



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y  
ANALÍTICA**

**TESIS DOCTORAL**

**OPTOSENSORES EN FLUJO:  
DE LA REGENERACIÓN A LA RENOVACIÓN  
DE LA SUPERFICIE SENSORA**

**PRESENTADA POR:  
MARÍA JOSÉ RUEDAS RAMA**

**DIRIGIDA POR:  
DR. D. ANTONIO MOLINA DÍAZ  
DR. D. ANTONIO RUIZ MEDINA**

**JAÉN, 21 DE ENERO DE 2005**

**ISBN 84-8439-305-4**

**Nombre y apellidos de la autora**

MARÍA JOSÉ RUEDAS RAMA

**Título de la Tesis Doctoral**

OPTOSENSORES EN FLUJO:  
DE LA REGENERACIÓN A LA RENOVACIÓN DE LA SUPERFICIE SENSORA

**I.S.B.N.**

84-8439-305-4

**Fecha de Lectura**

21 DE ENERO DE 2005

**Centro y Departamento en que fue realizada la lectura**

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
*Departamento de Química Física y Analítica*

**Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis**

Dirección de la Tesis	Dr. D. Antonio Molina Díaz Dr. D. Antonio Ruiz Medina
Presidente del Tribunal	Dr. D. Jesús Hernández Méndez
Vocales	Dr. D. José A. Murillo Pulgarín Dr. D. J. Javier Laserna Vázquez Dr. D. Bernhard Lendl
Secretaria	Dr. D. <sup>a</sup> María José Áyora Cañada

**Calificación Obtenida**

SOBRESALIENTE CUM LAUDE



UNIVERSIDAD DE JAÉN

tesis doctoral

# Abstract

In this Memory it is showed the development of ten spectroscopic continuous flow sensors for the automatic determination of organic and inorganic species of environmental and pharmaceutical interest. These sensors have been classified according to the developed methodology in sensors with or without renovation of the sensing surface.

Three flow sensors without renovation of the sensing surface have been developed using this methodology, one of them uses spectrophotometric detection and two of them spectrofluorimetric detection, based on the measurement of the absorbance in UV region or the intrinsic fluorescence of the analytes. In all these cases it is not necessary previous derivation reactions.

The seven developed sensors with renovation of the sensing surface are based on the concept of Bead Injection Spectroscopy. The use of this methodology is justified when the species of interest is strongly retained on the sensing surface and the regeneration of the support is not possible in suitable conditions or becomes extraordinarily difficult. The methodology used in these seven sensors is based on the injection of an exact volume of a homogenous beads suspension in a flow injection analysis system with spectroscopic detection. The beads (solid support) are loaded in the flow cell placed in the detection zone of a nondestructive spectroscopic detector. At the end of the analysis, the beads are discarded by reversing the flow and instantaneously transported out of the system, being replaced the sensing surface after each measurement.

In all cases, a great study of the experimental variables that can affect this type of sensors has been performed. Next, the sensors were calibrated for the corresponding analytes, finding a calibration equation that allowed relating the values of the analytical signals with the concentration of the sample. The method used in all the cases was the univariate calibration. Studies of interferences were made to know the response of the sensor in presence of the organic and inorganic compounds that usually accompany the analytes in the real samples. In the case of serious interferences occurring, appropriate modifications for their elimination were designed. Finally, the proposed sensors were applied to the determination of these analytes in samples of different nature. The results confirm the validity of the proposed sensors.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

OPTOSENSORES EN FLUJO:  
DE LA REGENERACIÓN  
A LA RENOVACIÓN DE LA  
SUPERFICIE SENSORA

MARÍA JOSÉ RUEDAS RAMA

tesis doctoral

*A Ángel,  
por ayudarme a cumplir este sueño*

*A mis padres*

*A mis hermanos*

Una experiencia nunca es un fracaso,  
pues siempre vine a demostrar algo  
*(Thomas A. Edison)*

Me gustaría aprovechar esta oportunidad para dejar constancia en este trabajo de mi más sincero agradecimiento a todos los que me han ayudado y acompañado a lo largo de estos años.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mis directores, Antonio Molina Díaz y Antonio Ruiz Medina, por empezar a descubrirme la investigación y por haberme introducido en el apasionante mundo de la Química Analítica, enseñándome y ayudándome cada día, y sobre todo, por haberme inculcado sus ganas de avanzar.

A todos los miembros del Departamento que de algún modo han colaborado en este trabajo, al menos haciéndolo más cordial, ameno y en ocasiones divertido. En él he encontrado, además de buenos compañeros, muchos de mis mejores amigos. Gracias a Ana, María, María José, Barbara, Paco, Tomás, Manolo, Javi, Silvia, Juanfra, Eulogio, Juana y todos los demás compañeros que me han ayudado.

También me gustaría agradecer la cordialidad y hospitalidad del profesor Bernhard Lendl, haciendo posible la estancia en Viena, poniendo a mi disposición todo su tiempo y su atención. Gracias también a todos los que allí encontré.

A Luisa, Inés y José por todos los momentos de Química que hemos compartido, y por supuesto a Fina, Dori, Charo y a todos los que la Química les queda muy lejos, por soportarme después del laboratorio.

Mi agradecimiento también a mis padres y hermanos, por creer en mí y ser mi punto de apoyo, por formarme como persona, y suponer para mí un constante ejemplo.

Por último, decir que con esta Memoria concluye una de las etapas más importantes de mi vida. En el recorrido he vivido muchos momentos felices y otros que no lo han sido tanto, pero tengo que destacar que en este camino he encontrado a una persona que me ha aportado su sabiduría, su amistad, su apoyo y me ha brindado una ayuda fundamental para mí. Es la persona más importante de mi vida. Quiero dar las gracias a Ángel, por todo.

# ÍNDICE

## I. RESUMEN

## II. JUSTIFICACIÓN E INTRODUCCIÓN

A. Justificación.....	15
B. Introducción.....	15
1 Métodos automáticos de análisis .....	15
1.1 Tipos de sistemas analíticos automáticos.....	16
1.2 Sistemas analíticos automáticos continuos.....	17
2. Análisis por inyección en flujo (FIA) .....	19
2.1 Características esenciales del FIA.....	20
2.2 Componentes básicos de un sistema FIA.....	21
2.3 Características de los métodos FIA.....	29
3. Espectroscopía en fase sólida.....	32
4. Sensores químicos .....	35
4.1 Sensores químicos en flujo continuo.....	37
4.1.1 Sensores que integran retención y detección .....	37
4.1.2 Sensores que integran reacción, retención y detección .....	38
4.2 Multisensores.....	39
4.3 Fundamento de los sensores.....	40
4.4 Tipos de soporte sólido.....	43
4.5 Sensores sin renovación de la superficie sensora.....	47
4.6 Sensores con renovación de la superficie sensora.....	48

5. Analitos .....	52
5.1 Rodenticidas, pesticidas y compuestos fenólicos.....	53
5.2 Elementos metálicos.....	60
5.3 Vitaminas y principios activos en fármacos.....	71
<b>III. Objetivos.....</b>	<b>76</b>
<b>IV. Antecedentes .....</b>	<b>80</b>
1. Análisis por inyección en flujo.....	82
2. Espectroscopía en fase sólida.....	84
3. Sensores químicos .....	86
3.1 Características generales de los sensores químicos en flujo continuo.....	87
3.2 Multisensores.....	89
3.3 Sensores sin renovación de la superficie sensora.....	90
3.4 Sensores con renovación de la superficie sensora....	90
3.5 Configuraciones FIA.....	94
3.6 Sistemas de detección.....	98
3.7 Antecedentes en nuestro grupo de investigación.....	98
4. Analitos: Otros métodos de determinación .....	100
4.1 Rodenticidas, pesticidas y compuestos fenólicos.....	100
4.2 Elementos metálicos.....	102
4.3 Principios activos y vitaminas.....	109
<b>V. Discusión conjunta de resultados .....</b>	<b>112</b>
1. Reactivos e Instrumentación.....	114
2. Estudios preliminares. Espectros .....	121
2.1 Sensores monoparámetro.....	122
2.2 Sensores biparámetro.....	126
3. Configuración del sistema .....	130
3.1 Sensores monoparámetro.....	131
3.2 Sensores biparámetro.....	136
4. Variables experimentales .....	141
4.1 Variables de la unidad de retención-detección.....	142
4.2 Variables químicas.....	147
4.3 Variables FIA.....	160
4.4 Variables instrumentales.....	165
5. Calibración de los sensores. Parámetros analíticos .....	168
5.1 Calibración de los sensores .....	169
5.1.1 Sensores monoparámetro.....	170
5.1.2 Sensores biparámetro.....	174
5.2 Parámetros analíticos .....	177

---

5.2.1 Reproducibilidad.....	177
5.2.2 Límites de detección y cuantificación.....	178
5.2.3 Frecuencia de muestreo.....	180
6. Estudio de interferencias.....	183
6.1 Sensores monoparámetro.....	185
6.2 Sensores biparámetro.....	191
7. Aplicaciones analíticas.....	196
7.1 Preparación de las muestras.....	198
7.2 Determinación en muestras reales.....	201
7.2.1 Sensores sin renovación de la superficie sensora.....	201
7.2.2 Sensores con renovación de la superficie sensora.....	206
<b>VI. Conclusiones y Perspectivas.....</b>	<b>220</b>
<b>VII. Bibliografía.....</b>	<b>225</b>
<b>VIII. Anexo.....</b>	<b>247</b>

# I. Resumen

## I. RESUMEN

En esta Memoria se presenta el desarrollo de diez sensores espectroscópicos en flujo continuo para la determinación automática de especies orgánicas e inorgánicas de interés medioambiental y farmacológico. Estos sensores se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios, siendo los más importantes: (1) según la técnica de detección empleada, distinguiendo así entre fotométricos y fluorimétricos; (2) según la metodología desarrollada, en sensores con o sin renovación de la superficie sensora; y por último, (3) de acuerdo con el número de analitos determinados cabe distinguir entre sensores monoparamétricos y multiparamétricos. De todas estas clasificaciones, he escogido la segunda para la redacción de este resumen.

### **Sensores sin renovación de la superficie sensora**

La metodología utilizada en estos sensores está basada en la ubicación de un volumen adecuado de una suspensión homogénea de partículas en una célula de flujo de un detector espectroscópico. Una vez finalizado el análisis, es decir, desarrollada la señal analítica, se procede a la regeneración del sensor con una disolución eluyente adecuada.

Se han desarrollado tres sensores que emplean esta metodología, uno con detección espectrofotométrica y dos con detección espectrofluorimétrica, basados en la medida de la absorbancia en la región UV o fluorescencia intrínseca de los analitos, no precisando de reacciones derivadoras previas.

El sensor fotométrico es un sensor monoparámetro para la determinación individual de cinco compuestos fenólicos (Fenol, 1-Naftol, 2-Naftol, 3,4-Dimetilfenol y 2,4-Diclorofenol) en aguas naturales.

Los dos sensores fluorimétricos desarrollados permiten la determinación de pesticidas. Uno es monoparámetro, para la determinación de Warfarina, y el segundo es biparámetro, determinándose simultáneamente Warfarina y Tiabendazol empleando una única inyección de muestra.

Este último utiliza una nueva estrategia que permite la llegada secuencial de los analitos a la zona de detección, lo cual se consigue mediante el empleo de una

precolumna *on line*, empaquetada con un soporte sólido adecuado, que retiene temporalmente los analitos, permitiendo un desfase temporal en su llegada a la zona de detección.

En todos los casos se ha realizado un amplio estudio de las variables experimentales que pueden afectar a este tipo de sensores: variables de la unidad de retención-detección, variables de tipo químico, variables del sistema FIA y, solo en el caso de los sensores fluorimétricos, variables instrumentales. Se optimizaron los valores adecuados en cada caso (buscando siempre la máxima sensibilidad y selectividad del sistema propuesto). En el sensor biparámetro, el estudio de las variables experimentales también incluyó la optimización de la separación *on line* de los analitos en una precolumna.

A continuación se calibraron los sensores, a los valores de las variables previamente optimizados, encontrándose la ecuación de calibración que permitía relacionar los valores de las señales analíticas con la concentración de analito. El método empleado en todos los casos fue la calibración univariante.

Por último, los sensores propuestos se aplicaron a la determinación de estos analitos en muestras de diferente naturaleza, aguas naturales en el caso del sensor fotométrico y aguas naturales, fármacos, pesticidas y raticidas comerciales para los dos sensores fluorimétricos. Los resultados confirman la validez de los sensores propuestos.

### **Sensores con renovación de la superficie sensora**

Los siete sensores con renovación de la superficie sensora desarrollados están basados en el concepto de espectroscopía con inyección de partículas o microesferas ("*Bead Injection Spectroscopy*"). El uso de esta metodología está justificado bien cuando la retención del analito en el soporte sólido es tan fuerte que no es posible su elución o cuando se han de emplear soluciones salinas, ácidas o básicas muy concentradas para la elución de dicho analito, lo que conlleva que el soporte experimente alteraciones que, además de modificar la línea base, producen el acortamiento drástico de la vida del sensor.

La metodología utilizada en estos siete sensores se basa, al igual que en los sensores sin renovación de la superficie sensora, en la inyección de un volumen exacto de una suspensión homogénea de partículas en un sistema de análisis por inyección en flujo con detección espectroscópica molecular. La diferencia reside en que en este caso, dada la imposibilidad de regenerar el sensor, al final del análisis las partículas son desechadas invirtiendo el sentido del flujo y expulsadas fuera del sistema de forma automática, reemplazándose así la superficie sensora tras cada medida mediante una nueva inyección de partículas.

Cinco de estos sensores son monoparámetro: uno utiliza detección fluorescente para la determinación de V(V) y los otros cuatro utilizan detección fotométrica para la determinación de Ácido Ascórbico, Fenotiazinas (Prometazina y Trifluoperazina), Co(II) y Fe(II), permitiendo también este último la determinación de Fe total y la determinación indirecta de Ácido Ascórbico. Todos se basan en reacciones derivadoras del analito en cuestión para la obtención de productos coloreados. En cuatro de estos sensores las reacciones derivadoras tienen lugar en el mismo soporte sólido, en el que previamente se ha fijado el reactivo cromogénico o fluorogénico, y en solo uno de ellos la reacción derivadora se produce *on line*, antes de que el analito alcance la zona sensora.

Los otros dos sensores con renovación de la superficie sensora son sensores biparámetro. Ambos permiten una determinación secuencial de mezclas binarias de los analitos: (a) Be(II)-Al(III) y (b) Cu(II)-Zn(II), mediante el uso de dos disoluciones de portador y dos inyecciones de muestra. El primero utiliza detección fluorimétrica, mientras que el último usa detección fotométrica. Estos sensores biparámetro también están basados en reacciones derivadoras que tienen lugar en la superficie sensora.

De igual forma que los sensores sin renovación de la superficie sensora, se realizó un estudio de las variables experimentales, incluyendo las variables químicas que afectan a este tipo de sensores, destacando la cantidad y el volumen de suspensión homogénea de partículas necesarios para llenar de manera óptima y reproducible la célula de flujo. Además, en el caso de los sensores biparámetro, el estudio inicial consistió en la selección de las disoluciones de portador que permitían la reacción y retención selectiva de cada analito en el soporte sólido.

Una vez establecidas las condiciones adecuadas de trabajo para cada sensor, se calibraron los sensores para los analitos correspondientes. De esta forma se obtienen los intervalos de concentración en los que la señal analítica (absorbancia o fluorescencia) es lineal con la concentración de analito en la muestra. En todos estos sensores también se realizó una calibración univariante.

Los estudios de interferencias se realizaron para conocer la respuesta del sensor en presencia de los compuestos orgánicos e inorgánicos que generalmente acompañan a los analitos en las muestras reales a las que se aplicarán los sensores. En el caso de la aparición de serias interferencias se diseñaron convenientes estrategias para su eliminación.

Finalmente, los sensores desarrollados se aplicaron a la determinación de los analitos correspondientes en muestras de diferente naturaleza: preparados farmacéuticos, aguas naturales, suero sanguíneo, orina, suelos, zumos de frutas, caramelos, líquidos conservantes, vinos, cabello humano, mejillones y aleaciones, obteniéndose resultados satisfactorios que avalan los métodos descritos.

Debe destacarse que los sensores con superficie renovable que se recogen en esta Tesis son los primeros sensores de este tipo descritos en bibliografía que emplean una célula de flujo comercial y además, usan la metodología FIA, al contrario de los hasta entonces descritos, basados en sistemas SIA y con una célula especialmente diseñada.

## II. Justificación e introducción

## **II. JUSTIFICACIÓN E INTRODUCCIÓN**

### **A. Justificación**

Esta Memoria forma parte de la línea de investigación desarrollada por el Grupo de Investigación "Química Analítica de la Universidad de Jaén", del Plan Andaluz de Investigación (PAI: Grupo FOM 323), cuyo objetivo principal es la puesta a punto de nuevos métodos de análisis químico que permitan la determinación de compuestos químicos en muestras reales de diferente naturaleza.

En concreto, esta Memoria pretende contribuir al desarrollo de sensores espectroscópicos en flujo continuo no segmentado, con y sin renovación de la superficie sensora, introduciendo nuevas metodologías basadas en la integración de la retención de la(s) especie(s) de interés sobre un soporte sólido, con la detección espectroscópica de la(s) misma(s). Así se posibilita tanto el análisis individual de diversos analitos, como el de mezclas de éstos.

Los sensores que se proponen van dirigidos a la determinación automática de especies de interés farmacológico y medioambiental, y su aplicación al control analítico de rutina en una gran variedad de muestras reales.

### **B. Introducción**

#### **1. MÉTODOS AUTOMÁTICOS DE ANÁLISIS**

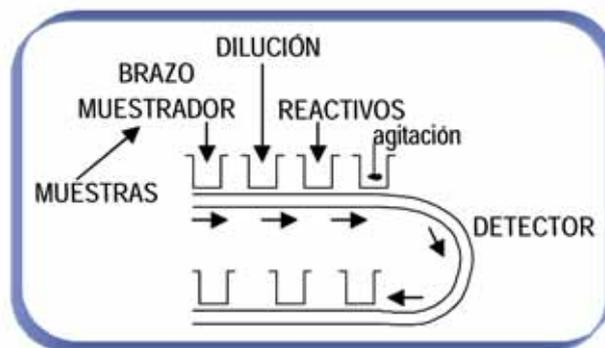
Estos métodos surgen de la necesidad de realizar los ensayos analíticos con un menor costo de material y tiempo, a la vez que disminuye la participación humana, con la ventaja que ello implica de mayor comodidad, mejora en la productividad, así como disminución de errores, riesgos para empleados y medio ambiente.

### 1.1 Tipos de sistemas analíticos automáticos

Los sistemas automáticos son aquellos que asignan unas acciones previamente programadas (por el operador) para ser llevadas a cabo en unos momentos determinados del proceso sin intervención humana. Estos sistemas no toman decisiones por sí mismos y siguen siempre la misma secuencia de operación.

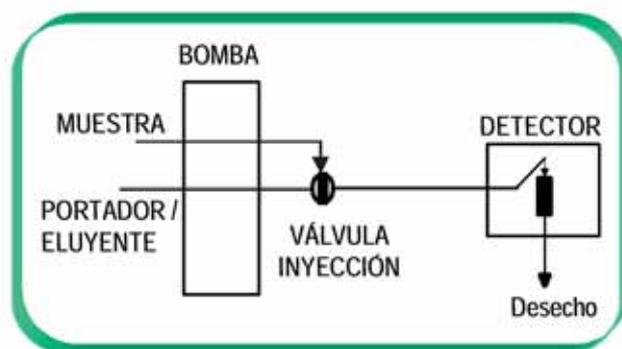
En función de cómo ocurre el proceso los métodos automáticos se clasifican en<sup>1</sup> discontinuos y continuos, encontrándose en algunas ocasiones una combinación de ambos:

-*Discontinuos*, en los que la muestra se mantiene separada en un receptáculo (cubeta) en el que tiene lugar las distintas etapas analíticas (adición de reactivos, agitación, calentamiento, dilución) (Ver *Figura II.1.*). Posteriormente se lleva a la unidad de detección donde se obtiene una señal analítica puntual para cada muestra, después de haber alcanzado el equilibrio químico (o estado estacionario).



**Figura II.1.** Esquema general de un sistema analítico automático discontinuo

-*Continuos*, la medida analítica se realiza sin interrumpir el flujo de un líquido o gas. Las muestras se van introduciendo directamente, a intervalos regulares de tiempo, en un canal por el que fluye un portador que puede ser el propio reactivo, en caso de ser necesaria una reacción química, o que confluye con éste. El flujo pasa continuamente por la célula de medida, cubeta de flujo, situada en la zona de detección de un detector apropiado, en donde se realizan las medidas. Las señales analíticas son transitorias en forma de pico. La *Figura II.2.* muestra un ejemplo de un sistema de este tipo.



**Figura II.2.** Esquema general de un sistema (FIA) analítico automático continuo

## 2.2 Sistemas analíticos automáticos continuos

Una clasificación general de los métodos automáticos continuos podría establecer dos grupos fundamentales: sistemas continuos de flujo segmentado y de flujo no segmentado. La *Tabla II.1* muestra una clasificación de los métodos automáticos continuos basada en el modo en que se elimina la posible interferencia mutua entre las muestras sucesivas.

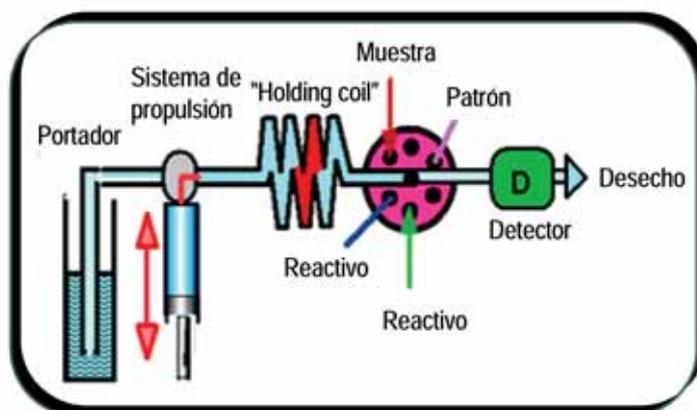
**Tabla II.1.** Métodos automáticos continuos

Flujo	Introducción de muestra		Naturaleza del flujo	Denominación
	Procedimiento	Tiempo		
Segmentado	Aspiración	Secuencial	Continuo	Análisis en flujo segmentado (SFA)
		Inyección	Secuencial	Continuo
	Inyección	Secuencial	Discontinuo	Métodos cinéticos a flujo detenido
No segmentado	Aspiración	Continua	Continuo	Análisis en flujo completamente continuo (CCFA)
		Secuencial	Continuo	
	Inyección	Secuencial	Discontinuo	Análisis en flujo con dispersión controlada (CDFA)

Los sistemas de *flujo segmentado* se caracterizan porque se introducen las muestras secuencialmente. Son aspiradas y espaciadas entre sí por medio de burbujas de aire, procurando en todo momento evitar el efecto de transporte, promoviendo la mezcla de muestras y reactivos, y limpiando las paredes del tubo.

Los sistemas de *flujo no segmentado* se caracterizan por la ausencia de burbujas de aire en el sistema. Las muestras se introducen de forma secuencial en el analizador, mediante inyección o inserción en una corriente de portador. Una diferencia muy importante de estos sistemas con los de flujo segmentado es que en el momento de llevar a cabo la detección, no se ha alcanzado ni el equilibrio físico (homogeneización del flujo) ni químico (desarrollo completo de la reacción analítica). De todos estos sistemas de flujo no segmentado, la técnica más empleada hoy día es el Análisis por Inyección en Flujo (FIA).

Ruzicka y Marshall en 1990 introdujeron otro tipo de sistemas de flujo no segmentado, el Análisis por Inyección Secuencial<sup>2</sup> (SIA), considerado como la segunda generación de las técnicas de flujo. Esta técnica está basada (*Figura II.3.*) en la aspiración secuencial de muestra y reactivo hasta un reactor (holding coil) mediante una válvula múltiple de selección, impulsando a continuación la mezcla, mediante un cambio en el sentido del flujo, hacia el detector. Presenta algunas ventajas, como un menor gasto de reactivos, disminución de los desechos y un control automático y preciso de la manipulación de muestras y reactivos, aunque la instrumentación necesaria es más costosa.



**Figura II.3.** Esquema general del Análisis por Inyección Secuencial (SIA)

De todos estos métodos continuos se expondrá más ampliamente la técnica de Análisis por Inyección en Flujo (FIA), debido a que ésta constituye la base de esta Memoria.

## 2. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

## 2. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

El análisis por inyección en flujo (FIA) es una modalidad de los sistemas en flujo continuo, en los que el flujo no está segmentado por burbujas de aire. Fueron descritos por primera vez a mediados de la década de los setenta por Ruzicka y Hansen<sup>3</sup> en Dinamarca y Stewart *et al.*<sup>4</sup> en Estados Unidos. Presentan gran versatilidad, puesto que permite al investigador hacer innovaciones en la determinación de compuestos con un presupuesto reducido y gran sencillez en el manejo, proporcionando resultados de gran rapidez, exactitud y precisión. El término de *Flow Injection Analysis (FIA)* se mantiene por razones históricas, debido a que Ruzicka y Hansen<sup>5</sup> empleaban una jeringa para introducir la muestra en el flujo, aunque, actualmente se realiza por inserción con válvulas rotatorias o mediante el uso de un inyector proporcional.

### 2.1 Características esenciales del FIA

Las características esenciales de la metodología FIA son:

- Flujo no segmentado por burbujas de aire, diferenciándose de los métodos de análisis en flujo segmentado.
- Inserción o inyección directa de un volumen bien definido de muestra en el flujo, en lugar de aspiración.
- Se realiza un transporte del bolo de muestra inyectado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso físico-químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.).
- La dispersión o dilución parcial del analito en ese transporte puede ser perfectamente controlada a través de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
- Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que es convenientemente registrada (fiagrama).

- En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogenización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). Por ello las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los Métodos Cinéticos de Análisis y en su modalidad de medida a tiempo fijo.
- El tiempo de operación debe ser muy reproducible, pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad, y por tanto, pequeñas variaciones del mismo pueden producir grandes alteraciones de los resultados.

## 2.2 Componentes básicos de un sistema FIA

Un sistema FIA elemental debe estar integrado por una serie de componentes básicos que proporcionen las condiciones ideales. A continuación se muestra un esquema de estos componentes y las características principales de cada uno.

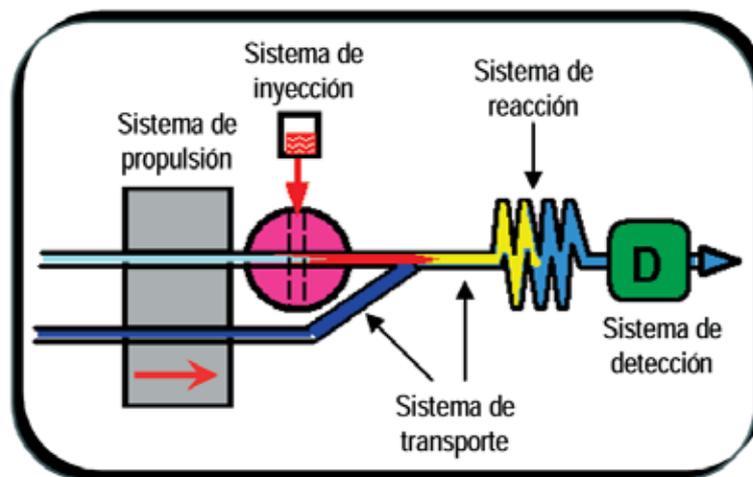


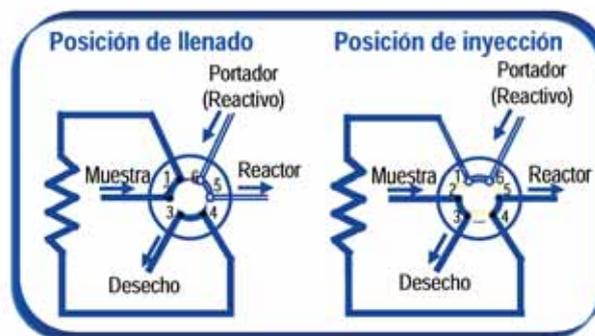
Figura II.4. Componentes básicos de un sistema FIA

**1. Sistema de propulsión** de la corriente portadora a través de las unidades elementales, que debe suministrar un flujo constante y regular en el sistema, ausente de impulsos y perfectamente reproducible.

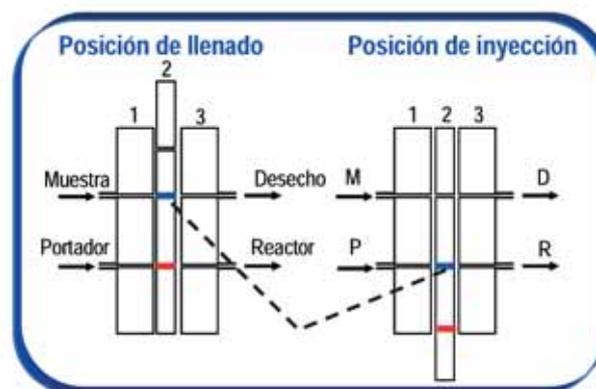
Pueden usarse como sistema de propulsión bombas, sistemas de presión o sistemas de gravedad. El más utilizado es la bomba peristáltica, basada en la presión ejercida por una serie de cilindros rotatorios sobre una serie de tubos de plástico flexible. El caudal suministrado por la bomba peristáltica vendrá determinado, entre otros factores, por el diámetro interno de los tubos.

**2. Sistema de inyección o inserción** de la muestra en la corriente portadora, que debe insertar volúmenes de muestra muy precisos y reproducibles, como un bolo, "plug", sin crear perturbaciones en el flujo del portador. Los volúmenes deben ser variables en un amplio rango, ampliando la versatilidad del sistema. Pueden controlarse mediante un motor eléctrico, y en cualquier caso, su utilización debe ser fácil, cómoda y rápida para ampliar la frecuencia de muestreo. El bolo de disolución de muestra debe insertarse en la corriente de portador de forma que este último no sea perturbado.

Pueden utilizarse jeringas y agujas hipodérmicas (que fueron los primeros sistemas de inyección utilizados), aunque los más empleados son la válvula rotatoria y el inyector proporcional. Las *Figuras II.5.* y *II.6.* muestran las posiciones de llenado e inyección en estos dos últimos sistemas.



**Figura II.5.** Válvula de inyección



**Figura II.6.** Inyector proporcional<sup>3</sup>.

**3. Sistema de transporte** de la disolución, que tiene como misión fundamental conectar entre sí los diferentes elementos y conseguir en el transcurso de los

fluidos a su través un adecuado grado de dispersión de la muestra con la corriente portadora. La trayectoria del flujo debe ser fácilmente reprogramable para realizar una amplia variedad de ensayos, y además los laterales de la corriente deben conectarse al flujo principal de forma fácil y reproducible.

Se utilizan tubos de pequeño diámetro (0.1-2 mm) de un material químicamente inerte y termoestable, de los cuales los más usados son el teflón, polietileno y propileno.

**4. Sistema de reacción** en donde se va a desarrollar la reacción química necesaria para la posterior detección del analito. Se suelen utilizar los mismos tubos empleados en el sistema de transporte, encontrándose en este caso enrollados en forma helicoidal. Este sistema de reacción puede estar calentado por baños termostatzados o mantas eléctricas.

**5. Sistema de detección** que permita la medida continua de una propiedad de la muestra o de un producto de reacción de ésta, proporcionando información cuantitativa y cualitativa. Para que un detector sea adecuado como sistema de medida en la técnica de inyección en flujo, éste debe poseer algunos atributos claramente definidos, tales como: pequeño volumen, bajo ruido, respuesta rápida y lineal en un amplio rango de concentraciones y alta sensibilidad.

Los sistemas de detección FIA pueden clasificarse en dos tipos según que éstos midan directamente una propiedad de la especie disuelta en la muestra inyectada, o bien necesiten una reacción adicional que origina un producto de reacción detectable. De esta manera el FIA puede aplicarse a especies activas o inactivas según su comportamiento en relación con el sistema de detección. De ahí que puedan clasificarse las técnicas FIA de acuerdo con:

- Análisis de muestras inyectadas que contienen especies no detectables por el detector empleado (análisis de muestras inactivas). Se pueden usar dos métodos en este caso: a) la disolución portadora contiene un componente detectable por el detector que reacciona con el analito; la concentración de la especie detectable decrece a medida que progresa la reacción; b) el flujo de disolución contiene una especie inactiva que reacciona con la disolución muestra para dar un producto de reacción detectable.
- Análisis de flujos de muestra conteniendo un componente no detectable por el detector empleado (análisis de especies inactivas en el flujo). En este caso se inyecta una disolución de un reactivo apropiado. Existen dos posibilidades: a) si el detector es sensible al reactivo se "sigue" el consumo de reactivo; b) si el producto de la reacción es activo en el detector, se

sigue su aparición. Obviamente los términos inactivo, no detectable, etc., dependen de la naturaleza del detector y de las condiciones experimentales.

La elección de una u otra técnica depende del problema a resolver, del volumen de muestra y de su concentración. En este último aspecto, si la muestra es concentrada, la inyección de muestra da resultados más satisfactorios que la inyección de reactivo, mientras que con muestras diluidas es preferible la situación inversa.

Los sistemas de detección más usados en FIA abarcan los más variados tipos existentes dentro de los métodos analíticos, ópticos (espectroscópicos y no espectroscópicos) y electroquímicos.

### ***Detectores Ópticos:***

Son los sistemas de detección más usados en FIA, debido al gran número de especies que pueden determinarse por este tipo de técnicas, bien por sus propiedades intrínsecas o por las de un producto de reacción con un reactivo determinado. Los más usados son los detectores de absorción molecular, seguidos por los de fluorescencia molecular, siendo ambos los que se han empleado en el desarrollo de esta Memoria.

Estos detectores ópticos se pueden clasificar en:

#### **-ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR UV-VISIBLE**

Es el sistema de detección más empleado en FIA, debido a la existencia de grandes cantidades de reacciones selectivas coloreadas<sup>6,7,8</sup> utilizables para todo tipo de compuestos y elementos, y a la gran cantidad de compuestos que presentan bandas representativas en la zona UV del espectro<sup>9</sup> (aunque el empleo de este sistema de detección en la zona UV del espectro ha sido poco utilizado debido a la baja selectividad que presenta).

A pesar de la enorme aplicación que ha tenido esta técnica en FIA, las células no han sufrido un desarrollo paralelo, habida cuenta que las células de flujo comerciales existentes se utilizan con buenos resultados. Estas células pueden estar fabricadas de cuarzo o vidrio óptico especial, dependiendo de la zona del espectro donde se realice la medida. Los dos tipos más comunes de estas células son:

- a) Tipo en U, con dos rendijas situadas en caras opuestas (el flujo entra y sale por la parte superior).
- b) Tipo en Z, donde el flujo entra por la cara inferior, saliendo por la superior. Es menos utilizada, ya que es más difícil adaptarla a los espectrofotómetros usuales.

En esta Memoria se incluyen seis sensores en flujo con este tipo de detección (cinco en la zona visible del espectro y uno en la UV).

#### -ESPECTROFLUORIMETRÍA

La detección fluorescente presenta muchas ventajas, como alta selectividad, bajo límite de detección, capacidad para la miniturización y bajo costo, por lo que ha sido ampliamente utilizada. Uno de los inconvenientes es el pequeño número de especies que manifiesta efecto fluorescente<sup>10,11</sup>, aunque puede ampliarse el campo de aplicación mediante el uso de reacciones químicas sencillas<sup>12</sup> o de la fluorescencia fotoinducida<sup>13</sup>. La aplicación del láser como fuente de excitación fue puesto a punto por Baumann<sup>14</sup>, y ha hecho posible la determinación de concentraciones a muy bajos niveles.

Las células fluorimétricas de flujo, al igual que las fotométricas, existen en el mercado con un diseño común, apto para su uso en FIA y responden a las características y materiales (éstas solo pueden ser de cuarzo) ya descritos para fotometría. La diferencia fundamental con aquellas se desprende de las características intrínsecas de la técnica: presentan tres ventanas en tres caras de la célula, mientras que la cuarta es opaca.

Cuatro sensores de esta Memoria utilizan detección espectrofluorimétrica.

#### -QUIMIOLUMINISCENCIA

La quimioluminiscencia exhibida por una sustancia es proporcional a la velocidad de la reacción que producen los estados electrónicamente excitados además de a la concentración del producto. Esta técnica también puede ser usada como sistema de detección en FIA<sup>15</sup>, aunque el diseño de una célula de quimioluminiscencia para FIA<sup>16,17</sup> difiere de los métodos basados en la medida de concentración, ya que nos interesa observar la reacción en el momento de la mezcla o en un tiempo muy corto, después de ésta, porque la intensidad es usualmente mayor al comienzo de la reacción.

#### -ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

Los mayores inconvenientes de este sistema de detección se centran en la falta de transparencia de los disolventes, así como en las dificultades del montaje y limpieza de las células. En este sentido, el empleo de mezclas de disolventes y el acoplamiento de la espectroscopia IR con las técnicas de inyección en flujo han hecho que el análisis cuantitativo de líquidos por IR vaya ocupando un lugar cada día más importante en la literatura científica<sup>18,19,20,21,22,23</sup>, aunque la sensibilidad no sea muy elevada. Con la espectrometría IR mediante la transformada de Fourier (FTIR),

en el tiempo requerido para medir un elemento de resolución mediante un espectrofotómetro dispersivo, es posible medir el espectro completo.

#### - ESPECTROSCOPÍA RAMAN

La espectroscopía Raman también se puede aplicar como sistema de detección en los métodos FIA, tanto para especies inorgánicas como orgánicas. Los espectros Raman tienden a ser menos confusos que los espectros de infrarrojo, por lo que es menos probable la superposición parcial en mezclas y las medidas cuantitativas son más sencillas. Además, la instrumentación Raman requiere pequeños volúmenes de muestra y no está sujeta a la influencia negativa de la humedad.

A pesar de estas ventajas, la sensibilidad obtenida con esta técnica no es muy elevada, lo que se puede mejorar notablemente con otros tipos de espectroscopía Raman, como la espectroscopía Raman sensibilizada en superficie (SERS)<sup>24,25,26</sup>. Esta técnica implica la obtención de los espectros de muestras que se adsorben en la superficie de partículas metálicas coloidales (normalmente plata, oro o cobre) o sobre superficies porosas de piezas de estos metales.

#### -REFRACTOMETRÍA

La refractometría se basa en la formación de un gradiente del índice de refracción entre la disolución de la muestra y una corriente de disolución estándar, la magnitud del cual es una medida del índice de refracción original de la muestra. Si una disolución de alto contenido salino (alto índice de refracción) se inyecta en una corriente de agua destilada que pasa por el transductor, cuando la muestra circula a través de él lo hace de tal forma que las líneas de igual concentración salina (isolíneas) tienen forma parabólica, características del flujo laminar del sistema. El sistema puede considerarse como una lente líquida cuyo foco o luz divergente es de una magnitud que depende de las dimensiones de la parábola, y de su situación respecto a la luz incidente, de la dirección y de la magnitud del gradiente de índice de refracción. A pesar de su alta sensibilidad, su aplicación a los métodos FIA<sup>27,28</sup> es muy escasa.

#### -TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS ATÓMICAS

En las técnicas atómicas generalmente se utiliza un volumen de muestra de 0.5 a 2 ml, pero para el análisis de muestras de menor volumen se puede conjugar con el FIA para resolver este problema. Una característica fundamental del uso en FIA de un instrumento de absorción atómica (cualquiera de sus modalidades)<sup>29,30,31</sup>, fotómetro de llama<sup>32</sup>, unidad ICP<sup>33,34</sup> o fluorescencia atómica<sup>35</sup>, es el hecho de no precisar célula de flujo. En estos sistemas, el portador, continuamente bombeado, se aspira hasta el nebulizador, y la inserción de la muestra en el mismo da lugar a

su aparición en el nebulizador, atomización o ionización sin ser necesaria la célula de flujo. Otra característica es la baja dispersión, factor adicional para una mayor sensibilidad. Actualmente la utilización del ICP como sistema de detección ha alcanzado un notable desarrollo, habida cuenta de la gran sensibilidad, frecuencia de muestreo y versatilidad que proporciona esta unidad de emisión.

### ***Detectores Electroquímicos***

Los detectores electroquímicos son de gran utilidad en sistemas hidrodinámicos debido a su selectividad, sensibilidad y linealidad de respuesta en un amplio rango de concentración. La propia naturaleza de los procesos electroquímicos, que generalmente ocurren en una superficie en lugar de hacerlo en volumen, los hace muy atractivos y convenientes para la detección miniaturizada. El principal inconveniente que plantea este tipo de detectores, lo constituye el material del electrodo. El envenenamiento de la superficie en el caso de electrodos sólidos debido a la adsorción, se manifiesta en una pérdida de estabilidad a causa de la pasivación y consecuente disminución de la señal.

Los detectores electroquímicos en FIA pueden clasificarse atendiendo a varios criterios:

*Según la base de la medida:*

- Detectores de propiedades de la disolución* (Conductimétricos y Capacitométricos): No son destructivos, son universales, su sensibilidad es moderada y su rango dinámico lineal es limitado.
- Detectores de propiedades del soluto* (Amperométricos, Coulométricos, Polarográficos y Potenciométricos): Son muy sensibles y específicos, y algunos son parcialmente destructivos. Estos detectores son reactores electroquímicos, ya que en los electrodos tienen lugar oxidaciones y reducciones. La señal que suministra el detector viene determinada por la concentración o actividad del compuesto, medida en las proximidades de la superficie del electrodo de trabajo.

*Según la situación de la superficie activa o sensor responsable de la señal analítica:*

- Detector anular*: La parte sensible está en forma de un anillo más o menos ancho, que normalmente coincide con las dimensiones internas de los tubos de transporte, por ejemplo el electrodo de vidrio.
- Detector de tipo varilla*: Se sitúa en la dirección del flujo. De este tipo son los electrodos metálicos (alambre de Ag, Pt, etc.).

- *Detector de choque*: El flujo incide frontal o tangencialmente con la superficie activa, la cual puede ser plana (electrodo selectivo de iones) o esférica (electrodo de gotas de mercurio).

*Según la posición del electrodo de referencia:*

- En la misma célula de flujo donde está situado el electrodo de trabajo.
- En un pozo o cavidad final donde se recoge el flujo de desecho del sistema.
- En lugares diferentes a los anteriores, tales como by-pass del sistema de inyección, tubo de salida de la célula, etc.

#### - TÉCNICAS AMPEROMÉTRICAS

De estas técnicas hay que distinguir entre los diseños que implican electrodos sólidos y los de gotas de mercurio (EGM). Los de EGM<sup>36</sup> tienen la ventaja de una superficie continuamente renovada que asegura una sensibilidad y un nivel de la línea base estables.

El campo de aplicación de estos detectores abarca, fundamentalmente, la determinación a muy bajas concentraciones de compuestos fisiológicamente activos, como neurotransmisores y sus precursores, y metabolitos<sup>37,38</sup>. Han sido propuestos numerosos diseños de células, sin embargo la geometría de la célula parece no tener gran influencia en parámetros como límites de detección y estabilidad del electrodo.

#### -TÉCNICAS POTENCIOMÉTRICAS

Un detector electroquímico en un sistema dinámico recibe el nombre de potenciométrico cuando la diferencia de potencial entre dos electrodos en condiciones de corriente constante (generalmente cero) se mide en función de los componentes del flujo. La detección potenciométrica presenta numerosas ventajas, como simplicidad del dispositivo experimental, sensibilidad, selectividad, rápida respuesta y química relativamente simple. Las desventajas más importantes son la difícil interpretación de la medida si el ión a determinar está prácticamente complejado, y ser sensibles a la actividad iónica solo en la inmediata vecindad de la membrana.

Dentro de esta técnica se distinguen los distintos tipos de medidas<sup>39,40,41</sup> que corresponden a: electrodos redox, electrodo de vidrio, electrodos selectivos de iones (ISFETS), y redisolución potenciométrica.

### -TÉCNICAS COULOMÉTRICAS

La coulometría por inyección en flujo (FIC) está basada en la medida de la integral del pico corriente-tiempo (i-t), obtenido en la inyección de un pequeño volumen de disolución que contiene especies electroactivas en un flujo de electrolito-soporte que pasa a través de un detector que opera en condiciones de transporte de masa limitado<sup>42,43</sup>. El FIC es más efectivo cuando el electrodo tiene una gran superficie y pequeño volumen interno, llamándose entonces "electrodo coulométrico".

El aporte de reactivo en esta técnica puede realizarse por generación electrolítica externa, lo que tiene un amplio campo de aplicación, especialmente cuando el reactivo se inyecta en la disolución; o por un proceso de electrolisis continuo.

### -TÉCNICAS CONDUCTIMÉTRICAS

La asociación de esta técnica con el FIA<sup>44,45</sup> ha dado lugar a un nuevo método de inyección en flujo, donde las muestras se eluyen a través de una célula de conductividad miniaturizada. Una columna de cambio iónico reduce la contribución a la conductividad del ácido o la base por neutralización a H<sub>2</sub>O. La conductividad diferencial es, por tanto, proporcional al contenido de ácido o base no considerando la sal.

## 2.3 Características de los métodos FIA

Los métodos FIA muestran una serie de características destacables desde el punto de vista de los resultados:

### 2.3.1 Sensibilidad

En general los métodos FIA son algo menos sensibles que las técnicas manuales por dos razones: cuando se hacen reacciones derivadoras, al ser el tiempo de reacción corto, se consiguen rendimientos parciales de reacción; y la segunda razón radica en el hecho de que al existir una dispersión física o dilución de la muestra en el portador, no se alcanza la máxima señal posible (bolo sin diluir). Son muchas las modificaciones que pueden hacerse en los montajes FIA para paliar esta característica nada ventajosa:

- El empleo de un soporte sólido que permita la retención-preconcentración del analito a partir del bolo de muestra. Esta alternativa es la que elegimos en el desarrollo de los sensores que proponemos en esta Memoria.

- El empleo de sistemas continuos de separación incorporados al FIA puede mejorar indirectamente la sensibilidad de la determinación.
- La interrupción del flujo cuando el bolo reaccionante se encuentra en el reactor, permite el desarrollo de la reacción sin que se produzca dilución.
- Para conseguir una mezcla más eficiente entre el bolo de muestra y el reactivo, se utiliza un punto de confluencia entre un canal de disolvente puro, que recibe el bolo de muestra, y el canal de reactivo.

### **2.3.2 Selectividad**

La adaptación de un método convencional para ser llevado a cabo de manera semiautomática o automática por FIA conlleva, en general, una reducción más o menos notable tanto del número de especies interferentes, como del nivel de perturbación. Este hecho se ha constatado en numerosas determinaciones FIA al establecer la comparación con el método manual.

El mayor nivel de selectividad logrado se debe en muchos casos a que las reacciones paralelas indeseables no se desarrollan en el corto espacio de tiempo de medida (tiempo de residencia en FIA). Además, esta característica se ve aún más incrementada en nuestros métodos por el uso de un soporte sólido que nos permita la fijación solo del analito en estudio.

### **2.3.3 Precisión**

A pesar de que en la metodología FIA concurren aspectos cinéticos, físicos y químicos, que a priori pueden hacer suponer que los resultados no han de caracterizarse por su buena precisión, de hecho se alcanzan niveles de reproducibilidad notables y perfectamente comparables con los conseguidos con las metodologías manuales. A pesar de que son varias las causas que pueden ocasionar fluctuaciones en la señal FIA (modo de inyección, fluctuaciones de la temperatura, cambios en la concentración de reactivo o portador, etc.), es sin duda la constancia en el caudal el factor más crítico. Es importante elegir un tipo de bomba que origine caudales constantes.

### **2.3.4 Rapidez**

La rapidez de la metodología FIA tiene su mayor incidencia en la frecuencia o velocidad de muestreo, siendo comparablemente superior respecto a las técnicas

manuales. Esta mayor velocidad de muestreo en FIA puede atribuirse a las existencias de fuerzas de difusión radiales, de gran significación con relación a las de difusión axial y de convección, que ejercen un efecto de lavado evitando la contaminación mutua entre las muestras al limitar el ancho de banda.

Es indudable que factores como volumen de muestra, volumen interno del reactor y caudal son decisivos al establecer la velocidad de muestreo. Deben elegirse en cada caso las condiciones adecuadas a las necesidades.

### **2.3.5 Sencillez**

La técnica FIA se caracteriza por su gran simplicidad debido a:

- Montajes no sofisticados compuestos por tubos de teflón, conexiones, bifurcaciones, etc., de fácil ensamblaje, en contraste con las nuevas metodologías analíticas surgidas en los últimos años, que se basan en instrumentos complicados difíciles de adquirir, poner a punto y mantener.
- Fácil manejo. No solo es tarea sencilla el uso de un montaje FIA para análisis de rutina, sino que es muy fácil también manipular su diseño para conseguir los resultados deseados. Así, es fácil sustituir algún componente, alargar un reactor, modificar la temperatura, etc., para adaptar el mismo montaje a la determinación de un analito en diferentes matrices.

### **2.3.6 Economía y versatilidad**

Al ser el FIA una técnica sencilla y simple, se caracteriza por su bajo coste, en claro contraste con otras metodologías automáticas, tanto continuas segmentadas, como discontinuas. Además, el carácter modular de un sistema FIA permite su adaptación a las diferentes necesidades que hoy día tiene la sociedad y cuya resolución compete a la Química Analítica. La sustitución de cualquiera de sus componentes y la incorporación de otros es tarea sencilla si se tiene en cuenta la ausencia de altas presiones que complicarían estas operaciones. La optimización de un nuevo montaje preparado en pocos minutos es fácil de llevar a cabo a diferencia de otros sistemas automáticos de análisis.

### 3. Espectroscopía en fase sólida

### 3. ESPECTROSCOPÍA EN FASE SÓLIDA

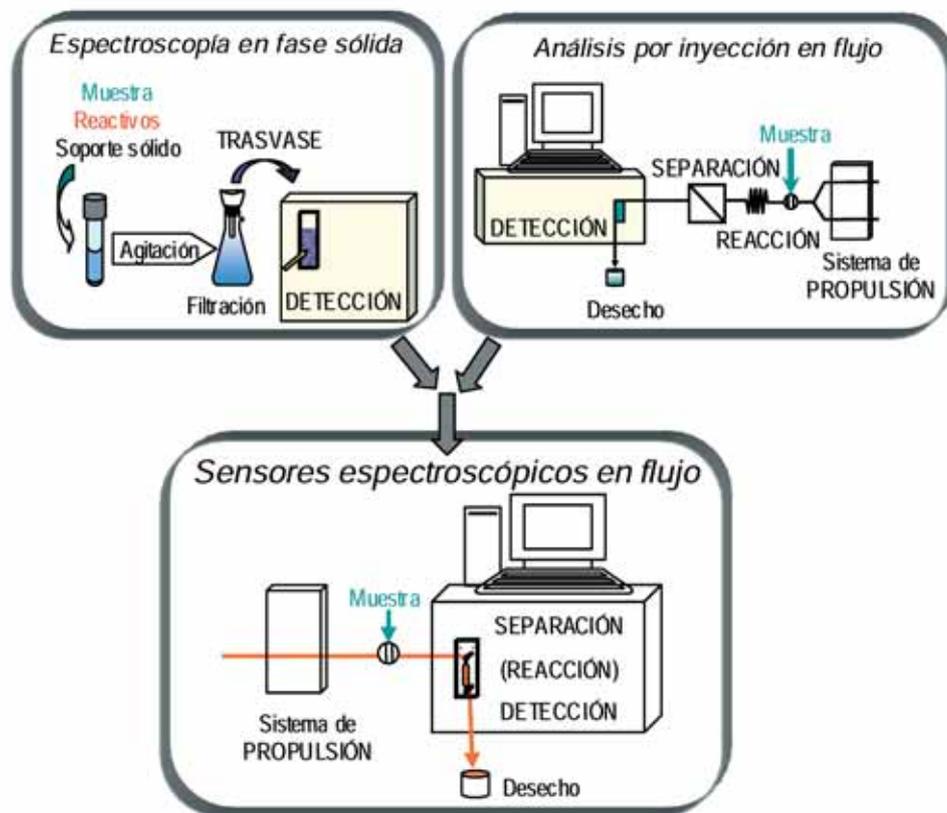
La Espectroscopía en Fase Sólida (SPS) surge como intento de aplicación al análisis cuantitativo del fundamento de los "resin spot tests" (ensayos a la gota sobre resinas intercambiadores de iones). Esta técnica consiste en ensayos cualitativos de observación visual basados en la aparición de coloración en unos granos de resina de cambio iónico debido a la fijación en ella del producto de reacción del analito con los reactivos, que debe ser una especie cargada eléctricamente. A pesar de los numerosos trabajos sobre "resin spot tests" publicados desde que en 1954 Fujimoto<sup>46</sup> propusiera la referida técnica de microanálisis cualitativo, en ninguno de ellos se hizo un intento de cuantificación del analito y tuvieron que pasar más de dos décadas hasta que en 1976 Kazuhisa Yoshimura<sup>47</sup> diera a conocer los primeros métodos de determinación cuantitativa basados en la medida directa de la absorbancia de la especie coloreada sorbida en fase resina, que él llamó *Colorimetría de Cambio Iónico* y que más ampliamente debemos denominar *Espectroscopía en Fase Sólida*.

La espectroscopía en fase sólida es una metodología relativamente nueva que ha sido aplicada a una gran variedad de analitos orgánicos<sup>48,49</sup> e inorgánicos<sup>50,51</sup> y los métodos basados en ella ofrecen una alta sensibilidad y selectividad<sup>52,53,54</sup>, utilizando una instrumentación barata y sencilla, mostrando además una gran aplicabilidad en el análisis de muestras reales. El analito, al que generalmente se ha sometido a un proceso de derivación, es previamente fijado por equilibración en un soporte sólido adecuado, que posteriormente se introduce en el interior de una cubeta (1 mm de paso de luz) donde se produce la detección directa del mismo.

Una gran ventaja de la SPS respecto a la Espectroscopía convencional radica en el notable incremento de sensibilidad que ofrece, pues la misma es función del volumen de muestra a analizar, pudiendo cuantificarse niveles de concentración inferiores a  $0.1 \text{ ng ml}^{-1}$ . Se ofrece así la posibilidad de determinación de elementos traza por Espectroscopía sin que sea obligado el empleo de una preconcentración del analito, seguida de una indeseable elución, tal como se requiere en la Espectroscopía convencional. Otras ventajas de la SPS son la buena selectividad que se alcanza (al combinar la naturaleza de los reactivos y la fijación sobre un soporte sólido) y

el bajo costo de la técnica. Mediante SPS se han determinado un amplio conjunto de elementos y compuestos<sup>55,56,57,58,59,60,61</sup>.

Posteriormente, la SPS se implementó con la detección on-line<sup>62</sup> dando lugar a la metodología SPS-FIA (ver *Figura II.7.*). De esta manera, las ventajas de la SPS (principalmente sensibilidad y selectividad), se han podido sumar a las ventajas intrínsecas del FIA (rapidez, comodidad, automatización, menor consumo de reactivos y de soporte sólido, etc.).



**Figura II.7.** Integración de la SPS con el FIA: Sensores espectroscópicos en flujo

## 4. Sensores químicos

## 4 SENSORES QUÍMICOS

Un **Sensor químico** ideal podemos definirlo<sup>1</sup> como un dispositivo analítico miniaturizado que responde de manera directa, reversible, continua, rápida, exacta y precisa a los cambios de concentración de la especie o especies de una muestra<sup>63</sup>. Está constituido por una microzona sensora, donde tiene lugar una reacción química (o bioquímica) y/o proceso de separación, que está conectada con (o integrada en) un transductor óptico, eléctrico, térmico, de masas o acústico.

La amplia variedad existente de sensores hace difícil describir su comportamiento en términos generales, sin embargo, establecer sus características generales, indispensables unas, deseables otras, es más fácil. Algunas de ellas coinciden con las características analíticas esenciales: exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad; otras se refieren al tipo de funcionamiento: reversibilidad, reutilizabilidad en procesos irreversibles o regenerables. Otras características básicas son aquellas relacionadas con el tiempo: respuesta lo más próxima posible a tiempo real, rapidez en los procesos reversibles y en los de generación y estabilidad (duración y tiempo de vida operacional). Finalmente, otras características destacables son: simplicidad de construcción y operación, robustez, bajo costo, posibilidad de trabajo con muestras complejas y, por último, necesidad de no interpretación de resultados por parte del operador.

Existe una gran variedad de sensores y su clasificación puede hacerse en función de un amplio conjunto de criterios diferentes: parámetro de medida (sensores químicos o bioquímicos), naturaleza (sensores reversibles, irreversibles o desechables y regenerables), forma externa (sensores planos, de sonda o de flujo), relación de la zona sensora con el detector (sensores conectados o integrados), modo de medida (discontinuos o continuos) o naturaleza del detector (sensores ópticos, eléctricos, térmicos, de masa, acústicos, etc). También pueden clasificarse en monoparámetro o multiparámetro, según respondan a un solo analito o a varios, y en simultáneos o secuenciales según respondan a la vez o sucesivamente a varios analitos.

En esta Memoria nos centraremos en los sensores ópticos en flujo continuo, es decir, sensores en los que la zona sensora se sitúa en el interior de una célula de flujo, ubicada en el seno de un detector espectroscópico no destructivo.

#### **4.1 Sensores Químicos en Flujo Continuo**

En los sistemas analíticos de flujo continuo, la detección en la célula de flujo, las reacciones químicas y los procesos de separación que implican transferencia de materia entre dos fases, tienen lugar en módulos diferentes, es decir, se llevan a cabo de forma secuencial. Existen cuatro formas de integrar estos pasos:

1. Integrar la separación con la reacción analítica.
2. Integrar la reacción química con la detección.
3. Integrar la separación continua con la detección.
4. Integrar la separación continua con la reacción química y la detección.

Los dispositivos que integran estos pasos en una célula de flujo según las modalidades 2, 3 y 4 pueden considerarse sensores, pues poseen los principales requisitos exigibles a éstos.

Nos centraremos en las modalidades 3 y 4, pues son las desarrolladas en los sensores de esta Memoria. A su vez, estas modalidades son compatibles tanto con aquellos sensores de superficie regenerable (*Capítulo II, apartado 4.5.*) como con aquellos que se basan en la renovación de dicha superficie (*Capítulo II, apartado 4.6.*).

##### **4.1.1 Sensores que integran retención y detección**

Los sistemas integrados de separación-detección incluyen tres tipos de interfases: gas-líquido (difusión gaseosa), líquido-líquido (diálisis, extracción) y sólido-líquido (adsorción, cambio iónico, etc.). En los dos primeros la construcción de sensores basados en dicho fenómenos es difícil, ya que no cumplen los requisitos necesarios para el desarrollo de los sensores. Es en la interacción sólido-líquido, donde el diseño de sensores que integran retención-detección encuentra mayores posibilidades de expansión, ya que no solo es posible retener el analito y monitorizar alguna propiedad intrínseca del mismo, sino que se puede retener también el producto de una reacción que haya tenido lugar previamente.

Los sensores de este tipo más frecuentemente empleados se basan en el uso de un material sorbente como una resina de cambio iónico, o sílice con fases enlazadas, empaquetado en la célula de flujo de un detector espectroscópico (no destructivo) y en el que se retiene el analito o su producto de reacción. Son sensores irreversibles, reutilizables en los que a lo sumo tienen lugar dos pasos, retención y elución, de forma secuencial pero simultáneamente con la detección en cada determinación.

Gran parte de los sensores fotométricos en flujo basados en la retención y medida de la absorbancia intrínseca del analito, han sido desarrollados por el área de Química Analítica del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén (Grupo de Investigación del PAI FQM 323). Sin embargo, el primer sensor de este tipo fue desarrollado por Yoshimura<sup>62</sup> para la determinación de cobre, utilizando como microzona activa una resina AG50W-X12 ubicada en una célula de flujo comercial. Este autor también describió el primer sensor fluorimétrico de estas características<sup>64</sup> para la determinación de algunos elementos lantánidos, empleando como microzona sensora una resina catiónica (Sephadex CM C-25).

Mucho más frecuentes son los sensores para la determinación de cationes metálicos en los que la especie retenida es el producto de una reacción previa a la retención<sup>65</sup>, siendo más escasos los sensores cuyos analitos son aniones o compuestos de naturaleza orgánica.

En esta Memoria se exponen cuatro sensores que integran retención y detección simultáneamente. Tres de ellos están basados en la medida de la señal analítica intrínseca de los analitos (sensores para Compuestos Fenólicos, Warfarina y Tiabendazol-Warfarina), mientras que en el cuarto sensor (sensor para Fenotiazinas) el proceso de retención-detección es posterior a la reacción previa en el sistema de flujo entre el analito y el reactivo (la reacción no ocurre en la zona de detección).

#### **4.1.2 Sensores que integran reacción, retención y detección**

En este caso hay que agregar a las características de los sensores comentados anteriormente el hecho de que la reacción entre el analito y el reactivo ocurre también en la zona de retención-detección.

