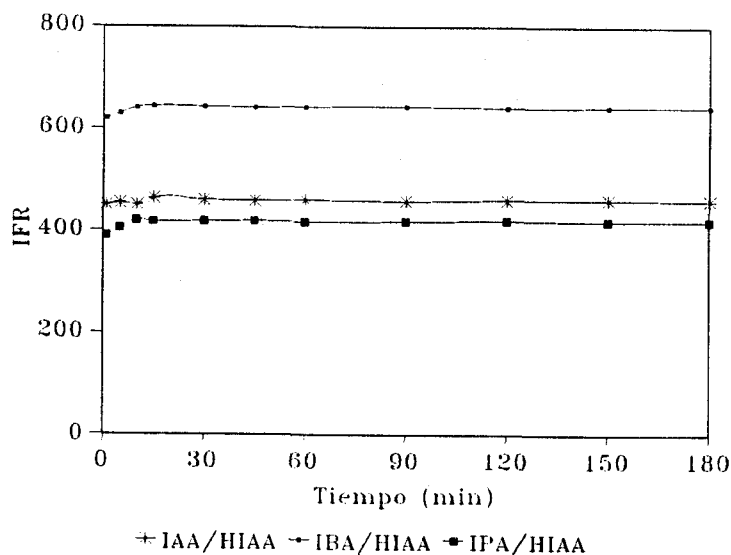
Los respectivos blancos se prepararon bajo las mismas condiciones experimentales.

Se midió las intensidades de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de las mezclas (350 nm). Los resultados obtenidos, una vez restadas las correspondientes contribuciones de los blancos, se muestran en la tabla III.2 y en la figura III.14.

TABLA III.2.-Estabilidad de las mezclas binarias de fitohormonas.

Tiempo (min)	IFR _{mezcla}		
	AIA/AHIA	AIB/AHIA	AIP/AHIA
1	451.26	619.72	389.82
5	454.43	630.16	404.64
10	451.26	640.61	419.96
15	463.92	644.09	417.80
30	460.76	642.32	418.25
45	459.61	641.51	419.15
60	461.25	642.05	417.38
90	459.37	643.61	418.34
120	460.98	641.64	419.65
150	461.84	642.28	418.57
180	460.18	642.81	418.49

FIGURA III.14.-Estabilidad de las fitohormonas.



De la tabla III.2 y figura III.14 podemos concluir que a partir de los diez minutos de haber preparado la disolución ésta es estable hasta al menos 3 horas.

III.3.-INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA.

Se ha realizado el estudio de la influencia que la fuerza iónica del medio ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del sistema empleando dos sales diferentes NaCl y NaClO₄.

Para ello se prepararon dos series de matraces aforados de 10 mL para cada mezcla binaria conteniendo 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cada derivado indólico, para lo cual se introdujeron en cada uno de ellos 0,5 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de derivado indólico, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, cantidades crecientes de NaCl 5 M ó NaClO₄ 5 M, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión para cada mezcla binaria con rendijas de excitación y emisión de 5 nm y λ_{ex} 222 nm.

Los respectivos blancos se prepararon bajo las mismas condiciones experimentales.

Se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de 350 nm. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.3 y III.4 y en las figuras III.15 y III.16.

TABLA III.3.-Fuerza iónica (NaCl).

[NaCl] (M)	IFR _{mezcla}		
	AIA/AHIA	AIB/AHIA	AIP/AHIA
0.1	460.38	641.51	417.90
0.2	492.68	686.42	466.24
0.4	526.89	700.07	464.33
0.6	542.09	692.39	459.02
0.8	554.09	692.04	461.80
1.0	562.99	686.42	452.18
1.5	572.49	690.57	458.34
2.0	581.62	700.11	460.21

TABLA III.4.-Fuerza iónica (NaClO₄)

[NaClO ₄] (M)	IFR _{mezcla}		
	AIA/AHIA	AIB/AHIA	AIP/AHIA
0.1	458.21	640.52	420.35
0.2	491.18	681.13	448.28
0.4	543.72	683.83	441.94
0.6	565.47	673.01	452.72
0.8	573.93	686.54	460.15
1.0	580.37	700.08	456.98

FIGURA III.15.-Fuerza iónica (NaCl).

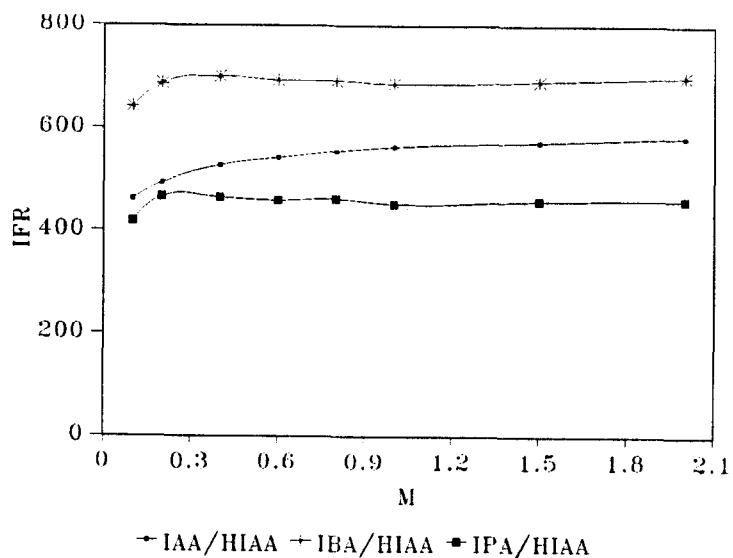
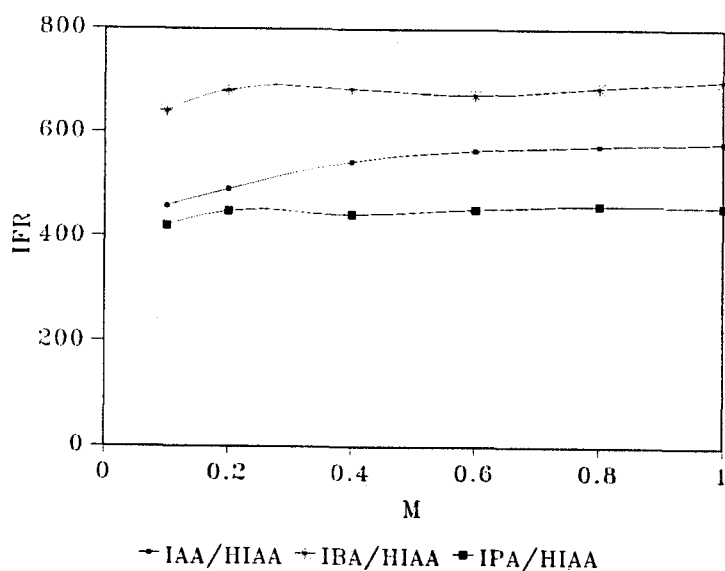


FIGURA III.16.-Fuerza iónica (NaClO₄).



De las figuras III.15 y III.16 podemos concluir que la intensidad relativa de fluorescencia aumenta ligeramente al aumentar la fuerza iónica.

III.4.-INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Se estudió la influencia que la temperatura ejerce sobre las mezclas binarias de las fitohormonas en estudio en disolución al 50% etanólica, para ello se preparó una disolución para cada mezcla binaria que contenía $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cada derivado indólico, para lo cual se introdujo en un matraz de 10 mL 0,5 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de cada derivado indólico, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión, variando la temperatura, con rendijas de excitación y emisión de 5 nm y λ_{ex} 222 nm.

Los respectivos blancos se prepararon bajo las mismas condiciones experimentales.

En la tabla III.5 se recogen las intensidades relativas de fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 350 nm al calentar el sistema y en la tabla III.6 al enfriar el sistema con ayuda de un termostato, y se representan gráficamente en las figuras III.17, III.18 y III.19.

TABLA III.5.-Influencia de la temperatura, calentamiento.

Calentamiento °C	IFR _{mezcla}		
	AIA/AHIA	AIB/AHIA	AIP/AHIA
5	507.77	694.02	444.63
10	495.49	696.83	437.70
15	481.15	668.70	424.08
20	460.68	640.56	417.76
25	442.25	589.92	398.79
30	432.01	557.41	390.88
35	395.15	502.39	364.56
40	362.39	448.93	337.13
45	327.58	378.90	311.84
50	286.34	321.25	283.57
55	236.14	270.54	256.38
60	160.85	217.15	225.12

TABLA III.6.-Influencia de la temperatura, enfriamiento.

Enfriamiento °C	IFR _{mezcla}		
	AIA/AHIA	AIB/AHIA	AIP/AHIA
60	160.85	217.15	225.12
55	212.97	280.57	257.74
50	261.24	365.14	287.64
45	311.43	435.62	350.17
40	377.08	494.35	380.07
35	423.41	548.38	420.15
30	479.70	613.71	451.71
25	520.32	683.56	489.20
20	561.77	720.00	528.65
15	598.61	765.55	558.52
10	621.64	783.77	594.03
5	628.55	801.99	619.81

FIGURA III.17.-Influencia de la temperatura sobre la mezcla AIA/AHIA.

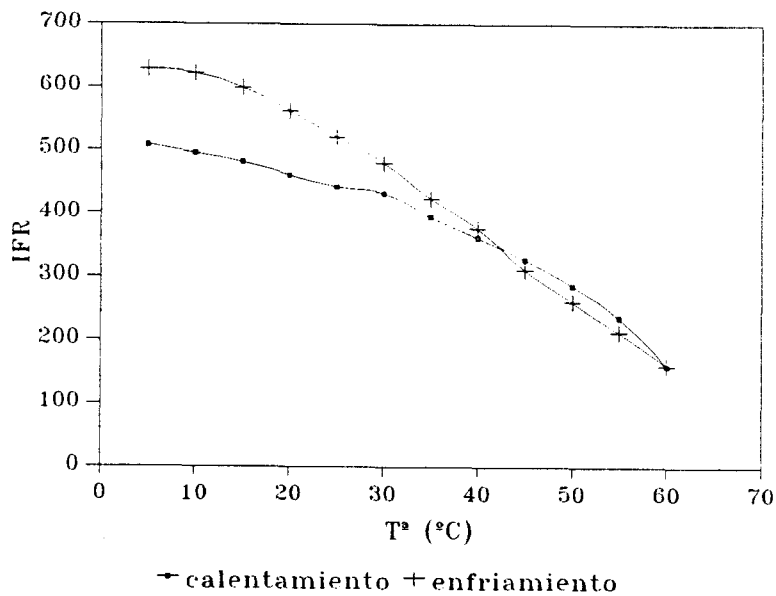


FIGURA III.18.-Influencia de la temperatura sobre la mezcla AIB/AHIA.

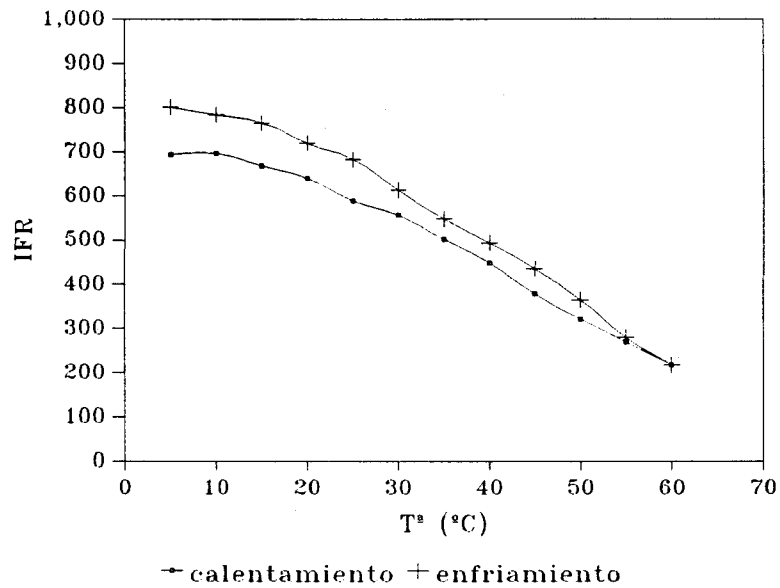
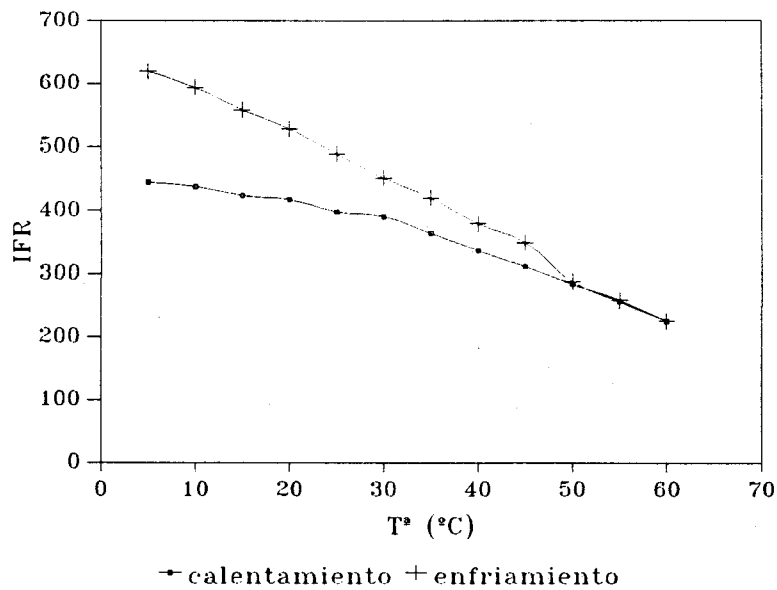


FIGURA III.19.-Influencia de la temperatura sobre la mezcla AIP/AHIA.



De las figuras III.17-III.19 se deduce que la intensidad relativa de fluorescencia decrece cuando la temperatura se incrementa. Esto nos obliga a fijar su valor. Se ha elegido como temperatura de trabajo $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, próxima a la temperatura ambiente y fácil de conseguir mediante el empleo de un simple termostato.

IV.-CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO.

IV.1.-RECTAS DE CALIBRADO.

Se han establecido cuatro rectas de calibrado para cada derivado indólico con objeto de comprobar la independencia entre las señales analíticas de cada derivado indólico, a partir de medidas de la señal analítica correspondiente a la primera derivada del espectro de emisión, de disoluciones que contenían cantidades crecientes de un derivado indólico, en ausencia y presencia de concentraciones constantes del otro derivado indólico implicado en la mezcla binaria y viceversa.

IV.1.1.-RECTAS DE CALIBRADO DE AIA.

Para establecer las rectas de calibrado del AIA en ausencia y en presencia de AHIA se prepararon cuatro series de matraces aforados de 10 mL en los que se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de AIA de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y la cantidad de AHIA correspondiente a cada serie, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} $0,1 \text{ M}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ $0,1 \text{ M}$ a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarán los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia se han efectuado a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/341$ nm.

En la tabla III.7 se muestran las intensidades relativas de fluorescencia derivada para el AIA en ausencia y presencia del AHIA, en la tabla III.8 se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado correspondientes deducidas de la regresión por mínimos cuadrados y en la tabla III.9 se muestran los parámetros estadísticos.

TABLA III.7.-Influencia de la concentración de AIA en ausencia y en presencia de AHIA.

AHIA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	AIA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	dIFR/d λ		
0	0	3.12	2.82	3.30
	30	23.80	25.06	24.27
	60	43.78	46.19	44.90
	90	66.48	66.00	66.81
	120	86.06	89.40	87.21
	150	107.30	108.26	109.32
10	0		1.54	
	30		24.62	
	60		46.82	
	90		66.81	
	120		89.49	
	150		105.47	
50	0		1.87	
	30		22.63	
	60		48.14	
	90		69.90	
	120		87.16	
	150		105.17	
100	0		1.69	
	30		22.40	
	60		46.95	
	90		66.37	
	120		83.50	

TABLA III.8.-Rectas de calibrado de AIA.

[AHIA] $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Ecuación de la recta
0	$3.13 + 0.70 [AIA]$
10	$3.34 + 0.70 [AIA]$
50	$3.54 + 0.70 [AIA]$
100	$2.66 + 0.69 [AIA]$

TABLA III.9.-Parámetros estadísticos del AIA.

Parámetros	AHIA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			
	0	10	50	100
n	18	6	6	5
m	3	1	1	1
$s_{\text{if},c}$	0.885	2.154	2.980	2.348
a	3.13	3.34	3.54	2.66
s_a	0.370	1.559	2.157	1.819
b	0.70	0.70	0.70	0.69
s_b	0.004	0.017	0.024	0.025
DSR(b)	0.58%	2.43%	3.43%	3.57%
R^2	99.95%	99.76%	99.54%	99.62%
lack of fit	96.23%			

De los datos de la tabla III.9 observamos que las pendientes de las rectas de calibrado del AIA en ausencia o presencia de AHIA son iguales, lo que nos indica independencia de la señal analítica del AIA respecto del AHIA.

También obtenemos que para la recta de calibrado en ausencia de AHIA el test de fallo de ajuste (lack of fit) es no significativo ($p=96.23\%$), lo que indica que no hay curvatura entre los datos.

IV.1.2.-RECTAS DE CALIBRADO DE AIB.

Para establecer las rectas de calibrado del AIB en ausencia y en presencia de AHIA se prepararon cuatro series de matraces aforados de 10 mL en los que se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de AIB de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y la cantidad de AHIA correspondiente a cada serie, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarán los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se han efectuado a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/341$ nm.

En la tabla III.10 se muestran las intensidades relativas de fluorescencia derivada para el AIB en ausencia y presencia del AHIA, en la tabla III.11 se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado correspondientes deducidas de la regresión por mínimos cuadrados y en la tabla III.12 se muestran los parámetros estadísticos.

TABLA III.10.-Influencia de la concentración de AIB en ausencia y en presencia de AHIA.

AHIA $\mu\text{g.L}^{-1}$	AIB $\mu\text{g.L}^{-1}$	dIFR/d λ		
0	0	0.55	-0.40	0.89
	20	24.52	22.49	26.03
	40	47.21	50.98	48.81
	60	74.61	75.20	74.58
	80	98.35	101.10	100.25
	100	123.92	121.53	123.89
30	0		0.67	
	20		23.89	
	40		50.20	
	60		73.51	
	80		99.64	
	100		122.73	
60	0		0.46	
	20		25.42	
	40		49.38	
	60		76.85	
	80		100.68	
	100		123.09	
100	0		0.33	
	20		23.43	
	40		48.19	
	60		73.80	
	80		98.37	

TABLA III.11.-Rectas de calibrado de AIB.

[AHIA] $\mu\text{g.L}^{-1}$	Ecuación de la recta
0	$0.04 + 1.24 [\text{AIB}]$
30	$0.28 + 1.23 [\text{AIB}]$
60	$0.76 + 1.24 [\text{AIB}]$
100	$-0.47 + 1.23 [\text{AIB}]$

TABLA III.12.-Parámetros estadísticos del AIB.

Parámetros	AHIA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			
	0	30	60	100
n	18	6	6	5
m	3	1	1	1
$S_{\text{if},c}$	1.333	0.894	1.334	0.768
a	0.04	0.28	0.76	-0.47
S_a	0.557	0.647	0.966	0.595
b	1.24	1.23	1.24	1.23
S_b	0.009	0.011	0.016	0.012
DSR(b)	0.73%	0.89%	1.29%	0.97%
R^2	99.91%	99.97%	99.93%	99.97%
lack of fit	53.65%			

De los datos de la tabla III.12 observamos que las pendientes de las rectas de calibrado del AIB en ausencia o presencia de AHIA son iguales, lo que nos indica independencia de la señal analítica del AIB respecto del AHIA.

También obtenemos que para la recta de calibrado en ausencia de AHIA el test de fallo de ajuste (lack of fit) es no significativo ($p=53.65\%$), lo que indica que no hay curvatura entre los datos.

IV.1.3.-RECTAS DE CALIBRADO DE AIP.

Para establecer las rectas de calibrado del AIP en ausencia y en presencia de AHIA se prepararon cuatro series de matraces aforados de 10 mL en los que se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de AIP de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y la cantidad de AHIA correspondiente a cada serie, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} $0,1 \text{ M}/\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ $0,1 \text{ M}$ a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia se han efectuado a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/341$ nm.

En la tabla III.13 se muestran las intensidades relativas de fluorescencia derivada para el AIP en ausencia y presencia del AHIA, en la tabla III.14 se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado correspondientes deducidas de la regresión por mínimos cuadrados y en la tabla III.15 se muestran los parámetros estadísticos.

TABLA III.13.-Influencia de la concentración de AIP en ausencia y en presencia de AHIA.

AHIA $\mu\text{g.L}^{-1}$	AIP $\mu\text{g.L}^{-1}$	$d\text{IFR}/d\lambda$		
0	0	0.77	0.11	0.35
	20	14.20	12.52	13.75
	40	24.48	25.93	26.71
	60	40.69	38.49	39.38
	80	52.16	51.49	51.16
	100	63.85	63.29	64.97
50	0		0.30	
	20		14.42	
	40		25.55	
	60		39.51	
	80		51.27	
	100		65.75	
150	0		0.48	
	20		13.54	
	40		26.52	
	60		40.05	
	80		51.87	
	100		64.61	
250	0		0.49	
	20		13.11	
	40		25.14	
	60		38.95	
	80		52.31	

TABLA III.14.-Rectas de calibrado de AIP.

[AHIA] $\mu\text{g.L}^{-1}$	Ecuación de la recta
0	$0.58 + 0.64 [\text{AIP}]$
50	$0.53 + 0.64 [\text{AIP}]$
150	$0.76 + 0.64 [\text{AIP}]$
250	$0.10 + 0.65 [\text{AIP}]$

TABLA III.15.-Parámetros estadísticos del AIP.

Parámetros	AHIA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			
	0	50	150	250
n	18	6	6	5
m	3	1	1	1
$s_{i\bar{y},c}$	0.829	0.862	0.465	0.595
a	0.58	0.53	0.76	0.10
s_a	0.346	0.624	0.336	0.461
b	0.64	0.64	0.64	0.65
s_b	0.005	0.010	0.005	0.009
DSR(b)	0.78%	1.56%	0.78%	1.38%
R^2	99.87%	99.90%	99.97%	99.94%
lack of fit	55.94%			

De los datos de la tabla III.15 observamos que las pendientes de las rectas de calibrado del AIP en ausencia o presencia de AHIA son iguales, lo que nos indica independencia de la señal analítica del AIP respecto del AHIA.

También obtenemos que para la recta de calibrado en ausencia de AHIA el test de fallo de ajuste (lack of fit) es no significativo ($p=55.94\%$), lo que indica que no hay curvatura entre los datos.

IV.1.4.-RECTAS DE CALIBRADO DE AHIA.

Para establecer las rectas de calibrado del AHIA en ausencia y en presencia de AIA, AIB e AIP se prepararon cuatro series de matraces aforados de 10 mL, para cada mezcla binaria, en los que se introdujeron volúmenes crecientes de disolución de AHIA de 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y la cantidad de AIA, AIB y AIP correspondiente a cada serie, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarán los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia se han efectuado a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/359$ nm.

En la tabla III.16 se muestran las intensidades relativas de fluorescencia derivada para el AHIA en ausencia y presencia de AIA, AIB y AIP, en la tabla III.17 se muestran las ecuaciones de las rectas de calibrado correspondientes deducidas de la regresión por mínimos cuadrados y en la tabla III.18 se muestran los parámetros estadísticos.

TABLA III.16.-Influencia de la concentración de AHIA en ausencia y en presencia de AIA, AIB y AIP.

Indol $\mu\text{g.L}^{-1}$	AHIA $\mu\text{g.L}^{-1}$	dIFR/d λ			
AIA	0	0.23	0.12	0.54	
	75	21.42	24.90	26.81	
	150	41.15	47.43	38.87	
	225	63.07	69.96	58.74	
	300	81.34	86.15	78.61	
	10	0		1.09	
		75		26.09	
		150		45.04	
		225		64.80	
	30	0		1.71	
		75		25.85	
		150		41.07	
		225		63.28	
	50	0		1.40	
		75		26.23	
150			41.81		
225			62.37		
AIB	0		1.17		
	75		22.17		
	150		40.61		
	225		62.58		
	300		83.34		
	25	0		0.79	
		75		23.54	
		150		43.90	
		225		65.04	
		300		80.23	
	40	0		0.54	
		75		26.25	
150			45.81		
225			63.41		
300			85.85		
AIP	0		0.86		
	75		24.57		
	150		47.28		
	225		65.93		
	300		85.02		
	30	0		0.33	
		75		22.64	
		150		41.74	
		225		63.81	
		300		81.92	
	50	0		0.48	
		75		21.99	
		150		42.07	
		225		65.78	
		300		82.04	

TABLA III.17.-Rectas de calibrado de AHIA.

Indol $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Ecuación de la recta
0	1.86 + 0.27 [AHIA]
AIA 10	2.74 + 0.28 [AHIA]
30	2.99 + 0.27 [AHIA]
50	3.18 + 0.26 [AHIA]
0	1.86 + 0.27 [AHIA]
AIB 10	1.02 + 0.27 [AHIA]
25	2.62 + 0.27 [AHIA]
40	2.82 + 0.28 [AHIA]
0	1.86 + 0.27 [AHIA]
AIP 10	2.80 + 0.28 [AHIA]
30	1.22 + 0.27 [AHIA]
50	1.09 + 0.27 [AHIA]

TABLA III.18.-Parámetros estadísticos del AHIA.

Parámetros	AHIA	AIA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		
		10	30	50
n	15	4	4	4
m	3	1	1	1
$s_{\text{f.r.}}$	1.714	2.147	2.606	2.709
a	1.86	2.74	2.99	3.18
s_a	1.665	1.796	2.181	2.267
b	0.27	0.28	0.27	0.26
s_b	0.009	0.013	0.016	0.016
DSR(b)	3.33%	4.64%	5.93%	6.15%
R^2	98.57%	99.58%	99.32%	99.26%
lack of fit	56.34%			

TABLA III.18.-Continuación.

Parámetros	AIB $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			AIP $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		
	10	25	40	10	30	50
n	5	5	5	5	5	5
m	1	1	1	1	1	1
$S_{\text{irr.}}$	0.917	2.405	2.404	2.134	1.241	1.890
a	1.02	2.62	2.82	2.80	1.22	1.09
S_a	0.710	1.863	1.862	1.653	0.961	1.464
b	0.27	0.27	0.28	0.28	0.27	0.27
S_b	0.004	0.010	0.010	0.008	0.005	0.008
DSR(b)	1.48%	3.70%	3.57%	2.86%	1.85%	2.96%
R^2	99.94%	99.57%	99.60%	99.69%	99.89%	99.75%

De los datos de la tabla III.18 observamos que las pendientes de las rectas de calibrado del AHIA en ausencia o presencia de AIA, AIB y AIP son iguales, lo que nos indica independencia de la señal analítica del AHIA respecto del resto de derivado indólicos.

También obtenemos que para la recta de calibrado individual de AHIA el test de fallo de ajuste (lack of fit) es no significativo ($p=56.34\%$), lo que indica que no hay curvatura entre los datos.

IV.2.-PARÁMETROS DE CALIDAD.

Para la determinación del límite de detección y de cuantificación se realizó un estudio estadístico de la señal del blanco para lo cual se preparó una serie de 10 matraces aforados de 10 mL en los que se introdujeron 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ H_2PO_4^- 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarán los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia se han efectuado a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/341$ nm para AIA, AIB y AIP y 222/359 nm para AHIA.

En la tabla III.19 se muestran las medidas de las señales de fluorescencia derivada de los blancos así como los límites de detección y cuantificación.

TABLA III.19.-Límites de detección y cuantificación.

Muestra	dIFR/d λ			
	AIA	AIB	AIP	AHIA
1	0.61	0.51	0.53	1.90
2	0.59	0.53	0.49	1.89
3	0.63	0.59	0.55	1.90
4	0.61	0.55	0.51	1.95
5	0.64	0.52	0.49	1.93
6	0.59	0.51	0.52	1.89
7	0.62	0.53	0.51	1.91
8	0.61	0.57	0.53	1.90
9	0.63	0.54	0.49	1.89
10	0.59	0.51	0.51	1.93
dIFR/d λ	0.61	0.54	0.51	1.91
σ_{n-1}	0.018	0.027	0.020	0.021
C_L	0.077	0.065	0.094	0.22
C_Q	0.26	0.22	0.31	0.75

En la tabla III.20 se resumen los parámetros analíticos calculados para el análisis de las mezclas binarias en estudio.

TABLA III.20.- Parámetros analíticos.

Parámetro	AIA	AIB	AIP	AHIA
Rango dinámico lineal ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0.26-120	0.22-80	0.31-80	0.75-300
Linealidad (%) ^a	99.42	99.26	99.12	98.62
Sensibilidad analítica ^b ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1.26	1.07	1.29	6.35
Precisión (%) ^c	0.78	0.66	0.80	15.72
Límite de detección ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0.077	0.065	0.094	0.22
Límite de cuantificación ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0.26	0.22	0.31	0.75

^a Calculada por la expresión $[1-DSR(b)]$

^b Calculada por la expresión $s_{R,c}/b$

^c Calculada por la expresión $DSR=s./c$ en el punto central de la recta de calibrado.

V.-PROCEDIMIENTOS OPERATORIOS.

Como consecuencia del estudio realizado anteriormente, proponemos los siguientes métodos para la determinación en mezclas binarias de los derivados indólicos mediante espectrofluorimetría derivada.

Procedimiento: En un matraz de 10 mL se introdujo un volumen de disolución de muestra tal que el contenido de los derivados indólicos en dicha muestra esté comprendido en la recta de calibrado de ambos derivados indólicos, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua bidestilada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restado el blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia derivada se miden a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/341$ nm para AIA, AIB y AIP y 222/359 nm para AHIA. A partir de estas medidas calculamos la concentración encontrada para cada derivado indólico en estudio, mediante la interpolación a la correspondiente recta de calibrado.

VI.-APLICACIONES ANALÍTICAS.

Los métodos analíticos propuestos para la resolución de mezclas binarias de derivados indólicos, han sido aplicados a la determinación de estos en muestras sintéticas y aguas naturales.

VI.1.-RESOLUCIÓN DE MEZCLAS BINARIAS EN MUESTRAS SINTÉTICAS.

Con objeto de aplicar los métodos propuestos para la determinación en mezclas binarias de derivados indólicos mediante fluorescencia derivada, se han preparado una serie de muestras sintéticas con distintas relaciones en peso de cada uno de los derivados indólicos.

Para todas ellas se siguió el mismo procedimiento: en un matraz aforado de 10 mL se añadió el volumen necesario de disolución etanólica de cada uno de los derivados indólicos para que la concentración final de los mismos sea la requerida según la relación en peso estimada. A continuación, se completó con 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ H_2PO_4^- 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua bidestilada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restado el blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia derivada se miden a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/341$ nm para AIA, AIB y AIP y 222/359 nm para AHIA. A partir de estas medidas calculamos la concentración encontrada para cada derivado indólico en estudio, mediante la interpolación a la correspondiente recta de calibrado, y el % de recuperación de cada determinación.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos se han realizado tres determinaciones de cada una de las mezclas ensayadas.

Los resultados obtenidos para las distintas concentraciones ensayadas de cada uno de los derivados indólicos se recogen en las tablas III.21, III.22 y III.23.

TABLA III.21.-Estudio de recuperación en muestras sintéticas de la mezcla binaria AIA/AHIA.

Relación	AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	% Recup	Puesta	Encontr.	% Recup
1:1	4	3.88	97.00	4	4.19	104.75
1:1	30	30.63	102.10	30	28.78	95.93
1:1	50	49.22	98.44	50	48.50	97.00
1:1	100	99.41	99.41	100	101.50	101.50
2:1	50	48.86	97.72	25	24.00	96.00
2:1	100	99.41	99.41	50	51.70	103.40
2:1	200	197.47	98.73	100	99.80	99.80
1:2	25	24.50	98.00	50	51.50	103.00
1:2	50	48.59	97.18	100	99.80	99.80
5:1	50	48.59	97.18	10	9.65	96.50
5:1	100	98.21	98.21	20	19.25	96.25
5:1	200	199.58	99.79	40	41.16	102.90
1:5	10	10.45	104.50	50	51.46	102.92
10:1	100	101.72	101.72	10	10.38	103.80
10:1	200	201.67	100.83	20	20.79	103.95
1:10	10	9.85	98.50	100	99.79	99.79

TABLA III.22.-Estudio de recuperación en muestras sintéticas de la mezcla binaria AIB/AHIA.

Relación	AIB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	% Recup	Puesta	Encontr.	% Recup
1:1	5	5.17	103.40	5	4.87	97.40
1:1	25	25.46	101.84	25	25.26	101.04
1:1	50	50.21	100.42	50	49.33	98.66
1:1	75	73.09	97.45	75	75.18	100.24
2:1	10	9.99	99.90	5	5.07	101.40
2:1	50	49.75	99.50	25	24.59	98.36
1:2	25	24.86	99.44	50	48.48	96.96
1:2	50	49.75	99.50	100	98.85	98.85
1:2	70	69.97	99.96	140	141.70	101.21
5:1	50	46.85	93.70	10	10.34	103.40
1:5	10	9.66	96.60	50	49.69	99.38
1:5	25	24.92	99.68	125	121.63	97.30
1:5	50	49.27	98.54	250	249.28	99.71
1:10	10	9.83	98.30	100	99.63	99.63
1:10	20	20.42	102.10	200	196.97	98.48
1:10	30	30.75	102.50	300	306.09	102.03

TABLA III.23.-Estudio de recuperación en muestras sintéticas de la mezcla binaria AIP/AHIA.

Relación	AIP ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	% Recup	Puesta	Encontr.	% Recup
1:1	25	25.28	101.12	25	25.59	102.36
1:1	50	50.64	101.28	50	50.12	100.24
2:1	50	49.56	99.12	25	24.52	98.08
1:2	25	25.43	101.72	50	49.44	98.88
1:2	50	50.07	100.14	100	101.30	101.30
1:2	75	75.61	100.81	150	145.93	97.29
3:1	75	75.17	100.23	25	25.60	102.40
1:3	25	25.62	102.48	75	74.01	98.68
1:3	50	49.47	98.94	150	148.48	98.98
1:4	25	25.62	102.48	100	97.34	97.34
1:4	50	49.23	98.46	200	201.40	100.70
1:5	25	25.91	103.64	125	123.84	99.07
1:5	50	50.22	100.44	250	245.69	98.27
1:6	25	25.51	102.04	150	147.88	98.59
5:1	50	51.65	103.30	10	10.12	101.20
6:1	60	60.69	101.15	10	10.30	103.00
1:10	25	24.84	99.36	250	250.78	100.31
1:10	10	9.74	97.40	100	99.15	99.15
10:1	10	9.82	98.20	1	0.97	97.00
1:30	10	9.76	97.60	300	301.50	100.50
1:50	1	1.03	103.00	50	48.52	97.04
50:1	50	49.45	98.90	1	1.02	102.00

Para comprobar si el valor de las recuperaciones difiere significativamente del 100%, realizamos un test de la t de student para comparar un valor medio frente a un valor de referencia [65].

Los valores de la recuperación media, su desviación estándar y el estadístico para cada mezcla se muestran en la tabla III.24.

TABLA III.24.-Recuperaciones.

Parámetro	AIA/AHIA		AIB/AHIA		AIP/AHIA	
	AIA	AHIA	AIB	AHIA	AIP	AHIA
R_{media}	100.45	99.29	99.55	99.63	100.54	99.65
s_R	3.235	2.077	2.398	1.826	1.864	1.854
t_{exp}^a	0.556	1.367	0.750	0.810	1.358	0.885
p %	58.60	19.20	46.40	43.00	18.80	38.60

$$^a t_{exp} = (R - R_{media}) \cdot n^{1/2} / s_R$$

Se concluye que la recuperación media no difiere significativamente del 100% con un $p > 5\%$ en todos los casos, por tanto los métodos son aplicables a la determinación de fitohormonas derivadas del indol en mezclas binarias en muestras sintéticas.

VI.2.-RESOLUCIÓN DE MEZCLAS BINARIAS EN MUESTRAS DE AGUAS.

Una vez estudiadas las interferencias y el efecto matriz de las muestras de aguas utilizadas (Agua de Lanjaron, agua potable de Granada y agua del Pozo de Santa Maria) en el capítulo II, pasamos al estudio de la determinación en mezclas binarias de los derivados indólicos en las distintas muestras de agua.

VI.2.1.-Determinación de mezclas binarias de derivados indólicos en Agua de Sierra Nevada (Lanjarón).

Para establecer los calibrados correspondientes se realizó el siguiente procedimiento: en matraces de 10 mL se introdujeron volúmenes crecientes de disolución patrón de los derivados indó-

licos, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ H_2PO_4^- 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, 4 mL de muestra tratada con EDTA, etanol absoluto para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se preparó un blanco que contenía 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ H_2PO_4^- 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, 4 mL de muestra tratada con EDTA, etanol absoluto para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restado el blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se miden a $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 222/341$ nm para AIA, AIB y AIP y 222/359 nm para AHIA.

En la tabla III.25 se indican las señales de fluorescencia derivada medidas cuando se varía la concentración de los derivados indólicos en una concentración de agua de Lanjarón del 50%.

Todos los calibrados presentan un test de linealidad no significativo, con unos valores de P superiores al 5%: 35.07% (AIA), 19.08% (AIB), 60.90% (AIP) y 50.99% (AHIA).

En la tabla III.26 se muestran los parámetros estadísticos y de calidad más representativos.

Tabla III.25.-Rectas de calibrado de los derivados indólicos en Agua de Lanjarón.

Derivado indólico	Concentración $\mu\text{g.L}^{-1}$	$d\text{IFR}/d\lambda$		
AIA	0	0.10	1.08	1.93
	45	37.38	35.75	39.15
	90	77.93	75.34	79.51
	135	114.56	113.01	116.97
AIB	0	0.67	1.58	-0.47
	25	21.10	19.31	23.57
	50	45.28	46.88	43.15
	75	70.01	72.61	69.24
	100	94.19	96.25	91.98
AIP	0	0.76	0.15	0.36
	20	7.08	6.20	6.98
	40	12.30	12.95	13.45
	60	20.35	19.21	19.89
	80	26.03	25.75	25.50
	100	31.90	31.60	32.50
AHIA	0	-0.15	0.10	0.85
	75	28.55	26.34	24.42
	150	53.94	49.57	51.27
	225	83.75	77.25	80.34
	300	105.83	107.56	109.64

Tabla III.26.-Parámetros estadísticos y de calidad.

Derivado indólico	Parámetro	Agua de Lanjarón
AIA	Estadístico	
	$S_{R,c}$	1.776
	a	0.49
	b	0.85
	R^2	99.86
	Calidad	
	Lineal. (%)	98.80
	Sens. (ppb)	2.09
	LD (ppb)	4.72
	DSR (90 ppb) %	1.52
AIB	Estadístico	
	$S_{R,c}$	2.018
	a	-0.92
	b	0.94
	R^2	99.69
	Calidad	
	Lineal. (%)	98.44
	Sens. (ppb)	2.13
	LD (ppb)	4.64
	DSR (50 ppb)	2.77

TABLA III.26.-Continuación.

Derivado indólico	Parámetro	Agua de Lanjarón
AIP	Estadístico	
	$S_{R.c}$	0.442
	a	0.43
	b	0.32
	R^2	99.85
	Calidad	
	Lineal. (%)	99.04
	Sens. (ppb)	1.40
AHIA	Estadístico	
	$S_{R.c}$	2.128
	a	-0.48
	b	0.36
	R^2	99.73
	Calidad	
	Lineal. (%)	98.55
	Sens. (ppb)	5.94
LD (ppb)	12.96	
DSR (60 ppb)%	1.43	
	DSR (150 ppb)	2.59

ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto, realizamos análisis sobre varias muestras distintas de agua de Lanjarón tratada con EDTA y dopadas con mezclas de derivados indólicos de concentración conocida.

Procedimiento: en un matraz aforado de 10 mL se introdujo el volumen necesario de disolución etanólica de cada uno de los derivados indólicos para que la concentración final de los mismos sea la requerida según la relación en peso estimada. A continuación, se completa con 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ $H_2PO_4^-$ 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, 4 mL de muestra tratada con EDTA, etanol absoluto y agua bidestilada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restado el blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia derivada se miden a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/341$ nm para AIA, AIB y AIP y 222/359 nm para AHIA.

A partir de estas medidas calculamos la concentración encontrada para cada derivado indólico en estudio, mediante la interpolación a la correspondiente recta de calibrado y estimamos el porcentaje de recuperación de cada determinación.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos se han realizado tres determinaciones de cada una de las mezclas ensayadas.

Los resultados obtenidos para las distintas concentraciones ensayadas de cada uno de los derivados indólicos se recogen en las tablas III.27, III.28 y III.29.

TABLA III.27.-Estudio de recuperación en Agua de Lanjarón de la mezcla binaria AIA/AHIA.

Relación	AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	%	Puesta	Encontr.	%
1:1	50	49.12	98.24	50	50.74	101.48
1:1	100	99.48	99.48	100	100.02	100.02
1:2	50	50.22	100.44	100	97.52	97.52
2:1	100	99.48	99.48	50	50.74	101.48
2:1	150	144.67	96.45	75	77.13	102.84
1:5	25	25.30	101.20	125	120.89	96.71
5:1	200	195.91	97.95	40	39.06	97.65
5:1	100	101.48	101.48	20	20.29	101.45
1:10	10	9.64	96.40	100	97.88	97.88
10:1	200	204.67	102.33	20	20.29	101.45

TABLA III.28.-Estudio de recuperación en Agua de Lanjarón de la mezcla binaria AIB/AHIA.

Relación	AIB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	% Error	Puesta	Encontr.	% Error
1:1	50	50.44	100.88	50	50.04	100.08
1:1	100	101.56	101.56	100	101.19	101.19
2:1	100	99.23	99.23	50	50.04	100.08
1:2	75	76.00	101.33	150	149.91	99.94
1:2	25	24.89	99.56	50	50.04	100.08
5:1	100	100.39	100.39	20	20.82	104.10
1:5	40	41.15	102.87	200	201.05	100.53
10:1	100	99.23	99.23	10	9.60	96.00
1:10	25	26.05	104.20	250	249.77	99.91

TABLA III.29.-Estudio de recuperación en Agua de Lanjarón de la mezcla binaria AIP/AHIA.

Relación	AIP ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	% Error	Puesta	Encontr.	% Error
1:1	25	25.28	101.12	25	25.59	102.36
1:1	100	99.64	99.64	100	99.12	99.12
2:1	50	49.56	99.12	25	24.52	98.08
1:2	50	50.43	100.86	100	99.44	99.44
1:2	100	101.07	101.07	200	197.03	98.52
1:5	20	20.61	103.05	100	100.93	100.93
5:1	100	99.17	99.17	20	20.10	100.50
1:10	25	25.62	102.48	250	254.01	101.60
1:10	20	19.47	97.35	200	198.48	99.24
10:1	100	99.62	99.62	10	9.74	97.40

Para comprobar la exactitud de los métodos, realizamos un test de la t de student para comparar un valor medio frente a un valor de referencia comparando la recuperación media de cada derivado indólico frente al 100%

Los valores de la recuperación media, su desviación estándar y el estadístico para cada mezcla se muestran en la tabla III.30.

TABLA III.30.-Recuperaciones.

Parámetro	AIA/AHIA		AIB/AHIA		AIP/AHIA	
	AIA	AHIA	AIB	AHIA	AIP	AHIA
R_{media}	99.85	99.34	101.03	100.21	100.35	99.72
s_R	2.196	2.065	1.691	2.065	1.704	1.590
t_{exp}^*	0.216	1.011	1.827	0.305	0.649	0.556
p %	83.40	33.90	10.50	76.80	53.30	59.20

$$* t_{exp} = (R - R_{media}) \cdot n^{1/2} / s_R$$

De la tabla III.30 obtenemos que la recuperación media no difiere significativamente del 100% con un $p > 5\%$ en todos los casos, por tanto los métodos son exactos y por lo tanto aplicables a la determinación de fitohormonas derivadas del indol en mezclas binarias en agua de Lanjarón.

VI.2.2.-Determinación de mezclas binarias de derivados indólicos en Agua potable de Granada.

Se establecen los calibrados correspondientes siguiendo el procedimiento operatorio: en matraces de 10 mL se introdujeron volúmenes crecientes de disolución patrón de los derivados indólicos, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ $H_2PO_4^{-1}$ 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, 4 mL de muestra tratada con EDTA y SO_3^{2-} , etanol absoluto y agua bidestilada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se preparó un blanco con las mismas condiciones sin derivado indólico.

Se registrarán los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_x 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restado el blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad

de fluorescencia derivada se miden a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/341$ nm para AIA, AIB y AIP y 222/359 nm para AHIA.

En la tabla III.31 se indican las señales de fluorescencia derivada medidas cuando se varía la concentración de los derivados indólicos en una concentración de agua potable de Granada del 50%.

Todos los calibrados presentan un test de linalidad no significativo, con unos valores de P superiores al 5%: 28.96% (AIA), 21.13% (AIB), 58.89% (AIP) y 38.89% (AHIA).

En la tabla III.32 se muestran los parámetros estadísticos y de calidad más representativos.

Tabla III.31.-Rectas de calibrado de los derivados indólicos en Agua potable de Granada.

Derivado indólico	Concentración $\mu\text{g.L}^{-1}$	dIFR/d λ		
AIA	0	-0.15	0.95	1.21
	45	35.47	33.21	36.99
	90	73.94	71.67	75.49
	135	109.61	107.54	110.87
AIB	0	0.64	1.85	-0.42
	25	18.96	20.51	16.24
	50	37.28	34.97	39.06
	75	52.46	50.11	54.36
	100	73.91	71.64	75.77
AIP	0	0.30	0.80	0.11
	20	9.11	8.05	7.93
	40	14.54	13.61	15.42
	60	22.30	21.31	20.23
	80	28.91	27.80	26.68
	100	35.66	33.49	34.58
AHIA	0	-0.73	-0.40	0.15
	75	14.33	17.57	19.13
	150	25.24	31.49	28.64
	225	47.15	41.34	44.28
	300	60.05	59.91	57.42

Tabla III.32.-Parámetros estadísticos y de calidad.

Derivado indólico	Parámetro	Agua potable
AIA	Estadístico	
	$S_{R,c}$	1.704
	a	0.06
	b	0.81
	R^2	99.85
	Calidad	
	Lineal. (%)	98.79
	Sens. (ppb)	2.10
	LD (ppb)	4.74
	DSR (90 ppb)%	1.53
AIB	Estadístico	
	$S_{R,c}$	2.120
	a	0.51
	b	0.72
	R^2	99.40
	Calidad	
	Lineal. (%)	97.85
	Sens. (ppb)	2.95
	LD (ppb)	6.45
	DSR (50 ppb)	3.66
AIP	Estadístico	
	$S_{R,c}$	0.869
	a	0.97
	b	0.34
	R^2	99.50
	Calidad	
	Lineal. (%)	98.22
	Sens. (ppb)	2.56
	LD (ppb)	5.56
	DSR (60 ppb)%	2.69
AHIA	Estadístico	
	$S_{R,c}$	2.337
	a	0.47
	b	0.19
	R^2	98.90
	Calidad	
	Lineal. (%)	97.08
	Sens. (ppb)	11.99
LD (ppb)	26.46	
DSR (150 ppb)	5.28	

ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto, realizamos análisis sobre varias muestras distintas de agua potable tratada con EDTA y SO_3^{2-} y dopadas con mezclas de derivados indólicos de concentración conocida.

Procedimiento: en un matraz aforado de 10 mL se añadió el volumen necesario de disolución etanólica de cada uno de los derivados indólicos para que la concentración final de los mismos sea la requerida según la relación en peso estimada. A continuación, se completa con 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ H_2PO_4^- 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, 4 mL de muestra tratada con EDTA y SO_3^{2-} , etanol absoluto y agua bidestilada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución etanol-agua al 50%.

Se registrarón los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restado el blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se miden a $\lambda_{\text{ex}} / \lambda_{\text{em}} = 222/341$ nm para AIA, AIB y AIP y 222/359 nm para AHIA. A partir de estas medidas calculamos la concentración encontrada para cada derivado indólico en estudio, mediante la interpolación a la correspondiente recta de calibrado y el porcentaje de recuperación de cada determinación.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos se han realizado tres determinaciones de cada una de las mezclas ensayadas.

Los resultados obtenidos para las distintas concentraciones ensayadas de cada uno de los derivados indólicos se recogen en las tablas III.33, III.34 y III.35.

TABLA III.33.-Estudio de recuperación en agua potable de la mezcla binaria AIA/AHIA.

Relación	AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	%	Puesta	Encontr.	%
1:1	100	101.53	101.53	100	99.74	99.74
1:1	50	51.33	102.66	50	50.04	100.08
1:2	60	58.23	97.05	120	118.91	99.09
2:1	60	61.68	102.80	30	29.53	98.43
2:1	180	178.73	99.29	90	89.62	99.58
1:5	20	19.78	98.90	100	98.91	98.91
5:1	250	257.93	103.17	50	50.04	100.08
5:1	100	100.98	100.98	20	19.28	96.40
1:10	10	10.03	100.30	100	101.32	101.32
10:1	300	294.30	98.10	30	29.26	97.53

TABLA III.34.-Estudio de recuperación en Agua potable de la mezcla binaria AIB/AHIA.

Relación	AIB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	% Error	Puesta	Encontr.	% Error
1:1	50	50.92	101.84	50	49.09	98.18
1:1	100	98.79	98.79	100	102.60	102.60
2:1	100	99.61	99.61	50	49.09	98.18
1:2	75	75.67	100.89	150	151.50	101.00
1:2	25	25.32	101.28	50	51.44	102.88
5:1	100	99.61	99.61	20	20.22	101.10
1:5	40	39.36	98.40	200	198.05	99.02
10:1	100	98.79	98.79	10	9.88	98.80
1:10	25	25.32	101.28	250	246.91	98.76

TABLA III.35.-Estudio de recuperación en Agua potable de la mezcla binaria AIP/AHIA.

Relación	AIP ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	% Error	Puesta	Encontr.	% Error
1:1	25	25.35	101.40	25	24.69	98.76
1:1	100	101.04	101.04	100	99.33	99.33
2:1	50	49.12	98.24	25	25.22	100.88
1:2	50	51.03	102.06	100	101.20	101.20
1:2	100	100.97	100.97	200	198.64	99.32
1:5	20	19.53	97.65	100	99.93	99.93
5:1	100	99.51	99.51	20	19.95	99.75
1:10	25	24.75	99.00	250	251.82	100.73
1:10	20	20.41	102.05	200	201.38	100.69
10:1	100	98.95	98.95	10	10.31	103.10

Realizamos un test de la t de student para comparar un valor medio frente a un valor de referencia comparando la recuperación media de cada derivado indólico frente al 100% para comprobar la exactitud de los métodos.

Los valores de la recuperación media, su desviación estándar y el estadístico para cada mezcla se muestran en la tabla III.36.

TABLA III.36.-Recuperaciones.

Parámetro	AIA/AHIA		AIB/AHIA		AIP/AHIA	
	AIA	AHIA	AIB	AHIA	AIP	AHIA
R_{media}	99.12	100.45	100.16	100.06	100.09	100.37
s_R	1.403	2.111	1.439	1.864	1.609	1.247
t_{exp}^a	1.982	0.715	0.333	0.096	0.171	0.938
p %	7.00	49.20	74.60	92.40	86.80	37.20

$$^a t_{exp} = (R - R_{media}) \cdot n^{1/2} / s_R$$

De la tabla III.36 obtenemos que la recuperación media no difiere significativamente del 100% con un $p > 5\%$ en todos los casos, los métodos son exactos y por lo tanto aplicables a la determinación de fitohormonas derivadas del indol en mezclas binarias en agua potable de Granada.

VI.2.3.-Determinación de mezclas binarias de derivados indólicos en Agua de pozo de Santa María.

Se establecieron los calibrados correspondientes con el siguiente procedimiento: en matraces de 10 mL se introdujeron volúmenes crecientes de disolución patrón de los derivados indólicos, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ $H_2PO_4^-$ 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, 4 mL de muestra, etanol absoluto y agua bidestilada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se preparó un blanco con las mismas condiciones.

Se registrarón los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restado el blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se miden a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/341$ nm para AIA, AIB y AIP y 222/359 nm para AHIA.

En la tabla III.37 se indican las señales de fluorescencia derivada medidas cuando se varía la concentración de los derivados indólicos en una concentración de agua de pozo 50%.

Todos los calibrados presentan un test de linealidad no significativo, con unos valores de P superiores al 5%: 69.44% (AIA), 52.15% (AIB), 83.89% (AIP) y 94.90% (AHIA).

En la tabla III.38 se muestran los parámetros estadísticos y de calidad más representativos.

Tabla III.37.-Rectas de calibrado de los derivados indólicos en Agua de pozo de Santa María.

Derivado indólico	Concentración $\mu\text{g.L}^{-1}$	dIFR/d λ		
AIA	0	1.79	0.15	2.19
	40	15.22	12.89	17.15
	80	25.85	27.45	23.51
	120	37.88	35.26	39.17
	160	49.91	46.97	51.65
AIB	0	1.26	-0.31	0.87
	25	10.75	12.34	8.94
	50	18.35	16.21	21.04
	75	29.27	26.87	31.11
	100	36.38	34.13	37.79
AIP	0	-0.40	-0.24	0.80
	20	5.15	4.33	6.22
	40	10.65	12.55	11.45
	60	18.45	17.38	16.55
	80	24.87	23.75	22.58
	100	28.87	29.78	30.90
AHIA	0	-2.60	-1.84	-3.34
	75	6.84	7.62	5.98
	150	15.03	15.94	16.78
	225	25.74	24.83	26.41
	300	34.84	33.90	35.65

Tabla III.38.-Parámetros estadísticos y de calidad.

Derivado indólico	Parámetro	Agua de pozo	
AIA	Estadístico		
	$S_{R,c}$	1.842	
	a	2.08	
	b	0.30	
	R^2	98.97	
	Calidad		
	Lineal. (%)	97.16	
	Sens. (ppb)	6.21	
AIB	Estadístico		
		$S_{R,c}$	1.819
		a	1.12
		b	0.36
	R^2	98.24	
	Calidad		
	Lineal. (%)	96.28	
	Sens. (ppb)	5.09	
AIP	Estadístico		
		$S_{R,c}$	0.875
		a	-0.38
		b	0.30
	R^2	99.36	
	Calidad		
	Lineal. (%)	97.99	
	Sens. (ppb)	2.91	
AHIA	Estadístico		
		$S_{R,c}$	0.735
		a	-2.61
		b	0.12
	R^2	99.73	
	Calidad		
	Lineal. (%)	98.57	
	Sens. (ppb)	5.89	

ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN.

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto, realizamos análisis sobre varias muestras distintas de agua de pozo y dopadas con mezclas de derivados indólicos de concentración conocida.

Procedimiento: en un matraz aforado de 10 mL se añadió el volumen necesario de disolución etanólica de cada uno de los derivados indólicos para que la concentración final de los mismos sea la requerida según la relación en peso estimada. A continuación, se completa con 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ H_2PO_4^- 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, 4 mL de muestra, etanol absoluto y agua bidestilada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión con rendijas de excitación y emisión de 5 nm, λ_{ex} 222 nm y a 20.0 ± 0.5 °C.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restado el blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia derivada se miden a $\lambda_{ex} / \lambda_{em} = 222/341$ nm para AIA, AIB y AIP y 222/359 nm para AHIA. A partir de estas medidas calculamos la concentración encontrada para cada derivado indólico en estudio, mediante la interpolación a la correspondiente recta de calibrado y el porcentaje de recuperación de cada determinación.

Con el fin de comprobar los resultados obtenidos se han realizado tres determinaciones de cada una de las mezclas ensayadas.

Los resultados obtenidos para las distintas concentraciones ensayadas de cada uno de los derivados indólicos se recogen en las tablas III.39, III.40 y III.41.

TABLA III.39.-Estudio de recuperación en agua de pozo de la mezcla binaria AIA/AHIA.

Relación	AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	%	Puesta	Encontr.	%
1:1	50	51.31	102.62	50	49.53	99.06
1:1	100	99.62	99.62	100	98.90	98.90
1:2	50	51.31	102.62	100	99.73	99.73
2:1	120	120.85	100.71	60	58.73	97.88
1:5	20	20.85	104.25	100	99.73	99.73
5:1	50	51.31	102.62	10	10.23	102.33
5:1	100	101.54	101.54	20	20.27	101.35
1:10	10	9.77	97.70	100	103.93	103.97
10:1	200	194.23	97.11	20	20.27	101.35

TABLA III.40.-Estudio de recuperación en Agua de pozo de la mezcla binaria AIB/AHIA.

Relación	AIB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	% Error	Puesta	Encontr.	% Error
1:1	50	50.67	101.34	50	49.66	99.32
1:1	100	99.57	99.57	100	99.18	99.18
2:1	100	99.57	99.57	50	49.66	99.32
1:2	75	74.64	99.52	150	148.70	99.13
1:2	25	25.04	100.16	50	51.79	103.58
5:1	100	99.57	99.57	20	19.56	97.80
1:5	40	41.06	102.65	200	198.22	99.11
10:1	100	99.57	99.57	10	9.81	98.10
1:10	25	25.04	100.16	250	247.74	99.10

TABLA III.41.-Estudio de recuperación en Agua de pozo de la mezcla binaria AIP/AHIA.

Relación	AIP ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			AHIA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
	Puesta	Encontr.	% Error	Puesta	Encontr.	% Error
1:1	25	25.12	100.48	25	24.89	99.56
1:1	100	99.34	99.34	100	101.14	101.14
2:1	50	51.02	102.04	25	25.31	101.24
1:2	50	49.85	99.70	100	99.82	99.82
1:2	100	100.31	100.31	200	199.11	99.55
1:5	20	19.71	98.55	100	98.96	98.96
5:1	100	99.91	99.91	20	20.10	100.50
1:10	25	25.12	100.48	250	249.45	99.78
1:10	20	19.89	99.45	200	200.94	100.47
10:1	100	99.75	99.75	10	10.10	101.00

Para comprobar la exactitud de los métodos realizamos un test de la t de student para comparar un valor medio frente a un valor de referencia comparando la recuperación media de cada derivado indólico frente al 100%.

Los valores de la recuperación media, su desviación estándar y el estadístico para cada mezcla se muestran en la tabla III.42.

TABLA III.42.-Recuperaciones.

Parámetro	AIA/AHIA		AIB/AHIA		AIP/AHIA	
	AIA	AHIA	AIB	AHIA	AIP	AHIA
R_{media}	100.47	100.97	100.23	99.40	100.01	100.20
s_R	1.917	2.417	1.081	1.659	0.926	0.779
t_{exp}^a	0.735	1.204	0.638	1.085	0.003	0.819
p %	48.40	26.30	54.00	31.00	99.00	43.40

$$^a t_{exp} = (R - R_{media}) \cdot n^{1/2} / s_R$$

De la tabla III.42 obtenemos que la recuperación media no difiere significativamente del 100% con un $p > 5\%$ en todos los casos, los métodos son exactos y por lo tanto aplicables a la determinación de fitohormonas derivadas del indol en mezclas binarias en agua de pozo.

CAPÍTULO IV
DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE ACIDO
INDOL-3-BUTIRICO Y ACIDO 1-NAFTILACETICO.

En este capítulo nos planteamos la resolución de la mezcla binaria constituida por el ácido indol-3-butírico y el ácido 1-naftilacético, seleccionadas por estar presentes en diferentes formulaciones comerciales. Ambas fitohormonas presentan características fluorescentes muy parecidas por lo que cuando se encuentran en la misma disolución, el gran solapamiento espectral producido es causa de la mutua interferencia en los respectivos métodos individuales de determinación por espectrofluorimetría clásica, por esta razón su determinación conjunta mediante el mismo procedimiento no es posible debido al gran solapamiento de sus espectros convencionales de fluorescencia. Dado que su determinación simultánea es de interés analítico, se pensó utilizar la fluorescencia derivada como técnica apropiada ya que, ésta, además de la sensibilidad inherente a la fluorescencia en general, presenta generalmente la selectividad suficiente para resolver mezclas de compuestos cuyos espectros de fluorescencia convencionales están muy solapados.

A continuación se resumen los resultados obtenidos en las experiencias realizadas.

I.-CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES.

Como en el capítulo III es necesario, en primer lugar, conocer de forma exhaustiva el comportamiento fluorescente de cada uno de los sistemas por separado así como el de su mezcla. Para ello obtenemos los espectros de luminiscencia total.

I.1.-ESPECTROS DE LUMINISCENCIA TOTAL.

Para la obtención de los espectros de luminiscencia total de los sistemas ANA, AIB y su mezcla en disolución etanólica al 50%, se prepararon tres disoluciones en matraces aforados de 10 mL, conteniendo el primero de ellos una disolución de ANA de concentración $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ preparada a partir de 0.25 mL de disolución patrón de 1 mg.L^{-1} , la proporción adecuada de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una concentración del 50% de etanol-agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua. En el segundo una disolución de AIB de concentración $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ preparada a partir de 0.25 mL de disolución patrón de 1 mg.L^{-1} , la proporción adecuada de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una concentración del 50% de etanol-agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua y en el tercero se añaden ambas fitohormonas en los volúmenes ya indicados con lo cual la disolución final de la mezcla contiene cada uno de los analitos en la misma concentración en que se encuentran en las disoluciones individuales.

A continuación se procede al registro de los espectros en las condiciones siguientes:

- Intervalo de longitudes de onda de excitación 200 a 280 nm.
- Intervalo de longitudes de onda de emisión 290 a 400 nm.
- Variación de longitud de onda de 2 en 2 nm para cada barrido de emisión.
- Rendija de excitación 5 nm y rendija de emisión 4 nm.
- Velocidad de barrido es de 240 nm.min^{-1} .
- Número de barridos: 40.

Con objeto de hacer desaparecer la línea Rayleigh de la representación y obtener el espectro de luminiscencia neto del sistema, se resta el espectro del blanco. Los tridimensionales resultantes se presentan en las figuras IV.1, IV.2 y IV.3.

FIGURA IV.1.-Tridimensional del ANA.

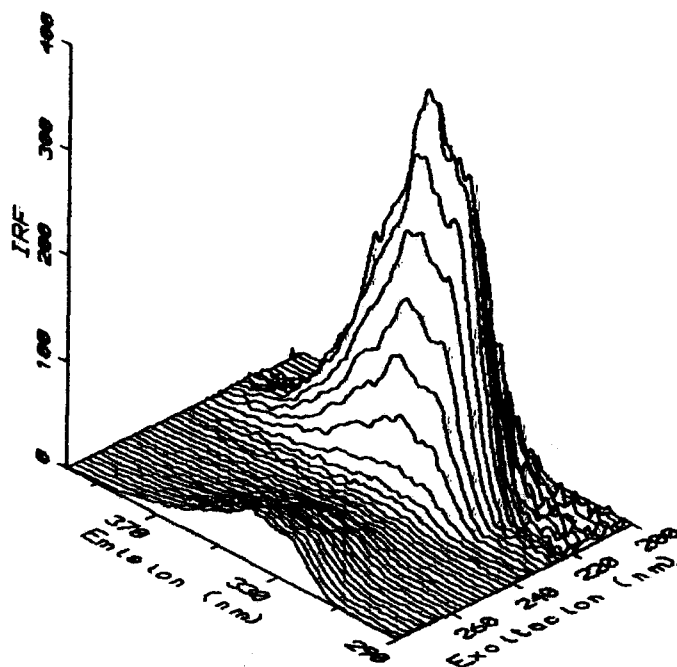


FIGURA IV.2.-Tridimensional del AIB.