Existen diferentes alternativas para el desarrollo de estos sensores: (1) Muy frecuentemente se emplea un reactivo (cromogénico o fluorogénico) permanentemente inmovilizado en la microzona activa. El primer sensor de este tipo fue propuesto por Lázaro *et al.*, para la determinación de cobre por reacción con 1-(2-piridilazo)-2-naftol irreversiblemente inmovilizado sobre resina Dowex 50Wx4<sup>66</sup>. (2) En otros sensores descritos el reactivo es retenido temporalmente sobre el soporte sólido, produciéndose a continuación la llegada de la muestra; posteriormente el sensor se regenerará mediante la elución, no solo del analito,

sino también del reactivo<sup>67,68,69</sup>. (3) Por último, esta triple integración de reacción, retención y detección puede tener lugar también por retención transitoria del analito en el soporte sólido, produciéndose seguidamente la reacción en la fase sólida como consecuencia de pasar a través de ésta una disolución de reactivo<sup>70</sup>.

El resto de los sensores desarrollados en esta Memoria, seis, están basados en algunos de estos principios. Solo se introduce una variante a lo descrito anteriormente, y es la renovación de la zona sensora una vez finalizado el proceso. Todo esto se comenta más adelante (*apartado 4.6*).

## 4.2 Multisensores

Los sensores que permiten la detección simultánea de más de un analito son técnicamente más complejos que los sensores monoparámetro, principalmente debido a la necesidad de que el detector sea capaz de proporcionar información multidimensional, en un período de tiempo compatible con las características del sensor, sin embargo presentan indiscutibles ventajas.

Una multideterminación consiste en la determinación de dos o más analitos sobre una muestra, pudiendo ser:

- a) *Secuencial*: Determinación de  $n$  analitos a partir de  $n$  inyecciones de muestra. En bibliografía encontramos algunos ejemplos de estos sensores biparámetro (determinación de dos analitos)<sup>71,72,73</sup>.
- b) *Simultánea*: Determinación de varios analitos a partir de una simple inyección de muestra. Estos últimos generalmente conllevan el tratamiento posterior de los datos mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)<sup>74,75,76</sup>. Otro multisensor descrito emplea la medida a diferentes longitudes de onda<sup>77</sup>. También se puede realizar determinaciones simultáneas basadas en la diferencia de la cinética de retención de los analitos en un soporte sólido colocado previamente a la célula de medida, con lo que la determinación de los analitos se realiza secuencialmente en el tiempo<sup>78,79,80</sup>, pero con sólo una inyección de muestra.

En esta Memoria se proponen tres sensores multiparámetro (biparámetro), en dos de ellos se realizan determinaciones secuenciales, ya que se determinan dos analitos con dos inyecciones de muestra (sensor Cu(II)-Zn(II) y Be(II)-Al(III)), mientras que en el tercer sensor biparámetro (sensor para Tiabendazol-Warfarina) se potencia la diferencia en la cinética del proceso de retención-elución de los analitos mediante el empleo de una precolumna *on line* empaquetada con el mismo

soporte que la célula de medida. De esta manera se consigue que los analitos lleguen a la zona de medida de forma secuencial, aunque la determinación se considera simultánea, ya que se necesita una sola inyección de muestra para determinar ambos componentes.

### 4.3 Fundamento de los sensores

Todos estos sistemas son compatibles con detectores espectroscópicos moleculares (no destructivos). La microzona de la fase sólida donde se monitoriza continuamente la detección está integrada (no conectada) en el detector y a su través fluye un flujo continuo de portador. El bolo de muestra es insertado en esta corriente y la radiación interacciona directamente con la zona sensora integrada en el área de detección. Estos dispositivos, basados en la interacción de la radiación con la superficie sólida integrada en el detector se llaman optosensores en flujo<sup>81</sup> o sensores espectroscópicos en flujo. Así, estos dispositivos son puestos en contacto directo con la muestra proporcionando (idealmente) una respuesta rápida, reversible y continua<sup>82</sup> que es transducida vía un detector espectroscópico molecular no destructivo.

La señal analítica medida en los sensores en flujo continuo está directamente relacionada con la concentración de analito en la muestra inyectada. En el caso de los sensores espectrofotométricos, la Absorbancia (en realidad, atenuación) medida sobre el soporte sólido, consta de varios componentes:

$$A = A_A + A_R + A_S \quad (1)$$

donde,

$A_A$  = absorbancia del analito o su derivado retenido en el sólido

$A_R$  = absorbancia del sólido (soporte sólido + reactivo, si lo hay)

$A_S$  = absorbancia de la solución intersticial entre las partículas del sólido (puede ser despreciada frente a los otros términos).

El empaquetamiento de las partículas del sólido activo afecta a los valores de  $A_A$  y  $A_R$ . Sin embargo, cuando el flujo está circulando unos cuantos segundos, el empaquetamiento es fijo (constante) y la línea base muestra un valor constante, igual a  $A_R + A_S$ . Por tanto el pico obtenido al paso del analito  $A_A$  corresponde a la diferencia entre el valor experimental medido  $A$  y  $A_R + A_S$ . De esta forma, la señal analítica de estos sistemas puede obtenerse directamente midiendo a una sola longitud de onda, y pueden llevarse a cabo reiteradas medidas sobre el mismo

empaquetamiento del sólido. Sin embargo, en SPS en modo batch, aunque cada medida se realiza con una misma cantidad de soporte sólido en la célula de medida, el empaquetamiento es diferente en cada caso lo que origina medidas no reproducibles si se mide a una sola longitud de onda. Por ello, en SPS manual se necesita efectuar las medidas a dos longitudes de onda (una en el máximo de absorción y otra donde sólo la resina absorbe luz).

La absorbancia neta del analito viene dada por

$$A_A = \varepsilon_R b_R C_R \quad (2)$$

siendo,

$\varepsilon_R$  = absorptividad molar aparente del analito en la fase sólida tal como se observa en el sistema de flujo ( $\text{kg mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$b_R$  = longitud media de paso óptico (cm)

$C_R$  = concentración de analito en la fase sólida ( $\text{mol kg}^{-1}$ )

Cuando se inyecta en el sistema un volumen determinado ( $V$ , l) de una muestra conteniendo una concentración  $C_0$ ,  $\text{mol l}^{-1}$ , de analito, la concentración sobre la fase sólida ( $C_R$ ,  $\text{mol kg}^{-1}$ ) será:  $C_R = C_0 V / m_r$  ( $m_r$  = masa de sólido, kg) suponiendo un valor alto del coeficiente de distribución (como suele ser lo habitual). Por tanto,

$$A_A = \varepsilon_R b_R V C_0 / m_r \quad (3)$$

Por consiguiente, manteniendo  $V$  y  $m_r$  constantes, existe una relación lineal entre la señal analítica y la concentración inicial,  $C_0$  del analito en la solución de muestra inyectada, siendo  $\varepsilon_R b_R V / m_r$  la pendiente de la recta de calibración.

De esta ecuación se desprende una importante característica de estos sensores en flujo: manteniendo  $C_0$  constante,  $A_A$  crece conforme crece  $V$ . Por tanto, cabe esperar una relación lineal entre  $A_A$  y el volumen de muestra inyectado, es decir, la sensibilidad es proporcional al volumen de muestra usado para el análisis y, por tanto, puede incrementarse aumentando el volumen de ésta.

En sensores fluorimétricos también puede encontrarse una relación similar entre la señal analítica y la concentración de analito en la solución problema. La señal de fluorescencia de la especie de interés retenida en el soporte sólido viene dada por la siguiente expresión<sup>83</sup>:

$$I = 2.303\Phi_F \frac{1}{1+2sb_R} I_0 \epsilon_R b_R C_R \quad (4)$$

$\phi_F$  = rendimiento cuántico de fluorescencia

$I_0$  = intensidad del haz de excitación

$s$  = coeficiente de dispersión

$\epsilon_R, b_R, C_R$  = análogos a la expresión (2)

Por tanto,

$$I = 2.303\Phi_F \frac{1}{1+2sb_R} I_0 \epsilon_R b_R \frac{VC_0}{m_r} \quad (5)$$

es decir, la señal de fluorescencia y la concentración de la especie de interés también están directamente relacionadas y el efecto del volumen de muestra es similar al caso de los sensores fotométricos.

Además, la cantidad a usar,  $m_r$ , debe ser la mínima posible que permita la geometría de la célula y el diseño del haz de luz del detector, pues la señal, de acuerdo con las ecuaciones (3) y (5), es inversamente proporcional a la cantidad de soporte sólido empleado.

Por ello, el nivel de sólido en la célula es una variable clave: debe llenarse hasta una altura tal que el haz de luz incida completamente sobre el soporte sólido y que éste apenas llegue a exceder el límite superior del haz de luz, pues alturas superiores originan la fijación de la especie de interés por encima del haz (fuera de la zona de detección) o bien la dispersión del bolo de muestra a lo largo de una mayor cantidad de sólido, con pérdida de sensibilidad y disminución de frecuencia de muestreo. Niveles más bajos del indicado, producen una disminución de la señal, pues la luz pasa total o parcialmente a través del flujo de disolución. En definitiva, la parte superior del sólido debe mantenerse tan próxima al límite superior del haz como sea posible, pero por encima de él. También influye la geometría del compartimento (forma y altura del haz de luz).

Por su parte, la célula ideal para un sensor en flujo debe conseguir la concentración del producto de interés sobre el soporte en un área de la célula tan pequeña como sea posible. El haz de radiación debe incidir sobre esta área sin perder luz en las proximidades de la zona citada.

#### 4.4 Tipos de Soporte Sólido

La elección del soporte entre la gran variedad de materiales sintéticos y naturales que pueden emplearse, constituye una parte esencial del diseño del sensor, ya que sobre la superficie del mismo se va a producir la integración de reacción y/o retención y la detección espectroscópica. El soporte sólido empleado debe reunir ciertos requisitos, como son:

- I. El tamaño de las partículas debe ser lo suficientemente grande como para permitir que el líquido circule libremente, teniendo en cuenta que una de las mayores ventajas de la técnica FIA es la de trabajar a bajas presiones.
- II. Con el fin de garantizar la reproducibilidad de respuesta del sensor, el soporte debe ser mecánicamente resistente al flujo continuo: no debe producirse la ruptura de las partículas o la aparición de huecos, que provocarían variaciones en la superficie de contacto sólido-disolución. Debe ser además, resistente al efecto de "barrido", provocado por el flujo continuo de portador, para que no se produzca una pérdida gradual de la actividad del soporte.
- III. Ha de ser químicamente inerte frente a los componentes de las disoluciones empleadas, portador, eluyente y otros reactivos, ya que en caso contrario la vida media del sensor se vería gravemente afectada.
- IV. Debe ser de un material compatible con la técnica integrada de detección, así, en sensores espectrofotométricos, el soporte debe ser suficientemente transparente como para permitir la medida de absorbancia; y en sensores espectrofluorimétricos la emisión del fondo debe ser lo más baja posible.
- V. El proceso de retención-elución debe ser suficientemente rápido.

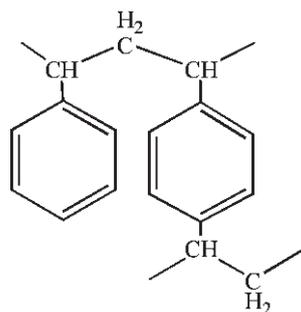
Los cuatro tipos de materiales más usados son:

1. Cambiadores iónicos derivados de polímeros de estireno.
2. Cambiadores iónicos derivados de polímeros de dextrano.
3. Resinas adsorbentes sin grupos funcionales.
4. Sílice con fases enlazadas.

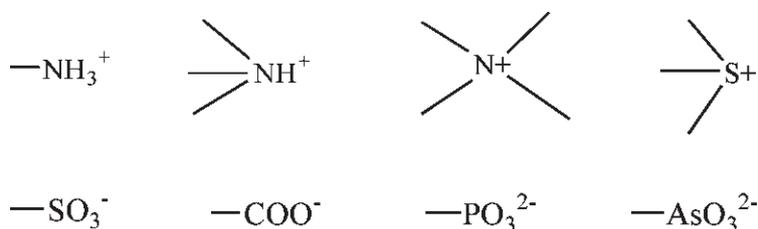
Existe gran variedad de productos sintéticos y naturales que muestran propiedades adecuadas, a continuación se detallan los más utilizados:

#### 4.4.1 Cambiadores iónicos derivados de polímeros de estireno.

Los polímeros de cambio iónico más importantes hoy en día son aquellos basados en el poliestireno. Están constituidos por una matriz hidrófoba formada por cadenas lineales de poliestireno unidas entre sí por puentes de divinilbenceno (tipo Dowex 1, Dowex 50W, etc.), que puede ser representada así:



Unidos al anillo aromático, se hallan los grupos cambiadores, que pueden ser de ácido fuerte o débil para los cambiadores catiónicos (tipo Dowex 50) y de base fuerte o débil para los aniónicos (tipo Dowex 1):



Al ponerse en contacto con agua o cualquier disolvente polar, lo absorben en su interior, convirtiéndose en "geles", ya que se trata de materiales porosos y poseen grupos hidrófilos, por lo que son afectados por las características del medio de reacción (pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, etc.) que influyen decisivamente en el grado de hinchamiento.

El grado de entrecruzamiento (relacionado directamente con el porcentaje de divinilbenceno) tiene una influencia decisiva en las características del cambiador, ya que determina el tamaño de los microporos de la matriz, la capacidad de hinchamiento y la movilidad de los contraiones, determinando la velocidad del proceso de cambio iónico. Para el empleo de estos cambiadores en técnicas absorciométricas en fase sólida, hay que tener en cuenta, además, que al aumentar el porcentaje de entrecruzamiento disminuye notablemente la transparencia del soporte.

Desde el punto de vista de su empleo en el desarrollo de sensores, hay que destacar que son muy útiles para la retención/elución de complejos inorgánicos o en el caso de cambiadores catiónicos para la retención irreversible de reactivos orgánicos que formen complejos con cationes. Los cambiadores aniónicos son menos útiles para la retención irreversible de reactivos, pues si al pH óptimo de la reacción éstos están cargados negativamente el anclaje sobre el cambiador se produce a través de los grupos quelantes, inactivándolos.

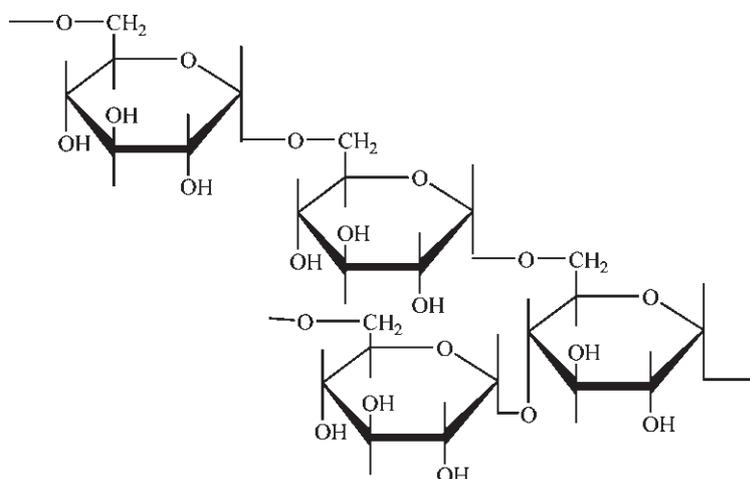
La utilización de estos soportes en sistemas que emplean reactivos aromáticos que forman complejos muy estables con cationes o aniones inorgánicos, plantea también numerosos inconvenientes, pues la elución del complejo resulta enormemente difícil.

Las resinas microporosas no pueden emplearse cuando lo que interesa es fijar una muestra compleja, de naturaleza orgánica. Es necesario en estos casos recurrir a las resinas «macroporosas o reticulares» que poseen una gran superficie interna y permiten un acceso más fácil de las moléculas reaccionantes y por tanto un cambio iónico más rápido que los polímeros convencionales tipo «gel».

#### 4.4.2 Cambiadores iónicos derivados de polímeros de dextrano

Las resinas derivadas de polímeros de dextrano están formadas por polisacáridos que se obtienen entrecruzando dextrano con epíclorhidrina, son por tanto, cambiadores de naturaleza polar, debido a los numerosos grupos hidroxilo existentes en los anillos de la estructura. Son adsorbentes polares con grupos no iónicos.

Pueden introducirse grupos funcionales iónicos obteniéndose cambiadores iónicos con carácter ácido fuerte (Sephadex SE y SP) y ácido débil (Sephadex CM), base fuerte (Sephadex GE, TEAE, QAE) y base débil (Sephadex DEAE, AE, ECTEOLA). La utilidad de estos cambiadores dependerá en gran medida del pH. El esqueleto del polisacárido puede ser representado de la forma siguiente:



Estos soportes pueden ser utilizados para la retención de complejos con ligandos tanto orgánicos como inorgánicos, ya que la naturaleza no aromática del cambiador, hace que la retención se produzca mediante interacciones casi exclusivamente electroestáticas, o en cualquier caso, débiles, facilitándose mucho la elución con respecto a los cambiadores mencionados en el apartado anterior. También son muy útiles para la determinación de especies orgánicas por medida de su absorbancia intrínseca en la zona UV, lo que resulta imposible con cambiadores de naturaleza aromática debido a la intensa absorción que presentan.

#### **4.4.3 Resinas adsorbentes sin grupos funcionales.**

Son resinas adsorbentes constituidas por cadenas de poliestireno entrecruzadas mediante moléculas de divinilbenceno (al igual que las resinas tipo Dowex), pero carentes de grupos funcionales cambiadores de iones (otro tipo, menos frecuente, está fabricado a partir de acrilato). Bien conocidas son las resinas macroporosas tipo Amberlita XAD, que son materiales porosos por lo que, al igual que las tipo Dowex, se afectan por las características del medio de reacción, aunque no tanto como aquellas.

Las resinas adsorbentes son capaces de retener gran cantidad de reactivos aromáticos por adsorción, de este modo los grupos activos de dichos reactivos quedan libres y éstos no pierden su capacidad de complejación. No obstante, su alta opacidad en toda la región del Visible (y UV) limita fuertemente su uso en SPS.

Su obtención se lleva a cabo realizando la polimerización estireno-DVB en presencia de un disolvente orgánico como el tolueno, apropiado para disolver los monómeros pero no para el polímero. Estas resinas macroporosas son muy útiles para su uso en disolventes no polares, en los que las resinas de cambio iónico ordinarias apenas se hinchan y el cambio iónico es por tanto lento. Su uso es frecuente en la industria, debido a que son fácilmente regenerables.

#### **4.4.4 Sílice con fases enlazadas**

Se trata de soportes constituidos por microesferas de sílice que poseen cadenas lineales hidrocarbonadas enlazadas a los grupos silanol exteriores. La cadena suele ser de 2, 8 ó 18 átomos de carbono. Son materiales no porosos, por lo que presentan gran resistencia a los cambios físico-químicos del medio.

Son soportes extremadamente útiles para la retención de compuestos orgánicos, aromáticos o no (ya sean reactivos formadores de complejos o analitos de naturaleza orgánica), ya que retienen débilmente a estos compuestos, en medio

acuoso o hidro-orgánico y la elución puede conseguirse fácilmente aumentando el porcentaje de disolvente orgánico del medio. No obstante, hay que tener en cuenta que son menos selectivos que los cambiadores iónicos.

En los distintos sensores desarrollados en esta Memoria se han empleado varios de los soportes sólidos expuestos anteriormente. En uno de los sensores se utilizó un cambiador catiónico derivado de polímeros de estireno (Dowex 50W), en otro se empleó sílice con fases enlazadas ( $C_{18}$ ), y en el resto de sistemas el soporte sólido elegido fue un intercambiador aniónico derivado de polímeros de dextrano con carácter base fuerte (Sephadex QAE A-25).

#### 4.5 Sensores sin renovación de la superficie sensora

Para que el sensor sea reutilizable es necesario que una vez desarrollada la señal la microzona activa se regenere y quede dispuesta para un nuevo análisis sin necesidad de renovar dicha zona sensora. Se puede conseguir de dos formas:

- El procedimiento más simple de regeneración se da en aquellos casos en los que la propia disolución portadora actúa como eluyente, desplazando al analito, o su producto de reacción, de los sitios activos del soporte sensor. Este procedimiento ofrece una serie de ventajas, como frecuencias de muestreo altas y una mayor duración del soporte cuando es una resina de intercambio iónico.
- Si no se produce la circunstancia anterior hay que utilizar otra disolución que actúe como eluyente. Este eluyente adicional se hace llegar a la zona sensora cuando la señal analítica ha alcanzado su valor máximo, mediante la inyección de un volumen determinado o mediante el uso de una válvula de selección. La ventaja de este procedimiento es una mayor sensibilidad, ya que la preconcentración es más efectiva, pero ofrece una menor frecuencia de muestreo y suele acortar la vida del sensor cuando se utilizan resinas de intercambio iónico.

En el caso de que la microzona activa del sensor esté formada por un soporte sólido con un reactivo permanentemente inmovilizado habrá que evitar que el eluyente produzca la desorción del mismo inactivando el sensor<sup>84</sup>.

Los agentes utilizados en la regeneración de sensores varían en función de la naturaleza de las especies retenidas y del tipo de interacción entre dichas especies y el soporte sólido. Pueden utilizarse, entre otros, agentes oxidantes o reductores, tensioactivos, agentes complejantes, disolventes orgánicos e incluso simplemente

cambios de pH o de fuerza iónica del medio.

En todos los sensores sin renovación de la superficie sensora de esta Memoria la regeneración de la microzona activa es llevada a cabo por la propia disolución portadora, que actúa como eluyente, obteniéndose una mayor simplicidad en los sistemas y todas las ventajas que ello conlleva.

Por otro lado, la desactivación de la superficie sensora con el uso es un inconveniente, pues se ven limitados los requerimientos esperados de longevidad y uso repetido del sensor.

Si la retención del analito es muy fuerte, se han de emplear soluciones salinas, ácidas o básicas muy concentradas para conseguir la elución del mismo en un tiempo adecuado, lo cual conlleva que el soporte experimente hinchamientos y deshinchamientos que además de alterar la línea base acortan sustancialmente su vida. Además no siempre es posible la elución de este analito o su producto de reacción. En estos casos se justifica el uso de la renovación de la superficie sensora mediante inyección en flujo, que evita la necesidad de un mecanismo de funcionamiento reversible del sensor. Esta metodología está basada en el concepto de Espectroscopía con Inyección de Partículas o Microesferas (*"Bead Injection Spectroscopy"*), que se desarrolla en el siguiente apartado.

#### **4.6 Sensores con renovación de la superficie sensora**

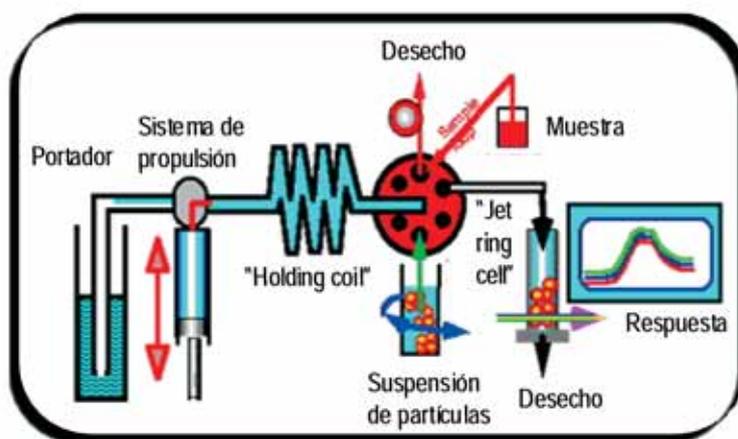
En ciertas ocasiones la microzona sensora no se puede regenerar, sobre todo cuando se utilizan como soporte sólido resinas de intercambio iónico: (1) la especie fijada esté tan fuertemente retenida en el soporte que no es posible su elución, ó (2) para eluir la especie se necesite un eluyente adicional de naturaleza muy ácida, muy básica o con alta concentración salina, tal que producen hinchamientos muy bruscos de la zona sensora. En estos casos es necesaria la renovación de la superficie sensora después de cada análisis de muestra. Esta metodología está basada en el concepto de inyección de partículas o microesferas (*"Bead injection Spectroscopy"*) y está considerada como la tercera generación de las técnicas microanalíticas de flujo<sup>85</sup>.

En esta Memoria se proponen siete sensores con renovación de la superficie sensora basados en esta metodología, pero incorporando nuevas estrategias. Seis de ellos (sensor de ácido ascórbico, Be(II)-Al(III), Co(II), Cu(II)-Zn(II), Fe(II) y V(V)) son sensores que integran reacción, retención y detección, mientras que solo uno (sensor de Fenotiazinas) integra retención y detección.

Inicialmente la renovación de superficies sensoras se consiguió con la técnica de análisis por inyección secuencial (SIA) y con una célula de medida especial "jet ring cell"<sup>86</sup> (Figura 11.8). Esta metodología se explica detalladamente en el *Capítulo*

IV (apartado 3.4.). El SIA ofrece grandes ventajas, como bajos volúmenes de muestra y un control automático y preciso de la manipulación de muestras y reactivos, pero la instrumentación necesaria es demasiado costosa para algunos laboratorios.

Se ha demostrado que la combinación de *Bead Injection* con FIA es una alternativa con menores costes de instrumentación. Nuestra aportación en este campo ha sido la posibilidad de utilizar células de flujo comerciales de diferentes geometrías que simplifica la metodología utilizada hasta la fecha, ya que no requiere el diseño de células especiales. Debemos destacar que son los primeros sensores descritos de estas características.



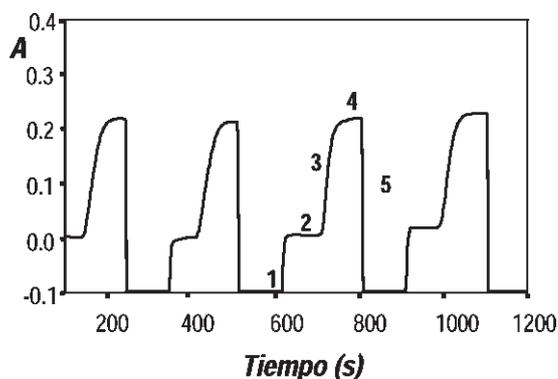
**Figura II.8.** Esquema general de la combinación "Bead injection" con SIA

La nueva metodología propuesta consiste en la inyección de un volumen exacto de una suspensión homogénea de partículas en la corriente de portador que las transporta y empaqueta en la célula de medida, situándose en el conducto de salida una pequeña cantidad de lana de vidrio, para evitar el escape del soporte sólido y permitir la salida de la disolución. Este soporte sólido puede inyectarse con el reactivo cromogénico previamente fijado, en el caso de que se necesite reacción derivadora. Tras la inyección de la muestra y reactivos necesarios se desarrolla la señal analítica, y después del análisis las partículas son descargadas automáticamente del sistema mediante inversión del flujo. Se desecha, por tanto, la zona sensora tras cada medida, reemplazándose para la siguiente mediante una nueva inyección de suspensión homogénea de partículas.

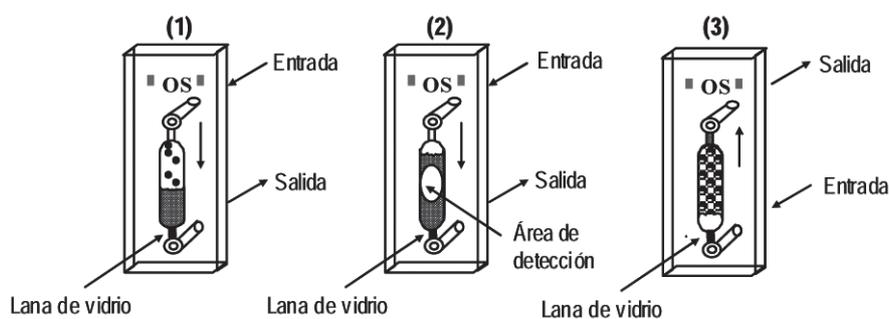
Esta metodología conlleva los siguientes pasos, explicados en la *Figura II.9.*, donde se muestra un diagrama genérico (a) junto con las distintas etapas que pasa la célula de flujo (b).

- 1) Un volumen exacto de suspensión de partículas (con o sin reactivo inmovilizado en su superficie) es inyectado en la corriente de portador hasta la célula de de medida. *Fig. II.9: a) paso 1; b) paso (1).*
- 2) Las partículas quedan acondicionadas en la célula de flujo por la disolución de portador y se establece la línea base para las medidas. *Fig. II.9: a) paso 2.*
- 3) Se inyecta la muestra y los reactivos necesarios. El analito o producto de una reacción previa se retiene en la fase sólida y en los casos en los que el reactivo esté fijo en el soporte, además de la retención, se produce la reacción, originando la señal analítica que es monitorizada continuamente. *Fig. II.9: a) paso 3; b) paso (2).*
- 4) La reacción entre el analito y el reactivo en las partículas finaliza. *Fig. II.9: a) paso 4.*
- 5) Finalmente, las partículas son descargadas automáticamente de la célula de medida mediante un cambio en el sentido del flujo, terminando así el ciclo de análisis. *Fig. II. 9: a) paso 5; b) paso (3).*

a)



b)



**Figura II.9.** Etapas de la metodología "Bead Injection" combinada con FIA y células comerciales

Hay dos factores importantes a tener en cuenta en esta metodología: la homogeneidad de la suspensión de partículas usadas como soporte sólido, para obtener una buena reproducibilidad en la cantidad de partículas que empaquetarán la célula de medida, y la uniformidad en el empaquetamiento de estas partículas. Para la obtención de la suspensión homogénea de partículas se puede utilizar la agitación magnética, rotación, agitación por aire en una columna, etc. Si las partículas son de diferentes tamaños, éstas pueden ser empaquetadas en la célula de diferentes formas en cada análisis, por tanto las partículas deben ser muy uniformes en tamaño. En los sensores de esta Memoria la suspensión de partículas se obtiene, en todos los casos, haciendo pasar aire a través de una columna de vidrio de cromatografía de líquidos a presión atmosférica en la que se ha colocado la suspensión de partículas, obteniéndose muy buena homogeneidad. Además, las partículas utilizadas en cada sensor como soporte sólido, muestran suficiente uniformidad como para obtener medidas reproducibles.

## 5. Analitos

## 5. ANALITOS

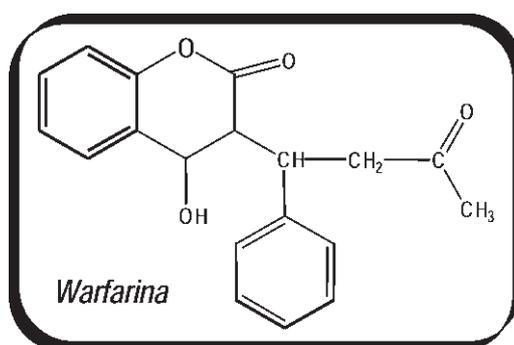
Los analitos seleccionados en los sensores de esta Memoria son de interés en los campos farmacológico y medioambiental, incluyéndose compuestos orgánicos y cationes metálicos. A continuación se describe el interés de cada uno de estos analitos.

### 5.1 Rodenticidas, Pesticidas y Compuestos Fenólicos

#### *Warfarina*

La warfarina [3-(a-4-acetonilbencil)-4-hidroxycumarina] ha sido ampliamente utilizada como rodenticida para el control de plagas de roedores, principalmente ratas, y como principio activo en fármacos para el tratamiento de desórdenes tromboembólicos, disminuyendo la coagulación sanguínea<sup>87,88</sup>.

La warfarina se presenta en forma de cristales incoloros, inodoros e insípidos, insolubles en agua y benceno. Es moderadamente soluble en alcohol y muy soluble en acetona y dioxano. La warfarina tiene un carbono asimétrico, que es el causante de la elevada actividad farmacológica. Tiene actividad óptica (*d* o *l*).



La warfarina se descubrió por casualidad en 1952 en los E.E.U.U. por problemas en la alimentación del ganado. Se observó que muchos animales tenían problemas de hemorragia y todos morían al consumir mucho trébol. Se observó que cuando el trébol se almacenaba se degradaba dando cumarinas.

La mayoría de los rodenticidas anticoagulantes son sustancias derivadas de la 4-hidroxycumarina. Las cumarinas son muy usadas como venenos, entre ellos raticidas. Realizan la acción a largo plazo y generalmente se requieren de 10 a 100 mg diarios durante varios días para producir síntomas. Actúan inhibiendo la acción de la vitamina K, pero se trata esencialmente de un veneno acumulativo. Es raro que una dosis única produzca problemas porque en el hígado hay suficiente reserva de vitamina K. Al consumir la warfarina durante días, esas reservas se acaban y aparecen los efectos anticoagulantes, siendo el signo más consistente el sangrado. El único antídoto que existe es la vitamina K1 (fitomenadiona).

La warfarina en los preparados farmacéuticos se usa para impedir la formación y el crecimiento de los coágulos. Algunas veces se prescribe para pacientes con ciertos tipos de palpitations irregulares y después de un ataque cardíaco u operación quirúrgica de reemplazo de válvulas cardíacas. Una investigación realizada sobre la eficacia y la terapia antitrombótica de la warfarina, revela que ésta, sola o combinada con aspirina, es superior a la aspirina en monoterapia en cuanto a la reducción de la incidencia de episodios combinados tras un infarto de miocardio. La warfarina también se usa en combinación con otros medicamentos en el tratamiento de algunos tipos de cáncer de pulmón.

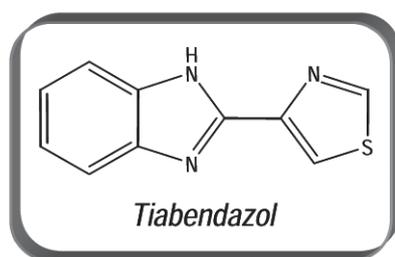
### ***Tiabendazol***

Durante los últimos treinta años la lista de pesticidas, productos antiparasitarios empleados en la agricultura, ha crecido rápidamente debido al desarrollo de la química orgánica de síntesis y la urgente necesidad por el empleo de la agricultura intensiva. El uso masivo de estos compuestos para la producción, almacenamiento, manipulación y transporte de alimentos es la causa principal por la que el análisis de pesticidas es uno de los campos de interés de la Química Analítica. La aparición de contaminantes procedentes de la utilización de este tipo de compuestos en el medio ambiente ha aumentado proporcionalmente, con lo que se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos sensibles y selectivos para controlar niveles residuales de pesticidas.

La denominación de pesticidas incluye todas aquellas sustancias que se utilizan para proteger los cultivos y los productos vegetales contra las enfermedades, el ataque de los insectos, los parásitos, las malas hierbas y los microorganismos dañinos. Los grupos más importantes de pesticidas son: *Herbicidas*, que protegen a las plantas de las malas hierbas; *Fungicidas*, que impiden el crecimiento de hongos o mohos perjudiciales en semillas y cultivos maduros, e *Insecticidas*, para proteger

a las plantas de las lesiones causadas por los insectos. Además de estos grupos principales, se encuentran otros como *acaricidas*, *nematocidas*, *molusquicidas*, *rodenticidas* y los *reguladores del crecimiento*.

El tiabendazol [2-(4-tiazolil)-1H-benzimidazol] es un fungicida sistémico, del grupo de los imidazólicos absorbibles, empleado ampliamente desde 1968 en el control de enfermedades de vegetales y frutas, principalmente cítricos, tales como mohos, plagas, manchas y podredumbres. Es un sólido blanco, insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos. Es un fungicida de amplio espectro, erradicante, que tiene acción sistémica y baja toxicidad.



Se utiliza ampliamente como fungicida en la agricultura, pero la toxicología en humanos proviene de su uso medicinal en el tratamiento de parásitos intestinales. Es metabolizado y excretado rápidamente en la orina, la mayor parte como producto de conjugación de un metabolito hidroxilado. Tienen escasos efectos en los seres humanos, aunque puede ocasionar daño hepático, por lo que las personas con problemas de hígado o de riñón pueden ser vulnerables a los efectos tóxicos.

También se usa como antihelmíntico, para eliminar, en los humanos o en animales, las infecciones producidas por parásitos helmintos: cestodos (tenias), nematodos (áscaris, oxiuriasis o enterobiasis, triquiuros), triquinosis, etc.

Otro uso del tiabendazol ha sido su utilización en el tratamiento contra la larva migratoria cutánea (LMC), que es una afección causada por la penetración en la piel de larvas de nematodos. Estos parásitos viven habitualmente en el intestino de animales domésticos (perros y gatos), los cuales, a través de las heces, eliminan los huevos al suelo, donde permanecen latentes transformándose en larvas<sup>89</sup>. Los seres humanos adquieren la infección al entrar en contacto con el suelo contaminado y ésta suele quedar restringida a la piel.

### **Compuestos Fenólicos**

Se denominan fenoles o compuestos fenólicos a todas aquellas sustancias derivadas del fenol (hidroxibenceno o bencenol). Existe una amplia variedad de compuestos, y de forma genérica, son sustancias muy tóxicas. El compuesto típico del grupo es

el propio fenol, debiendo destacarse los cresoles o metilfenoles, los naftoles y los tres difenoles isoméricos pirocatequina, resorcina e hidroquinona, así como compuestos fenólicos clorados y nitrados formados por cloración de fenoles originariamente presentes en aguas brutas: 2-clorofenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol<sup>90</sup>.

En general, los fenoles no son sustancias comúnmente presentes en las aguas naturales, salvo en las que atraviesan o fluyen por zonas industriales y aguas ricas en material húmico. Su procedencia está ligada a efluentes industriales procedentes de pasta de papel, explotaciones mineras, refinerías de petróleo, alpechines, e industrias químicas y farmacéuticas, así como a su uso en revestimientos y pinturas bituminosas (postes de madera, tuberías y canalizaciones de aguas o de otros fluidos).

Los contenidos de fenoles en aguas naturales y aguas de bebida oscilan entre 1-10 mg/l, aportando a éstas un sabor desagradable, cuyo umbral de percepción es tan bajo como 0.1-1.0 mg/l, debido principalmente a clorofenoles formados en los procesos de cloración de las aguas.

Si se vierten como residuos industriales al medio ambiente<sup>91</sup> y, en especial, al agua, resultan muy tóxicos, ya que los fenoles son más pesados que el agua y se hunden, se disuelven lentamente y forman soluciones tóxicas. En aire, los vapores son más pesados que éste y, expuestos al calor, forman mezclas explosivas. En suelo, debido a la degradación microbiana (aeróbica o anaeróbica) la acumulación de fenoles es escasa; el nivel de esta acumulación depende de la presencia de minerales arcillosos (gran afinidad con el óxido de aluminio).

Toxicológicamente, niveles de 1 mg/l de fenoles en aguas naturales resultan tóxicos para los peces, mientras que concentraciones menores afectan a otros organismos acuáticos, como moluscos, algas, protozoos y bacterias. En general, los compuestos fenólicos pese a su poder bactericida y bacteriostático pueden degradarse por diversos microorganismos presentes en las aguas naturales, especialmente del grupo de las pseudomonas.

Los vapores y líquidos de los fenoles son tóxicos en seres humanos y mamíferos y pueden ingresar fácilmente en el cuerpo por vía cutánea. Los vapores inhalados lesionan las vías respiratorias y el pulmón. El contacto del líquido con la piel y los ojos produce severas quemaduras. La exposición prolongada paraliza el sistema nervioso central y produce lesiones renales y pulmonares. Los fenoles exhiben efectos teratógenos y cancerígenos, y en plantas inhiben la permeabilidad pasiva y el crecimiento. Causan la muerte por ingestión de tan sólo 1 g.

Para eliminar los fenoles no se pueden realizar tratamientos mecánicos o por coagulación, ya que no tienen efectos sobre éstos, y la filtración lenta tampoco los elimina totalmente. Un medio de lucha contra el sabor a cloro-fenol es el tratamiento con dióxido de cloro, pero si el contenido en fenol es variable o elevado, será

necesario emplear dosis en exceso de dióxido de cloro, con el riesgo de introducir en el agua contenidos fuertes de clorito sódico. En ese caso, debe recurrirse al ozono o al carbón activo.

El ozono destruye el fenol y los compuestos fenólicos siempre que la dosis que se empleen vaya en función de los tratamientos procedentes, del pH, de la naturaleza de dichos compuestos y de la concentración final deseada. El pH tiene una gran influencia en la dosis de ozono que debe utilizarse: ésta se duplica si el valor del pH baja de 12 a 7. En la zona de valores de pH que corresponden al funcionamiento normal de las instalaciones de tratamiento de agua potable (7 a 8,5), el consumo de ozono por gramo de fenol eliminado es máximo. Las dosis de ozono varían según se trate de fenol puro, muy poco frecuente, de di- o trifenoles, de cresoles o de naftoles y dependiendo de que estos compuestos se encuentren unidos a otros, como los tiocianatos, sulfuros, etc. La dosis correcta sólo puede fijarse mediante un ensayo. Generalmente es del orden de cuatro veces el valor del contenido en compuestos fenólicos presentes, expresado en fenol puro.

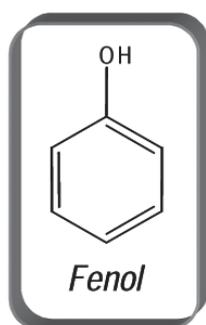
Para la oxidación de los fenoles, no se necesita un tiempo de contacto prolongado. Con el empleo de ozono puede combinarse su eliminación con la desinfección total del agua a tratar en tanto en cuanto la concentración de fenol se mantenga reducida. Si existen fenoles en pequeñas concentraciones en las aguas sin tratar, se eliminan radicalmente mediante una ozonización aplicada en dosis bactericidas o virulicidas. Sin embargo, también se ha estudiado la acción del ozono en aguas más concentradas en fenoles. Se ha realizado durante estos últimos años en Rusia un detallado trabajo con aguas residuales y de río muy contaminadas (agua del Dniéper), con contenidos de 1 mg/l a 10 mg/l de compuestos hidroxilados (fenoles, naftoles, cresoles, pirocatequina, etc.), y se ha demostrado la influencia del pH (2 a 14) y del tiempo de contacto (5 min. a 20 min.). La presencia de cloro hace más fácil la desodorización del agua, pero disminuye el porcentaje de destrucción de cresoles y naftoles, y el aumento del pH favorece la disminución de las concentraciones de fenol.

La combinación ozono-carbón activo sólo se prevé en el caso de que puedan producirse puntas importantes del contenido en fenol. En este caso, el empleo sólo de ozono puede resultar insuficiente en los momentos de máxima concentración, y no sería lógico sobredimensionar la instalación de ozono cuando basta efectuar, en este caso, una inyección en el decantador de carbón activo en polvo. La combinación Ozono-Carbón Activo en gramos sólo será de interés si se presentan fuentes de fenol durante periodos relativamente prolongados.

A continuación se indica la estructura, así como las propiedades más características de los cinco fenoles en estudio: fenol, 1-naftol, 2-naftol, 2,4-diclorofenol y 3,4-dimetilfenol.

### **Fenol**

El fenol, inicialmente denominado ácido carbólico, fue descubierto por Runge en 1834, en el alquitrán de la hulla. Se presenta bajo forma de una masa cristalina o de agujas incoloras. Tiene un olor característico, acre y dulzaino, no demasiado agradable.



Es muy soluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. Es caústico y muy venenoso. Por calentamiento a 800 °C, el fenol se descompone totalmente en monóxido de carbono, hidrógeno y carbono.

El fenol se utiliza para la preparación de resinas sintéticas, colorantes, medicamentos, plaguicidas, curtientes sintéticos, sustancias aromáticas, aceites lubricantes y solventes. Se presenta en la naturaleza en la madera y en las agujas de pino, en la orina de los herbívoros (fenolsulfato) y en el alquitrán de hulla. Actualmente, sin embargo, predomina la producción sintética por disociación del hidroperóxido de cumeno o por síntesis a partir del benceno.

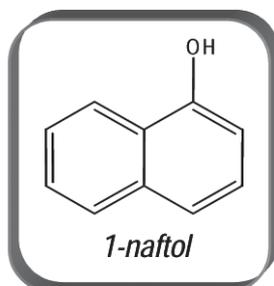
Su procedencia es principalmente industrial (industria química, del carbón, celulosa, petroquímica), aunque también hay que mencionar la degradación de algunos plaguicidas. Surgen emisiones por combustión incompleta de la gasolina y del alquitrán de hulla, en el agua residual de coquerías y como metabolitos en la fotólisis del benceno y del clorobenceno.

### **Naftol**

El 1-naftol es un sólido blanco, con leve tonalidad rosa. Es dañino por ingestión y puede ser absorbido por la piel, causando irritaciones en ojos, piel y vías respiratorias. Es un compuesto bastante estable químicamente en condiciones normales de presión y temperatura, aunque es muy sensible a la luz y al aire, y es prácticamente insoluble en agua.

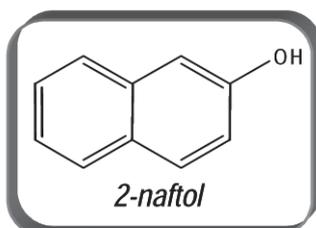
El 1-naftol es el principal producto de hidrólisis del carbaril, un insecticida del grupo de los N-metilcarbamatos, ampliamente usado en la agricultura debido a su alta

efectividad<sup>92</sup> contra numerosas plagas de insectos, así como para su control en frutas y vegetales. El 1-naftol también tiene utilidad como insecticida y, como el carbaril, actúa inhibiendo la enzima colinesterasa.



### **2-Naftol**

El 2-naftol es un sólido de apariencia levemente marrón. Es altamente tóxico y muy sensible a la luz. Causa irritaciones en las vías respiratorias y digestivas, y puede llegar a ser mortal por ingestión o inhalación.

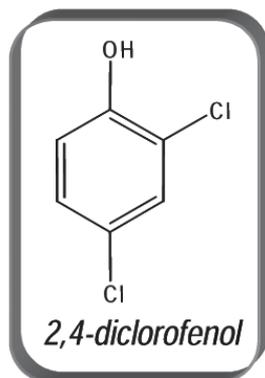


El 2-naftol se utiliza comercialmente como repelente de insectos y desinfectante. La presencia de 2-naftol en el medio ambiente también puede deberse a los incendios que producen hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y el humo del tabaco.

### **2,4-diclorofenol**

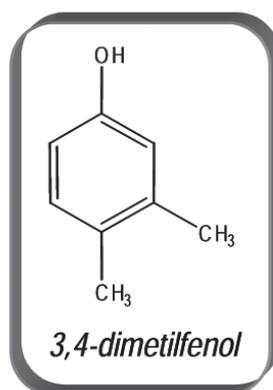
El 2,4-diclorofenol es un sólido blanco, combustible, nocivo por ingestión e irrita los ojos y la piel.

Es un metabolito secundario del ácido 2,4-diclorofenoxiacético. Se usa en síntesis orgánica y es un intermediario químico en la producción de herbicidas.



### ***3,4-dimetilfenol***

El 3,4-dimetilfenol es un sólido difícilmente soluble en agua, muy tóxico y corrosivo.



## **5.2 Elementos metálicos**

### ***Hierro***

El hierro se conoce y utiliza desde la prehistoria. El hierro es un elemento relativamente abundante en el universo, se encuentra en el Sol y en muchos tipos de estrellas en cantidades importantes. Sus núcleos son muy estables. Es el componente principal de un tipo de meteoritos denominados *sideritas* y, en menor proporción, también se encuentra en otros tipos. Se cree que el núcleo de la Tierra está, en gran parte, compuesto por hierro con aproximadamente un 10% de hidrógeno ocluido. En la corteza es el cuarto elemento más abundante (5,63% en peso). Sólo se encuentra en estado elemental en los meteoritos. Sus minerales son muy abundantes (más de 400), de los que destacan el hematites, la magnetita, la siderita y la pirita.

Es el metal más importante, útil, abundante y barato. Es raro encontrarlo puro, y generalmente está aleado con carbono y otros metales. El metal puro es plateado, brillante, duro, dúctil, muy fusible y muy reactivo, que rápidamente se corroe, pero puro no tiene aplicaciones. Fundamentalmente se emplea en la producción de aceros, consistentes en aleaciones de hierro con otros elementos, tanto metálicos como no metálicos, que confieren distintas propiedades al material. Se considera que una aleación de hierro es acero si contiene menos de un 2% de carbono, y si el porcentaje es mayor recibe el nombre de fundición.

El hierro es el metal más usado, con el 95% en peso de la producción mundial de metal. Es indispensable debido a su bajo precio y dureza, especialmente en automóviles, barcos y componentes estructurales de edificios. Según el contenido en carbono del acero, las propiedades mecánicas del hierro cambian drásticamente, y por tanto, sus aplicaciones.

Entre los compuestos de hierro destacan: óxido de hierro (III) (oligisto), que se utiliza en la obtención del metal, como abrasivo, en pinturas; óxido ferroso-férrico u óxido de hierro (II, III) (magnetita), que se emplea en la obtención de hierro, electrodos para la obtención electrolítica de cloro-álcalis, como colorante, abrasivo; y sulfato de hierro (II) heptahidratado, empleado en tintorería, fabricación de tintas, desinfectante, herbicida, en fotografía y en medicina.

El hierro se encuentra en, prácticamente, todos los seres vivos, siendo el oligoelemento más abundante en el cuerpo humano, que contiene normalmente de 4 a 5 g, clasificándose en hierro de reserva (1-1.5 g), hierro funcional (3.5 g) y hierro circulante (3 mg).

El hierro cumple numerosas y variadas funciones:

- 1) Hay distintas proteínas que contienen el grupo hemo, que consiste en el ligando porfirina con un átomo de hierro. La hemoglobina transporta el O<sub>2</sub> en la sangre y la mioglobina lo almacena en los músculos.
- 2) Las proteínas de hierro/azufre (Fe/S) participan en procesos de transferencia de electrones.
- 3) También se puede encontrar proteínas en donde átomos de hierro se enlazan entre sí a través de enlaces puente de oxígeno. Se denominan proteínas Fe-O-Fe. Algunos ejemplos son las proteínas monooxigenasas de las bacterias metanotróficas, que catalizan la oxidación de metano; la hemeritina, que transporta oxígeno en algunos organismos marinos y algunas ribonucleótido reductasas que catalizan la formación de desoxinucleótidos.

Los animales para transportar el hierro dentro del cuerpo emplean unas proteínas llamadas transferrinas, y para almacenarlo emplean la ferritina y la hemosiderina presentes en hígado, bazo y médula ósea.

El hierro entra en el organismo sobre todo debido a la dieta, siendo absorbido en el intestino delgado, y transportado o almacenado por esas proteínas. El remanente de hierro en el cuerpo varía sobre todo debido a la dieta, y las pérdidas del cuerpo son generalmente pequeñas, por descamación celular y en las mujeres durante la menstruación. La absorción del hierro de origen vegetal mejora gracias a la presencia de la vitamina C (ácido ascórbico), u otros ácidos orgánicos tales como el ácido málico y al ácido cítrico.

Las necesidades de hierro del organismo varían según edad, sexo y estado fisiológico del individuo (infancia, adolescencia, menstruación y embarazo). Los requerimientos diarios de hierro son cubiertos, en su mayoría, por la reutilización a partir de la destrucción de los glóbulos rojos envejecidos. El resto de las necesidades son cubiertas con la ingesta diaria. Cuando la ingesta de hierro disminuye, aumentan las necesidades del organismo o aumentan las pérdidas y la destrucción de los glóbulos rojos, las reservas de hierro son insuficientes para la adecuada producción de hemoglobina, con el consiguiente desarrollo de un cuadro de anemia ferropénica que implica molestias y consecuencias como debilidad generalizada, somnolencia, menor rendimiento.

El exceso de hierro sin embargo, también puede provocar problemas en el organismo. El envenenamiento por hierro se llama hemocromatosis, acumulándose este exceso en el hígado.

### **Cobalto**

El cobalto fue descubierto por George Brandt hacia 1735. Es un metal plateado, duro y quebradizo. Se encuentra en la corteza en un 0.0025% en peso. Sus minerales más importantes son la cobaltina, esmaltina y la eritrina. También se encuentra en nódulos manganosos del fondo del mar y en meteoritos. Se obtiene fundamentalmente como subproducto en la obtención del cobre.

El cobalto es un elemento natural que se encuentra en las rocas, el suelo, el agua, plantas y animales. Se usa para producir aleaciones usadas en la manufactura de motores de aviones, imanes, herramientas para triturar y cortar y articulaciones artificiales para la rodilla y la cadera. Los compuestos de cobalto se usan también para colorear vidrio, cerámicas y pinturas, y como secador de esmaltes y pinturas para porcelana.

Los dos isótopos radioactivos de cobalto comercialmente más importantes son el  $^{60}\text{Co}$  y el  $^{57}\text{Co}$ . El  $^{60}\text{Co}$  es usado como fuente de rayos gama para esterilizar equipos médicos y artículos de consumo, radioterapia para pacientes con cáncer,

para fabricar plásticos y para irradiar alimentos. El  $^{57}\text{Co}$  es usado en investigación clínica y científica.

El cobalto es un oligoelemento importante, ya que es el átomo central de la cianocobalamina o vitamina  $\text{B}_{12}$ . Las funciones del cobalto en el organismo son la producción de glóbulos rojos y la formación de mielina. Detoxifica la cianida que ingerimos en los alimentos y en el humo del tabaco y aumenta la utilización de la glucosa, por lo que baja sus índices sanguíneos. Por último, tiene una función equilibrante en los receptores gástricos e intestinales. Los suelos con un contenido en cobalto de 0.13 a 0.30 ppm son adecuados para la nutrición vegetal.

El cobalto entra al medioambiente desde fuentes naturales, al quemar carbón o aceite combustible o durante la producción de aleaciones de cobalto. En el aire se asocia con partículas que se depositan en el suelo en unos pocos días. El cobalto liberado al agua o al suelo se adhiere a partículas. No puede ser destruido en el ambiente, solamente puede cambiar de forma o adherirse o separarse de partículas. El decaimiento radioactivo es la única manera de disminuir la cantidad de cobalto radioactivo en el ambiente.

Se puede estar expuesto a bajos niveles de cobalto al respirar aire, tomar agua o comer alimentos que contienen cobalto. Los alimentos y el agua potable son las fuentes principales de exposición al cobalto para la población general.

El cobalto tiene efectos tanto beneficiosos como perjudiciales sobre la salud de seres humanos<sup>93</sup>. El cobalto es beneficioso porque es parte de la vitamina  $\text{B}_{12}$ , pero la exposición a altos niveles de cobalto puede producir efectos en los pulmones y el corazón y dermatitis. En animales expuestos a altos niveles de cobalto también se han observado efectos en el hígado y los pulmones. La exposición a altas cantidades de cobalto radioactivo o a la radiación que emite, puede dañar las células en su cuerpo.

No se ha demostrado que el cobalto no radioactivo produzca cáncer en seres humanos o en animales después de exposición a través de los alimentos o el agua. Sin embargo, se ha observado cáncer en animales que respiraron cobalto o cuando se colocó cobalto directamente en el músculo bajo la piel. La exposición a altos niveles de radiación de cobalto puede producir alteraciones en el material genético en el interior de las células, lo que puede conducir al desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Basado en datos en animales de laboratorio, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha determinado que el cobalto y los compuestos de cobalto son posiblemente carcinogénicos en seres humanos.

### **Berilio**

El berilio es un metal grisáceo, duro que se encuentra naturalmente en rocas, carbón, el suelo y en polvo volcánico. Vauquelin lo descubrió al analizar una

aguamarina (berilo) en 1798. Es muy quebradizo, de excelente conductividad térmica y eléctrica y buena elasticidad. Es uno de los metales más ligeros y, entre ellos, es de los de mayor punto de fusión (por encima de 600°C). Se encuentra en unas treinta especies minerales, entre las cuales, las más importantes son: bertrandita, berilo, crisoberilo y fenaquita. Las aguamarinas y esmeraldas (con impurezas de  $\text{Cr}^{3+}$ ) son formas preciosas del berilo. Se encuentra en la corteza en una proporción en peso del 0.00028 %.

Debido a su baja densidad se emplea en la construcción de satélites y misiles, así como ventanas de tubos de Rayos X. Aleado con cobre se usa para muelles de reloj, contactos eléctricos y electrodos de soldadura de punto. Es moderador y reflector en reactores nucleares (baja sección de absorción de neutrones térmicos) y fuente de neutrones mezclado con un emisor de partículas  $\alpha$ . Otras aplicaciones en donde se requiere ligereza, rigidez y estabilidad dimensional: giróscopos, partes de computadoras, aviones, cohetes y satélites, armadura de limpiaparabrisas, frenos de disco, artículos deportivos (palos de golf) y piezas dentales.

Los polvos de berilio entran al aire al quemar carbón y aceite combustible, y se deposita sobre el suelo y el agua. El berilio entra al agua por la erosión de las rocas y del suelo y desde residuos industriales. Algunos compuestos de berilio se disuelven en el agua, pero la mayoría se adhieren a partículas y se depositan en el fondo. La mayor parte del berilio en el suelo no se disuelve en agua y permanece adherido al suelo. El berilio no se acumula en la cadena alimentaria.

Si se respira, el berilio puede producir daños<sup>93</sup>. Los efectos dependen de la cantidad a la que se expone, la duración de la exposición y la susceptibilidad individual. Si el nivel es suficientemente alto, por encima de 1000  $\frac{1}{4}\text{g}/\text{m}^3$  en el aire respirado, puede provocar una enfermedad aguda por berilio o beriliosis aguda, que es similar a la pulmonía, provocando daños en el pulmón.

Entre el 1 y el 15% de la población expuesta desarrolla sensibilización al berilio. Estas personas pueden desarrollar procesos inflamatorios del aparato respiratorio, enfermedad crónica por berilio o beriliosis crónica (CBD), que pueden manifestarse años después de la exposición laboral cuando ésta ha superado los niveles de exposición recomendados (0.2  $\frac{1}{4}\text{g}/\text{m}^3$ ). El riesgo de la población general a contraer estas enfermedades es muy bajo ya que los niveles de berilio en el aire ambiental son normalmente muy bajos (0.00003-0.0002  $\frac{1}{4}\text{g}/\text{m}^3$ ).

La intoxicación por ingestión de berilio no se conoce ya que la cantidad de berilio absorbida por el organismo por esa vía es muy pequeña, aunque han podido observarse úlceras en perros tras la ingesta de berilio, y el contacto del berilio con la piel tras un rasguño o corte, puede causar eczema y úlceras cutáneas. El Departamento de Salud y Servicios Humanos de EEUU (DHHS) y

la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) han determinado que la exposición prolongada al berilio puede aumentar la posibilidad de desarrollar cáncer del pulmón en seres humanos.

### **Aluminio**

El aluminio fue descubierto por H.C. Oersted y F. Wöhler en 1825. R. W. Bunsen y H. Sainte-Claire Deville lo obtuvieron en forma pura en 1854 mediante electrólisis de sus sales fundidas. Es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre (8,23% en peso) y el metal más abundante, pero no se encuentra libre. Se encuentra fundamentalmente combinado con el oxígeno formando los feldespatos, micas y arcillas. También forma parte de la composición de muchas piedras preciosas, como el zafiro y el rubí.

El aluminio puro es un metal blanco-plateado, blando y frágil, con muy buenas propiedades: ligero, no magnético y maleable, por lo que se aplica a utensilios de cocina, decoración y cientos de aplicaciones industriales donde se necesita resistencia, ligereza y facilidad de fabricación. Es un buen conductor por lo que se usa en transmisión de la corriente eléctrica. Aleado con otros elementos adquiere buenas propiedades para la construcción de aviones, cohetes, bicicletas, etc.

Es muy estable a la corrosión porque forma rápidamente una fina capa, densa, dura y translúcida de su óxido que impide el ataque posterior por el oxígeno.

El aluminio, evaporado al vacío, forma una capa con elevada reflexión para la luz visible y el calor radiante, lo que permite su uso en la construcción de espejos de telescopios, papeles decorativos, empaquetados y juguetes. También se aplica a pinturas resistentes a la oxidación, pirotecnia, explosivos, soldadura, etc.

Entre sus compuestos destaca el óxido de aluminio (alúmina), incoloro o blanco si está pulverizado, empleado como fuente del elemento. La alúmina se usa en la fabricación de vidrios y material refractario y como catalizador, y se utiliza como fase estacionaria en cromatografía. Algunos hidruros de aluminio se utilizan como potentes agentes reductores y en reacciones de hidrogenación. El tricloruro se usa como catalizador y el hexahidrato como desodorante y antitranspirante, ya que elimina las bacterias de la transpiración que producen olores desagradables. El sulfato se usa en la fabricación de colas, rellenos de goma sintética, y en la industria papelera para coagular fibras de celulosa y obtener una superficie dura e impermeable. Los alumbres son mezclas de sulfatos, usados como astringentes y en el tratamiento de aguas, para conservar vegetales y en impermeabilización de tejidos.

Su aplicación en la construcción representa el mercado más grande de la industria del aluminio. Miles de casas emplean el aluminio en puertas, cerraduras, ventanas, pantallas, boquillas y canales de desagüe. El transporte constituye el segundo gran

mercado. Muchos aviones comerciales y militares están hechos casi en su totalidad de aluminio. En los automóviles, el aluminio aparece en interiores y exteriores como molduras, parrillas, llantas, acondicionadores de aire, transmisiones automáticas y algunos radiadores, bloques de motor y paneles de carrocería. Se encuentra también en carrocerías, transporte rápido sobre rieles, ruedas formadas para camiones, vagones, contenedores de carga y señales de carretera, división de carriles y alumbrado. En la industria aeroespacial, el aluminio también se encuentra en motores de aviones, estructuras, cubiertas y trenes de aterrizaje e interiores. En las aplicaciones eléctricas, los alambres y cables de aluminio son los productos principales. Se encuentra en el hogar en forma de utensilios de cocina, papel de aluminio, herramientas, aparatos portátiles, acondicionadores de aire, congeladores, refrigeradores, y en equipos deportivos como esquíes y raquetas de tenis.