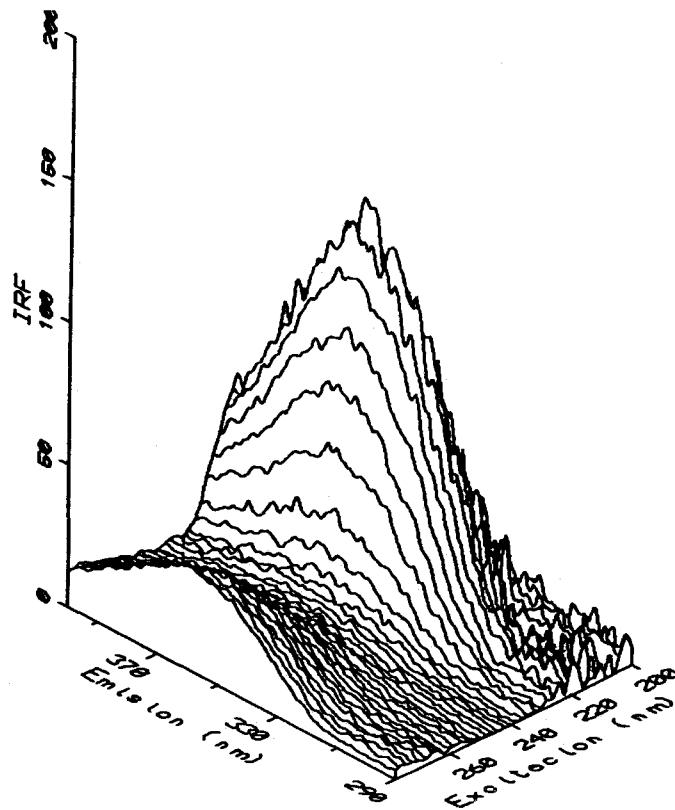
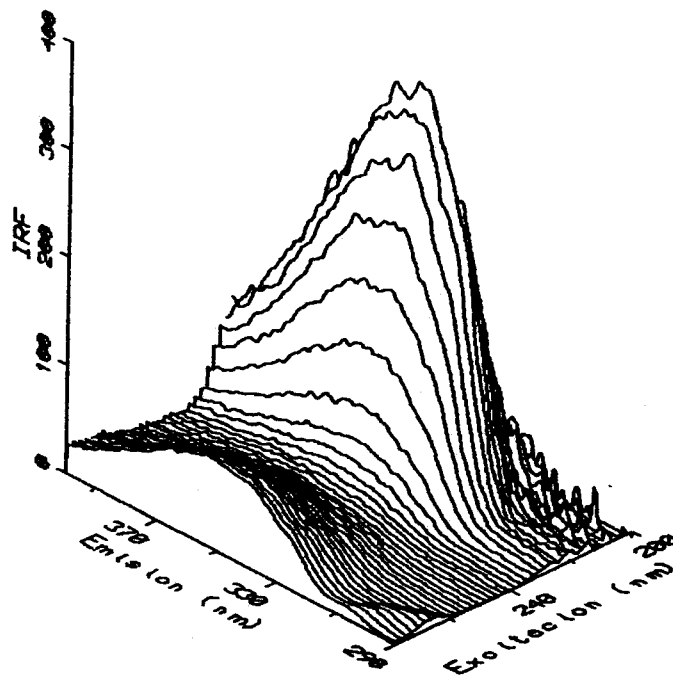


FIGURA IV.3.-Tridimensional de la mezcla ANA/AIB.



I.2.-MAPAS DE CONTORNO (TOPOGRAMAS).

La representación de los espectros tridimensionales en forma de curvas de nivel es la que nos ofrece mayor información, a continuación se presentan los mapas de contorno de cada uno de los analitos individuales y de su mezcla.

FIGURA IV.4.-Mapa de contorno del ANA.

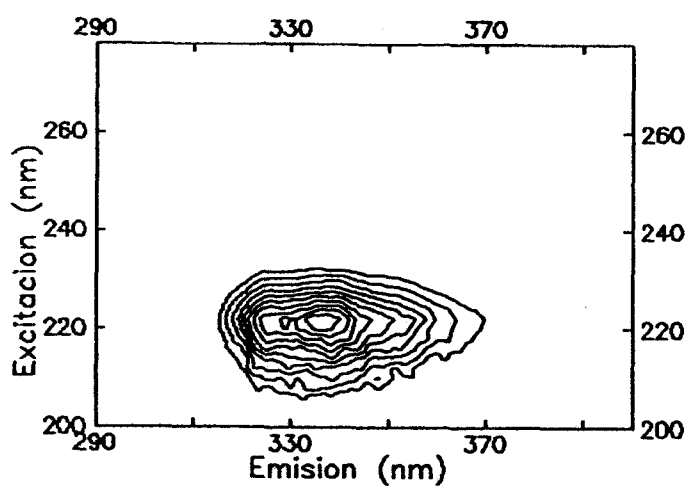


FIGURA IV.5.-Mapa de contorno del AIB.

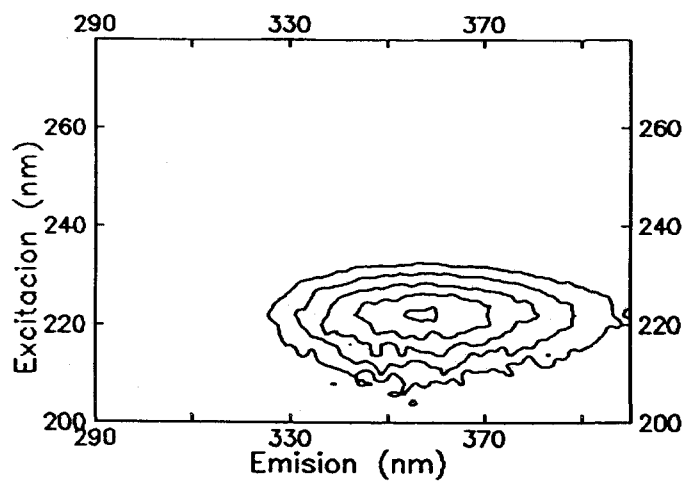
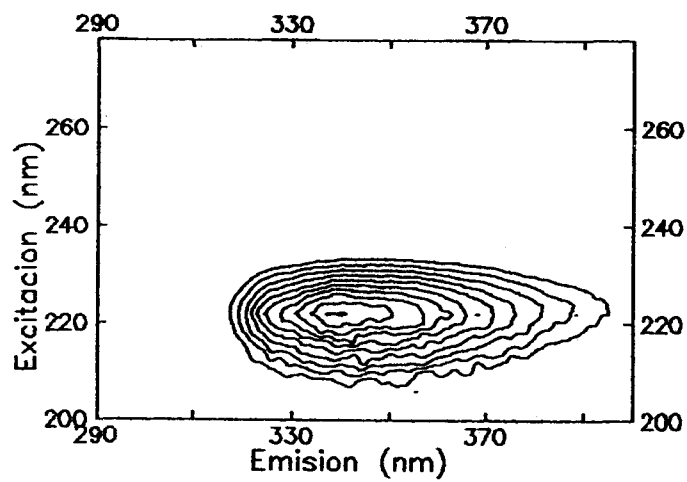


FIGURA IV.6.-Mapa de contorno de la mezcla ANA/AIB.

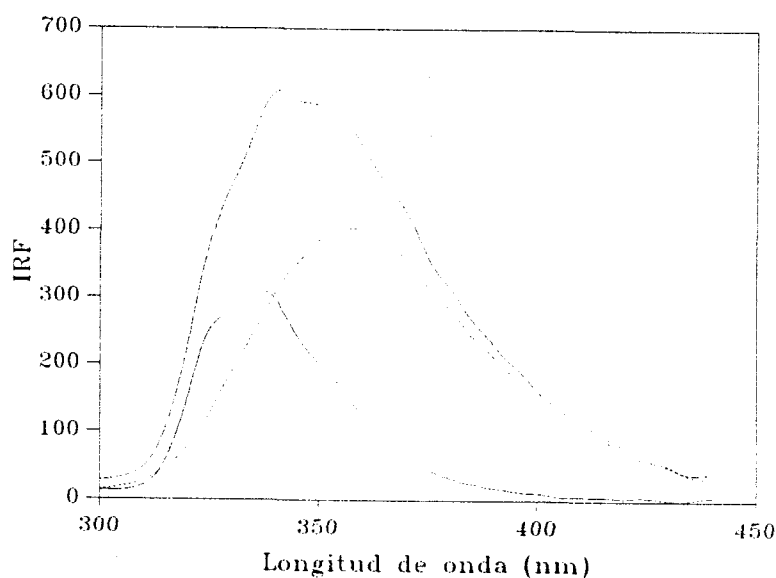


Vemos como en el topograma correspondiente a la mezcla de ambos analitos, las posiciones de los máximos de excitación y emisión de las dos fitohormonas coinciden con las que ocupaban en sus topogramas individuales; lo cual nos indica que no se da ningún tipo de interacción entre ellos.

I.3.-REPRESENTACIONES BIDIMENSIONALES.

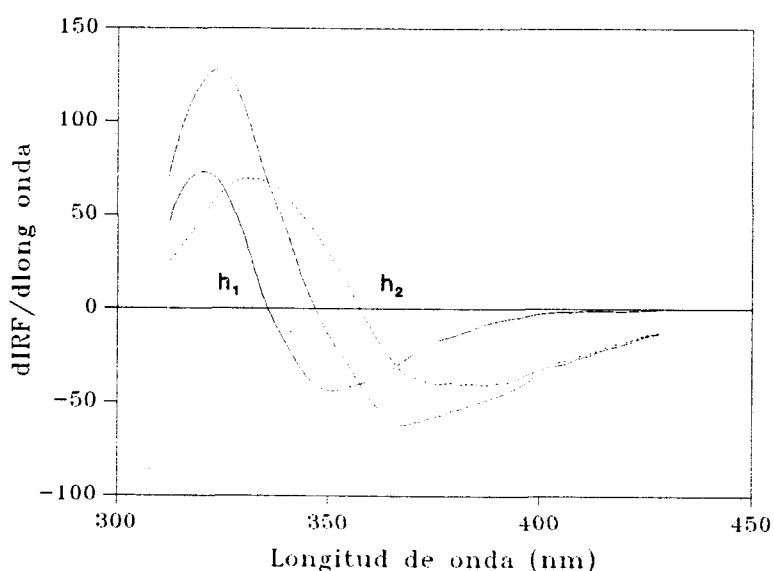
En la figura IV.7 se representan los espectros de emisión de ANA, AIB y de la mezcla de ambos. Estos espectros corresponden a las mismas muestras preparadas para registrar los espectros de luminiscencia total.

FIGURA IV.7.-Espectros de emisión de ANA (—), AIB (···) y de la mezcla (---).



Debido al considerable solapamiento de los espectros de emisión, como podemos observar en la figura IV.7 se resuelve la mezcla mediante la técnica de derivada, utilizando como técnica de medida el "zero crossing" como se explicó en el capítulo III. En la figura IV.8 se representa la primera derivada de la mezcla en estudio.

FIGURA IV.8.-Primera derivada de los espectros de emisión de ANA (—), AIB (···) y de la mezcla (---).



De la figura IV.8 obtenemos que la longitud de onda analítica de excitación para ambos analitos es 222 nm y las longitudes de onda analíticas de emisión son 336 y 358 nm para el AIB y el ANA respectivamente.

II.-PARÁMETROS INSTRUMENTALES.

II.1.-Elección del factor de filtrado en la obtención de los espectros derivados.

Como se vio en el capítulo III elegimos un factor de filtrado de 19 puntos para la obtención de la primera derivada minimi-

zando así la pérdida de sensibilidad que conllevaría el uso de un mayor número de puntos.

III.-OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.

III.1.-INFLUENCIA DEL pH DEL MEDIO.

Para estudiar la posible influencia que pueda ejercer la acidez del medio sobre la intensidad de fluorescencia de la mezcla binaria ANA/AIB en disolución al 50% etanol/agua se realizó la siguiente experiencia:

Se preparó en un matraz aforado de 100 mL una disolución de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ al 50% etanol/agua de AIB a partir de 5 ml de la disolución etanólica de 1 mg.L^{-1} correspondiente. En un segundo matraz aforado de 100 mL se preparó una disolución de 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ al 50% etanol/agua de ANA a partir de 2.5 mL de la disolución etanólica de 1 mg.L^{-1} correspondiente. Dichas disoluciones se transfirieron a sendos vasos de precipitado de 200 mL y mediante ácido clorhídrico e hidróxido sódico de diferentes concentraciones, se ajustó el pH al valor deseado en cada caso. Se registraron los espectros de emisión con las siguientes condiciones operatorias: rendija de excitación 5 nm, rendija de emisión 4 nm y longitud de onda de excitación 222 nm.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se efectuaron a las longitudes de onda de emisión de 336 y 358 nm para el AIB y ANA respectivamente.

La experiencia se repitió sucesivamente para cada valor del pH seleccionado en el intervalo comprendido entre pH=1.0 y 14.0.

Los resultados obtenidos los resumimos en las tablas IV.1, IV.2 y en la figura IV.9.

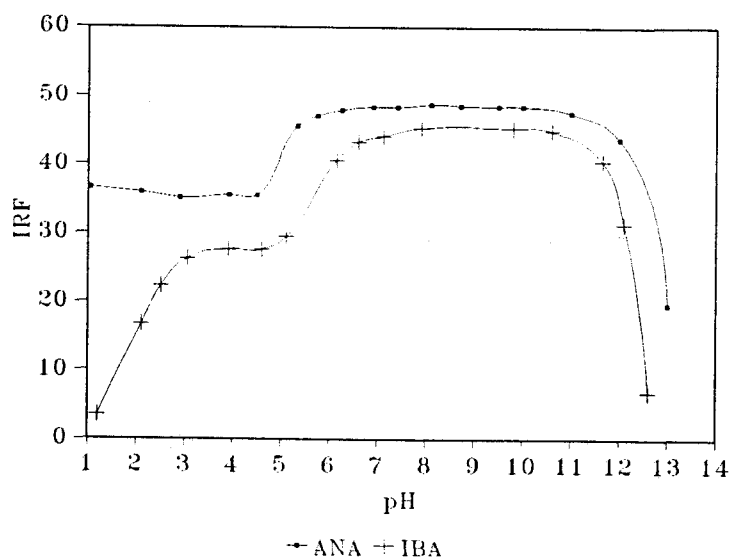
TABLA IV.1.-Influencia del pH del medio sobre el ANA.

pH	dIFR/dλ	pH	dIFR/dλ
1.05	36.52	7.41	48.40
2.10	35.82	8.10	48.73
2.90	35.02	8.72	48.60
3.92	35.39	9.50	48.51
4.50	35.38	10.00	48.47
5.33	45.60	11.00	47.50
5.75	47.07	12.00	43.71
6.25	47.93	13.00	19.52
6.90	48.40		

TABLA IV.2.-Influencia del pH del medio sobre el AIB.

pH	dIFR/dλ	pH	dIFR/dλ
1.20	3.41	6.60	43.20
2.11	16.68	7.12	44.10
2.51	22.25	7.90	45.24
3.05	26.23	9.80	45.24
3.91	27.55	10.60	44.95
4.60	27.55	11.65	40.39
5.10	29.41	12.10	31.26
6.15	40.55	12.60	6.73

FIGURA IV.9.-Influencia del pH sobre la intensidad relativa de fluorescencia derivada d ANA y AIB.



Como podemos observar en la figura IV.9, la señal es máxima para el intervalo de pH comprendido entre 6.5 y 10.5 para el AIB y 6.0 y 11.0 para el ANA. Ante la conveniencia de tamponar se ha elegido la disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua por originar espectros idénticos a los obtenidos con NaOH y HCL a pH similares. Se ha comprobado así mismo que para fijar el pH del sistema basta con añadir 2 mL de dicha disolución. El empleo de volúmenes superiores no modificó el morfología del sistema.

III.2.-ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD.

Para estudiar la estabilidad de la mezcla binaria ANA/AIB en estudio en disolución al 50% etanólica se preparó una disolución que contenía $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de AIB y $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA, para lo cual se introdujo en un matraz de 10 mL 0.5 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de AIB, 0.25 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de ANA, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, etanol absoluto y agua desionizada en proporciones adecuadas para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con una disolución al 50% etanol-agua.

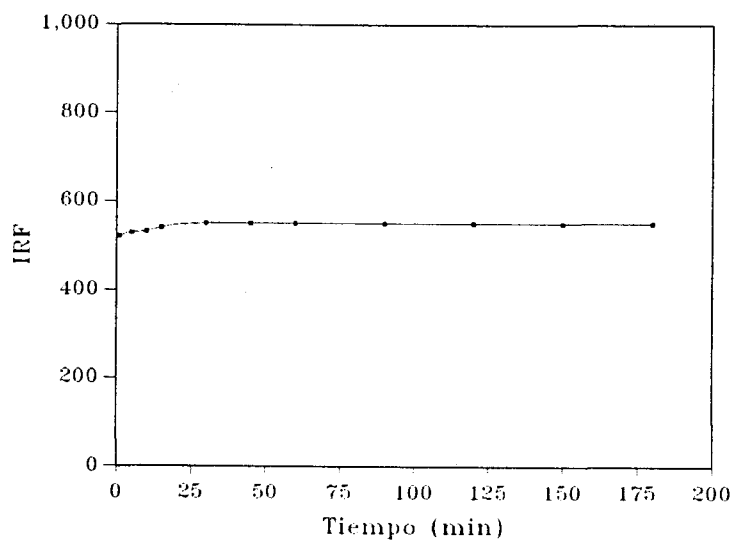
Se registrarón los espectros de emisión periódicamente con las siguientes condiciones operatorias: rendija de excitación 5 nm, rendija de emisión 4 nm y longitud de onda de excitación 222 nm.

Se midió la intensidad relativa de fluorescencia a la longitud de onda de emisión de 350 nm. Los resultados obtenidos los resumimos en la tabla IV.3 y en la figura IV.10.

TABLA IV.3.-Estabilidad de la mezcla ANA/AIB.

Tiempo (min)	IRF
1	522.1
5	528.5
10	541.6
15	551.1
30	550.6
45	550.6
60	551.0
90	550.9
120	551.2
150	550.3
180	551.1

FIGURA IV.10.-Estabilidad de la mezcla ANA/AIB.



De la tabla IV.3 y figura IV.10 obtenemos que la mezcla es estable a partir de los diez minutos de su preparación y hasta al menos tres horas.

III.3.-INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA.

Se ha realizado el estudio de la influencia que la fuerza iónica del medio ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del sistema empleando NaCl y NaClO₃.

Para ello se prepararon dos series de matraces aforados de 10 mL para la mezcla binaria conteniendo $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de AIB y $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA, para lo cual se introdujeron en cada uno de ellos 0,5 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de AIB, 0.25 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de ANA, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, cantidades crecientes de NaCl 5 M ó NaClO_4 5 M, etanol absoluto y agua desionizada en proporciones adecuadas para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión con las siguientes condiciones operatorias: rendija de excitación 5 nm, rendija de emisión 4 nm y longitud de onda de excitación 222 nm.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se han efectuado a las longitudes de onda de emisión de 336 y 358 nm para el AIB y ANA respectivamente.

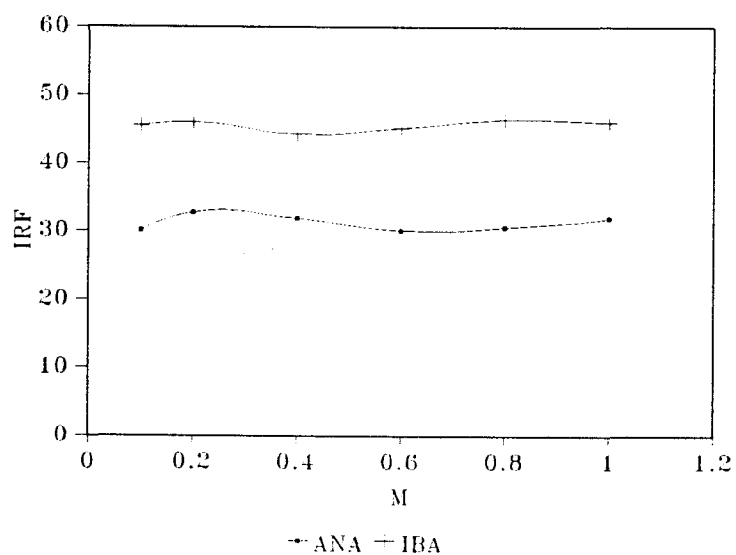
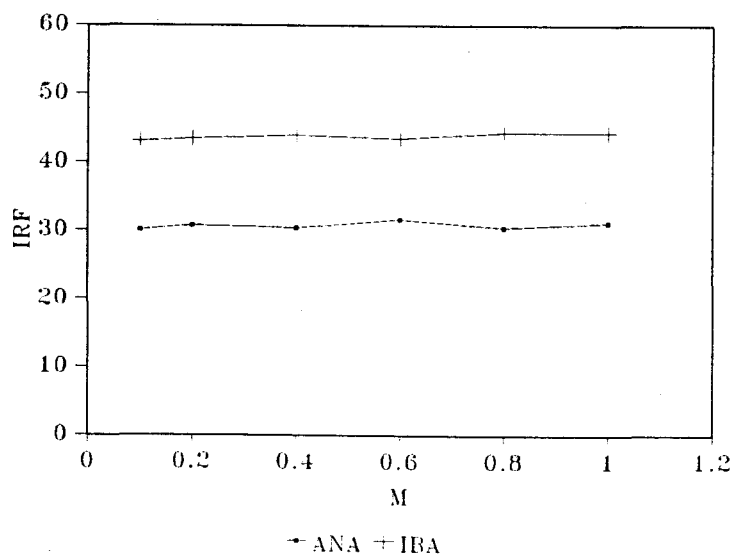
Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.4 y IV.5 y en las figuras IV.11 y IV.12.

TABLA IV.4.-Fuerza iónica (NaCl).

[NaCl] (M)	dIFR/d λ	
	ANA	AIB
0.1	30.11	45.55
0.2	32.70	45.98
0.4	31.84	44.25
0.6	30.11	45.12
0.8	30.54	46.41
1.0	31.84	45.98

TABLA IV.5.-Fuerza iónica (NaClO_4)

[NaClO_4] (M)	dIFR/d λ	
	ANA	AIB
0.1	30.11	43.05
0.2	30.75	43.46
0.4	30.34	43.87
0.6	31.56	43.46
0.8	30.34	44.27
1.0	31.16	44.27

FIGURA IV.11.-Fuerza iónica (NaCl).FIGURA IV.12.-Fuerza iónica (NaClO_4).

De las figuras IV.11 y IV.12 podemos concluir que la fuerza iónica no influye en la determinación de la mezcla ANA/AIB.

III.4.-INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA.

Para establecer la influencia que la temperatura ejerce sobre la intensidad de fluorescencia de la mezcla binaria en estudio, ANA/AIB, en disolución al 50% etanólica, se preparó una disolución que contenía $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de AIB y $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA, para lo cual se introdujo en un matraz de 10 mL, 0,5 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de AIB, 0.25 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de ANA, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión, variando la temperatura, con las siguientes condiciones operatorias: rendija de excitación 5 nm, rendija de emisión 4 nm y longitud de onda de excitación 222 nm.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se han efectuado a las longitudes de onda de emisión de 336 y 358 nm para el AIB y ANA respectivamente.

En la tabla IV.6 se recogen los resultados obtenidos al calentar el sistema y en la tabla IV.7 al enfriar el sistema con ayuda de un termostato, y se representan gráficamente en las figuras IV.13 y IV.14.

TABLA IV.6.-Influencia de la temperatura, calentamiento.

Calentamiento °C	dIFR/dλ	
	ANA	AIB
5	33.54	71.89
10	34.07	67.70
15	34.07	65.06
20	33.01	62.34
25	34.60	60.45
30	33.54	58.24
35	34.07	56.11
40	34.07	52.35
45	33.01	51.06
50	34.60	47.01
55	33.54	44.36
60	34.07	42.60

TABLA IV.7.-Influencia de la temperatura, enfriamiento.

Enfriamiento °C	dIFR/dλ	
	ANA	AIB
60	30.69	46.69
55	29.74	48.29
50	32.59	51.51
45	34.49	55.80
40	34.49	56.87
35	33.54	60.08
30	33.54	62.15
25	33.01	64.09
20	34.49	65.97
15	33.56	68.10
10	33.46	70.30
5	33.49	71.89

FIGURA IV.13.-Influencia de la temperatura sobre ANA.

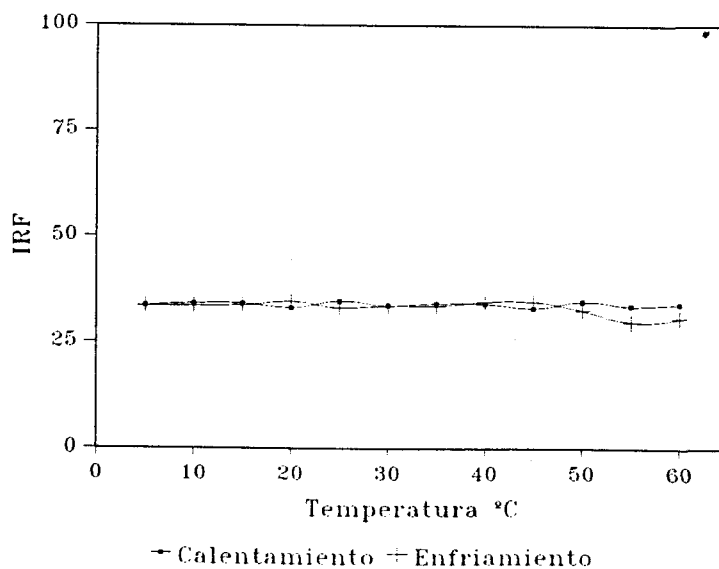
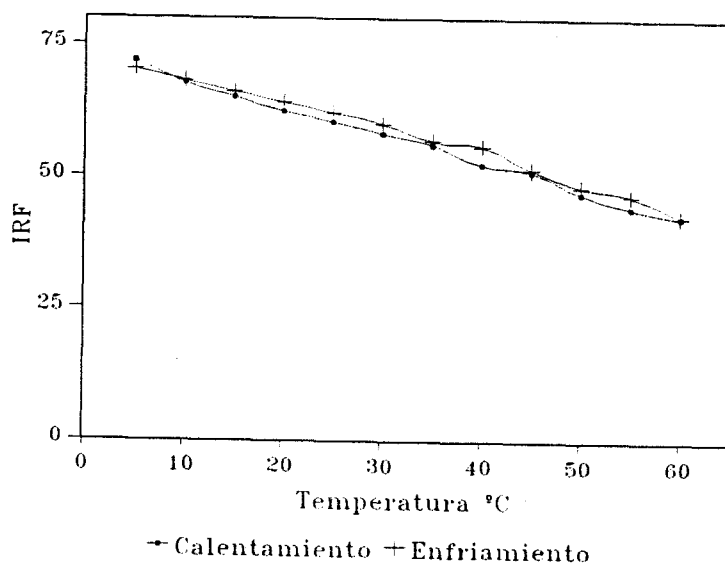


FIGURA IV.14.-Influencia de la temperatura sobre AIB.



De la figura IV.13 obtenemos que la intensidad de fluorescencia relativa derivada del ANA no está influida por la temperatura y en cambio de la figura IV.14 obtenemos que la intensidad de fluorescencia relativa derivada del AIB si está afectada. Por ello elegimos como temperatura de trabajo $20.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ obtenida mediante un termostato.

III.5.-INFLUENCIA DEL CONTENIDO EN ETANOL.

Para estudiar la influencia del contenido de etanol sobre la intensidad de fluorescencia de la mezcla binaria ANA/AIB en estudio se preparó una disolución que contenía $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de AIB y $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA, para lo cual se introdujo en un matraz de 10 mL 0.5 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de AIB, 0.25 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de ANA, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua y cantidades crecientes de etanol absoluto y agua desionizada hasta el enrase.

Se registrarón los espectros de emisión con las siguientes condiciones operatorias: rendija de excitación 5 nm, rendija de emisión 4 nm y longitud de onda de excitación 222 nm.

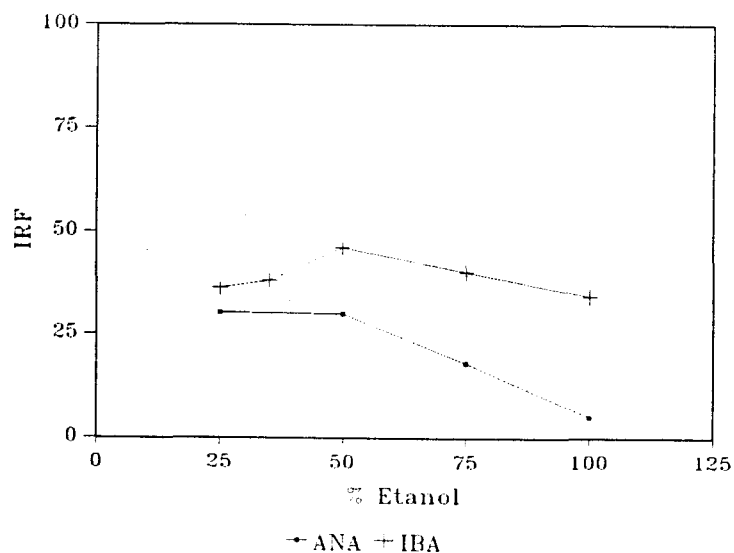
A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se han efectuado a las longitudes de onda de emisión de 336 y 358 nm para el AIB y ANA respectivamente.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.8 y en la figura IV.15.

TABLA IV.8.-Influencia del contenido en etanol.

Volumen mL	%Etanol	dIRF/dλ	
		ANA	AIB
2.5	25	30.12	36.18
3.5	35	29.75	37.87
5.0	50	29.87	46.10
7.5	75	18.02	40.10
10.0	100	5.02	34.20

FIGURA IV.15.-Influencia del contenido de etanol.



De la tabla IV.8 y figura IV.15 tenemos que para el ANA la intensidad relativa de fluorescencia derivad permanece constante hasta el 50% de etanol-agua y disminuye a partir de este y para el AIB aumenta hasta el 50% y a partir de este disminuye ligeramente. Por lo tanto el porcentaje óptimo de trabajo será el 50% etanol-agua.

IV.-CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO.

IV.1.-RECTAS DE CALIBRADO.

Una vez establecidas las variables experimentales e instrumentales óptimas y con el objeto de proponer un método de determinación simultánea de AIB y ANA, se han obtenido las correspondientes rectas de calibrado para ambos analitos, comprobando la independencia entre las señales analíticas de ambos.

IV.1.1.-Rectas de calibrado del AIB.

Se preparó una serie de matraces de 10 mL en los que se introdujeron de 0,01 a 1 mL de disolución de 1 mg.L⁻¹ de AIB, 2 mL de disolución reguladora HPO₄²⁻ 0,1 M/H₂PO₄⁻ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, etanol absoluto y agua desionizada en proporciones adecuadas para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua. También se preparó un blanco en las mismas condiciones experimentales.

Se registrarón los espectros de emisión con las siguientes condiciones operatorias: rendija de excitación 5 nm, rendija de emisión 4 nm y longitud de onda de excitación 222 nm.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos.

Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se han efectuado a las longitudes de onda de emisión de 336 nm.

Se han realizado tres réplicas para cada valor de concentración y las medidas se muestran en la tabla IV.9. En la tabla IV.10 se reúnen los datos estadísticos de la recta de calibrado.

TABLA IV.9.-Recta de calibrado de AIB.