La exposición a bajos niveles de aluminio a través de los alimentos, el aire, el agua o contacto con la piel no parece causar daño a la salud. Sin embargo, el aluminio no es una sustancia necesaria para el organismo y en grandes cantidades puede ser peligroso. La ingesta de aluminio puede tener lugar a través de la comida, respirarlo y por contacto en la piel. La toma de concentraciones significantes de aluminio puede causar efectos serios como daño al sistema nervioso central, demencia, pérdida de la memoria, apatía, temblores severos y trastornos respiratorios como tos y asma. El aluminio puede causar problemas en los riñones de los pacientes, cuando entra en el cuerpo durante el proceso de diálisis.

Algunos estudios han demostrado que gente con la enfermedad de Alzheimer tiene más aluminio que lo normal en el cerebro. No se sabe si el aluminio causa esta enfermedad o si la acumulación de aluminio ocurre en gente que ya tiene la enfermedad. Niños y adultos que recibieron altas dosis de aluminio como tratamiento para ciertos problemas de salud, contrajeron enfermedades en los huesos, lo que sugiere que el aluminio puede causar problemas al esqueleto. En ciertas personas se ha observado irritación de la piel a raíz del uso de desodorantes que contienen clorhidrato de aluminio. El aluminio no ha producido cáncer en estudios en animales.

El aluminio en el medioambiente puede acumularse en las plantas y causar problemas de salud a animales que consumen esas plantas. Las concentraciones de aluminio parecen ser muy altas en lagos acidificados, y en éstos, un gran número de peces y anfibios está disminuyendo debido a las reacciones de los iones de aluminio con las proteínas de las agallas de los peces y los embriones de las ranas. Elevadas concentraciones de aluminio también causan efectos sobre los pájaros y otros animales que consumen peces contaminados y sobre animales que respiran el aluminio a través del aire, produciendo problemas de pulmones, pérdida de peso y declinación de la actividad. Otro efecto negativo

en el medioambiente es que sus iones pueden reaccionar con los fosfatos, los cuales causan que el fosfato no esté disponible para los organismos acuáticos. También se pueden encontrar altas concentraciones de aluminio en aguas subterráneas y suelos ácidos, pudiendo dañar las raíces de los árboles.

### **Cobre**

El cobre es un elemento conocido desde la antigüedad. Es uno de los pocos metales que se encuentra libre en la naturaleza, denominándose cobre nativo. El cobre es un metal pesado, rojo con brillo metálico. Es blando, maleable, dúctil, y un buen conductor del calor y de la electricidad. Se encuentra en la corteza terrestre en un 0.006% en peso. Se encuentra en muchos minerales: cuprita, malaquita, azurita, calcopirita, etc. El cobre está presente naturalmente en rocas, el suelo, el agua y el aire, además de plantas y animales, y es utilizado en forma pura para fabricar una amplia gama de productos como cables y tuberías.

Es la base de las aleaciones denominadas bronce (cobre y estaño), de gran dureza, y latones (cobre y cinc), fáciles de manipular y resistentes a la corrosión. Casi todas las monedas y proyectiles contienen aleaciones de cobre.

Entre sus compuestos destacan el sulfato de cobre (II), que es la sal más importante, utilizado como veneno agrícola (fungicida) y como algicida en la purificación de aguas. También es producto de partida de numerosos colorantes. El  $\text{Cu}_2\text{O}$  se emplea como pigmento de pinturas anticorrosión, en desinfectación, como catalizador y para la obtención de vidrios y esmaltes rojos. El  $\text{CuO}$  se emplea para obtener vidrios y esmaltes negros, verdes y azules, como catalizador, en vidrios ópticos y como abono.

El cobre es un oligoelemento que se encuentra presente en el organismo en 100 a 150 mg, y el 90% de esta cantidad se encuentra en músculos, huesos e hígado. Este participa en la formación de la hemoglobina, y es fundamental para el desarrollo y mantenimiento de huesos, tendones, tejido conectivo y el sistema vascular. Las necesidades diarias en el hombre son de aproximadamente de 2 mg, sin embargo, para las bacterias, algas y hongos, el ion  $\text{Cu}^{2+}$  es un veneno.

Es raro ver excesos de cobre en el organismo, pero éstos pueden producir hepatitis, mal funcionamiento de riñones y desórdenes neurológicos. Una dificultad metabólica determinada genéticamente que se caracteriza por aumentar los depósitos de cobre en hígado y cerebro es la enfermedad de Wilson. La carencia de cobre en el organismo es igualmente anormal en personas que llevan una alimentación normal. Sin embargo las formas en que se puede manifestar la ausencia de cobre en el organismo es por anemias moderadas a

severas, edemas, desmineralización ósea, detención del crecimiento, anorexia y vulnerabilidad a infecciones. Ante carencias de cobre en el organismo, su presencia disminuye en el cerebro, huesos, tejidos conjuntivos y médula ósea pero no en el hígado.

El cobre puede entrar al medioambiente a partir de minas de cobre y de otros metales y desde fábricas que manufacturan o usan cobre metálico o compuestos de cobre. También puede entrar a través de aguas residuales domésticas, la combustión de combustibles fósiles, la producción de madera, la producción de abonos de fosfato, y de fuentes naturales como volcanes, vegetación en descomposición, incendios forestales y del rocío de agua de mar. El cobre en el suelo se adhiere firmemente a materia orgánica y a minerales, pero generalmente no entra en el agua subterránea y no se degrada en el medioambiente.

Por tanto, podríamos estar expuestos al cobre<sup>93</sup> respirando aire, tomando agua o nadando en lagos o en piscinas tratadas recientemente con cobre para controlar algas. También, comiendo alimentos y por contacto de la piel con polvo, agua, u otras sustancias que contienen cobre. La exposición prolongada a polvo de cobre puede irritar la nariz, la boca y los ojos, y producir dolores de cabeza, mareo, náusea y diarrea. Tomar agua con niveles de cobre mayores que lo normal puede causar vómitos, diarrea, calambres estomacales y náuseas. Se ha determinado que el cobre no es clasificable en cuanto a su carcinogenicidad.

### **Cinc**

Muchos siglos antes de reconocerse el cinc como elemento, los minerales de cinc ya se usaban para hacer latón. En la India, en el siglo XIII a. C., se obtuvo cinc metálico por reducción de calamina. En 1746, Marggraf redescubrió el metal en Europa, obteniéndolo por reducción de calamina con carbón. Se encuentra en la corteza en un 0.007 % en peso. Las principales fuentes minerales de cinc son la blenda o escalerita, calamina, la cincita y la franklinita. El cinc es un metal blanco-azulado, brillante. Es quebradizo a temperatura ambiente, pero entre 100 y 150°C es fácilmente maleable, volviéndose muy quebradizo por encima de 250°C, por lo que puede pulverizarse con facilidad. Es un buen conductor de la electricidad y del calor. Se emplea para obtener numerosas aleaciones, siendo las más importantes los latones. Por su estabilidad frente a la corrosión, se emplean para construcción de maquinaria, cojinetes, etc. Se emplea también para el galvanizado (cincado) de acero u otros metales para impedir su corrosión y como reductor.

El óxido de cinc es un material muy utilizado en pinturas, relleno de materiales de caucho, cosméticos, productos farmacéuticos, recubrimiento de suelos,

plásticos, tintas, jabones, baterías, productos textiles, equipos eléctricos y otros. El sulfuro de cinc (blenda o wurtzita) con pequeñas impurezas de cobre o plata producen fosforescencia al iluminarlo, por lo que se utiliza en señales luminosas, pantallas de rayos X y de TV y luces fluorescentes. El cloruro de cinc se usa como deshidratante.

El cinc es un nutriente esencial para humanos y animales (cofactor enzimático). Los animales deficientes en cinc requieren un 50% más de alimento que el control normal, para ganar el mismo peso. Aunque el cinc no es tóxico, cuando se inhala ZnO recién formado puede producirse una enfermedad conocida como temblores de óxido o escalofríos de cinc.

El cinc se encuentra en el aire, el suelo y el agua, y está presente en todos los alimentos. Cierta cantidad de cinc es liberada al ambiente por procesos naturales, pero la mayor parte proviene de actividades humanas tales como la minería, producción de acero, combustión de petróleo e incineración de desperdicios. Se adhiere al suelo, sedimentos y a partículas de polvo en el aire. Dependiendo del tipo de suelo, algunos compuestos de cinc pueden movilizarse al agua subterránea y a lagos, arroyos y ríos. Se acumula en peces y en otros organismos, pero no en plantas.

Aunque ingerir muy poco cinc puede causar problemas, demasiado cinc también es perjudicial. Los efectos nocivos generalmente se empiezan a manifestar a niveles de 10-15 veces más altos que la cantidad necesaria para mantener buena salud. La ingestión de grandes cantidades aun brevemente puede causar calambres estomacales, náusea y vómitos. Si se ingieren grandes cantidades durante un período más prolongado pueden ocurrir anemia y disminución de los niveles del tipo de colesterol que es beneficioso.

Inhalar grandes cantidades de polvos o vapores de cinc puede producir una enfermedad de corta duración llamada fiebre de vapores de metal, aunque no se conocen los efectos a largo plazo de respirar altos niveles de cinc. El Departamento de Salud y Servicios Humanos de EEUU (DHHS) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) tampoco han clasificado al cinc en cuanto a carcinogenicidad.

### ***Vanadio***

El vanadio fue descubierto en un principio por el mineralogista español Andrés Manuel del Río, en México, en 1801, en un mineral de plomo. En 1830, el sueco Nils Gabriel Sefström lo redescubrió en un óxido que encontró mientras trabajaba en unas menas de hierro y le dio el nombre que hoy se conoce.

El vanadio es un elemento que se encuentra naturalmente en el ambiente en forma de un metal blanco grisáceo, dúctil, blando y poco abundante, y que se

encuentra generalmente en forma de cristales. El vanadio no se encuentra nunca en estado nativo, pero está presente en la corteza terrestre y en las rocas en unos 65 minerales diferentes, así como en depósitos que contienen carbono, como por ejemplo en carbón, petróleos, crudo y alquitrán. Generalmente se combina con otros elementos tales como oxígeno, sodio, azufre o con cloruro.

Aproximadamente el 80% del vanadio producido se emplea como aditivo en aceros. Se emplea en acero inoxidable usado en instrumentos quirúrgicos y herramientas, en aceros resistentes a la corrosión, y mezclado con aluminio en aleaciones de titanio empleadas en motores de reacción. También, en aceros empleados en ejes de ruedas y cigüeñales, engranajes, y otros componentes críticos. Varios de los compuestos de vanadio se emplean en la industria química, sobre todo en la fabricación de catalizadores de oxidación, en la industria cerámica como agentes colorantes y para manufacturar caucho, plásticos y otros productos químicos. Tiene algunas aplicaciones nucleares debido a su baja sección de captura de neutrones. Es un elemento esencial en algunos seres vivos, aunque no se conoce su función.

No está demostrada su esencialidad en humanos, pero es un oligoelemento que se encuentra de forma natural en el organismo, en cantidades muy pequeñas, cuya función es enviar señales similares a las de la insulina, y por tanto, tiene un efecto «imitador» de la misma, es decir, mejora la absorción de aminoácidos y glucosa en el interior de la célula.

Se encuentra en algunas enzimas en distintos seres vivos, por ejemplo, en las haloperoxidasas de algunas algas, que reducen peróxidos y a la vez halogenan un sustrato orgánico. También acumula altas concentraciones de vanadio el hongo amanita muscaria.

El vanadio entra al medio ambiente principalmente desde fuentes naturales y de la incineración de combustibles de petróleo. Permanece largo tiempo en el aire, el agua o el suelo. No se disuelve muy bien en agua, se combina con otros elementos y partículas y se adhiere a sedimentos del suelo. El vanadio puede ser encontrado en el ambiente, en algas, plantas, invertebrados, peces y muchas otras especies. En mejillones y cangrejos puede ser acumulado en concentraciones de  $10^5$  a  $10^6$  veces mayores que las encontradas en el agua salada.

Se puede estar expuesto a niveles muy bajos de vanadio en el aire, el agua y los alimentos. Respirando aire cerca de una industria que quema combustibles de petróleo o carbón, ya que estas industrias liberan óxido de vanadio al aire. La exposición a altos niveles de vanadio puede causar efectos perjudiciales para la salud. Los efectos principales de respirar altos niveles de vanadio ocurren en los pulmones, la garganta y los ojos, pero estos efectos cesan poco tiempo

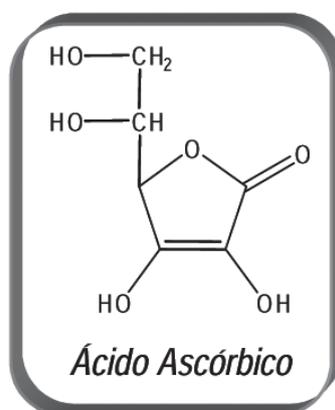
después de cesar la exposición al aire contaminado. Otra indicación de que ha ocurrido exposición a altas cantidades de vanadio en seres humanos es una coloración verde de la superficie de la lengua. Respirar o ingerir vanadio por largo tiempo origina lesiones leves del hígado y los riñones, daño cardíaco y vascular, irritación de la piel, entre otros.

El polvo metálico es pirofórico, y los compuestos de vanadio deberían de ser considerados como altamente tóxicos. Su inhalación puede causar cáncer de pulmón. La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) ha establecido un límite de exposición para el polvo de pentóxido de vanadio de 0,05 mg/m<sup>3</sup>, y de 0,1 mg/m<sup>3</sup> para el gas de pentóxido de vanadio en el aire del lugar de trabajo para una jornada de 8 horas, 40 horas a la semana. El Instituto Nacional de Salud y Seguridad Ocupacional (NIOSH) recomienda que debe considerarse peligroso para la salud y la vida un nivel de 35 mg/m<sup>3</sup> de vanadio. Este nivel se corresponde al cual puede causar problemas permanentes de salud o muerte.

### 5.3 Vitaminas y Principios Activos en Fármacos

#### *Ácido Ascórbico*

Las vitaminas son unos compuestos necesarios, en pequeñas cantidades, para el mantenimiento de la actividad biológica normal. El ácido ascórbico (vitamina C) es una cetolactona de seis carbonos, que tiene relación estructural con la glucosa y otras hexosas, y se oxida de modo reversible en el organismo hacia ácido deshidroascórbico. Es soluble en agua y se oxida con facilidad en disolución, en especial cuando se expone al calor, acelerándose por la presencia de hierro, cobre o pH alcalino. Se le dio el nombre químico de "ácido ascórbico" para designar su función preventiva del escorbuto.



El ácido ascórbico puede ser sintetizado a partir de glucosa y galactosa por las plantas y muchos mamíferos, pero no por el hombre, ya que carece de la enzima hepática necesaria para la conversión de L-gulonolactona en ácido L-ascórbico. Por lo tanto, tiene que tomarlo de los alimentos que lo contienen, siendo las mejores fuentes las frutas y vegetales, preferentemente ácidos y frescos. Se absorbe en el intestino en un 90%. Los niños hasta los 13 años de edad tienen un requerimiento promedio de 45 mg/día, entre los 14 y 18 años ronda los 75 mg y a partir de los 19 años, las recomendaciones son de 90 mg para el hombre y 75 mg para la mujer. Durante el embarazo y la lactancia estas cifras aumentan hasta los 120 mg diarios de vitamina.

El ácido ascórbico tiene múltiples funciones como coenzima o cofactor. Tiene una potente acción antioxidante, protegiendo al organismo de los "radicales libres". Participa en la hidroxilación de la prolina para formar hidroxiprolina en la síntesis de colágeno (constituyente principal del tejido conjuntivo, del cartílago y del hueso), en la síntesis de hormonas esteroideas, en el metabolismo de lípidos y de algunos fármacos y aumenta la absorción de hierro cuando ambos se ingieren juntos. Interviene también en numerosas reacciones enzimáticas y, concretamente, en el transporte del hierro desde la transferrina plasmática a la ferritina del interior de los órganos. Es esencial para la oxidación de ciertos aminoácidos (fenilalanina y tirosina), en el metabolismo del triptófano y en la síntesis de noradrenalina. Tiene influencia sobre la actividad de los leucocitos, macrófagos, la respuesta inmune y las reacciones alérgicas. La vitamina C ayuda al desarrollo de dientes y encías sanos. Participa en la cicatrización de heridas, fracturas y hemorragias, también reduce el riesgo de infecciones. Al ser un antioxidante, suprime los radicales libres que pueden causar daño a órganos, tejidos y células. Una alimentación rica en vitamina C ofrece una protección añadida contra todo tipo de cánceres.

La vitamina C se debe consumir todos los días, ya que no es una vitamina liposoluble y no se puede almacenar para uso posterior, aunque las recomendaciones específicas dependen de la edad, género y otros factores (como el embarazo). La vitamina C se elimina a las tres horas de ingerirla, por lo que debe tomarse varias veces al día. Se potencia en presencia de bioflavonoides (presentes en la capa blanca de los cítricos debajo de la piel), calcio y magnesio. Quienes ingieren cantidades masivas de vitamina C tienen un "escorbuto de rebote" cuando se suspende la dosis. En consecuencia los suplementos deben disminuirse de manera gradual.

La deficiencia grave de vitamina C lleva al escorbuto. Aunque aparece en pocos casos, pueden observarse carencias en quienes consumen una dieta sin vegetales y frutas, en alcohólicos, en personas de edad avanzada con dietas limitadas, pacientes muy graves con estrés crónico y en lactantes que se alimentan con leche de vaca. Los síntomas del escorbuto son hiperqueratosis

folicular, tumefacción e inflamación gingival (en encías), hemorragia en las encías, aflojamiento de los dientes, resequedad de la boca y los ojos, pérdida de pelo y piel seca, entre otros síntomas que pueden conducir a la muerte. Por la deficiencia de colágeno, las heridas no cicatrizan y las heridas de cicatrices previas se rompen, pudiendo dar lugar a infecciones secundarias. Son comunes las alteraciones neuróticas que consisten en histeria y depresión, seguida de disminución de la actividad psicomotora.

Normalmente, no se presenta toxicidad debido a que la vitamina C es hidrosoluble y el cuerpo la excreta regularmente. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que las dosis excesivas de vitamina C (muchas veces más de la cantidad recomendada) pueden llevar a que se presente toxicidad. Las manifestaciones más comunes de toxicidad por vitamina C son cálculos renales y en muy raras circunstancias anemia, causada por la interferencia con la absorción de la vitamina B<sub>12</sub>.

Además de su participación en la nutrición, el ácido ascórbico suele utilizarse como un antioxidante para proteger el sabor y color naturales de muchos alimentos, como fruta procesada, verduras y productos lácteos, entre otros.

### **Fenotiazinas**

Las fenotiazinas, en general, son llamadas tranquilizantes mayores y se usan para el tratamiento de los trastornos psicóticos. Las primeras fenotiazinas se sintetizaron a fines del siglo XIX para ser utilizadas como colorantes de anilina. Las propiedades sedantes y antipsicóticas se descubrieron desde 1930. Comprenden dos grupos: los antipsicóticos clásicos (o neurolépticos) y los atípicos.

-Antipsicóticos clásicos:

#### Fenotiazinas alifáticas

Clorpromazina  
Triflupromazina  
Levomepromazina  
Prometazina  
Haloperidol

#### Fenotiazinas piperazínicas

Trifluoperazina  
Flufenazina  
Propericiazina

### -Antipsicóticos atípicos

Clozapina

Risperidona

Olanzapina

Quetiapina

Benzamidas sustituidas (sulpirida y amisulprida)

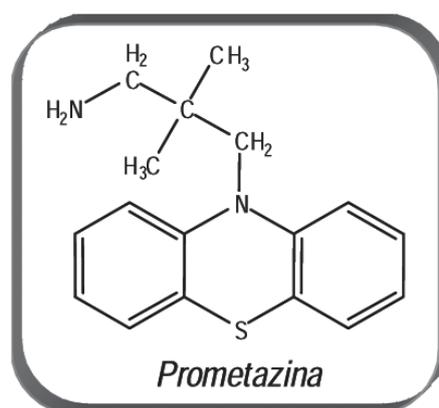
Ziprasidona

La intoxicación por fenotiazinas provoca alteraciones del sistema nervioso central y del sistema cardiovascular, pero en menor escala que con otros antidepresivos como los tricíclicos.

Veamos las características generales de las Fenotiazinas estudiadas en esta Memoria: Prometazina y Trifluoperazina.

#### ***Prometazina:***

La prometazina es un medicamento que pertenece al grupo de los antihistamínicos y actúa bloqueando los receptores H1 de la histamina. La histamina es una sustancia química con muchas acciones, por ejemplo, estimula la aparición de los síntomas de una reacción alérgica, como inflamación, escozor y enrojecimiento de la piel, y para producir esta acción se tiene que unir a unos lugares llamados receptores H1.

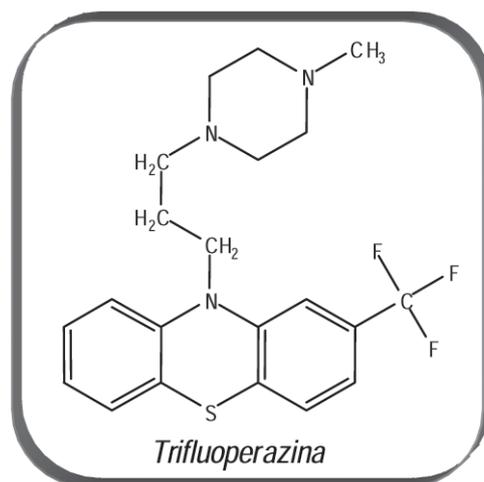


Los fármacos antihistamínicos como la prometazina se unen a estos receptores, impidiendo la unión de la histamina y las acciones derivadas de la misma. Por tanto, la prometazina alivia el enrojecimiento e irritación en la piel provocado por las alergias o picaduras de insectos y el lagrimeo de los ojos, rinorrea y estornudo.

También se usa para tratar la sensación de mareos o vértigo, y antes y después de la cirugía como sedante para aliviar la ansiedad, y para prevenir y tratar las náuseas y los vómitos.

### ***Trifluoperazina:***

La trifluoperacina es un inhibidor de los canales del calcio plasmáticos. La trifluoperazina es usada para el tratamiento de los desórdenes psicóticos y la esquizofrenia. La trifluoperazina es efectiva en cuadros psicóticos delirantes y alucinatorios, en el caso de los trastornos emocionales elimina la ansiedad excesiva, expresada como agitación y tensión o apatía e indiferencia. Asimismo, alivia la ansiedad que acompaña a los trastornos somáticos, siendo su acción, generalmente, libre de sedación.



En casos de náuseas y vómito, la trifluoperazina, da buenos resultados rápidos y efectivos.

## III. Objetivos

### III OBJETIVOS

La presente Memoria constituye una respuesta al reto lanzado a la comunidad científica hace unos años<sup>63</sup> respecto a la necesidad de desarrollar sensores en flujo que puedan aplicarse al análisis de muestras reales.

Por ello, el objetivo general de esta Memoria ha sido desarrollar el campo de los sensores espectroscópicos conjugado con el Análisis por Inyección en Flujo (FIA), poniendo así a punto nuevas metodologías analíticas de flujo con detección espectroscópica en fase sólida con amplia aplicabilidad en diferentes campos de análisis.

En todos los casos el uso de un soporte sólido permite la preconcentración y retención selectiva de/los analito/s de interés en la propia zona de detección, proporcionando un notable incremento en la sensibilidad y un descenso en los límites de detección, así como una significativa exaltación de la selectividad comparados con la metodología FIA en ausencia de dicho soporte sólido.

Los sensores que se proponen van dirigidos a la determinación automática de especies de interés medioambiental y farmacológico, y su aplicación al análisis de muestras reales de diferente naturaleza. Respecto al número de analitos a los que responde cada sensor, en esta Memoria se proponen sensores monoparámetro y biparámetro, siendo estos últimos menos abundantes en bibliografía. Dentro de los sensores biparámetro se desarrollan determinaciones simultáneas y secuenciales utilizando diferentes estrategias.

Estos sensores desarrollados los podemos agrupar en dos grupos, según requieran o no la renovación de la superficie sensora:

(1) Se aborda el estudio de tres sensores que no necesitan renovación de la zona sensora (sensores regenerables):

- Sensores monoparámetro: Warfarina, Compuestos Fenólicos
- Sensor biparámetro: Warfarina-Tiabendazol

El propio portador o bien un eluyente adecuado, permiten la regeneración del sensor dejándolo preparado para un nuevo análisis. El tercer sensor (Warfarina-

Tiabendazol) origina la separación *on line* de uno de los analitos en una precolumna, permitiendo pasar así al otro analito hacia el detector (el portador que lo conduce a la microzona sensora también es capaz de actuar de eluyente de la misma). Después, el analito retenido en la precolumna es eluido convenientemente y transportado a la zona sensora, donde se desarrollará igualmente una segunda señal transitoria, siendo también este analito eluido de la misma.

(2) También se ha abordado el estudio de siete sensores mono y biparámetro con inyección de partículas ("*Bead Injection*") (BI) (sensores espectroscópicos con zona sensora renovable). Esto está indicado en aquellos casos en que la regeneración de la zona sensora sólida es especialmente difícil o plantea serios problemas de acortamiento sustancial de la vida del sensor. Estos sistemas presentan una configuración más compleja que los sensores comentados anteriormente. Son los primeros sensores de estas características que combinan ambas metodologías BI-FIA, haciendo uso de células de flujo comerciales.

Concretamente, los sensores desarrollados han permitido el análisis de las siguientes especies:

- Sensores monoparámetro: Fe, Co, V, Ácido Ascórbico, Fenotiazinas
- Sensores biparámetro: Be-Al, Cu-Zn

Dentro de los sensores monoparámetro hay que destacar que el sensor de Fe(II) permite también la determinación de Fe total, mediante una reducción previa con un agente reductor, como el ácido ascórbico, y por tanto, la determinación indirecta de ácido ascórbico, introduciendo una mínima modificación en el sistema. Con el sensor de Fenotiazinas se pueden determinar dos compuestos de esta familia, Prometazina y Trifluoperazina. Por último, en el sensor para la determinación de Ácido Ascórbico la señal analítica es la disminución de la absorbancia que se produce cuando el analito reduce al reactivo (Azul de Prusia) previamente fijado en el soporte sólido.

Referente a los sensores biparámetro, éstos han permitido la determinación secuencial de la mezcla binaria correspondiente. En el sensor para Be(II) y Al(III) la determinación se consigue mediante el uso de dos disoluciones de portador, una de ellas permite la reacción y retención, y por tanto detección, de solo uno de los analitos, y con la segunda se determina el otro analito. El otro sensor biparámetro, para Cu(II) y Zn(II), funciona de forma similar, pero esta vez con uno de los portadores solo reacciona y se retiene uno de los metales y con el segundo lo hacen ambos, cumpliéndose con este último que las señales analíticas son aditivas. En todos los casos, tanto para sensores monoparámetro como biparámetro, la detección ha sido espectrofotométrica o fluorimétrica.

En general, se ha pretendido hacer aportaciones al campo de los sensores con detección fluorimétrica, debido al menor número de este tipo de sensores descritos,

así como contribuir al campo de los multisensores en flujo, también de escaso desarrollo. Con la aportación de los sensores de superficie sensora renovable, se ha dado un gran paso en el avance de lo que hoy conocemos como sensores de tercera generación, cada día más empleados en los campos científicos de análisis clínico, alimentario y medioambiental.

## IV. Antecedentes

#### **IV. ANTECEDENTES**

En este capítulo se estudia los antecedentes de los puntos 2, 3, 4 y 5 desarrollados en la Introducción de esta Memoria (*Capítulo II*), con objeto de hacer un pequeño resumen de los fundamentos y resultados previos que han constituido los pilares para el posterior desarrollo de esta Memoria.

## 1. Análisis por inyección en flujo

## 1. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

El análisis por inyección en flujo (FIA) fue descrito por primera vez a mediados de la década de los setenta por Ruzicka y Hansen<sup>3</sup> en Dinamarca y Stewart *et al.*<sup>4</sup> en Estados Unidos. El FIA, como se comentó en el *Capítulo II*, es una modalidad de los sistemas en flujo continuo en los que el flujo no está segmentado por burbujas de aire. Presentan gran versatilidad, puesto que permite al investigador hacer innovaciones en la determinación de compuestos con un presupuesto reducido, gran sencillez en el manejo, y proporciona resultados de gran rapidez, exactitud y precisión. El término de *Flow Injection Analysis (FIA)* se mantiene por razones históricas, debido a que Ruzicka y Hansen<sup>5</sup> empleaban una jeringa para introducir la muestra en el flujo, aunque, actualmente se realiza por inserción con válvulas rotatorias o bien con un inyector proporcional.

Desde sus comienzos, el FIA ha sido empleado con técnicas espectroscópicas atómicas<sup>31,32,33</sup> (en todas sus modalidades) y moleculares<sup>7,8,9,10,11,94,95</sup> (espectrofotometría, espectrofluorimetría, quimioluminiscencia, etc.), electroquímicas<sup>40,41,44</sup>, cromatográficas<sup>96,97,98,99,100</sup>, etc., para la automatización de determinados procesos o la determinación automática de analitos de carácter inorgánico y orgánico con interés en diferentes campos de aplicación.

## 2. Espectroscopía en fase sólida

## 2. ESPECTROSCOPÍA EN FASE SÓLIDA

En 1976 Yoshimura<sup>47</sup> propuso el uso combinado de un soporte sólido para preconcentrar el analito (o su producto de reacción con un reactivo cromogénico) con la medida directa de la absorción de luz de la especie de interés sorbida sobre la fase sólida. A partir de entonces, se prestó atención a esta metodología, que Yoshimura denominó primeramente *Colorimetría de Cambio Iónico* (pues los primeros soportes empleados eran cambiadores iónicos), aunque más propiamente debería llamarse espectroscopía de cambio iónico (SPS).

Uno de los primeros grupos en contribuir con importantes aportaciones a esta metodología fue el grupo de investigación del PAI "Espectrometría en Fase Sólida" del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada<sup>58,61</sup>. Las primeras aplicaciones analíticas de la SPS estuvieron encaminadas a la determinación de iones metálicos en agua mediante resinas de cambio iónico con matrices de naturaleza aromática como soporte sólido. Desde entonces, los métodos SPS<sup>52,57,58,60</sup> han sido desarrollados para el análisis tanto de analitos de carácter inorgánico como orgánico en muy diferentes tipos de muestras reales, como son agua, tejidos vegetales, alimentos, suelos, preparados farmacéuticos, etc. Además, el rango espectral ha sido ampliado desde el visible hasta el UV mediante el uso de soportes sólidos que muestras bajos niveles de absorbancia en estas regiones. Asimismo, se han abierto nuevos horizontes con otras técnicas similares como la Espectroscopía de Cambio Iónico por Reflectancia Difusa<sup>101</sup>, etc.

Aunque esta técnica proporcione una alta sensibilidad, normalmente se requiere un gran volumen de muestra, y se tiene que realizar una separación física del soporte sólido de la disolución previa a la medida. Esto ha hecho que surjan nuevas alternativas en las que se combina esta técnica con otras que permitan eliminar estos inconvenientes. Podemos considerar la espectroscopía en fase sólida, practicada originariamente en modo manual o batch, como precursora de los sensores en flujo cuando ésta se combina con la metodología FIA.

### 3. Sensores químicos

### 3. SENSORES QUÍMICOS

La integración de la metodología SPS con el análisis por inyección en flujo (FIA)<sup>62</sup>, combina las ventajas de la primera, principalmente sensibilidad y selectividad, con las que ofrece el FIA: rapidez, automatización, menor participación humana, etc. Estas combinaciones SPS-FIA<sup>102</sup> se denominan sensores en flujo continuo y se han desarrollado mucho en los últimos años, tanto para especies orgánicas<sup>103,104,105</sup> como para inorgánicas<sup>106,107</sup>.

#### 3.1 Características generales de los sensores químicos en flujo continuo

En estos sistemas SPS-FIA, la separación y retención de la especie de interés sobre la fase sólida tiene lugar en la misma área de detección y simultáneamente con ésta. El hecho de no requerir una previa elución antes de la medida (que es lo que se hace clásicamente cuando se mide la señal en disolución y que conlleva inevitablemente una dilución de la especie a medir), proporciona un notable incremento en la sensibilidad y un descenso en los límites de detección comparados con la respectiva metodología FIA en ausencia de soporte sólido.

A su vez, la separación de la especie de interés del resto de la matriz, al ser retenida en el soporte activo, contribuye a exaltar muy significativamente la selectividad, pues las especies no retenidas en el soporte no pueden desarrollar señal al verse forzadas a pasar a través de los intersticios que dejan las partículas del sólido, lo que ofrece un paso óptico efectivo extraordinariamente bajo.

Por consiguiente, los procesos de separación/retención, concentración y detección ocurren en estos sistemas simultáneamente en el tiempo y en el espacio. Una gran cantidad de sensores fotométricos en flujo estaban basados en la retención y medida de la absorbancia intrínseca del analito. El primero, como se ha comentado

en el *Capítulo II*, fue desarrollado por Yoshimura<sup>62</sup> para la determinación de cobre, utilizando una configuración monocanal con dos válvulas de inyección en serie, una para la muestra y otra para el eluyente (ácido nítrico concentrado). La microzona activa la constituía una resina AG 50W-X12 ubicada en una célula de flujo comercial.

Los sensores en los que la especie retenida es el producto de una reacción previa a la retención<sup>65</sup> son muy frecuentes, sobre todo aquellos que tienen como analitos cationes metálicos, siendo más escasos los sensores que determinan aniones o compuestos de naturaleza orgánica.

Además, en los casos en los que sea necesaria reacción derivadora, ésta puede tener lugar también simultáneamente sobre el soporte sólido, por lo que estos sistemas en tales casos integran separación/retención, preconcentración, reacción y detección. Muy frecuentemente se emplea un reactivo (cromogénico o fluorogénico) permanentemente inmovilizado en la microzona activa. El primer sensor de este tipo fue propuesto por Lázaro *et al.*<sup>65</sup>, para la determinación de cobre por reacción con 1-(2-piridilazo)-2-naftol irreversiblemente inmovilizado sobre resina Dowex 50Wx4.

Otros sensores de este tipo se basan en la retención transitoria del analito, seguida de la reacción en la fase sólida, al pasar a través de la microzona activa una disolución de reactivo. Un ejemplo de esta metodología es el sensor desarrollado por Richter *et al.*<sup>70</sup>, en el que se retiene cadmio en una resina aniónica (Sephadex QAE A-25) por formación de  $CdI_4^{2-}$ . La posterior inyección de piridazolresorcinol (PAR) provoca la formación del complejo Cd-PAR sobre la microzona sensora por desplazamiento del ion I<sup>-</sup>.

También tiene lugar esta triple integración en aquellos sensores donde el reactivo es retenido temporalmente sobre el soporte sólido; a la llegada de la muestra se produce un cambio detectable en la microzona activa, y posteriormente el sensor se regenera mediante la elución, no solo del analito, sino también del reactivo<sup>67,68,69</sup>.

Todos estos sistemas, basados en la interacción de la radiación con la superficie sólida integrada en el detector, se llaman optosensores en flujo<sup>81</sup> o sensores espectroscópicos en flujo. Estos dispositivos son puestos en contacto directo con la muestra proporcionando (idealmente) una respuesta rápida, reversible y continua<sup>82</sup> que es transducida vía un detector espectroscópico molecular no destructivo.

Las primeras aplicaciones de los sistemas SPS-FIA estaban dirigidas a analitos inorgánicos<sup>108,109</sup>, así como las primeras aplicaciones en modo batch<sup>47,110</sup>. Después fueron desarrollados sensores de este tipo para analitos orgánicos, mayoritariamente principios activos de fármacos. Los primeros requerían una reacción derivadora<sup>111,112</sup>, siendo los más sencillos aquellos sensores basados en la medida de una propiedad intrínseca del analito (absorbancia o fluorescencia), que evitan la necesidad de reacciones derivadoras<sup>113,114</sup>.

El desarrollo de optosensores en flujo es un área de investigación muy prometedora que conduce a métodos analíticos muy simples y baratos con características analíticas muy destacadas (principalmente sensibilidad y selectividad) comparadas con los respectivos métodos espectroscópicos convencionales.

### 3.2 Multisensores

Nos centraremos en los sensores capaces de resolver mezclas de analitos sin necesidad de llevar a cabo una separación previa, aunque también se han usado sistemas sensores colocados, por ejemplo, a la salida de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución<sup>115</sup>.

El primero de ellos fue el sensor propuesto por Fernández Band *et al.*<sup>77</sup> en 1990 que permite la resolución de mezclas de aminas mediante la inyección de la muestra en una configuración monocanal, produciéndose la retención transitoria de los analitos sobre gel de sílice C<sub>18</sub>, empaquetado en la célula de flujo de un detector diodo "array", que registra la absorbancia intrínseca de los mismos, a nueve longitudes de onda, en la zona entre 300-460 nm. La resolución del sistema de nueve ecuaciones generado por la medida a nueve longitudes de onda permite la resolución de la mezcla.

En otros multisensores de este tipo tiene lugar una reacción química y utilizan detección fotométrica o fluorimétrica. La reacción puede tener lugar previamente a la retención-detección<sup>116,117</sup> o sobre la misma microzona sensora<sup>118</sup>. Estos sensores utilizan calibración multivariante (PLS o CLS) o univariante (derivada o sincrónica derivada).

En los últimos años se han desarrollado multisensores que utilizan técnicas fotométricas y fluorimétricas sin necesidad de reacciones derivadoras. Estos, generalmente, conllevan el tratamiento posterior de los datos mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)<sup>74,75,76</sup>. También se han empleado otros sistemas de detección como espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier<sup>119</sup>.

Por otro lado, se puede realizar determinaciones simultáneas basadas en la diferencia de la cinética de retención de los analitos en un soporte sólido colocado previamente a la célula de medida<sup>78,79,80</sup>.

Otros mutilsensores realizan determinaciones secuenciales de los analitos en los que, para cada determinación, se realizan tantas inyecciones de muestra como analitos se quieren determinar<sup>71,72,73</sup>.

### 3.3 Sensores sin renovación de la superficie sensora

Tras la medida, la zona sensora tiene que ser regenerada para quedar lista para la siguiente determinación haciendo que el sensor sea reutilizable. La implementación de este paso de regeneración es un requerimiento clave e importante.

Para ello se emplea una disolución adicional de eluyente, que se hace llegar a la zona sensora mediante inyección de un volumen definido en el sistema, o usando una válvula de selección, como ocurre en el sensor de Ni(II) desarrollado por M. J. Ayora Cañada *et al.*<sup>107</sup>, en el cual es necesaria una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para conseguir la elución del analito y la consiguiente regeneración del sensor. Otros ejemplos en los que se emplean esta configuración son los sensores para la determinación de fluoruros desarrollado por D. Chen *et al.*<sup>120</sup> y de sulfonamidas, por M. T. Tena *et al.*<sup>121</sup>, que emplean como eluyentes disoluciones de HCl y etanol, respectivamente, para la regeneración de los sensores. Esta disolución de eluyente se utiliza cuando el portador no puede eluir por sí mismo la especie que se mide de la zona sensora (analito o producto de reacción), permitiendo mayor sensibilidad, dado que la preconcentración es más efectiva; sin embargo, ofrece menor frecuencia de muestreo y suele acortar la vida del sensor si el soporte es una resina intercambiadora, al contrario de lo que ocurre cuando el propio portador actúa como eluyente.

### 3.4 Sensores con renovación de la superficie sensora

Los sensores con renovación de la superficie sensora utilizan la metodología conocida como "*Bead Injection*" (BI), la cual es aplicable a distintos campos de investigación, incluyendo sensores químicos, bioanálisis, cromatografía, espectroscopía y electroquímica.

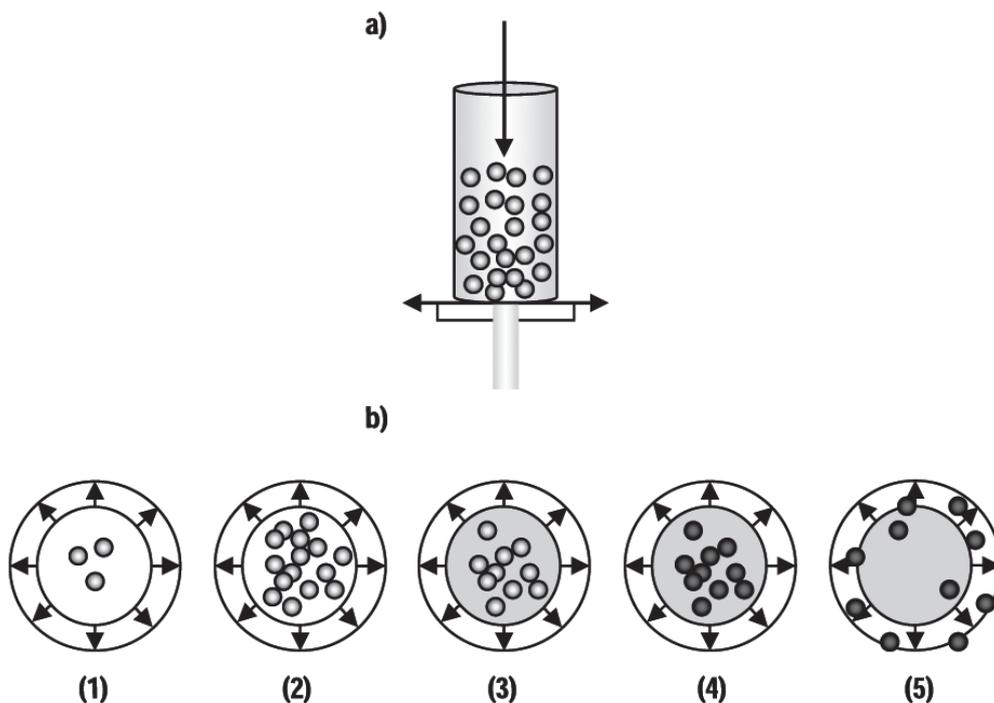
Esta metodología, también propuesta por Ruzicka *et al.*, se considera la tercera generación de técnicas microanalíticas de flujo<sup>85</sup>. En sus comienzos se basaba en la inyección de un volumen exacto de una suspensión de partículas en un sistema por inyección secuencial (SIA) con detección espectroscópica. Las partículas eran atrapadas en una célula especial ("*jet ring cell*")<sup>86</sup> colocada en la zona de detección de un detector espectroscópico no destructivo.

Esta célula consiste en un tubo perpendicular a una superficie plana dejando un estrecho hueco circular en el fondo. El líquido escapa radialmente por el hueco circular, que es más estrecho que el diámetro de las partículas, mientras que las partículas son retenidas. (*Figura VI. 1. (a)*). Cuando las partículas están empaquetadas en la célula, los reactivos necesarios y la muestra se inyectan, pasando a través de ésta y desarrollándose la señal analítica. Al final del análisis se

vacía la célula, eliminando las partículas de la zona de detección mediante un cambio en el sentido del flujo o aumentando el tamaño del hueco de la misma. Por tanto, la fase sólida sensora es desechada tras cada medida, reemplazándose para la siguiente por un nuevo lote intacto.

La metodología seguida se puede explicar teniendo en cuenta los siguientes pasos (Figura VI. 1.(b))

- Paso 1: Un volumen exacto de suspensión de partículas es aspirado y transportado hasta la célula de flujo donde quedan atrapadas.
- Paso 2: Las partículas son empaquetadas por la corriente de portador y se establece la línea base de la medida (espectroscópica o electroquímica).
- Paso 3: Se inyecta la muestra, y el analito queda retenido en la superficie de las partículas.
- Paso 4: El analito es tratado con los correspondientes reactivos con objeto de desarrollar la señal analítica.
- Paso 5: Las partículas son eliminadas automáticamente de la célula de medida, finalizando así el ciclo de análisis.



**Figura IV. 1. (a)** Vista frontal de la "jet ring cell". **(b)** Corte transversal de la "jet ring cell" y etapas del "Bead Injection" en la "jet ring cell"

Es necesario mantener homogénea la suspensión de partículas. El procedimiento para ello puede variar dependiendo del tipo de material de las mismas. Así por ejemplo, las suspensiones de partículas o microesferas densas, como las de vidrio de carbono<sup>122</sup>, pueden mantenerse homogéneas mediante agitación magnética. En cambio, la agarosa y el dextrano son más frágiles y deberían agitarse por rotación del recipiente de la suspensión de partículas<sup>123</sup>.

También hay que tener en cuenta las propiedades de estas partículas; algunas (Sephadex, Sepharosa, Cytodex, etc.) son muy transparentes en la región del visible, incrementando su absorbancia hacia la zona UV del espectro, mientras que muchas partículas poliméricas, como las Polysorb, son blancas, y por tanto son solo apropiadas para reflectancia. Por lo general, los tamaños de las partículas deben oscilar entre 10 y 150 nm.

La metodología basada en "*Bead Injection*" ha sido aplicada a distintos campos de investigación:

### ***Sensores químicos renovables***

Los mecanismos de transducción en los sensores químicos o biológicos deben ser reversibles y estables por tiempo indefinido, aunque desafortunadamente, los sistemas sensores suelen sufrir deterioro de su superficie sensora. Sin embargo el BI presenta la ventaja de poder reemplazar la superficie reactiva cuando se necesite. Esto abre una puerta a un amplio rango de sustancias que no podrían ser estudiados en análisis repetitivos. Un ejemplo de aplicación es el sensor renovable con fibra óptica para la determinación de trazas de Cr(VI) con 1,5-difenilcarbohidrazina (DCP)<sup>124</sup>, que en medio ácido forma un complejo rojo-violeta. El DCP se fija sobre un soporte sólido, quedando atrapado dicho soporte en la célula "jet ring cell". Tras la inyección del analito se forma el complejo reteniéndose de forma irreversible sobre el lecho de partículas, realizándose la detección por espectroscopía de reflectancia.

En este campo de investigación ha sido donde se ha desarrollado la mayor parte de esta Memoria, introduciendo en dicha metodología sustanciales modificaciones.

### ***Interacción de bioligandos***

En los análisis de interacción de bioligandos (BIA), el primer componente está inmovilizado en un sustrato sólido, mientras que el segundo componente se pone en contacto con el primero por perfusión continua, monitorizándose la formación y disociación de los quelatos de los ligandos. Estas interacciones de ligandos se

realizan mediante etiquetas fluorescentes, por lo que la fluorescencia podría utilizarse como sistema de detección. El "*Bead Injection*" puede utilizarse para estos análisis, e inicialmente se utilizó con etiquetas fluorescentes en varios estudios<sup>125,126</sup>, aunque el uso la de espectroscopia UV-visible acoplada con una célula de flujo de fibra óptica también ha sido desarrollada, monitorizando, simultáneamente, las biomoléculas etiquetadas y sin etiquetar<sup>127</sup>. Las ventajas de la combinación de estas técnicas son la posibilidad de utilizar partículas comerciales con una gran variedad de grupos funcionales, además de que facilita la detección de pequeñas cantidades de moléculas sin etiquetar.

### ***Cromatografía***

Otra extensión del concepto de "*Bead Injection*" son las microcolumnas cromatográficas renovables. Las recientes publicaciones sobre la cromatografía renovable demuestran que el BI es una sencilla forma de automatización de la extracción en fase sólida<sup>128</sup>. También puede aplicarse a la separación de residuos radiactivos y análisis de radionucleidos. En la separación cromatográfica de <sup>90</sup>Sr de los otros radioisótopos<sup>129</sup> se obtiene una recuperación del 95%, por lo tanto, deja un residuo de <sup>90</sup>Sr que causa contaminaciones en los siguientes análisis. Renovando el material de la columna tras cada análisis, los posibles restos o contaminaciones de análisis anteriores se eliminan. En este caso, para la eliminación de las partículas se utiliza un flujo inverso.

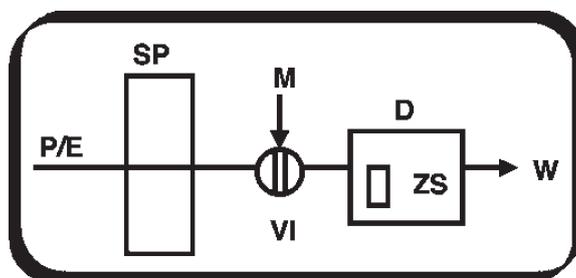
### ***Valoraciones***

La valoración en fase sólida es una técnica nueva que utiliza partículas como microviales individuales que contienen un reactivo valorante y un indicador<sup>130</sup>. En las partículas se fija el agente valorante, que puede ser una disolución de NaOH, y el indicador de pH puede unirse a la superficie por un intercambio de iones (si las partículas son resinas de cambio iónico). Una cantidad definida de partículas queda atrapada en la célula de flujo, formando una microcolumna. En la última capa de partículas se coloca un par de fibras ópticas que trabajan en modo de transmitancia. A flujo constante se realiza una inyección de ácido que es titulado gradualmente a través de las capas de partículas, hasta neutralizar la última capa de partículas. Cuando esta última capa es titulada se produce un cambio en la absorbancia, indicando el punto final. El volumen de muestra necesario para llegar al punto final es directamente proporcional a la concentración de analito. Esta técnica se suele utilizar con muestras coloreadas.

### 3.5 Configuraciones FIA

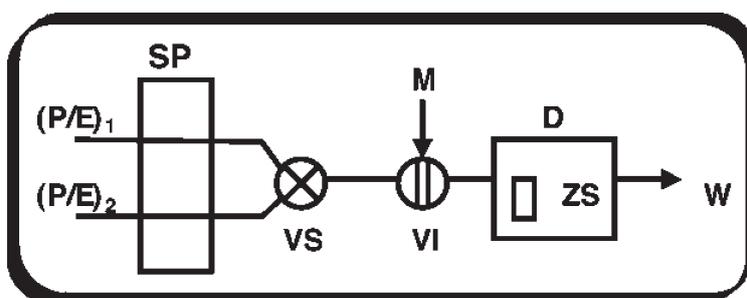
Las configuraciones de los sistemas FIA vienen determinadas, tanto por la existencia o no de una reacción química, como por la naturaleza del proceso de elución. Las más utilizadas, de acuerdo con la bibliografía consultada hasta la fecha, se muestran a continuación:

-La más sencilla es una configuración monocanal en la que la disolución portadora (P/E) actúa también como disolución eluyente. Cuando la cola del bolo de muestra alcanza la zona sensora (ZS) el analito es eluido por el propio portador, originando una señal transitoria.



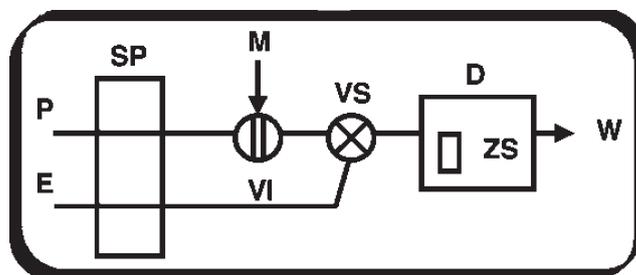
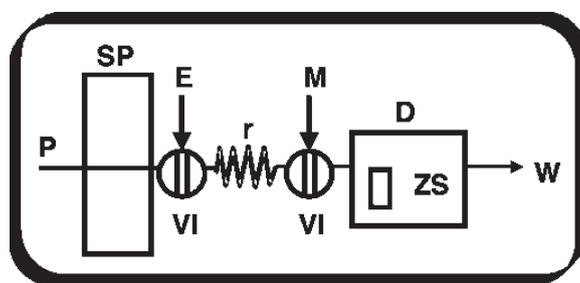
Esta es la configuración empleada en la mayoría de los sensores monoparámetro. Un ejemplo son los sensores para la determinación de diuréticos, amilorida<sup>113</sup> y triantereno<sup>114</sup>, utilizando detección espectrofluorimétrica.

-Se pueden determinar dos analitos secuencialmente usando dos disoluciones portador/eluyente adecuadas y una válvula de selección previa a la inyección. Cada analito origina una señal transitoria en la misma y única zona sensora.



Ruiz Medina *et al.* emplearon esta configuración en el sensor para la determinación secuencial de ácido ascórbico y paracetamol<sup>71</sup>, consiguiendo la detección del ácido ascórbico a pH 5.6, mientras que el paracetamol se determinaba tras el cambio a portador de pH 12.5.

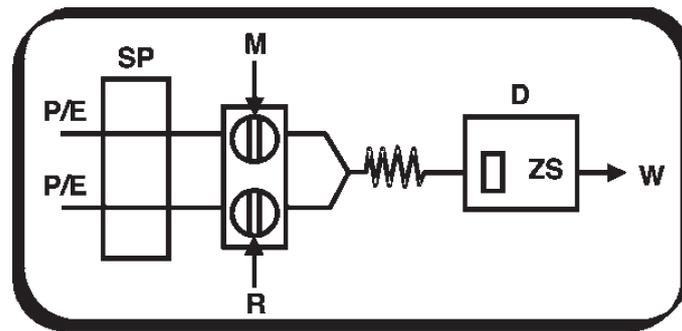
-Si la especie es retenida tan fuertemente que el portador no puede eluirla, tiene que usarse una disolución eluyente adicional. Entonces hay que usar una válvula adicional de inyección **(a)** o de selección **(b)**, colocada lo más cerca posible de la zona sensora. Esta configuración acorta la vida del sensor si la zona sensora es una resina de intercambio iónico.



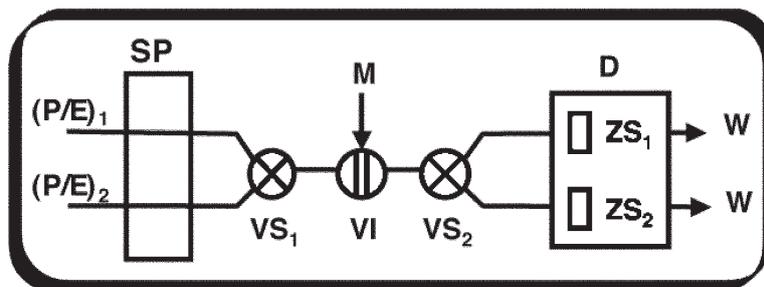
En un sensor para la determinación de Zn(II) se emplea una configuración similar a la **(a)**<sup>131</sup>, en el que la muestra y el eluyente son inyectados simultáneamente. La configuración **(b)** es la utilizada en un sensor para la determinación de Ni(II)<sup>107</sup>. El Ni(II) reacciona con PAN retenido en el soporte sólido, necesiéndose para su elución, y la consiguiente regeneración del sensor, una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

-Cuando se requiere una reacción de derivación previa se realiza una inyección doble sincronizada de muestra y reactivo, por lo que también se usa un reactor para completar la reacción antes de que el bolo alcance la microzona sensora.

Un ejemplo de esta configuración se puede encontrar en un sensor fosforescente para la determinación de ciprofloxacina<sup>132</sup>, en el cual el reactivo es una disolución de Eu(III).

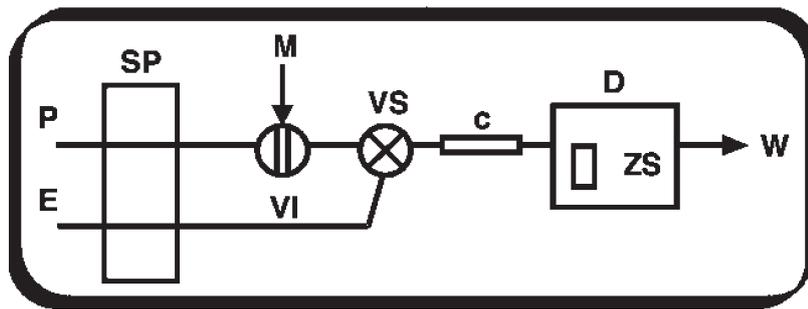


-Cuando la propia naturaleza de los analitos no permite la retención en un mismo tipo de soporte, el uso combinado de dos zonas sensoras ( $ZS_1$  y  $ZS_2$ ) y un espectrofotómetro de doble haz permite la determinación secuencial de los analitos usando dos disoluciones de portador/eluyente y dos válvulas de selección.



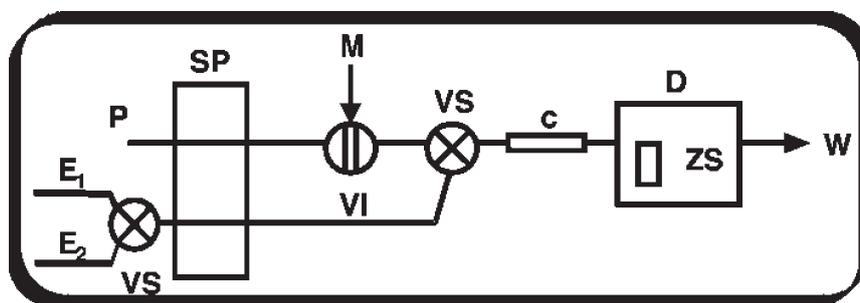
El sensor para la determinación de dos vitaminas, tiamina y ácido ascórbico, utiliza esta configuración<sup>133</sup>. En éste, la tiamina es retenida en la resina catiónica Sephadex SP C-25 ( $ZS_1$ ), mientras que el ácido ascórbico se retiene en una aniónica, Sephadex QAE A-25 ( $ZS_2$ ).

-La siguiente configuración se ha usado para la determinación directa de un analito e indirecta de otro, que puede transformarse previamente en el primero. En la determinación directa, la muestra pasa a través de  $VS_1$  y  $VS_2$  hasta la válvula de inyección (VI), con la cual se inserta en la corriente de portador. En la determinación indirecta, la muestra confluye con el reactivo y sufre la transformación oportuna en el reactor (r) sumergido en un baño termostatzado y después se inyecta con la válvula VI.



-El uso de una minicolumna colocada en línea delante de la zona sensora amplía el potencial de las configuraciones monocanal. Esto permite la determinación de más de un analito con una simple inyección de muestra. Un analito pasa a través de ella hacia la zona sensora mientras el(los) otro(s) es(son) retenido(s) en la minicolumna. El primero es eluido de la zona sensora por el propio portador. La elución del(los) analito(s) retenido(s) en la minicolumna con la(s) disolución(es) adecuada(s) seleccionada(s) con SV permite determinar simultáneamente dos **(a)** y hasta tres **(b)** analitos haciéndolos llegar secuencial y sucesivamente a la zona de detección.

(a)



(b)

Como ejemplo a la configuración **(a)** podemos encontrar en bibliografía un sensor para la determinación simultánea de dos vitaminas, tiamina y piridoxina<sup>79</sup>, y a la configuración **(b)** un sensor para la determinación de paracetamol, cafeína y propifenazona<sup>78</sup>.

Por supuesto, dada la gran versatilidad de los sistemas FIA, es posible introducir numerosas variantes de las configuraciones aquí presentadas. Será un estudio del sistema químico y de las necesidades que pretenda cubrir el sensor lo que condicione, en cada caso, la elección de la configuración de flujo más adecuada.

Todas estas configuraciones también pueden utilizarse con la nueva metodología de renovación de la superficie sensora mediante la introducción de una serie de modificaciones.

### 3.6 Sistemas de detección

La espectroscopía molecular es una técnica no destructiva perfectamente compatible con los sensores ópticos en flujo. La espectrofotometría UV-visible es, sin duda, la técnica de detección más frecuentemente usada en los laboratorios analíticos, dada su facilidad de adaptación a una amplia variedad de problemas analíticos. Por ello, también es la técnica de detección más empleada en los optosensores en flujo. No obstante, la región UV adolece de escasa selectividad para poder usarse en análisis espectrofotométrico convencional pues los componentes que acompañan a los analitos generalmente absorben radiación haciendo imposible su determinación. Sin embargo, el soporte sólido activo actúa en la zona de detección exaltando fuertemente la selectividad tal como se ha señalado anteriormente, excluyendo del área de detección las especies no retenidas en las condiciones de trabajo, potenciando la utilización de la región UV con satisfactorios resultados en un buen número de sensores para análisis orgánico<sup>134</sup>. Así, puede obviarse la necesidad de reactivos derivadores, simplificándose la configuración del sensor y disminuyéndose los costos por análisis. De hecho, la mayor parte de los sensores espectroscópicos en flujo continuo desarrollados por el "Grupo de Química Analítica de la Universidad de Jaén" utilizan detección fotométrica en la región UV.

La fluorescencia molecular sigue en importancia a la espectrofotometría como técnica de detección para sensores en flujo en cuanto al número de sensores desarrollados. Frente a la primera, tiene el inconveniente de que el número de analitos que pueden detectarse basándose en su fluorescencia nativa es mucho más reducido, pero, en cambio, ofrece alta sensibilidad, buena selectividad y excelentes límites de detección. La incorporación del soporte sensor a la zona de detección, contribuye también a incrementar sensibilidad y selectividad por las mismas razones anteriormente apuntadas.

Los sensores espectroscópicos basados en fenómenos de fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) son aún más escasos<sup>132,135,136</sup>, dadas las exigencias intrínsecas de esta técnica de detección. También debe mencionarse la escasez, aún mayor de sensores quimioluminiscentes<sup>137,138</sup> y de los que emplean la espectroscopía vibracional<sup>139,140,141</sup> como técnica de detección, si bien han sido menos explotados.