AIB $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	dIRF/d λ		
0	-0.47	-0.99	0.01
25	23.81	24.53	22.98
50	45.41	46.32	47.25
75	69.29	67.77	71.21
100	93.59	92.84	91.25

TABLA IV.10.-Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	15
m	3
$s_{\text{inf.}}$	1.04
a	-0.03
s_a	0.46
b	0.92
s_b	0.01
DSR(b)	0.76%
Lack of fit	68.66%
R^2	99.91%

Como podemos observar en la tabla IV.10 el test de fallo de ajuste es no significativo ya que $p > 20\%$ (68.66%), por lo tanto el rango de linealidad es de 0-100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para comprobar la independencia entre las señales analíticas de los analitos AIB y ANA, se han establecido tres rectas de calibrado en el mismo rango de concentraciones de AIB pero en presencia de concentraciones diferentes de ANA. Los resultados se muestran en la tabla IV.11.

TABLA IV.11.-Rectas de calibrado de AIB en presencia de ANA.

AIB $\mu\text{g.L}^{-1}$	dIRF/d λ		
	ANA 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$	ANA 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$	ANA 45 $\mu\text{g.L}^{-1}$
0	-1.44	-1.55	0.10
25	24.33	25.06	23.38
50	47.45	45.08	44.90
75	69.53	67.58	67.18
100	91.43	90.10	91.71

El ajuste de las rectas por mínimos cuadrados nos proporciona los valores de pendiente y ordenada en el origen que se recogen en la tabla IV.12, en donde se observa que estos valores están incluidos en el intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen correspondiente a la recta de calibrado establecida en ausencia de ANA, lo que nos indica que la señal de fluorescencia del AIB es independiente de la señal de fluorescencia del ANA.

TABLA IV.12.-Rectas de calibrado de AIB en presencia de ANA.

ANA $\mu\text{g.L}^{-1}$	Pendiente	Ordenada	r^2 (%)
0	0.92 \pm 0.02	-0.03 \pm 0.9	99.91
5	0.92	0.07	99.89
25	0.90	0.09	99.83
45	0.91	0.05	99.45

IV.1.2.-Rectas de calibrado del ANA.

Se preparó una serie de matraces de 10 mL en los que se introdujeron de 0,01 a 0.5 mL de disolución de 1 mg.L^{-1} de ANA, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, etanol absoluto y agua desionizada en proporciones adecuadas para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua. También se preparó un blanco en las mismas condiciones experimentales.

Se registrarón los espectros de emisión con las siguientes condiciones operatorias: rendija de excitación 5 nm, rendija de emisión 4 nm y longitud de onda de excitación 222 nm.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se han efectuado a las longitudes de onda de emisión de 358 nm.

Se han realizado tres réplicas para cada valor de concentración y las medidas se muestran en la tabla IV.13. En la tabla IV.14 se reúnen los datos estadísticos de la recta de calibrado.

TABLA IV.13.-Recta de calibrado de ANA.

ANA $\mu\text{g.L}^{-1}$	dIRF/d λ		
0	1.55	-0.20	0.89
10	11.31	10.35	12.78
20	23.25	24.59	22.11
30	35.19	33.98	36.28
40	46.61	45.25	47.89
50	59.85	58.49	61.12

TABLA IV.14.-Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	18
m	3
$s_{\text{ir.c}}$	1.19
a	0.05
s_a	0.50
DSR(a)	
b	1.18
s_b	0.02
DSR(b)	1.69%
Lack of fit	46.09%
R^2	99.69%

Como podemos observar en la tabla IV.14 el test de fallo de ajuste es no significativo ya que $p > 20\%$ (46.09%), por lo tanto el rango de linealidad es de 0-50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Para comprobar la independendencia entre las señales analíticas de los analitos AIB y ANA, se han establecido tres rectas de calibrado en el mismo rango de concentraciones de ANA pero en presencia de concentraciones diferentes de AIB. Los resultados se muestran en la tabla IV.15.

TABLA IV.15.-Rectas de calibrado de ANA en presencia de AIB.

ANA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	dIRF/d λ		
	AIB 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	AIB 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	AIB 90 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
0	0.07	-0.78	0.16
10	11.65	12.49	11.42
20	23.43	23.90	24.10
30	36.71	34.59	35.62
40	47.99	46.00	46.51
50	58.89	58.83	59.61

El ajuste de las rectas por mínimos cuadrados nos proporciona los valores de pendiente y ordenada en el origen que se recogen en la tabla IV.16, en donde se observa que estos valores están incluidos en el intervalo de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen correspondiente a la recta de calibrado establecida en ausencia de AIB, por lo tanto hay independendencia entre las señales de fluorescencia del ANA y del AIB.

TABLA IV.16.-Rectas de calibrado de ANA en presencia de AIB.

AIB $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Pendiente	Ordenada	r^2 (%)
0	1.18 \pm 0.04	0.04 \pm 1.1	99.69
10	1.19	0.05	99.93
50	1.17	-0.06	99.90
90	1.18	-0.01	99.95

IV.2.-PARÁMETROS DE CALIDAD.

Para la determinación del límite de detección y de cuantificación se realizó un estudio estadístico de la señal del blanco para lo cual se preparó una serie de 10 matraces aforados de 10 mL en los que se introdujeron 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0,1 M/ H_2PO_4^- 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua desionizada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión con las siguientes condiciones operatorias: rendija de excitación 5 nm, rendija de emisión 4 nm y longitud de onda de excitación 222 nm.

A continuación, sobre los espectros de emisión, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se han efectuado a las longitudes de onda de emisión de 336 nm para el AIB y 358 nm para el ANA.

En la tabla IV.17 se muestran las medidas de las señales de fluorescencia derivada de los blancos así como los límites de detección y cuantificación.

TABLA IV.17.-Límites de detección y cuantificación.

Muestra	dIFR/d λ	
	AIB	ANA
1	3.16	1.59
2	3.14	1.56
3	3.16	1.58
4	3.17	1.59
5	3.15	1.58
6	3.16	1.60
7	3.16	1.58
8	3.18	1.57
9	3.16	1.60
10	3.16	1.57
dIFR/d λ	3.16	1.58
σ_{n-1}	0.01	0.01
$C_L \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.03	0.03
$C_0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.11	0.08

Para estudiar la reproducibilidad del método se realizó un estudio estadístico de la señal de fluorescencia para lo cual se prepararon dos series de 10 matraces aforados de 10 mL, una para cada analito, que contenían la concentración correspondiente a la mitad de la recta de calibrado de cada analito aproximadamente, para ello se introdujo 0.5 mL de disolución de 1 mg.L⁻¹ de AIB y 0.25 mL de disolución de 1 mg.L⁻¹ de ANA. Se les añadió 2 mL de disolución reguladora HPO₄²⁻ 0,1 M/H₂PO₄⁻¹ 0,1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, etanol absoluto y agua desionizada en proporciones adecuadas para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua.

Se registrarón los espectros de emisión con las siguientes condiciones operatorias: rendija de excitación 5 nm, rendija de emisión 4 nm y longitud de onda de excitación 222 nm.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se han efectuado a las longitudes de onda de emisión de 336 nm para el AIB y 358 nm para el ANA.

En la tabla IV.18 se reúnen los resultados obtenidos.

TABLA IV.18.- Reproducibilidad del método.

Muestra	dIFR/dλ	
	AIB	ANA
1	46.39	32.45
2	47.59	32.89
3	46.70	32.45
4	46.51	32.45
5	46.36	33.39
6	47.72	32.60
7	47.68	32.37
8	46.43	32.89
9	47.79	33.20
10	47.55	32.89
dIFR/dλ	47.07	32.76
σ	0.63	0.35
DER (%)	1.3	1.1

En la tabla IV.19 se resumen los parámetros analíticos calculados para el análisis de la mezcla binaria en estudio.

TABLA IV.19.- Parámetros analíticos.

Parámetro	AIB	ANA
Rango dinámico lineal ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0.1-100	0.08-50
Linealidad (%) ^a	99.18	98.64
Sensibilidad analítica ^b ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	1.13	1.01
Precisión (%) ^c	1.3	1.1
Límite de detección ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0.03	0.03
Límite de cuantificación ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0.1	0.08

^a Calculada por la expresión $[1-DSR(b)]$

^b Calculada por la expresión s_{R_c}/b

^c Calculada por la expresión $\frac{\sigma}{dIFR/d\lambda} \cdot 100$

V.-PROCEDIMIENTO OPERATORIO.

Como consecuencia del estudio realizado anteriormente, proponemos el siguiente método para la determinación simultánea de AIB y ANA mediante espectrofluorimetría derivada.

Procedimiento: En un matraz de 10 mL se introdujo un volumen de disolución de muestra tal que el contenido de los analitos en dicha muestra esté comprendido en la recta de calibrado de ambos analitos, 2 mL de disolución reguladora HPO_4^{2-} 0.1 M/ $\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ 0.1 M a pH 8 al 50% etanol-agua, proporciones adecuadas de etanol absoluto y agua bidestilada para obtener una disolución al 50% etanol/agua y se enrasó con disolución al 50% etanol-agua. Tam-

bién se preparó un blanco en las mismas condiciones experimentales.

Se registrarón los espectros de emisión con las siguientes condiciones operatorias: rendija de excitación 5 nm, rendija de emisión 4 nm y longitud de onda de excitación 222 nm.

A continuación, sobre los espectros de emisión, una vez restada la señal correspondiente al blanco, se efectúa el cálculo de la primera derivada con un factor de filtrado de 19 puntos. Las medidas de intensidad de fluorescencia relativa derivada se han efectuado a las longitudes de onda de emisión de 336 nm para el AIB y 358 nm para el ANA.

A partir de estas medidas calculamos la concentración encontrada para cada analito en estudio, mediante la interpolación a la correspondiente recta de calibrado.

VI.-APLICACIONES ANALÍTICAS.

El método propuesto para la determinación simultánea de AIB y ANA ha sido aplicado a muestras sintéticas y a muestras reales.

VI.1.-DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE AIB Y ANA EN MEZCLAS SINTÉTICAS.

Con el fin de estudiar la eficiencia del método propuesto para la determinación simultánea de ambos analitos en una muestra real, se ha estudiado el efecto que ejerce cada uno de los analitos sobre la respuesta del otro.

Para ello se ha aplicado el método a muestras que contienen diferentes proporciones de ambos analitos, variando la relación entre los límites 1:1 y 20:1.

Las concentraciones ensayadas y los resultados obtenidos como promedio de tres determinaciones se reúnen en la tabla

IV.20.

TABLA IV.20.-Determinación de AIB y ANA en mezclas sintéticas.

AIB/ANA	AIB			ANA		
	Puesto $\mu\text{g.L}^{-1}$	Encontrado $\mu\text{g.L}^{-1}$	Rec(%)	Puesto $\mu\text{g.L}^{-1}$	Encontrado $\mu\text{g.L}^{-1}$	Rec(%)
20:1	100.0	98.3	98.30	5.0	5.1	102.00
15:1	75.0	75.4	100.53	5.0	5.2	104.00
10:1	50.0	50.4	100.80	5.0	4.9	98.00
10:1	20.0	19.5	97.50	2.0	2.1	105.00
10:1	10.0	9.7	97.00	1.0	1.1	95.00
5:1	50.0	51.3	102.60	10.0	9.9	99.00
5:1	25.0	25.4	101.60	5.0	5.2	104.00
3:1	75.0	74.8	99.73	25.0	25.2	100.80
3:1	90.0	91.5	101.67	30.0	29.9	99.67
2:1	100.0	99.1	99.10	50.0	50.6	101.20
2:1	50.0	48.1	96.20	25.0	25.2	100.80
1:1	50.0	51.9	103.80	50.0	49.8	99.60
1:1	25.0	24.5	98.00	25.0	25.6	102.40
1:1	10.0	10.2	102.00	10.0	10.0	100.00
1:2	10.0	10.2	102.00	20.0	20.0	100.00
1:2	25.0	25.1	100.40	50.0	49.6	99.20
1:3	10.0	9.9	99.00	30.0	30.5	101.67
1:5	10.0	10.3	103.00	50.0	50.1	100.20
1:10	1.0	1.0	100.00	10.0	10.1	101.00
1:10	5.0	4.9	98.00	50.0	50.5	101.00

Para comprobar la exactitud del método se realizó el test de comparación de una media muestral frente a un valor de referencia, comparando la recuperación media frente al 100%. En la tabla IV.21 se muestran los resultados obtenidos.

TABLA IV.21.

	AIB	ANA
R_{medio}	100.06	100.73
s_R	2.140	2.232
t_{exp}	0.125	1.463
p %	90.10	16.00

$$t_{\text{exp}} = (R - R_m) \cdot n^{1/2} / s_R$$

De la tabla IV.21 obtenemos que la recuperación media no difiere significativamente del 100% con $p > 5\%$ en todos los casos,

por lo tanto el método es aplicable a la determinación simultánea de ANA y AIB en mezclas sintéticas.

VI.2.-DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE AIB Y ANA EN MUESTRAS REALES.

Para comprobar la utilidad y exactitud del método propuesto, éste ha sido aplicado a formulaciones comerciales de fitohormonas tales como:

Hormogreen SL-2 (Greendel S.A.)	AIB	0.2%
	ANA	0.2%
	Captan	15.0%
Inabarplant I (Inabar S.A.)	AIB	0.1%
	ANA	0.1%
	Ziram	4.0%
Inabarplant II (Inabar S.A.)	AIB	0.2%
	ANA	0.2%
	Ziram	4.0%
Inabarplant IV (Inabar S.A.)	AIB	0.4%
	ANA	0.4%
	Captan	15.0%

En primer lugar se estudió si las sustancias que acompañaban a la mezcla en estudio (Ziram y Captan) interferían en el método propuesto para el análisis de la mezcla. Para ello se prepararon dos series de tres matraces de 10 mL que contenían $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ de AIB y $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA, a una serie se le añadió 3.75 mg.L^{-1} de Captan (concentración 75 veces mayor, máxima relación que existe entre dicho interferente y los analitos en las aplicaciones); a la otra serie se le añadió 2 mg.L^{-1} de Ziram (concentración 40 veces mayor, máxima relación que existe entre dicho interferente y los analitos en las aplicaciones) y se les aplicó el procedimiento operatorio.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IV.22.

TABLA IV.22.-Estudio de interferencias.

Analito	R \pm Δ R	Ziram	Captan
AIB	46.32 \pm 1.90	45.22 \pm 0.80	47.15 \pm 0.65
ANA	29.52 \pm 2.14	30.76 \pm 0.52	28.64 \pm 0.70

R=señal predicha

ΔR (intervalo de confianza sobre la señal)= $s_R \cdot t_{2\alpha, n-2}$

s_R =Desviación estándar de la señal predicha, calculada a partir de $s_R^2 = s_{iR}^2(1/n+1/m) + s_b^2(R-R_m)^2$ [68].

Como podemos observar en la tabla anterior no se produce interferencia ya que la señal obtenida con los interferentes pertenece al intervalo de confianza de la señal de los analitos en estudio.

Una vez visto que no se producen interferencias pasamos a tratar las muestras.

A 100.0 mg de muestra se le añaden 100 mL de etanol absoluto y se tratan en el baño de ultrasonidos, se filtra y del filtrado se coge una alicuota y se le aplica el procedimiento operatorio.

Puesto que conocemos el contenido nominal de los analitos en la muestra, vamos a validar el método por comparación del resultado con un valor de referencia.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.23.

TABLA IV.23.-Determinación simultánea de AIB y ANA en formulaciones comerciales.

Muestra	Composición (%)	Encontrado (%)	t_{exp}	p(%)
Hormogreen SL-2	AIB 0.2	0.197±0.004	1.837	12.6
	ANA 0.2	0.202±0.003	1.633	16.3
	Captan 15.0			
Inabarplant I	AIB 0.1	0.097±0.003	2.450	5.8
	ANA 0.1	0.098±0.002	2.450	5.8
	Ziram 4.0			
Inabarplant II	AIB 0.2	0.198±0.003	1.633	16.3
	ANA 0.2	0.205±0.006	2.042	9.7
	Ziram 4.0			
Inabarplant IV	AIB 0.4	0.402±0.003	1.633	16.3
	ANA 0.4	0.397±0.004	1.837	12.6
	Captan 15.0			

* Media y desviación estándar de seis determinaciones.

** $t_{exp} = |x_m - x_R| \cdot n^{1/2} / s$

Como podemos observar de los datos de la tabla anterior los valores obtenidos no son significativamente distintos de los valores de referencia con $p \geq 5\%$, lo cual implica que el método es exacto.

CAPÍTULO V
DETERMINACIÓN DEL ACIDO 1-NAFTILACETICO.

Una vez realizado el estudio espectrofluorimétrico en disolución de las fitohormonas seleccionadas (capítulo II) se ha llevado a cabo un estudio cualitativo de las mismas en fase sólida.

La espectrofluorimetría de preconcentración en fase sólida básicamente consiste en añadir una cierta cantidad de resina de cambio iónico a un gran volumen de disolución que contiene el elemento traza fluorescente a determinar. Mediante la agitación conveniente del sistema, el compuesto fluorescente se incorpora al substrato sólido aumentando la intensidad de fluorescencia emitida al haber experimentado un proceso de concentración. La resina con el analito fluorescente se filtra y a continuación se transfiere, con la ayuda de una fina pipeta, a una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso de luz donde se empaqueta. A continuación la cubeta se introduce en el compartimento de muestras del espectrofluorímetro para realizar la medida de la intensidad de fluorescencia.

La máxima señal de fluorescencia se obtiene midiendo la fluorescencia difusa transmitida y no la reflejada. Esto se consigue situando la cubeta de tal forma que el plano de esta forme

ángulos de 45° con los haces de excitación y emisión respectivamente. Esta optimización de la geometría de medida ha sido corroborada en todos los sistemas estudiados hasta la fecha.

El protocolo de aplicación de la espectrofluorimetría en fase sólida consta por tanto de las etapas siguientes:

- 1.-Preparación de la disolución.
- 2.-Agitación.
- 3.-Filtración.
- 4.-Empaquetamiento de la resina.
- 5.-Medida de la intensidad de fluorescencia.

A las etapas de la espectrofluorimetría convencional, se le añade las etapas de agitación, filtración y empaquetamiento de la resina, razón por la cual podría pensarse en una mayor incertidumbre en los resultados obtenidos por la técnica. Sin embargo, el empleo de resinas que posean buenas cualidades para su empaquetamiento (ser homogéneas en tamaño y no atacables por los reactivos empleados) determina que las desviaciones estandar relativas de esta técnica sean del mismo orden que las de los métodos convencionales en disolución.

Finalmente en cuanto a la interferencia causada por la presencia de especies extrañas al medio, merece destacar que, en general, se observa una mayor tolerancia con respecto a los mismos métodos en disolución. Este aumento de la tolerancia se ha puesto de manifiesto con alguno iones paramagnéticos como el Cu(II).

Mediante esta técnica se han propuesto métodos para la determinación de las especies inorgánicas [69] así como para las orgánicas. Las ventajas de la aplicación de esta técnica las podemos resumir de la siguiente forma: en la obtención de límites de detección considerablemente bajos, disminución en el número de interferencias y empleo de instrumentación convencional.

I.-ESTUDIO EN FASE SÓLIDA. ELECCIÓN DEL SOPORTE.

Como técnica de preconcentración en la espectrofluorimetría en fase sólida es necesario fijar el analito en un soporte sólido. Con objeto de determinar el soporte adecuado se llevó a cabo un estudio sistemático de la fijación de las fitohormonas en estudio sobre los distintos soportes seleccionados. El método operatorio fué el siguiente: se preparó una disolución de cada fitohormona para cada uno de los soportes, que contenía la cantidad de disolución patrón de fitohormona suficiente para originar una señal de fluorescencia razonable y agua desionizada hasta un volumen de 500 mL. Posteriormente se añadió la cantidad de soporte necesaria para llenar la cubeta de medida (100 mg para el soporte tipo Sephadex y 250 mg para el soporte de sílica C18) y se sometió el sistema a una agitación durante 15 minutos. Tras filtrar, con la ayuda de una pipeta se transfiere el soporte a una cubeta de cuarzo de 1mm de paso de luz y se registraron los espectros de emisión y excitación. En cada caso se registraron los espectros de los respectivos blancos para una posterior resta de la contribución de los mismos.

En la tabla V.1 se recogen los resultados obtenidos, donde se muestra la relación intensidad relativa de fluorescencia /concentración para cada soporte con las diferentes fitohormonas.

TABLA V.1.-Resultado del ensayo cualitativo.

Soportes	Fitohormonas	IRF/Con.	λ_{exc} nm	λ_{em} nm
Sephadex QAE-A-25	AIA	86	282	359
	AIB	31	282	359
	AIP	46	282	359
	AHIA	22	282	339
	ANA	300	280	336
	ANA-A	0	280	336
Sephadex DEAE-A-25	AIA	80	282	359
	AIB	26	282	359
	AIP	41	282	359
	AHIA	17	282	339
	ANA	250	282	336
	ANA-A	0	---	---
Sephadex SP-C-25	AIA	--	---	---
	AIB	--	---	---
	AIP	--	---	---
	AHIA	--	---	---
	ANA	--	---	---
	ANA-A	--	---	---
Sephadex G-15	AIA	--	---	---
	AIB	--	---	---
	AIP	--	---	---
	AHIA	--	---	---
	ANA	--	---	---
	ANA-A	--	---	---
Sephadex G-25	AIA	--	---	---
	AIB	--	---	---
	AIP	--	---	---
	AHIA	--	---	---
	ANA	--	---	---
	ANA-A	--	---	---
Sílica C-18	AIA	--	---	---
	AIB	--	---	---
	AIP	--	---	---
	AHIA	--	---	---
	ANA	--	---	---
	ANA-A	--	---	---

La tabla V.1 nos permite concluir:

-Sobre la resina Sephadex QAE-A-25 se fijan, mostrando fluorescencia, todas las fitohormonas seleccionadas.

-Sobre la resina Sephadex DEAE-A-25 se fijan todas las fitohormonas seleccionadas excepto el ANA-A que no lo hace.

-La posición de los máximos de excitación y emisión de cada fitohormona es la misma en ambas resinas. La comparación de las longitudes de onda de estos máximos en disolución (tabla II.1) y en fase resina nos permite observar que, por efecto de la fijación, las fitohormonas sufren en ambos soportes un desplazamiento en el máximo de excitación hacia valores superiores (efecto batocrómico), manteniendo la posición del máximo de emisión.

-En la resina Sephadex SP-C-25, Sephadex G-15, Sephadex G-25 y Sílica C-18 ninguna de las fitohormonas estudiadas muestra fluorescencia.

-De las fitohormonas seleccionadas el ANA-A tiene menor rendimiento relativo de fluorescencia y al ANA el mayor.

A la vista de los resultados obtenidos, hemos seleccionado la resina Sephadex QAE-A-25 para el estudio del ANA debido a que con ella se obtiene un intensidad de fluorescencia mayor que con la DEAE.

II.-CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES DE ÁCIDO 1-NAFTILACÉTICO (ANA) FLJADO SOBRE SEPHADEX QAE-A-25.

II.1.-ESPECTROS DE LUMINISCENCIA TOTAL.

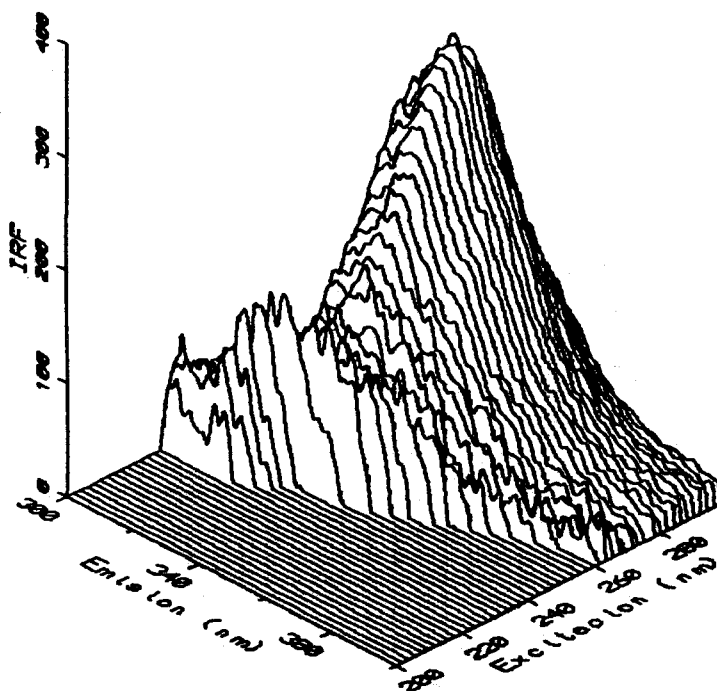
Para establecer el espectro tridimensional del ácido 1-naftilacético (ANA) en resina Sephadex QAE-A-25 se preparó una disolución acuosa de concentración $3.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA en un volumen final de 500 mL, pipeteando 1.5 mL de una disolución patrón de ANA de 1 mg.L^{-1} en etanol absoluto. La disolución se transfirió a un frasco de vidrio de 1000 mL y se adicionaron 100 mg de resina Sephadex QAE-A-25. Del mismo modo, pero sin adicionar ANA, se preparó un blanco.

Después de agitar durante 10 minutos, se filtró la disolución. A continuación, con la ayuda de un gotero, se llenó la cubeta y se procedió al registro de los espectros en las siguientes condiciones:

- Intervalo de emisión entre 300 y 400 nm.
- Intervalo de excitación entre 200 y 300 nm.
- Variación de 2 en 2 nm de la λ_{exc} para cada barrido de emisión.
- Realización de 50 barridos.
- Rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.
- Velocidad de barrido de 240 nm/min.

El blanco se registra en las mismas condiciones y se le resta al espectro del ANA con objeto de hacer desaparecer la línea Rayleigh. El resultado se muestra en la figura V.1.

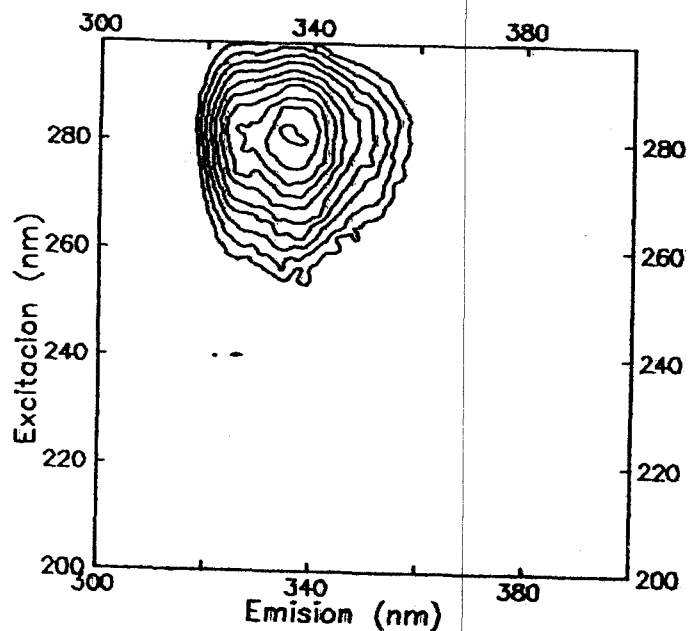
FIGURA V.1.-Espectro tridimensional del ANA fijado sobre QAE.



II.2.-MAPAS DE CONTORNO (TOPOGRAMAS).

En la figura V.2 se representa el topograma del sistema ANA sobre Sephadex QAE-A-25.

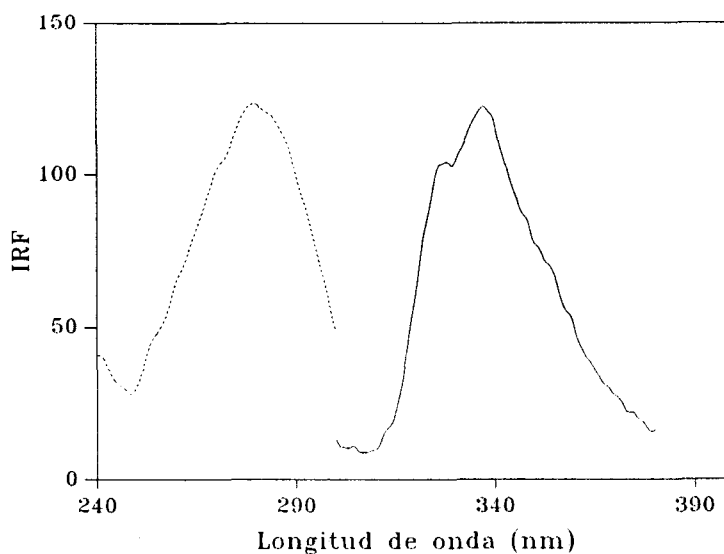
FIGURA V.2.-Topograma de ANA sobre QAE.



II.3.-ESPECTRO BIDIMENSIONALES.

Del espectro de luminiscencia total se obtuvieron los espectros bidimensionales representados en la figura V.3, de los cuales se escogió la longitud de onda de trabajo, para la máxima intensidad, tanto de excitación como de emisión que son 280 y 336 nm respectivamente.

FIGURA V.3.-Espectros de excitación y emisión del ANA fijado sobre QAE.



III.-OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.

Para establecer la posibilidad de la determinación de ANA en muestras reales, estudiamos la influencia que ejercen las distintas variables químicas como son la acidez del medio, posible empleo de disolución reguladora, fuerza iónica, estabilidad de los analitos, temperatura y porcentaje de etanol sobre la intensidad relativa de fluorescencia.

III.1.-ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL ANA FIJADA SOBRE RESINA QAE.

Para estudiar la influencia del tiempo sobre la intensidad de fluorescencia del ANA fijado sobre QAE se ha seguido el procedimiento que se describe a continuación:

Se preparó una disolución de ANA de concentración $3.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ en un volumen final de 500 mL, pipeteando 1.50 mL de una disolu-

ción patrón de ANA de 1 mg.L^{-1} en etanol absoluto. La disolución se transfirió a un frasco de vidrio de 1000 mL y se adicionaron 100 mg de resina QAE. Después de agitar durante 10 minutos, se filtró la disolución. A continuación, con la ayuda de un gotero, se llenó la cubeta y se procedió a registrar los espectros de emisión periódicamente con las siguientes condiciones operativas: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente. Se midió la variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo con $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.2.

TABLA V.2.-Estabilidad del ANA fijado sobre QAE.

Tiempo (minutos)	IRF
0	427.10
1	427.10
2.5	427.10
5	427.10
10	427.10
15	427.94
60	427.41
120	383.62
180	371.49

De los resultados obtenidos podemos afirmar que el sistema es estable, permaneciendo constante la intensidad de fluorescencia relativa del sistema durante al menos una hora. A partir de dicho tiempo se produce una lenta disminución que al cabo de 3 horas llega a ser de un 13%.

III.2.-INFLUENCIA DEL PH SOBRE EL ANA FIJADA SOBRE QAE.

Para estudiar la posible influencia que pueda ejercer la acidez del medio sobre la intensidad de fluorescencia del ANA fijada sobre QAE, se realizó la siguiente experiencia:

Se prepararon once disoluciones de ANA de concentración $3.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ pipeteando 1.5 mL de la disolución patrón de 1 mg.L^{-1} en

etanol absoluto, en matraces de 500 mL y tras añadir agua desionizada hasta prácticamente el enrase, se ajusto el pH de forma aproximada añadiendo ácido clorhídrico o hidróxido sódico de distintas concentraciones según procediera completándose por último al volumen final de 500 mL. A continuación, dichas disoluciones fueron transferidas a botellas de vidrio de 1000 mL y se añadieron 100 mg de resina.

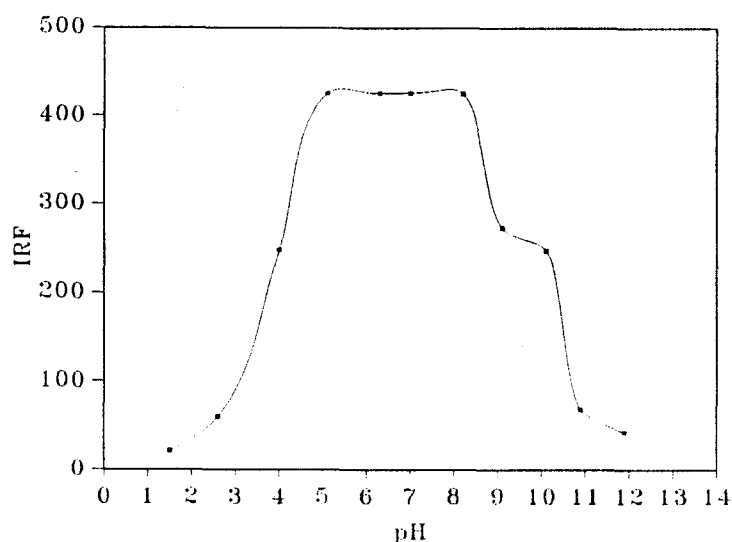
Se prepararon así mismo, los blancos correspondientes que fueron sometidos al mismo tratamiento que las muestras. Tras agitar las disoluciones durante 10 minutos, se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y, una vez medido el pH del filtrado, se registraron los espectros de emisión y excitación (para observar posibles desplazamientos en las longitudes de onda correspondientes) en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla V.3 y se muestran de forma gráfica en la figura V.4.

TABLA V.3.-Influencia del pH del ANA fijada sobre QAE.

pH	IRF
1.5	21.32
2.6	59.64
4.0	248.18
5.1	425.91
6.3	424.18
7.0	426.91
8.2	425.11
9.1	273.11
10.1	248.10
10.9	68.18
11.9	42.70

FIGURA V.4.-Influencia del pH sobre la emisión de fluorescencia del ANA fijada sobre QAE.



De la observación de la tabla V.3 y figura V.4 podemos afirmar que el sistema ANA/QAE-A-25 muestra la máxima intensidad de fluorescencia en el intervalo de pH comprendido entre 5 y 8. Las longitudes de onda de excitación y emisión permanecen constante en este intervalo de pH.

Este comportamiento es similar al mostrado por el analito en disolución.

III.3.-INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE TAMPON SOBRE EL ANA FIJADO SOBRE RESINA QAE.

Debido a la conveniencia de tamponar, se ha seleccionado el sistema $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH 7 como el más adecuado ya que no ejerce ninguna influencia sobre la intensidad relativa de fluorescencia del sistema respecto a cuando se emplea HCl o NaOH para fijar el pH. Hemos estudiado el efecto de dicho tampón sobre el sistema. Para ello se prepararon siete disoluciones de ANA de concentración $3.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ pipeteando 1.5 mL de la disolución patrón de 1 mg.L^{-1} en etanol absoluto, en matraces de 500 mL, tras añadir

volúmenes crecientes del tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH=7 se completó por último al volumen final de 500 mL. A continuación, dichas disoluciones fueron transferidas a botellas de vidrio de 1000 mL y se añadieron 100 mg de resina.

Se prepararon así mismo, los blancos correspondientes que fueron sometidos al mismo tratamiento que las muestras. Tras agitar las disoluciones durante 10 minutos, se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y, una vez medido el pH del filtrado, se registraron los espectros de emisión en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente. Por último se midió la intensidad relativa de fluorescencia a $\lambda_{\text{em}} = 336$ nm.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla V.4.

TABLA V.4.-Influencia del volumen de tampon sobre el sistema.

Tampon (mL)	pH	IRF
0	4.8	426.34
0.1	6.4	340.41
0.2	6.7	323.00
0.5	7.0	319.05
1.0	7.0	315.01
2.5	7.1	234.66
5.0	7.1	132.06

De los resultados observamos que hay influencia del tampon sobre el sistema, al aumentar el volumen de tampon disminuye la intensidad de fluorescencia hasta un 69% para 5 mL de tampon 0.2 M. Debido a la necesidad de tamponar seleccionamos como volumen adecuado 5 mL ya que dicho volumen nos aseguraba el pH.

También fueron estudiados los tampones AcH/AcNa y $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$, mostrando un comportamiento parecido, disminuía la intensidad de fluorescencia al aumentar el volumen de tampon. Seleccio-

namos el tampon de fosfatos para nuestro trabajo porque mostraba mejor comportamiento.

III.4.-INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA SOBRE EL SISTEMA.

Se ha realizado el estudio de la influencia que la fuerza iónica del medio, fijada con NaCl, ejerce sobre la emisión de fluorescencia del ANA, con vistas a la posterior aplicación a muestras de agua.

Se prepararon una serie de disoluciones de ANA de concentración $3.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ pipeteando 1.50 mL de la disolución patrón de 1 mg.L^{-1} en etanol absoluto, en matraces de 500 mL, se añadió concentraciones comprendidas entre 0.0005 y 0.01 M por pesada directa de la cantidad correspondiente de NaCl. Se completó por último al volumen final de 500 mL. A continuación, dichas disoluciones fueron transferidas a botellas de vidrio de 1000 mL y se añadieron 100 mg de resina.

Se prepararon así mismo, los blancos correspondientes que fueron sometidos al mismo tratamiento que las muestras. Tras agitar las disoluciones durante 10 minutos, se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla V.5.

TABLA V.5.-Influencia de la fuerza iónica sobre el ANA fijada sobre QAE.

[NaCl] 10^{-3}M	IRF
0.0	425.61
0.5	280.91
1.0	216.45
2.0	131.75
8.0	51.41
10.0	42.50

De los resultados de la tabla V.5 observamos que la fuerza iónica influye sobre el sistema, disminuyendo la intensidad de fluorescencia.

III.5.-INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE EL ANA FIJADO SOBRE SEPHADEX QAE-A-25.

Para realizar dicho estudio, se preparó una disolución de ANA de concentración $3.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ pipeteando 1.5 mL de la disolución patrón de 1 mg.L^{-1} en etanol absoluto, en un matraz de 500 mL, se añadió 5 mL del tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH=7 y se completó por último al volumen final de 500 mL. A continuación, dicha disolución fue transferida a una botella de vidrio de 1000 mL y se añadió 100 mg de resina.

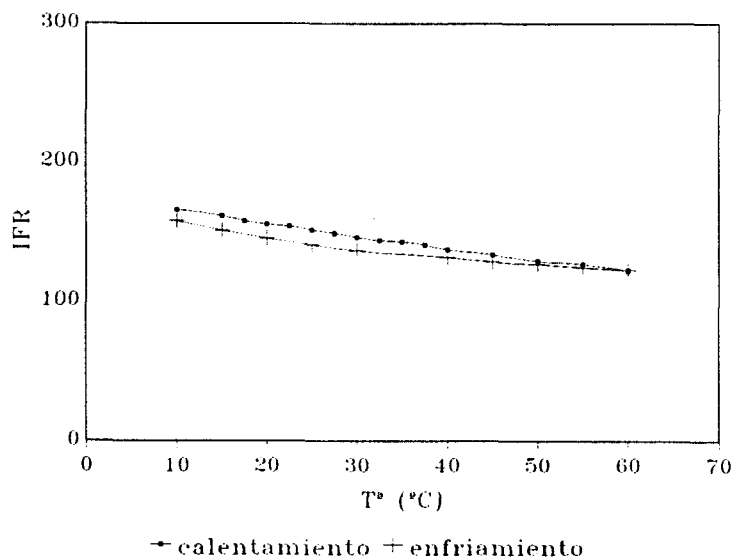
Se prepararon así mismo, el blanco correspondiente que fue sometido al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar la disolución durante 10 minutos, se filtró. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia relativa a temperaturas crecientes hasta 60°C , en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente. Del mismo modo se opero durante el proceso de enfriamiento del sistema.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla V.6 y figura V.5.

TABLA V.6.-Influencia de la temperatura sobre la intensidad de fluorescencia del sistema.

Calentamiento		Enfriamiento	
T _a (°C)	IRF	T _a (°C)	IRF
10.0	161.95	60.0	121.85
15.0	160.99	55.0	123.85
17.5	157.11	50.0	126.10
20.0	154.80	45.0	128.02
22.5	153.39	40.0	131.44
25.0	150.73	30.0	136.00
27.5	148.25	25.0	140.24
30.0	145.67	20.0	144.98
32.5	143.49	15.0	150.21
35.5	142.54	10.0	157.18
37.5	140.07		
40.0	136.95		
45.0	133.30		
50.0	128.53		
55.0	126.43		
60.0	121.83		

FIGURA V.5.-Influencia de la temperatura.



Como puede observarse en la figura V.5, la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar la temperatura, igualmente se ha comprobado que se obtienen prácticamente los mismos valores para la intensidad de fluorescencia al enfriar el sistema previamente calentado, lo que indica que se trata de un proceso rever-

sible. No obstante esta dependencia de la intensidad de fluorescencia con la temperatura nos obliga a fijar su valor, se ha elegido como temperatura de trabajo 20.0 ± 0.5 °C, próxima a la temperatura ambiente y fácil de conseguir mediante el empleo de un termostato.

III.6.-INFLUENCIA DEL CONTENIDO EN ETANOL.

Teniendo en cuenta que las disoluciones acuosas de ANA van a contener un cierto volumen de etanol proveniente de la disolución patrón, vamos a estudiar la influencia que éste puede ejercer sobre la intensidad de fluorescencia del ANA fijado en QAE. Se prepararon para tal fin una serie de disoluciones que contenían en 500 mL una concentración fija de ANA e igual a $3.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 5 mL del tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH=7 y porcentajes crecientes de etanol. Se prepararon así mismo los blancos correspondientes y tras operar igual que se indica en las experiencias anteriores, se midieron las intensidades de fluorescencia en las condiciones de trabajo habituales, observándose en la tabla V.7 los porcentajes de variación correspondientes.

TABLA V.7.-Influencia del contenido en etanol.

% Etanol	IRF	% Variación
0.01	128.12	----
0.05	127.08	0.81
0.10	126.54	1.23
0.30	126.88	0.97
0.50	126.34	1.39
0.70	125.79	1.82
1.00	126.48	1.28
1.50	126.07	1.60

De los resultados de la tabla V.7 observamos que no influye el porcentaje de etanol sobre la intensidad relativa de fluorescencia del ANA fijado sobre resina Sephadex QAE-A-25.

III.7.-TIEMPO DE EQUILIBRACIÓN DE LA RESINA.

Para establecer la influencia que el tiempo de agitación del sistema en estudio en la botella de vidrio ejerce sobre la intensidad de fluorescencia del mismo se prepararon una serie de disoluciones de ANA de concentración $3.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ pipeteando 1.50 mL de la disolución patrón de 1 mg.L^{-1} en etanol absoluto, en matraces de 500 mL, se añadió 5.0 mL del tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH=7 y se completó por último al volumen final de 500 mL. A continuación, dicha disolución fue transferida a una botella de vidrio de 1000 mL y se añadió 100 mg de resina.

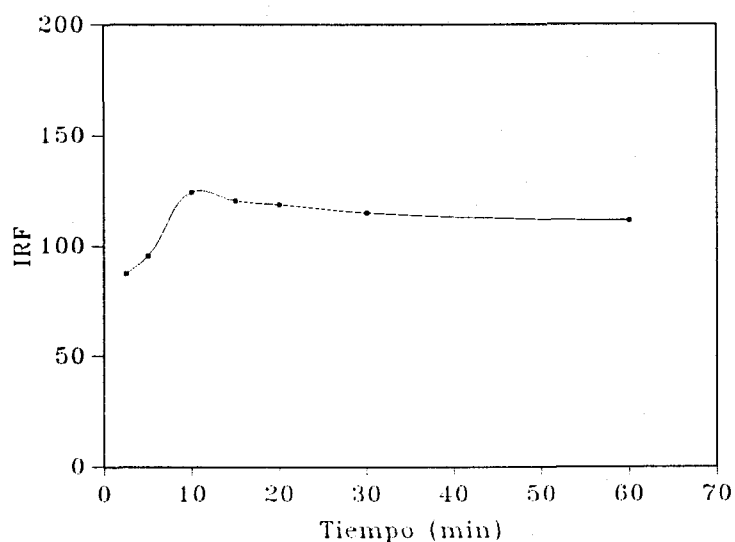
Se prepararon así mismo, los blancos correspondientes que fueron sometidos al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar durante periodos de tiempo crecientes a 60 r.p.m., se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta. Se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.8 y en la figura V.6.

TABLA V.8.-Tiempo de equilibración de la resina.

Tiempo (minutos)	IRF
2.5	87.47
5.0	95.73
10.0	124.40
15.0	120.66
20.0	118.81
30.0	115.18
60.0	111.62

FIGURA V.6.-Tiempo de equilibración de la resina.



Como puede observarse en la figura V.6, la intensidad de fluorescencia aumenta inicialmente al aumentar el tiempo de agitación, hasta alcanzar un valor máximo a los diez minutos, a partir del cual hay un ligero descenso en la intensidad de fluorescencia permaneciendo prácticamente constante a partir de los quince minutos. Para sucesivas experiencias se eligió como tiempo de equilibración de la resina el de 10 minutos.

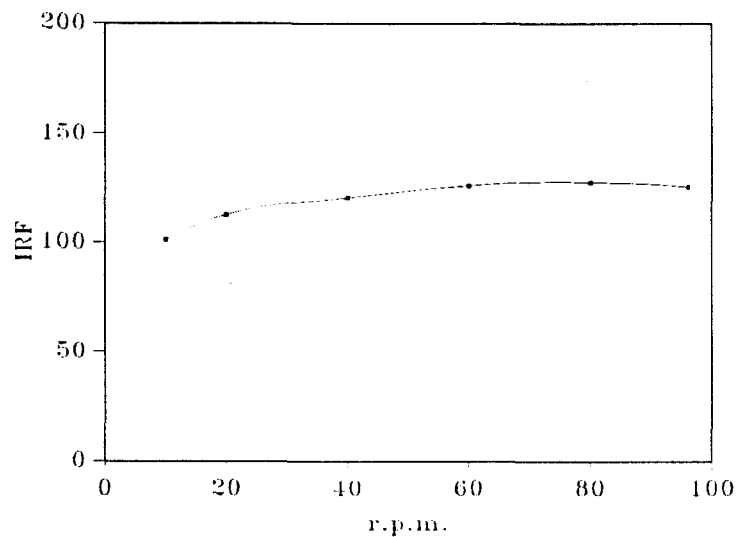
III.8.-VELOCIDAD DE AGITACIÓN.

Esta experiencia tiene por objeto determinar la velocidad óptima de agitación de la disolución en presencia de la resina, una vez transferidas ambas a las botellas de vidrio. Para ello se opera igual que en la experiencia anterior, manteniendo un tiempo de agitación constante de 10 minutos para todas las muestras, aunque operando a velocidades crecientes, según se indica en la tabla V.9. Los resultados de dicha experiencia están representados en la figura V.7.

TABLA V.9.-Velocidad de agitación.

Velocidad r.p.m.	IRF
10	101.25
20	112.62
40	118.45
60	126.11
80	127.64
96	125.61

FIGURA V.7.-Influencia de la velocidad de agitación.



Esta experiencia indica que la intensidad de fluorescencia se estabiliza a partir de una velocidad de 60 r.p.m., siendo ésta por tanto, la que usaremos a partir de ahora en experiencias posteriores.

III.9.-INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE RESINA.

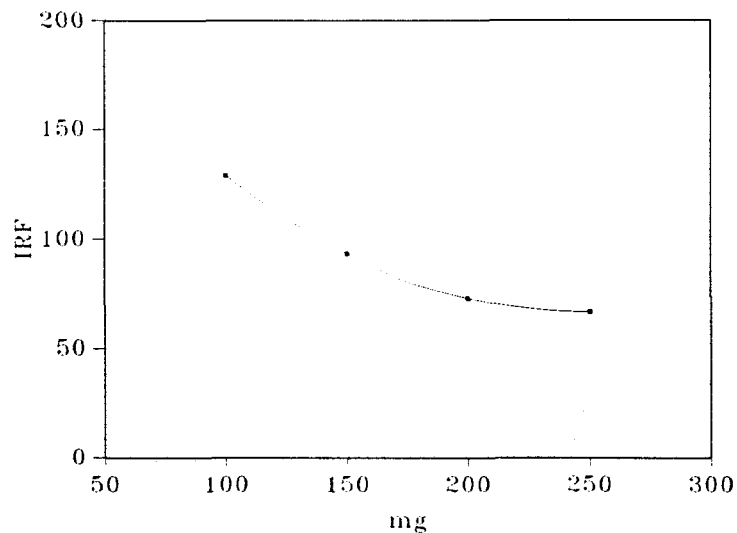
La experiencia se llevó a cabo preparando una serie de disoluciones a las que se añadieron cantidades crecientes de resina. Estas disoluciones contenían, en un volumen de 500 mL, una concentración de ANA de $3.0 \mu\text{g.L}^{-1}$. Una vez transferidas a sus res-

pectivas botellas de vidrio de 1 L de capacidad, se añadieron cantidades crecientes de resina Sephadex QAE-A-25, y tras agitar durante 10 minutos a 60 r.p.m., se filtraron las disoluciones y la resina se empaquetó en la cubeta de 1 mm de espesor. Se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las condiciones de trabajo habituales, restándose posteriormente la contribución del blanco. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.10 y se representan en la figura V.8.

TABLA V.10.-Cantidad de resina.

Cantidad de resina (mg)	IRF
100	128.78
150	93.44
200	72.96
250	66.56

FIGURA V.8.-Influencia de la cantidad de resina.



Puede observarse, en la figura V.8, que al aumentar la cantidad de resina añadida, disminuye la intensidad de fluorescencia. Como consecuencia, la cantidad de resina a utilizar debe ser la mínima posible. Este valor viene limitado por la cantidad mínima necesaria para llenar la cubeta, que en nuestro caso concreto se fijó en 100 mg.

III.10.-INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE AGITACIÓN.

Los métodos de espectrometría en 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 de acuerdo con las necesidades del problema a resolver. Si la concentración de analito en un problema concreto es pequeña, un aumento del volumen de muestra a tratar podrá permitirnos, dentro de ciertos límites, resolver su análisis.

Para estimar en la práctica el aumento de sensibilidad que se logra para un sistema dado, se estudia la señal analítica, IRF, que origina la equilibración de volúmenes crecientes de analito de la misma concentración y con la misma masa de resina.

Al objeto de conocer como influye el volumen de disolución a tomar sobre la intensidad de fluorescencia, se prepararon una serie de disoluciones que en volúmenes finales, comprendidos entre 100 y 1500 mL, contenían cantidades crecientes de disolución patrón de ANA de 1 mg.L^{-1} , de tal forma que la concentración final después de enrasar con agua desionizada, fuese siempre igual a $3.0 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$. Se transfirieron seguidamente a botellas de vidrio de 1 o 2 L de capacidad, según el volumen de trabajo, y se añadió en cada caso 100 mg de resina. Tras agitar el conjunto

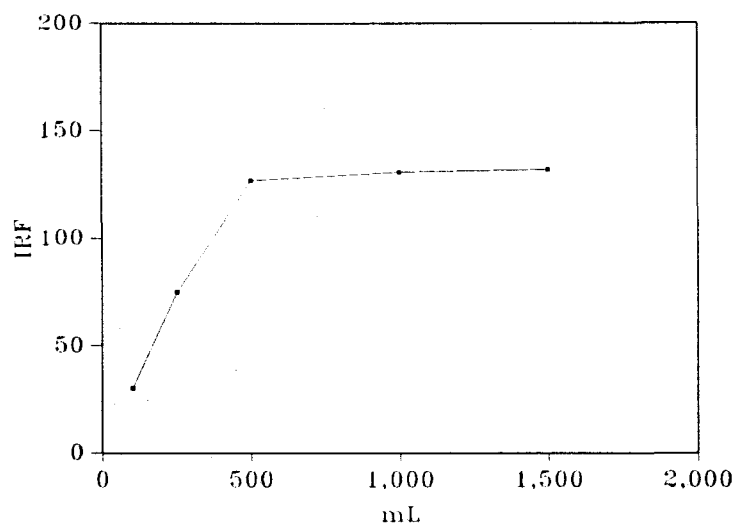
durante 10 minutos a 60 r.p.m., se filtraron, se llenó la cubeta y se procedió a registrar los espectros de emisión y a la medida de la intensidad de fluorescencia en las condiciones de trabajo habituales.

Los resultados obtenidos, así como los volúmenes añadidos de disolución patron, se recogen en la tabla V.11 y se representan gráficamente en la figura V.9.

TABLA V.11.-Influencia del volumen de agitación.

Vol. final (mL)	Vol. patron (mL)	IRF
100	0.30	30.42
250	0.75	74.78
500	1.50	126.75
1000	3.00	130.55
1500	4.50	131.82

FIGURA V.9.-Influencia del volumen de agitación.



La figura V.9 pone de manifiesto un incremento de la señal de fluorescencia con el volumen final de muestra hasta hacerse prácticamente independiente del mismo para valores superiores a 500 mL. Por tanto se puede concluir que el volumen óptimo de trabajo es en nuestro caso de 500 mL pues es el que nos va a permitir obtener una mayor sensibilidad sin un aumento excesivo de volumen que dificultaría en análisis.

III.11.-RESUMEN DE LA OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES PARA EL ANA FIJADO SOBRE SEPHADEX QAE-A-25.

En la tabla V.12 se resumen los valores óptimos encontrados en las experiencias anteriores y que a partir de ahora van a ser utilizados en todas y cada una de las determinaciones a realizar.

TABLA V.12.-Resumen de la optimización de variables.

Variable	Valor óptimo
Longitudes de onda de excitación y emisión	280/336 nm
Rendijas de excitación y emisión	15/5 nm
Estabilidad	1 hora
pH	7
Tampon	5 mL $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M
Fuerza iónica	Afecta
Temperatura	20.0±0.5 °C
Contenido en etanol	No afecta
Tiempo de agitación	10 minutos
Velocidad de agitación	60 r.p.m.
Cantidad de resina	100 mg
Volumen de agitación	500 mL

IV.-CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO.

IV.1.-RECTAS DE CALIBRADO.

Como ya se ha indicado en un estudio anterior, una de las ventajas que posee la espectrofluorimetría en fase sólida 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, como hemos visto en apartados anteriores.

Por todo ello hemos obtenido curvas de calibrado para diferentes volúmenes de disolución: 100, 250, 500 y 1000 mL, en las condiciones operatorias establecidas anteriormente.

IV.1.1.-Recta de calibrado para un volumen de 100 mL.

Se preparó una serie de disoluciones de ANA de concentración creciente entre 10 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pipeteando de 1 a 10 mL de la disolución patrón de 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en etanol absoluto, en matraces de 100 mL, se añadió 1 mL del tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH=7 y se completó por último al volumen final de 100 mL. A continuación, dichas disoluciones fueron transferidas a botellas de vidrio de 1000 mL y se añadió 100 mg de resina.

Se prepararon así mismo, el blanco correspondiente que fue sometido al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar 10 minutos a 60 r.p.m., se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta. Se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

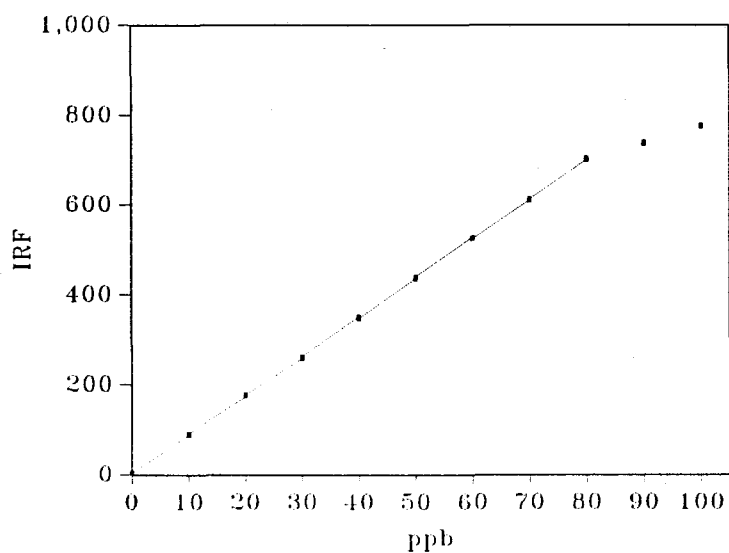
Se realizaron dos réplicas para cada concentración.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla V.13 y en la figura V.10.

TABLA V.13.-Recta de calibrado para un volumen de 100 mL.

ANA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IRF	
0	3.72	-2.10
10	87.57	90.89
20	174.11	177.89
30	259.37	264.15
40	351.93	347.10
50	435.32	440.15
60	527.77	524.82
70	609.91	613.20
80	699.58	704.05
90	739.11	735.10
100	877.94	873.61

FIGURA V.10.-Recta de calibrado para un volumen de 100 mL.



Como podemos observar en la figura anterior, al incluir las dos últimas concentraciones en el calibrado tenemos curvatura, por lo que se eliminan, con lo cual obtenemos un buen ajuste al modelo de regresión lineal ($p=95.1\%$).

En la tabla V.14 se resumen los parámetros estadísticos.

TABLA V.14.-Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	18
m	2
$s_{iir,c}$	2.52
a	0.69
s_a	1.09
b	8.75
s_b	0.02
DSR(b)	0.26%
Lack of fit	95.15%
R^2	99.99%

IV.1.2.-Recta de calibrado para un volumen de 250 mL.

Se preparó una serie de disoluciones de ANA de concentración creciente entre 5 y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pipeteando de 0.25 a 2.00 mL de la disolución patrón de 5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en etanol absoluto, en matraces de 250 mL, se añadió 2.5 mL del tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH=7 y se completó por último al volumen final de 250 mL. A continuación, dichas disoluciones fueron transferidas a botellas de vidrio de 1000 mL y se añadió 100 mg de resina.

Se prepararon así mismo, el blanco correspondiente que fue sometido al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar 10 minutos a 60 r.p.m., se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

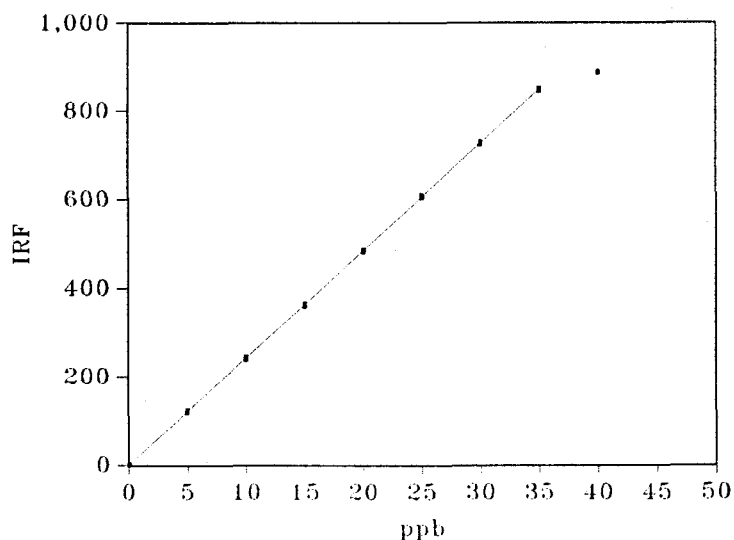
Se realizaron dos réplicas para cada concentración.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla V.15 y en la figura V.11.

TABLA V.15.-Recta de calibrado para un volumen de 250 mL.

ANA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IRF	
0	2.70	0.71
5	119.11	124.78
10	246.71	240.05
15	360.13	367.10
20	482.20	487.31
25	604.15	610.05
30	725.31	730.67
35	845.24	852.13
40	889.45	885.15

FIGURA V.11.-Recta de calibrado para un volumen de 250 mL.



Como podemos observar en la figura anterior, al incluir la última concentración en el calibrado tenemos curvatura, por lo que se elimina, con lo cual obtenemos un buen ajuste al modelo de regresión lineal ($p=99.96\%$).

En la tabla V.16 se resumen los parámetros estadísticos.

TABLA V.16.-Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	16
m	2
$s_{i\bar{y}.o}$	3.13
a	1.09
s_a	1.43
b	24.22
s_b	0.07
DSR(b)	0.29%
Lack of fit	99.96%
R^2	99.99%

IV.1.3.-Recta de calibrado para un volumen de 500 mL.

Se preparó una serie de disoluciones de ANA de concentración creciente entre 3 y 21 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pipeteando de 0.3 a 2.1 mL de la di-

solución patrón de 5 mg.L⁻¹ en etanol absoluto, en matraces de 500 mL, se añadió 5 mL del tampon KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0.2 M a pH=7 y se completó por último al volumen final de 500 mL. A continuación, dichas disoluciones fueron transferidas a botellas de vidrio de 1000 mL y se añadió 100 mg de resina.

Se prepararon así mismo, el blanco correspondiente que fue sometido al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar 10 minutos a 60 r.p.m., se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta. Se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 336$ nm y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

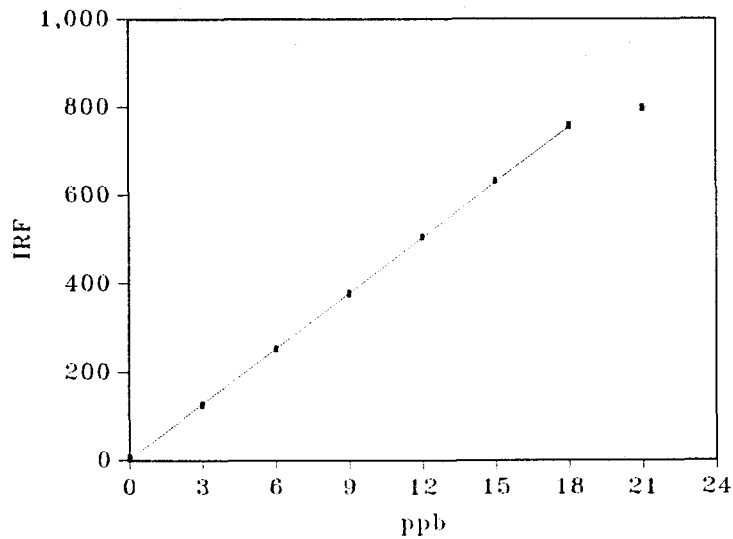
Se realizaron dos réplicas para cada concentración.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla V.17 y en la figura V.12.

TABLA V.17.-Recta de calibrado para un volumen de 500 mL.

ANA $\mu\text{g.L}^{-1}$	IRF	
0.0	0.80	8.00
3.0	122.64	129.14
6.0	249.89	256.11
9.0	374.52	381.89
12.0	508.34	501.05
15.0	628.99	635.22
18.0	760.54	753.30
21.0	783.44	801.15

FIGURA V.12.-Recta de calibrado para un volumen de 500 mL.



Como podemos observar en la figura V.12, al incluir la última concentración en el calibrado tenemos curvatura, por lo que se elimina, con lo cual obtenemos un buen ajuste al modelo de regresión lineal ($p=94.61\%$).

En la tabla V.18 se resumen los parámetros estadísticos.

TABLA V.18.-Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	14
m	2
$s_{i\bar{r},c}$	3.99
a	1.99
s_a	1.92
b	41.92
s_b	0.18
DSR(b)	0.43%
Lack of fit	94.61%
R^2	99.98%

IV.1.4.-Recta de calibrado para un volumen de 1000 mL.

Se preparó una serie de disoluciones de ANA de concentración creciente entre 1 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pipeteando de 0.5 a 5.0 mL de la di-

solución patrón de 1 mg.L^{-1} en etanol absoluto, en matraces de 1000 mL, se añadió 10 mL del tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH=7 y se completó por último al volumen final de 1000 mL. A continuación, dichas disoluciones fueron transferidas a botellas de vidrio de 1000 mL y se añadió 100 mg de resina.