### 3.7 Antecedentes en nuestro Grupo de Investigación

El creciente número de trabajos publicados en las últimas décadas sobre desarrollo y aplicaciones de sensores químicos y bioquímicos en flujo es un claro índice de la vitalidad desplegada por los investigadores en esta área. De los diferentes tipos de

sensores en flujo que se encuentran descritos<sup>142</sup>, los optosensores en flujo son objeto de investigación del Grupo de Investigación "Química Analítica de la Universidad de Jaén", del departamento de Química Física y Analítica de dicha Universidad. Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación de dicho Grupo, sobre sensores espectroscópicos en flujo continuo. Hasta la fecha en que se inició la parte experimental de esta Tesis Doctoral se habían desarrollado por el Grupo, principalmente sensores monoparámetro<sup>143,144,145,146</sup>, es decir, aquellos que responden solo a un analito en cada inyección, o bien, a varios analitos de una misma familia<sup>147</sup>, pero siempre individualmente, uno en cada inyección. A su vez, la transducción era casi exclusivamente fotométrica (UV).

Tan sólo tres sensores biparámetro han sido desarrollados operando en modo secuencial, es decir, la determinación se lleva a cabo mediante dos inyecciones y la respuesta del sensor corresponde: a) a sólo un analito cada vez<sup>73</sup>; o b) primeramente a un solo analito y luego a la suma de los dos<sup>71,72</sup>.

Se han desarrollado asimismo cuatro sensores triparámetro y dos biparámetro para la determinación simultánea (solo se precisa una inyección de muestra) de todos los analitos. En dos de los triparámetro<sup>74,75</sup> y uno de los biparámetro<sup>76</sup> se aplicaba un tratamiento quimiométrico mediante regresión por PLS a los espectros UV adquiridos mediante un espectrofotómetro de diodo array, o a los espectros de emisión obtenidos con un espectrofluorímetro, mientras que los analitos avanzan a través de la zona sensora con un comportamiento diferencial respecto a su cinética de retención-elución en dicha zona. Los otros sensores se basan en la diferencia de la cinética de retención de los analitos en un soporte sólido colocado previamente a la célula de medida, con lo que la determinación de los analitos se realiza secuencialmente en el tiempo<sup>78,79,148</sup>.

Esta Memoria contribuye al desarrollo de nuevos sensores espectroscópicos (espectrofluorimétricos y espectrofotométricos) en flujo continuo:

Se ha desarrollado un sensor (UV) para la determinación de una familia de compuestos y cinco sensores espectrofotométricos (visible) introduciendo una nueva metodología basada en "*Bead injection*". Estos últimos son sensores con renovación de la superficie sensora, en los que se realiza una reacción derivadora para obtener un compuesto coloreado, siendo los trabajos publicados en esta Memoria los primeros sensores de estas características que aparecen en bibliografía.

En cuanto a los sensores con detección luminiscente, se proponen cuatro sistemas que contribuyen a ampliar este campo, menos desarrollado que el de los sensores fotométricos. De este tipo se han desarrollado asimismo sensores con y sin renovación de la superficie sensora.

#### 4. ANALITOS: OTROS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

A continuación se resumen brevemente los distintos métodos encontrados en bibliografía empleados anteriormente para el análisis de los analitos estudiados en esta Memoria, agrupados en función del tipo de analito.

##### 4.1 Rodenticidas, Pesticidas y Compuestos Fenólicos

###### *Warfarina*

Se han desarrollado numerosos métodos de determinación de Warfarina. Para el análisis de rutina el método más empleado ha sido la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución<sup>149,150,151,152</sup>, utilizando diferentes sistemas de detección. Estos métodos son muy sensibles y fiables, pero requieren una instrumentación muy costosa y, frecuentemente, también necesitan largos procedimientos de preparación de muestras, como extracciones previas<sup>153</sup>, centrifugaciones, etc., haciendo el método más lento y complejo.

También se realizaron medidas directas<sup>154,155</sup> e indirectas<sup>156</sup> para la determinación de Warfarina mediante métodos espectrofotométricos. Su luminiscencia nativa permite su determinación por espectrofluorimetría<sup>157,158</sup> y fosforimetría<sup>159</sup> convencional. Estos métodos son más simples que los cromatográficos, pero ofrecen menor sensibilidad y selectividad (límites de detección entre 1 y 10 mg ml<sup>-1</sup>). Se puede aumentar la sensibilidad de las medidas luminiscentes de la warfarina añadiendo ciclodextrinas o b-ciclodextrinas<sup>160,161,162</sup>, con lo que aumenta la fluorescencia o fosforescencia a temperatura ambiente, aunque son técnicas muy laboriosas y se necesita un proceso de derivación. Otras técnicas también empleadas para su determinación han sido los radioinmunoensayos<sup>163</sup> o la electroforesis capilar<sup>164</sup>.

La espectrofluorimetría en fase sólida es una técnica muy sensible aplicada a la determinación de pesticidas en aguas, y entre ellos la Warfarina<sup>165</sup>, pero aunque proporcione gran sensibilidad, se requieren volúmenes relativamente grandes y una separación física del soporte sólido de la totalidad de la disolución (metodología batch).

En los últimos años también se han desarrollado métodos de análisis por inyección secuencial para la determinación de este raticida<sup>166,167</sup> con y sin preconcentración en una fase sólida.

### ***Tiabendazol***

Se han desarrollado diversos métodos espectrofotométricos, espectrofluorimétricos<sup>168,169</sup> y fosforimétricos<sup>170</sup> para la determinación de este pesticida, aunque son métodos que proporcionan baja sensibilidad y selectividad. Algunos de éstos requieren un paso previo de extracción en fase sólida<sup>171</sup>.

Para análisis de rutina, los métodos más empleados son los cromatográficos (HPLC), que son muy sensibles y pueden utilizar diferentes técnicas de detección<sup>172,173,174,175,176,177</sup>. Sin embargo, estos métodos requieren un gran tiempo de análisis y una instrumentación de elevado costo.

La metodología de análisis por inyección en flujo (FIA)<sup>178</sup> y análisis por inyección secuencial (SIA)<sup>179</sup>, han sido desarrolladas para la determinación de este pesticida. También se han usado técnicas electroquímicas<sup>180</sup> y electroforesis capilar<sup>181</sup>.

Con la espectrofluorimetría en fase sólida<sup>182</sup> se aumenta la sensibilidad obtenida en las técnicas anteriores, pero también tiene inconvenientes, como bajas frecuencias de muestreo, debido a la laboriosidad de esta técnica.

### ***Compuestos Fenólicos***

Dos de los métodos más empleados para la determinación de compuestos fenólicos en aguas residuales<sup>183</sup> son los métodos volumétricos y colorimétricos.

El método volumétrico es conveniente para cantidades de compuestos fenólicos superiores a 1 mg/l, y además permite determinar totalmente los fenoles no sustituidos. En lo que concierne a los derivados monosustituidos y disustituidos es necesario tener en cuenta los coeficientes para efectuar los cálculos, y los derivados trisustituidos no se determinan. El método consiste en concentrar y purificar la muestra, someter los fenoles a una bromación y después determinarlos por yodometría.

Los métodos colorimétricos convencionales para la determinación de fenoles están basados en la formación de un derivado coloreado. Uno de los más empleados es aquel que utiliza como reactivo la 2,6-dibromoquinona-4-cloroimida, aunque el método colorimétrico de la 4-aminoantipirina es el que habitualmente se utiliza para analizar el contenido en fenoles, ya que está estandarizado por la Unión Europea<sup>184,185</sup>. Se trata de un método poco preciso, ya que no detecta solo fenoles y no determina de qué tipo de fenoles se trata. Es un método que requiere bastante tiempo, ya que se precisa de una destilación previa y una extracción, pero es muy sensible. Debido a que los fenoles reaccionan diferentemente con este reactivo, la coloración depende de la composición química, así pues, es más

un "índice-fenol" que un contenido en los diferentes fenoles lo que se puede obtener con este método. En conclusión, este método tiene bastantes deficiencias, por lo que una alternativa a su empleo es el método propuesto por Kang *et al.*<sup>186</sup>, consistente en la reacción entre el fenol, nitroprusiato de sodio y clorhidrato de hidroxilamina en un medio pH=10.6-11.8.

Durante los últimos años, se han desarrollado otros métodos espectrofotométricos que utilizan diferentes reacciones cromogénicas con: 2,4,6-trimetilanilina diazotizada<sup>187</sup>, el complejo Hierro(III)/1,10-fenantrolina<sup>188</sup> y bromuro de yodo<sup>189</sup>. Éstos presentan muchas ventajas: son simples, reproducibles y sensibles, pero todos incorporan una reacción derivadora previa.

La espectroscopia infrarroja permite determinar los compuestos fenólicos del agua hasta 0.01 mg/l. Se aplica a los compuestos fenólicos susceptibles de estar bromados en posición *orto* respetando el grupo hidroxil, lo que excluye la determinación de compuestos fenólicos ya sustituidos.

La principal técnica usada para el análisis de fenoles en aguas es la cromatografía. Se han desarrollado muchos métodos de HPLC<sup>190,191,192</sup> y cromatografía de gases<sup>193,194</sup>, que son muy selectivos, pero necesitan un paso de enriquecimiento, como extracción en fase sólida, y en la mayoría de los casos un paso adicional de filtración o diálisis. Por otra parte, se necesita un equipamiento muy complejo para el análisis automático. En otros casos se ha aplicado la polarografía<sup>195</sup> y la valoración potenciométrica<sup>196</sup>, y en la actualidad también se están utilizando métodos enzimáticos<sup>197,198</sup>.

La técnica de análisis por inyección en flujo (FIA) es un procedimiento analítico automático que puede ser útil para una rápida determinación de fenoles. El FIA ha sido acoplada a técnicas de separación en continuo, tales como el mecanismo de destilación y extracción en fase líquida<sup>199,200,201</sup>, sin embargo, estos métodos también tienen limitaciones: baja reproducibilidad, un gran volumen *on-line*, etc. En muchos casos el análisis por inyección en flujo ha sido también combinado con análisis multivariante<sup>202,203</sup>, obteniéndose en algunos casos una alta frecuencia de muestreo, aunque con la limitación de ser métodos no muy sensibles (altos límites de detección). El análisis por inyección secuencial<sup>204</sup> también ha sido utilizada para la determinación de fenoles.

## 4.2 Elementos metálicos

### *Hierro*

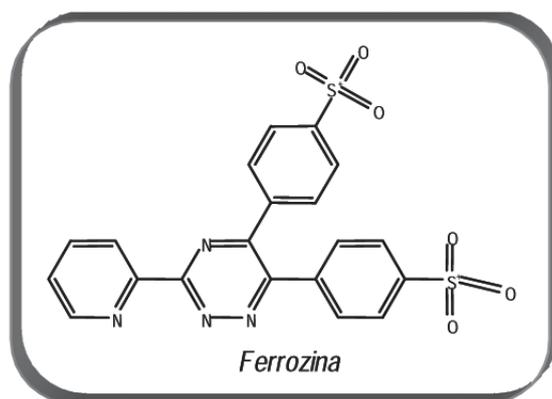
De todos los métodos de determinación de Hierro que existen en bibliografía, quizás los más abundantes sean los espectrofotométricos. Los métodos clásicos

emplean diferentes reactivos cromogénicos. El tiocianato reacciona con Fe(III) en medio ácido formando complejos de color rojo<sup>205,206</sup>, que no son muy estables, pero persisten con altas concentraciones de tiocianato. Este método se ha usado para la determinación de Hierro en sales<sup>207</sup> y en un gran número de muestras biológicas<sup>208</sup>.

Los métodos de la 1,10-fenantrolina y del 2,2'-bipiridil consisten en la reacción de éstos con Fe(II) a pH = 2-9 para dar complejos muy estables anaranjados o rosas respectivamente<sup>209,210</sup>. Similar al método de la 1,10-fenantrolina, pero dos veces más sensible, es el método de la batofenantrolina<sup>211</sup> (4,7-difenil-1,10-fenantrolina). Además de éstos, se han encontrado en bibliografía muchos más reactivos cromogénicos utilizados en métodos espectrofotométricos<sup>212</sup> para la determinación de Fe, cuyas aplicaciones se realizan a muestras de diferente naturaleza, como aleaciones<sup>213</sup>, bronce<sup>214</sup>, pelo<sup>215</sup>, etc.

El inconveniente de estos métodos radica en las interferencias debidas a la presencia de aniones que forman complejos estables con el Fe, así como la presencia de otros metales que también puedan formar complejos con los reactivos cromogénicos.

La sal disódica del ácido 3-(2-piridil)-5,6-difenil-1,2,4-triazina-4'-4»-disulfónico, conocido como Ferrozina, reacciona con Fe(II)<sup>216</sup> para formar un complejo muy soluble en agua de color magenta, lo cual hace que se pueda utilizar para la determinación directa de Fe en aguas. Este reactivo presenta numerosas ventajas, como son su sensibilidad, solubilidad en agua, estabilidad y baja viscosidad<sup>217</sup>.



Además de los métodos espectrofotométricos se han utilizado multitud de métodos para la determinación de Fe en diferentes muestras. Existen determinaciones de Fe por espectrofluorimetría<sup>218,219</sup>, electroforesis<sup>220</sup>, técnicas electroanalíticas<sup>221,222</sup>, espectroscopía Raman<sup>223</sup> y los métodos cromatográficos (HPLC), ampliamente usados en la determinación de metales<sup>224,225</sup>. En los últimos años se han

desarrollado las técnicas espectroscópicas atómicas para la determinación de Fe, como la absorción atómica<sup>226,227</sup>, fluorescencia de rayos X<sup>228,229</sup> e ICP<sup>230,231,232</sup>.

Los métodos de análisis por inyección en flujo y análisis por inyección secuencial, con diferentes sistemas de detección<sup>233,234,235,236</sup> han sido muy utilizados debido a su sencillez, rapidez, etc., pero tienen el inconveniente de su baja sensibilidad y selectividad, y a veces requieren de un procedimiento previo de preconcentración. Estos inconvenientes se eliminan con la espectroscopía en fase sólida<sup>41,237</sup>, pero surgen otros, como la laboriosidad y el gran tiempo de análisis.

Anteriormente al desarrollo de esta Memoria se habían realizado en nuestro Grupo de Investigación dos trabajos para la determinación de Fe basados en su reacción con el reactivo cromogénico Ferrozina. Uno de ellos utilizaba la espectrofotometría en fase sólida<sup>238</sup>, y el otro el análisis por inyección en flujo<sup>239</sup>. En el trabajo desarrollado en esta Memoria tiene lugar la misma reacción derivadora, pero combina ambas metodologías, por lo que se obtienen las ventajas de los dos. Hay que destacar que ha sido el primer sensor FIA con renovación de la superficie sensora desarrollado.

### **Cobalto**

Las primeras determinaciones de cobalto encontradas en bibliografía utilizan técnicas volumétricas<sup>240</sup>, gravimétricas<sup>241,242</sup> y métodos colorimétricos, basados en su reacción con diferentes reactivos cromogénicos, de los cuales los más utilizados han sido la sal nitroso-R<sup>243</sup>, el tiocianato<sup>244</sup> y el 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-dietilaminofenol<sup>245</sup>.

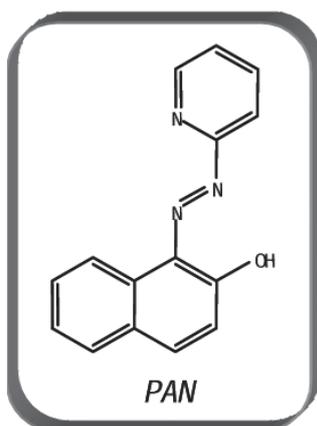
Posteriormente se han desarrollado más determinaciones espectrofotométricas<sup>246,247,248,249</sup> y espectrofluorimétricas<sup>250</sup>, precedidas de una reacción derivadora con diferentes reactivos, aunque la mayoría de estos métodos son procedimientos complicados y tienen poca sensibilidad y selectividad, por lo que se requiere una extracción para separar los iones interferentes o preconcentrar el analito. En estos casos se puede usar la extracción en fase sólida<sup>251,252,253</sup>, aumentándose el tiempo de análisis. Otras técnicas utilizadas son la electroforesis capilar<sup>254,255</sup> y las técnicas electroanalíticas<sup>256</sup>.

Frecuentemente, con las técnicas espectroscópicas atómicas, como la absorción atómica con horno de grafito<sup>257,258,259</sup>, las técnicas de emisión atómica (ICP)<sup>260,261</sup> y las técnicas cromatográficas (HPLC)<sup>262,263</sup>, se obtiene alta sensibilidad en la determinación de metales, entre ellos el Cobalto, pero tienen el inconveniente de un elevado coste en la instrumentación.

Más sensibles que los métodos de espectrofotometría convencional son los métodos que utilizan espectrofotometría en fase sólida<sup>47,264,265</sup>, aunque son

metodologías más complejas. El análisis por inyección en flujo<sup>266,267</sup> es simple, sencillo y rápido, y también ha sido utilizada en la determinación de Cobalto.

En esta Tesis Doctoral se desarrolla un sensor para la determinación de Co(II) utilizando el reactivo cromogénico 1-(2-piridazol)-2-naftol (PAN).



El PAN es uno de los reactivos más versátiles y usados en la determinación de trazas de metales, y ha sido inmovilizado en diferentes soportes sólidos en trabajos previos<sup>268,269,270</sup>. Forma complejos con multitud de cationes, aunque su uso en determinaciones espectrofotométricas<sup>271,272</sup> es reducido debido a que no es muy selectivo y que la mayoría de los complejos que forma muestran un máximo de absorción en la región de 560-590 nm. Los complejos formados entre el PAN y la mayoría de los metales se descomponen usando una disolución de un reactivo adicional, pero en el caso del complejo formado con el Co(II), se retiene tan fuertemente en el soporte sólido que es imposible su regeneración, por lo que en el sensor desarrollado en esta Memoria se recurre a la renovación de la superficie sensora para solucionar este problema. Con esta metodología se eliminan las posibles interferencias de otros metales que puedan acompañar al Co(II).

### **Berilio y Aluminio**

La determinación de metales, entre ellos Be(II) y Al(III), ha sido llevada a cabo mediante técnicas cromatográficas (HPLC)<sup>273</sup>, técnicas espectroscópicas atómicas, fundamentalmente absorción atómica<sup>274,275</sup> y emisión atómica (ICP)<sup>276,277</sup>, proporcionando alta selectividad, pero requieren elevados tiempo de análisis y costes. Para aumentar sus límites de detección se recurre a una preconcentración<sup>278</sup> o extracción en fase sólida<sup>279,280</sup>.

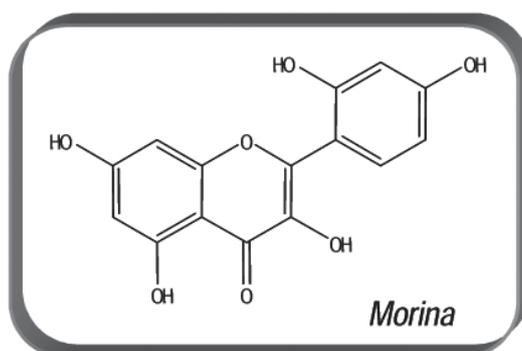
Además de los anteriores, una gran variedad de métodos espectrofotométricos y

espectrofluorimétricos han sido propuestos para la determinación de estos analitos<sup>281</sup>. La espectroscopía de fluorescencia molecular es una técnica analítica muy importante para la determinación a nivel de trazas y ultratrazas de sustancias inorgánicas, ya que es más sensible que otras técnicas espectroscópicas, y además mucho más selectiva. El único inconveniente de este tipo de técnicas es que generalmente requiere de un paso previo de separación.

La espectrofluorimetría se ha usado para la determinación de Be(II) y Al(III) por separado, utilizando diferentes reactivos fluorogénicos. Para el Be(II) los reactivos más utilizados han sido el 2-hidroxi-1-naftaldehído-8-aminoquinolina<sup>282</sup> y el 2-hidroxi-5-sulfoanilina-N-salicilideno<sup>283</sup> y para la determinación de Al(III) el 1,4-dihidroxi-antraquinona<sup>284</sup>, 1-hidroxi-2-carboxiantraquinona<sup>285</sup>, ácido 1,8-dihidroxi-naftaleno-3,6-disulfónico<sup>286</sup>, lumogalion<sup>287</sup>, salicilideno-*o*-aminofenol<sup>288</sup>, etc. Es difícil diferenciar ambos analitos en mezclas, debido a que tienen espectros de emisión muy similares, presentando fuertes solapamientos espectrales cuando reaccionan con ligandos orgánicos. Por esta razón, la mayoría de los métodos descritos para determinar estos analitos requieren técnicas de espectroscopía de primera derivada<sup>289</sup> o primera derivada sincrónica<sup>290</sup>.

Como alternativa a la espectrofluorimetría convencional cuando se requiere mayor sensibilidad, se ha empleado la espectrofluorimetría en fase sólida<sup>291</sup>, que utiliza un soporte sólido para preconcentrar el analito y separarlo del resto de la matriz. Los métodos automáticos de flujo, FIA<sup>292,293</sup> y SIA<sup>294</sup>, con diferentes sistemas de detección, también se han usado para la determinación de estos analitos.

En esta Memoria, se propone un sensor espectrofluorimétrico con superficie renovable para la determinación de Be(II) y Al(III) utilizando como reactivo fluorogénico la Morina (2',4',3,4,7-pentahidroxi-flavona)<sup>295</sup>. Este reactivo ha sido ampliamente utilizado en la determinación de metales a bajas concentraciones<sup>296,297,298</sup> (Be(II), Al(III), Zr(IV), Zn(II)), ya que origina complejos fluorescentes solubles en agua, aunque normalmente se requieren surfactantes, especialmente no iónicos, para aumentar la estabilidad de los complejos, y por tanto, la sensibilidad<sup>299,300</sup>.



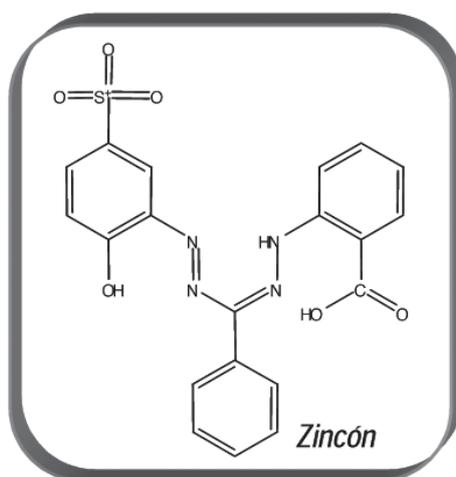
## Cobre y Cinc

Los primeros métodos de determinación de Cobre y Cinc encontrados en bibliografía son los métodos gravimétricos, fundamentalmente basados en procesos electrolíticos<sup>301,302,303</sup>, y los métodos volumétricos<sup>304,305,306</sup>, utilizando en muchos casos técnicas conductimétricas, potenciométricas, etc. También los métodos separativos, como los cromatográficos, han sido ampliamente utilizados, siendo los más numerosos los de cambio iónico<sup>307,308,309</sup> y la cromatografía líquida de alta resolución<sup>310,311,312</sup>.

De las técnicas espectroscópicas atómicas, la primera que se utilizó ampliamente fue la absorción atómica<sup>313,314,315</sup> en cualquiera de sus modalidades, necesitándose a veces procesos de extracción previa<sup>316</sup> o preconcentración. En los últimos años la técnica de emisión atómica ICP<sup>317,318</sup> ha sido ampliamente utilizada para la determinación de metales, entre ellos el Cu y el Zn.

Las determinaciones espectrofotométricas<sup>319</sup> y espectrofluorimétricas<sup>320,321</sup> son usualmente precedidas de una reacción con un reactivo cromogénico o fluorogénico. Aunque existen reactivos muy selectivos que forman complejos con el Cu, como la cuproína<sup>322</sup> o neocuproína<sup>323</sup>, la mayoría de los reactivos cromogénicos forman complejos con una gran cantidad de cationes metálicos, por lo que es muy difícil la determinación de mezclas por la existencia de grandes solapamientos en los espectros de absorción de los complejos formados. Para poder resolver mezclas de estos metales es necesario utilizar una calibración multivariante y un tratamiento de los datos por mínimos cuadrados parciales (PLS)<sup>324,325</sup>.

Uno de estos reactivos cromogénicos, muy utilizado en la determinación de Cu(II), Co(II), Ni(II) y Zn(II), es el Zincón (2-carboxi-2-hidroxi-5-sulfoformazilbenceno)<sup>326,327,328</sup>, que origina con estos metales complejos solubles en agua. Este reactivo ha sido el empleado en el sensor propuesto.



Las técnicas automáticas<sup>329,330,331,332</sup> de análisis por inyección en flujo (FIA) y análisis por inyección secuencial (SIA), así como la espectrofotometría en fase sólida<sup>333,334,335,336</sup> han sido aplicadas también a la determinación de estos metales, la mayoría de las veces utilizando diferentes reactivos cromogénicos, entre ellos el Zincón<sup>47,337</sup>.

Se ha propuesto un primer sensor para la determinación de Cu basándose en la medida de su absorbancia intrínseca<sup>62</sup>, y un segundo sensor con reacción derivadora mediante el uso de PAN<sup>66</sup>. Además de estos sensores se han encontrado en bibliografía otros tantos para la determinación de Zn<sup>84,338,339</sup> y Cu<sup>102</sup> por separado, utilizando diferentes soportes sólidos y distintos reactivos cromogénicos.

### **Vanadio**

Han sido descritos numerosos métodos de determinación de Vanadio, siendo los métodos de extracción<sup>340,341</sup>, gravimétricos<sup>342,343,344</sup> y volumétricos<sup>345,346</sup>, los primeros encontrados en bibliografía. También se han desarrollado métodos cinéticos<sup>347</sup>, por electroforesis capilar<sup>348,349</sup>, y electroquímicos<sup>350,351</sup>.

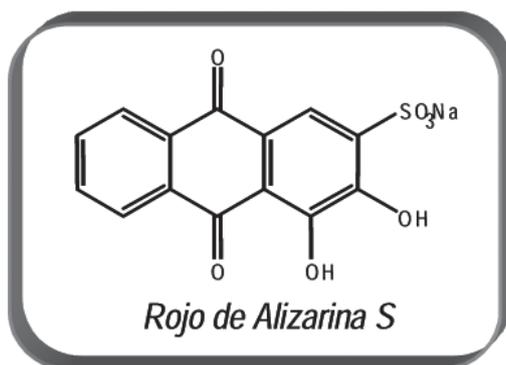
Las técnicas cromatográficas de HPLC<sup>352,353</sup> y cromatografía iónica<sup>354</sup> han sido ampliamente utilizadas en la determinación de metales, entre ellos el Vanadio. Las técnicas espectroscópicas atómicas ICP-masas<sup>355,356</sup>, absorción atómica<sup>357</sup>, etc., se han usado como sistemas de detección combinadas con otras técnicas. Las técnicas luminiscentes<sup>358,359,360</sup> utilizando diferentes reactivos también se han aplicado a la determinación de Vanadio en gran variedad de muestras reales.

La técnica más empleada es la espectroscopía molecular UV-visible, usando una gran variedad de reactivos, de los que destacan el método de la oxina<sup>361</sup>, del PAR<sup>362</sup> y del ácido tungstosfosovanádico<sup>363</sup>, los cuales tienen buena sensibilidad, pero escasa selectividad.

Los métodos automáticos de flujo, FIA<sup>364,365,366</sup> y SIA<sup>367</sup>, se pueden combinar con todos los sistemas de detección anteriores, aunque la sensibilidad obtenida no es muy elevada, por lo que a veces se requiere unos procesos previos de preconcentración<sup>368,369</sup>. La sensibilidad aumenta cuando se utiliza la espectroscopía en fase sólida (en modo batch), fundamentalmente empleando una reacción derivadora con multitud de reactivos cromogénicos, produciendo una preconcentración del vanadio sobre un soporte sólido<sup>370,371,372,373</sup>. Se trata de sistemas muy sensibles, pero con procedimientos lentos, ya que requieren de varias etapas. También han sido propuestos sensores espectroscópicos en flujo continuo<sup>374,375</sup>.

En esta Memoria se desarrolla un sensor espectrofluorimétrico con renovación de la superficie sensora basado en la reacción del Vanadio con el reactivo fluorogénico

ácido 1,2-dihydroxiantraquinona-3-sulfónico (Rojo de Alizarina S), previamente fijado en el soporte sólido. Este reactivo ha sido ampliamente utilizado como reactivo fotométrico<sup>376</sup> para multitud de metales, pero solo forma complejos fluorescentes con boro<sup>377</sup>, aluminio y galio<sup>378</sup>, niobio y molibdeno<sup>379</sup> y vanadio<sup>380</sup>, aunque la fluorescencia de estos complejos es tan débil en disolución acuosa que debe ser aumentada mediante la adición de surfactantes catiónicos.



### 4.3 Principios activos y vitaminas

#### *Ácido Ascórbico*

La determinación de Ácido Ascórbico en diferentes matrices se ha llevado a cabo con diversas técnicas analíticas, siendo las técnicas clásicas las primeras en utilizarse. Los métodos volumétricos se basan en las propiedades redox del ácido ascórbico, y por lo general emplean agentes oxidantes para oxidarlo a ácido deshidroascórbico. Existe gran cantidad de métodos yodométricos<sup>381,382</sup> con diferentes reactivos, aunque quizás el más popular sea el método que emplea el 2,6-diclorofenolindofenol<sup>383,384</sup> como reactivo valorante.

Las técnicas instrumentales más empleadas en la determinación de Ácido Ascórbico son las espectrofotométricas y HPLC. La mayoría de los métodos espectrofotométricos para la determinación de ácido ascórbico requieren una reacción derivadora, empleándose una gran variedad de reactivos<sup>385,386,387,388</sup>, sin embargo, la determinación de Ácido Ascórbico por medida directa de su absorbancia en la región UV es muy difícil de realizar, ya que normalmente se encuentra asociado a otras sustancias que también absorben en esta zona, por lo que las determinaciones de este tipo encontradas en bibliografía utilizan derivadas de segundo y tercer orden<sup>389</sup>. El problema de las interferencias se ha conseguido eliminar haciendo uso de reactivos que reaccionan selectivamente con el Ácido Ascórbico, originando productos coloreados. La mayoría de estos métodos están

basados en la capacidad reductora del ácido ascórbico<sup>390,391,392</sup>, sin embargo, estos métodos están sujetos a posibles interferentes que también posean dicha capacidad reductora, y que aparecen acompañándolo en matrices de diferente índole. También se ha propuesto un gran número de métodos para la determinación por HPLC<sup>393,394,395</sup> de Ácido Ascórbico total o Ascórbico/Deshidroascórbico en diferentes matrices, utilizando distintos sistemas de detección.

Se han descrito métodos espectrofluorimétricos<sup>396,397</sup>, obteniéndose mayor sensibilidad que con los métodos espectrofotométricos, y métodos electroquímicos, fundamentalmente polarográficos<sup>398</sup> y potenciométricos<sup>399</sup>, que ofrecen alta selectividad y facilidad operativa.

Los métodos automáticos de análisis también han sido ampliamente utilizados para la determinación de ácido ascórbico. Se han descrito métodos por inyección en flujo (FIA)<sup>400,401,402</sup> con diferentes sistemas de detección, así como sistemas de análisis por inyección secuencial (SIA)<sup>403</sup>, los cuales presentan ventajas como sencillez, rapidez, automatización, menor consumo de reactivos, etc.

Hay descritas algunas aplicaciones de la espectrofotometría en fase sólida (SPS) para la determinación de ácido ascórbico<sup>404,405</sup>, basadas en la formación de productos coloreados, incluida la medida directa de su absorción intrínseca UV<sup>406</sup>. En este caso, también han sido desarrollados sensores en flujo para su análisis<sup>407,408,133</sup>.

Uno de los reactivos empleados para el análisis de la vitamina C ha sido el Azul de Prusia<sup>409</sup>, utilizado también para el desarrollo de uno de los sensores que recoge esta Memoria. En los últimos años se han utilizado láminas o películas de Azul de Prusia para la determinación óptica de especies redox, basados en la reducción de esta película, originando su pérdida de color al formarse el producto reducido (Blanco de Prusia)<sup>410,411</sup>. Estas películas han sido aplicadas a la determinación de cisteína, peróxido de hidrógeno y ácido ascórbico en fármacos<sup>412</sup>. Aunque una de las ventajas de estas películas es que permiten la regeneración de la superficie sensora, la sensibilidad de estos métodos no es muy elevada.

### **Fenotiazinas**

Se han propuesto numerosos métodos para la determinación de Fenotiazinas en preparados farmacéuticos y orina: métodos volumétricos<sup>413,414</sup>, cinéticos<sup>415,416</sup>, cromatográficos, entre ellos HPLC<sup>417,418</sup> y cromatografía de gases<sup>419</sup>, electroforesis capilar<sup>420,421</sup>, etc.

Los más abundantes son los métodos espectrofotométricos<sup>422,423</sup> basados en la oxidación de las fenotiazinas en medio ácido para originar compuestos coloreados que presentan máximos de absorción entre 500 y 650 nm. Por tanto, debido a los

amplios solapamientos espectrales, las determinaciones de mezclas de fenotiazinas requieren una calibración multivariante mediante el método de mínimos cuadrados parciales (PLS)<sup>424</sup> y espectroscopía derivada, o el uso de métodos cinéticos<sup>425,426</sup>, aparte de las técnicas cromatográficas. Basándose en estas propiedades redox, ha sido posible el desarrollo de un sensor para el análisis de estas sustancias.

Otros métodos están basados en la espectrofluorimetría convencional<sup>427,428</sup>, espectroscopía UV<sup>429</sup> o complejación con verde de bromocresol<sup>430</sup>, pero en éstos se requieren tediosas preparaciones de muestra. A veces, se necesita aumentar la sensibilidad obtenida con estas técnicas, para lo cual se incluyen procesos previos de extracción en fase sólida<sup>431,432,433</sup>, lo cual complica el método.

Una técnica que minimiza el tiempo empleado en el tratamiento de las muestras y aumenta la frecuencia de muestreo es el FIA. Las fenotiazinas han sido analizadas con FIA mediante oxidación química<sup>434,435</sup> o fotoquímica<sup>436,437</sup>, y determinando su forma oxidada con detección fotométrica o fluorimétrica<sup>438</sup>. En otros sistemas se utiliza la detección quimioluminiscente<sup>439</sup>, Raman<sup>440</sup> o amperométrica<sup>441</sup>.

## V. Discusión conjunta de resultados

## **V. DISCUSIÓN CONJUNTA DE RESULTADOS**

Esta Memoria desarrolla diez sensores, con y sin renovación de la superficie sensora, incluyendo mono y biparámetro, para la determinación de analitos de interés medioambiental y farmacológico. En todos los casos, el trabajo experimental realizado sigue la misma metodología para la optimización de variables, calibración de los sensores, estudio de especies interferentes y aplicaciones. A continuación se muestra un resumen de los estudios realizados siguiendo ese mismo orden.

## 1. Reactivos e Instrumentación

## 1. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

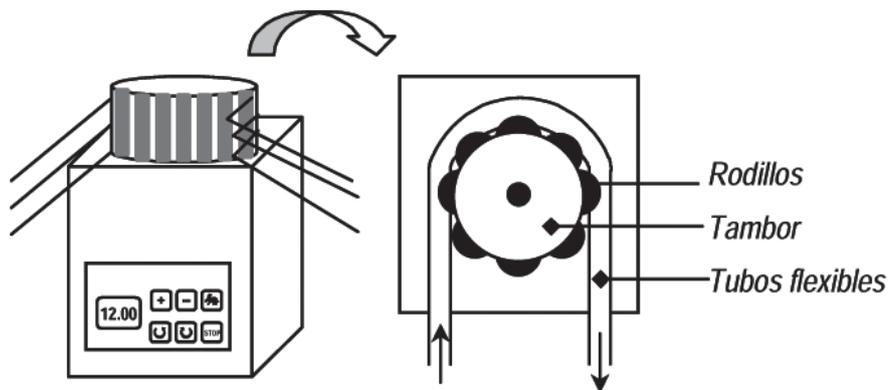
Para todos los experimentos realizados en esta Memoria se usaron reactivos de calidad "para análisis", disolventes puros y agua desionizada. Para la pesada de reactivos se emplearon precisiones de 0.1 mg y el material volumétrico para la preparación de disoluciones fue de vidrio clase A contrastado.

Las disoluciones estándar de los analitos fueron preparadas disolviendo una cantidad apropiada en agua desionizada. De todos los analitos, solo en el caso de los pesticidas se utilizó una mezcla de metanol-agua desionizada al 50% (v:v) para Tiabendazol y Warfarina, y para los cinco Compuestos Fenólicos se utilizó una mezcla metanol:agua desionizada al 10% (v:v). Los reactivos cromogénicos eran solubles en agua, a excepción del PAN, que se preparaba en una mezcla etanol:agua desionizada al 40% (v:v).

La instrumentación utilizada en los trabajos propuestos es la necesaria para la configuración de los sistemas FIA, además del material necesario para los sensores con renovación de la superficie sensora, en los que se combina la metodología FIA con el "Bead Injection". Estos componentes se muestran a continuación:

### ***Sistema de propulsión:***

Se usaron bombas peristálticas GILSON MINIPLUS 3, que constan de un tambor y una serie de rodillos que comprimen unos tubos flexibles de silicona a través de los que circula el flujo del sistema. Esta bomba tiene control de velocidad y proporciona un flujo libre de pulsos.

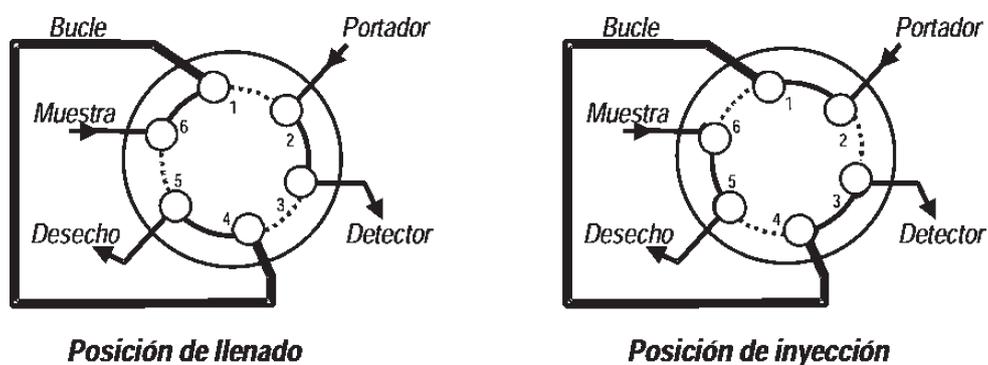


**Figura V.1.** Esquema de una bomba peristáltica, con detalle del tambor con los rodillos

### **Sistemas de inyección y selección:**

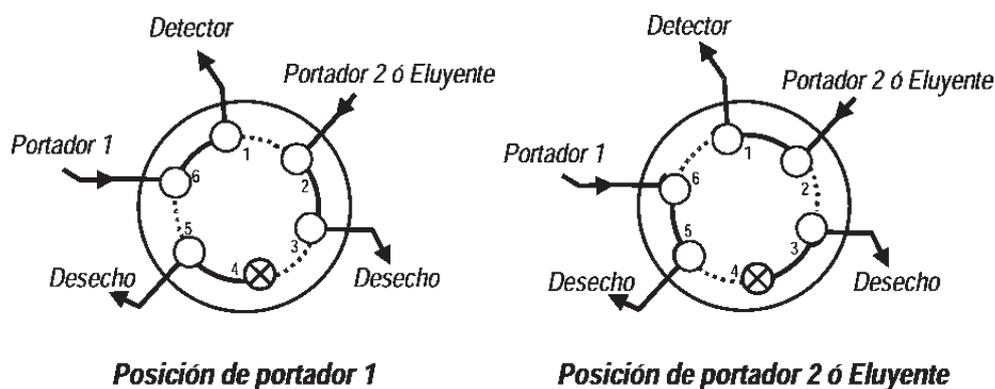
Se usaron válvulas rotatorias REODHYNE tipo 50, de seis vías. Las válvulas van conectadas de diferente forma según vayan a actuar como sistema de inserción de muestra o de partículas (válvula de inyección), o permitiendo la selección entre dos portadores, o la selección entre el llenado y el vaciado de partículas de la célula de medida (válvula de selección).

La válvula de inyección tiene dos posiciones, llenado e inyección. En la primera se llena el bucle de muestra o de suspensión homogénea de partículas, y en la segunda posición lo inserta en la corriente de portador.



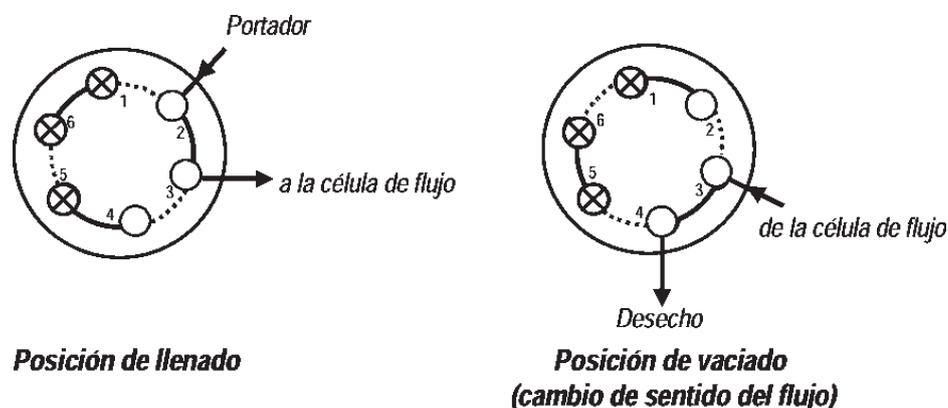
**Figura V.2.** Esquema de una válvula rotatoria conectada como válvula de inyección

La válvula rotatoria conectada como válvula de selección permite elegir entre las corrientes de portador y eluyente.



**Figura V.3.** Esquema de una válvula rotatoria conectada como válvula de selección

Esta última también permite, mediante un cambio en la dirección del flujo, la eliminación de partículas de la célula de medida hasta el desecho.



**Figura V.4.** Esquema de una válvula rotatoria conectada como válvula de selección para el vaciado de la célula de flujo

### **Sistema de transporte:**

En todas las configuraciones se usaron tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno como sistema de transporte. Las uniones se realizaron con conectores tipo OMNIFIT. Los tubos de bomba de silicona utilizados son de dos tipos, dependiendo del tipo de disolución portadora empleada. En la mayoría de los casos

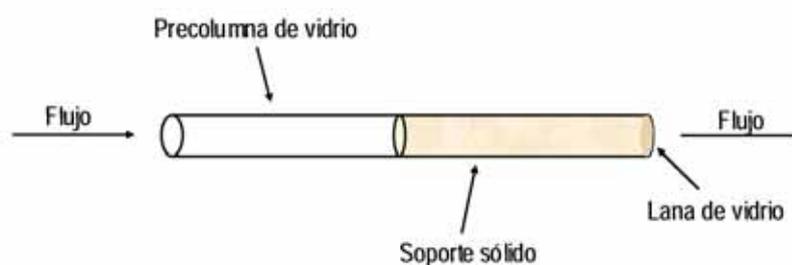
los portadores eran disoluciones acuosas, por lo que se utilizaron tubos KENDALL, de diámetro interno 0.051 pulgadas. Solo cuando se emplearon disolventes orgánicos (metanol) como portador se utilizaron tubos ELKAY, de mismo diámetro interno.

### ***Sistema de reacción:***

Al igual que en el sistema de transporte, los reactores utilizados cuando han sido necesarios han sido tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro, encontrándose en este caso enrollados en forma helicoidal.

### ***Separación de mezclas:***

En el sensor para la determinación de warfarina y tiabendazol se usó una precolumna empaquetada con un soporte sólido para la separación de los analitos en función de su cinética de retención/elución. Es una columna de vidrio, de 1 mm de diámetro interno y 5 cm de longitud.

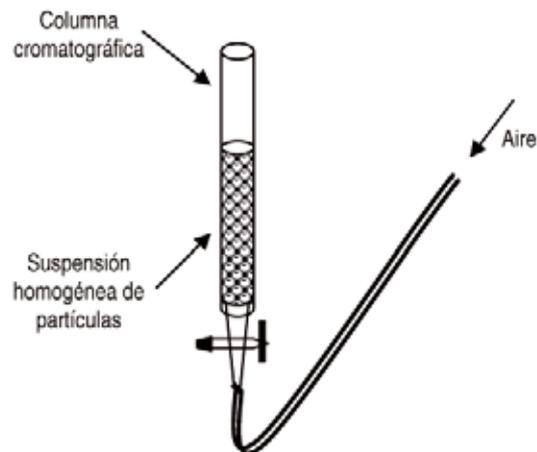


**Figura V.5.** Esquema de una precolumna de vidrio para la separación de mezclas de analitos

### ***Suspensión homogénea de partículas:***

En los sensores con renovación de la superficie sensora se utiliza la metodología "*Bead Injection*", necesitándose una suspensión homogénea del soporte sólido. Para su obtención se emplea una columna para cromatografía líquida a presión atmosférica de 16 mm de diámetro interno y 30 cm de longitud. En esta columna se introduce la mezcla de soporte sólido y disolución de reactivo, o en su caso agua desionizada, y se hace pasar constantemente con una corriente de aire. Esta

corriente se introduce por la parte inferior de la columna, originando burbujas que hacen que la mezcla esté en constante agitación.



**Figura V.6.** Esquema del sistema para la obtención de una suspensión homogénea de partículas

### **Sistema de detección:**

Los sensores de esta Memoria utilizan detección óptica, espectrofotométrica o espectrofluorimétrica. Las cubetas empleadas son células de flujo Hellma 138-QS y 138-OS para espectrofotometría y Hellma 176.052-QS para espectrofluorimetría. Estas cubetas se colocan dentro del compartimento de medida del sistema de detección correspondiente. Los esquemas y las características de estas células se muestran más adelante (*Capítulo V, apartado 4.1.1.*).

Los detectores empleados fueron los siguientes:

- a) Para los sensores con detección espectrofluorimétrica se emplearon dos equipos diferentes. Para el sensor de vanadio, un espectrofluorímetro Varian Eclipse, con lámpara de descarga de Xenón de 75 kW, monocromadores Czerny-Turner y dos detectores (referencia interna y muestra) mediante tubo fotomultiplicador R-928 sensible al rojo como estándar y con control del voltaje automático o manual mediante un software Cary-Eclipse para sistemas Windows 95/98/NT. Para los otros sensores fluorescentes, un

espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-50, equipado con una lámpara de descarga de Xenón (20 kW), monocromadores Monk-Gillieson y un contador de rodamina 101 para corregir los espectros de excitación, el cual estaba controlado por un ordenador Mitac MPC 3000F-386, programa FLDM V.2.50 (Perkin Elmer).

- b) Para los sensores con detección espectrofotométrica se empleó un espectrofotómetro UV-visible Perkin Elmer LAMBDA 2, controlado mediante un ordenador compatible 386, y el programa PECSS 4.2 de Perkin Elmer.

## 2. Estadudios preliminares. Espectros

## 2. ESTUDIOS PRELIMINARES. ESPECTROS

Para comenzar el desarrollo de cada sensor es necesario estudiar las características espectrales de los analitos o de los productos de reacción a los que se debe la señal analítica. Se realizaron los espectros de absorbancia o de luminiscencia, según el caso, para determinar las condiciones óptimas de trabajo.

### 2.1 Sensores monoparámetro

Se desarrollaron dos sensores monoparámetro sin renovación de la superficie sensora, uno con detección fluorescente para la determinación de Warfarina, y otro con detección espectrofotométrica para la determinación de cinco Compuestos Fenólicos. En estos casos se realizaron los espectros de los propios analitos, pues el respectivo sensor se basó en la medida de una propiedad intrínseca del analito (absorbancia o fluorescencia). De los cinco sensores monoparámetro con renovación de la superficie sensora desarrollados, cuatro implican detección espectrofotométrica y uno espectrofluorimétrica. Todos están basados formación de un producto derivado formado por reacción de los analitos con reactivos adecuados, por lo que se obtuvieron los espectros de los productos formados, como consecuencia de estas reacciones.

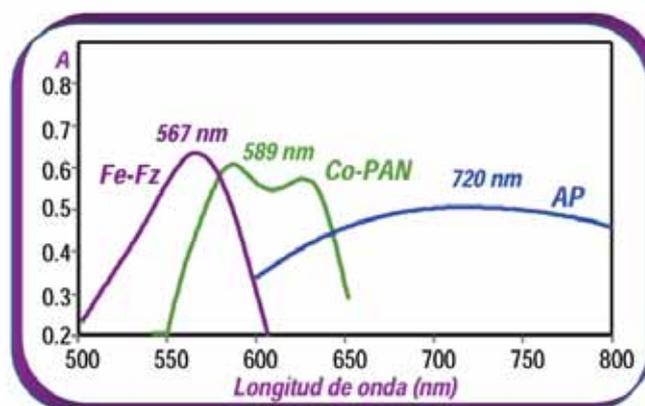
#### 2.1.1 Sensores monoparámetro espectrofotométricos

En los sensores para la determinación de **Fe(II)**, **Co(II)** y **Fenotiazinas** se realizaron los espectros de absorción, tanto en disolución como en fase sólida, de los complejos formados con reactivos cromogénicos. Para el Co(II) el reactivo cromogénico fue el PAN, registrándose los espectros del complejo Co-PAN. Para la determinación de Fe(II) y Fenotiazinas el producto final de las reacciones derivadoras fue el complejo aniónico Fe(II)-Ferrozina (Fe-Fz) (el caso de las Fenotiazinas está

basado en un proceso redox originándose este complejo como producto final). En todos los casos se utilizó una célula de flujo Hellma 138 OS, y las longitudes de onda de trabajo fueron las de máxima absorción obtenidas en fase sólida. En el sensor para la determinación de Co(II) la longitud de onda seleccionada fue 589 nm, produciéndose un aumento en la señal analítica, aproximadamente, diez veces mayor que la obtenida en disolución. La longitud de onda de máxima absorción cuando trabajamos en fase resina para el complejo Fe-Fz es de 567 nm, obteniéndose un aumento de sensibilidad en la determinación de Fe(II) de unas siete veces, al pasar de disolución a fase sólida.

Asimismo, se registró el espectro de absorción en disolución y en fase sólida del **Azul de Prusia**, que actúa como reactivo cromogénico en el sensor para la determinación de ácido ascórbico. En este caso, el estudio de las características espectrales se le realizó al propio reactivo, ya que la señal analítica es debida a éste, puesto que el fundamento de este sensor es la medida de la disminución que sufre la absorbancia cuando el Azul de Prusia oxida al ácido ascórbico originando Blanco de Prusia, que es incoloro. El máximo de absorción, trabajando en fase sólida aparece a 720 nm, y el aumento en la señal analítica en resina respecto a disolución es del orden de unas diez veces.

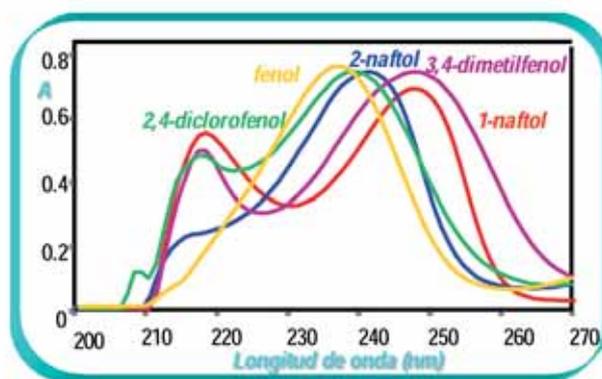
Los resultados de todos los espectros comentados en fase sólida se muestran en la *Figura V.7*.



**Figura V.7** Espectros de absorción en fase sólida del Azul de Prusia (AP) y de los complejos formados entre Fe(II) y Ferrozina (Fe-Fz), y entre Co(II) y PAN (Co-PAN)

En el caso de la determinación de los **cinco Compuestos Fenólicos** se realizaron los espectros de absorción de estos analitos, tanto en disolución como en fase sólida, usando una célula de flujo Hellma 138-QS, seleccionándose como longitudes

de onda de trabajo las de máxima absorción en fase sólida, que son 237 nm para el fenol, 247 nm para 1-naftol y 2,4-diclorofenol y 242 nm para el 2-naftol y 3,4-dimetilfenol. El aumento de sensibilidad que se produce en todos los casos, a igualdad de concentración, es del orden de 10 veces cuando se usa el sistema sensor con respecto a la espectrofotometría convencional en disolución.



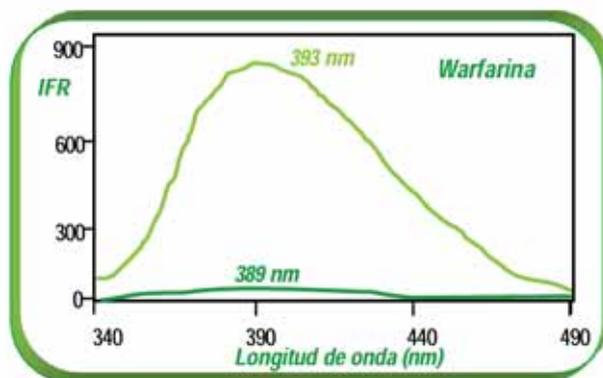
**Figura V.8.** Espectros de absorción en fase sólida de fenol ( $10 \frac{1}{4} \text{g ml}^{-1}$ ), 1-naftol ( $10 \frac{1}{4} \text{g ml}^{-1}$ ), 2-naftol ( $10 \frac{1}{4} \text{g ml}^{-1}$ ), 3,4-dimetilfenol ( $50 \frac{1}{4} \text{g ml}^{-1}$ ) y 2,4-diclorofenol ( $50 \frac{1}{4} \text{g ml}^{-1}$ )

En todos los casos anteriores se cumple que existe un efecto batocrómico en fase sólida respecto a disolución, lo que puede atribuirse a la diferencia del ambiente químico del entorno de los analitos retenidos en el soporte, con respecto a disolución.

### 2.1.2 Sensores monoparámetro espectrofluorimétricos

El sensor sin renovación de la superficie sensora para la determinación de **Warfarina** utiliza detección luminiscente, por lo que se registraron los espectros bidimensionales, es decir, los espectros de excitación y de emisión, tanto en disolución como en fase sólida a  $\text{pH}=10$ , que es el  $\text{pH}$  óptimo para el desarrollo del sensor. Estos espectros son una representación gráfica de la IFR frente a la longitud de onda (nm). Para poder comparar los espectros obtenidos en disolución con los obtenidos en fase sólida, se registraron ambos haciendo uso de la célula de flujo Hellma 176.052-QS observándose el aumento de sensibilidad que se produce al pasar de espectrofluorimetría convencional a espectrofluorimetría en fase sólida, siendo este aumento del orden de unas 25 veces, debido a la preconcentración de la Warfarina en el soporte sólido (Figura V.9.). Las longitudes de onda de excitación y de emisión que proporcionan un máximo en la intensidad de fluorescencia relativa

en fase sólida son 312 nm y 393 nm, respectivamente, por lo que se seleccionan como longitudes de onda óptimas de trabajo.

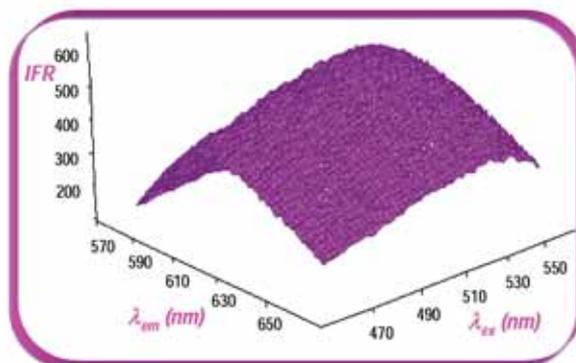


**Figura V.9.** Espectros de emisión en fase sólida y en disolución de Warfarina a una concentración de  $4 \frac{1}{4} \text{g ml}^{-1}$  ( $I_{\text{ex}}=312 \text{ nm}$ ,  $V_{\text{iny}}=100 \frac{1}{4} \text{l}$ )

Comparando los máximos de los espectros de excitación y de emisión en disolución y en fase sólida se observa un efecto batocrómico de los segundos respecto de los primeros (en disolución los máximos de excitación y emisión son 309 y 389 nm, respectivamente). Esto también puede atribuirse a la diferencia en el ambiente químico que rodea al analito cuando está fijo en la resina, con respecto a cuando está en disolución.

El segundo sensor monoparámetro con detección espectrofluorimétrica permite la determinación de **Vanadio**. Para obtener una descripción completa de las características fluorescentes del complejo formado entre el vanadio y el reactivo fluorogénico, Rojo de Alizarina S (RAS), se realizaron los espectros bidimensionales en disolución y en fase sólida, además de los espectros de luminiscencia total.

Un espectro de luminiscencia total consiste en un espectro tridimensional que representa la intensidad relativa de fluorescencia frente a las longitudes de onda de excitación y de emisión, permitiendo determinar los máximos con una gran precisión.



**Figura V.10.** Espectros de luminiscencia total del complejo Vanadio-Rojo de Alizarina S

Las posiciones de los máximos de excitación y emisión para el complejo V-RAS son 521nm y 617nm, respectivamente. Estas serán las longitudes de onda seleccionadas para el trabajo.

Al comparar los espectros en disolución y en fase sólida, realizados en la misma célula de flujo y a las mismas condiciones de trabajo, se observa que se produce un aumento de sensibilidad de unas 4000 veces, debido a que la formación del complejo fluorescente en disolución está poco favorecida, necesitándose surfactantes catiónicos para aumentar la sensibilidad. Sin embargo, el uso de una fase sólida consigue la preconcentración del complejo en la resina, produciendo un notable aumento de sensibilidad, permitiendo la determinación fluorescente de vanadio sin necesidad de la utilización de surfactantes para su detección.

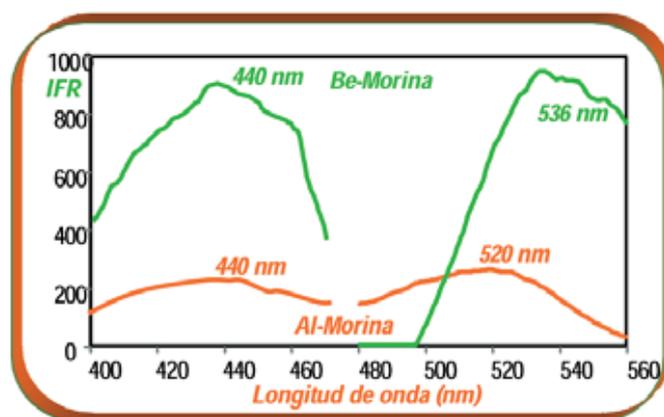
## 2.2 Sensores biparámetro

Se desarrollan tres sensores biparámetro, dos con detección espectrofluorimétrica y uno con detección espectrofotométrica. Dos de éstos son sensores con renovación de la superficie sensora, y se basan en la reacción de los dos analitos con reactivos cromogénicos o fluorogénicos, por lo que se estudiaron las características espectrales de los complejos formados, productos de la reacción con estos reactivos. El tercer sensor, sin renovación de superficie sensora, se resuelve con el uso de una precolumna empaquetada, también con soporte sólido, que permite que los analitos lleguen secuencialmente a la zona de detección en donde se mide la fluorescencia nativa. En este caso se realizaron los espectros de los propios analitos.

### 2.2.1. Sensores biparámetro espectrofluorimétricos

De estos dos sensores, solo uno, (determinación de **Be(II)-Al(III)**) está basado en la reacción de los analitos con un reactivo fluorogénico (Morina), por lo que se realizarán los espectros bidimensionales (excitación y emisión) de los complejos formados con los dos metales. Dichos espectros se realizaron a los pHs de trabajo, ya que la determinación de los dos metales es secuencial: la resolución de la mezcla se consigue usando dos portadores a dos pHs distintos y realizando dos inyecciones.

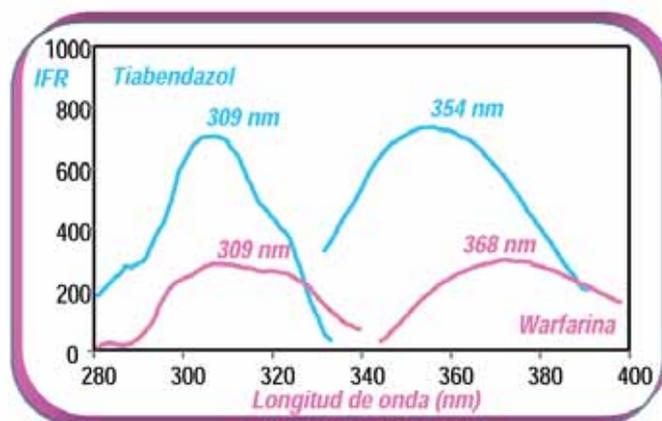
Se registraron los espectros en disolución y en fase sólida, y al compararlos, se observa un aumento de sensibilidad de 20 y 3 veces para el Be(II) y el Al(III), respectivamente, como resultado de la preconcentración de los analitos en el soporte sólido, y un efecto batocrómico en las longitudes de onda de los máximos, tanto de excitación como de emisión para los dos analitos. Se observa un gran solapamiento en los espectros en disolución de ambos complejos, lo que imposibilita la resolución de esta mezcla por espectrofluorimetría convencional. Las longitudes de onda máximas de excitación y emisión, trabajando en resina, fueron 440 nm y 520 nm para el Al(III) (a pH 6) y 440 nm y 536 nm para el Be(II) (a pH 12), respectivamente. Para la determinación secuencial de ambos analitos se seleccionan como longitudes de onda de trabajo 440 nm para la excitación y 520 nm para la emisión, que son las de los máximos del complejo de Al(III), debido a su menor sensibilidad.