Se prepararon así mismo, el blanco correspondiente que fue sometido al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar 10 minutos a 60 r.p.m., se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

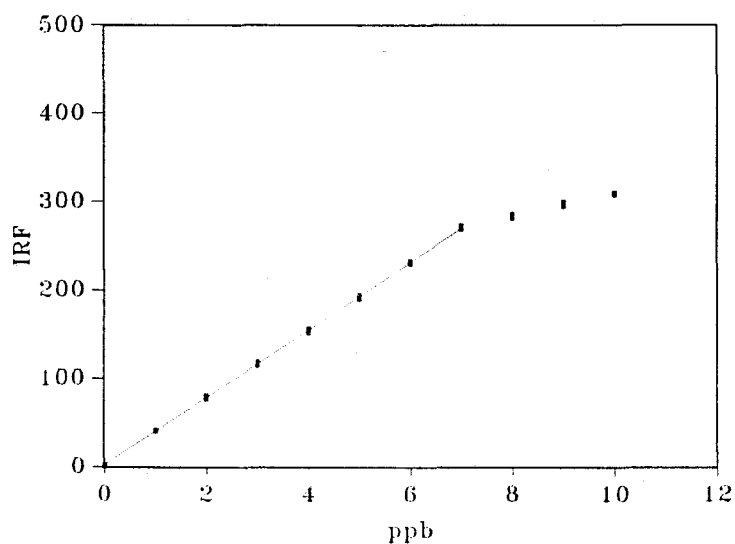
Se realizaron dos réplicas para cada concentración.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla V.19 y en la figura V.13.

TABLA V.19.-Recta de calibrado para un volumen de 1000 mL.

ANA $\mu\text{g.L}^{-1}$	IRF	
0.0	0.90	2.11
1.0	40.45	40.98
2.0	76.87	81.23
3.0	119.92	115.11
4.0	152.13	157.08
5.0	195.25	190.71
6.0	230.27	233.15
7.0	273.10	269.05
8.0	286.33	281.07
9.0	295.23	300.10
10.0	308.10	310.13

FIGURA V.13.-Recta de calibrado para un volumen de 1000 mL.



Como podemos observar en la figura V.13, al incluir las tres últimas concentraciones en el calibrado tenemos curvatura, por lo que se eliminan, con lo cual obtenemos un buen ajuste al modelo de regresión lineal ($p=99.2\%$).

En la tabla V.20 se resumen los parámetros estadísticos.

TABLA V.20.-Parámetros estadísticos.

Parámetro	Valor
n	16
m	2
$s_{if,c}$	2.10
a	1.94
s_a	0.96
b	38.34
s_b	0.23
DSR(b)	0.60%
Lack of fit	99.20%
R^2	99.95%

IV.2.-PARÁMETROS DE CALIDAD.

Se han establecido para el método propuesto los parámetros de calidad rango dinámico lineal, linealidad, sensibilidad analítica, precisión, límite de detección y límite de cuantificación indicados en capítulos anteriores y además hemos incluido el estudio de la robustez.

ROBUSTEZ

La **robustez** de un procedimiento analítico es la medida de la capacidad de dicho procedimiento para producir resultados exactos en presencia de pequeños cambios de las variables experimentales [70].

Hemos utilizado para llevar a cabo el estudio de la robustez un diseño 2^7-4 centrado con 2 réplicas del punto central (óptimo) que se lleva a cabo con 7 variables y requiere un total de 8 experiencias más los valores del punto central que utilizamos los obtenidos en el calibrado. Elegimos como concentración de ANA a ensayar el valor de $1.5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Hemos elegido una variación de $\pm 5\%$ sobre el valor optimizado de 5 variables experimentales: pH, cantidad de resina, tiempo de equilibración, velocidad de agitación y temperatura; y un 10% sobre el volumen de tampon. Por último hemos añadido una variable fantasma para evaluar el error de repetibilidad.

En la tabla V.21 se indican las variables ensayadas, así como los valores que toma cada una, mientras que en la tabla V.22 se muestra la estructura del diseño factorial utilizado para el estudio de la robustez.

TABLA V.21.-Variables ensayadas para determinar la robustez.

Variable	Valor inferior	Valor superior
pH	6.65	7.35
Cantidad de resina	95 mg	105 mg
Tiempo de agitación	9.5 min	10.5 min
Velocidad de agitación	57 r.p.m.	63 r.p.m.
Temperatura	19 °C	21 °C
Volumen de tampon	0.45 mL	0.55 mL
Fantasma	----	----

TABLA V.22.-Diseño factorial utilizado para estudiar la robustez.

Nº Exp.	Variables							
	pH	Resina	Tiempo agit.	Veloc. agit.	°C	Tampon	Fantasma	IRF
1	-1	-1	-1	1	1	-1	1	F ₁
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	F ₂
3	-1	1	-1	-1	1	1	-1	F ₃
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	F ₄
5	-1	-1	1	1	-1	1	-1	F ₅
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	F ₆
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1	F ₇
8	1	1	1	1	1	1	1	F ₈

Para llevar a cabo la experiencia se prepararon 8 matraces de 500 mL en los que se añadió 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ y se aplicó el procedimiento operatorio teniendo en cuenta las condiciones para cada variable en cada experiencia. En la tabla V.23 se indican dichas condiciones en cada experimento así como los valores de la intensidad de fluorescencia obtenido en cada caso junto a las dos réplicas del punto central obtenidas a partir de la experiencia realizada para establecer el calibrado.

TABLA V.23.-Condiciones para cada experimento.

Nº Exp.	Variables							
	pH	Resina mg	Tiempo Agit. (min)	Veloc. agit. r.p.m	°C	Tampon	Fantasma	IRF
1	6.65	95	9.5	63	21	0.45	1	202.6
2	7.35	95	9.5	57	19	0.55	1	254.3
3	6.65	105	9.5	57	21	0.55	-1	179.5
4	7.35	105	9.5	63	19	0.45	-1	229.9
5	6.65	95	10.5	63	19	0.55	-1	224.1
6	7.35	95	10.5	57	21	0.45	-1	193.9
7	6.65	105	10.5	57	19	0.45	1	237.1
8	7.35	105	10.5	63	21	0.55	1	192.5
9	7.00	100	10.0	60	20	0.50	0	211.9
10	7.00	100	10.0	60	20	0.50	0	202.5

Los resultados obtenidos se trataron estadísticamente mediante STATGRAPHICS.

En primer lugar se comprobó en la tabla ANOVA correspondiente que la variable "fantasma" no produce un efecto significativo ($p=12\%$) por lo que podemos eliminar el cálculo de este efecto y utilizar estos datos para calcular el error experimental mientras que las réplicas del punto central las usaremos para evaluar la curvatura del modelo.

En la tabla V.24 se indican los p-valores del correspondiente F-test calculados para los efectos de las distintas variables, incluyendo la variable fantasma introducida en la experiencia.

Una vez eliminados los efectos de la variable fantasma, se procedió a realizar un nuevo ANOVA (tabla V.25) donde podemos comprobar que, en estas condiciones, todos los efectos no son significativos excepto la temperatura y además no existe curvatura.

TABLA V.24

Variablen	G.L.	F(exp)	P-valor
pH	1	1.51	0.344
Resina mg	1	2.62	0.247
Tiempo agit.	1	0.71	0.497
Veloc. agit.	1	0.51	0.557
Temperatura	1	63.32	0.015
Fantasma	1	7.03	0.118
Tampon mL	1	0.34	0.625
Error	2		

TABLA V.25

Variablen	G.L.	F(exp)	P-valor
pH	1	2.11	0.378
Resina mg	1	3.66	0.302
Tiempo agit.	1	0.99	0.510
Veloc. agit.	1	0.71	0.562
Temperatura	1	88.51	0.066
Tampon mL	1	0.47	0.622
Curvatura	2	5.81	0.277
Error	2		

En la tabla V.26 se indican los efectos estimados para cada variable experimental.

TABLA V.26

Variable	Efecto
Media	212.83 ± 4.312
pH	6.83 ± 9.643
Resina mg	-8.99 ± 9.643
Tiempo agit.	-4.67 ± 9.643
Veloc. agit.	-3.95 ± 9.643
Temperatura	-44.22 ± 9.643
Tampon mL	-3.24 ± 9.643

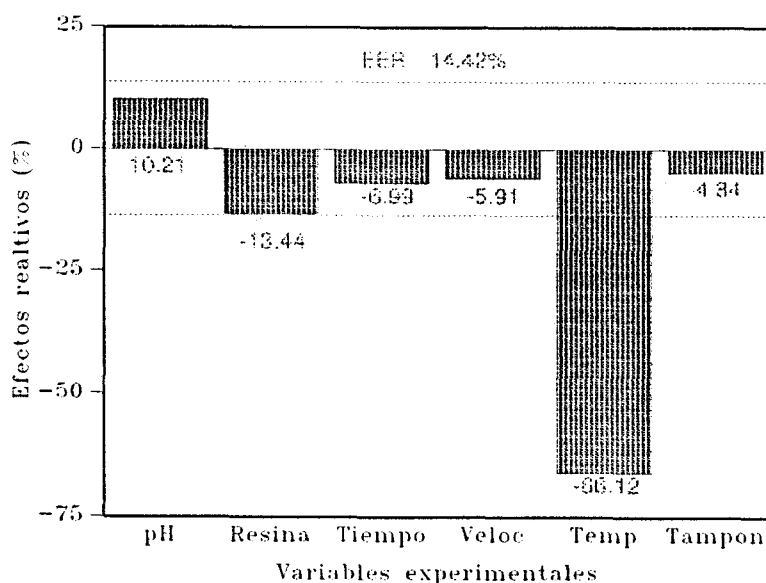
$t=3.182$

En la figura V.14 se representa, mediante un diagrama de barras, el valor relativo de los efectos (cálculado dividiendo cada efecto por el valor medio y multiplicándolo por el valor t) que causa la modificación estudiada de cada variable, así como

el nivel del error experimental. Se comprueba que el efecto debido a la modificación de la temperatura es mayor que el error experimental, lo que indica que el control de esta variable es crítico ya que variaciones del $\pm 5\%$ sobre la temperatura provoca un error sistemático en la medida de la señal de fluorescencia mayor que el propio error experimental.

En cambio el método analítico propuesto es robusto para una modificación del $\pm 5\%$ sobre el pH, la cantidad de resina, tiempo de equilibración de la resina, velocidad de agitación y para una modificación del $\pm 10\%$ sobre el volumen de tampon.

FIGURA V.14.



LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Para la determinación del límite de detección y de cuantificación se realizó un estudio estadístico de la señal del blanco para lo cual se preparó cuatro series con 10 matraces cada uno de 100, 250, 500 y 1000 mL, en los cuales se añadió 1, 2.50, 5 y 10 mL del tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH=7, respectivamente y se completó por último al volumen final. A continuación, dichas disoluciones fueron transferidas a botellas de vidrio de 1000 mL y se añadió 100 mg de resina a cada una.

Tras agitar 10 minutos a 60 r.p.m., se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.27

TABLA V.27.-Límites de detección y cuantificación.

Muestra	IRF (100 mL)	IRF (250 mL)	IRF (500 mL)	IRF (1000 mL)
1	105.52	115.51	172.45	118.54
2	109.07	116.36	173.62	118.82
3	107.29	115.88	172.92	117.28
4	109.82	116.99	171.52	119.73
5	107.98	114.93	168.98	117.47
6	105.00	117.20	172.24	119.09
7	106.83	117.88	169.75	117.54
8	106.11	115.70	170.59	119.58
9	107.93	117.26	172.14	120.51
10	110.38	116.58	172.73	119.99
IRF _{media}	107.59	116.43	171.79	118.85
σ_{n-1}	1.80	0.92	1.30	1.13
C_L ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.62	0.11	0.09	0.09
C_0 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	2.06	0.40	0.30	0.30

OTROS PARÁMETROS DE CALIDAD.

En la tabla V.28 se recogen los parámetros analíticos para los distintos volúmenes en estudio.

TABLA V.28.-Parámetros analíticos.

Parámetro	100 mL	250 mL	500 mL	1000 mL
Rango dinámico lineal ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	2.06-80.0	0.4-35.0	0.3-18.0	0.30-7.0
Linealidad (%) ^a	99.74	99.72	99.58	99.40
Sensibilidad analítica ^b ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0.288	0.129	0.095	0.055
Precisión (%) ^c	0.54	0.55	0.80	1.18
Límite de detección ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0.62	0.11	0.09	0.09
Límite de cuantificación ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	2.06	0.40	0.30	0.30

^a Calculada por la expresión $[1-DSR(b)]$

^b Calculada por la expresión $s_{r,c}/b$

^c Calculada por la expresión $DSR(c)=s_c/c$ donde s_c se calcula como:

$$s_c^2 = s_{anal}^2 * (1/n + 1/m) + DSR^2(b) * (c - c_{mala})^2$$

De la tabla V.28 observamos que al aumentar el volumen de trabajo disminuye el rango lineal, disminuyendo tanto el límite inferior como el superior. También disminuye, por lo tanto, el límite de cuantificación. Por último disminuye la sensibilidad y todo ello es debido al aumento de la pendiente de la recta de calibrado al aumentar el volumen de trabajo.

IV.3.-ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS RENDIJAS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN SOBRE LOS PARÁMETROS ESTADÍSTICOS Y DE CALIDAD DEL MÉTODO.

Como sabemos al aumentar la rendija de emisión aumenta la señal de fluorescencia que llega al detector procedente de la muestra, también aumenta la señal correspondiente al gel utilizado como soporte y por tanto el ruido de fondo. Al aumentar la rendija de excitación disminuye la señal de fluorescencia así como el ruido de fondo. Ahora vamos a estudiar como afecta todo esto al calibrado.

Para dicho estudio se preparó una serie de disoluciones de ANA de concentración comprendida entre 3 y 70 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pipeteando de 0.3 a 7 mL de la disolución patrón de 5 mg.L^{-1} en etanol absoluto, en matraces de 500 mL, se añadió 5 mL del tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH=7 y se completó por último al volumen final de 500 mL. A continuación, dichas disoluciones fueron transferidas a botellas de vidrio de 1000 mL y se añadió 100 mg de resina.

Se prepararon así mismo, el blanco correspondiente que fue sometido al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar 10 minutos a 60 r.p.m., se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y variando las rendijas de excitación y emisión entre 2.5-15 y 2.5 y 5 nm respectivamente.

Se realizaron dos réplicas para cada concentración.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla V.29. Los parámetros estadísticos y de calidad se muestran en la tabla V.30.

TABLA V.29.-Rectas de calibrado variando las rendijas de excitación y emisión.

ANA μg.L ⁻¹	IRF						
	15/5	15/4	15/3	15/2.5	10/2.5	5/2.5	2.5/2.5
0.0	0.80	-0.30	-0.60	0.30	2.20	-0.30	-3.50
	8.00	4.60	3.60	2.40	-4.10	-8.90	9.70
3.0	122.64						
	129.14						
5.0		135.81					
		139.15					
6.0	249.89						
	256.11						
9.0	374.52						
	381.89						
10.0		270.25	155.09	94.02	112.87	111.57	118.17
		275.92	151.81	92.32	110.45	107.57	121.67
12.0	508.34						
	501.05						
15.0	628.99	406.37					
	635.22	411.73					
18.0	760.54						
	753.30						
20.0		548.31	311.27	185.82	229.78	227.30	237.91
		544.11	306.91	190.11	226.16	222.42	232.80
25.0		684.53					
		679.26					
30.0		815.33	461.31	283.60	343.27	336.03	355.87
		820.05	466.77	278.25	338.91	340.98	351.10
40.0			622.41	373.38	456.98	450.10	467.84
			617.18	377.21	451.76	455.84	472.33
50.0			770.65	470.97	570.81	569.02	583.81
			774.98	466.15	566.11	564.75	588.15
60.0			925.23	560.27	680.16	676.86	700.10
			930.11	565.91	685.90	681.10	705.22
70.0				659.25	798.90	790.47	817.89
				654.81	794.05	794.99	822.75

TABLA V.30.-Parámetros estadísticos y de calidad.

Parámetro	15/5	15/4	15/3	15/2.5	10/2.5	5/2.5	2.5- /2.5
a	1.99	1.59	0.34	0.28	-1.14	-3.72	2.92
b	41.92	27.20	15.46	9.37	11.40	11.39	11.67
S_{urfc}	3.9893	2.6538	2.6439	2.3539	2.6483	2.9900	3.4456
Lack of fit	94.61%	99.82%	95.41%	99.33%	99.51%	98.83%	99.97%
r^2	99.98%	99.99%	99.99%	99.99%	99.99%	99.99%	99.99%
Rango lineal $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.3-18	0.5-30	0.4-60	0.5-70	0.6-70	0.9-70	0.9-70
Sensibili- dad analí- tica $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.095	0.097	0.171	0.251	0.232	0.262	0.295
Precisión %	0.80	0.50	0.43	0.54	0.50	0.56	0.63
LD $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.09	0.14	0.13	0.14	0.18	0.26	0.28
LQ $\mu\text{g.L}^{-1}$	0.30	0.46	0.45	0.47	0.60	0.86	0.94

De la tabla anterior podemos deducir:

-Al disminuir la rendija de emisión la pendiente disminuye, el rango lineal aumenta, el límite de detección y de cuantificación aumentan y también aumenta la sensibilidad.

-Al disminuir la rendija de excitación la pendiente aumenta ligeramente, el rango lineal permanece igual y el límite de detección y cuantificación y la sensibilidad aumentan.

IV.4.-CÁLCULO DEL COEFICIENTE DE DISTRIBUCIÓN (D) PARA EL ANA.

K. Yoshimura y colaboradores (referencia monsa) definen el coeficiente de distribución (D) para esta técnica de preconcentración en fase sólida como:

$$D = \frac{\text{mmoles de analito adsorbidos/kg de resina seca}}{\text{moles de analito en disolución/l de disolución}}$$

Para realizar la estimación de dicho coeficiente preparamos tres matraces de 500 mL con $9 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA y 5 mL de tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a $\text{pH}=7$, por último se completó al volumen final a 500 mL. A continuación se añadió 100 mg de resina. Tras agitar 10 minutos a 60 r.p.m. se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

Al filtrado se le realizó una segunda extracción con 100 mg de resina y se midió la intensidad de fluorescencias en las condiciones de trabajo.

En las mismas condiciones se realizó el blanco.

A partir de los valores de la intensidad relativa de fluorescencia, haciendo uso de la recta de calibrado, podemos estimar la cantidad de analito que se fija en el soporte en la primera y en la segunda extracción. Así como ver si es necesario una tercera extracción.

En la tabla V.31 se muestran los resultados.

TABLA V.31.-Coeficiente de distribución.

IRF 1ª extrac.	IRF 2ª extrac.	mmoles ANA adsorbidos	mmoles ANA en disoluc.	D
316.39	64.87	2.014E-5	0.403E-5	24988
310.46	70.80	1.976E-5	0.441E-5	22404
313.27	67.99	1.994E-5	0.423E-5	23570

De la tabla anterior podemos concluir que una primera extracción es suficiente para que la fijación del ANA sobre QAE sea

cuantitativa. El valor medio del coeficiente de distribución es 23654.

V.-PROCEDIMIENTO OPERATORIO.

La optimización de las variables que influyen sobre la intensidad de fluorescencia del ANA fijado sobre Sephadex QAE-A-25 realizada anteriormente nos permite proponer los procedimientos operatorios para la determinación de ésta especie dependiendo del volumen de muestra. A continuación se describe el correspondiente a 500 mL, teniendo en cuenta que así mismo es válido para cualquiera de los volúmenes indicados siempre que esté dentro del rango óptimo señalado para cada uno de ellos.

Se toma una alícuota de la muestra que contenga entre 0.3 y 18 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA en un matraz de 500 mL, se añade 5 mL del tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.2 M a pH=7 y se completa por último al volumen final de 500 mL. A continuación, dicha disolución se transfiere a una botella de vidrio de 1000 mL y se añade 100 mg de resina.

Se prepara así mismo, el blanco correspondiente que se somete al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar 10 minutos a 60 r.p.m., se filtra. Con ayuda de un gotero se llena la cubeta, se registra el espectro de emisión y se mide la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión 15 y 5 nm respectivamente.

Una vez restada la contribución del blanco, la concentración de ANA presente en la muestra se determina interpolando el valor de IRF obtenido en la recta de calibrado, bajo las mismas condiciones experimentales, para disoluciones de concentración conocida de ANA y que abarca el rango dinámico lineal prefijado.

VI.-SELECTIVIDAD: ESTUDIO DE INTERFERENTES.

Con objeto de investigar la selectividad del método fluorimétrico propuesto, estudiamos el efecto que la presencia de otras fitohormonas ejerce en la determinación de ANA fijada sobre QAE.

Como criterio para decidir si la sustancia es o no interferente hemos seguido el descrito en el capítulo II.

En la tabla V.32 se muestran los valores obtenidos, siendo R la señal analítica predicha a partir del calibrado; s_R , desviación estándar de la señal predicha y t ($\alpha=0.10$, n-2 grados de libertad).

TABLA V.32.-Intervalos de confianza sobre la señal predicha.

ANA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	R	s_R^a	$\Delta R(\pm)$	ICR
3.0	127.77	3.016	5.3745	122.39-133.14
6.0	253.54	3.016	5.3745	248.16-258.91
9.0	379.32	3.016	5.3745	373.94-384.69
12.0	505.09	3.016	5.3745	499.71-510.46
15.0	630.86	3.016	5.3745	625.48-636.23
18.0	756.64	3.016	5.3745	751.26-762.01

$$t(\alpha=0.10, 12 \text{ gl})=1.782$$

$$^a s_R^2 = s_{\text{ir.c.}}^2 (1/n + 1/m) + \text{DSR}^2(b) (R-R_{\text{mín.}})^2$$

La concentración seleccionada sobre la que se han ensayado distintos interferentes es de $9.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

La experiencia que se llevó a cabo fue la siguiente: se preparó una serie de disoluciones de ANA de concentración $9.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ pipeteando 4.5 mL de la disolución patrón de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en etanol absoluto, en matraces de 500 mL, se añadió 5 mL del tampon KH_2PO_4 -/ K_2HPO_4 0.2 M a pH=7 y cantidades decrecientes de cada uno de las fitohormonas ensayadas como posibles interferentes hasta alcanzar un valor de intensidad de fluorescencia comprendido dentro del intervalo de confianza. Se completó por último al volumen final

de 500 mL. A continuación, dichas disoluciones fueron transferidas a botellas de vidrio de 1000 mL y se añadió 100 mg de resina.

Se prepararon así mismo, el blanco correspondiente que fue sometido al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar 10 minutos a 60 r.p.m., se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión 15 y 5 nm respectivamente.

En la tabla V.33 se muestran los valores de intensidad de fluorescencia, a partir de los cuales es posible deducir la función polinómica que mejor se ajusta a la respuesta de cada interferente, mediante el método interpolación de Lagrange. El punto de corte de este polinomio con la banda superior o inferior del intervalo de confianza obtenido sobre la predicción de la señal correspondiente a $9.0 \mu\text{g.L}^{-1}$, nos indicará la concentración tolerada de sustancia interferente en todo el rango de aplicación del método. Todos los valores de señal que no estén incluidos dentro de ese intervalo, deducido a partir de los datos de calibrado, implican que la sustancia es interferente al nivel de concentración ensayado.

Para la concentración de ANA que hemos seleccionado, $9.0 \mu\text{g.L}^{-1}$, el intervalo de confianza sobre la señal de fluorescencia predicha, a partir de los datos de calibrado es:

$$\text{IRF} \in 379.32 \pm 5.37$$

Según esto, todos los valores de concentración de fitohormona extraña cuya intensidad de fluorescencia no esté comprendida en el intervalo (373.94-384.69), serán considerados como interferencia.

TABLA V.33.-Estudio de interferencias.

Fitohormona	C_x/C_{ANA}	C_x ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	$\log C_x$	R
AIB	0.044	0.4	-0.40	584.86
	0.033	0.3	-0.52	560.15
	0.022	0.2	-0.70	501.24
	0.011	0.1	-1.00	480.28
AIA	0.044	0.4	-0.40	521.85
	0.033	0.3	-0.52	510.69
	0.022	0.2	-0.70	483.92
	0.011	0.1	-1.00	475.16
AHIA	0.033	0.3	-0.52	553.22
	0.011	0.1	-1.00	487.32
AIP	0.066	0.6	-0.22	522.37
	0.055	0.5	-0.30	513.91
	0.044	0.4	-0.40	502.14
	0.033	0.3	-0.52	489.80
	0.022	0.2	-0.70	478.90
	0.011	0.1	-1.00	460.69
ANA-A	10.0	90.0	1.95	420.30
	8.9	80.0	1.90	400.52
	7.5	67.5	1.83	381.45
	5.0	45.0	1.65	375.61
ZIRAM	52.0	468.0	2.67	197.97
	26.0	234.0	2.37	274.53
	13.0	117.0	2.07	306.05
	6.5	58.5	1.77	349.57
	3.0	27.0	1.43	369.08
	2.0	18.0	1.25	380.27

La cantidad tolerada para cada una de las fitohormonas ensayadas, en la determinación de ANA fijada sobre QAE, así como la relación de tolerancia encontrada para la concentración de interferente se relaciona en la tabla V.34.

TABLA V.34.-Niveles de tolerancia ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

Fitohormonas	C_x/C_{ANA}	C_i
AIB	0.0	0.0
AIA	0.0	0.0
AHIA	0.0	0.0
AIP	0.0	0.0
ANA-A	8.0	72.0
ZIRAM	2.5	22.5

Los principales interferentes encontrados han sido AIA, AIB, AIP y AHIA provocando aumentos de la señal de fluorescencia.

La presencia de ANA-A no interfiere hasta una relación molar de 8:1 y la presencia de ZIRAM de 1.5:1.

VII.-APLICACIONES ANALÍTICAS.

El método propuesto para la determinación de ANA ha sido aplicado a formulaciones comerciales y agua potable de la ciudad de Granada.

VII.1.-DETERMINACIÓN DE ANA EN FORMULACIONES COMERCIALES.

Para comprobar la utilidad y exactitud del método propuesto, éste ha sido aplicado a formulaciones comerciales de fitohormonas tales como:

Fruitone (Etisa)	ANA	0.45%
	ANA-A	1.20%
Etifix (Etisa)	ANA	1.00%
Rhizopon B (Proflor)	ANA	0.20%
Raifort F (Riba Quimiagra)	ANA	0.40%
	ZIRAM	10.00%

En primer lugar observamos que en la primera muestra Fruitone el ANA-A es un posible interferente, pero no ocurre esto ya que la relación que existe es 2.7:1 y la relación tolerada es 8:1.

En la última muestra el ZIRAM si que es posible interferente ya que existe en una relación que es mucho mayor que la tolerada (1.5:1) aunque al no ser fluorescente su presencia puede ser corregida mediante el empleo de la metodología de la adición de patron.

A continuación se describe las experiencias realizadas en las diferentes formulaciones comerciales.

VII.1.1.-Determinación de ANA en Fruitone, Etifix y Rizopon B.

A 100.0 mg de muestra se le añaden 100 mL de etanol absoluto y se tratan en el baño de ultrasonidos, se filtra y del filtrado se coge una alicuota y se le aplica el procedimiento operatorio.

Puesto que conocemos el contenido nominal de los analitos en la muestra, vamos a validar el método por comparación del resultado con un valor de referencia.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.35.

TABLA V.35.-Determinación de ANA en formulaciones comerciales.

Muestra	Composición (%)	Encontrado* (%)	t_{exp} **	p(%)
Fruitone	ANA 0.45	0.447±0.042	0.35	74.3
	ANA-A 1.20			
Etifix	ANA 1.00	0.991±0.048	1.10	33.3
Rizopon B	ANA 0.20	0.191±0.043	1.35	24.8

* Media y desviación estándar de cinco determinaciones.

$$** t_{exp} = |x_m - x_R| \cdot n^{1/2} / s$$

$$t(\alpha=0.05, n-1=4 \text{ gl})=2.776$$

Como podemos observar de los datos de la tabla V.35 los valores obtenidos no son significativamente distintos de los valores de referencia con $p \geq 5\%$, lo cual implica que el método es exacto.

VII.1.2.-Determinación de ANA en Raifort F.

Como hemos comentado anteriormente vamos a analizar la muestra Raifort F (ANA 0.40% y ZIRAM 10.00%) mediante la metodología de adición de patrón. Dicha metodología requiere el establecimiento de tres calibrados distintos:

-Calibrado con patrones: CP (Rango entre 0.3-18 $\mu\text{g.L}^{-1}$, tabla V.17).

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

Se obtiene mediante adición, en matraces de 500 mL, de concentraciones crecientes de ANA, a un volumen constante de disolución de muestra tratada igual a 0.2 mL, procedente del tratamiento de muestra indicado anteriormente, aplicando posteriormente el procedimiento operatorio.

-Calibrado de Youden: CY.

Se lleva a cabo introduciendo, en matraces de 500 mL, volúmenes crecientes (0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mL) de la disolución procedente del tratamiento de la muestra, sin adición alguna y aplicando el procedimiento operatorio.

Las señales analíticas correspondiente a los tres calibrados, registradas a las longitudes de onda de 280 y 336 nm, excitación y emisión respectivamente y utilizando rendijas de 15 y 5 nm respectivamente, se muestran en la tabla V.36.

TABLA V.36.-Señales de fluorescencia correspondientes a los calibrados CA y CY.

Calibrados	ANA _{adic.} $\mu\text{g.L}^{-1}$	Muestra mg.L^{-1}	IRF
CA	0	0.4	39.64
	3		162.20
	6		280.17
	9		405.05
CY	0	0.4	40.84
		0.6	49.29
		0.8	57.16
		1.0	67.46

Los parámetros característicos de los tres calibrados se reflejan en la tabla V.37.

TABLA V.37.-Valores numéricos de los parámetros correspondientes a las rectas CP, CA y CY.

Parámetros	CP	CA	CY
n	14	4	4
a	1.99	39.64	22.98
b	41.92	40.47	43.86
$s_{\text{inf.c}}$	3.9893	1.9948	0.8089
$r^2(\%)$	99.98	99.99	99.60

A partir de estos datos se aplica el procedimiento estadístico para llevar a cabo la determinación del analito en presencia de efecto matriz [71] y aprovechando esta metodología validar el método analítico propuesto.

Los pasos a seguir son:

-Comparación de pendientes.

Para poder validar una determinación analítica mediante el método de adición de patrón, es necesario que esta adición provoque exclusivamente un error sistemático constante, es decir que la adición de cantidades crecientes del analito a una cantidad constante de muestra no debe afectar a la pendiente del calibrado con patrones, ya que sino el error sería proporcional a la cantidad adicionada y sería inviable la validación de este modo.

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

Los resultados del test aparecen en la tabla V.38.

TABLA V.38.-Resultados de la comparación de pendientes de los calibrados CP y CA.

s_p	3.7695
$t(b)$	1.48 (P=2.65%)
b_p	41.81

Valor crítico 2.977 (1%)

Se comprueba que el valor del estadístico $t(b)$ calculado es menor que el valor t tabulado con un nivel de significación al 1% para n_p+n_m-4 grados de libertad, por tanto, las pendientes son iguales con un valor P del 2.65%, pudiéndose estimar un valor promedio, b_p entre las pendientes de ambos calibrados y siendo posible la validación.

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

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

Debido a que la ordenada del calibrado de Youden no está incluida en el intervalo de confianza del calibrado con patrones (ver tabla V.35), podemos deducir que existe una componente de error sistemático debido al efecto matriz de la muestra. Esta "blanco" de la muestra o Blanco de Youden deberá ser sustraído de todas las medidas fluorimétricas llevadas a cabo con objeto de obtener una adecuada determinación del contenido de ANA.

Estos resultados se muestran en la tabla V.39.