**Figura V.11.** Espectros de excitación y emisión en fase sólida de los complejos de Be(II) y Al(III). [Be(II)] = 6 ng ml<sup>-1</sup>; [Al(III)] = 1 ¼g ml<sup>-1</sup>, [Morina] = 2 ¼g ml<sup>-1</sup>; V<sub>iny</sub> = 600 ¼l

Para el sensor de **Warfarina y Tiabendazol** se registraron los espectros de excitación y de emisión, en disolución y en fase sólida, de los dos analitos. Esta mezcla se resuelve mediante el uso de una precolumna empaquetada con el mismo soporte sólido de la célula de medida, que permite, mediante el uso de dos disoluciones de portador/eluyente, que los analitos lleguen secuencialmente a la zona sensora. Esto ocurre debido a un comportamiento diferencial en el proceso de fijación-elución de los analitos. Con una disolución de portador adecuada se consigue que la Warfarina se retenga en la precolumna, debido a su cinética de retención/elución más lenta, y el Tiabendazol pasa directamente hacia la zona de detección.

Los espectros de los analitos fijados en el soporte sólido muestran un máximo de excitación a 309 nm para los dos analitos y un máximo de emisión a 368 nm y 354 nm para Warfarina y Tiabendazol, respectivamente, eligiéndose para el desarrollo del sensor las de los máximos correspondientes a la Warfarina, ya que la sensibilidad para la Warfarina es mucho menor que para el Tiabendazol (unas 40 veces). Al igual que en el sistema anterior, existe un gran solapamiento espectral para los dos analitos en disolución acuosa, por lo que no se podría resolver la mezcla mediante espectralfluorimetría convencional en disolución.



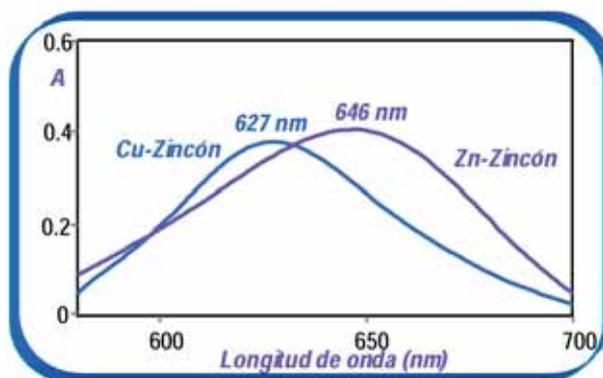
**Figura V.12.** Espectros de excitación y emisión en fase sólida de Tiabendazol y Warfarina; [Tiabendazol] = 0.2  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; [Warfarina] = 20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; V<sub>iny</sub> = 600  $\mu$ l

Como resultado de la preconcentración de los analitos en el soporte sólido, la intensidad relativa de fluorescencia es, aproximadamente, siete y dos veces mayor que la obtenida usando un sistema convencional en disolución, para Tiabendazol y Warfarina, respectivamente (en las mismas condiciones de trabajo).

### 2.2.2 Sensor biparámetro espectrofotométrico

El último de los sensores biparámetro desarrollado utiliza detección espectrofotométrica, y se trata de un sensor con renovación de la superficie sensora para la determinación de **Cu(II)-Zn(II)**. Se basa en la reacción de estos metales con un reactivo cromogénico, Zincón, por lo que se realizaron los espectros de absorción, tanto en disolución como en fase sólida, de los complejos formados con este reactivo. La determinación es secuencial, mediante el uso de dos disoluciones portadoras a dos valores de pH, por lo que se realizaron los espectros a estos pHs de trabajo.

Al comparar los espectros realizados en disolución y en fase sólida se observa un efecto batocrómico en las longitudes de onda de los máximos y un aumento de sensibilidad de unas 9 veces para ambos analitos, debido a la preconcentración de éstos en el soporte. Las longitudes de onda de absorción máximas de los complejos fijados en el soporte sólido, utilizando una disolución de portador de pH 11, fueron 627 nm para Cu(II) y 646 nm para Zn(II), siendo en disolución 624 y 636 nm, respectivamente. Para la determinación secuencial de ambos analitos se seleccionó como longitud de onda de trabajo la del máximo del complejo de Cu(II) a este pH, 627 nm, ya que su sensibilidad es menor.



**Figura V.13.** Espectros de absorción en fase sólida de los complejos formados entre los metales Cu(II) y Zn(II) y el reactivo cromogénico Zincón

Esta determinación tampoco sería posible mediante espectrofotometría convencional en disolución debido al amplio solapamiento espectral.

### 3. Configuración del sistema

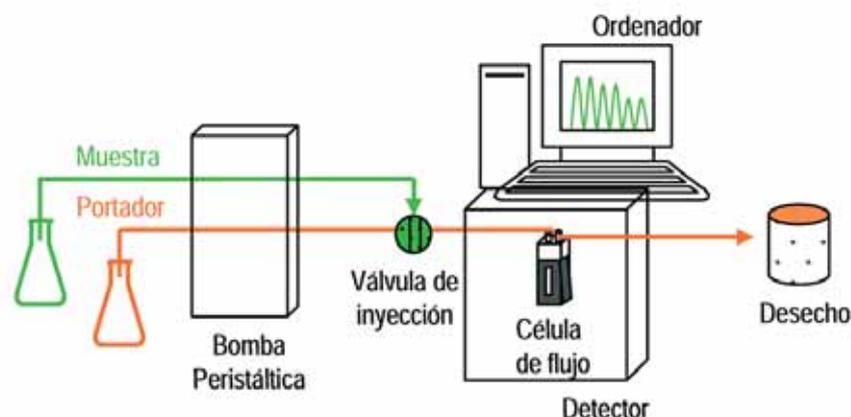
### 3. CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA

Los trabajos desarrollados en esta Memoria implican la integración de la espectroscopía en fase sólida con un sistema en flujo continuo. La configuración del sistema en cada uno de los casos vendrá determinada: a) por el tipo de sensor, es decir si se trata de un sensor con o sin renovación de la superficie sensora; b) por la existencia o no de reacciones derivadoras; c) por la naturaleza del proceso de elución.

#### 3.1 Sensores monoparámetro

En los sensores monoparámetro sin renovación de la superficie sensora, se empleó una sencilla configuración monocanal, en la que el analito se inyecta en la corriente de portador que lo pone en contacto con la microzona activa del sensor (*Figura V.14.*). Cuando el final del bolo de muestra alcanza la zona de detección y la señal analítica su valor máximo, el portador, a su vez, actúa como eluyente de forma rápida y efectiva, regenerando la zona sensora, lo que hace reutilizable el sensor que quedaría así dispuesto para la siguiente inyección de muestra.

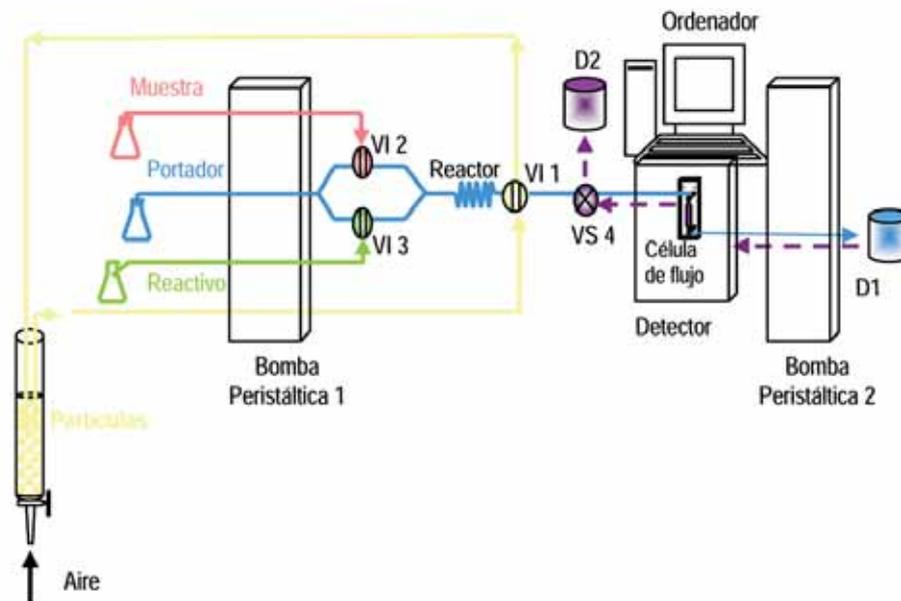
El sensor para la determinación de **Warfarina** emplea detección espectrofluorimétrica siendo el portador una disolución de NaCl 0.25 M a pH 10. En el caso del sensor para la determinación de **cinco Compuestos Fenólicos** el portador es una disolución de KCl 0.10 M a pH 12, y utiliza esta misma configuración, pero con detección espectrofotométrica.



**Figura V.14.** Configuración FIA de los sensores monoparámetro sin renovación de superficie sensora para la determinación de Warfarina y Compuestos Fenólicos

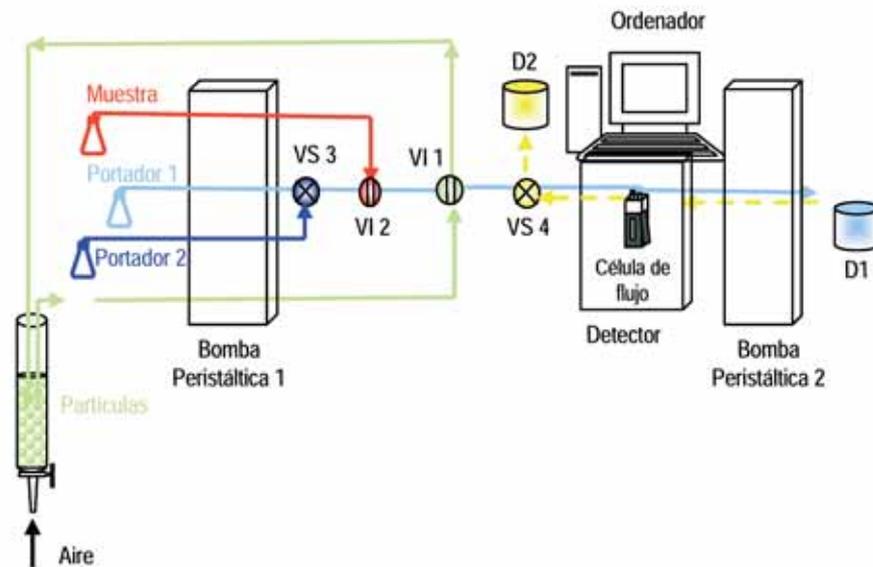
En los sensores monoparámetro en los que los analitos, o los productos de reacción de éstos, quedan tan fuertemente retenidos en el soporte sólido que no es posible la regeneración del sensor, se utiliza la metodología BIS-FIA para el desarrollo de sensores con renovación de la superficie sensora. Consiste en la inyección en el flujo del portador de un volumen exacto de una suspensión homogénea de las partículas del soporte sólido. Este soporte se empaqueta en la célula de flujo, y una vez desarrollada la señal analítica, mediante un cambio en el sentido del flujo, se produce el vaciado de la célula y la eliminación de las partículas hasta el desecho. Este soporte sólido puede llevar fijado el reactivo cromogénico o fluorogénico (son los casos en los que se integra la reacción-retención-detección), o el reactivo puede ser inyectado y reaccionar previamente con el analito *on line*, antes de su llegada a la zona de detección. Siguiendo esta metodología se han desarrollado cinco sensores, de los cuales cuatro tienen detección espectrofotométrica y uno detección espectrofluorimétrica. Dependiendo del sensor las configuraciones pueden variar.

En el sensor para la determinación de **Fe(II)**, la fase sólida que se inyecta en el sistema lleva el reactivo cromogénico fijo (Ferrozina), siendo el portador agua desionizada. Este sensor (*Figura V.15.*) también permite: (1) la determinación de **Fe total**, mediante una reducción previa del Fe(III) a Fe(II) con un agente reductor, el ácido ascórbico, y (2) la determinación indirecta de **ácido ascórbico**. Para la determinación de Fe(II) no es necesario el canal del reactivo (VI 3), ni el reactor. Para el análisis de Fe total, la disolución reactiva sería el ácido ascórbico, mientras que para el análisis indirecto de ácido ascórbico esta disolución reactiva sería una disolución de Fe(III).



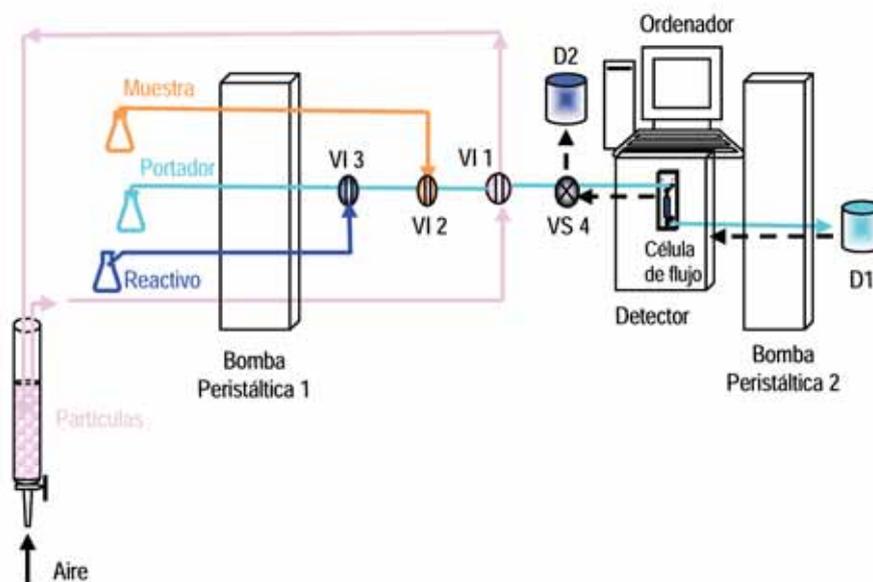
**Figura V.15.** Configuración FIA del sensor monoparámetro con renovación de superficie sensora para la determinación de Fe(II), Fe total y ácido ascórbico. VI 1, VI 2, VI 3: Válvulas de inyección; VS 4: Válvula de selección; D1, D2: Desechos

En el caso de la determinación de **Co(II)**, el reactivo cromogénico (PAN) también se fija previamente en la resina, y la disolución que actúa como portadora es pirofosfato 0.1 M a pH 5. Esta misma configuración (*Figura V.16.*) se usa en el sensor para la determinación de **V(V)**, cuyo reactivo fluorogénico es el Rojo de Alizarina S (también previamente fijado en el soporte sólido), y la disolución portadora es KCl 0.15 M a pH 7.5. La única diferencia es que la célula de flujo empleada en este último caso es una célula Hellma 176.052 QS, debido a que utiliza detección fluorimétrica.



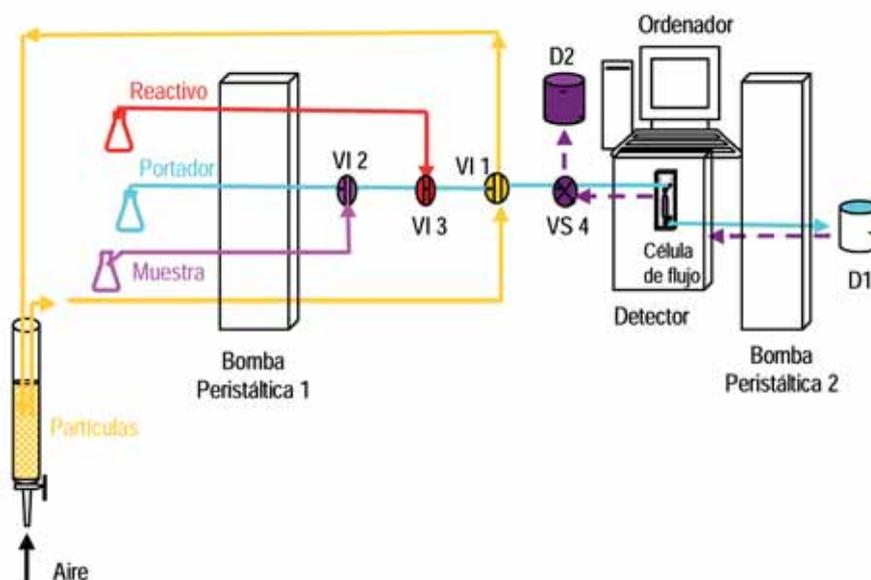
**Figura V.16.** Configuración FIA de los sensores monoparámetro con renovación de superficie sensora para la determinación de  $\text{Co(II)}$  y  $\text{V(V)}$ . VI 1, VI 2: Válvulas de inyección; VS 3: Válvula de selección; D1, D2: Desechos

Para los dos sensores monoparámetro restantes se emplean configuraciones algo más complejas que la anterior, ya que hay que introducir en el sistema una nueva válvula de inyección. En el sensor para la determinación de **Ácido Ascórbico** (Figura V.17.) el reactivo cromogénico (Azul de Prusia) se inyecta en el flujo del portador, una disolución de  $\text{NaCl}$  0.4 M a pH 5, fijándose en la resina que empaqueta la célula de medida, la cual ha sido previamente inyectada en el mismo canal de portador.



**Figura V.17.** Configuración FIA del sensor monoparámetro con renovación de superficie sensora para la determinación de Ácido Ascórbico. VI 1, VI 2, VI 3: Válvulas de inyección; VS 4: Válvula de selección; D1, D2: Desechos

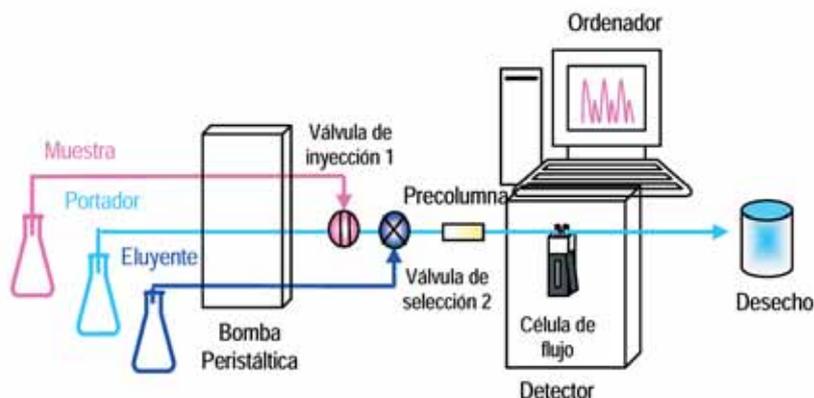
En el sensor para la determinación de **Fenotiazinas** (Figura V.18.), el reactivo cromogénico (Ferrozina) reacciona con el Fe(II) generado como consecuencia de la reacción redox entre el analito y la disolución portadora (que posee Fe(III)). Por consiguiente, el reactivo se inyectará en la parte final del proceso, con objeto de generar y retener el complejo formado. El complejo coloreado se forma *on line*, antes de la llegada del analito a la zona de detección, fijándose y preconcentrándose en la resina de la célula de medida, que también ha sido inyectada previamente en el flujo de portador, que es una disolución de  $1.79 \times 10^{-3}$  M de Fe(III) y 0.10 M de NaCl a pH 1.



**Figura V.18.** Configuración FIA del sensor monoparámetro con renovación de superficie sensora para la determinación de Fenotiazinas. VI 1, VI 2, VI 3: Válvulas de inyección; VS 4: Válvula de selección; D1, D2: Desechos

### 3.2 Sensores biparámetro

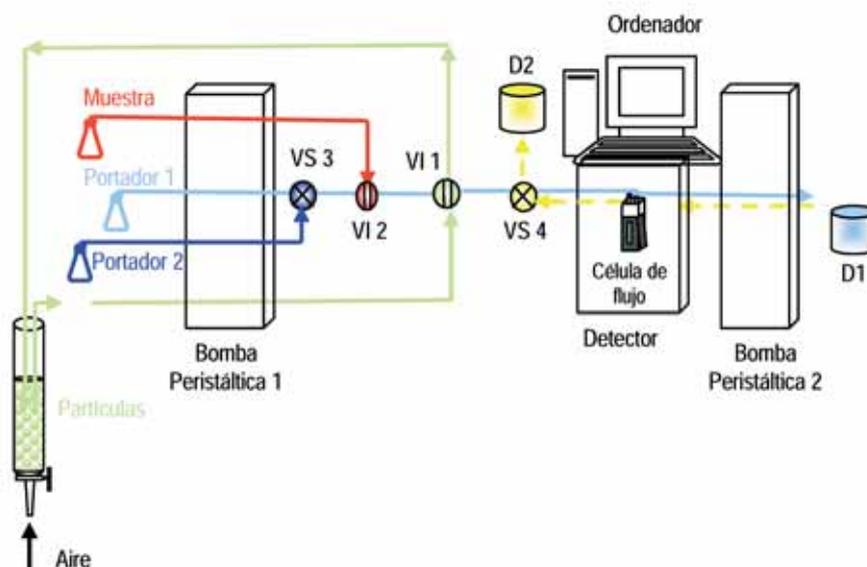
De los tres sensores biparámetro solo uno de ellos tiene una sencilla configuración FIA monocanal (*Figura V.19.*), el caso del sensor para la determinación simultánea de los pesticidas **Warfarina-Tiabendazol**, con detección espectrofluorimétrica. En éste, se utiliza una precolumna empaquetada con el mismo soporte sólido que la célula de medida, gracias a la cual se permite la retención transitoria de uno de los analitos permitiendo el paso y determinación del otro. Una disolución de metanol:agua desionizada al 30 % (v:v) actúa como portador y eluyente del tiabendazol, cuya cinética de retención/elución es más rápida, por lo que este analito pasa a través de la precolumna sin apenas retenerse llegando así a la zona sensora y originando la señal analítica correspondiente, mientras que la warfarina se retiene fuertemente en la precolumna. Una vez eluido el tiabendazol de la zona sensora (por el propio portador), se gira la válvula de selección 2, y se selecciona el eluyente (una disolución de metanol:agua desionizada al 50% (v:v)), permitiendo la elución de la warfarina de la precolumna y transportándola hasta la zona de detección, donde esta disolución también actúa como eluyente en la célula de flujo originando así otra señal transitoria correspondiente, esta vez, sólo a la warfarina.



**Figura V.19.** Configuración FIA del sensor biparámetro sin renovación de superficie sensora para la determinación de Warfarina y Tiabendazol

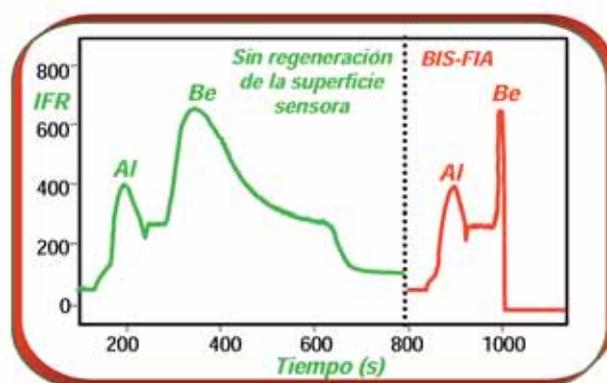
Los otros dos sensores biparámetro son sensores con renovación de superficie sensora. Uno utiliza detección espectrofluorimétrica y el otro espectrofotométrica.

En el sensor con detección espectrofluorimétrica para la determinación de **Be(II)-Al(III)** (Figura V.20.), la muestra se inyecta, mediante la válvula de inyección 2, en la corriente del portador 1 (NaCl 0.5 M a pH 6), que la pone en contacto con el soporte sólido en el que previamente se ha fijado el reactivo fluorogénico (Morina). Este portador permite la reacción y retención selectiva del Al(III), produciendo a su vez la elución del mismo. A continuación se gira la válvula de selección 3, y tras una nueva inyección de muestra sobre el portador 2 (NaCl 0.3 M a pH 12) se consigue la reacción y detección selectiva del Be(II) sobre la zona sensora. Por tanto, el sensor opera secuencialmente (requiere dos inyecciones sucesivas para determinar dos analitos), usando dos portadores diferentes.



**Figura V.20.** Configuración FIA del sensor biparámetro con renovación de superficie sensora para la determinación de Be(II)-Al(III). VI 1, VI 2, VI 3: Válvulas de inyección; VS 4: Válvula de selección; D1, D2: Desechos

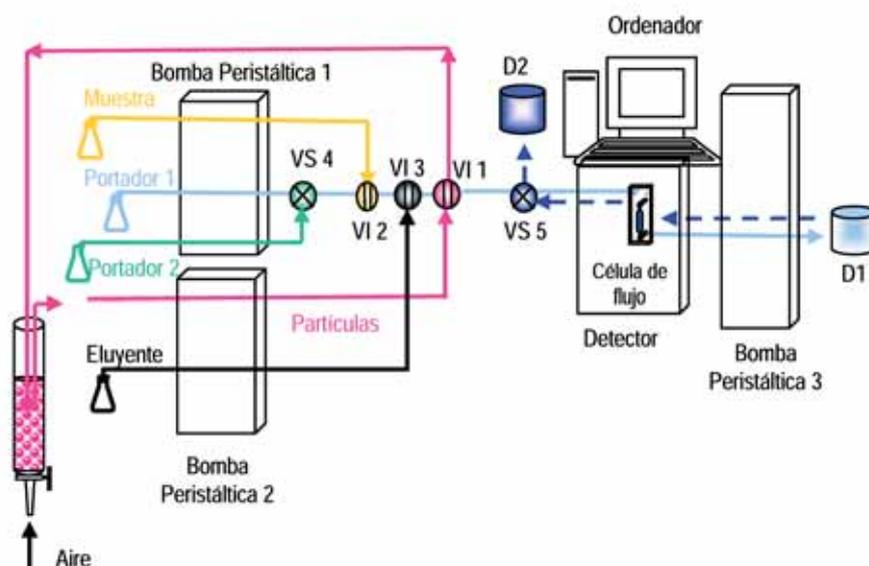
La elución del Be(II) con este portador 2 es muy lenta y, además, el cambio de pH no permite la regeneración completa de la superficie sensora, por lo que se recurre a la metodología BIS-FIA para la renovación de la misma. (Figura V. 21.).



**Figura V.21.** Comparación entre la metodología sin y con renovación de la superficie sensora. [Be(II)] = 3 ng ml<sup>-1</sup>; [Al(III)] = 1 µg ml<sup>-1</sup>; V<sub>iny</sub> = 600 µl

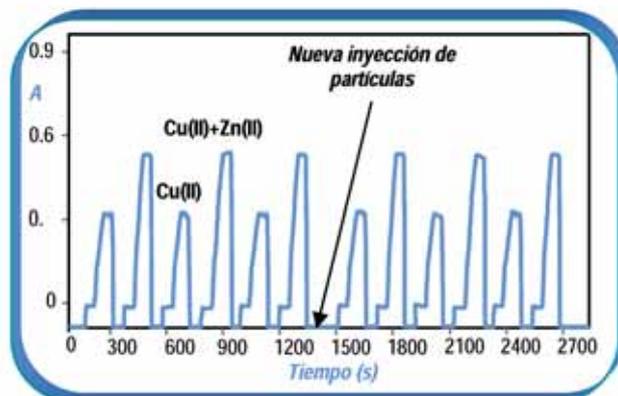
El sensor con detección espectrofotométrica para la determinación de **Cu(II)-Zn(II)** también opera secuencialmente usando dos portadores diferentes. La muestra, que contiene Cu(II) y Zn(II) (Figura V.22.), se inyecta (VI 2) en la corriente

de portador 1 (agua desionizada, pH 5.9), que la transporta hasta el soporte sólido, en el que previamente se ha fijado el reactivo cromogénico Zincón. Con este portador solo el Cu(II) reacciona con el Zincón reteniéndose en la resina, por lo que la absorbancia medida se debe solo al Cu(II). Para descomponer el complejo se inyectan 600 ml de una disolución 2 M de HCl (VI 3), que actúa como eluyente. A continuación se gira la válvula de selección 4, y tras una nueva inyección de muestra (VI 2) en la corriente del portador 2 (NaOH a pH 11), ambos analitos reaccionan con el Zincón retenido en el soporte obteniéndose así una señal analítica que es la suma de las absorbancias de ambos metales complejados. Seguidamente, sería necesario realizar otra nueva inyección de eluyente para descomponer ambos complejos. Sin embargo, tras realizar tres análisis sucesivos, la superficie sensora no se regenera completamente. Será necesario por tanto un cambio en el sentido del flujo para desechar el soporte sólido de la célula de medida (VS 5), renovando así la superficie sensora mediante la inyección de un nuevo lote de soporte sólido.



**Figura V.22.** Configuración FIA del sensor biparámetro con renovación de superficie sensora para la determinación de Cu(II) y Zn(II). VI 1, VI 2, VI 3: Válvulas de inyección; VS 4, VS 5: Válvulas de selección; D1, D2: Desechos

La *Figura V.23.* muestra un ejemplo de un diagrama de la determinación de Cu(II) y Zn(II) con el sensor biparámetro propuesto.



**Figura V.23.** Diagrama de seis determinaciones de muestra mediante el sensor biparámetro con renovación de superficie sensora para Cu(II) y Zn(II).  $[Cu(II)] = 0.6 \mu g ml^{-1}$ ,  $[Zn(II)] = 1 \mu g ml^{-1}$ .  $V_{iny} = 1000 \mu l$ .

## 4. Variables Experimentales

## 4. VARIABLES EXPERIMENTALES

Para optimizar estos sensores espectroscópicos en flujo continuo se estudian una serie de variables experimentales que se clasifican en cuatro grupos fundamentales:

- Variables de la unidad de retención-detección
- Variables químicas
- Variables FIA
- Variables instrumentales

### 4.1 Variables de la unidad de retención-detección

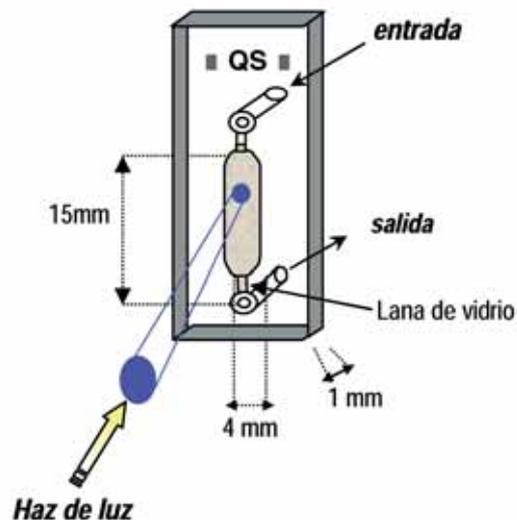
En este punto se estudian las características de la célula de flujo, la naturaleza del soporte sólido y el nivel de éste en la célula de medida.

#### 4.1.1 Características de la célula de flujo

En la célula de flujo, hay que tener en cuenta tanto el camino óptico como el depósito interno de la misma. El camino óptico no debe ser muy grande para evitar que la señal de la línea base (absorbancia o IFR del soporte sólido) sea demasiado alta. Además, cantidades grandes de soporte sólido en el depósito interno de la célula puede producir una disminución de la señal y un aumento del tiempo de elución, por lo que este depósito debe ser lo menor posible para incrementar la sensibilidad.

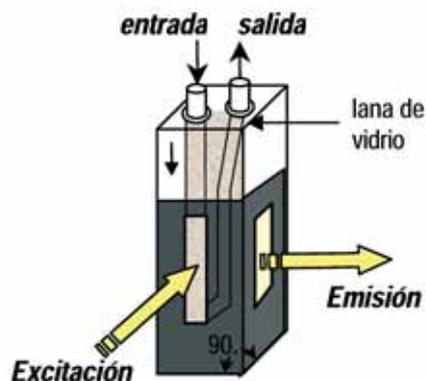
La célula de medida que se emplea depende del sistema de detección. Para la *detección espectrofotométrica* se emplea una célula de flujo de 1 mm de paso de

luz y un depósito interno de 50  $\mu$ l. En el sensor para la determinación de Compuestos Fenólicos se emplea una célula **Hellma 138-QS**, de cuarzo, puesto que trabajamos en la zona UV del espectro. En el resto de los sensores espectrofotométricos se emplea una célula de vidrio **Hellma 138-OS**, ya que en estos casos la detección es en la zona del visible (Ver *Figura V.24.*).



**Figura V.24.** Esquema de una célula de flujo Hellma 138-QS (cuarzo) o Hellma 138-OS (vidrio)

Para los sensores con *detección espectrofluorimétrica* la célula empleada tiene forma de prisma rectangular de base cuadrada, permitiendo la emisión en un ángulo de  $90^\circ$  respecto a la excitación incidente. Es una célula de cuarzo **Hellma 176.052 QS** de 1.5 mm de paso óptico y un volumen interno de 25  $\mu$ l (Ver *Figura V.25.*).



**Figura V.25.** Esquema de una célula de flujo Hellma 176.052-QS (cuarzo)

#### 4.1.2 Naturaleza del soporte sensor

El punto de partida en espectroscopía en fase sólida es la elección de un soporte adecuado donde fijar el sistema. Para la elección de este soporte hay que considerar la naturaleza química de los analitos, reactivos o productos de reacción que vayamos a fijar en él, además de la transparencia del soporte sólido en la zona del espectro en la que se trabaje, ya que no debe originarse una línea base demasiado alta.

Respecto a la estructura química de los analitos, los de naturaleza iónica, son susceptibles de ser retenidos en resinas de intercambio iónico. Se probaron resinas de ácido y base débil y fuerte, obteniendo en la mayoría de los casos mejores resultados con las resinas iónicas tipo Sephadex, ya que las resinas Dowex son poco transparentes en la zona UV del espectro. Solo en un caso se empleó un cambiador iónico tipo Dowex, en la determinación de Cobalto, puesto que la detección era en la zona del visible.

En los sensores en los que se fijaba previamente el reactivo cromogénico o fluorogénico en el soporte sólido hubo que considerar, además de la naturaleza química del propio reactivo, la estructura y naturaleza iónica del producto de la reacción, en la mayoría de los casos, quelatos metálicos.

También se empleó un gel de adsorción en el sensor biparámetro para la determinación de Warfarina y Tiabendazol, silicagel C<sub>18</sub>, de tamaño de partícula comprendido entre 55-105  $\mu$ m. En este caso se seleccionó este soporte porque permitía la retención transitoria de ambos analitos, factor que influyó más que la naturaleza de los propios analitos. En este sensor también se utilizó una **precolumna** empaquetada con soporte sólido que permitía la retención secuencial de los analitos y la discriminación en el tiempo de llegada de los analitos a la célula de medida, mediante el uso de portadores adecuados. Puesto que los analitos retenidos en esta precolumna también deben ser retenidos en el soporte sensor, se empleó para empaquetar la precolumna el mismo soporte que se usó en el sensor, es decir, silicagel C<sub>18</sub>.

A continuación se muestran los soportes sólidos empleados en cada sensor:

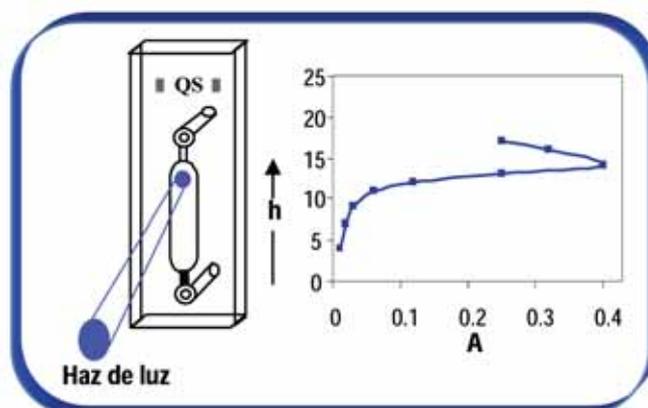
Tabla V.1. Soportes sólidos empleados

<i>SENSOR</i>	<i>Soporte Sensor en la Célula de Flujo</i>
Warfarina	Sephadex QAE A-25
Warfarina-Tiabendazol	Silicagel C <sub>18</sub>
Derivados fenólicos	Sephadex QAE A-25
Fe (II), Fe total, Ácido Ascórbico	Sephadex QAE A-25
Co(II)	Dowex 50 W
Be(II)-Al(III)	Sephadex QAE A-25
Ácido Ascórbico	Sephadex QAE A-25
Fenotiazinas	Sephadex QAE A-25
Cu(II)-Zn(II)	Sephadex QAE A-25
V(V)	Sephadex QAE A-25

#### 4.1.3 Nivel de soporte sólido

El estudio de esta variable se realizó a través de medidas de la señal analítica que proporciona el sistema a la respectiva longitud de onda óptima, empleando diferentes niveles de resina en la célula de medida. Este nivel depende de la geometría del haz de luz del detector, siendo necesario que el nivel de resina cubra completamente la zona en la que incide el haz de luz, ya que de otro modo la fijación del analito se produce en la fase sólida fuera de la zona de detección.

Se observa que la señal analítica va aumentando hasta un valor máximo, que se produce cuando la cantidad de resina es suficiente para que todo el haz de luz pase a su través. Para cantidades superiores de resina la absorbancia o IFR disminuye debido a la dilución del analito en la resina (parte del mismo se fija en una zona de la resina que no coincide con la zona irradiada, sino que se encuentra situada por encima de ésta). Niveles más bajos del indicado producen, por su parte, otra disminución de la señal, pues la luz pasa total o parcialmente a través del flujo de disolución.



**Figura V.26.** Influencia del nivel de soporte sólido en la célula Hellma 138 QS

En los sensores con detección espectrofotométrica todo el haz de luz pasa a través del soporte sólido cuando llenamos la cubeta (Hellma 138-QS o Hellma 138-OS) hasta una altura de 15 mm, medidos desde la base de ésta, consiguiendo así que la célula quede completamente llena. Para los sensores de detección espectrofluorimétrica, dada la geometría de la célula de flujo (Hellma 176.052-QS), es muy difícil conocer la altura del soporte que se introduce dentro, con lo cual, se introduce la mínima cantidad de éste que nos asegure que la zona de detección está totalmente cubierta de resina en todo momento.

Hay que tener en cuenta que cuando hay que usar una disolución de eluyente diferente del propio portador para eluir la especie de interés, los soportes cambiadores de iones sufren hinchamientos y deshinchamientos alternativamente, que alteran el nivel de soporte sólido en la célula y la línea base. En estos casos hay que tener la precaución de llenar la célula pasando a su través la disolución de eluyente para evitar que las compactaciones lleguen a bajar el nivel de soporte sólido por debajo del haz de luz. Una vez llenada la célula, hay que pasar el portador a través de la misma durante unos minutos para acondicionar la zona sensora.

En el sistema para la determinación de los pesticidas Warfarina y Tiabendazol, la resolución de la mezcla se realizó teniendo en cuenta la diferencia en la cinética de retención-elución en su paso por el soporte sólido. Mediante el uso de una precolumna empaquetada con el mismo soporte sólido que la célula de medida se puede potenciar esta diferente cinética, consiguiendo que los analitos lleguen secuencialmente a la zona sensora y que se determinen sin solapamiento de señales. Se realiza un estudio de la influencia de la longitud de esta precolumna empaquetada en la resolución de la mezcla. Se observa que conforme se aumenta la cantidad de soporte sólido en la precolumna las señales de ambos analitos se van separando, hasta que se separan totalmente cuando usamos una longitud de

precolumna de **40 mm**. Por encima de esta cantidad de soporte los picos se ensanchan, por lo que se eligió la cantidad mínima que permite la completa separación de los analitos.

## **4.2 Variables Químicas**

Se consideran variables químicas que pueden afectar la señal: (1) influencia del pH del(os) portador(es)/eluyente(s); (2) naturaleza y concentración óptima del(os) mismo(s); (3) influencia del pH de la muestra; (4) fuerza iónica de la misma; (5) volumen de suspensión homogénea del soporte sólido (solo en el caso de los sensores con renovación de superficie sensora); y (6) concentración y volumen de reactivos, en los casos donde sea necesaria una reacción derivadora.

### ***4.2.1 Influencia del pH del portador y del eluyente***

Cuando se utiliza como soporte sólido una resina de intercambio iónico es importante el pH de la disolución portadora, pues influye en la posible ionización de los analitos permitiéndose así la fijación o no de éstos en la resina.

En los sensores monoparámetro se estudia el pH de fijación/elución para elegir el óptimo, que será el que origine una mayor fijación del analito en el soporte sólido. En los sensores biparámetro el pH puede ser un factor discriminante, permitiendo la fijación de un solo analito a un pH y del otro a un valor diferente. También podría resolverse la mezcla si a un pH solo se retiene uno de los analitos y a otro pH se retienen los dos simultáneamente, cumpliéndose que a este último pH las señales analíticas sean aditivas. En esta Memoria se presentan dos sensores de estos tipos, tratándose, por tanto, de determinaciones secuenciales de dos analitos.

El estudio del pH del portador/eluyente en estos sistemas se realizó preparando distintas disoluciones con una concentración constante de electrolito pero diferentes valores de pH, ajustados con HCl o NaOH 0.1 M, manteniendo constantes el resto de variables experimentales. Al inyectar la muestra, se registraba la señal a las longitudes de onda óptimas de cada sistema y se comparaban las señales obtenidas.

#### ***-Sensores monoparámetro***

En los sensores monoparámetro sin renovación de la superficie sensora no se necesita reacción derivadora, por lo que el pH óptimo seleccionado fue aquel que

originó una señal analítica máxima. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

**Determinación de Warfarina:** La fijación de la warfarina se produce a partir de pH 6, es decir, que está desprotonada a partir de este pH, lo cual se explica teniendo en cuenta que su  $pK_a$  es 5.05.

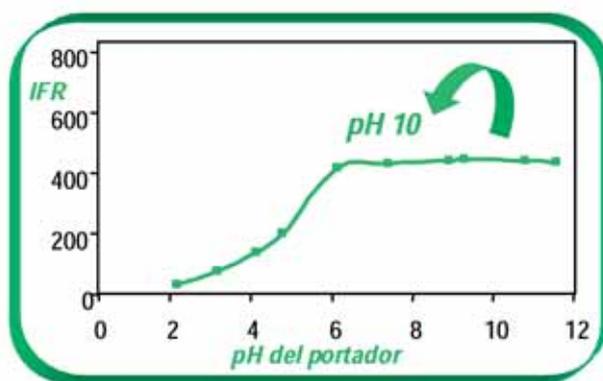


Figura V.27. Estudio de la influencia del pH sobre la IFR de Warfarina

**Determinación de Compuestos Fenólicos:** Para los cinco compuestos fenólicos la señal máxima se obtiene para un valor de  $pH=12$ , lo cual también es coherente con los valores de los  $pK_a$  de los analitos. Por debajo de  $pH 9-10$  ningún analito se encuentra desprotonado, por lo que no se fija en la resina aniónica.

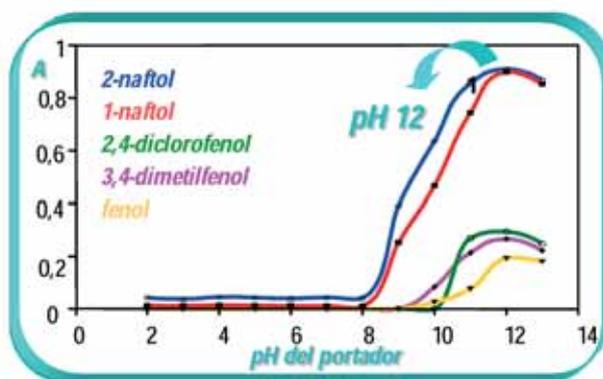
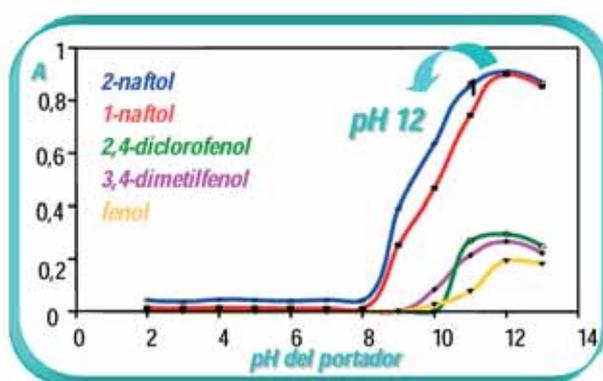


Figura V.28. Estudio de la influencia del pH sobre la absorbancia de cinco Compuestos Fenólicos

En el caso de los sensores monoparámetro con renovación de superficie sensora, cuando la reacción se produce en el propio soporte sensor hay que tener en cuenta la estructura iónica del reactivo cromogénico o fluorogénico y del producto de la reacción. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

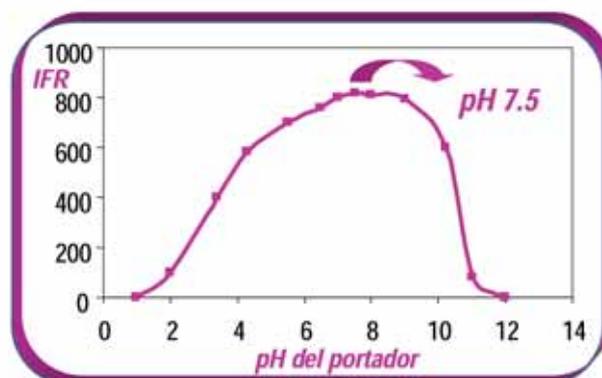
**Determinación de Fe(II), Co(II) y Ácido Ascórbico:** Para la determinación de Fe(II), la señal analítica es debida al complejo formado con Ferrozina. Se observa que la absorbancia no varía hasta llegar a pH 9, ya que a este pH se forman los hidróxidos de Fe, impidiendo que reaccione con la Ferrozina. Por tanto, el portador usado fue agua desionizada. En el caso del sensor de Co(II), la formación del complejo con PAN es máxima a pH 5, por lo que se seleccionó éste como óptimo. En la determinación de Ácido Ascórbico la señal analítica es la disminución de absorbancia producida al reducirse el Azul de Prusia, siendo ésta máxima a pH 5.



**Figura V.29.** Estudio de la influencia del pH sobre la absorbancia de los complejos Fe(II)-Ferozina, Co(II)-PAN y Azul Prusia

**Determinación de Fenotiazinas:** En este sistema el pH del portador viene determinado por la primera reacción derivadora. El propio portador, Fe(III), actúa como agente oxidante de las Fenotiazinas, y esta reacción necesita un pH muy ácido. El pH elegido como óptimo fue pH 1. A pH superiores no se producía la oxidación completa de las Fenotiazinas. Por debajo de pH 1 no se originaba la reacción de complejación del Fe(II) formado con Ferrozina.

**Determinación de V(V):** El complejo fluorescente formado entre el V(V) y el reactivo Rojo de Alizarina S origina una IFR máxima cuando el pH de la disolución portadora está entre 5-9, seleccionándose como pH óptimo pH 7.5. Fuera de este intervalo la señal analítica desciende sustancialmente.

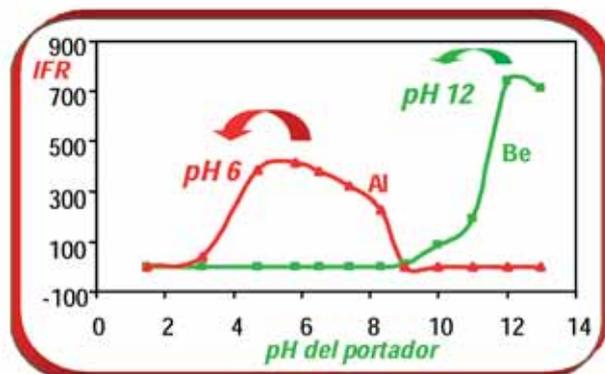


**Figura V.30.** Estudio de la influencia del pH sobre la IFR del complejo fluorescente V(V)-Rojo de Alizarina S

### **Sensores biparámetro**

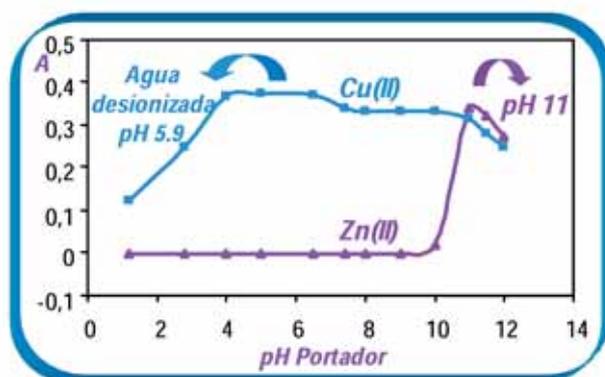
En los dos sensores biparámetro con renovación de la superficie sensora de esta Memoria el pH del portador es un factor importante para la resolución de la mezcla. Ambos se basan en la reacción de los analitos con reactivos cromogénicos o fluorogénicos. Para seleccionar los pH óptimos, además de tener en cuenta la sensibilidad obtenida, hay que considerar que puedan discriminar la fijación y reacción de un solo analito a cada pH, o de los dos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

**Determinación de Be(II) y Al(III):** Se observó que el complejo de Be(II) con Morina solo se forma a partir de pH 10, obteniendo una IFR máxima a pH 12. Sin embargo el complejo del Al(III) con Morina se forma en el intervalo de pH entre 4-8, obteniéndose un máximo a pH 6. Esto permite el desarrollo de un sensor para la determinación secuencial de ambos analitos, usando dos disoluciones portadoras, una a pH 6, al cual solo reacciona y se retiene selectivamente el Al(III), y la segunda a pH 12, al cual solo reacciona y se retiene selectivamente el Be(II).



**Figura V.31.** Estudio de la influencia del pH sobre la IFR de los complejos de Be(II) y Al(III) con Morina

**Determinación de Cu(II) y Zn(II):** Se comprobó que el complejo Cu-Zincón se forma en el intervalo de pH entre 1-13, obteniendo señales máximas entre los valores de pH 4-7, por tanto, para simplificar el sistema, se eligió como primer portador agua desionizada. El complejo Zn-Zincón solo se forma a partir de pH 11, siendo éste el pH al cual la señal analítica era máxima. Esto permite el desarrollo de un sensor para la determinación secuencial de ambos analitos, usando dos disoluciones portadoras, una a pH 5.9 (agua desionizada), al cual solo reacciona y se retiene de forma selectiva el Cu(II), y la segunda a pH 11, al cual reaccionan y se fijan ambos metales. A este valor de pH se cumple que las absorbancias debidas a estos analitos son aditivas.



**Figura V.32.** Estudio de la influencia del pH sobre la absorbancia de los complejos de Cu(II) y Zn(II) con Zincón

#### **4.2.2 Naturaleza y concentración de portador y eluyente**

Una vez elegidos los pHs óptimos de las disoluciones portadoras, se estudió la naturaleza de las mismas, así como su concentración. En sensores monoparámetro, el portador seleccionado debe ser aquel que permita una máxima retención, y por tanto origine una máxima sensibilidad. Pero también, en el caso de que actúe como eluyente, debe eluir los analitos rápidamente para obtener una elevada frecuencia de muestreo. En el sensor biparámetro que utiliza la diferencia en la cinética de retención-elución para la resolución de la mezcla, habrá que favorecer esta diferencia cinética con los portadores seleccionados.

Cuando el soporte sólido utilizado sea una resina de intercambio iónico, lo más apropiado es utilizar disoluciones de portador acuosas, mientras que cuando se utilice el gel de adsorción  $C_{18}$ , los portadores más adecuados son de naturaleza alcohólica.

Para realizar este estudio, en los sensores que utilizan un soporte de cambio iónico se prueban distintas disoluciones amortiguadoras al pH seleccionado como óptimo, o disoluciones de diferentes electrolitos en las mismas condiciones de trabajo. Se hacen sucesivas inyecciones de la misma muestra utilizando los distintos portadores y se comparan las señales analíticas obtenidas en cada caso. Se seleccionará aquella disolución de portador que proporcione mayor sensibilidad, es decir, mayores señales analíticas.

Una vez elegida la naturaleza del portador se estudian distintas concentraciones de éste, y de igual modo, se selecciona aquella que proporciona mayores señales analíticas; además, en el caso de que también actúe como eluyente, se busca que esta disolución proporcione tiempos de residencia cortos. Se trata, por tanto, de una solución de compromiso entre alta sensibilidad y elevada frecuencia de muestreo.

En todos los sensores monoparámetro sin renovación de la superficie sensora se cumple que el propio portador actuaba como eluyente, es decir, que una vez alcanzado el máximo de la señal los analitos son eluidos por el propio portador, regenerando así el sensor tras el desarrollo de la señal transitoria, con lo que se aumenta la frecuencia de muestreo y se alarga el tiempo de vida del sensor.

En los sensores con renovación de la superficie sensora los analitos quedan tan fuertemente retenidos en el soporte sólido que no es posible la regeneración del sensor, por lo que tras cada inyección de muestra se desecha el soporte sólido de forma automatizada, y se inyecta un volumen fijo de una suspensión homogénea de partículas para volver a llenar la célula de flujo.

En el sensor biparámetro para la determinación de Warfarina y Tiabendazol, uno de los portadores debe permitir que uno de los analitos no sea retenido en la precolumna empaquetada con soporte sólido, pasando hasta la célula de flujo,

mientras que el otro analito debe fijarse en dicha precolumna. Posteriormente, se selecciona el otro portador, que eluye al segundo analito de la precolumna, transportándolo hasta la microzona sensora, permitiendo la determinación simultánea de ambos. Para este estudio se varió la concentración de las disoluciones de metanol hasta encontrar dos disoluciones de portador que cumplieran lo anterior. Se eligieron como portadores una disolución de metanol al 30% para el tiabendazol, y una disolución de metanol al 50% para la warfarina. Ambos portadores actúan a su vez de eluyentes de cada analito de la superficie sensora, originando señales transitorias.

Solo en el caso del sensor para la determinación de Fenotiazinas el portador actúa también como reactivo, oxidando a las Fenotiazinas. Se probaron distintos oxidantes, obteniéndose mejores resultados con un disolución de Fe(III). Posteriormente el Fe(II) producido reacciona con Ferrozina para formar un complejo coloreado, el cual es responsable de la señal analítica.

A continuación se muestra un resumen de los portadores y eluyentes seleccionados en cada sensor:

**Tabla V.2.** Resumen de las disoluciones de portador/eluyente empleadas

<i>SENSOR</i>	<i>PORTADOR/ELUYENTE</i>
Warfarina	NaCl (0.25 M) / NaOH (pH 10)
Warfarina-Tiabendazol	1) MeOH:H <sub>2</sub> O (v:v) 30% 2) MeOH:H <sub>2</sub> O (v:v) 50%
Compuestos Fenólicos	KCl (0.10 M) / NaOH (pH 12)
Fe (II), Fe total, Ácido Ascórbico	Agua Desionizada
Co(II)	Pirofosfato (0.10 M) / HCl (pH 5)
Be(II)-Al(III)	1) NaCl (0.50 M) / HCl (pH 6) 2) NaCl (0.30 M) / NaOH (pH 12)
Ácido Ascórbico	NaCl (0.40 M) / HCl (pH 5)
Fenotiazinas	Fe(III) (1.79x10 <sup>-3</sup> M) / HClO <sub>4</sub> (pH 1)
Cu(II)-Zn(II)	1) Agua Desionizada (pH 5.9) 2) NaOH (pH 11)
V(V)	KCl (0.15 M) / NaOH (pH 7.5)

### **4.2.3 Influencia del pH de la muestra**

De la misma forma que se estudió el pH de la disolución de portador, se estudió también el pH de la muestra mediante modificación del mismo con la cantidad adecuada de HCl o NaOH 0.1 M.

Esta experiencia se realizó para todos los sensores de esta Memoria, y se observó que en la mayoría de los casos no se producían variaciones significativas en los valores de las señales, por lo que en estos casos, por comodidad, se mantuvieron los pHs propios de las muestras una vez preparadas para ser inyectadas.

Solo en el sensor para la determinación de Compuestos Fenólicos, para 1-naftol y 2,4-diclorofenol el pH de la muestra debe ser ajustado a 12 y 11, respectivamente. Asimismo, algunas veces también es necesario ajustar este pH en muestras que han experimentado tratamientos ácidos o básicos extremadamente fuertes para su disolución, como por ejemplo en el caso de algunas aplicaciones analíticas en el sensor para Vanadio.

### **4.2.4 Influencia de la fuerza iónica de la muestra**

En dos de los sensores con renovación de la superficie sensora, los analitos se fijan tan fuertemente en el soporte sólido que la fuerza iónica del portador no es suficiente para favorecer el transporte de éstos hasta la zona de detección, sino que se retienen en la parte superior de la zona irradiada, imposibilitando su detección. Para solucionarlo se añade una cantidad de electrolito a las propias muestras, facilitando el transporte y preconcentración de los analitos hasta la zona de detección.

Para este estudio se adicionaron diferentes electrolitos a la disolución muestra en una concentración constante, seleccionando aquel que proporcione mayores señales analíticas. Este estudio fue necesario para el sensor monoparámetro de Fe(II) y biparámetro de Cu(II)-Zn(II). En los dos sensores se eligió como electrolito óptimo NaCl. A continuación, para optimizar la concentración de NaCl, se prepararon diferentes disoluciones de una misma concentración de analito y distintas concentraciones de NaCl. Se seleccionó una concentración de 0.20 M de NaCl para el sensor de Fe(II) y 0.10 M de NaCl para el sensor biparámetro de Cu(II)-Zn(II), pues concentraciones mayores no producían un aumento en la señal analítica.

### **4.2.5 Influencia del volumen de suspensión homogénea de partículas**

En los sensores con renovación de la superficie sensora, ésta es sustituida tras cada inyección de muestra, ya que los analitos, reactivos o los complejos formados

en reacciones de derivación, quedan tan fuertemente retenidos en el soporte sólido que no es posible su reutilización en sucesivas inyecciones de muestra. El soporte sólido se inyecta en el flujo del portador en forma de suspensión homogénea de partículas, que es transportado hasta la célula de medida llenándola completamente hasta un nivel óptimo. Para realizar este estudio se tiene en cuenta, además del volumen interno de la célula de medida, el tipo de soporte, así como la naturaleza, concentración y pH de la disolución de portador.

En una columna cromatográfica se introduce una cantidad de las partículas del soporte sólido en un determinado volumen de agua desionizada o disolución de reactivo cromogénico o fluorogénico, dependiendo del caso. Para obtener esta suspensión se hace pasar por la columna cromatográfica con una corriente de aire sintético, produciendo al atravesar la base porosa de la columna unas burbujas que agitan la suspensión y la mantienen homogénea.

Este estudio se realiza inyectando distintos volúmenes de esta suspensión, manteniendo constantes el resto de las variables experimentales y observando qué nivel de soporte se consigue en la célula de flujo. El volumen óptimo será aquel que consiga el nivel adecuado, en los términos que se han venido comentando hasta anteriormente. Hay que tener en cuenta que el volumen seleccionado en los sensores que usen el mismo tipo de soporte y la misma célula de medida no tiene por qué ser el mismo, ya que la concentración del portador y su pH influye mucho en la compactación del soporte en la célula.

A continuación se muestra una tabla resumen con los resultados obtenidos:

**Tabla V.3.** Resumen de los parámetros optimizados para la suspensiones homogéneas de partículas

Sensor Cantidad y tipo de sop

Sensor	Cantidad y tipo de soporte	Volumen de disolución en la columna	Volumen de suspensión inyectado
Fe(II), Fe total y Ácido Ascórbico	0.6 g Sephadex QAE A-25	30 ml disolución de Ferrozina	300 $\mu$ l
Co(II)	1 g Dowex 50 W con PAN	30 ml agua desionizada	600 $\mu$ l
Al(III)-Be(II)	1 g Sephadex QAE A-25 con Morina	30 ml agua desionizada	500 $\mu$ l
Ácido Ascórbico	0.6 g Sephadex QAE A-25	30 ml agua desionizada	300 $\mu$ l
Fenotiazinas	1 g Sephadex QAE A-25	30 ml agua desionizada	500 $\mu$ l
Zn(II)-Cu(II)	1 g Sephadex QAE A-25	30 ml disolución de Zincón	300 $\mu$ l
V(V)	1 g Sephadex QAE A-25	30 ml disolución de Rojo de Alizarina S	500 $\mu$ l

La preparación y concentraciones seleccionadas de los reactivos anteriores se explicarán en el siguiente apartado.

#### 4.2.6 Influencia de la concentración de reactivos

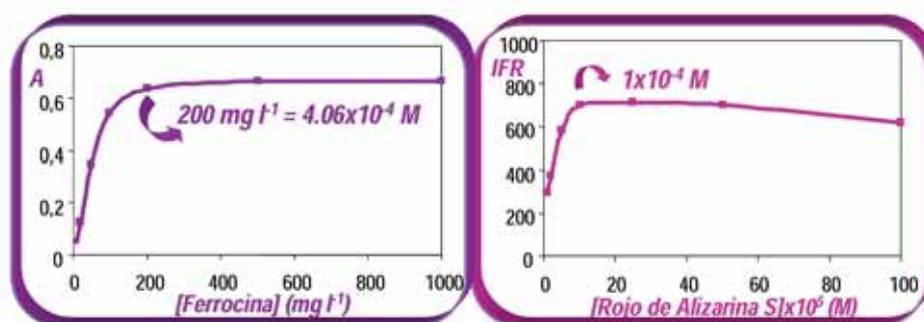
En esta Memoria se presentan siete sensores en los que se emplean reacciones derivadoras de complejación, originándose complejos coloreados o complejos fluorescentes, y reacciones redox entre el analito y un agente oxidante o reductor.

En algunos casos el reactivo se fija previamente sobre el soporte sólido. En otros casos la fijación del reactivo en el soporte es tan rápida, que basta con añadir en la columna cromatográfica el soporte sólido y un volumen fijo de una disolución de este reactivo, e inmediatamente, se produce la fijación del reactivo en el soporte. También puede ocurrir que el reactivo se inyecte en el sistema y se fije en el soporte sólido que empaqueta la célula de medida o que la reacción derivadora se produzca *on line*, antes de la llegada del analito a la zona de detección, y sea el

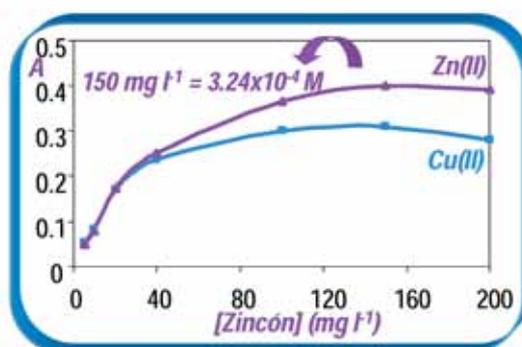
producto de esta reacción el que se retenga en el soporte sólido que hay en la célula de flujo.

Para optimizar esta variable se preparan disoluciones de reactivo a diferentes concentraciones, para una misma cantidad de soporte sólido, y se realizan inyecciones de muestra manteniendo fijas el resto de las variables. Se observa que en todos los casos la señal analítica aumenta conforme aumentamos la concentración de reactivo, hasta llegar a un valor en el que la señal analítica se mantiene prácticamente constante. La concentración de reactivo seleccionada en cada caso es aquella que proporcionó la mayor sensibilidad y que no originaba una elevada señal de fondo, comprobándose que era una cantidad en exceso para todas las concentraciones de muestra de la recta de calibrado.

En los sensores monoparámetro para la determinación de **Fe(II)** y **V(V)** y en el sensor biparámetro para la determinación de **Zn(II)-Cu(II)**, la fijación de los reactivos en la resina es inmediata, por lo que se le añade directamente al soporte sólido un volumen de la disolución de reactivo de la concentración óptima. Se seleccionan como concentraciones de reactivo óptimas:  $4.06 \times 10^{-4}$  M de Ferrozina, en el caso de la determinación de Fe(II),  $1 \times 10^{-4}$  M de Rojo de Alizarina S para la determinación de V(V) y  $3.24 \times 10^{-4}$  M de Zincón en el sensor biparámetro para la determinación de Zn(II)-Cu(II).



**Figura V.33.** Estudio de la influencia de la concentración de Ferrozina en la determinación de Fe(II) y de Rojo de Alizarina S en la determinación de V(V)



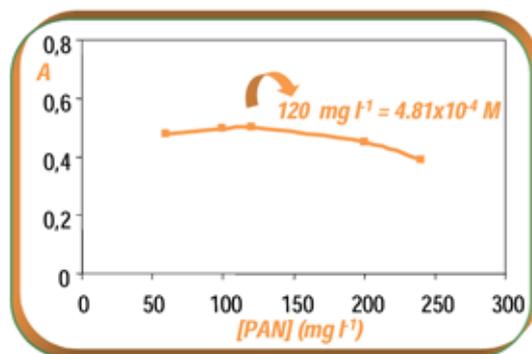
**Figura V.34.** Estudio de la influencia de la concentración de Zincón en el sensor para la determinación secuencial de Cu(II)-Zn(II)

En los sensores espectrofotométricos de Fe(II) y Cu(II)-Zn(II), el valor del blanco, es decir la señal de los reactivos fijados en el soporte sólido a las longitudes de onda seleccionadas en cada caso, era menor de 0.05 unidades de absorbancia. En el caso del sensor fluorimétrico para V(V) el valor del blanco fue 250 unidades de IFR, lo cual no era debido a la emisión del reactivo fluorogénico, sino a la del propio soporte sólido en las condiciones de trabajo seleccionadas.

Con pequeñas modificaciones del sistema, el sensor para la determinación de Fe(II) también puede utilizarse para la determinación de Fe total y para la determinación indirecta de ácido ascórbico. Para analizar el contenido total en Fe [Fe(II)+Fe(III)], solo hay que reducir previamente el Fe(III) presente en la muestra, de forma que todo el Fe estaría en forma de Fe(II) y reaccionaría con Ferrozina, pues es un reactivo bastante selectivo para este último. El reductor usado es el ácido ascórbico, el cual requiere de un medio ácido para el proceso de reducción. Se optimizaron los volúmenes y concentraciones de estos reactivos, consiguiendo mejores resultados con las siguientes condiciones:

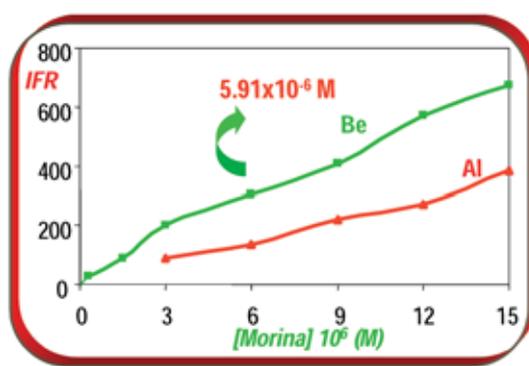
- **Fe total:** 100 ml de una disolución de  $5.68 \times 10^{-5}$  M de ácido ascórbico para un volumen de muestra de 100 ml.
- **Ácido Ascórbico:** 100 ml de una disolución de  $8.95 \times 10^{-5}$  M de Fe(III) para un volumen de muestra de 100 ml.

En el sensor para la determinación de **Co(II)** el reactivo cromogénico utilizado fue PAN. Todas las disoluciones de PAN se prepararon en etanol al 40%. 50 ml de cada disolución de PAN se añadían a 1 g de la resina de intercambio iónico Dowex 50 W, y se mantenía en agitación constante durante 60 minutos para conseguir se fijación en dicho soporte. A continuación se filtraba y se dejaba secar al aire. Se seleccionó una concentración de PAN de  $4.81 \times 10^{-4}$  M. (Figura V.35.). El valor del blanco en este caso (señal analítica del PAN fijado en el soporte sólido) en las condiciones de trabajo utilizadas era menor a 0.05 unidades de absorbancia.



**Figura V.35.** Estudio de la influencia de la concentración de PAN en la determinación de Co(II)

Para el sensor de **Al(III)-Be(II)** la fijación del reactivo en el soporte sólido también se realizaba previamente. Se añadía 20 ml de disolución de Morina a 1 g de resina Sephadex QAE A-25, se agitaba durante una hora, y se mantenía en contacto durante 12 horas en reposo, para asegurar la completa fijación, y por último, tras filtrar, la resina se secaba al aire. Se observó que al aumentar la concentración de Morina aumentaba la IFR de ambos complejos, pero debido a la propia fluorescencia de la Morina, también aumentaba la IFR de la línea base. Por esta razón, se seleccionó una concentración de Morina de  $5.91 \times 10^{-6}$  M (Figura V.36.), que originaba un valor del blanco de aproximadamente 300 unidades de IRF.

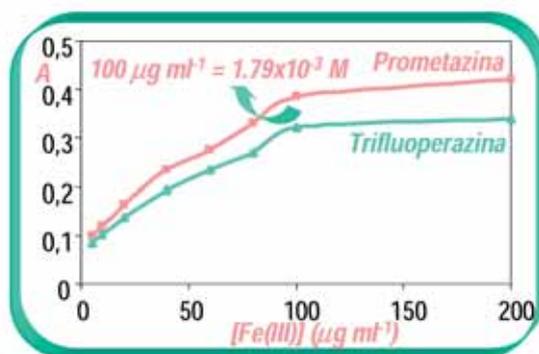


**Figura V.36.** Estudio de la influencia de la concentración de Morina en la determinación de Be(II)-Al(III)

En el sensor para la determinación de **Ácido Ascórbico** el reactivo cromogénico es Azul de Prusia, y la señal analítica en este caso es la disminución de la absorbancia de este reactivo cuando oxida al analito. Este reactivo se prepara haciendo reaccionar  $\text{Fe}^{3+}$  y  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ . Se estudiaron disoluciones de distintas concentraciones de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  y una concentración constante de  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $3.58 \times 10^{-4}$  M. Se observó que la absorbancia aumentaba hasta una concentración de  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  de  $9.44 \times 10^{-5}$  M, por lo que se seleccionaron estas concentraciones para la obtención del Azul de Prusia en todo el desarrollo del sensor.

En el caso de la determinación de **Fenotiazinas** se producen dos reacciones durante el proceso de análisis. La primera es la oxidación de los analitos con el propio portador, una disolución de Fe(III), produciendo Fe(II), el cual en la segunda reacción con Ferrozina origina el complejo coloreado responsable de la señal analítica. La concentración de Fe(III) se estudió entre  $1.70 \times 10^{-4}$  –  $5.37 \times 10^{-3}$  M, eligiéndose  $1.79 \times 10^{-3}$  M, puesto que concentraciones mayores no incrementan significativamente la señal analítica. Para estudiar la influencia de la concentración de Ferrozina se inyectó 800 ml de disoluciones de diferente concentración,

obteniendo mayor sensibilidad con una concentración de  $4.06 \times 10^{-3}$  M de Ferrozina. Estas reacciones se producen *on line*, antes de la llegada del analito a la zona de detección, y es el producto coloreado final el que se retiene en el soporte sólido al alcanzar la célula.



**Figura V.37.** Estudio de la influencia de la concentración de Fe(III) en la determinación de Fenotiazinas

### 4.3 Variables FIA

Una vez seleccionadas las variables químicas se realizó el estudio de las variables del sistema de inyección en flujo utilizado: longitud del reactor, caudal y volumen de muestra inyectado. Esto se llevó a cabo manteniendo constantes el diámetro interno de los tubos de bomba, así como las variables químicas en los valores anteriormente optimizados.

#### 4.3.1 Longitud del reactor

Solo en dos de los sensores de esta Memoria se requiere *a priori* de un reactor, para que se desarrollen reacciones derivadoras *on line*, antes de la llegada del analito a la zona de detección: el sensor de Fe(II), cuando se quiere determinar Fe total o ácido ascórbico indirectamente, y el sensor de Fenotiazinas.

En el primero de los sensores la reacción que se produce es la reducción de Fe(III) a Fe(II) por el ácido ascórbico, y en el segundo la complejación de Fe(II) con Ferrozina. Los resultados obtenidos muestran que la variación de la longitud del reactor no modifica la respuesta de los sensores, lo cual indica que las reacciones son prácticamente completas en un pequeño tiempo, ya que la velocidad de reacción es muy elevada. Por tanto, se opta por un reactor lo más corto posible con objeto de obtener un tiempo de residencia que sea pequeño y una buena

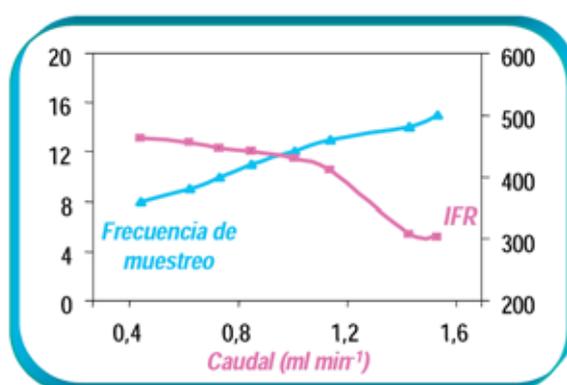
frecuencia de muestreo. Se elige un reactor de 50 cm (tubo de Teflón de 0.8 mm de diámetro interno) para el sensor de Fe(II), y en el caso de las Fenotiazinas bastaba con la longitud de los tubos del propio sistema para que la reacción fuera completa.

#### 4.3.2 Caudal

El efecto del caudal se estudió inyectando disoluciones de los analitos a diferentes caudales, los cuales se obtenían incrementando la velocidad de giro de la bomba peristáltica. Para obtener el valor del caudal en  $\text{ml min}^{-1}$  basta con medir el tiempo que emplea un determinado volumen de disolución en salir del sistema hacia el desecho una vez establecida la configuración FIA, manteniendo fijas las variables experimentales anteriormente optimizadas.

En los sensores sin renovación de la superficie sensora se observa que al aumentar la velocidad de giro de la bomba, es decir al aumentar el caudal, disminuye la altura de los picos y los tiempos de residencia, lo que indica que la cinética del proceso de difusión-retención de todos los analitos en el soporte sólido no era instantánea. Un caudal bajo lleva consigo tiempos de residencia largos, disminuyendo la frecuencia de muestreo, por lo que hemos de adoptar una solución de compromiso que proporcione buenas señales analíticas y una frecuencia de muestreo aceptable.

A modo de ejemplo se muestra el estudio de la influencia del caudal realizado para el desarrollo del sensor Warfarina-Tiabendazol. Los resultados expuestos corresponden al Tiabendazol.



**Figura V.38.** Estudio de la influencia del caudal sobre la IFR y la frecuencia de muestreo para la determinación de Tiabendazol

En los sensores con renovación de la superficie sensora no se puede trabajar con caudales muy altos porque se producen sobrepresiones en el sistema, debido a su

complejidad. En estos casos el caudal no influiría en los anchos de picos obtenidos, ya que los analitos no se eluyen del soporte, sino que se desecha la resina después de cada medida. Generalmente se selecciona el mayor caudal que permita el sistema. Para la eliminación de la resina de la célula después de cada inyección de muestra se cambia el sentido del flujo, y se aumenta el caudal a  $2.25 \text{ ml min}^{-1}$  para acelerar el proceso de vaciado.

A continuación se muestra un resumen con los caudales seleccionados para cada sensor desarrollado:

**Tabla V.4.** Resumen de los caudales seleccionados

SENSOR	CAUDAL ( $\text{ml min}^{-1}$ )
Warfarina	1.14
Warfarina-Tiabendazol	1.14
Compuestos fenólicos	1.36
Fe (II), Fe total, Ácido Ascórbico	1.25
Co(II)	1.30
Be(II)-Al(III)	1.43
Ácido Ascórbico	1.25
Fenotiazinas	1.25
Cu(II)-Zn(II)	1.25
V(V)	1.40

#### 4.3.3 Volumen de muestra inyectado

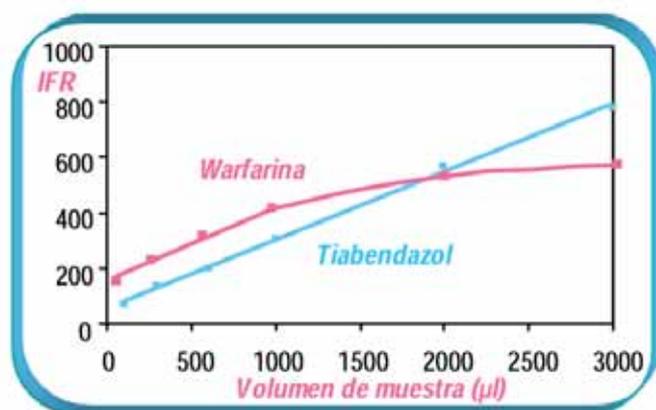
Para establecer la influencia del volumen de muestra en la determinación de cada uno de los analitos, se modifica el volumen de la válvula de inyección mediante la utilización de bucles de volúmenes diferentes.

Se producirá un incremento de sensibilidad al incrementar el volumen de muestra usado para el análisis. Este aumento es lineal hasta un determinado volumen, por encima del cual la señal analítica tiende a estabilizarse. En volúmenes elevados se debe disminuir el caudal para favorecer la retención de todo el analito, salvo que su coeficiente de distribución tenga un valor muy elevado.

Esta dependencia de la señal con el volumen aumenta la versatilidad del sensor ya que permite trabajar con amplios márgenes de concentraciones de los analitos, con solo variar el volumen de muestra inyectado. El uso de un volumen de inyección grande se traduce en un aumento de la sensibilidad, debido a que se fija una mayor cantidad de analito sobre la misma masa de soporte sólido. El único inconveniente de usar grandes volúmenes de muestra es que se requiere un mayor tiempo para cada determinación, con lo que se produce una disminución en la frecuencia de muestreo.

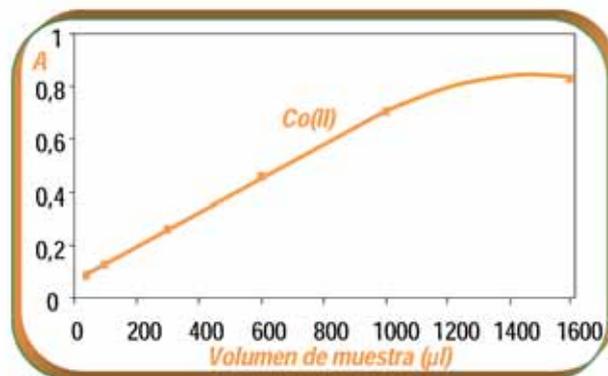
Este estudio se realizó manteniendo las condiciones de trabajo previamente optimizadas, para cada analito por separado, incluyendo los analitos de los sensores biparámetro.

Como ejemplo se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del volumen de muestra para el sensor biparámetro para la determinación de Warfarina-Tiabendazol, donde se puede observar claramente que la señal analítica, IFR en este caso, es linealmente dependiente del volumen de inyección hasta un volumen de 1000  $\mu\text{l}$  para Warfarina y de, al menos, 3000  $\mu\text{l}$  para Tiabendazol (máximo volumen probado).



**Figura V.39.** Influencia del volumen de muestra en la IFR en el sensor biparámetro para la determinación de Warfarina y Tiabendazol

También se muestra otro ejemplo en el que la señal analítica es la absorbancia, como es el caso del sensor para la determinación de  $\text{Co(II)}$ , en el que la linealidad se cumple hasta un volumen de 1000  $\mu\text{l}$ , por encima del cual no se producen incrementos significativos en la señal.



**Figura V.40.** Influencia del volumen de muestra en la absorbancia en el sensor para la determinación de Co(II)

Una vez establecido el intervalo en el que la señal analítica es lineal con el volumen de inyección se seleccionan los volúmenes a los que posteriormente se realizará la calibración. En los sensores sin renovación de la superficie sensora y en el sensor con renovación para la determinación de Fe(II) se eligieron dos volúmenes de inyección con los que calibrar el sensor, consiguiendo para uno de ellos buena frecuencia de muestreo, y para el otro, buena sensibilidad y amplios intervalos de calibración. En el resto de sensores solo se seleccionó un volumen de inyección para la calibración.

La siguiente tabla resume las ecuaciones de la dependencia de la señal analítica con el volumen de muestra inyectado, el intervalo de linealidad y los volúmenes seleccionados para la calibración de cada sensor:

**Tabla V.5.** Influencia del volumen de muestra inyectado

Sensor	Ecuación Lineal (v, $\mu$ l)	Intervalo de volumen	Volumen(es) seleccionado(s)
Warfarina	IFR=63+0.622v R=0.9996	100-1600 $\mu$ l	100 y 600 $\mu$ l
Warfarina	IFR=64+0.175v R=0.9908	100-1000 $\mu$ l	
Tiabendazol	IFR=57+0.245v R=0.9989	100-3000 $\mu$ l	40 y 600 $\mu$ l
1-Naftol	A=0.07+2.689 $10^{-4}$ v R=0.9991	40-2000 $\mu$ l	40 y 600 $\mu$ l
2-Naftol	A=0.07+1.621 $10^{-4}$ v R=0.9986	40-2000 $\mu$ l	40 y 600 $\mu$ l
3,4-Dimetilfenol	A=0.05+3.553 $10^{-4}$ v R=0.9988	40-600 $\mu$ l	40 y 600 $\mu$ l
2,4-Diclorofenol	A=0.10+4.831 $10^{-4}$ v R=0.9996	40-2000 $\mu$ l	40 y 600 $\mu$ l
Fenol	A=0.03+4.294 $10^{-4}$ v R=0.9977	40-1000 $\mu$ l	40 y 600 $\mu$ l
Fe(II)	A=0.02+3.951 $10^{-4}$ v R=0.9996	100-1000 $\mu$ l	100 y 1000 $\mu$ l
Co(II)	A=0.06+6.454 $10^{-4}$ v R=0.9998	40-1000 $\mu$ l	600 $\mu$ l
Be(II)	IFR=122+0.371v R=0.9993	40-1000 $\mu$ l	
Al(III)	IFR=86+0.062v R=0.9906	40-600 $\mu$ l	600 $\mu$ l
Ácido Ascórbico	A=0.02+3.838 $10^{-4}$ v R=0.9998	40-800 $\mu$ l	800 $\mu$ l
Trifluoperazina	A=0.10+5.129 $10^{-4}$ v R=0.9994	40-800 $\mu$ l	600 $\mu$ l
Prometazina	A=0.11+4.662 $10^{-4}$ v R=0.9997	40-800 $\mu$ l	600 $\mu$ l
Cu(II)(pH 5.9)	A=0.04+4.726 $10^{-4}$ v R=0.9980	40-1000 $\mu$ l	
Cu(II)(pH 11)	A=0.07+3.170 $10^{-4}$ v R=0.9994	40-2000 $\mu$ l	1000 $\mu$ l
Zn(II)(pH 11)	A=0.01+3.456 $10^{-4}$ v R=0.9975	40-2000 $\mu$ l	
V(V)	IFR=14+0.541v R=0.9984	40-1000 $\mu$ l	800 $\mu$ l

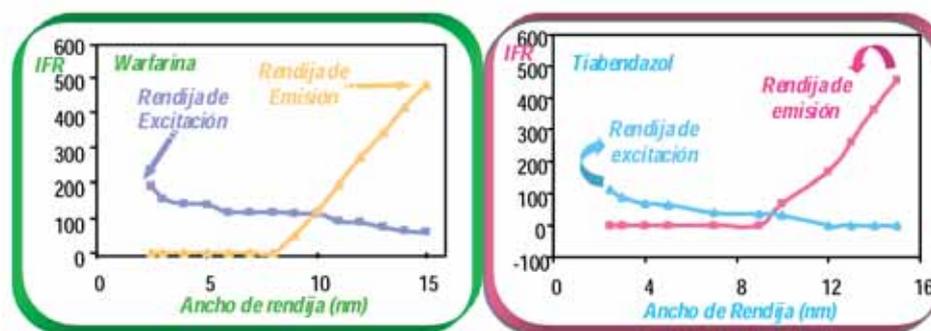
#### 4.4 Variables instrumentales

En esta Memoria se incluyen cuatro sensores con detección espectrofluorimétrica, por lo que en estos casos es necesaria la optimización de algunas variables instrumentales, tales como la anchura de las rendijas de excitación y de emisión, velocidad de barrido y el voltaje del fotomultiplicador.

Para el estudio de la influencia de la **anchura de las rendijas de excitación y de emisión** sobre la intensidad de fluorescencia relativa se inyecta un volumen de analito, y una vez fijado en la zona de detección y alcanzada la señal máxima, se detiene el flujo para medir la IFR a distintos valores de anchura de rendijas. Para estudiar como varía la IFR con la rendija de excitación se mantenía fija la rendija de emisión a un valor de 10 nm, mientras que el estudio de la fluorescencia con la rendija de emisión se llevó a cabo manteniendo fija la rendija de excitación a un valor de 10 nm.

Es necesario obtener elevadas señales correspondientes al analito, y bajas señales de fondo debidas a la emisión del soporte sólido. En el sensor para la determinación de V(V) se observó que conforme se aumentaba la anchura de ambas rendijas se producía un aumento en la IFR del analito, pero también de la señal de fondo, por lo que se seleccionó como solución de compromiso entre sensibilidad y baja señal de fondo un ancho de rendija de excitación de 10 nm y una anchura de rendija de emisión de 20 nm. En los otros tres sensores los mejores resultados se obtuvieron usando un ancho de rendija de excitación de 2.5 nm y una anchura de rendija de emisión de 15 nm.

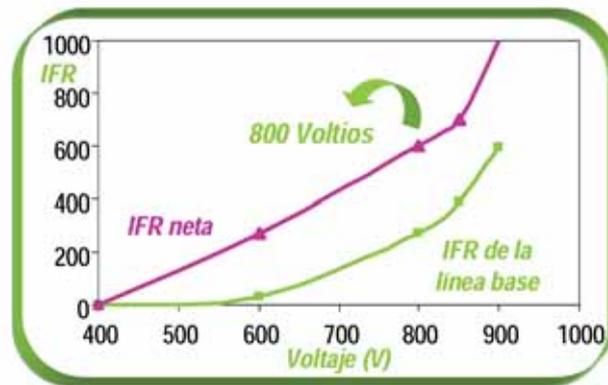
A continuación se muestra un ejemplo de cómo varía la señal analítica en función de la anchura de las rendijas para el sensor de Warfarina, y para el caso del Tiabendazol en el sensor biparámetro Warfarina-Tiabendazol.



**Figura V.41.** Estudio de la influencia de la anchura de las rendijas de excitación y de emisión para Warfarina y Tiabendazol

Respecto a la **velocidad de barrido**, se observa que variándola en el intervalo 100-1000 nm min<sup>-1</sup> no se producen cambios en los espectros de emisión, por lo que se mantiene en todos los sistemas una velocidad de 240 nm min<sup>-1</sup>.

Conforme se aumenta el **voltaje del fotomultiplicador** se produce un aumento de la IFR neta de los analitos y de la señal de fondo. Se muestra el estudio de esta variable instrumental en el caso del sensor de vanadio (*Figura V.42.*).



**Figura V.42.** Estudio de la influencia del voltaje del fotomultiplicador para el sensor de vanadio

Como se puede observar en la figura anterior, por encima de 850 V la IFR de la línea base es tan grande que nos dejaría un intervalo de valores de la recta muy pequeño para la determinación del analito, saturándose el detector muy pronto. Se fijó el valor del voltaje en 800 V para todos los casos.

## 5. Calibración de los sensores. Parámetros analíticos

## 5 CALIBRACIÓN DE LOS SENSORES. PARÁMETROS ANALÍTICOS

### 5.1 Calibración de los sensores

Se emplea calibración univariante en todos los sensores propuestos. La calibración univariante utiliza relaciones sencillas entre los datos independientes, entendidos como los valores de concentración, y los datos dependientes, siendo éstos las señales analíticas (absorbancia o intensidad relativa de fluorescencia).

En los métodos univariantes se resuelve una única ecuación basada en una única señal analítica (en nuestro caso absorbancia o fluorescencia a una sola longitud de onda) para predecir la concentración. Uno de los métodos más simples es la regresión lineal, en el que la señal analítica se relaciona con las concentraciones de los constituyentes mediante una ecuación polinómica de primer grado. La técnica más empleada es la **regresión por mínimos cuadrados**, que se emplea para resolver la ecuación del modelo relacionando los datos de la señal analítica con concentraciones conocidas de los constituyentes.

Se comprueba la existencia de una relación lineal entre la señal analítica y la concentración de cada uno de los analitos a determinar. Para ello se construyen, a las condiciones óptimas de trabajo en cada caso, las funciones de calibrado, consistentes en la representación de las parejas de datos señal analítica-concentración.

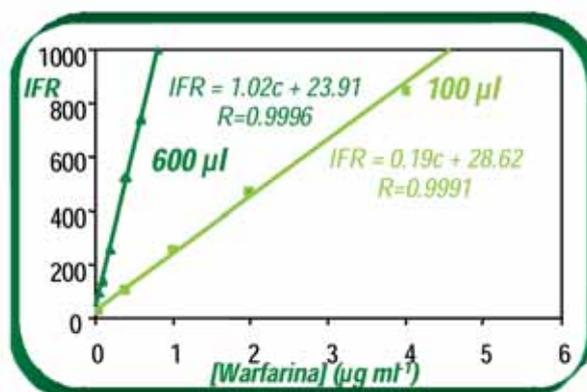
Para determinar las funciones de calibrado, las variables químicas, FIA e instrumentales se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados, y se inyectaron volúmenes iguales de disoluciones patrón de los analitos de diferente concentración (generalmente, cada inyección por triplicado), registrándose las correspondientes señales analíticas.

Los resultados obtenidos siguiendo este modelo para cada uno de los sensores descritos y para cada uno de los volúmenes de trabajo se muestran a continuación.

### 5.1.1 Sensores Monoparámetro

Para ampliar el campo de posibles aplicaciones se emplearon dos volúmenes de inyección de muestra en cada sensor. En todos los casos se observa una buena linealidad, tal y como muestran los coeficientes de correlación muy próximos a 1.

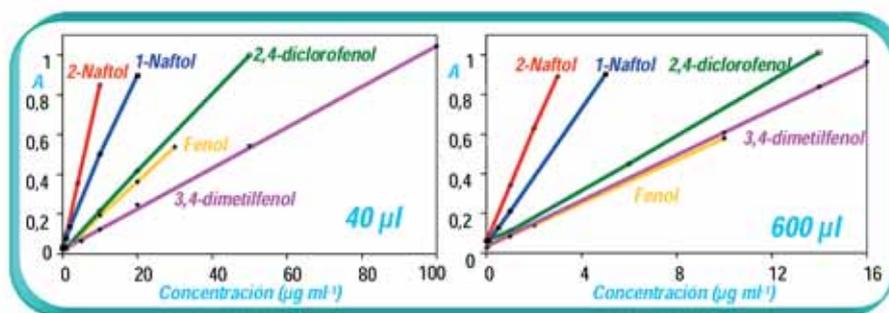
Comencemos primero con el estudio de los sensores monoparámetro sin renovación de la superficie sensora. El sensor con detección espectrofluorimétrica para la determinación de **Warfarina** se calibró para 100 ml y 600 ml de muestra:



**Figura V.43.** Gráficas y ecuaciones de la calibración del sensor de Warfarina

El sensor con detección espectrofotométrica para la determinación de **Compuestos Fenólicos** también se calibró para dos volúmenes de muestra, 40 y 600 ml. Con el uso del volumen de muestra mayor se facilita la aplicación del sensor en muestras en las que los analitos se encuentren en concentraciones bajas.

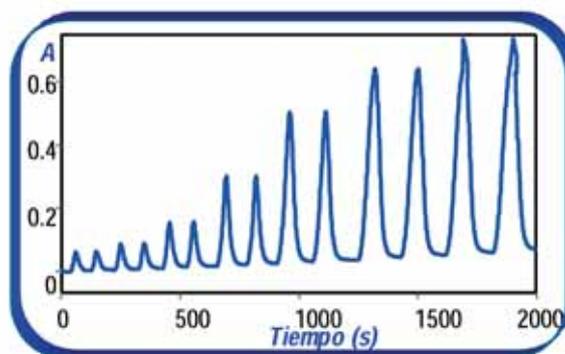
A continuación se muestran las rectas de calibrado de los cinco analitos para los dos volúmenes de calibración junto a una tabla con las ecuaciones de estas rectas (*Figura V.44.*), y a modo de ejemplo, el diagrama obtenido en la calibración del 2-Naftol utilizando un volumen de inyección de muestra de 40 ml (*Figura V.45.*).



Analito	40 µl		600 µl	
	Ecuación de calibración			
1-naftol	$A=0.044c+0.04$	$R=0.9970$	$A=0.171c+0.05$	$R=0.9999$
2-naftol	$A=0.083c+0.03$	$R=0.9999$	$A=0.280c+0.06$	$R=0.9994$
3,4-dimetilfenol	$A=0.010c+0.02$	$R=0.9977$	$A=0.056c+0.05$	$R=0.9991$
2,4-diclorofenol	$A=0.019c+0.02$	$R=0.9997$	$A=0.068c+0.05$	$R=0.9996$
Fenol	$A=0.018c+0.01$	$R=0.9977$	$A=0.053c+0.04$	$R=0.9990$

**Figura V.44.** Gráficas y ecuaciones de la calibración del sensor para la determinación de Compuestos Fenólicos.  
*c* = concentración ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

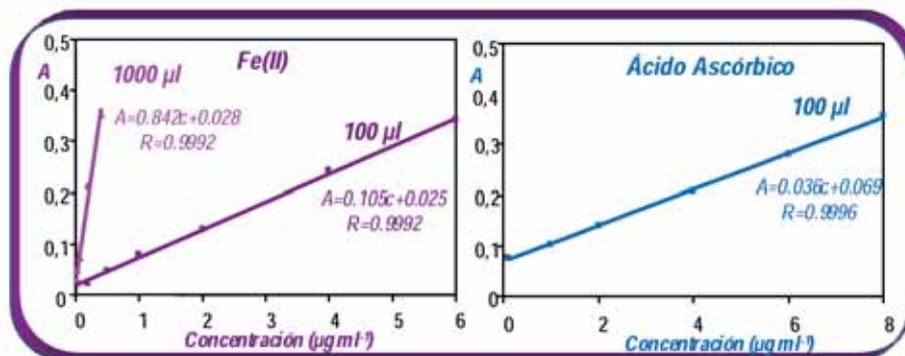
**Figura V.44.** Gráficas y ecuaciones de la calibración del sensor para la determinación de Compuestos Fenólicos. *c* = concentración ( $\text{mg ml}^{-1}$ )



**Figura V.45.** Diagrama de la calibración del 2-Naftol utilizando un volumen de inyección de 40ml

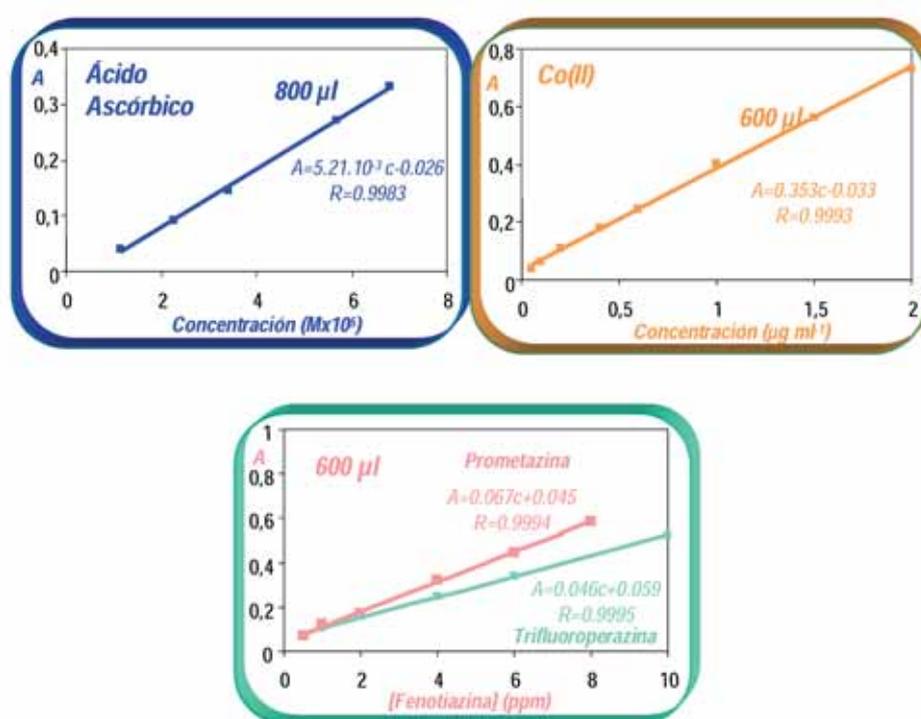
De los sensores monoparámetro con renovación de la superficie sensora, solo uno se calibró para dos volúmenes de muestra, mientras que los otros cuatro se calibraron para un solo volumen de muestra.

El sensor espectrofotométrico para la determinación de **Fe(II)** se calibró para los volúmenes de 100 y 1000 ml. Este sensor también permitía la determinación indirecta de **Ácido Ascórbico**, para la cual se realizó una calibración para un solo volumen de muestra (100 mµ).



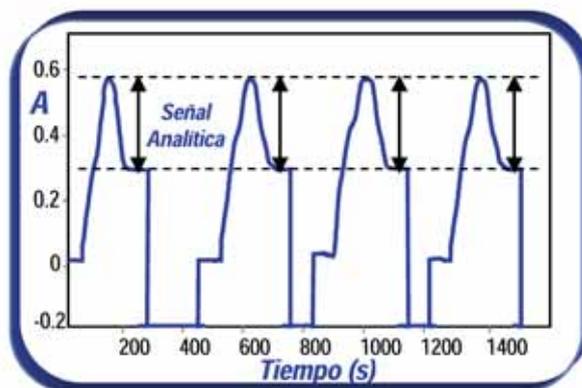
**Figura V.46.** Gráficas y ecuaciones de la calibración del sensor para la determinación directa de Fe(II) e indirecta de Ácido Ascórbico

Los sensores espectrofotométricos para la determinación de **Co(II)**, **Fenotiazinas** y **Ácido Ascórbico** se calibraron para un solo volumen de inyección de muestra. A continuación se muestran sus gráficas de calibrado y las ecuaciones de sus rectas para el volumen seleccionado en cada caso.

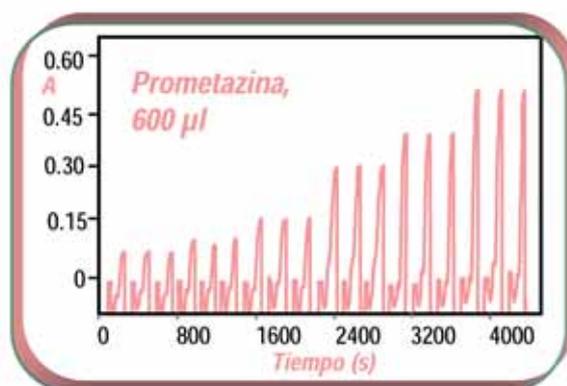


**Figura V.47.** Gráficas y ecuaciones de la calibración del sensor para los sensores de Ácido Ascórbico, Co(II) y Fenotiazinas

En el caso del sensor de Ácido Ascórbico, la señal analítica es la disminución de la absorbancia del reactivo cromogénico, Azul de Prusia, cuando es reducido por el analito. La *Figura V.48.* muestra un fiagrama como ejemplo. También se muestra el fiagrama obtenido para la calibración de una de las Fenotiazinas, Prometazina, utilizando un volumen de muestra de 600 ml (*Figura V.49.*).

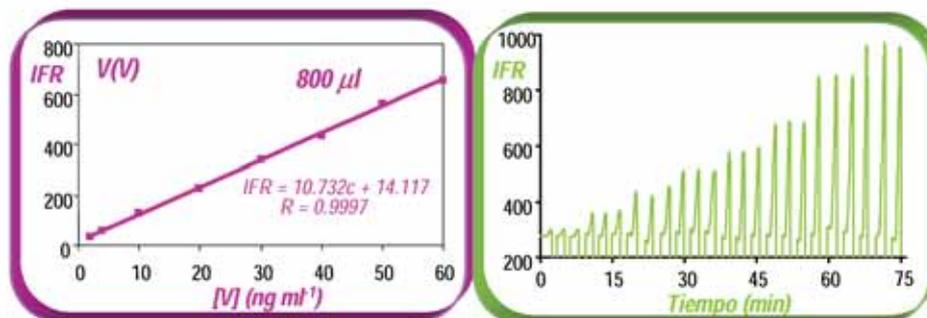


**Figura V.48.** Fiagrama de cuatro inyecciones consecutivas de Ácido Ascórbico.  $[\text{Ácido Ascórbico}] = 5.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $V_{\text{iny}} = 800 \mu\text{l}$



**Figura V.49.** Fiagrama de la calibración de Prometazina

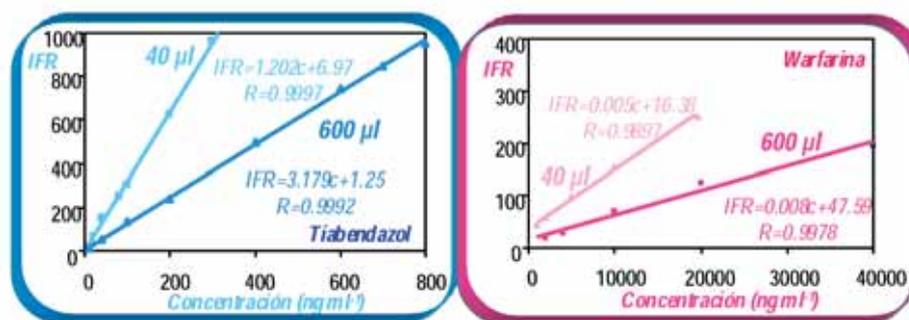
El sensor espectrofluorimétrico para la determinación de **V(V)** se calibró utilizando un volumen de muestra de 800 ml. La gráfica y ecuación de calibración se muestra a continuación junto con el fiagrama obtenido en dicha calibración.



**Figura V.50.** Gráfica y ecuación de la calibración del sensor para la determinación de V(V) y fiograma de la calibración

### 5.1.2 Sensores Biparámetro

El sensor biparámetro sin renovación de la superficie sensora y detección espectrofluorimétrica para la determinación simultánea de los pesticidas **Warfarina** y **Tiabendazol** se calibró individualmente para dos volúmenes de muestra diferentes, 40 y 600 ml, a las condiciones de trabajo previamente optimizadas. Las gráficas de las rectas de calibrado y sus ecuaciones se muestran a continuación (*Figura V.51.*).

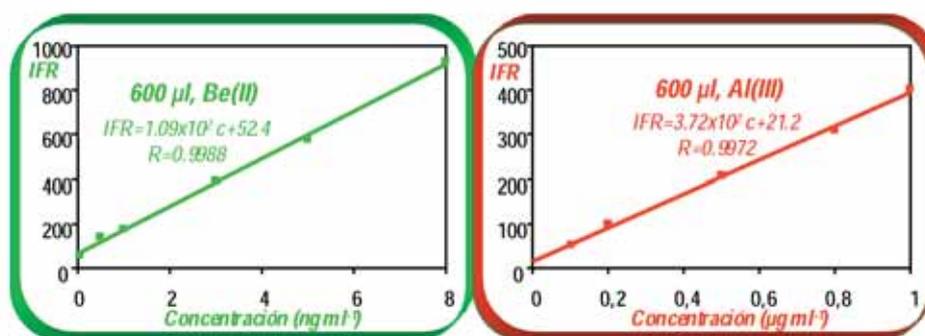


**Figura V.51.** Gráficas y ecuaciones de la calibración del sensor para la determinación de Warfarina y Tiabendazol

Los dos sensores biparámetro con renovación de la superficie sensora se calibraron para un solo volumen de inyección, 600 ml para la mezcla Be(II)-Al(III) y 1000 ml para Cu(II)-Zn(II).

En el sensor para la determinación secuencial de **Be(II)-Al(III)** se necesita una doble inyección secuencial de muestra, cada una en una disolución de

portador distinta, evitándose la potencial interferencia mutua de los dos metales. Las ecuaciones y gráficas de calibración se muestran en la *Figura V.52*.

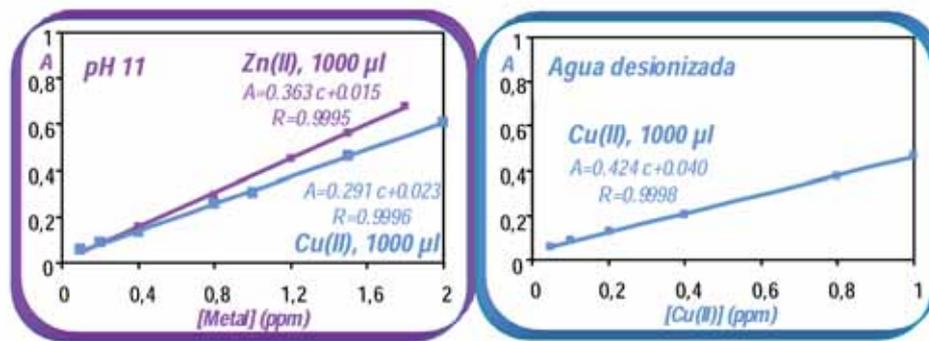


**Figura V.52.** Gráficas y ecuaciones de la calibración del sensor para la determinación de Be(II) y Al(III)

En el sensor para la determinación de **Cu(II)-Zn(II)**, aunque también se necesita una doble inyección secuencial de muestra, la resolución de la mezcla se lleva a cabo mediante otro mecanismo. Trabajando con agua desionizada (pH 5.9) como disolución portadora se produce únicamente la reacción del Cu(II) con el Zincón fijado en la resina, y por tanto, su retención, obteniendo un valor de absorbancia  $A_I$ . Una vez destruido el complejo y eluido el analito, se gira la válvula de selección para que una nueva disolución portadora (NaOH a pH 11) ponga la muestra (tras una segunda inyección) en contacto con la microzona activa. Con esta nueva inyección obtenemos un valor de absorbancia  $A_{II}$ , que corresponde a la absorbancia suma del Cu(II) y del Zn(II), dado que a este valor de pH se produce la reacción y fijación con Zincón de ambos analitos, ocurriendo además que los valores de absorbancia de los dos analitos son aditivos. Por consiguiente, de las dos inyecciones de muestra se obtienen del espectrofotómetro dos valores de absorbancia:  $A_I$  y  $A_{II}$ .

$$\begin{array}{ll} \text{pH}=5.9 & A_I = A_{\text{Cu}} \\ \text{pH}=11 & A_{II} = A_{\text{Cu}} + A_{\text{Zn}} \quad (1) \end{array}$$

Una vez realizada la calibración para cada analito, mediante ajuste por mínimos cuadrados, se obtienen las siguientes ecuaciones de las rectas que aparecen representadas en la *Figura V.53*.



**Figura V.53.** Gráficas y ecuaciones de la calibración de Cu(II) y Zn(II) a pH 11 y de Cu(II) en agua desionizada (pH 5.9)

La concentración de Cu(II) se determina directamente a partir de la señal de absorbancia obtenido en la fijación de éste a pH 5.9 (agua desionizada), es decir, a partir de  $A_I$ . Esta concentración se interpola en la recta de calibrado que corresponde al proceso de reacción y retención del Cu(II) a pH 11, obteniendo así  $A_{Cu'}$  que sería su absorbancia para este valor de pH. Una vez conocido este valor de absorbancia, y haciendo uso de la ecuación (1), podemos calcular la absorbancia correspondiente al Zn(II).

$$A_{II} = A_{Cu'} + A_{Zn}$$

$$A_{Zn} = A_{II} - A_{Cu'}$$

Con este valor de absorbancia,  $A_{Zn}$ , se podrá obtener su concentración a partir de su recta de calibrado.

La siguiente tabla resume los intervalos dinámicos lineales (RDL) para cada sensor, que se define como el intervalo de concentraciones para el que se cumple la linealidad entre la señal analítica y la concentración.

**Tabla V.6.** Resumen de los intervalos dinámicos lineales

Sensor (FIA)	$V_{iny}$ ( $\mu$ l)	Intervalo dinámico lineal	Sensor BIS-FIA	$V_{iny}$ ( $\mu$ l)	Intervalo dinámico lineal
<b>Warfarina</b>	100	50-5000 ng ml <sup>-1</sup>	<b>Fe(II)</b>	100	0.1-3.0 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>
	600	20-800 ng ml <sup>-1</sup>		1000	0.012-0.400 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>
<b>Warfarina</b> <b>Tiabendazol</b>	40	2-40 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	<b>Co(II)</b>	600	0.05-2.0 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>
	600	0.5-20 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>		<b>Al(III)</b>	600
	40	10-800 ng ml <sup>-1</sup>	<b>Be(II)</b>		600
	600	4-300 ng ml <sup>-1</sup>			
<b>1-Naftol</b> <b>2-Naftol</b> <b>3,4-Dimetilfenol</b> <b>2,4-Diclorofenol</b> <b>Fenol</b>	40	0.1-20 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	<b>Ácido Ascórbico</b>	800	5.1 10 <sup>-6</sup> -6.8 10 <sup>-5</sup> (mol l <sup>-1</sup> )
	600	0.01-5 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>		<b>Prometazina</b>	600
	40	0.1-11 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	<b>Trifluoperazina</b>		600
	600	0.01-3 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>			
	40	1-100 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	<b>Cu(II) (pH 5.9)</b>	1000	0.05-1 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>
	600	0.05-15 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>		<b>Cu(II) (pH 11)</b>	1000
	40	1-50 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	<b>Zn(II) (pH 11)</b>		1000
	600	0.05-12 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>			
	40	1-30 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	<b>V(V)</b>	800	2-60 ng ml <sup>-1</sup>
	600	0.1-10 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>			

## 5.2 Parámetros analíticos

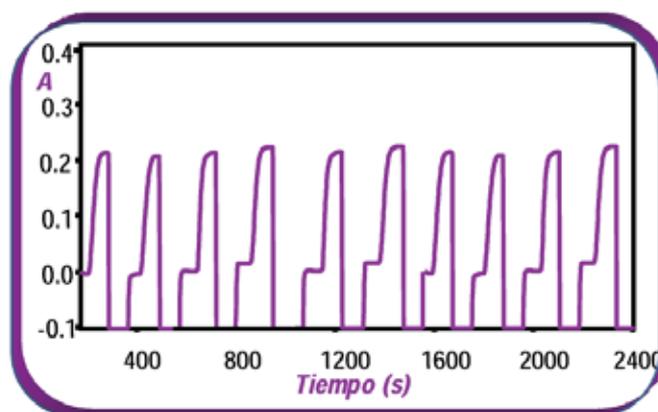
En el desarrollo de cada sensor también se estudiaron otros parámetros analíticos como la reproducibilidad, límites de detección y cuantificación, y frecuencia de muestreo.

### 5.2.1 Reproducibilidad

Con objeto de evaluar la reproducibilidad del método propuesto, para cada sensor se realizan inyecciones sucesivas de diez disoluciones de cada analito

de igual concentración con el/los volumen/es de muestra seleccionado/s en cada caso, midiendo la absorbancia o intensidad relativa de fluorescencia según el caso.

Un análisis estadístico de los datos proporciona la desviación estándar relativa (RSD) para cada sensor. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas V.7 y V.8. (Páginas 220 y 221). Como ejemplo, se muestra el fiagrama obtenido en el estudio de la reproducibilidad del sensor monoparámetro para la determinación de Fe(II).



**Figura V.54.** Fiagrama del estudio de reproducibilidad del sensor para la determinación de Fe(II)

### 5.2.2 Límite de detección y cuantificación

Por el término límite de detección de una magnitud se entiende al valor mínimo de la misma que puede afirmarse que es distinto de cero. En nuestro caso la magnitud medida es la señal analítica (absorbancia neta del analito o intensidad relativa de fluorescencia),  $Y$ . Denominaremos  $Y_L$  al límite de detección de esta magnitud, el cual corresponde a la incertidumbre sobre el valor de  $Y$  cuando ésta tiende a cero. Según el caso,  $Y_L$  es igual bien al límite de sensibilidad del aparato de medida, bien a la incertidumbre sobre los errores sistemáticos, o bien, a la incertidumbre sobre la precisión de los resultados.

Cuando  $Y$  es igual a  $Y_L$ , es decir cuando el error absoluto sobre la medida se iguala a la magnitud a determinar, entonces el valor obtenido  $Y$  cumple:

$$0 \leq Y \leq Y_b + 3\sigma$$

donde:

$Y_b$ : señal analítica media obtenida para el blanco

$\sigma$ : desviación estándar para el blanco

Se admite como límite de detección el valor<sup>442</sup>:

$$Y_L = Y_b + 3\sigma$$

El límite de detección en términos de concentración,  $c_L$ , se obtendrá usando la función de calibrado:

$$c_L = (Y_L - Y_b) / m = 3\sigma / m$$

siendo  $m$  la pendiente de la recta de calibrado.

Conforme la señal analítica ( $Y$ ) crece por encima del límite de detección, crece la concentración aparente del analito. Como criterio mínimo, la región de cuantificación debe estar claramente por encima del límite de detección.

Se admite la siguiente definición<sup>443</sup>:

$$Y_Q = Y_b + 10\sigma$$

donde:

$Y_Q$ : señal analítica correspondiente al límite de cuantificación.

$Y_b$ : señal analítica obtenida para el blanco.

$\sigma$ : desviación estándar para el blanco.

El límite de cuantificación en términos de concentración,  $c_Q$ , se obtendrá a partir de la función de calibrado:

$$C_Q = (Y_Q - Y_b) / m = 10\sigma / m$$

donde  $m$  es la pendiente de la recta de calibrado.

Para la determinación del límite de detección y cuantificación se inyectó diez veces sucesivas el blanco de cada sensor, es decir, muestras que contenían todos los componentes excepto el/los analito/s, registrándose las señales analíticas a las longitudes de onda de trabajo para los volúmenes de inyección seleccionados. Los datos se muestran en las tablas V.7. y V.8. (Páginas 220 y 221).

### **5.2.3 Frecuencia de muestreo**

La frecuencia de muestreo da una idea de la velocidad de análisis, indicando el número de muestras que se pueden analizar con los sensores propuestos en una hora.

Las variables FIA (longitud de reactor, caudal y volumen de muestra inyectado) influyen en este parámetro, de forma que cuanto menor sea la longitud del reactor (en los casos en los que sea necesario), mayor sea el caudal, y menor el volumen de muestra, mayor será la frecuencia de muestreo.

También se observa que los sensores sin renovación de la superficie sensora ofrecen una mayor frecuencia de muestreo que los de renovación, ya que este proceso de renovación tras cada inyección de muestra requiere más tiempo para cada análisis.

En las *Tablas V.7. y V.8.* aparecen también resumidas las frecuencias de muestreo obtenidas en cada sensor a cada volumen de muestra.

**Tabla V.7.** *Parámetros analíticos de los sensores sin renovación de la superficie sensora*

<i>Sensor sin renovación</i>	<i>Volumen de inyección (μl)</i>	<i>RSD(%) n=10</i>	<i>Límite de Detección</i>	<i>Límite de Cuantificación</i>	<i>Frecuencia Muestreo (h<sup>-1</sup>)</i>
<i>Warfarina</i>	100	1.98	8.8 ng ml <sup>-1</sup>	29.2 ng ml <sup>-1</sup>	20
	600	2.40	4.1 ng ml <sup>-1</sup>	13.5 ng ml <sup>-1</sup>	17
<i>Warfarina</i>	40	1.26	540 ng ml <sup>-1</sup>	1800 ng ml <sup>-1</sup>	17
	600	2.23	295 ng ml <sup>-1</sup>	980 ng ml <sup>-1</sup>	14
<i>Tiabendazol</i>	40	0.93	2.4 ng ml <sup>-1</sup>	7.80 ng ml <sup>-1</sup>	13
	600	1.21	1.3 ng ml <sup>-1</sup>	4.40 ng ml <sup>-1</sup>	11
<i>1-Naftol</i>	40	2.84	0.010 μg ml <sup>-1</sup>	0.03	22
	600	1.51	0.005 μg ml <sup>-1</sup>	0.02	17
<i>2-Naftol</i>	40	1.72	0.009 μg ml <sup>-1</sup>	0.03	19
	600	0.65	0.003 μg ml <sup>-1</sup>	0.01	16
<i>3,4-Dimetilfenol</i>	40	1.69	0.105 μg ml <sup>-1</sup>	0.35	29
	600	1.07	0.022 μg ml <sup>-1</sup>	0.07	25
<i>2,4-Diclorofenol</i>	40	3.22	0.082 μg ml <sup>-1</sup>	0.27	20
	600	1.85	0.032 μg ml <sup>-1</sup>	0.11	17
<i>Fenol</i>	40	1.47	0.073 μg ml <sup>-1</sup>	0.24	39
	600	1.48	0.027 μg ml <sup>-1</sup>	0.09	35

**Tabla V.8.** Parámetros analíticos de los sensores con renovación de la superficie sensora

Sensor con renovación	Volumen de inyección ( $\mu$ l)	RSD(%) <i>n</i> =10	Límite de Detección	Límite de Cuantificación	Frecuencia Muestreo ( <i>hr</i> <sup>-1</sup> )
<i>Fe(II)</i>	100	4.0	0.024 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	0.08 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	16
	1000	4.2	0.003 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	0.01 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	13
<i>Co(II)</i>	600	4.2	0.02 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	0.06 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	13
<i>Be(II)</i>	600	4.8	0.02 ng ml <sup>-1</sup>	0.08 ng ml <sup>-1</sup>	18
<i>Al(III)</i>	600	4.9	10 ng ml <sup>-1</sup>	34 ng ml <sup>-1</sup>	15
Ácido Ascórbico	800	5.0	4.5x10 <sup>-7</sup> mol l <sup>-1</sup>	1.5x10 <sup>-6</sup> mol l <sup>-1</sup>	13
Trifluoperazina	600	2.0	0.14 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	0.46 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	12
Prometazina	600	1.8	0.09 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	0.31 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	12
<i>Cu(II)</i> (pH 5.9)	1000	4.5	0.03 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	0.10 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	15
<i>Cu(II)</i> (pH 11)	1000	3.3	0.05 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	0.17 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	16
<i>Zn(II)</i> (pH 11)	1000	4.5	0.04 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	0.13 $\mu$ g ml <sup>-1</sup>	16
V(V)	800	4.2	0.45 ng ml <sup>-1</sup>	1.50 ng ml <sup>-1</sup>	18

## 6. Estudio de interferencias

## 6. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

Una vez realizadas las experiencias necesarias para establecer el método, optimización de variables experimentales y calibración de cada sensor para los volúmenes seleccionados, pasamos al estudio de la selectividad de los sensores para los analitos objeto de estudio. Se realiza un estudio de la interferencia que puede producirse por la presencia de distintas concentraciones de especies extrañas. Se seleccionaron como posibles interferentes aquellas especies que más frecuentemente acompañan a los analitos en las muestras reales a las que se va a aplicar cada sensor desarrollado.

Para este estudio, operando con el método propuesto para cada sensor, se trabaja con disoluciones que contienen una misma concentración de analito y cantidades variables de la especie extraña que se pretende estudiar. Se compara la señal analítica correspondiente a estas disoluciones con la obtenida con una disolución que solo contiene al analito (a la misma concentración) y se determina la tolerancia del sensor a cada una de estas especies.

Se aceptó como límite de tolerancia para la especie extraña, la concentración de ésta por encima de la cual se origina un error relativo en la medida mayor del 3%. No se consideran por tanto interferentes aquellas concentraciones de la especie extraña que producen un error relativo igual o menor que el mencionado límite. Los límites de tolerancia se expresarán como la relación peso (p:p) de la especie interferente/analito.

A continuación se exponen las peculiaridades más interesantes que se han presentado en el estudio de interferencias para los distintos sensores de esta Memoria.

## 6.1 Sensores Monoparámetro

### 6.1.1 Determinación de pesticidas

El estudio de especies interferentes en el sensor para la determinación del pesticida **Warfarina** se realizó a especies inorgánicas y otros pesticidas orgánicos, debido a que este sensor se aplicará a muestras de aguas y pesticidas comerciales. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla V.9.** Límites de tolerancia para el sensor de Warfarina

<i>Especie extraña</i>	<i>Tolerancia interferente/analito (p/p)</i>
EDTA, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	>1000
Cl <sup>-</sup>	400
Imazalil	160
Dimetoato	100
Al(III), Cu(II)	25
Cr(III)	5
1-Naftol, <i>o</i> -fenilfenol	2
Fe(II), Tiabendazol	1

Los límites de tolerancia de algunas especies interferentes estudiadas con el método propuesto se compararon con las obtenidas por espectrofluorimetría convencional en disolución. Los resultados muestran que, para otros pesticidas tales como 1-naftol, imazalil, tiabendazol u *o*-fenilfenol, los límites de tolerancia obtenidos con el método propuesto son 4, 16, 20 y 40 veces, respectivamente, mayores que los obtenidos con el método en disolución homogénea. Esto se debe a que la utilización de la fase sólida incrementa significativamente la selectividad del método, debido a la preconcentración de la warfarina en la zona sensora, aislando así el analito del resto de interferentes que quedan en la disolución, aumentando la tolerancia a los mismos. Esta mayor selectividad se debe a la naturaleza química del cambiador iónico (Sephadex QAE A-25), ya

que solo especies afines a él (especies que se encuentren cargadas negativamente) quedarán retenidas, eliminándose un gran número de interferencias.

### 6.1.2 Determinación de metales

El resto de los sensores monoparámetro desarrollados son sensores con renovación de la superficie sensora, y para cada uno de ellos también se realizó el estudio de la interferencia que produce la presencia de distintas concentraciones de especies extrañas.

En el caso del sensor para la determinación de **Fe(II)**, este estudio se realizó a otros iones extraños, cationes y aniones, que pueden estar presentes en las muestras de agua a las que se aplicará. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla V.10.** Límites de tolerancia para el sensor de Fe(II)

<i>Iones interferentes</i>	<i>Tolerancia interferente/analito (p/p)</i>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	250
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Ca <sup>2+</sup>	125
F <sup>-</sup>	100
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Al <sup>3+</sup>	20
Co <sup>2+</sup>	10
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , Mg <sup>2+</sup>	5
Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	2.5
EDTA, CN <sup>-</sup>	1

Se puede observar que para la mayoría de los iones estudiados el sensor propuesto es altamente selectivo, lo cual se debe a la reacción del analito con la Ferrozina (reactivo bastante selectivo), originando un complejo coloreado que se retiene en el soporte sólido y dando lugar así a su separación de la matriz.