TABLA V.39.-Nuevas ordenadas en el origen y Blanco de Youden.

Ordenadas	CP	CA	CY
a' BY	3.03	37.26	19.95

-Comprobación de la exactitud.

Se ha llevado a cabo comparando los contenidos en ANA en la disolución a medir obtenidos utilizando directamente la recta de calibrado y mediante el calibrado con adición de patrón. Dicha comparación se realiza mediante el cálculo del estadístico $t(c)$. Los resultados se muestran en la tabla V.40 y se observa que no existe discrepancia entre los resultados. La comparación concluye no encontrando diferencia significativa entre los contenidos calculados ya que el valor del estadístico $t(c)$ es menor que el valor tabulado para $n_{CP}+n_{CA}-3$ grados de libertad al nivel de significación seleccionado, aceptándose que el método es exacto con un valor P mayor del 5%.

TABLA V.40.-Comprobación de la exactitud: contenido de ANA por CP y CA.

C_{ANA}	CP	CA	CY
$C_{ANA} (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	0.40	0.34	
	$t(c) = 1.11$ (P=28.44%) Valor crítico 2.13 (5%)		
$C_{muestra} (\%)$	0.40	0.34	0.42

-Análisis de la muestra.

Una vez realizada la validación del método espectrofluorimétrico propuesto, en este tipo de matriz, se han llevado a cabo tres análisis de diferentes porciones de muestra, siendo determinado el contenido de ANA mediante el uso directo de la recta de calibrado una vez eliminado el "Blanco de Youden" o blanco de la muestra, calculado en la experiencia anterior. Los resultados se muestran en la tabla V.41.

TABLA V.41.-Determinación de ANA en la muestra Raifort F.

Muestra (mL)	ANA $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	ANA %
0.3	0.64	0.418
0.4	0.83	0.407
0.5	1.07	0.420

$$\text{ANA}_{\text{media}} (\%) = 0.415$$

$$s_{\text{ANA}} = 0.007$$

$$\text{DER} = 1.69\%$$

Del resultado de la tabla anterior comprobamos que el contenido de ANA en Raifort F es de 0.415%.

VII.2.-DETERMINACIÓN DE ANA EN AGUA POTABLE DE LA CIUDAD DE GRANADA.

Para la determinación de ANA en agua potable de Granada se ha aplicado la metodología de adición de patron. Para ello se establecen los tres calibrados: calibrado con patrones, calibrado con adición de patron tomando 475 ml de muestra añadiendole cantidad de patron creciente y aplicando el procedimiento operatorio y el calibrado de Youden tomando 100, 200, 300 y 400 mL de muestra, se lleva a 500 mL y se aplica el procedimiento operatorio.

Las señales analíticas correspondiente a los tres calibrados, registradas a las longitudes de onda de 280 y 336 nm, excitación y emisión respectivamente y utilizando rendijas de 15 y 5 nm respectivamente, se muestran en la tabla V.42.

TABLA V.42.-Señales de fluorescencia correspondientes a los calibrados CA y CY.

Calibrados	ANA _{anal.} μg.L ⁻¹	Muestra mL	IRF
CA	0	475	25.93
	5		233.93
	10		447.93
	15		654.93
CY	0	100	7.67
		200	11.89
		300	18.27
		400	21.77

Los parámetros característicos de los tres calibrados se reflejan en la tabla V.43.

TABLA V.43.-Valores numéricos de los parámetros correspondientes a las rectas CP, CA y CY.

Parámetros	CP	CA	CY
n	14	4	4
a	1.99	25.53	2.73
b	41.92	42.02	24.34
s _{inf.c}	3.9893	2.0857	0.8366
r ² (%)	99.98	99.98	98.83

A partir de estos datos se aplica el procedimiento estadístico propuesto por Luis..... para llevar a cabo la determinación del analito y aprovechando esta metodología validar el método analítico propuesto.

Los pasos a seguir son:

-Comparación de pendientes.

Para poder validar una determinación analítica mediante el método de adición de patrón, es necesario que esta adición provoque exclusivamente un error sistemático constante, es decir que la adición de cantidades crecientes del analito a una cantidad constante de muestra no debe afectar a la pendiente del calibrado

con patrones, ya que sino el error sería proporcional a la cantidad adicionada y sería inviable la validación de este modo.

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

Los resultados del test aparecen en la tabla V.44.

TABLA V.44.-Resultados de la comparación de pendientes de los calibrados CP y CA.

s_p	3.7765
$t(b)$	0.265 (P=79.5%)
b_p	41.94

Valor crítico 2.977 (1%)

Se comprueba que el valor del estadístico $t(b)$ calculado es menor que el valor t tabulado con un nivel de significación al 1% para n_p+n_m-4 grados de libertad, por tanto, las pendientes son iguales con un valor P del 79.5%, pudiéndose estimar un valor promedio, b_p , entre las pendientes de ambos calibrados y siendo posible la validación.

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

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

Debido a que la ordenada del calibrado de Youden está incluida en el intervalo de confianza del calibrado con patrones podemos deducir que no existe efecto matriz de la muestra.

Estos resultados se muestran en la tabla V.45.

TABLA V.45.-Nuevas ordenadas en el origen.

Ordenadas	CP	CA
a'	1.86	26.13

-Comprobación de la exactitud.

Se ha llevado a cabo comparando los contenidos en ANA en la disolución a medir obtenidos utilizando directamente la recta de calibrado y mediante el calibrado con adición de patrón. Dicha comparación se realiza mediante el cálculo del estadístico $t(c)$. Los resultados se muestran en la tabla V.46 y se observa que no existe discrepancia entre los resultados. La comparación concluye no encontrando diferencia significativa entre los contenidos calculados ya que el valor del estadístico $t(c)$ es menor que el valor tabulado para $n_{CP}+n_{CA}-3$ grados de libertad al nivel de significación seleccionado, aceptándose que el método es exacto con un valor P mayor del 5%.

TABLA V.46.-Comprobación de la exactitud: contenido de ANA por CP y CA.

C_{ANA}	CP	CA	CY
$C_{ANA} (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	0.55	0.56	
	$t(c) = 0.20$ (P=84.4%) Valor crítico 2.13 (5%)		
$C_{muestra} (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	0.58	0.59	0.58

Como podemos observar de la tabla anterior nuestro método es válido y encontramos que en el agua potable de Granada se detecta la presencia de $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ANA. Este resultado pensamos validarlo mediante el empleo de otra técnica.

-Análisis de la muestra.

Una vez realizada la validación del método espectrofluorimétrico propuesto, en este tipo de matriz, se han llevado a cabo tres análisis de diferentes porciones de muestra, siendo determinado el contenido de ANA mediante el uso directo de la recta de calibrado. Los resultados se muestran en la tabla V.47.

TABLA V.47.-Determinación de ANA en agua potable de Granada.

Muestra (mL)	ANA $\mu\text{g.L}^{-1}$
200	0.59
300	0.65
400	0.59

$$\text{ANA}_{\text{media}} = 0.610 \mu\text{g.L}^{-1}$$

$$s_{\text{ANA}} = 0.035$$

$$\text{DER} = 5.74\%$$

CAPÍTULO VI
DETERMINACIÓN SIMULTANEA DE ACIDO
1-NAFTILACÉTICO Y 1-NAFTILACETAMIDA.

El ANA y ANA-A como se indica en la Introducción son fitohormonas de amplia aplicación en gran parte de productos hortofrutícolas encontrándose además juntos diferentes formulaciones comerciales de ahí la importancia de proponer un método para su determinación simultánea.

En este capítulo nos planteamos el estudio de la mezcla binaria constituida por ANA y ANA-A. Debido al gran solapamiento de los espectros tanto de excitación como de emisión de ambos analitos en disolución, lo que imposibilita su resolución, hemos hecho uso además de la espectrofluorimetría en fase sólida.

I.-CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES.

I.1.-ESPECTROS DE LUMINISCENCIA TOTAL.

Para conseguir una descripción completa de las características fluorescentes de cada compuesto, se registran los correspondientes espectros tridimensionales. Para ello se prepararon tres disoluciones, en matraces de 10 mL. Una disolución de concentración 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA, otra de la misma concentración de ANA-A y la tercera la mezcla de las anteriores. Del mismo modo, pero sin adicionar los analitos, se preparó un blanco. A continuación, con la ayuda de un gotero, se llenó la cubeta y se procedió al registro de los espectros en las siguientes condiciones:

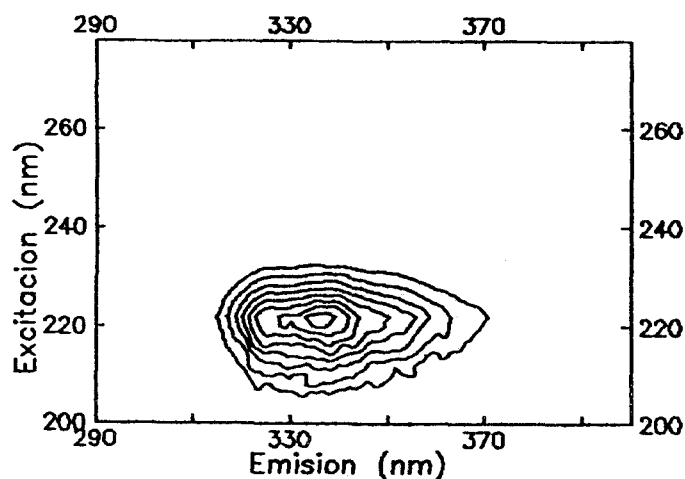
- Intervalo de emisión entre 300 y 400 nm.
- Intervalo de excitación entre 200 y 300 nm.
- Variación de 2 en 2 nm de la λ_{exc} para cada barrido de emisión.
- Realización de 50 barridos.
- Rendijas de excitación y emisión de 5 y 5 nm respectivamente.
- Velocidad de barrido de 240 nm/min.

El blanco se registra en las mismas condiciones y se le resta a los espectros de los analitos con objeto de hacer desaparecer la línea Rayleigh.

Una vez obtenidos los espectros de luminiscencia total de los dos analitos y de su mezcla se representan mediante curvas de nivel o topogramas, los cuales nos permiten, entre otras ventajas, determinar el máximo del sistema con gran precisión.

En la figura VI.1 se representa el topograma del ANA, del ANA-A y de la mezcla de ambos.

FIGURA VI.1.-Topograma de ANA y ANA-A.

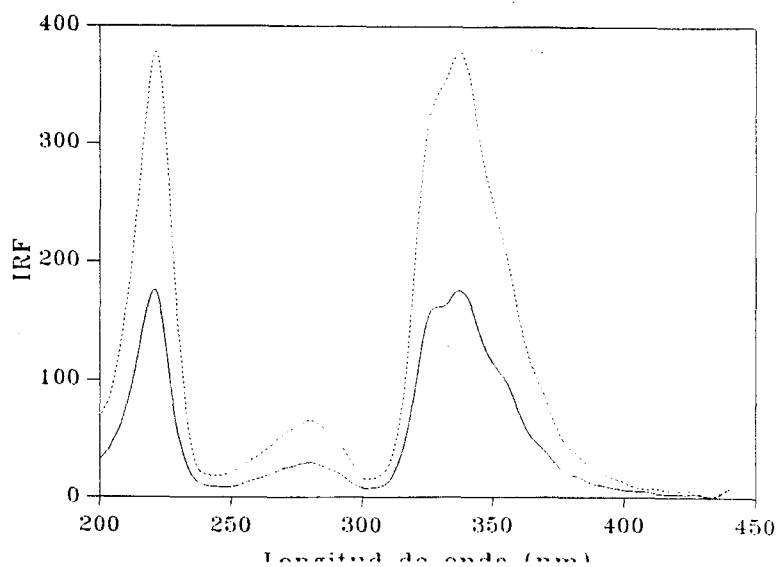


De la observación de la figura VI.1 puede observarse que los espectros de excitación y emisión de ambas sustancias son prácticamente iguales.

I.2.-ESPECTROS BIDIMENSIONALES.

Del espectro de luminiscencia total se extraen, mediante la opción correspondiente del programa utilizado, los espectros de emisión y excitación más intensos del conjunto. Así se obtuvieron los espectros bidimensionales representados en la figura VI.2

FIGURA VI.2.-Espectros de excitación y emisión del ANA y ANA-A.



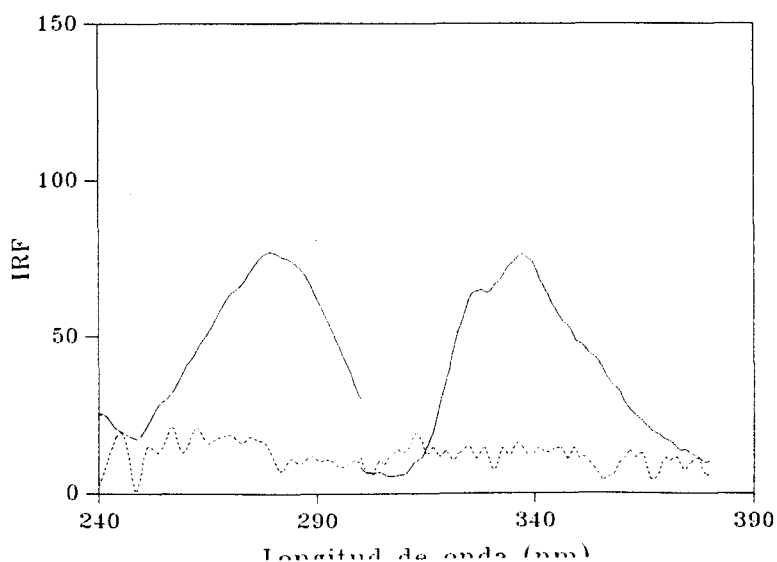
En la figura VI.2 se observa aún más claramente la idéntica morfología que presentan los espectros de excitación y emisión del ANA y ANA-A siendo la λ_{exc} 222 nm para ambos y λ_{em} 336 y 337 nm para el ANA y el ANA-A respectivamente.

Ante la imposibilidad de acometer la resolución de la mezcla de forma convencional mediante espectrofluorimetría clásica, sincrónica y sincrónica derivada optamos por hacer uso de la espectrofluorimetría en fase sólida (EFS).

En el capítulo V se ha puesto de manifiesto el diferente comportamiento de ambos analitos al ser tratada su disolución con resina Sephadex QAE-A-25 y DEAE-A-25. Estos hechos nos hacen pensar en la posibilidad de una fijación selectiva del ANA al ser tratada la disolución de ambos con la resina QAE según la metodología seguida en la espectrofluorimetría en fase sólida. Para ello se operó de la siguiente manera:

Se preparó una disolución con las mismas concentraciones de ANA y ANA-A pero en este caso añadiendo 50 mg de QAE y agitando durante 2.5 minutos, se filtró y se recogió la resina con ayuda de un gotero. Se registraron los espectros en las mismas condiciones excepto la rendija de excitación que paso a ser de 15 nm. De los espectros de luminiscencia total se obtubieron los espectros bidimensionales que se representan en la figura VI.3.

FIGURA VI.3.-Espectros de excitación y emisión del ANA (—) y ANA-A (--) fijados sobre resina QAE.



De la figura VI.3 obtenemos que el ANA se fija sobre la resina QAE con las siguientes longitudes de onda: $\lambda_{exc}=280$ nm y $\lambda_{em}=336$ nm. Pero tenemos que el ANA-A no se fija en la resina. A la disolución resultante del filtrado se le registró los espectros bidimensionales en las condiciones de disolución: $\lambda_{exc}=222$ nm y $\lambda_{em}=337$, rendijas de excitación y emisión de 5 nm. Obtenemos unos espectros bidimensionales iguales a los representados en la figura VI.2 con lo cual vamos a establecer un método para la determinación simultánea de ANA y ANA-A, determinando ANA en fase sólida y el ANA-A en la disolución resultante del filtrado de la resina.

II.-OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.

II.1.-ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL ANA FIJADO SOBRE QAE Y DEL ANA-A EN DISOLUCIÓN.

Para estudiar la influencia del tiempo sobre la intensidad de fluorescencia del ANA fijado sobre QAE y del ANA-A en disolución se ha seguido el procedimiento que se describe a continuación:

Se preparó una disolución que contenía $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA y $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA-A en un volumen final de 10 mL, pipeteando 0.2 mL de una disolución patrón de 1 mg.L^{-1} en etanol absoluto de cada analito. La disolución se transfirió a un matraz de 10 mL y se adicionaron 50 mg de resina QAE. Después de agitar durante 2.5 minutos, se filtró la disolución. A continuación, con la ayuda de un gotero, se llenó la cubeta y se registró el espectro de emisión y se midió la variación de la intensidad de fluorescencia con el tiempo con una $\lambda_{exc} = 280$ nm y $\lambda_{em} = 336$ nm y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente. A la disolución proveniente del filtrado se le registró el espectro de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia con una $\lambda_{exc} = 222$ nm y $\lambda_{em} = 337$ nm y rendijas de excitación y emisión de 5 y 5 nm respectivamente.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VI.1.

TABLA VI.1.-Estabilidad del ANA fijado sobre QAE y del ANA-A en disolución.

Tiempo (minutos)	IRF	
	ANA	ANA-A
0	88.92	193.87
1	90.15	191.65
2.5	89.45	192.84
5	86.57	193.41
10	87.99	191.54
15	90.87	193.08
60	91.04	191.62
120	75.32	192.35
180	61.76	191.25

De los resultados de la tabla VI.1 podemos afirmar que el sistema es perfectamente estable, permaneciendo prácticamente constante la intensidad de fluorescencia relativa del sistema durante al menos una hora produciéndose una disminución de aproximadamente un 15% para el ANA y para el ANA-A es perfectamente estable.

II.2.-INFLUENCIA DEL PH SOBRE EL ANA FIJADA SOBRE QAE Y DEL ANA-A EN DISOLUCIÓN.

Para estudiar la posible influencia que pueda ejercer la acidez del medio sobre la intensidad de fluorescencia del ANA fijada sobre QAE y del ANA-A en disolución, se realizó la siguiente experiencia:

Se prepararon dieciseis disoluciones de concentración 20.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para cada analito, pipeteando 0.2 mL de la disolución patrón de 1 mg.L^{-1} en etanol absoluto, en matraces de 10 mL y tras añadir agua desionizada hasta prácticamente el enrase, se ajusto el pH de forma aproximada añadiendo ácido clorhídrico o hidróxido sódico de distintas concentraciones según procediera completándo-

se por último al volumen final de 10 mL. A continuación se añadieron 50 mg de resina.

Se prepararon así mismo, los blancos correspondientes que fueron sometidos al mismo tratamiento que las muestras. Tras agitar las disoluciones durante 2.5 minutos, se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y, una vez medido el pH del filtrado, se registraron los espectros de emisión y excitación (para observar posibles desplazamientos en las longitudes de onda correspondientes) en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 336$ nm y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

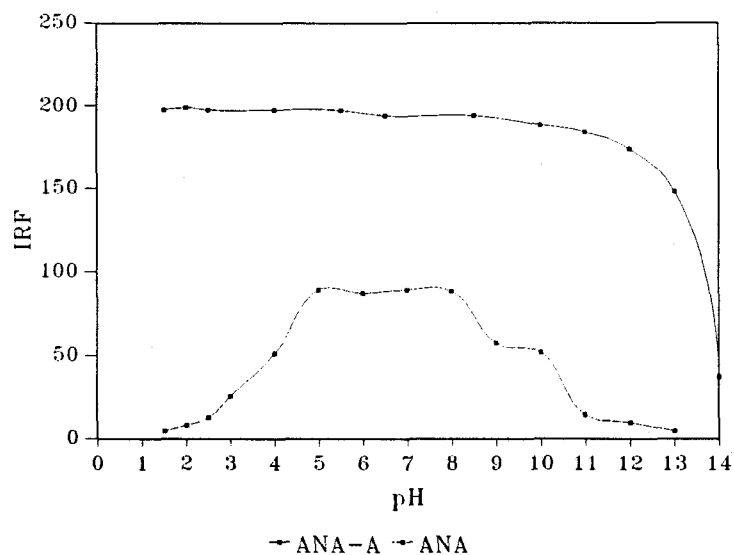
Para el ANA-A se tomó la disolución resultante del filtrado y se registraron los espectros de emisión y excitación (para observar posibles desplazamientos en las longitudes de onda correspondientes) en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc} = 222$ nm, $\lambda_{em} = 337$ nm y rendijas de excitación y emisión de 5 y 5 nm respectivamente.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla VI.2 y se muestran de forma gráfica en la figura VI.4.

TABLA VI.2.-Influencia del pH del ANA fijada sobre QAE y del ANA-A en di solución.

pH	IRF	
	ANA	ANA-A
1.5	4.55	197.56
2.0	7.84	199.01
2.5	12.64	197.57
3.0	25.85	197.57
4.0	51.18	197.57
5.0	88.91	197.14
6.0	87.18	197.14
6.5	88.21	196.51
7.0	89.12	194.03
8.0	88.11	193.80
9.0	57.20	193.87
10.0	51.87	188.31
11.0	14.28	183.90
12.0	9.30	173.44
13.0	4.32	148.13
14.0	3.25	37.23

FIGURA VI.4.-Influencia del pH sobre la emisión de fluorescencia del ANA fijada sobre QAE y del ANA-A en disolución.



De la observación de la tabla VI.2 y la figura VI.4 podemos afirmar que el intervalo de pH óptimo de trabajo está comprendido entre pH 5 y pH 8, por lo que tamponamos a pH=7. Para ello elegimos el tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.01 M.

Como indicamos en el capítulo V la fuerza iónica y el tampon van a influir en la intensidad de fluorescencia por lo que ya no repetimos dicha experiencia y el volumen de tampon utilizado será 0.1 mL.

II.3.-TIEMPO DE EQUILIBRACIÓN DE LA RESINA.

Esta experiencia consiste en variar el tiempo de agitación del sistema en estudio.

Para dicho estudio, se preparó una serie de disoluciones de ANA de concentración $20.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ pipeteando 0.2 mL de la disolución patrón de 1 mg.L^{-1} en etanol absoluto, en matraces de 10 mL, se añadió 0.1 mL del tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.01 M a pH=7 y se completó por último al volumen final de 10 mL. A continuación se añadió 50 mg de resina.

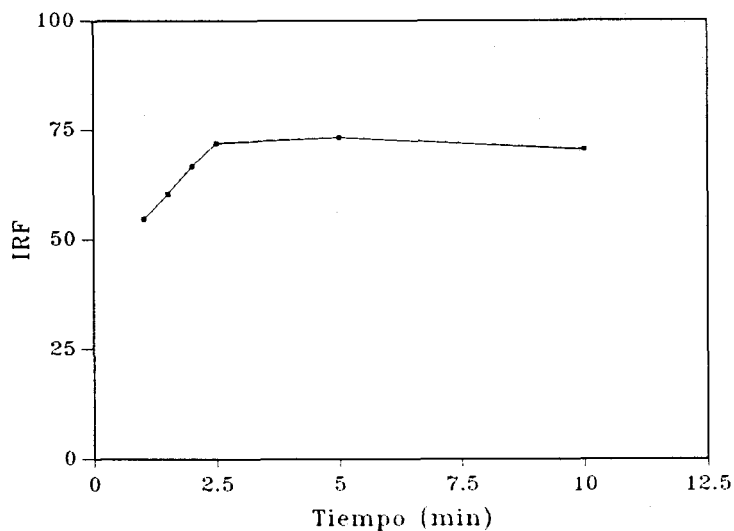
Se prepararon así mismo, los blancos correspondientes que fueron sometidos al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar con periodos de tiempo crecientes, se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VI.3 y en la figura VI.5.

TABLA VI.3.-Tiempo de equilibración de la resina.

Tiempo (minutos)	IRF
1.0	54.67
1.5	60.35
2.0	64.65
2.5	71.94
5.0	73.21
10.0	70.54

FIGURA VII.5.-Tiempo de equilibración de la resina.



Como puede observarse en la figura VI.5, la intensidad de fluorescencia aumenta inicialmente al aumentar el tiempo de agitación, hasta alcanzar un valor máximo a los dos minutos y medio, a partir del cual permanece prácticamente constante. Para sucesivas experiencias se eligió como tiempo de equilibración de la resina el de 2.5 minutos.

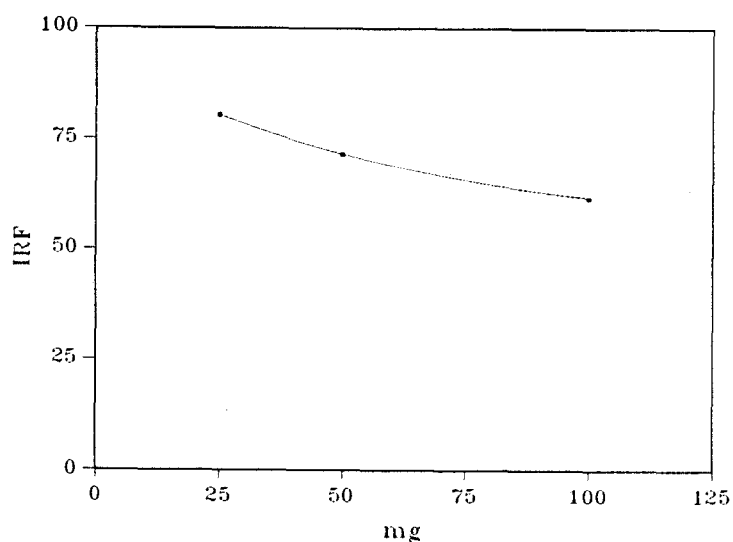
II.4.-INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE RESINA.

La experiencia se llevó a cabo preparando una serie de disoluciones a las que se añadieron cantidades crecientes de resina. Estas disoluciones contenían, en un volumen de 10 mL, una concentración de ANA de $20.0 \mu\text{g.L}^{-1}$. Se añadieron cantidades crecientes de resina QAE, y tras agitar durante 2.5 minutos se filtraron las disoluciones y la resina se empaquetó en la cubeta de 1 mm de espesor. Se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las condiciones de trabajo habituales, restándose posteriormente la contribución del blanco. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VI.4 y se representan en la figura VI.6.

TABLA VI.4.-Cantidad de resina.

Cantidad de resina (mg)	IRF
25	80.36
50	71.52
100	61.56

FIGURA VI.6.-Influencia de la cantidad de resina.



Puede observarse, en la figura VI.6, que al aumentar la cantidad de resina añadida, disminuye la intensidad de fluorescencia. Como consecuencia, la cantidad de resina a utilizar debe ser la mínima posible. Este valor viene limitado por la cantidad mínima necesaria para llenar la cubeta, que en nuestro caso concreto se fijó en 50 mg.

II.5.-RESUMEN DE LA OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES PARA EL ANA FIJADO SOBRE QAE Y EL ANA-A EN DISOLUCIÓN.

En la tabla VI.5 se resumen los valores óptimos encontrados en las experiencias anteriores y que a partir de ahora van a ser utilizados en todas y cada una de las determinaciones a realizar.

TABLA VI.5.-Resumen de la optimización de variables.

Variable	Valor óptimo	
	ANA	ANA-A
Longitudes de onda de excitación y emisión (nm)	280/336	222/337
Rendijas de excitación y emisión	15/5	5/5
Estabilidad		
pH	7	
Tampon	0.1mL $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.01M	
Fuerza iónica	Afecta	
Temperatura	20 °C	
Tiempo de agitación	2.5 min	
Cantidad de resina	50 mg	
Volumen de agitación	10 mL	

III.-CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO.

III.1.-RECTAS DE CALIBRADO.

Vamos a establecer dos rectas de calibrado, una para cada analito en estudio. Se preparó una serie de disoluciones que contenían concentraciones crecientes de ANA y ANA-A a partir de las disoluciones patrón de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en etanol absoluto, en matraces de 10 mL, se añadió 0.1 mL del tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.01 M a pH=7 y por último se completó al volumen final de 10 mL. A continuación se añadió 50 mg de resina.

Se prepararon así mismo, el blanco correspondiente que fue sometido al mismo tratamiento que la muestra. Tras agitar 2.5 minutos se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} =$

336 nm y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

A la disolución proveniente del filtrado se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad relativa de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 222$ nm, $\lambda_{em} = 337$ nm y rendijas de excitación y emisión de 5 y 5 nm respectivamente.

Se realizaron dos réplicas para cada nivel de concentración en fase resina y tres réplicas en disolución.

Los resultados obtenidos, una vez restado el blanco, se recogen en la tabla VI.6, VI.7 y en la figura VI.7 y VI.8.

TABLA VI.6.-Recta de calibrado del ANA.

ANA $\mu\text{g.L}^{-1}$	IRF	
0	-9.92	7.25
10	30.25	37.49
20	66.27	76.00
30	95.27	103.58
40	131.12	124.64
50	158.87	163.12
60	197.60	189.49
70	210.31	208.53
80	230.23	225.13

FIGURA VI.7.-Recta de calibrado del ANA.

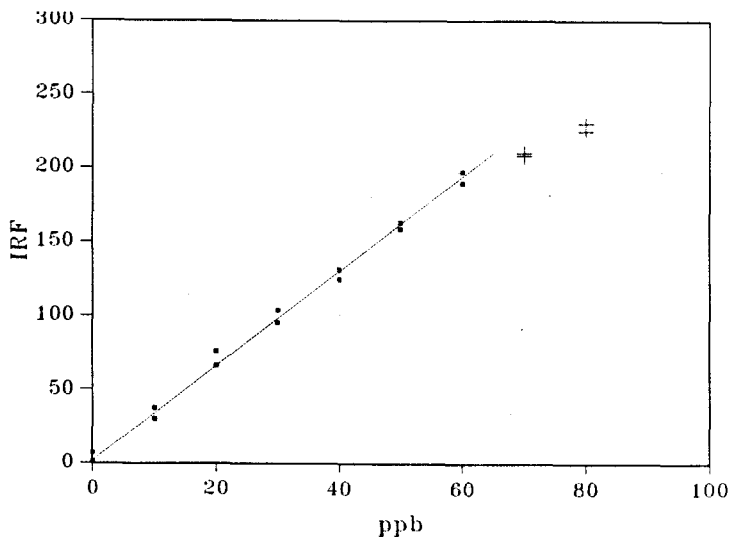
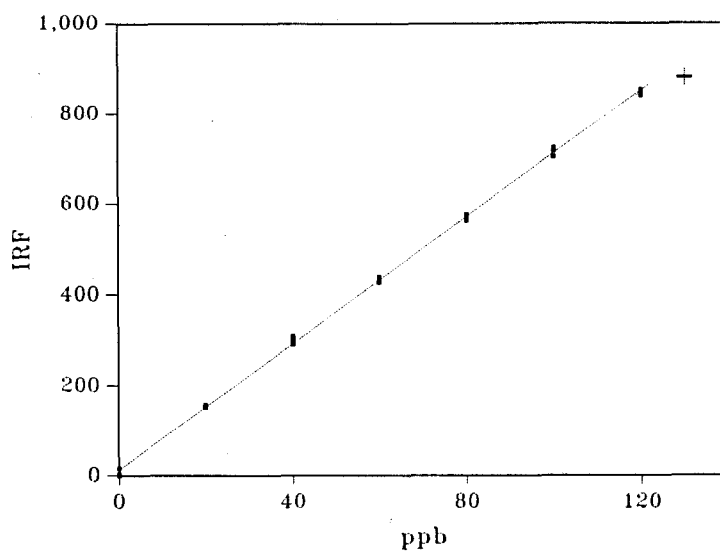


TABLA VI.7.-Recta de calibrado del ANA-A.

ANA-A $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	IRF		
0	16.06	-0.34	3.98
20	151.87	157.26	156.18
40	290.91	298.70	308.38
60	438.37	428.87	426.50
80	575.58	571.02	562.97
100	723.37	703.37	716.24
120	848.98	839.07	852.89
130	877.50	880.21	882.13

FIGURA VI.8.-Recta de calibrado para el ANA-A.