De igual forma se estudió el efecto de la interferencia de varios iones en el sensor para la determinación de **Co(II)**. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

**Tabla V.11.** Límites de tolerancia para el sensor de Co(II)

<i>Iones interferentes</i>	<i>Tolerancia interferente/analito (p/p)</i>
Cl <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Na <sup>+</sup>	>500
Mn <sup>2+</sup>	500
Cd <sup>2+</sup>	200
MoO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	120
WO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	100
Al <sup>3+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Fe <sup>3+</sup>	60
Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	60*
Ni <sup>2+</sup>	50*

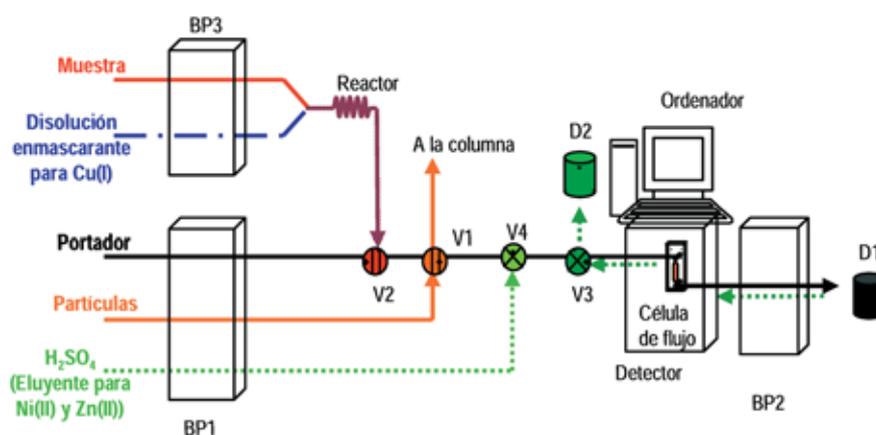
\* Resultados obtenidos con la modificación en la configuración

Originariamente, los niveles de tolerancia al Ni(II), Zn(II) y Cu(II) que se obtuvieron eran mucho más bajos que para el resto de iones estudiados (menores de 0.1), ya que la selectividad del reactivo cromogénico no es muy alta, y estos iones también reaccionan con PAN para formar complejos en las condiciones de trabajo. Por lo tanto, en presencia de estos iones la determinación de Co(II) no era posible.

Para intentar solventar este problema se realizaron modificaciones en la configuración FIA para analizar muestras con alto contenido en estos metales. Cuando la muestra contenía grandes cantidades de Cu(II) se añadía ácido ascórbico a la propia muestra, para reducir el Cu(II) a Cu(I). Esta muestra se hacía confluír con una disolución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0.05 M, *on line*, la cual enmascaraba el Cu(I), impidiendo por tanto su reacción con PAN fijo en el soporte sólido. Se observó un aumento del límite de tolerancia de 600 veces si comparamos estos resultados con los obtenidos con la configuración inicial. La modificación en el montaje se muestra en la *Figura V.55*.

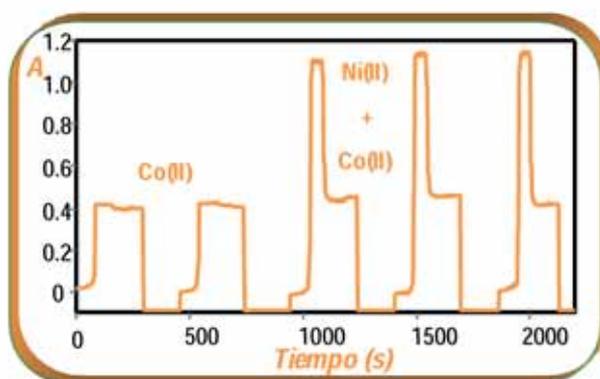
Para muestras que contenían Ni(II) o Zn(II) en grandes cantidades se realizó otra modificación de la configuración. Cuando la señal analítica llegaba a su

máximo se inyectaba 1.5 ml de una disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M, la cual, descompone los complejos que el Ni(II) y el Zn(II) forman con PAN en la superficie sensora, dejando inalterado al complejo Co-PAN, que se mantiene fijo en el soporte sólido. En estas condiciones los niveles de tolerancia obtenidos son 500 y 600 veces mayores, para el Ni(II) y Zn(II) respectivamente, que los obtenidos con la configuración inicial. La *Figura V.55*. muestra el esquema del sistema con las modificaciones necesarias para eliminar estas interferencias.



**Figura V.55.** Configuración del sistema FIA para la eliminación de las interferencias del Cu(II), Zn(II) y Ni(II) en la determinación de Co(II). V1, V2: Válvulas de inyección; V3, V4: Válvulas de selección; BP1, BP2, BP3: Bombas peristálticas; D1, D2: Desechos

A continuación se muestra un fiagrama en el que se puede observar como se elimina la interferencia debida al Ni(II).



**Figura V.56.** Fiagrama que muestra la eliminación de la interferencia de Ni(II) en la determinación de Co(II).  $[\text{Co(II)}] = 1 \text{ mg ml}^{-1}$ ;  $[\text{Ni(II)}] = 50 \text{ mg ml}^{-1}$

A partir de estos resultados se puede decir que el método desarrollado, con las correspondientes modificaciones de la configuración, es altamente selectivo, a pesar de utilizar un reactivo cromogénico poco selectivo, debido a la fuerte retención del complejo Co-PAN en la superficie sensora, así como a la posibilidad de descomponer otros complejos metal-PAN retenidos en el soporte sólido.

Un estudio similar se realizó en el sensor para la determinación de **V(V)**, probándose diferentes iones, cationes y aniones, que podrían acompañar al vanadio en las muestras reales a las que se aplicará el sensor. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla.

**Tabla V.12.** Límites de tolerancia para el sensor de V(V)

<i>Iones interferentes</i>	<i>Tolerancia interferente/analito (p/p)</i>
$\text{NO}_3^-$ , $\text{SiO}_3^{2-}$ , $\text{CO}_3^{2-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$	>500
$\text{Ni}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$	100 <sup>a</sup>
$\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mn}^{2+}$ , $\text{Sn}^{2+}$ , <sup>b</sup> $\text{Zn}^{2+}$ , <sup>b</sup> $\text{Cu}^{2+}$ , <sup>b</sup> $\text{Cd}^{2+}$	50
<sup>b</sup> $\text{Al}^{3+}$ , $\text{Be}^{2+}$	10 <sup>b</sup>
<sup>c</sup> $\text{Fe}^{3+}$	2 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Máxima relación ensayada  
<sup>b</sup>Tolerancia en presencia de EDTA ( $2.65 \times 10^{-6}$  M)  
<sup>c</sup>Tolerancia en presencia de  $\text{F}^-$  ( $5.26 \times 10^{-3}$  M)

Los interferentes más serios en la determinación de V(V) son Fe(III) y Al(III), cuyos niveles de tolerancia son 0.1 y 2, respectivamente, ya que también puede formar complejos con el reactivo fijo en el soporte sólido. Para aumentar estos límites de tolerancia se puede añadir a la muestra una determinada cantidad de agentes complejantes de estos metales. El EDTA ( $2.65 \times 10^{-6}$  M) y el  $\text{F}^-$  ( $5.26 \times 10^{-3}$  M) enmascararán al Al(III) y al Fe(III), respectivamente, formando complejos más estables que los que pueden formar con el reactivo (Rojo de Alizarina S), impidiendo la reacción con éste, y aumentando la tolerancia 20 veces para el Fe(III) y 5 veces para el Al(III).

Aunque algunos de los límites de tolerancia no sean altos, hay que tener en cuenta que la determinación de V(V) por espectrofluorimetría convencional en disolución no es posible en presencia de estos metales, ya que los niveles de tolerancia obtenidos para estos iones son del orden de 0.01 (p/p), con lo cual,

con el método propuesto se produce una notable mejora en la selectividad.

### 6.1.3 Determinación de Vitaminas y Fenotiazinas

El estudio de interferencias se realizó también para la determinación de **Ácido Ascórbico**, en cuyo caso las especies estudiadas como posibles interferentes son aquellas que acompañan a esta vitamina en fármacos, incluyendo preparados vitamínicos.

Los resultados, que se muestran en la tabla que aparece a continuación, indica que los límites de tolerancia obtenidos son bastantes altos, y en todos los casos son bastante mayores que las proporciones en las que se encuentran estas especies en los preparados farmacéuticos. Esta alta selectividad se debe a la fijación del reactivo en la superficie sensora, que permite solo la reacción con la especie de interés, mientras que la matriz de la muestra y el resto de interferentes son eliminados.

**Tabla V.13.** Límites de tolerancia para el sensor de ácido ascórbico

<i>Especies extrañas</i>	<i>Tolerancia interferente/analito (p/p)</i>
Sacarosa, Glucosa, Ácido Glutámico, Sacarina, Cafeína, Paracetamol, Ácido Acetilsalicílico, Ácido Salicílico, Ácido Cítrico, Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Vitamina B <sub>12</sub>	100 <sup>a</sup>
Vitamina B <sub>1</sub> , Vitamina B <sub>6</sub>	50
Vitamina B <sub>2</sub>	10
Vitamina A, Vitamina E	1

<sup>a</sup> Máxima relación interferente/analito ensayada

Según los resultados se puede decir que el método propuesto es altamente selectivo, ya que solo sustancias con carácter muy reductor podrían reducir al Azul de Prusia en las condiciones de trabajo, y en general, estas sustancias no aparecen en los compuestos analizados.

El último de los sensores monoparámetro es el sensor para la determinación de dos Fenotiazinas: **Prometazina** y **Trifluoperazina**. Este sensor se aplicará a diferentes fármacos de la Farmacopea Española, por lo que las especies susceptibles de ocasionar alguna interferencia son aquellas que se encuentran en dichos preparados farmacéuticos. Se observó, al igual que anteriormente, que los límites de tolerancia encontrados eran mayores que las proporciones en las que se encuentran estas especies en los preparados farmacéuticos. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla V.14.** Límites de tolerancia para el sensor de Fenotiazinas

<i>Especies extrañas</i>	<i>Tolerancia interferente/analito (p/p) (Prometazina y Trifluoperazina)</i>
Sacarosa, Glucosa, Talco, Gelatina, Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Zn <sup>2+</sup>	1250 <sup>a</sup>
Sacarina, Fructosa, Oxalato, Tartrato, Estearato magnésico, Sulfito sódico, Ácido salicílico, Paracetamol, Ácido acetilsalicílico, Cafeína	100 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Máxima relación interferente/analito ensayada

## 6.2 Sensores Biparámetro

### 6.2.1 Determinación de pesticidas

En el sensor para la determinación de los pesticidas **Warfarina** y **Tiabendazol** se realizó un estudio del efecto de algunos iones extraños y diferentes pesticidas fluorescentes. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla.

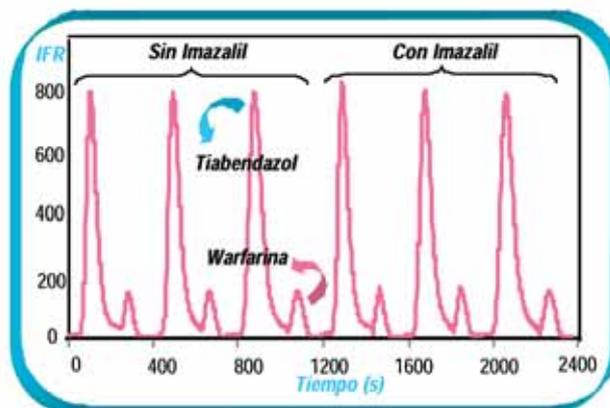
**Tabla V.15.** Límites de tolerancia para el sensor de Warfarina y Tiabendazol

<i>Especie Extraña</i>	<i>Tolerancia interferente/analito (p/p)</i>	
	<i>Tiabendazol</i>	<i>Warfarina</i>
Imazalil	100	0.5
<i>o</i> -fenilfenol	40	0.005
<i>p</i> -nitrofenol	2	25
2,4-diclorofenol	20	10
Fe <sup>3+</sup>	10	50
Al <sup>3+</sup>	10	0.2
2-naftol	0.2	0.01
1-naftol	0.1	0.02

La interferencia producida por los iones Fe<sup>3+</sup> y Al<sup>3+</sup> era debida, probablemente, a la adsorción de sus hidróxidos en la superficie del gel.

Los límites de tolerancia para algunas de las especies estudiadas obtenidos con el método propuesto fueron comparados con los obtenidos en espectrofluorimetría convencional en disolución, usando el mismo sistema, pero sin soporte sólido. Para el tiabendazol los niveles de tolerancia del método propuesto para pesticidas tales como imazalil, *o*-fenilfenol, 2-naftol, *p*-nitrofenol y 2,4-diclorofenol fueron 50, 40, 20, 4 y 2 veces, respectivamente, mayores que los obtenidos con el método en disolución. Para la warfarina este incremento en los límites de tolerancia fueron de 2.5, 2.5, 2, 1000 y 2 veces, respectivamente.

La siguiente figura muestra las intensidades relativas de fluorescencia obtenidas para Tiabendazol y Warfarina en ausencia y en presencia de Imazalil.



**Figura V.57.** Diagrama que muestra la tolerancia del pesticida Imazalil ( $10 \text{ mg ml}^{-1}$ ) en la determinación de Warfarina ( $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y Tiabendazol ( $0.6 \text{ mg ml}^{-1}$ )

### 6.2.2 Determinación de metales

Los dos sensores que resuelven mezclas binarias de metales se aplicarán, entre otros, a muestras de aguas, por lo que el estudio de especies extrañas se realizó a otros iones que podrían interferir en su determinación.

En el caso del sensor para la determinación de **A(III)-Be(II)** se estudió el efecto que estos iones extraños tenían sobre las IFRs a los dos pHs seleccionados, siguiendo la misma metodología anteriormente explicada. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

**Tabla V.16.** Límites de tolerancia para el sensor de Be(II)-Al(III)

Iones interferentes	Tolerancia interferente/analito (p/p)	
	Be(II)	Al(III)
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SiO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup>	> 500	> 500
Ca <sup>2+</sup>	35	5
Co <sup>2+</sup>	20	3
Mn <sup>2+</sup>	20	2
F <sup>-</sup>	20	1
Zr <sup>4+</sup>	10	3
Cd <sup>2+</sup>	10	1
Zn <sup>2+</sup>	5 (100) *	5
Mg <sup>2+</sup>	5 (100) *	2
Ni <sup>2+</sup>	1 (35) *	5
Fe <sup>3+</sup>	1 (20) *	0.1
Cu <sup>2+</sup>	1 (100) *	0.1

\*Los límites en paréntesis corresponden a la tolerancia en presencia de EDTA (2.68x10<sup>-4</sup> M)

Los interferentes más serios en la determinación de Be(II)-Al(III) son los iones Fe<sup>3+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, ya que también pueden reaccionar con Morina para formar complejos. Los límites de tolerancia en la determinación de Be(II) podían aumentarse añadiendo a la disolución de portador una determinada cantidad de EDTA (2.68x10<sup>-4</sup> M). El EDTA enmascara a estos iones formando complejos más estables que los que pueden formar con Morina, impidiendo la reacción con ésta.

Los bajos límites de tolerancia para el Al(III) no se aumentan con EDTA, pero hay que tener en cuenta que la determinación de Al(III) por espectrofluorimetría convencional en disolución no es posible en presencia de estas especies, ya que los niveles de tolerancia obtenidos para la mayoría de estos iones son menores de 0.01 (p/p), con lo cual, con el método propuesto se consiguen límites de tolerancia superiores al menos 10 veces.

La tolerancia a la presencia de Be(II) en la determinación de Al(III), y viceversa, resultó ser muy satisfactoria. Se repitió la calibración de cada analito en presencia

de diferentes concentraciones del otro: Al(III) en presencia de 0.1, 1.0, 10 y 100 ng ml<sup>-1</sup> de Be(II), y Be(II) en presencia de 0.01, 0.1, 1.0 y 2.0 µg ml<sup>-1</sup> de Al(III), para conocer la influencia que producía uno en el otro en el proceso de calibración. Este estudio<sup>444</sup> no mostró diferencias significativas en las pendientes de las rectas de calibración de cada uno de los analitos en estas condiciones (intervalo de confianza del 5%), comparados con los valores de las pendientes obtenidas en las rectas de calibración de los analitos por separado.

En el sensor para la determinación de **Cu(II)-Zn(II)** el estudio del efecto de iones interferentes se realizó para el Cu(II) a los dos valores de pH a los que se realiza la determinación. Los resultados obtenidos están resumidos en la *Tabla V.17.*, y muestran una alta tolerancia a la mayoría de los iones estudiados, los cuales serían serios interferentes en espectrofotometría convencional en disolución. Algunos de los interferentes más serios son Co(II), Ni(II) y Al(III) a pH 11, ya que en estas condiciones estos iones también se retienen y reaccionan con Zincón. Estas interferencias se pueden evitar en la determinación de Cu(II) trabajando a pH 5.9.

**Tabla V.17.** Límites de tolerancia para el sensor de Cu(II)-Zn(II)

Iones interferentes	Tolerancia interferente/analito (p/p)		
	Cu(II)		Zn(II)
	pH=5.9	pH=11	pH=11
Co(II)	100	2	1
Ni(II)	200	5	2
Ca(II)	100	10	100
Mg(II)	100	80	40
Be(II)	200	100	1
Mn(II)	400	200	1
Cd(II)	100	100	20
Fe(III)	5	5	1
Al(III)	100	20	2

Para concluir, de todo el estudio de interferencias realizado en los sensores de esta Memoria, podemos decir que la selectividad que presentan es realmente elevada frente a la que se obtiene con el método convencional en disolución.

## 7. Aplicaciones analíticas

## 7. APLICACIONES ANALÍTICAS

Una vez establecidos los métodos analíticos de los diez sensores de esta Memoria, pasamos a la aplicación de éstos al análisis en muestras reales. A continuación se resumen las diversas muestras a las que ha sido aplicado cada sensor:

### ***-Sensores sin renovación de la superficie sensora***

- Warfarina: Fármacos, raticidas y aguas naturales
- Warfarina-Tiabendazol: Fármacos, pesticidas y aguas naturales
- Compuestos Fenólicos: Aguas naturales

### ***Sensores con renovación de la superficie sensora***

- (1) Fe(II): (2) Fe total: (3) Ácido Ascórbico: Fármacos Aguas naturales y vinos Fármacos, zumos de frutas y líquidos conservantes
- Co(II): Fármacos, aguas naturales, aleaciones y materiales certificados
- Be(II)-Al(III): Aguas naturales y aleaciones
- Ácido Ascórbico: Fármacos, zumos de frutas, caramelos y líquidos conservantes
- Fenotiazinas: Fármacos
- Cu(II)-Zn(II): Aguas naturales, cabello humano, suelos y fármacos
- V(V): Aguas naturales, orina, suero sanguíneo y mejillones

## 7.1 Preparación de las muestras

Como se puede ver en el resumen anterior, las muestras a las que se aplicarán los sensores son de muy diferente índole, por lo que la preparación de las mismas es muy diferente dependiendo del tipo de muestra. Se detallará, por tanto, los distintos procedimientos seguidos en cada caso. Una vez obtenida la muestra en las condiciones adecuadas, se realizan en cada caso las diluciones necesarias, hasta que la concentración se encuentre dentro del intervalo de la recta de calibrado correspondiente.

### *Aguas naturales y orina*

Los sensores para la determinación de pesticidas, compuestos fenólicos y metales han sido aplicados a la determinación de estos analitos en muestras fortificadas de aguas naturales: aguas potables tomadas de distintas redes de aguas, aguas de río y aguas de pozo. Además, el sensor de vanadio también fue aplicado a muestras de orina.

Estas aguas y las muestras de orina fueron filtradas a través de una membrana Millipore de 0.45  $\mu\text{m}$ , analizándose inmediatamente.

### *Preparados farmacéuticos*

Todos los fármacos analizados se encontraban recogidos en la Farmacopea Española y contenían los analitos que se iban a determinar en diversas formas de presentación: grageas, comprimidos efervescentes, inyectables, cápsulas, sobres, jarabes, cremas y disoluciones.

Las grageas fueron molidas cuidadosamente en un mortero de ágata y disueltas en agua desionizada mediante sonicación durante 5 minutos. Los sobres, comprimidos efervescentes, cremas y los contenidos de las cápsulas se disolvieron en agua desionizada con ayuda de un baño ultrasonidos y se filtraron. Las disoluciones y jarabes se diluyeron directamente.

Solo en dos casos la preparación de la muestra era algo más compleja. Una de ellas fue la crema "Avril" (*Lab. Labaz*) en el sensor para la determinación de Cu(II) y Zn(II). La muestra se deposita en un crisol de porcelana y se mineraliza en un horno de mufla a 450 °C durante 4 horas, las cenizas se disuelven en 5ml de HCl 1 M, se filtran y se diluyen con agua desionizada<sup>84</sup>. El otro caso se produjo en el sensor para la determinación de Co(II), que se aplicó a la

determinación del Co(II) en cianocobalamina (inyectables). Para ello, la muestra se disolvió en 2 ml de agua desionizada y se realizó una mineralización húmeda, añadiendo sucesivamente 1.5 ml de HNO<sub>3</sub> y 4.5 ml de HCl y calentando durante unos minutos, cubriendo la disolución con un vidrio de reloj. A continuación se añadían 10 gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33% y 3 gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 32% y la disolución se evaporaba hasta casi sequedad<sup>265</sup>. Finalmente el residuo se disolvió en agua desionizada.

### ***Aleaciones y materiales certificados***

La muestra (0.1-0.3 g) se disolvía en 10 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado y se calentaba hasta que la reacción finalizaba, es decir, hasta la aparición de gases nitrosos, añadiendo más ácido si era necesario. A continuación se dejaba enfriar.

### ***Raticidas y pesticidas comerciales***

Las muestras líquidas se diluyeron directamente en agua desionizada, mientras que los productos sólidos se filtraron una vez que éstos estaban disueltos.

### ***Zumos de frutas y caramelos***

El zumo, obtenido con un exprimidor doméstico, se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 4 minutos a 4°C. Posteriormente se filtró a través de papel Whatman N° 42, quedando así preparado para su posterior análisis. Los zumos envasados se filtraron directamente y se diluyeron en agua desionizada.

Los caramelos se disolvieron en agua desionizada, con ayuda de un baño ultrasónicos, diluyéndose apropiadamente.

### ***Vinos y líquidos conservantes***

Se toma una alícuota de vino y se diluye directamente en agua desionizada, sin ningún tratamiento previo, mientras que en el caso de los líquidos conservantes se filtraron a través de filtros Millipore de 0.45 mm, para eliminar los posibles sólidos en suspensión, antes de diluirse.

### ***Suelos***

Se realiza una digestión con agua regia<sup>445</sup> de la muestra (1-3 g) seca y molida. Para ello se le añade 7.5 ml de HCl y 2.5 ml de HNO<sub>3</sub> por gramo de muestra. Se coloca un condensador de reflujo sobre el matraz redondo y se realiza la digestión durante 6 horas a 90°C. A continuación se deja enfriar, y se filtra la disolución. Se lava el filtro y el residuo cinco veces con unos ml de HNO<sub>3</sub> 2M caliente, y se enrasa la disolución con agua desionizada.

### ***Cabello humano***

En primer lugar, se lava el pelo con detergente y agua desionizada, aclarándolo convenientemente. Seguidamente se introduce el pelo en una estufa durante 24 horas a 110°C para que el secado sea completo. A la muestra (3-5 g), una vez seca, se le realiza una mineralización húmeda: se le añaden 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y 30 ml de HNO<sub>3</sub>, que se van adicionando en pequeños volúmenes sucesivos, calentando a ebullición hasta que la mineralización sea completa<sup>84</sup>. En este momento la disolución, aunque transparente, presenta una intensa coloración amarilla, por lo que se le añaden 25 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 33% (en volúmenes sucesivos de 5 ml) hasta la desaparición del color, produciéndose un proceso de oxidación que completa la mineralización. De esta forma, y llevando hasta casi sequedad, se obtiene un mineralizado incoloro.

### ***Suero humano***

El sensor monoparámetro de vanadio fue aplicado a muestras fortificadas de suero sanguíneo. Las muestras de suero se obtuvieron a través del Hospital Universitario "Ciudad de Jaén" (Jaén, España). Después de mezclar la muestra con un volumen equivalente de ácido tricloroacético 0.6 M para llevar a cabo su desproteinización, la muestra es centrifugada a 5000 rpm durante 5 min y filtrada a través de un filtro de membrana de 0.45 mm.

### ***Mejillones***

Las muestras de mejillones fueron llevadas rápidamente al laboratorio y acondicionadas inmediatamente: se lavaron varias veces con agua desionizada y se introdujeron después en la estufa a 100° C durante 15 minutos. Se

extrajeron los moluscos de la valva, se les eliminó el biso y se volvieron a introducir en la estufa a 70°C durante 24 horas, con corriente de aire, con el fin de proceder a su secado completo. Una vez secos, fueron molidos en un molinillo de café, manteniéndose después en la estufa a 70° C durante dos horas más, al cabo de las cuales se enfriaron durante 30 minutos en un desecador, después de lo cual se procedió a su mineralización por vía seca. La muestra se colocó en un crisol de cuarzo<sup>375</sup> y se introdujo en un horno de mufla eléctrico con circulación de aire. La temperatura se elevó hasta 550° C en un intervalo de dos horas, y se mantuvo durante dos horas más.

Las cenizas obtenidas, de color gris claro, se humedecieron con 2-3 ml de agua desionizada y se le añadieron lentamente 2 ml de disolución de NaOH 4 M. Se calentó en una placa calefactora hasta ebullición durante unos minutos. Se filtró a través de papel lavado a los ácidos (recogiendo todas las cenizas con agua desionizada templada) y se neutralizó con ácido clorhídrico, antes de llevar al volumen final.

## **7.2 Determinación en muestras reales**

Para establecer la utilidad de los métodos propuestos en esta Memoria, fueron aplicados a la determinación de los analitos en muestras reales mediante procedimientos descritos en cada caso. En todos los casos las medidas se realizaron por triplicado, para obtener la media y la desviación estándar de los datos.

### ***7.2.1 Sensores sin renovación de la superficie sensora***

#### DETERMINACIÓN DE WARFARINA

El sensor para la determinación de Warfarina se aplicó a muestras de diferente naturaleza, tales como fármacos, raticidas y aguas. En cada caso la determinación siguió el procedimiento experimental descrito, realizándose una determinación directa y un estudio de recuperación añadiendo cantidades conocidas del analito, para chequear la exactitud del método.

**Tabla V.18.** Determinación y estudio de recuperación de Warfarina en muestras reales

Muestra	Composición según fabricante	Encontrado $\pm$ SD**	Cantidad añadida ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cantidad encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)
<b>Fármaco:</b> Aldocumar (Lab. Aldo Unión)	10.0 mg/compr.	$9.8 \pm 0.4$	1.00	0.98	$97.8 \pm 0.4$
			2.00	2.05	$102.3 \pm 1.0$
			3.00	3.04	$101.4 \pm 0.8$
			4.00	3.87	$96.8 \pm 0.8$
<b>Raticida:</b> "Kol" (Lab. Kol)	0.0500%	$0.0507 \pm 0.0008$	1.00	1.01	$101.5 \pm 0.4$
			2.00	1.97	$98.5 \pm 0.6$
			3.00	2.99	$99.7 \pm 0.9$
			4.00	4.04	$100.9 \pm 0.5$
<b>Raticida:</b> "Mosfertil" (Lab. Sumagro)	0.0375%	$0.0383 \pm 0.0001$	1.00	1.02	$102.0 \pm 0.6$
			2.00	2.03	$101.5 \pm 0.6$
			3.00	2.97	$99.0 \pm 0.3$
			4.00	4.01	$100.2 \pm 0.8$
<b>Aguas:</b> Agua potable de la red de Jaén	-	-	1.00	1.02	$102.0 \pm 1.0$
			2.00	1.94	$96.8 \pm 0.6$
			3.00	3.09	$102.9 \pm 0.4$
			4.00	3.89	$97.3 \pm 0.9$

\* Valor medio  $\pm$  desviación estándar relativa (n=3)\*\* Valor medio  $\pm$  desviación estándar (n=3)

En todos los casos se observan muy buenos resultados, obteniéndose recuperaciones muy próximas al 100% y RSDs menores al 1%.

#### DETERMINACIÓN DE WARFARINA Y TIABENDAZOL

El sensor biparámetro para la determinación simultánea de los pesticidas Warfarina y Tiabendazol se aplicó a muestras de fármacos, pesticidas y raticidas comerciales, y aguas naturales.

En la determinación de fármacos se realizó una calibración por adición de patrón, ya que se observó un pequeño efecto matriz, quizás debido a los excipientes. La relación entre las pendientes de la calibración por adición de patrón y la calibración directa con estándares fue 0.810 para "Triasox" (Lab. Berna) y 0.945 para "Aldocumar" (Lab. Aldo Unión).

Los análisis se realizaron por triplicado, y los resultados obtenidos para cada preparado farmacéutico, y pesticidas y raticidas comerciales están en buena concordancia con los datos suministrados por los fabricantes:

**Tabla V.19.** Determinación de Warfarina y Tiabendazol en pesticidas, raticidas y preparados farmacéuticos

<i>Muestra</i>	<i>Composición según fabricante</i>	<i>Encontrado ± SD</i>
<b>Fármaco:</b> "Triasox" (Lab. Berna)	350 mg Tiabendazol (por cápsula)	338 ± 1
<b>Fármaco:</b> "Aldocumar" (Lab. Aldo Unión)	10 mg Warfarina (por comprimido)	9.9 ± 0.5
<b>Pesticida:</b> "Testar 60 T" (Lab. Tecnidex)	60% Tiabendazol (p/v)	57 ± 1
<b>Pesticida:</b> "Fubotec Extra" (Lab. Tecnidex)	22.5% Tiabendazol (p/v)	22 ± 1
<b>Raticida:</b> "Mosfertil" (Lab. Sumagro)	0.0375% Warfarina (p/p)	0.0362 ± 0.0004

\*Valor medio ± desviación estándar (n=3)

Para chequear la precisión y exactitud del método propuesto se realizó un estudio de recuperación para los pesticidas y raticidas comerciales, y para dos tipos de muestras de aguas (agua potable de la red de Jaén y agua de río). En todos los casos se obtuvieron muy buenas recuperaciones, entre 97.1 y 104.5 %, y desviaciones estándares relativas menores de 1.2%. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla V.20.** Estudio de recuperación para Warfarina y Tiabendazol en pesticidas, raticidas y aguas naturales

Muestra	Tiabendazol			Warfarina		
	Cantidad añadida (µg/l)	Cantidad encontrada (µg/l)	Recuperación ± RSD* (%)	Cantidad añadida (mg/l)	Cantidad encontrada (mg/l)	Recuperación ± RSD* (%)
<b>Pesticida</b> "Textar 60 T" (Lab. Tecnidex)	100	97	97.0 ± 0.8	--	--	--
	200	201	100.6 ± 0.6			
	300	291	97.6 ± 0.9			
	400	406	101 ± 1			
<b>Pesticida</b> "Fubotec Extra" (Lab. Tecnidex)	100	98	98.0 ± 0.4	--	--	--
	200	209	104.5 ± 0.4			
	400	394	98.5 ± 0.8			
	600	589	98.1 ± 0.7			
<b>Raticida</b> "Mosfertil" (Lab. Sumagro)	--	--	--	5	4.9	98.0 ± 0.7
				10	9.8	98.0 ± 0.5
				20	20.7	103.5 ± 0.6
				30	31.0	103.3 ± 0.6
Agua de la red de Jaén	100	102	102 ± 1	10	10.1	101.0 ± 0.9
	200	206	103.0 ± 0.7	20	20.3	101 ± 1
	400	411	103 ± 1	30	29.5	98 ± 1
	600	583	97.1 ± 0.9	40	40.8	102 ± 1
Agua de río	100	98.6	98.6 ± 0.8	10	9.8	98 ± 1
	200	195.8	97.9 ± 0.9	20	19.6	98 ± 1
	400	407	101.7 ± 0.9	30	29.2	97.3 ± 0.9
	600	621	103 ± 1	40	40.4	101 ± 1

\*Valor medio ± desviación estándar relativa (n=3)

### DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

En este sensor las aplicaciones se realizaron igualmente a dos tipos de aguas, agua de la red de aguas de Jaén y agua de río. En todos los casos se realizó un estudio de recuperación para chequear la exactitud del método. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas. Las recuperaciones se encuentran próximas al 100% (comprendidas entre 96.3 y 106.0%), lo cual es indicativo de la exactitud.

**Tablas V.21. y V.22.** Estudio de recuperación para los cinco Compuestos Fenólicos en aguas

<i>Muestra</i>	<i>1-naftol</i>		<i>2-naftol</i>	
	Cantidad Añadida ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)	Cantidad Añadida ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)
Agua de la red de Jaén	0.5	96.3 $\pm$ 0.5	0.5	98.2 $\pm$ 0.4
	1.5	97 $\pm$ 1	1.5	99.4 $\pm$ 0.4
	2.5	98.0 $\pm$ 0.8	2.5	98.2 $\pm$ 0.5
Agua de río	0.5	98.2 $\pm$ 0.6	0.5	99.2 $\pm$ 0.5
	1.5	99.3 $\pm$ 0.8	1.5	100.3 $\pm$ 0.6
	2.5	101.2 $\pm$ 0.4	2.5	97.8 $\pm$ 0.7

\*Valor medio  $\pm$  desviación estándar relativa (n=3)

<i>Muestra</i>	<i>Fenol</i>		<i>3,4-dimetilfenol</i>		<i>2,4-diclorofenol</i>	
	Cantidad Añadida ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)	Cantidad Añadida ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)	Cantidad Añadida ( $\mu\text{g/ml}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)
Agua de la red de Jaén	2	100 $\pm$ 1	5	95.7 $\pm$ 0.7	1	106.0 $\pm$ 0.9
	6	103.9 $\pm$ 0.9	15	100.5 $\pm$ 0.4	3	99 $\pm$ 1
	10	103.6 $\pm$ 0.8	25	97.6 $\pm$ 0.8	5	99.4 $\pm$ 0.6
Agua de río	2	103.6 $\pm$ 0.5	5	97.5 $\pm$ 0.6	1	102.1 $\pm$ 0.7
	6	98 $\pm$ 1	15	99.0 $\pm$ 0.5	3	99.2 $\pm$ 0.6
	10	101.3 $\pm$ 0.8	25	98.3 $\pm$ 0.8	5	98 $\pm$ 1

\*Valor medio  $\pm$  desviación estándar relativa (n=3)

### 7.2.2 Sensores con renovación de la superficie sensora

#### DETERMINACIÓN DE FE(II), FE TOTAL Y ÁCIDO ASCÓRBICO

##### -Fármacos

El sensor se aplicó a la determinación de Fe(II) en "Fero-gradumet" (Lab. Ross) (525 mg de sulfato de Fe(II) por comprimido) y a la determinación de Ácido Ascórbico en "Desenfrinol C" (Lab. Schering-Plough) (500 mg de ácido ascórbico, 388.8 mg de ácido acetilsalicílico, 32.4 mg de cafeína y 2 mg de maleato de clorfenamina por sobre) y en Aspirina C (Lab. Bayer) (240 mg de ácido ascórbico y 400 mg de ácido acetilsalicílico por comprimido). Después del tratamiento previo y tras diluciones apropiadas, las muestras se inyectaron por triplicado. Los resultados están de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se muestran a continuación:

**Tabla V.23.** Determinación de Fe(II) y ácido ascórbico en fármacos

Muestra	Composición según fabricante	Encontrado $\pm$ SD (%)
"Fero-gradumet" (Lab. Ross)	525 mg sulfato Fe(II)	515 $\pm$ 3
"Desenfrinol C" (Lab. Schering-Plough)	500 mg ácido ascórbico	514 $\pm$ 3
Aspirina C (Lab. Bayer)	240 mg ácido ascórbico	236 $\pm$ 5

\* Valor medio  $\pm$  desviación estándar (n=3)

Para estas mismas muestras también se realizaron estudios de recuperación a tres niveles de concentración, obteniendo recuperaciones entre 97.6% y 101.7%, con desviaciones estándares relativas menores del 3 % en todos los casos, lo que indica la utilidad del método propuesto para el análisis de rutina de preparados farmacéuticos.

**-Aguas naturales y vino**

El sensor también se aplicó a la determinación de Fe total en dos tipos de aguas naturales (agua del río Guadalquivir y agua de un pozo) y en un vino blanco ("Tío de la bota"). Se prepararon las muestras fortificando con diferentes cantidades de Fe(III). El reductor usado para pasar el Fe(III) a Fe(II) fue ácido ascórbico. Los resultados se resumen a continuación, mostrando recuperaciones muy próximas al 100%, lo que es indicativo de la buena exactitud del método.

**Tabla V.24.** Estudio de recuperación para Fe total en aguas y vino blanco

<i>Muestra</i>	<i>Hierro total</i>		
	Cantidad añadida ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cantidad encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)
Agua del río Guadalquivir	0.5	0.50	101 $\pm$ 2
	1.0	0.98	98 $\pm$ 3
	1.5	1.51	101 $\pm$ 3
Agua de pozo	0.5	0.49	100 $\pm$ 2
	1.0	0.99	99 $\pm$ 3
	1.5	1.50	100 $\pm$ 3
Vino "Tío de la Bota"	--	0.93	--
	0.25	1.18	100 $\pm$ 3
	0.5	1.44	102 $\pm$ 1
	1.0	1.92	99 $\pm$ 3

\* Valor medio  $\pm$  desviación estándar relativa (n=3)

**- Zumos de frutas y líquidos conservantes**

Por último, el sensor propuesto se aplicó a la determinación indirecta de Ácido Ascórbico en zumos de frutas y líquidos conservantes. En este caso, para contrastar la fiabilidad de los datos obtenidos se empleó como método de referencia el método oficial de la AOAC<sup>446</sup>.

Este método de la AOAC consiste en una volumetría redox basada en la reducción del 2,6-dicloroindofenol por el ácido ascórbico, siendo el indicador el mismo indofenol. En el punto final, con un pequeño exceso de indofenol, se aprecia un viraje de incoloro a rosa en medio ácido. El ácido es valorado en presencia de  $\text{HPO}_3\text{-CH}_3\text{COOH}$  para mantener la propia acidez de la reacción y evitar la oxidación del ácido ascórbico a pHs altos.

Se realiza un estudio estadístico<sup>447</sup> comparativo de la precisión y exactitud entre el método de referencia y el método propuesto. Para el cálculo de la precisión se aplicó el criterio "F" de la razón de las varianzas para un valor de significación del 5%, cuya expresión es la siguiente:

$$F_{\text{exp}} = \sigma_1^2 / \sigma_2^2$$

El valor crítico de  $F_{0.05} = 39.000$  ( $g.l_1 = g.l_2 = 2$ ).

donde:

$s_1$ : desviación estándar del método.

$s_2$ : desviación estándar del método de referencia.

$g.l_1, g.l_2$ : grados de libertad.

Para comparación de los valores medios obtenidos por ambos métodos, se calculó la desviación estándar del sistema,  $s$  y la  $t_{\text{exp}}$  a partir de las siguientes expresiones:

$$\sigma = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1)}} \quad t_{\text{exp}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

El valor de  $t_{\text{teór}}$  para un nivel de confianza del 95% y 4 grados de libertad es igual a 2.776.

En los casos en los que  $t_{\text{exp}} < t_{\text{teór}}$  no habrá diferencia significativa entre los valores de las medias obtenidas por ambos métodos, por lo que podremos afirmar en tal caso que ambos métodos arrojan el mismo resultado para una probabilidad del 95%.

En cada caso se realizaron tres determinaciones. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas entre los dos métodos, y se resumen a continuación.

**Tabla V.25.** Determinación de Ácido Ascórbico con el método propuesto y el método oficial

Muestra	Método propuesto <sup>a</sup> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Método de referencia <sup>a</sup> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	$t_{\text{calc}}^b$	$F_{\text{calc}}^c$
Zumo de naranja	477 $\pm$ 12	466 $\pm$ 4	0.16	8.33
Zumo de Limón	453 $\pm$ 10	472 $\pm$ 6	0.32	2.59
Líquido conservante de melocotón	322 $\pm$ 13	325 $\pm$ 6	0.03	4.45
Líquido conservante de salchichas	158 $\pm$ 2	159 $\pm$ 4	0.05	0.19
Líquido conservante de espárragos	104 $\pm$ 2	104 $\pm$ 4	0.03	0.30

<sup>a</sup> Valor medio  $\pm$  desviación estándar (n=3)<sup>b</sup> Valor teórico 2.772 (p=0.05)<sup>c</sup> Valor teórico 39.00 (p=0.05)

### DETERMINACIÓN DE CO(II)

El sensor de Co(II) fue aplicado a la determinación de este metal en aguas (agua del río Guadalimar y aguas residuales de una industria de aceros), aleaciones certificadas y fármacos.

Los fármacos analizados fueron:

- (1) Cromatonbic B<sub>12</sub> (1000 mg de cianocobalamina, *Lab. Menarini*) (que corresponde a 45.40 mg de Co(II) por ampolla).
- (2) Nervobion 5000 (5000 mg de cianocobalamina, 100 mg de clorhidrato de tiamina, 100 mg de clorhidrato de piridoxina, *Lab. Merck*) (que corresponde a 227.02 mg de Co(II) por ampolla).
- (3) Gingeron 400 (0.4 g de ginseng, 0.05 g clorhidrato de procaína, Sulfatos: 0.002 g Zn, 0.003 g Cu, 0.47 mg Co y 0.2 mg Mn por ampolla, *Lab. Baliarda*).

Tras los tratamientos necesarios de los preparados farmacéuticos, las determinaciones se realizaron por triplicado, encontrando resultados muy concordantes con las composiciones dadas por el fabricante, y se hicieron estudios de recuperación para chequear la exactitud del método. Se obtuvieron recuperaciones entre 99 y 103 %, con desviaciones estándares relativas menores al 4% en todos los casos, lo que indica la utilidad del método para el análisis de rutina de preparados farmacéuticos (Ver *Tabla V.26.*).

También se realizaron estudios de recuperación a dos tipos de aguas, mediante adición de Co(II) a tres niveles de concentración, obteniéndose muy buenos resultados, incluso en muestras con alto contenido de sólidos disueltos.

**Tabla V.26.** Estudio de recuperación para Co(II) en preparados farmacéuticos y aguas

Muestra	Cobalto			
	Cantidad añadida ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cantidad según fabricante ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cantidad encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)
Cromatonbic B <sub>12</sub> (Lab. Menarini)	--	0.250	0.250	--
	0.1		0.353	103 $\pm$ 3
	0.2		0.456	103 $\pm$ 4
	0.3		0.555	101 $\pm$ 3
Nervobion 5000 (Lab. Merck)	--	0.500	0.506	--
	0.2		0.704	99 $\pm$ 3
	0.4		0.915	102 $\pm$ 2
	0.6		1.100	99 $\pm$ 3
Gingeron 400 (Lab. Baliarda)	--	0.300	0.302	--
	0.1		0.404	102 $\pm$ 3
	0.2		0.499	99 $\pm$ 2
	0.3		0.605	101 $\pm$ 2
Agua del río Guadalimar (Jaén)	0.1		0.1003	100 $\pm$ 2
	0.2		0.1975	99 $\pm$ 3
	0.3		0.3041	101 $\pm$ 2
Aguas residuales	0.1		0.1007	101 $\pm$ 4
	0.2		0.2036	102 $\pm$ 4
	0.3		0.2983	99 $\pm$ 4

\*Valor medio  $\pm$  desviación estándar relativa (n=3)

Finalmente, el método se aplicó a dos aleaciones comerciales certificadas (*Bundesanstalt Für Materialforschung und-Prüfung*, BAN, Alemania), cuyas composiciones son:

- (1) ECRM 290-1: 0.911% C, 0.072% Si, 0.244% Mn, 0.016% P, 0.016% S, 4.18% Cr, 4.83% Mo, 0.329% Ni, 5.12% Co, 0.081% Cu, 0.0325% N, 1.91% V, 6.27% W.

- (2) ECRM 328-1: 0.390% C, 0.629% Si, 1.395% Mn, 0.005% P, 0.003% S, 20.54% Cr, 4.41% Mo, 20.38% Ni, 0.070% Al, 41.65% Co, 0.013% Cu, 0.027% N, 3.61% Nb, 4.16% W, 0.18% Ta, 2.40% Fe.

Las concentraciones encontradas con el método propuesto están de acuerdo con las composiciones especificadas por el fabricante (errores inferiores al 2%).

**Tabla V.27.** Determinación de Co(II) en aleaciones certificadas

Material certificado	Contenido en Co(II) (%)	Co(II) encontrado $\pm$ SD*(%)
ECRM 290-1	5.12	5.03 $\pm$ 0.08
ECRM 328-1	41.65	43.12 $\pm$ 1.00

\*Valor medio  $\pm$  desviación estándar (n=3)

Con el fin de comparar los valores medios obtenidos en el análisis de cada una de las muestras mediante la aplicación del método propuesto con los valores certificados, se hizo uso del "test t". Para ello utilizamos la siguiente expresión:

$$t_{\text{exp}} = (\mu - \bar{x}) \frac{\sqrt{n}}{s}$$

donde:

m: valor certificado

$\bar{x}$ : valor medio de las determinaciones con el método propuesto

s : desviación estándar

En los casos en los que  $t_{\text{exp}} < t_{\text{teór}}$  no habrá diferencia significativa entre los valores de las medias obtenidas por ambos métodos, por lo que podremos afirmar en tal caso que ambos métodos arrojan el mismo resultado para una probabilidad del 95%.

El valor de  $t_{\text{teór}}$  para un nivel de confianza del 95% y 2 grados de libertad es igual a 4.303. El valor de  $t_{\text{exp}}$  para el material certificado ECRM 290-1 es 1.94 y para ECRM 328-1 es 2.27. A la vista de los resultados se observa que no

existe ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los valores medios encontrados mediante la aplicación del método propuesto y los valores certificados.

#### Determinación de Be(II) y Al(III)

La aplicabilidad del sensor de Be(II) y Al(III) se ha demostrado mediante su aplicación al análisis de aguas (agua potable de la red de Jaén y agua de río), y a aleaciones sintéticas.

Para las aguas se realizaron estudios de recuperación, mediante adiciones de Be(II) y Al(III) a tres niveles de concentración distintos, obteniéndose muy buenos resultados, con recuperaciones entre el 95 y el 105 %, y RSDs inferiores al 4% en todos los casos. Los resultados aparecen reflejados en la siguiente tabla.

**Tabla V.28.** Estudio de recuperación para Be(II) y Al(III) en aguas

Muestra	Be(II)		Al(III)	
	Cantidad añadida (ng/ml <sup>-1</sup> )	Recuperación ± RSD* (%)	Cantidad añadida (μg/ml <sup>-1</sup> )	Recuperación ± RSD* (%)
Agua potable de la red de Jaén	2	100 ± 3	0.5	101 ± 4
	4	100 ± 1	0.6	98 ± 4
	6	103 ± 1	0.7	101 ± 4
Agua de Río	2	98 ± 3	0.1	95 ± 3
	4	101 ± 3	0.3	105 ± 2
	6	102 ± 3	0.5	99 ± 4

\*Valor medio ± desviación estándar relativa (n=3)

Asimismo, el sensor propuesto se aplicó al análisis de dos aleaciones sintéticas<sup>448</sup> de composiciones similares a las aleaciones base de aluminio, dada la escasez de patrones certificados de este tipo. Los contenidos en Al(III) y Be(II) de estas dos muestras y los porcentajes obtenidos con el método propuesto se resumen a continuación.

**Tabla V.29.** Determinación de Be(II) y Al(III) en aleaciones sintéticas

**Tabla V.29. Determinación de Be(II) y Al(III) en aleaciones sintéticas**

Muestra	Composición (%)		Composición encontrada ± SD (%)	
	Al(III)	Be(II)	Al(III)	Be(II)
Aleación 1	99.5	0.5	98 ± 2	0.51 ± 0.04
Aleación 2	95.0	5.0	94 ± 3	4.9 ± 0.5

\*Valor medio ± desviación estándar (n=3)

Todos los resultados muestran la buena exactitud y precisión del método propuesto para el análisis de muestras de diferente naturaleza.

#### DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Este sensor se aplicó a la determinación de Ácido Ascórbico en fármacos, zumos de frutas, caramelos y diferentes líquidos conservantes, sin eliminación previa en ningún caso de elementos interferentes.

Las composiciones de los fármacos analizados son:

- (1) Redoxón Complex (Pastillas efervescentes) (Vit. A: 1500 u.i., Vit. B1: 2 mg, Vit. B2: 2 mg, Vit. PP: 20 mg, Vit. B6: 2,5 mg, Ca-Pantotenato: 11,6 mg, Vit. H: 250 mcg, Vit. B12: 5 mcg, ácido ascórbico: 100 mg, Vit. D: 400 u.i., Vit. E: 10 mg,  $\text{CaC}_3\text{H}_5(\text{OH})_2\text{PO}_4$ : 262 mg, Fe: 12,5 mg,  $\text{MgC}_3\text{H}_5(\text{OH})_2\text{PO}_4$ : 40 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 2,05 mg,  $\text{PO}_4^{3-}$ : 45 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ : 0,39 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 2,3 mg,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : 0,25 mg, *Lab. Roche*).
- (2) Becozyme C forte (Comprimidos) (Vit. B1: 15 mg, Vit. B2: 15 mg, Vit. PP: 50 mg, Vit. B6: 10 mg, Ca-Pantotenato: 25 mg, Vit. H: 150 mcg, Vit. B12: 10 mcg, ácido ascórbico : 200 mg, *Lab. Roche*).
- (3) Actilevol Orex (Sobres efervescentes) (Vit. B1: 50 mg, Vit. B6: 50 mg, Vit. B12: 0,25 mg, ácido ascórbico: 250 mg, Ciproheptadina: 1 mg, Carnosina: 100 mg, Hematoporfirina: 3 mg, Sacarina: 25 mg, Sacarosa: 1500 mg, *Lab. Wassermann*).

Todas las muestras fueron disueltas y diluidas apropiadamente, analizándose por triplicado. En todos los casos los resultados fueron comparados con los

obtenidos por el método de referencia (método oficial de la AOAC) comentado anteriormente en el sensor para Fe(II), realizando una comparación estadística entre los resultados obtenidos por ambos métodos.

Los resultados no muestran diferencias significativas entre ambos métodos respecto a exactitud y precisión, lo que indica la utilidad del método propuesto para el análisis de rutina de los diferentes tipos de muestras. (Tabla V.30).

**Tabla V.30.** Determinación de Ácido Ascórbico en diferentes muestras reales

Muestra	Método propuesto <sup>a</sup> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Método de referencia <sup>a</sup> ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	$t_{\text{calc}}^b$	$F_{\text{calc}}^c$
Redoxón Complex	1000 $\pm$ 12	999 $\pm$ 6	0.95	2.54
Actilevol Orex	926 $\pm$ 7	933 $\pm$ 7	1.56	0.34
Becozyme C Forte	947 $\pm$ 9	960 $\pm$ 9	2.24	1.00
Líquido conservante de champiñones	377 $\pm$ 12	370 $\pm$ 7	1.10	3.06
Líquido conservante de aceitunas	62 $\pm$ 4	67 $\pm$ 6	1.45	0.43
Zumo de naranja envasado	328 $\pm$ 4	338 $\pm$ 7	2.37	0.39
Zumo de limón	442 $\pm$ 7	454 $\pm$ 7	2.61	0.84
Zumo de naranja	480 $\pm$ 11	492 $\pm$ 7	1.86	2.38
Kiwi	209 $\pm$ 4	216 $\pm$ 7	1.64	0.38
Caramelos "Vita C"	1224 $\pm$ 12	1240 $\pm$ 12	1.65	0.92

<sup>a</sup>Valor medio  $\pm$  desviación estándar (n=3)

<sup>b</sup>Valor teórico 2.772 ( $p=0.05$ )

<sup>c</sup>Valor teórico 39.00 ( $p=0.05$ )

## DETERMINACIÓN DE FENOTIAZINAS

El sensor propuesto pretende la determinación de dos Fenotiazinas, Prometazina y Trifluoperazina, en preparados farmacéuticos de diferente presentación. Se utilizaron fármacos de la Farmacopea Española, cuyas composiciones son:

- (1) Fenergán (crema). Composición por 100 g: 2 g de prometazina y excipientes: ácido esteárico, colesterol, lanolina, trietanolamina, glicerina, aroma de lavanda, cera, metil p-hidroxibenzoato, etc. (Lab. Aventis).
- (2) Fenergán (jarabe). Composición por 5 ml: 5.65 mg de prometazina, 3.75

g sacarosa, 5 ml etanol (4%), 3 mg de extracto de ipecacuana, 45 mg potasio sulfoguaiacolato. (*Lab. Aventis*).

- (3) Frinova (comprimidos). Composición por comprimido: 25 mg de prometazina y excipientes: almidón, lactosa, cera, sacarosa, levitina, estearato magnésico. (*Lab. Aventis*).
- (4) Eskazine (comprimidos). Composición por comprimido: 1 mg de trifluoperazina y excipientes: sacarosa, sulfato de Ca(II), ácido esteárico, almidón, gelatina, talco, cera, glicerina, dióxido de Ti, parafina, indigotina. (*Lab. Goldshield Pharmaceuticals*).

Los resultados encontrados con el método propuesto eran muy concordantes con las composiciones dadas por el fabricante. Además, se realizaron estudios de recuperación para chequear la exactitud del método propuesto, añadiendo cantidades conocidas de los analitos, a tres niveles de concentración. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla V.31.** Estudio de recuperación de Prometazina y Trifluoperazina en fármacos

Muestra	Cantidad añadida ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cantidad según fabricante ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cantidad encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)
<b>Prometazina</b>				
"Fenergán" (Jarabe) ( <i>Lab. Aventis</i> )	--	1.000	0.976	--
	1		1.951	97 $\pm$ 3
	3		4.012	101 $\pm$ 3
	5		6.055	102 $\pm$ 1
"Fenergán" (Crema) ( <i>Lab. Aventis</i> )	--	1.500	1.478	--
	1		2.460	99 $\pm$ 3
	3		4.551	102.4 $\pm$ 0.5
	5		6.449	99 $\pm$ 1
"Frinova" ( <i>Lab. Aventis</i> )	--	1.000	0.953	--
	1		1.922	97 $\pm$ 3
	3		4.079	103 $\pm$ 2
	5		6.015	101 $\pm$ 2
<b>Trifluoperazina</b>				
"Eskazine" ( <i>Lab. Goldshield Pharmaceuticals</i> )	--	3.000	2.819	--
	1		3.801	99 $\pm$ 3
	3		5.877	102 $\pm$ 2
	5		7.856	101 $\pm$ 2

\*Valor medio  $\pm$  desviación estándar relativa (n=3)

Las recuperaciones obtenidas están muy próximas al 100%, entre 97 y 103%, con RSDs menores al 3% en todos los casos.

### DETERMINACIÓN DE CU(II) Y ZN(II)

El sensor se aplicó a la determinación de Cu(II) y Zn(II) en muestras de diferente naturaleza, así como a la determinación de cada metal por separado. Se determinó la cantidad de Cu(II) y Zn(II) en tres tipos de aguas (agua de dos redes de aguas y un agua de río), y en un fármaco que contenía los dos analitos. También se determinó Cu(II) en suelos, y Zn(II) en cabello humano y fármacos. Tras los tratamientos y diluciones apropiadas de las muestras, se inyectaron por triplicado siguiendo el procedimiento descrito, sin ningún proceso previo de eliminación de interferencias.

Para las aguas se realizaron estudios de recuperación, adicionando cantidades conocidas de los analitos a tres niveles de concentración. Se obtuvieron recuperaciones entre 94 y 105%, con desviaciones estándares relativas menores al 6%. Los resultados se muestran a continuación.

**Tablas V.32. y V.33.** Estudios de recuperación de Cu(II) y Zn(II) en aguas

Muestra	Cu(II) Portador: agua desionizada (pH 5.9)		
	Cantidad añadida ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cantidad encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)
Agua del río Jaén (Jaén)	0.20	0.19	96 $\pm$ 4
	0.40	0.39	99 $\pm$ 4
	0.60	0.59	99 $\pm$ 3
Agua de la red de Jaén	0.20	0.19	94 $\pm$ 2
	0.40	0.38	95 $\pm$ 2
	0.60	0.63	105 $\pm$ 3
Agua de la red de Torredonjimeno	0.20	0.19	98 $\pm$ 5
	0.40	0.41	103 $\pm$ 2
	0.60	0.62	103 $\pm$ 3

\*Valor medio  $\pm$  desviación estándar relativa (n=3)

Muestra	Cu(II) Portador: agua desionizada (pH 5.9)		
	Cantidad añadida ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cantidad encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)
Agua del río Jaén (Jaén)	0.20	0.19	96 $\pm$ 4
	0.40	0.39	99 $\pm$ 4
	0.60	0.59	99 $\pm$ 3
Agua de la red de Jaén	0.20	0.19	94 $\pm$ 2
	0.40	0.38	95 $\pm$ 2
	0.60	0.63	105 $\pm$ 3
Agua de la red de Torredonjimeno	0.20	0.19	98 $\pm$ 5
	0.40	0.41	103 $\pm$ 2
	0.60	0.62	103 $\pm$ 3

\*Valor medio  $\pm$  desviación estándar relativa (n=3)

Para el resto de las muestras analizadas se realizaron determinaciones directas, y en el caso de observar efecto matriz, se realizó un método de adición de patrón. Para contrastar la fiabilidad de los datos obtenidos se empleó como método de referencia un método por ICP-masas, y se realizó el estudio estadístico comparativo de la precisión y exactitud entre el método de referencia y el método propuesto.

Las composiciones de los preparados farmacéuticos son:

- (1) "Avril" (crema): Por gramo: acetotartrato de aluminio 2.5 mg, cloruro de benzalconio 1 mg, aceite de hígado de bacalao 70 mg, óxido de zinc 200 mg. (*Lab. Labaz*).
- (2) "Acnosan" (solución) Por litro: alcanfor 12.80 g, ácido undecilénico 8.75 g, ácido bórico 6.45 g, resorcina 1.94 g, ácido salicílico 1.2 g, sulfato de zinc 0.13 g, sulfato de cobre 0.13 g. (*Lab. R. Bescansa*).

Los resultados de las determinaciones y del estudio estadístico se muestran en la siguiente tabla, obteniendo muy buena concordancia entre los resultados obtenidos con ambos métodos.

**Tabla V.34.** Determinación Cu(II) y Zn(II) con el método propuesto y el método de referencia (ICP-masas)

Muestra	Cu(II) Portador: pH 11			Zn(II) Portador: pH 11		
	Cantidad añadida ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cantidad encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)	Cantidad añadida ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Cantidad encontrada ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	Recuperación $\pm$ RSD* (%)
Agua del río Jaén (Jaén)	0.40	0.42	104 $\pm$ 4	0.20	0.20	100 $\pm$ 3
	0.80	0.79	97 $\pm$ 2	0.40	0.41	102 $\pm$ 2
	1.20	1.25	98 $\pm$ 3	0.60	0.60	100 $\pm$ 1
Agua de la red de Jaén	0.40	0.39	99 $\pm$ 4	0.20	0.20	100 $\pm$ 6
	0.80	0.83	101 $\pm$ 3	0.40	0.41	103 $\pm$ 6
	1.20	1.20	100 $\pm$ 2	0.60	0.85	97 $\pm$ 1
Agua de la red de Torred.	0.40	0.41	104 $\pm$ 4	0.20	0.20	100 $\pm$ 5
	0.80	0.78	97 $\pm$ 2	0.40	0.41	102 $\pm$ 4
	1.20	1.18	98 $\pm$ 3	0.60	0.61	101 $\pm$ 5

\*Valor medio  $\pm$  desviación estándar relativa (n=3)

#### DETERMINACIÓN DE V(V)

El sensor de V(V) fue aplicado a la determinación de este metal en aguas (agua de pozo y agua potable de la red de Jaén), fluidos fisiológicos (suero y orina) y mejillones.

Para las aguas y los fluidos fisiológicos se realizaron estudios de recuperación, para chequear la exactitud del método propuesto, añadiendo V(V) a tres niveles de concentración en cada caso. Para el suero sanguíneo fue necesario realizar una calibrado por adición de patrón, debido al alto efecto matriz encontrado. Los resultados de estos estudios se resumen en la siguiente tabla.

**Tabla V.35.** Estudios de recuperación de V(V) en aguas y fluidos fisiológicos

Muestra	Cantidad añadida (ng ml <sup>-1</sup> )	Cantidad encontrada (ng ml <sup>-1</sup> )	Recuperación ± RSD* (%)
Agua de pozo	10	10.66	107 ± 5
	20	19.64	98 ± 5
	30	30.12	100 ± 2
Agua de la red de Jaén	10	9.59	96 ± 4
	20	19.30	96 ± 5
	30	29.73	99 ± 2
Orina	10	10.76	108 ± 3
	20	20.98	105 ± 2
	30	29.85	99 ± 4
Suero	10	10.71	107 ± 4
	20	19.12	96 ± 3
	30	30.60	102 ± 3

\*Valor medio ± desviación estándar relativa (n=3)

Los resultados de recuperación se encuentran en el intervalo comprendido entre 96 y 108 %, lo cual confirma la validez del método propuesto.

Para la muestra de mejillones se realizaron determinaciones directas. En estas muestras fue necesario añadir  $5.26 \times 10^{-3}$  M de una disolución de F<sup>-</sup> con objeto de enmascarar al Fe(III). El resultado obtenido con el método propuesto fue una concentración de V(V) de  $2.1 \pm 0.2$  mg g<sup>-1</sup>. Para contrastar la fiabilidad de los datos obtenidos se empleó como método de referencia un método por ICP-masas, obteniéndose una concentración de V(V) de  $1.99 \pm 0.08$  mg g<sup>-1</sup>. A continuación, se realizó una comparación estadística entre el método propuesto y el método de referencia. Los resultados obtenidos de este estudio fueron  $F_{\text{calc}} = 3.325$  y  $t_{\text{calc}} = 0.073$ , siendo el valor crítico de  $F_{0.05} = 39.000$  y el valor de  $t_{\text{teór}} = 2.776$ . Estos resultados no muestran diferencias significativas entre ambos métodos respecto a exactitud y precisión, lo que indica la utilidad del método propuesto para el análisis de rutina de los diferentes tipos de muestras.