Como podemos observar en la figuras VI.7 y VI.8 a partir de $60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el ANA y $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para el ANA-A hay curvatura. En la tabla VI.8 se resumen los parámetros estadísticos.

TABLA VI.8.-Parámetros estadísticos.

Parámetro	ANA	ANA-A
n	14	21
m	2	3
$S_{i.f.c}$	5.837	7.803
a	1.97	12.96
s_a	2.81	3.07
b	3.20	6.98
s_b	0.08	0.04
DSR(b)	2.50%	0.57%
Lack of fit	83.6%	30.22%
R^2	99.29%	99.93%

De la tabla VI.8 observamos que hay un buen ajuste la modelo de regresión lineal ya que $p > 5\%$ para el ANA (83.6%) y el ANA-A (30.2%).

III.2.-PARÁMETROS DE CALIDAD.

Para la determinación del límite de detección y de cuantificación se realizó un estudio estadístico de la señal del blanco para lo cual se preparó una serie con 10 matraces en los cuales se añadió 0.1 mL del tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.01 M a pH=7 y se completó al volumen final de 10 mL. A continuación se añadió 50 mg de resina. Tras agitar 2.5 minutos se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 336$ nm y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente.

A la disolución resultante del filtrado se registró el espectro de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{exc} = 222$ nm, $\lambda_{em} = 337$ nm y rendijas de excitación y emisión de 5 y 5 nm respectivamente.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VI.9.

TABLA VI.9.-Límites de detección y cuantificación.

Muestra	IRF ANA	IRF ANA-A
1	461.03	37.97
2	471.38	31.64
3	465.25	28.48
4	469.15	28.48
5	467.03	28.48
6	469.18	33.32
7	466.27	31.64
8	462.11	37.97
9	469.18	31.64
10	469.18	36.96
IRF _{media}	466.98	32.66
σ_{n-1}	3.35	3.81
C _L ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	3.14	1.64
C ₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	10.47	5.46

En la tabla VI.10 se recogen los parámetros analíticos para los analitos en estudio.

TABLA VI.10.-Parámetros analíticos.

Parámetro	ANA	ANA-A
Rango dinámico lineal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	10.47-60.00	5.46-120.00
Linealidad (%) ^a	97.50	99.43
Sensibilidad analítica ^b ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.82	1.12
Precisión (%) ^c	4.59	1.15
Límite de detección ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	3.14	1.64
Límite de cuantificación ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	10.47	5.46

^a Calculada por la expresión $[1-DSR(b)]$

^b Calculada por la expresión $s_{r,c}/b$

^c Calculada por la expresión $DSR(c)=s_c/c$ donde s_c se calcula como:

$$s_c^2 = s_{\text{anal}}^2 * (1/n + 1/m) + DSR^2(b) * (c - c_{\text{media}})^2$$

IV.-PROCEDIMIENTO OPERATORIO.

La optimización de las variables que influyen sobre la intensidad de fluorescencia del ANA fijado sobre QAE y sobre la intensidad de fluorescencia del ANA-A en disolución realizada anteriormente nos permite proponer el procedimiento operatorio para la determinación binaria de dichos analitos. A continuación se describe dicho procedimiento:

Se toma una alícuota de la muestra que contenga entre 10.47 y 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA y entre 5.46 y 120 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ANA-A en un matraz de 10 mL, 0.1 mL de tampón $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0.01 M a pH=7 y etanol absoluto necesario para obtener una disolución al 40 % etanólica, por último se completó al volumen final de 10 mL. A continuación se añadió 50 mg de resina. Tras agitar 2.5 minutos se filtraron. Con ayuda de un gotero se llenó la cubeta y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 336 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 15 y 5 nm respectivamente. Al filtrado se le añade 50 mg de resina, para tener más seguridad y evitar que interfiera el ANA aunque se puso de manifiesto en el capítulo V que no hace falta una segunda extracción. Tras agitar 2.5 minutos se filtró. Se tomó la disolución filtrada y se midió la intensidad de fluorescencia en las siguientes condiciones: $\lambda_{\text{exc}} = 222 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 337 \text{ nm}$ y rendijas de excitación y emisión de 5 y 5 nm respectivamente.

Una vez restada la contribución del blanco, la concentración de ANA y ANA-A presente en la muestra se determina interpolando los valores de IRF obtenidos en la recta de calibrado correspondiente.

V.-APLICACIONES ANALÍTICAS.

El método propuesto para la determinación simultánea de ANA y ANA-A ha sido aplicado a mezclas sintéticas, a fitohormonas comerciales y a suelos.

V.1.-MEZCLAS SINTÉTICAS.

A continuación se lleva a cabo la determinación simultánea de los dos analitos para distintas proporciones en mezclas sintéticas. Esto nos va a permitir comprobar la validez del método propuesto.

Las experiencias se llevan a cabo preparando una serie de disoluciones en matraces aforados de 10 ml y aplicando el procedimiento operatorio.

Los resultados se muestran en la tabla VI.11.

TABLA VI.11.-Estudio de recuperación en mezclas sintéticas.

Relación	ANA $\mu\text{g.L}^{-1}$			ANA-A $\mu\text{g.L}^{-1}$		
	Añadido	Encontr.	% Recup.	Añadido	Encontr.	% Recup.
1:1	20	19.82	99.1	20	20.60	103.0
1:1	60	57.43	95.7	60	61.56	102.6
1:2	60	61.12	101.9	120	120.00	100.0
1:3	20	20.95	104.7	60	60.61	101.0
1:3	40	39.71	99.3	120	118.91	99.1
1:4	20	20.68	103.4	80	83.74	104.7
1:5	20	20.57	102.8	100	98.52	98.5
1:6	20	21.17	105.8	120	117.99	98.3
1:7	10	10.02	100.2	70	68.82	98.3
2:3	40	38.31	95.8	60	62.85	104.7

TABLA VI.12.-Comprobación de la validez del método.

	ANA	ANA-A
R_{media}	100.87	101.02
S_R	3.47	2.57
t_{cal}	0.79	1.26
p (%)	44.98%	23.94%

$$t_{9, 0.05} = 2.262$$

Como se observa en la tabla VI.12 obtenemos una recuperación media para ambos analitos cuyo valor es contrastado frente a 100%, mediante el test de la t de Student, poniéndose de manifiesto que la recuperación obtenida del método no es significativamente distinta de 100%, ya que el valor de t calculado es inferior al tabulado para el nivel de significación seleccionado y los grado de libertad adecuados, lo que implica que el método es exacto.

V.2.-FITOHORMONAS COMERCIALES.

Vamos a analizar la muestra Fruitone (Etisa, 0.45% ANA y 1.2% ANA-A) mediante la metodología de adición de patrón.

Tratamiento de la muestra

Tomamos 1 g de muestra y la disolvemos en 100 mL de etanol absoluto en el ultrasonidos. De estos 100 mL tomamos 0.1 mL y lo llevamos a 10 mL, con lo cual diluimos 100 veces. Esta es nuestra disolución de trabajo.

Metodología de adición de patrón

Se establecen los tres calibrados: calibrado con patrones, calibrado con adición de patrón tomando 0.4 ml de muestra añadiéndole cantidad de patrón creciente y aplicando el procedimiento operatorio y el calibrado de Youden tomando volúmenes crecientes de muestra (0.25, 0.50, 0.75 y 1 mL) se lleva a 10 mL y se aplica el procedimiento operatorio.

Las señales analíticas correspondiente a los tres calibrados y los parámetros característicos de cada calibrado se muestran en las tablas VI.13-VI.16.

TABLA VI.13.-Señales de fluorescencia correspondientes a los calibrados CA y CY para el ANA.

Calibrados	ANA _{adsc.} μg.L ⁻¹	Muestra mL	IRF
CA	0	0.4	57.08
	10		84.90
	20		109.03
	30		137.93
	40		181.18
CY	0	0.25	35.17
		0.50	61.15
		0.75	107.63
		1.00	140.83

TABLA VI.14.-Valores numéricos de los parámetros correspondientes a las rectas CP, CA y CY para el ANA.

Parámetros	CP	CA	CY
n	14	5	4
a	1.97	53.78	-4.67
b	3.20	3.01	1453.84
s _{ifr,c}	5.8367	6.4094	5.9197
r ² (%)	99.29	98.66	98.95

TABLA VI.15.-Señales de fluorescencia correspondientes a los calibrados CA y CY para el ANA-A.

Calibrados	ANA-A _{adsc.} μg.L ⁻¹	Muestra mL	IRF
CA	0	0.4	480.51
	20		628.50
	40		750.35
	60		890.62
CY	0	0.25	355.44
		0.50	570.19
		0.75	794.51
		1.00	986.34

TABLA VI.16.-Valores numéricos de los parámetros correspondientes a las rectas CP, CA y CY para el ANA-A.

Parámetros	CP	CA	CY
n	21	4	4
a	12.96	484.67	147.36
b	6.98	6.76	8468.08
$s_{if.c}$	7.8034	7.5558	10.4829
$r^2(\%)$	99.93	99.88	99.90

A partir de estos datos se aplica el procedimiento estadístico para llevar a cabo la determinación de los analitos y aprovechando esta metodología validar el método analítico propuesto.

Para el ANA:

Los pasos a seguir son:

-Comparación de pendientes.

Para poder validar una determinación analítica mediante el método de adición de patrón, es necesario que esta adición provoque exclusivamente un error sistemático constante, es decir que la adición de cantidades crecientes del analito a una cantidad constante de muestra no debe afectar a la pendiente del calibrado con patrones, ya que sino el error sería proporcional a la cantidad adicionada y sería inviable la validación de este modo.

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

Los resultados del test aparecen en la tabla VI.17.

TABLA VI.17.-Resultados de la comparación de pendientes de los calibrados CP y CA para el ANA.

s_p	5.9557
$t(b)$	0.912* (P=37.7%)
b_p	3.17

* Valor crítico 2.977 (1%)

Se comprueba que el valor del estadístico $t(b)$ calculado es menor que el valor t tabulado con un nivel de significación al 1% para n_p+n_a-4 grados de libertad, por tanto, las pendientes son iguales con un valor P del 37.7%, pudiéndose estimar un valor promedio, b_p , entre las pendientes de ambos calibrados y siendo posible la validación.

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

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

Debido a que la ordenada del calibrado de Youden está incluida en el intervalo de confianza del calibrado con patrones podemos deducir que no existe efecto matriz de la muestra.

Estos resultados se muestran en la tabla VI.18.

TABLA VI.18.-Nuevas ordenadas en el origen.

Ordenadas	CP	CA
a'	2.81	50.61

-Comprobación de la exactitud.

Se ha llevado a cabo comparando los contenidos en ANA en la disolución a medir obtenidos utilizando directamente la recta de calibrado y mediante el calibrado con adición de patrón. Dicha

comparación se realiza mediante el cálculo del estadístico $t(c)$.

Los resultados se muestran en la tabla VI.19 y se observa que no existe discrepancia entre los resultados. La comparación concluye no encontrando diferencia significativa entre los contenidos calculados ya que el valor del estadístico $t(c)$ es menor que el valor tabulado para $n_{CP}+n_{CA}-3$ grados de libertad al nivel de significación seleccionado, aceptándose que el método es exacto con un valor P mayor del 5%.

TABLA VI.19.-Comprobación de la exactitud: contenido de ANA por CP y CA.

C_{ANA}	CP	CA	CY
$C_{ANA} (\mu g \cdot L^{-1})$	18.00	15.96	
	$t(c) = 2.08$ (P=5.5%) Valor crítico 2.13 (5%)		
$C_{muestra} (\%)$	0.45	0.40	0.46

Como podemos observar de la tabla anterior nuestro método es válido para la determinación de ANA.

Para el ANA-A:

Los pasos a seguir son los mismos del apartado anterior:

-Comparación de pendientes.

Para poder validar una determinación analítica mediante el método de adición de patrón, es necesario que esta adición provoque exclusivamente un error sistemático constante, es decir que la adición de cantidades crecientes del analito a una cantidad constante de muestra no debe afectar a la pendiente del calibrado con patrones, ya que sino el error sería proporcional a la cantidad adicionada y sería inviable la validación de este modo.

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

Los resultados del test aparecen en la tabla VI.20.

TABLA VI.20.-Resultados de la comparación de pendientes de los calibrados CP y CA para el ANA-A.

s_p	7.7802
$t(b)$	1.237 (P=22.9%)
b_p	6.97

Valor crítico 2.831%

Se comprueba que el valor del estadístico $t(b)$ calculado es menor que el valor t tabulado con un nivel de significación al 1% para $n_{cp}+n_{ca}-4$ grados de libertad, por tanto, las pendientes son iguales con un valor P del 22.9%, pudiéndose estimar un valor promedio, b_p entre las pendientes de ambos calibrados y siendo posible la validación.

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

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

Debido a que la ordenada del calibrado de Youden no está incluida en el intervalo de confianza del calibrado con patrones podemos deducir que existe una componente de error sistemático debido al efecto matriz de la muestra. Esta "blanco" de la muestra o Blanco de Youden deberá ser sustraído de todas las medidas fluorimétricas llevadas a cabo con objeto de obtener una adecuada determinación del contenido de ANA-A.

Estos resultados se muestran en la tabla VI.21.

TABLA VI.21.-Nuevas ordenadas en el origen y Blanco de Youden.

Ordenadas	CP	CA	CY
a' BY	13.71	478.39	133.65

-Comprobación de la exactitud.

Se ha llevado a cabo comparando los contenidos en ANA-A en la disolución a medir obtenidos utilizando directamente la recta de calibrado y mediante el calibrado con adición de patrón. Dicha comparación se realiza mediante el cálculo del estadístico $t(c)$.

Los resultados se muestran en la tabla VI.22 y se observa que no existe discrepancia entre los resultados. La comparación concluye no encontrando diferencia significativa entre los contenidos calculados ya que el valor del estadístico $t(c)$ es menor que el valor tabulado para $n_{CP}+n_{CA}-3$ grados de libertad al nivel de significación seleccionado, aceptándose que el método es exacto con un valor P mayor del 5%.

TABLA VI.22.-Comprobación de la exactitud: contenido de ANA-A por CP y CA.

C_{ANA-A}	CP	CA	CY
$C_{ANA-A} (\mu g.L^{-1})$	47.80	47.49	
	$t(c) = 0.51$ (P=61.5%) Valor crítico 2.074(5%)		
$C_{muestra} (\%)$	1.19	1.19	1.21

Como podemos observar de la tabla anterior nuestro método es válido para la determinación de ANA-A.

-Análisis de la muestra.

Una vez realizada la validación del método espectrofluorimétrico propuesto, en este tipo de matriz, se han llevado a cabo tres análisis de diferentes porciones de muestra, siendo determinado el contenido de ANA mediante el uso directo de la recta de calibrado y de ANA-A también mediante el uso directo de la recta de calibrado una vez eliminado el "Blanco de Youden" o blanco de la muestra, calculado en la experiencia anterior. Los resultados se muestran en la tabla VI.23.

TABLA VI.23.-Determinación de ANA y ANA-A en la muestra FRUITONE.

Muestra (mL)	ANA		ANA-A	
	$\mu\text{g.L}^{-1}$	%	$\mu\text{g.L}^{-1}$	%
0.6	27.50	0.46	72.95	1.22
0.8	36.67	0.46	97.25	1.21
1.0	45.41	0.45	121.54	1.21

$$\text{ANA}_{\text{media}} (\%) = 0.457$$

$$\text{ANA-A}_{\text{media}} (\%) = 1.213$$

$$s_{\text{ANA}} = 0.006$$

$$s_{\text{ANA-A}} = 0.006$$

$$\text{DER} = 1.31\%$$

$$\text{DER} = 0.49\%$$

V.3.-APLICACIÓN A SUELOS.

Tratamiento de la muestra: 3 g de muestra de suelo se disuelve con 15 mL de etanol absoluto en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos, se filtra y el filtrado se diluye hasta 25 mL con etanol absoluto en un matraz aforado de 25 mL. Se toma una alícuota de esta disolución y el contenido de ANA y ANA-A se determina como indica el procedimiento operatorio.

Debido a que el contenido de ANA y ANA-A en muestras de suelo es inferior al límite de detección realizamos un estudio de recuperación comprobando así la exactitud del método.

Los resultados se muestran en la tabla VI.24 y VI.25.

TABLA VI.24.-Estudio de recuperación de ANA en suelo.

Muestra	ANA $\mu\text{g.L}^{-1}$		
	Puesta	Encontrada ^a	% Recuperación
Suelo	10	9.7 \pm 0.2	97.0
	20	19.8 \pm 0.4	99.0
	30	29.5 \pm 0.4	98.3

^a Valor medio de seis determinaciones.

$R_{\text{media}}=98.1\%$, $s_r=1.01$, $t(R)=3.250$ ($p=8.3\%$), valor crítico=4.303(5%)

TABLA VI.25.-Estudio de recuperación de ANA-A en suelo.

Muestra	ANA-A $\mu\text{g.L}^{-1}$		
	Puesta	Encontrada ^a	% Recuperación
Suelo	20	19.2 \pm 0.4	96.00
	40	39.1 \pm 0.2	97.75
	60	59.4 \pm 0.3	99.00

^a Valor medio de seis determinaciones.

$R_{\text{media}}=97.6\%$, $s_r=1.51$, $t(R)=2.773$ ($p=10.9\%$), valor crítico=4.303(5%)

CONCLUSIONES

1.-Se han establecido las características fluorescentes de las fitohormonas derivadas del indol: ácido indol-3-acético (AIA), ácido indol-3-butírico (AIB), ácido indol-3-propiónico (AIP) y ácido 5-hidroxiindol-3-acético (AHIA) y del naftaleno: ácido 1-naftilacético (ANA) y 1-naftilacetamida (ANA-A) comprobándose que AIA, AIB y AIP poseen idéntica morfología ($\lambda_{exc}=222$ nm y $\lambda_{em}=359$ nm). El AHIA se diferencia de estos en el espectro de emisión ($\lambda_{em}=341$ nm). El ANA y ANA-A también presentan idéntica morfología diferenciándose de los anteriores en el espectro de emisión ($\lambda_{exc}=222$ nm y $\lambda_{em}=337$ nm). Todos ellos poseen idéntico espectro de excitación.

2.-Se ha podido comprobar que de las fitohormonas estudiadas el ácido 1-naftilacético (ANA) es el que presenta mayor rendimiento fluorescente y el ácido 5-hidroxiindol-3-acético (AHIA) menor.

3.-Se ha estudiado la influencia de las distintas variables experimentales sobre la intensidad de fluorescencia de cada fitohormona en disolución, su optimización ha permitido proponer nuevos métodos espectrofluorimétricos para la determinación de éstas en los intervalos de concentración siguientes:

- Ácido indol-3-acético 0.64-150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Ácido indol-3-butírico 0.41-100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Ácido indol-3-propiónico 0.87-100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Ácido 5-hidroxiindol-3-acético 2.17-300 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- Ácido 1-naftilacético 2.04-50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.
- 1-naftilacetamida 5.46-120 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.-Se ha llevado a cabo un estudio sistemático del efecto producido por la presencia de sustancias extrañas en la determinación de las fitohormonas tales como iones inorgánicos, pesticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos. Este estudio nos ha permitido comprobar que no existe interferencia por parte de los pesticidas: o-fenilfenol, Carbaril, Morestan, Benomilo, 1-naftol

y Carbendazima; y de los hidrocarburos policíclicos aromáticos: Naftaleno, Acenaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Fluoranteno, Pireno, Criseno, Benzo[a]antraceno, Benzo[k]fluoranteno, Benzo[a]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno y Benzo[e]pireno. La interferencia de los iones inorgánicos depende de la concentración de estos en las distintas muestras de aguas. Por otra parte, dadas las características espectrales, las fitohormonas se interfieren mutuamente.

5.-Los métodos propuestos se han aplicado a la determinación de fitohormonas derivadas del indol y del naftaleno en diferentes muestras de aguas naturales. Debido a que el método no detecto la presencia de las fitohormonas estudiadas en las aguas ensayadas se procedió, en todos los casos, a realizar un estudio de recuperación. Los valores de recuperación obtenidos no difieren significativamente del 100% con $p > 5\%$.

6.-Se ha llevado a cabo la resolución de mezclas binarias de fitohormonas derivadas del indol:

- Ácido indol-3-acético y ácido 5-hidroxiindol-3-acético.
- Ácido indol-3-butírico y ácido 5-hidroxiindol-3-acético.
- Ácido indol-3-propiónico y ácido 5-hidroxiindol-3-acético.

por espectrofluorimetría derivada. El estudio de la influencia de las distintas variables experimentales sobre la intensidad de fluorescencia de dichas mezclas y su optimización nos ha permitido proponer nuevos métodos para la deteminación de éstas en mezclas sintéticas y en muestras de aguas naturales tales como: Agua de Sierra Nevada (Lanjarón), Agua potable de Granada y Agua de pozo de la Huerta de Santa María (Vega de Granada).

7.-Se han establecido las curvas de calibrado para cada una de las fitohormonas en presencia de cantidades crecientes de la otra, comprobándose la independendencia de la intensidad de fluorescencia de cada una de ellas.

8.-Los estudios de recuperación llevados a cabo en mezclas sintéticas y en muestras de aguas naturales ofrecen buenos resultados, encontrándose valores de recuperaciones que no difieren significativamente del 100% con $p > 5\%$.

9.-Se propone un método para la determinación simultánea de la mezcla de Ácido indol-3-butírico (AIB) y Ácido 1-naftilacético (ANA) mediante espectrofluorimetría derivada y se valida dicho método aplicándolo a formulaciones comerciales.

10.-Se ha realizado un estudio cualitativo de fijación de las fitohormonas en estudio sobre resinas tipo Sílica C-18, Sephadex QAE-A-25, Sephadex DEAE-A-25, Sephadex SP-C-25, Sephadex G-15 y G-25. Se comprueba que todas las fitohormonas en estudio excepto el ANA-A se fijan sobre Sephadex QAE-A-25 y Sephadex DEAE-A-25 presentando mayor intensidad de fluorescencia sobre Sephadex QAE-A-25 y al igual que en el estudio en disolución la fitohormona que presenta mayor rendimiento fluorescente es el ANA.

11.-Por efecto de la fijación se produce un desplazamiento en el máximo de excitación hacia valores superiores de 222 nm a 280 nm (efecto batocrómico), manteniéndose la posición del máximo de emisión.

12.-Se ha realizado el estudio espectrofluorimétrico del ANA fijado sobre Sephadex QAE-A-25, proponiéndose un nuevo método para la determinación de ésta en formulaciones comerciales y en muestras de agua natural mediante fluorimetría en fase sólida.

13.-Se ha resuelto la mezcla ANA/ANA-A mediante la aplicación de la espectrofluorimetría en disolución y en fase sólida, proponiéndose un nuevo método para la determinación simultánea de ambas en formulaciones comerciales y en suelos.

14.-Todos los métodos propuestos se han validado mediante la metodología de adición de patrón o mediante el test de la t de Student que compara el valor medio de la determinación con un valor de referencia para el caso de las formulaciones comerciales.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Robert M. Devlin, **Fisiología Vegetal**, pág. 353.
- 2.- Davis, G., Hein, M., Neely, B., Sharp, R. y Carnes, M., **Anal. Chem.**, 57(6), 638A, (1985).
- 3.- Strasburguer, **Tratado de Botanica**, cap. II, pág. 387.
- 4.- Barceló, **Fisiología Vegetal**, pág. 354, (1980).
- 5.- Johnson, Crosby, **J. Org. Chem.**, 28, 1246, (1963).
- 6.- Shagalov, U.S. pat. 3,320,281 (1967).
- 7.- H.L. Davis Jr., R.R. Brown, J.E. Leklem y I.H. Carlson, **Cancer**, 31, 1061, (1973).
- 8.- G.T. Bryan, **Am. J. Clin. Nutr.**, 24, 841, (1971).
- 9.- Boullin, D.J. (Ed.) **Serotonin in Mental Abnormalities**. John Wiley & Sons. Chichester (1978).
- 10.- George M. Anderson y William C. Purdy, **Anal. Chem.**, 51(2), 283, (1979).
- 11.- R. Budini, S. Girotti, A.M. Pierpaoli y D. Tonelli, **Microchem. J.**, 27, 365, (1982).
- 12.- Jun Yamada, Yumi Sugimoto y Kazuyoshi Horisaka, **Anal. Biochem.**, 129, 460, (1983).
- 13.- A. Adell, J.M. Tusell, F. Artiagas, E. Martinez, C. Suñol y E. Gelpi, **J. Liq. Chromatogr.**, 6(3), 527, (1983).
- 14.- Tereza C.M. Pastore y Clausius G. de Lima, **Analyst**, 111, 707, (1986).

-
- 15.- Jerry D. Cohen, Bruce G. Baldi y Janet Pernise Slovin, **Plant Physiol.**, 80, 14, (1986).
- 16.- Marta Andino, J.J. Aaron y J.D. Winefordner, **Talanta**, 33 (1), 27, (1986).
- 17.- Naotaka Kuroda, Hitoshi Nohta y Yosuke Ohkura, **Anal. Chim. Acta**, 197, 169, (1987).
- 18.- Tereza C.M. Pastore, Ezer M. de M. Nicola y Clausius G. de Lima, **Analyst**, 109, 243, (1984).
- 19.- F. García Sanchez, C. Cruces Blanco, A.L. Ramos Rubio, M. Hernandez Lopez, J.C. Marquez Gomez y C. Carnero, **Anal. Chim. Acta**, 205, 149, (1988).
- 20.- C. Sanchez Roldán, M.A. Quesada, Martin J. Bukovac, V. Valpuesta y A. Heredia, **Phytochemistry**, 27(6), 1579, (1988).
- 21.- F. García Sanchez y C. Carnero Ruiz, **Talanta**, 37(12), 1137, (1990).
- 22.- Fritz, U.S. Pat. 3,051,723 (1962).
- 23.- Bowman, Islip, **Chem. & Ind.** (London) 154, (1971).
- 24.- Alfred H. Free, Ph.D. y Helen M. Free, **El análisis de orina en la práctica clínica del laboratorio**, CRC Press, Inc. U.S.A. (1975).
- 25.- A.N.A.C. **Métodos seleccionados de análisis clínicos**, Vol. IV, Academic Press Inc. (1963).
- 26.- Mukerjee, H., Pincus, Mathew R., **Clin. Chim. Acta**, 209(1-2), 105, (1992).

-
- 27.- Martinez, E., Artigas, F., Sunol, C., Tusell, J.M., Gelpi, E., *Clin. Chem.*, 29(7), 1354, (1983).
- 28.- Iwatani Atsuko, Nakamura Hajime, *J. Chromatogr.*, 309(1), 145, (1984).
- 29.- Hanai, T., Hubert, J., *J. Liq. Chromatogr.*, 7(8), 1627, (1984).
- 30.- Skrinska V., Hahn Shineui, *J. Chromatogr.*, 311(2), 380, (1984).
- 31.- Anders Helander, Olof Beck, Mona Wennberg, Tina Wikstrom y Gun Jacobsson, *Anal. Biochem.*, 196, 170, (1991).
- 32.- R.P. Maickel y F.P. Miller, *Anal. Chem.*, 38(13), 1937, (1996).
- 33.- Junichi Ishida, Massatoshi Yamaguchi y Masaru Nakamura, *Analyst*, 116, 301, (1991).
- 34.- Ogata Ishiguro J., *Am. Chem. Soc.* 72,4302 (1950).
- 35.- Wenner, U.S. pat. 2,489,348 (1949); *J. Org. Chem.*, 15, 548, (1950).
- 36.- *Anal. Chem.*, 19, 475, (1947).
- 37.- Baskakov, Yu. A. y Mel'nikov, N.N., *Khim. Prom-st'*, 2, 47, (1954).
- 38.- Kreshkov, A.P. y Tumovskii, L.A., *Zh. Analit. Khim.*, 21(5), 606, (1966).
- 39.- Kaname Nomura, *Ann. Rep. Takamine Lab.*, 8, 242, (1956).

-
- 40.- Young, H.Y., Shimabukuro, S. y Aono, L., *J. Agric. Food Chem.*, 11(2), 132, (1963).
- 41.- Hornstein, I., *J. Agric. Food Chem.*, 6(1), 32, (1958).
- 42.- Virgil Jolliffe, A. y Coggiins, Charles W., Jr., *J. Agric. Food Chem.*, 18(3), 394, (1970).
- 43.- Sigrist, R., Temperli, A., Hurter, J., *J. Agric. Food Chem.*, 22(4), 568, (1974).
- 44.- García Sanchez, F. y Cruces Blanco, C., *Mikrochim. Acta*, II(1-3), 49, (1989).
- 45.- Sanders, L.B. y Winefordner, J.D., *J. Agric. Food Chem.*, 20, 166, (1972).
- 46.- Aaron, J.J., Kaleel, E.M. y Winefordner, J.D., *J. Agric. Food Chem.*, 27, 1233, (1979).
- 47.- Su, S.Y. y Asafu-Adjaye, E., *Anal. Chem.*, 58, 539, (1986).
- 48.- Zhang, S., Liu, C. y Bu, Y., *Fenxi Huaxue*, 16, 494, (1988).
- 49.- Zweig, G., Archer, T.E. y Raz, D., *J. Agric. Food Chem.*, 10(3), 199, (1962).
- 50.- Zweig, G., Gutnick, D.L., Gulli, R., Archer, T.E. y Hartmann, H.T., *J. Agric. Food Chem.*, 12(1), 59, (1964).
- 51.- Bache, C.A., Lisk, D.J. y Loos, M.A., *J. Agric. Food Chem.*, 47(2), 348, (1964).
- 52.- Anson Moye, H. y Adair Wheaton, T., *J. Agric. Food Chem.*, 27(2), 291, (1979).

-
- 53.- Krause, R.T., *J. of Chromatography*, 255, 497, (1983).
- 54.- Maiti, B., Desai, Sumant R. y Krishnamoorthy, T.S., *Analyst*, 113(4), 667, (1988).
- 55.- Cochrane, W.P., Lanouette, M. y Grant, R., *J. Ass. Off. Ana. Chem.*, 63(1), 145, (1980).
- 56.- García Sanchez, F. y Cruces Blanco, C., *Quim. Anal.*, 7(3), 299, (1988).
- 57.- L. Cuadros Rodriguez, ANA M. García Campaña, C. Jimenez Linares y M. Roman Ceba, *Analytical Letters*, 26(6), 1243, (1993).
- 58.- J.C. Janson, *J. of Chromatography*, 28, 12, (1967).
- 59.- "Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis II", *Spectrochim. Acta (B)*, 33(B), 242, (1978).
- 60.- Jamal Rohand, *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada, (-1994).
- 61.- Ma M. del Olmo Iruela, *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada, (1994).
- 62.- "Standard Methods for the examination of water and wastewater", 15th Edition, APHA-AWWA-WPCF, (1980).
- 63.- J. Rodier, "Análisis de Aguas: aguas naturales, aguas residuales, agua de mar", Ed. Omega, (1981).
- 64.- D.L. Massatt, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte y L. Kaufman, *Chemometrics a textbook*, pág. 116. Elsevier (1988).

-
- 65.- Klaus Doerffel, "Assuring trueness of analytical results", **Fresenius J. Anal. Chem.**, 348, 183, (1994).
- 66.- J.L. Vilchez Quero, Comunicación Personal.
- 67.- A. Savitzky y M.J.E. Golay, **Anal. Chem.**, 36, 1627, (1964).
- 69.- J.L. Vilchez, A. Navalón, G. Sanchez Palencia, M^a R. Blanc García y R. Avidad., **Analytical Letters**, 27(12), 2355, (-1994).
- 70.- L. Cuadros Rodriguez, A.M. García Campaña, J.M. Bosque Sendra y M^a R. Blanc García, Comunicación CAC96 (Spain). (-1996).
- 71.- L. Cuadros Rodriguez y col., **J. of AOAC**, 78(2), 471, (-1995).