## VI. Conclusiones y perspectivas

## CONCLUSIONES

Los objetivos iniciales que han presidido la presente Memoria han sido el desarrollo de nuevos métodos de análisis por inyección en flujo no segmentado con detección espectroscópica en fase sólida, basados en la medida de una propiedad intrínseca del(os) analito(s) o del producto de reacción de éste(os) con un reactivo cromogénico o fluorogénico, por fijación del(os) mismo(s) sobre un soporte sólido (resina de cambio iónico o gel de sílice C<sub>18</sub>) e integración de dicha retención con la detección espectrofotométrica (UV y visible) y espectrofluorimétrica.

Como consecuencia del estudio realizado, se han obtenido las siguientes conclusiones generales:

- 1) Se han desarrollado dos sensores en flujo monoparámetro sin renovación de la superficie sensora que permiten: (1) la determinación espectrofotométrica UV, rápida y directa de cinco Compuestos Fenólicos en aguas, y (2) la determinación espectrofluorimétrica del pesticida Warfarina en aguas y productos comerciales.
- 2) Se ha desarrollado un sensor biparámetro sin renovación de la superficie sensora para la determinación fluorimétrica de los pesticidas Warfarina y Tiabendazol. Se ha contribuido así al desarrollo de un sensor que emplea la estrategia de una precolumna, *on line*, para conseguir la secuenciación temporal en la llegada de los analitos a la zona de detección, basándose en el comportamiento diferencial de los mismos en su cinética de retención-elución en dicha precolumna.
- 3) Por primera vez se propone el uso de la espectroscopía con inyección de partículas o microesferas ("*Bead Injection Spectroscopy*") para el desarrollo de sensores de inyección en flujo con renovación de la superficie sensora, empleando células de flujo comerciales. Se ha demostrado que esta metodología es idónea cuando la retención del analito en el soporte sólido

es tan fuerte que es difícil o no es posible su elución, y está basada en la inyección de un volumen exacto de una suspensión homogénea de partículas (soporte sólido) que queda atrapado en la célula de flujo. Al final del análisis, las partículas son desechadas, reemplazándose la superficie sensora tras cada medida con una nueva inyección de partículas.

- 4) Los sensores monoparámetro con renovación de la superficie sensora propuestos utilizan: (1) detección espectrofotométrica (visible) para la determinación de cationes metálicos (Fe(II) y Co(II)) y principios activos (Fenotiazinas y Ácido Ascórbico), y (2) detección fluorimétrica para la determinación de V(V). Estos sistemas están basados en reacciones de derivación con reactivos cromogénicos o fluorogénicos, previamente fijados sobre el soporte sólido, por lo que se trata de sensores que integran reacción, retención y detección. En el sensor para la determinación de Fenotiazinas (Prometazina y Trifluoperazina) las reacciones derivadoras tienen lugar *on line*, antes de la llegada del analito a la zona de detección.
- 5) El uso de dos disoluciones portadoras diferentes, convenientemente seleccionadas, y un reactivo fluorogénico o cromogénico previamente retenido en la superficie sensora, nos han permitido la resolución secuencial en modo automático de mezclas de metales, Be(II)-Al(III) y Cu(II)-Zn(II) en una gran variedad de muestras reales. Constituyen los primeros sensores biparámetro con renovación de la superficie sensora y detección espectrofluorimétrica y espectrofotométrica que operan de esta forma.
- 6) El empleo de un soporte sólido activo en la zona de detección proporciona, en todos los casos, un incremento considerable de la sensibilidad, así como una exaltación de la selectividad con respecto al método convencional en disolución. Gracias al empleo de este soporte sólido la retención, separación y la detección (y reacción en algunos casos) se producen al mismo tiempo y en mismo lugar del sistema de flujo.
- 7) Se han estudiado y optimizado las variables experimentales que afectan a la respuesta de los sensores, con objeto de trabajar en condiciones más favorables en cada caso. Dichas variables se han clasificado en cuatro categorías: variables de la unidad de retención-detección (o reacción-retención-detección), variables químicas, variables del sistema de flujo continuo y variables instrumentales (solo en el caso de sensores espectrofluorimétricos).
- 8) Se ha demostrado la dependencia de la sensibilidad con el volumen de muestra inyectado. Por ello, en algunos sensores se ha realizado la calibración para varios volúmenes de muestra, lo cual dota de gran versatilidad a los sensores en flujo, ya que ello permite la determinación de los analitos dentro de amplios intervalos de concentración.
- 9) El estudio de las interferencias originadas por un elevado número de especies orgánicas e inorgánicas, que acompañan a cada analito en las muestras

reales a los que se aplican los sensores indica que estos sensores propuestos muestran una elevada selectividad, como consecuencia del empleo del soporte sólido que permite la retención selectiva del(os) analito(s) de interés. En los casos en los que se han detectado interferencias serias, se han propuesto modificaciones que permiten el empleo de los sensores en presencia de estas especies.

- 10) Se ha demostrado la aplicabilidad de los sensores propuestos para el análisis de muestras de muy diversa naturaleza, demostrándose su utilidad para el control analítico de rutina de fármacos, productos industriales, aleaciones, aguas naturales, fluidos biológicos, etc. La exactitud de los métodos se chequeó con estudios de recuperación, y/o comparación con otros métodos, incluidos métodos de referencia.
- 11) Los sensores con renovación de la superficie sensora que se recogen en esta Memoria aportan una nueva estrategia en el desarrollo de los sensores en flujo continuo. Constituyen una respuesta sencilla al desarrollo y avance en este campo de la Química Analítica, aportando métodos sencillos, económicos y rápidos para la resolución de problemas analíticos reales en el campo del análisis farmacéutico y medioambiental. A su vez, abren nuevas perspectivas para el desarrollo de futuras tendencias que se muestran muy prometedoras en este campo de investigación.

## PERSPECTIVAS

Para ampliar el campo de los sensores en flujo con renovación de la superficie sensora se está desarrollando un trabajo de investigación en el campo de la espectroscopía vibracional, concretamente Microscopía Confocal Raman. Dicho trabajo está basado en el empleo de un campo de ultrasonidos aplicado sobre diferentes tipos de partículas (fases sólidas) ubicadas en una célula de flujo especialmente diseñada, produciéndose una concentración de dichas partículas en una reducida zona de la célula, lo cual hace innecesario el empleo de lana de vidrio para retener las partículas en la célula. Por consiguiente, se produce un drástico aumento de intensidad en los espectros Raman de las especies que interaccionan con estas partículas. Se trata, por tanto, de una nueva estrategia en el campo de la espectroscopía en fase sólida donde las partículas se agrupan por ultrasonidos, produciendo, de igual forma que en los sensores expuestos en esta Memoria, una preconcentración de los analitos y por tanto un sustancial aumento de la sensibilidad.

Dicha metodología ha sido aplicada al desarrollo de un sistema de flujo con detección SERS (Espectroscopía Raman Sensibilizada en Superficie). La fase sólida empleada es una resina de intercambio catiónico, Sephadex SP C-25.

Tras inyectar un volumen determinado de una suspensión de esta resina con  $\text{AgNO}_3$  y aplicar un campo de ultrasonidos sobre la célula de flujo, las partículas se agrupan formando la fase sólida sobre la cual se va a retener el analito. A continuación, se inyecta una disolución de hidroxilamina al 1% para reducir los iones ( $\text{Ag}^+$ ) y formar una película de plata metálica en la superficie de dichas partículas. Por último, se inyecta el analito, 9-aminoacridina, reteniéndose en dicha superficie y obteniendo así los correspondientes espectros Raman. Tras las medidas se anula el campo de ultrasonidos y se produce el vaciado de la célula con el propio sistema en flujo, sin necesidad de una inversión del sentido del flujo, quedando ésta preparada para la siguiente inyección.

Además de la 9-aminoacridina, también se pretende aplicar la misma metodología a otros analitos tales como Rodamina 6G y Azul de Metileno.

Con estos sistemas se pretende dar un paso más en el campo de aplicación de los sensores en flujo con renovación de la superficie sensora, haciendo uso además de la Espectroscopía Raman, un sistema de detección al que hasta hace poco tiempo se le ha venido prestando escasa atención en el campo del análisis químico.

## VII. Bibliografía

- [1] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Automatic Methods of Analysis*, Elsevier, 1988.
- [2] J. Ruzicka, G.D. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, 237 (1990) 329.
- [3] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 78 (1975) 145.
- [4] K.K. Stewart, G.R. Beecher, P.E. Hare, *Anal. Biochem*, 70 (1970) 167.
- [5] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, J. Wiley, New York, 1981.
- [6] M.F. Mousavi, A. Jabbari, S. Nouroozi, *Talanta*, 45 (1998) 1247.
- [7] A. Molina Díaz, I. Ortega Carmona, M.I. Pascual Reguera, *Talanta*, 47 (1998) 531.
- [8] A. A. Ensafi, A. Kazemzadeh, *Anal. Chim. Acta*, 382 (1999) 15.
- [9] C. Sánchez Pedreño, M.S. García, M.I. Alberro, J. Rodríguez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11 (1993) 933.
- [10] P. Solich, C.K. Polydorou, M.A. Koupparis, C.E. Efstathiou, *Anal. Chim. Acta*, 438 (2001) 131.
- [11] A. Ensafi, B. Rezaei, *Microchem. J.*, 60 (1998) 75.
- [12] J.A. Murillo Pulgarín, L.F. García Bermejo, *Anal. Chim. Acta*, 333 (1996) 59.
- [13] J.L. Vilchez, M.C. Valencia, A. Navalón, B. Molinero, L.F. Capitán, *Anal. Chim. Acta*, 439 (2001) 299.
- [14] W. Baumann, *Z Anal. Chem.*, 310 (1982) 239.
- [15] A. Townshend, J.A. Murillo Pulgarin, M.T. Alanon Pardo, *Anal. Chim. Acta*, 488 (2003) 81.
- [16] P. Camping Falcó, L.A. Tortajada Genaro, F. Bosch Reig, *Talanta*, 55 (2001) 403.
- [17] A. Safavi, M.R. Baezzat, *Anal. Chim. Acta*, 368 (1998) 113.
- [18] S. Garrigues, M. Gallignani, M. de la Guardia, *Talanta*, 40 (1993) 89.

- [19] M.L. Ramos, J.F. Tyson, D.J. Curran, *Anal. Chim. Acta*, 364 (1998) 107.
- [20] S. Armenta, G. Quintás, J. Moros, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, 468 (2002) 98.
- [21] M.J. Ayora Cañada, A. Ruiz Medina, B. Lendl, *Appl. Spectr.*, 55 (2001) 356.
- [22] B. Lendl, R. Schindler, *Vibrat. Spectr.*, 19 (1999) 1.
- [23] R. Schindler, B. Lendl, R. Kellner, *Anal. Chim. Acta*, 366 (1998) 35.
- [24] A. Berthod, J.J. Laserna, J.D. Winefordner, *Appl. Spectros.*, 41 (1987) 1137.
- [25] N. Weissenbacher, B. Lendl, J. Frank, H.D. Wanzenbock, B. Mizaikoff, R. Kellner, *J. Mol. Struct.*, 410-411 (1997) 539.
- [26] M.J. Ayora Cañada, A. Ruiz Medina, J. Frank, B. Lendl, *Analyst*, 127 (2002) 1365.
- [27] J. Li, G. Liu, H. Ma, *Fenxi Kexue Xuebao*, 11 (1995) 23.
- [28] H.H. Stuting, I.S. Krull, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2107.
- [29] Y.H. Sung, S.D. Huang, *Anal. Chim. Acta*, 492 (2003) 165.
- [30] A.N. Anthemidis, G.A. Zachariadis, J.A. Stratis, *Talanta*, 60 (2003) 929.
- [31] N.M.M. Coelho, A.C. da Silva, C.M. da Silva, *Anal. Chim. Acta*, 460 (2002) 227.
- [32] G.E. Roscoe, R. Miles, C.G. Taylor, *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 439.
- [33] L.L. Sombra, M.O. Luconi, L.P. Fernández, R.A. Olsina, M.F. Silva, L.D. Martínez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2003), 1451.
- [34] E. Neide, V.M. Carrilho, J.A. Nóbrega, T.R. Gilbert, *Talanta*, 60 (2003) 1131.
- [35] N.V. Semenova, L.O. Leal, R. Forteza, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta*, 486 (2003) 217.
- [36] J.J. Pedrotti, I.G.R. Gutz, *Talanta*, 60 (2003) 695.
- [37] G.F. Khan, W. Wernet, *Anal. Chim. Acta*, 351 (1997) 151.
- [38] A. Liu, E.K. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 280 (1993) 223.
- [39] R. De Marco, B. Pejcic, M. Loan, M. Wilcox, *Talanta*, 57 (2002) 115.
- [40] A.P.S. Paim, C.M.N.V. Almeida, B.F. Reis, R.A.S. Lapa, E.A.G. Zagatto, J.L.F. Costa Lima, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28 (2002) 1221.
- [41] H.Hara, F. Izumiyama, *Anal. Chim. Acta*, 355 (1997) 211.
- [42] R.E. Gyurcsányi, Z. Fehér, G. Nagy, *Talanta*, 47 (1998) 1021.

- [43] F. Torabi, K. Ramanathan, P.O. Larsson, L. Gorton, K. Svanberg, Y. Okamoto, B. Danielsson, M. Khayyami, *Talanta*, 50 (1999) 787.
- [44] K. Grudpan, P. Sritharathikhun, J. Jakmunee, *Anal. Chim. Acta*, 363 (1998) 199.
- [45] F.A. Inon, F.J. Andrade, M.B. Tudino, *J. Flow. Inject. Anal.*, 19 (2002) 137.
- [46] M. Fujimoto, *Bull. Chem. Soc.*, 27 (1954) 48.
- [47] K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi, *Talanta*, 23 (1976) 499.
- [48] L.F. Capitán Vallvey, N. Navas Iglesias, I. De Orbe Payá, R. Avidad Castañeda, *Talanta*, 43 (1996) 1457.
- [49] F. Capitán, L.F. Capitán Vallvey, M.D. Fernández, I. De Orbe Payá, R. Avidad Castañeda, *Anal. Chim. Acta*, 331 (1996) 141.
- [50] K. Yoshimura, H. Waki, *Talanta*, 32 (1985) 345.
- [51] P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdova, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán Vallvey, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 353 (1997) 115.
- [52] P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 271.
- [53] M.L. Fernández de Córdova, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357 (1997) 44.
- [54] M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán Vallvey, *Anal. Chim. Acta*, 348 (1994) 1668.
- [55] C.A. Heller, R.R. McBride, M.A. Ronning, *Anal. Chem.*, 49 (1977) 2251.
- [56] F. Capitán, G. Sánchez Palencia, A. Navalón, L.F. Capitán Vallvey, J.L. Vílchez, *Anal. Chim. Acta*, 259 (1992) 345.
- [57] A. Molina Díaz, J.M. Herrador Mariscal, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán Vallvey, *Talanta*, 40 (1993) 1059.
- [58] M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán Vallvey, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349 (1994) 722.
- [59] L.F. Capitán Vallvey, E.J. Alonso, R. Avidad, M. del Olmo, J.L. Vílchez, *Anal. Sci.*, 9 (1993) 117.
- [60] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 20 (1999) 247.
- [61] J.L. Vílchez, M. del Olmo, R. Avidad, L.F. Capitán Vallvey, *Analyst*, 119 (1994) 1211.
- [62] K. Yoshimura, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2922.

- [63] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Analyst*, 118 (1993) 593.
- [64] K. Yoshimura, S. Matsuoka, T. Tabuchi, H. Waki, *Analyst*, 117 (1992) 189.
- [65] M. de la Torre, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Talanta*, 39 (1991) 869.
- [66] F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 214 (1988) 217.
- [67] S. Matsuoka, K. Yoshimura, A. Tateda, *Anal. Chim. Acta*, 317 (1995) 207.
- [68] K. Yoshimura, U. Hase, *Analyst*, 116 (1991) 835.
- [69] M. Agudo, A. Ríos, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 281 (1993) 103.
- [70] P. Richter, M.D. Luque, M. Valcárcel, *Anal. Lett.*, 25 (1992) 2279.
- [71] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, 394 (1999) 149.
- [72] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 365 (1999) 619.
- [73] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, 404 (2000) 131.
- [74] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, L.F. Capitán Vallvey, *Talanta*, 49 (1999) 691.
- [75] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 21 (1999) 983.
- [76] S. Ortega Algar, N. Ramos Martos, A. Molina Díaz, *Talanta*, 60 (2003) 313.
- [77] B. Fernández Band, F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 229 (1990) 117.
- [78] A. Domínguez Vidal, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, *Microchim. Acta*, 141 (2003) 157.
- [79] P. Ortega Barrales, A. Domínguez Vidal, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (2001) 619.
- [80] M.L. Fernández de Córdoba, P. Ortega Barrales, G. Rodríguez Torné, A. Molina Díaz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 11 (2003) 669.
- [81] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, 173 (1985) 3.
- [82] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Analyst*, 118 (1993) 593.

- [83] Z. Zweidinger, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, 42 (1976) 639.
- [84] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, 375 (1998) 71.
- [85] J. Ruzicka, L. Scampavia, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 257 A.
- [86] J. Ruzicka, C.H. Pollema, K.M. Scudder, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 3566.
- [87] H.H.W. Thijssen, *Pestic. Sci.*, 43 (1995) 73.
- [88] A.S. Gallus, *Blood Rev.*, 2 (1988) 95.
- [89] J. Colomina, J. Buesa, E. Jordá, S. Belda, R. Borrás, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 12 (1994) 103.
- [90] R. Marín Galvín, "Química, Microbiología, Tratamiento y Control Analítico de Aguas", Ed. Servicio de Publicaciones Universidad de Córdoba.
- [91] J.W. Moore, S. Ramamourthy, *Organic Chemicals in Waters Applied Monitoring and Impact Assessment*. Springer, Berlín Heidelberg New York Tokio, 1984.
- [92] J.J. D'Amico, F.G. Bollinger, "Synthesis and Chemistry of Agrochemical II", Symposium Series 443, *American Chemical Society*, Washington DC, 1991, pp. 300-320.
- [93] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR), 2001, Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los E.E.U.U., Servicio de Salud Pública.
- [94] A. Muñoz de la Pena, A. Espinosa Mansilla, J.A. Murillo Pulgarin, A. Alanon Molina, P. Fernández López, *Talanta*, 48 (1999) 1061.
- [95] J.A. Murillo Pulgarin, L.F. García Bermejo, *Anal. Chim. Acta*, 333 (1996) 59.
- [96] P. Richter, J. M. Fernández Romero, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Chromatographia*, 34 (1992) 445.
- [97] L.M. Cabalin, A. Ruperez, J.J. Laserna, *Anal. Chim. Acta*, 318 (1996), 203.
- [98] N. Dantan, W. Frenzel, S. Koppers, *Chromatographia*, 54 (2001) 187.
- [99] H. F. Schroeder, *J. Chromatogr. A*, 777 (1997) 127.
- [100] O. Jiménez de Blas, S. Vicente Gonzalez, R. Seisedos Rodríguez, J. Hernández Méndez, *J. AOAC Internat.*, 77 (1994) 441.
- [101] A. Martínez, M. Cruz Moreno, C. Cámara, *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1877.
- [102] K. Yoshimura, S. Matsuoka, Y. Inokura, U. Hase, *Anal. Chim. Acta*, 268

- (1992) 225.
- [103]** K. Yoshimura, S. Nawata, G. Kura, *Analyst*, 115 (1990) 843.
- [104]** A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, 404 (2000) 131.
- [105]** A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *Talanta*, 50 (1999) 277.
- [106]** L.F. Capitán Vallvey, M.C. Valencia, G. Mirón, *Anal. Chim. Acta*, 289 (1994) 365.
- [107]** M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363 (1999) 59.
- [108]** K. Yoshimura, *Analyst*, 13 (1988) 471.
- [109]** D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 345.
- [110]** K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi, *Talanta*, 25 (1978) 579.
- [111]** D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Microchem. J.*, 44 (1991) 215.
- [112]** M.T. Tena, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, 119 (1994) 1625.
- [113]** A. Domínguez Vidal, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, *Talanta*, 56 (2002) 1005.
- [114]** A. Domínguez Vidal, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, *J. Phar. Biomed. Anal.*, 28 (2002). 721.
- [115]** M.T. Tena, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. Sci.*, 30 (1992) 269.
- [116]** E. Vereda, A. Ríos, M. Valcárcel, *Analyst*, 122 (1997) 85.
- [117]** D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 261 (1992) 269.
- [118]** N. Lacy, G.D. Christian, J. Ruckica, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 1482.
- [119]** R. Schindler, B. Lendl, R. Kellner, *Anal. Chim. Acta*, 366 (1998) 35.
- [120]** D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 345.
- [121]** M.T. Tena, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, 119 (1994) 1625.
- [122]** M. Mayer, J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 3808.

- [123] J. Ruzicka, *Analyst*, 123 (1998) 1617.
- [124] O. Egorov, J. Ruzicka, *Analyst*, 120 (1995) 1959.
- [125] J. Ruzicka, *Analyst*, 119 (1994) 1925.
- [126] B. Willumsen, G.D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 3482.
- [127] J. Ruzicka, A. Ivaska, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 5024.
- [128] B. Dockendorff, D.A. Colman, G.D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Commun.*, 35 (1998) 357.
- [129] J.W. Grate, O.B. Egorov, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 779A.
- [130] D.H. Holman, G.D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1763.
- [131] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual reguera, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, 375 (1998) 71.
- [132] R.M. Cuenca Trujillo, M.J. Ayora Cañada, A. Molina Díaz, *J. AOAC Int.*, 85 (2002) 1268.
- [133] A. Ruiz Medina, P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *J. AOAC Inter.*, 85 (2002) 369.
- [134] A. Molina Díaz, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28 (2002) 399.
- [135] F. Álava Moreno, M.J. Valencia González, A. Sanz Medel, M.E. Díaz García, *Analyst*, 122 (1997) 573.
- [136] B.S. Vicente de la Riva, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro, A. Sanz Medel, *Anal. Chim. Acta*, 395 (1999) 1.
- [137] Z. Gong, Y. Huang, Z. Zhang, *Fenxi Huaxue*, 32 (2004) 641.
- [138] R.B. Lowry, C.E. Williams, J. Braven, *Talanta*, 63 (2004) 961.
- [139] P. Ortega, M.J. Ayora, A. Molina, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Analyst*, 124 (1999) 579.
- [140] A. Edelmann, B. Lendl, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 1474.
- [141] M. Haberkorn, P. Hinsmann, B. Lendl, *Analyst*, 127 (2002) 109.
- [142] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow-Through (Bio)chemical sensors*, Elsevier (1994).
- [143] P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, 376 (1998) 227.
- [144] A. Molina Díaz, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363 (1999) 92.
- [145] P. Ortega Barrales, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A.

- Molina Díaz, *Anal. Sci.*, 15 (1999) 985.
- [146] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22 (2000) 59.
- [147] A. Ruiz Medina, M.G. García Marín, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *Microchem. J.*, 65 (2000) 325.
- [148] A. Domínguez Vidal, J.F. García Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, *Anal. Letters*, 35 (2002) 2433.
- [149] F.S. Hunter, *J. Chromatogr.*, 321 (1985) 255.
- [150] J.M. Steyn, H.M. van der Merwe, *J. Chromatogr.*, 378 (1986) 258.
- [151] C. Banfield, M. Rowland, *J. Pharm. Sci.*, 72 (1967) 192.
- [152] Y.W.J. Wong, P.J. Davis, *J. Chromatogr. A*, 469 (1989) 281.
- [153] J. Dalbacke, I. Dahlquist, C. Persson, *J. Chromatogr. A*, 507 (1990) 381.
- [154] F.B. Fishwick, A. Tayler, *Analyst*, 92 (1967) 192.
- [155] P.G. Welling, K.P. Lee, V. Khanna, J.C. Wagner, *J. Pharm. Sci.*, 59 (1970) 162.
- [156] C.S.P. Sastry, T. Thirupathi Rao, A. Sailaja, J. Venkateswara Rao, *Talanta*, 38 (1991) 1107.
- [157] H.C. Hollifield, J.D. Winefordner, *Talanta*, 14 (1967) 103.
- [158] S. Panadero, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito, *Talanta*, 40 (1993) 225.
- [159] J.J. Vanelli, E.M. Schulman, *Anal. Chem.*, 56 (1984) 1030.
- [160] F. García Sánchez, C. Cruces Blanco, *Anal. Chim. Acta*, 222 (1989) 177.
- [161] J.C. Márquez, M. Hernández, F. García Sánchez, *Analyst*, 115 (1990) 1003.
- [162] S. Ishiwata, M. Kamiya, *Chemosphere*, 34 (1997) 783.
- [163] H. Satoh, M. Hayashi, S. Satoh, *J. Phar. Pharmacol.*, 34 (1982) 429.
- [164] P. Gareil, J.P. Gramond, F. Guyon, *J. Chromatogr.*, 615 (1993) 317.
- [165] J.L. Vílchez, J. Rohand, A. Navalón, R. Avidad, L.F. Capitán Vallvey, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354 (1996) 470.
- [166] G. de Armas, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta*, 47 (2002) 173.
- [167] G. de Armas, M. Miró, J. M. Estela, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta*, 467(2002)

- 13.
- [168] R. Mestre, M. Campo, J. Tourte, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 63 (1970) 160.
- [169] F. García Sánchez, C. Cruces Blanco, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 323.
- [170] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, J.F. Fernández Sánchez, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 19.
- [171] D. Picón Zamora, J.L. Martínez Vidal, M. Martínez Galera, A. Garrido Frenich, J.L. López González, M.R. Arahal, *Talanta*, 60 (2003) 335.
- [172] A. Collinge, A. Noirfalise, *J. Chromatogr. A*, 257 (1983) 416.
- [173] F.S. Hunter, *J. Chromatogr.*, 321 (1985) 255.
- [174] R.J. Bushway, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 431.
- [175] A. di Muccio, S. Girolimetti, D. Attard Barbini, P. Pelosi, T. Generali, L. Vergori, G. de Merulis, A. Leonelli, P. Stefanelli, *J. Chromatogr. A*, 833 (1999) 61.
- [176] M. Fernández, R. Rodríguez, Y. Picó, J. Mañes, *J. Chromatogr. A*, 912 (2001) 301.
- [177] N. Yoshioka, Y. Akiyama, K. Teranishi, *J. Chromatogr. A*, 1022 (2004) 145.
- [178] L.F. Garcia, J.J. Aaron, *Mikrochim. Acta*, 126 (1997) 289.
- [179] G. de Armas, E. Becerra, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta*, 427 (2001) 83.
- [180] J.A. Garcia Calzón, A.J. Miranda Ordieres, J.L. Muñiz Alvarez, J.M. López Fonseca, *J. Electroanal. Chem.*, 427 (1997) 29.
- [181] R. Rodríguez, Y. Picó, G. Font, J. Mañes, *J. Chromatogr. A*, 949 (2002) 359.
- [182] F. Capitán, E. Alonso, R. Avidad, L.F. Capitán Vallvey, J.L. Vilchez, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 1336.
- [183] J. Rodier, *Análisis de las aguas*, Ed. Omega, Barcelona, 1981
- [184] A.E. Greenberg (Ed), *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 15<sup>o</sup> ed., American Public Health Association, Washington, 1980.
- [185] British Standards Institution, British Standard, 1356 068, Sección 2.12, 1990, p.2.
- [186] C. Kang, Y. Wang, R. Li, Y. Du, J. Li, B. Zhang, L. Zhou, Y. Du, *Microchem. Journal*, 2000, 64,161.

- [187] L. Álvarez Rodríguez, J. Esteve Romero, I. Escriba Tena, *J. AOAC Intern.*, 85 (1999) 937.
- [188] S. Koch, G. Ackermann, P. Lindner, *Talanta*, 39 (1992) 693.
- [189] F. Bosch, G. Font, J. Mañes, *Analyst*, 112 (1987) 1335.
- [190] W.A. MacCrehan, J.M. Brown Thomas, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 477.
- [191] L.J. Magee, J. Osteryoung, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2625.
- [192] A. Brega, P. Prandini, C. Amaglio, E. Pafumi, *J. Chromatogr.*, 535 (1990) 311.
- [193] L.N. Amankwa, W.G. Kuhr, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1733.
- [194] E.J. Nanni, M.E. Lovette, R.D. Hicks, K.W. Fowler, M.F. Borgerding, *J. Chromatogr.*, 550 (1990) 365.
- [195] D.S. Ignjafofic, N.S. Vukelic, *J. Serb. Chem. Soc.*, 1993, 58, 705.
- [196] Y.I. Korenman, T.N. Ermolaeva, E.A. Podolina, *J. Anal. Chem.*, 51 (1996) 447.
- [197] J.L. Besombes, S. Cosmer, P. Labbe, G. Reverdy, *Anal. Lett.*, 28 (1995) 405.
- [198] B. Fuhrmann, U. Spohn, *Biosensors and Bioelectronics*, 13 (1998) 895.
- [199] C. Kwode, R. Voigtlander, K. Cammann, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 342 (1992) 426.
- [200] W. Frenzel, J. Frenzel, J. Moeller, *Anal. Chim. Acta*, 261 (1992) 253.
- [201] Z. Zhi, A. Ríos, M. Valcárcel, *Analyst*, 121 (1996) 1.
- [202] A. Cladera, E. Gómez, J.M. Estela, V. Cerdá, *Anal. Chim. Acta*, 267 (1992) 95.
- [203] F. Navarro Villoslada, L.V. Pérez Arribas, M.E. León González, L.M. Polo Díez, *Anal. Chim. Acta*, 308 (1995) 238.
- [204] A. Cladera, M. Miró, J.M. Estela, Víctor Cerdà, *Anal. Chim. Acta*, 421 (2000) 155.
- [205] L. Melnick, H. Freiser, H.F. Beeghly, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 856.
- [206] P. Baily, *Anal. Chem.*, 29 (1957) 1534.
- [207] E. Jackwerth, E.L. Schneider, *Anal. Chem.*, 207 (1965) 188.
- [208] A.R. Jha, R.K. Mishra, *Analyst*, 106 (1981) 1150.
- [209] A.E. Harvey, J.A. Smart, E.S. Amis, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 26.
- [210] J.O. Hibbits, W.F. Davis, M.R. Menke, *Talanta*, 8 (1961) 163.

- [211] E.M. Penner, W.R. Inman, *Talanta*, 9 (1962) 1027.
- [212] J. Hernández Méndez, A. Alonso Mateos, E.J. Martín Mateos, *Microchem. J.*, 30 (1984) 157.
- [213] T.V. Popova, O.V. Domracheva, *Zabod. Lab.*, 57 (1991) 7.
- [214] M. Tsuchiya, Y. Iwanami, *Anal. Sci.*, 6 (1990) 701.
- [215] M.Y. Khuhawar, G.Q. Khaskheli, *J. Chem. Soc. Pak.*, 12 (1990) 52.
- [216] L.L. Stookey, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 779.
- [217] B. Jaselkis, S.J.J. Nelapaty, *J. Anal. Chem.*, 44 (1972) 379.
- [218] G.F. Kirkbright, T.S. West, C. Woodward, *Anal. Chim. Acta*, 36 (1966) 298.
- [219] G.F. Yan, G.R. Shi, Y.M. Liu, *Anal. Chim. Acta*, 264 (1992) 121.
- [220] B.S. Seidel, W. Faubel, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 360 (1998) 795.
- [221] G.G. Muntyanu, *J. Anal. Chem.*, 53 (1998) 277.
- [222] K. Ogura, Y. Miwa, *J. Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.*, 111 (1980) 253.
- [223] M. Hidalgo, R. Montes, J.J. Laserna, A. Ruperez, *Anal. Chim. Acta*, 318 (1996) 229.
- [224] Z.L. Ma, Y.P. Wang, C.X. Wang, F.Z. Miao, W.X. Ma, *Talanta*, 44 (1997) 743.
- [225] G. Zhuang, Z. Yi, G.T. Wallace, *Mar. Chem.*, 50 (1995) 41.
- [226] P. Bermejo, R. Domínguez, A. Bermejo, *Talanta*, 45 (1997) 325.
- [227] G.A. Zachariadis, E.S. Raidou, D.G. Themelis, J.A. Stratis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28 (2002) 463.
- [228] J. Álvarez, L.M. Marcó, J. Arroyo, E.D. Greaves, R. Rivas, *Spectrochim. Acta B*, 58 (2003) 2183.
- [229] M.J. Anjos, R.T. Lopes, E.F.O. de Jesús, S. Moreira, R.C. Barroso, C.R.F. Castro, *Spectrochim. Acta B*, 58 (2003) 2227.
- [230] C. Duyck, N. Miekeley, C.L. Porto da Silveira, P. Szatmari, *Spectrochim. Acta B*, 57 (2002) 1959.
- [231] K.L. Chen, S.J. Jiang, *Anal. Chim. Acta*, 470 (2002) 223.
- [232] K. Sreenivasa Rao, T. Balaji, T. Prasada Rao, Y. Babu, G.R.K. Naidu, *Spectrochim. Acta B*, 57 (2002) 1333.
- [233] M.L. Adams, K.J. Powell, *Anal. Chim. Acta*, 433 (200) 289.

- [234] R.C. de Campos Costa, A. Nova Araújo, *Anal. Chim Acta*, 438 (2001) 227.
- [235] C.I. Measures, J. Yuan, J.A. Resing., *Mar. Chem.*, 50 (1995) 3.
- [236] M. Kass, A. Ivaska, *Talanta*, 58 (2002) 1131.
- [237] F. Capitán, R. Checa, R. Avidad, L.F. Capitán Vallvey, *Talanta*, 42 (1995) 711.
- [238] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357 (1997) 44.
- [239] M.I. Pascual Reguera, I. Ortega Carmona, A. Molina Díaz, *Talanta*, 44 (1997) 1793.
- [240] O. Tomicek, F. Freiburger, *J. Amer. Chem. Soc.*, 57 (1935) 801.
- [241] G.E.F. Lundell, J.I. Hoffman, *J. Ind. Eng. Chem.*, 13 (1921) 540.
- [242] D. Salyer, T.R. Sweet, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1632.
- [243] K.J. McNaught, *Analyst*, 67 (1942) 97.
- [244] N. Uri, *Analyst*, 72 (1947) 478.
- [245] J. Zbiral, L. Sommer, *Z. Anal. Chem.*, 306 (1981) 129.
- [246] F. García Sánchez, A. Navas, J.J. Laserna, A. Arbaizar, *Analyst*, 107 (1982) 35.
- [247] G. Demetrius, G.A. Themelis, J.A. Zachariadis, *Analyst*, 120 (1995) 1593.
- [248] J. Hernández Méndez, A. Alonso Mateos, E.J. Martín Mateos, *Microchem. J.*, 30 (1984) 12.
- [249] M.S. Carvalho, I.C.S. Fraga, K.C.M. Neto, E.Q. Silva Filho, *Talanta*, 43 (1996) 1675.
- [250] Q. Ma, Q.E. Cao, Y. Zhao, S. Wu, Z. Hu, Q. Xu, *Food Chem.*, 71 (2000) 123.
- [251] B.S. Garg, J.S. Bist, R.K. Sharma, N. Bhojak, *Talanta*, 43 (1996) 2093.
- [252] B.S. Garg, R.K. Sharma, J.S. Bist, N. Bhojak, S. Mittal, *Talanta*, 48 (1999) 49.
- [253] I. Narin, M. Soylak, *Talanta*, 60 (2003) 215.
- [254] Y.M. Liu, E.B. Liu, J.K. Cheng, *J. Chromatogr. A*, 939 (1991) 91.
- [255] W. Buchberger, O.P. Semenova, A.R. Timerbaev, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 16 (1993) 153.
- [256] Z.Q. Zhang, S.Z. Chen, H.M. Lin, H. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, 272

- (1993) 227.
- [257]** D. Zendelovska, G. Pavlovska, K. Cundeveva, T. Stafilov, *Talanta*, 54 (2000) 139.
- [258]** J. Chen, K.C. Teo, *Anal. Chim. Acta*, 434 (2001) 325.
- [259]** Q. Zhang, H. Minami, S. Inoue, I. Atsuya, *Anal. Chim. Acta*, 407 (2001) 147.
- [260]** K. Sreenivasa Rao, T. Balaji, T. Prasada Rao, Y. Babu, G. R. K. Naidu, *Spectrochim. Acta B*, 57 (2002) 1333.
- [261]** B. Marin, M. Valladon, M. Polve, A. Monaco, *Anal. Chim. Acta*, 342 (1997) 91.
- [262]** M.Y. Khuhawar, S.N. Lanjwani, *Talanta*, 46 (1998) 485.
- [263]** T. Okutani, Y. Tsukada, A. Sakuragawa, T. Yamaji, S. Morita, *J. Chromatogr. A*, 788 (1997) 45.
- [264]** T. Nakashima, K. Yoshimura, H. Waki, *Talanta*, 37 (1990) 735.
- [265]** M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán Vallvey, *Anal. Lett.*, 25 (1992) 1961.
- [266]** O. Hernández, A.I. Jiménez, F. Jiménez, J.J. Arias, *Anal. Chim. Acta*, 310 (1995) 53.
- [267]** Q. Lin, A. Guiraúm, R. Escobar, F.F. de la Rosa, *Anal. Chim. Acta*, 283 (1993) 379.
- [268]** T. Braun, M.N. Abbas, *Anal. Chim. Acta*, 119 (1980) 113.
- [269]** K. Yoshimura, Y. Toshimitsu, S. Ohashi, *Talanta*, 27 (1980) 693.
- [270]** M. Thakur, M.K. Deb, *Talanta*, 49 (1999) 561.
- [271]** H. Watanabe, *Talanta*, 21 (1974) 295.
- [272]** E.K. Paleologos, M.I. Prodromidis, D.L. Giokas, A.C.H. Pappas, M.I. Karayannis, *Anal. Chim. Acta*, 467 (2002) 205.
- [273]** L. Shoupu, Z. Mingqiao, D. Chuanyue, *Talanta*, 41 (1994) 279.
- [274]** Y.W. Min, N.Z. Ming, *Spectrochim. Acta B*, 49 (1994) 1067.
- [275]** C. Gonçalves Magalhães, K. L. Alves Lelis, C. Aparecida Rocha, J.B. Borba da Silva, *Anal. Chim. Acta*, 464 (2002) 323.
- [276]** A. Profumo, G. Spini, L. Cucca, M. Pesavento, *Talanta*, 57 (2002) 929.
- [277]** A. Martín Esteban, P. Fernández, C. Pérez Conde, A. Gutiérrez, C. Cámara, *Anal. Chim. Acta*, 304 (1995) 121.
- [278]** Y. Yamini, J. Hassan, R. Mohandesi, N. Bahramifar, *Talanta*, 56 (2002)

- 375.
- [279] L. Chia Chen, K. Mao Sung, *Anal. Sci.*, 18 (2002) 607.
- [280] A. Afkhami, T. Madrakian, A.A. Sal, A.A. Sehat, *Anal. Chim. Acta*, 437 (2001) 17.
- [281] F.D. Snell, *Photometric and Fluorimetric methods of Analysis. Metals. Part 1*, Wiley, New York, 1978.
- [282] C. Jiang, F. He, *Spectrochim. Acta A*, 59 (2003) 1321.
- [283] K. Morisige, *Anal. Chim. Acta*, 73 (1974) 245.
- [284] L. Quinti, N.S. Allen, M. Edge, B.P. Murphy, A. Perotti, *J. Photochem. and Photobiol. A*, 155 (2003) 79.
- [285] F. Salinas, A. Muñoz de la Peña, J.A. Murillo, *Analyst*, 109 (1984) 1135.
- [286] C.I. Park, K.W. Cha, *Talanta*, 51 (2000) 769.
- [287] J. Zhang, H. Xu, J.L. Ren, *Anal. Chim. Acta*, 405 (2000) 31.
- [288] Y.M. Hao, H.X. Shen, *Spectrochim. Acta A*, 56 (2000) 1013.
- [289] N.K. Agnihotri, H.B. Singh, R.L. Sharma, V.K. Singh, *Talanta*, 40 (1993) 415.
- [290] F. Capitán, E. Manzano, A. Navalón, J.L. Vilchez, L.F. Capitán Vallvey, *Talanta*, 39 (1992) 21.
- [291] M.C. Valencia, S. Boudra, J.M. Bosque Sendra, *Anal. Chim. Acta*, 327 (1996) 73.
- [292] P. Fernández, C. Pérez Conde, A. Gutiérrez, C. Cámara, *Talanta*, 38 (1991) 1387.
- [293] D.B. Do Nascimento, G. Schwedt, *Anal. Chim. Acta*, 283 (1993) 909.
- [294] C. Brach Papa, B. Coulomb, J.L. Boudenne, V. Cerda, F. Theraulaz, *Anal. Chim. Acta*, 457 (2002) 311.
- [295] H.L.J. Zermatten, *Prod. Acad. Sci. Ámsterdam*, 36 (1933) 899.
- [296] M.H. Fletcher, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 551.
- [297] R.A. Geiger, E.B. Sandell, *Anal. Chim. Acta*, 16 (1957) 346.
- [298] S.M.Z. Al Kindy, F.O. Suliman, S.B. Salama, *Microchem. J.*, 74 (2003) 173.
- [299] W. Fusheng, T. Enjiang, W. Zhongxiang, *Talanta*, 37 (1990) 947.
- [300] F. Hernández Hernández, J. Medina Escriche, M.T. Gasco Andreu, *Talanta*, 33 (1986) 537.

- [301] S. Skowronski, *A.S.T.M. Bull*, 174 (1951) 60.
- [302] A.J. Lindsey, *Analyst*, 63 (1938) 159.
- [303] D.L. Carpenter, A.D. Hopkins, *Analyst*, 77 (1952) 86.
- [304] C.L. Wilson, D.W. Wilson, *Comprehensive Analytical Chemistry: Classical Análisis*, Vol. I, Ed. Elsevier, p. 371 (1962).
- [305] S.Z. Haider, M.H. Khundkar, *Anal. Chim. Acta*, 12 (1955) 1.
- [306] J. Hernández Méndez, B. Moreno Cordero, *Analyst*, 107 (1982) 787.
- [307] J.S. Fritz, D.J. Pietrzyk, *Talanta*, 8 (1961) 143.
- [308] T. Katsura, *Jpn. Anal.*, 10 (1961) 366.
- [309] J.S. Fritz, J.E. Abbink, *Anal. Chem.*, 37 (1965) 1274.
- [310] N.T. Basta, M.A. Tabatabai, *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, 54 (1990) 1289.
- [311] J.H. Shofstahl, J.K. Ardí, *J. Chromatogr. Sci.*, 28 (1990) 225.
- [312] P. Ritchter, J.M. Fernández Romero, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Chromatographia*, 34 (1992) 445.
- [313] S. Levi, R.C. Fortin, W.C. Purdy, *Anal. Chim. Acta*, 127 (1981) 103.
- [314] E.D. Suttie, E.W. Wolff, *Anal. Chim. Acta*, 258 (1992) 229.
- [315] S. Levi, W.C. Purdy, *Anal. Chim. Acta*, 116 (1980) 375.
- [316] J.T. Olejko, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 53 (1976) 480.
- [317] K. Sreenivasa Rao, T. Balaji, T. Prasada Rao, Y. Babu, G.R.K. Naidu, *Spectrochim. Acta B*, 57 (2002) 1333.
- [318] J. Szpunar, J. Bettmer, M. Robert, H. Chassaingne, K. Cammann, R. Lobinski, O.F.X. Donard, *Talanta*, 44 (1997) 1389.
- [319] K. Kilian, K. Pyrzynska, *Talanta*, 60 (2003) 669.
- [320] M.R. Martínez de la Barrera, J.J. Laserna, F. García Sánchez, *Anal. Chim. Acta*, 147 (1983) 303.
- [321] M. Santiago, A. Navas, J.J. Laserna, F. García Sánchez, *Mikrochim. Acta*, 2 (1983) 197.
- [322] J. Hoste, J. Eeckhout, J. Gillis, *Anal. Chim. Acta*, 9 (1953) 263.
- [323] G.F. Smith, W.H. McCurdy Jr., *Anal. Chem.*, 24 (1952) 371.
- [324] J. Ghasemi, A. Niazi, R. Leardi, *Talanta*, 59 (2003) 311.
- [325] Q. Wu, Y. Ding, *Fenxi Shiyanshi*, 13 (1994) 11.
- [326] J. Ghasemi, S. Ahmadi, K. Torkestani, *Anal. Chim. Acta*, 487 (2003) 181.

- [327] N. Maniasso, E.A.G. Zagatto, R.E. Santelli, *Anal. Chim. Acta*, 331 (1996) 17.
- [328] J. Ghasemi, A. Niazi, R. Leardi, *Talanta*, 59 (2003) 311.
- [329] P. Rumori, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta*, 486 (2003) 227.
- [330] O. Jiménez de Blas, R. Seisdedos Rodríguez, J. Hernández Méndez, J.A. Sánchez Tomero, B. de León Gómez, S. Vincente González, *J. AOAC Intern.*, 77 (1994) 722.
- [331] S. Suteerapataranon, J. Jakmunee, Y. Vaneesorn, K. Grudpan, *Talanta*, 58 (2002) 1235.
- [332] A. Asan, I. Isildak, M. Andac, F. Yilmaz, *Talanta*, 60 (2003) 861.
- [333] M.F. Molina, M. Nechar, J.M. Bosque Sendra, *Anal. Sci.*, 14 (1998) 791.
- [334] K. Yoshimura, S. Nigo, T. Tarutani, *Talanta*, 29 (1982) 173.
- [335] F. Capitán, J.M. Román Navarro, L.F. Capitán Vallvey, *Anal. Lett.*, 24 (1991) 1201.
- [336] C.M. Hill, K.W. Street, W.H. Philipp, S.P. Tanner, *Anal. Lett.*, 27 (1994) 2589.
- [337] P. Richter, M.I. Toral, H. Castro, *Anal. Lett.*, 35 (2002) 635.
- [338] L.S.G. Teixeira, F.R.P. Rocha, M. Korn, B.F. Reis, S.L.C. Ferreira, A.C.S. Costa, *Anal. Chim. Acta*, 383 (1999) 309.
- [339] R.M. Liu, D.J. Liu, A.L. Sun, *Talanta*, 40 (1993) 381.
- [340] D.E. Ryan, *Analyst*, 85 (1960) 569.
- [341] H.J. Crump Wiesner, W.C. Purdy, *Talanta*, 16 (1969) 124.
- [342] E. Krouda, *Microchim. Acta*, 32 (1944) 245.
- [343] W.G. Parks, H.N. Prebluda, *J. Amer. Chem. Soc.*, 57 (1935) 1676.
- [344] W.A. Turner, *Amer. J. Sci.*, 41 (1916) 339.
- [345] E.H. Swift, R.W. Hoepfel, *J. Amer. Chem. Soc.*, 51 (1929) 1366.
- [346] G.S. Deshmukh, M.G. Bapat, *Anal. Chim. Acta*, 14 (1956) 225.
- [347] R. Forteza, J.M. Estela, V. Cerdá, *Analyst*, 116 (1991) 1171.
- [348] E.B. Liu, Y.M. Liu, J.K. Cheng, *Anal. Chim. Acta*, 456 (2002) 177.
- [349] J.F. Jen, M.H. Wu, T.C. Yang, *Anal. Chim. Acta*, 339 (1997) 251.
- [350] J. Wang, B.M. Tian, J.M. Lu, *Talanta*, 39 (1992) 1273.
- [351] L. Lucena Conde, J. Hernández Méndez, A. Sánchez Misiego, M. Delgado Zamarreno, *Metalurgia y Electricidad*, 41 (1977) 50.

- [352] N. Vachirapatama, G.W. Dicoski, A.T. Townsend, P.R. Haddad, *J. Chromatogr. A*, 956, (2002) 221.
- [353] H. Wang, H.S. Zhang, J.K. Cheng, P.H. Qiu, *Microchem. Journal*, 55 (1997) 332.
- [354] Y.H. Zhang, M. Nomura, M. Aida, Y. Fujii, *J. Chromatogr. A*, 989, (2003) 175.
- [355] C.Y. Huang, N.M. Lee, S.Y. Lin, C.Y. Liu, *Anal. Chim Acta*, 466 (2002) 161.
- [356] G.M. Wuilloud, J.C.A. de Wuilloud, R.G. Wuilloud, M.F. Silva, R.A. Olsina, L.D. Martinez, *Talanta*, 58 (2002) 619.
- [357] J.M. Guidroz, J. Sneddon, *Microchem. J.*, 73 (2002) 363.
- [358] J. Gao, X. Zhang, W. Yang, J. Kang, *Anal. Chim. Acta*, 455 (2002) 159.
- [359] F.N. Chuan, X.B. Xing, B.Z. Ping, F.Y. Zhi, *Talanta*, 41 (1994) 1841.
- [360] X. Li, Y. Tang, *Yejin Fenxi*, 14 (1994) 14.
- [361] P. Bermejo Barrera, A. Bermejo Barrera, F. Bermejo Martínez, *Microchem. J.*, 25 (1980) 458.
- [362] O. Budevsky, L. Johnova, *Talanta*, 12 (1965) 291.
- [363] G.L. Hopps, A.A. Berk, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 1050.
- [364] M.J.C. Taylor, G.D. Marshall, S.J.S. Williams, J.F. van Staden, C. Saling, *Anal. Chim. Acta*, 329 (1996) 275.
- [365] W. Qin, Z. Zhang, C. Zhang, *Analyst*, 122 (1997) 658.
- [366] M.E. Palomeque, A.G. Lista, B.S. Band, *Afinidad*, 57 (2000) 131.
- [367] H.M. Al Swaidan, *Talanta*, 43 (1996) 1313.
- [368] T. Yamane, Y. Osada, M. Suzuki, *Talanta*, 45 (1998) 583.
- [369] R.G. Wuilloud, J.A. Salonia, R.A. Olsina, L.D. Martínez, *Spectrochim. Acta B: Atomic Spectroscopy*, 55 (2000) 671.
- [370] O.P. Shvoeva, V.P. Dedkova, S.B. Savvin, *J. Anal. Chem.*, 55 (2000) 545.
- [371] M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, N. Ramos Martos, L.F. Capitán Vallvey, *Anal. Lett.*, 24 (1991) 2245.
- [372] M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán Vallvey, *Talanta*, 42 (1995) 1057.
- [373] S. Boudra, J.M. Bosque Sendra, M.C. Valencia, *Talanta*, 42 (1995) 1525.
- [374] S. Matsuoka, K. Yoshimura, A. Tateda, *Anal. Chim. Acta*, 317 (1995)

- 207.
- [375] M.J. Ayora Cañada, A. Molina Díaz, M.I. Pascual Reguera, *Internat. J. Environmen. Anal. Chem.*, 76 (2000) 319.
- [376] A. Navas Díaz, *Talanta*, 38 (1991) 588.
- [377] A.M. García Campaña, F. Alés Barrero, M. Román Ceba, *Analyst*, 117 (1992) 1189.
- [378] M.K. Akhmedli, D.A. Efendiev, F.I. Ruvinosa, *Uch. Zap. Azerb. Gob. Univ. Ser. Khim. Nauk*, 4 (1973) 10.
- [379] A.M. García Campaña, F. Alés, Barrero, M. Román Ceba, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta*, 119 (1994) 1903.
- [380] A.M. García Campaña, F. Alés Barrero, M. Román Ceba, *Anal. Sci.*, 12 (1996) 647.
- [381] J.W. Stevens, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 10 (1938) 269.
- [382] G. Spacu, P. Spacu, *Z. Anal. Chem.*, 128 (1948) 233.
- [383] H. Liebman, A.D. Ayers, *Analyst*, 70 (1945) 411.
- [384] T.W. Birch, *Biochem. J.*, 27 (1993) 303.
- [385] P.J. Garry, G.M. Owen, D.W. Lashley, P.C. Ford, *Clin. Biochem.*, 7 (1974) 131.
- [386] E.Y. Backheet, K.M. Emara, H.F. Askal, G.A. Saleh, *Analyst*, 116 (1991) 861.
- [387] N. Balasubramanian, S.Usha, K. Srividya, *Indian Drugs*, 32 (1995) 78.
- [388] B.R. Day, D.R. Williams, C.A. Marsh, *Clin. Biochem.*, 12 (1979) 22.
- [389] F. García Montelongo, M.J. Sánchez, J.C. García Castro, A. Hardisson, *Anal. Lett.*, 24 (1991) 1875.
- [390] B. Jaselkis, S.J.J. Nelapaty, *Anal. Chem.*, 44 (1972) 379.
- [391] S.M. Sultan, A.M. Abdennabi, F.E.O. Suliman, *Talanta*, 41 (1994) 125.
- [392] E.L. McGown, M.G. Rusnak, C.M. Lewis, J.A. Tillotson, *Anal. Biochem.*, 119 (1982) 55.
- [393] J. Lykkesfeldt, S. Loft, H.E. Poulsen, *Anal. Biochem.*, 229 (1995) 329.
- [394] H.J. Nelis, A.P. De Leenheer, G. Merchie, P. Lavens, P. Soorgelos, *J. Chromatogr. Sci.*, 35 (1997) 337.
- [395] J.J. Mangas Alonso, J. moreno, B. Suárez, A. Picinelli, D. Blanco Gomis, *Chromatographia*, 47 (1998) 197.
- [396] D.L. Dunmire, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 62 (1979) 648.

- [397] J. Peinado, F. Toribio, D. Pérez Bendito, *Analyst*, 112 (1987) 775.
- [398] M.J. Esteve, R. Farre, A. Frigola, *J. Fresenius Anal. Chem.*, 351 (1995) 804.
- [399] X.Y. Hu, Z.Z. Leng, *Anal. Lett.*, 28 (1995) 2263.
- [400] T. Kleszczewski, E. Kleszczewska, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29 (2002) 755.
- [401] J. Hernández Méndez, A. Alonso Mateos, M.J. Almendral Parra, C. García de María, *Anal. Chim. Acta*, 184 (1986) 243.
- [402] M.C. Yebra Biurrun, *Talanta*, 52 (2000) 367.
- [403] N. Lenghor, J. Jakmune, M. Vilen, R. Sara, G.D. Christian, K. Grudpan, *Talanta*, 58 (2002) 1139.
- [404] P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta*, 360 (1998) 143.
- [405] E.I. Morosanova, E.A. Reznikova, A.A. Velikorodnyi, *J. Anal. Chem.*, 56 (2001) 173.
- [406] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 20 (1999) 247.
- [407] P. Ortega Barrales, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 227.
- [408] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz, *J. Fresenius Anal. Chem.*, 363 (1999) 92.
- [409] J.A. Nóbrega, G.S. Lopes, *Talanta*, 43 (1996) 971.
- [410] R. Koncki, T. Lenarczuk, S. Glab, *Anal. Chim. Acta*, 379 (1999) 69.
- [411] T. Lenarczuk, I. Roszczyk, R. Koncki, *Anal. Lett.*, 33 (2000) 137.
- [412] T. Lenarczuk, R. Koncki, S. Glab, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26 (2001) 163.
- [413] P.G. Ramappa, H.S. Godwa, A.N. Nayak, *Anal. Chim. Acta*, 108 (1979) 277.
- [414] K. Basavaiah, G. Krishnamurthy, *Talanta*, 47 (1998) 59.
- [415] M.C. Gutiérrez, A. Gomez Hens, D. Pérez Bendito, *Anal. Lett.*, 20 (1987) 1847.
- [416] H.A. Mottola, A. Hanna, *Anal. Chim. Acta*, 100 (1978) 167.
- [417] D. De Orsi, L. Gagliardi, D. Tonelli, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 14 (1996) 1635.

- [418] T. Kumazawa, H. Seno, K. Watanabe Suzuki, H. Hatori, A. Ishii, K. Sato, O. Suzuki, *J. Mass Spectrom.*, 35 (2000) 1091.
- [419] O. Papp, I. Adma, I. Simonyi, *Acta Pharm. Hung.*, 60 (1990) 204.
- [420] P.G.H.M. Muijselaar, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A*, 735 (1996) 395.
- [421] K.H. Chen, C.E. Lin, W.S. Liao, W.Y. Lin, Y.Y. Hsiao, *J. Chromatogr. A*, 979 (2002) 399.
- [422] K. Basavaiah, K. Srilatha, J.M. Swamy, G. Krishnamurthy, *Anal. Lett.*, 33 (2000) 43.
- [423] K. Basavaiah, J.M. Swamy, G. Krishnamurthy, *Anal. Lett.*, 32 (1999) 2613.
- [424] M. Shamsipur, B. Hemmateenejad, C. Akhond, *J. AOAC Intern.*, 85 (2002) 555.
- [425] M. López Carreto, L. Lunar, S. Rubio, D. Pérez Bendito, *Anal. Chim. Acta*, 349 (1997) 33.
- [426] L. de la Peña, A. Gómez Hens, D. Pérez Bendito, *Talanta*, 41 (1994) 1895.
- [427] B. Laassis, M. Maafi, J.J. Aaron, M.C. Mahadero, *Anal. Lett.*, 30 (1997) 1541.
- [428] B. Dembinski, A. Szyldowska Czerniak, M. Kurzawa, *Acta. Pol. Pharm.*, 54 (1997) 415.
- [429] J.M. García, A.I. Jiménez, F. Jiménez, J.J. Arias, *Anal. Lett.*, 25 (1992) 1511.
- [430] K. Basavaiah, G. Krishnamurthy, *Talanta*, 46 (1998) 665.
- [431] J. Tan, Z. Jiang, C. Lang, Y. Zhang, J. Meng, *Yaowu Fenxi Zazhi*, 17 (1997) 391.
- [432] S.A. Barshick, M.V. Buchanan, *J. AOAC Intern.*, 77 (1994) 1428.
- [433] T. Kumazawa, H. Seno, K. Watanabe Suzuki, H. Hattori, A. Ishii, K. Sato, O. Suzuki, *J. Mass Spectrom.*, 35 (2000) 1091.
- [434] T. Pérez Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomas, C. Sidrach de Cardona, *Talanta*, 40 (1993) 1361.
- [435] J. Martínez Calatayud, V. García Mateo, *Anal. Chim. Acta*, 264 (1992) 283.
- [436] M.T. Tena, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *J. Automat. Chem.*, 13 (1991) 11.

- [437] D. Chen, A. Ríos, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Analyst*, 116 (1991) 171.
- [438] B. Laassis, J.J. Aaron, M.C. Mahedero, *Talanta*, 41 (1994) 1985.
- [439] F.A. Aly, N.A. Alarfaj, A.A. Alwarthan, *Anal. Chim. Acta*, 358 (1998) 255.
- [440] R. Pérez, A. Ruperez, J.J. Laserna, N. Felidj, B. Laassis, J.J. Aaron, J. Aubard, *Anal. Chim. Acta*, 369 (1998) 197.
- [441] J. Michalowski, A. Kojlo, B. Magnuszewska, M. Trojanowicz, *Anal. Chim. Acta*, 289 (1994) 339.
- [442] Analytical Chemistry división, *Spectrochimica Acta Part B*, 1978, 242.
- [443] ACS Comité on enviromental improvement, *Anal. Chem.*, 52 (1980) 2242.
- [444] J.C. Miller and J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, London, 1988, p.54.
- [445] A. Götzl, W. Riepe, *Talanta*, 53 (2001) 1187.
- [446] AOAC, *Official Methods of Analysis*, vol. II, 15 th ed., 1990, p. 1058.
- [447] L. Saunders, R. Fleming, *Mathematics and Statistics*, 2<sup>nd</sup> ed., Pharmaceutical Press, London 1971, p. 192.
- [448] B.R.F. Kjellgren, C.W. Schwenczier, Jr., E.S. Melick, *Treatise on Analytical Chemistry*, eds. I.M. Kolthoff and P.J. Elving, Wiley, N. York, 1964, vol. 6, part 2, pp. 12.

## VIII. Anexo

## VIII. ANEXO

En este Anexo se recogen los diez artículos desarrollados por el autor de la presente Memoria sobre el Proyecto de Tesis presentado y admitido a trámite con fecha 30 de abril de 2003.

Nueve de ellos han sido publicados en revistas científicas especializadas en el área de Química Analítica de carácter internacional, mientras que el otro está pendiente de publicación y se incluyen en el formato propio de un artículo de acuerdo con las normas reguladoras (artículo 32.2) de los estudios de Tercer Ciclo y del Título de Doctor por la Universidad de Jaén.

A continuación se detallan los artículos y sus referencias:

TITULO: A Flow-Through sensing device with fluorimetric transduction for the determination of warfarin by using an anion-exchanger gel combined with a FIA system.

AUTORES: M.J. RUEDAS RAMA, A. RUIZ MEDINA, A. MOLINA DÍAZ

REVISTA: ANALYTICAL SCIENCES, 17 (2001) 1007-1010.

TITULO: Use of a solid sensing zone implemented with unsegmented flow analysis for simultaneous determination of thiabendazole and warfarina.

AUTORES: M.J. RUEDAS RAMA, A. RUIZ MEDINA, A. MOLINA DÍAZ

REVISTA: ANALYTICA CHIMICA ACTA, 459 (2002) 235-243.

TITULO: A simple and straightforward procedure for monitoring phenol compounds in waters by using UV solid phase transduction integrated in a continuous flow system.

AUTORES: M.J. RUEDAS RAMA, A. RUIZ MEDINA, A. MOLINA DÍAZ

REVISTA: MICROCHIMICA ACTA, 141 (2003) 143-148.

TITULO: Bead injection spectroscopic flow-through renewable surface sensors as alternative to reusable flow-through sensors: Determination of iron and ascorbic acid.

AUTORES: M.J. RUEDAS RAMA, A. RUIZ MEDINA, A. MOLINA DÍAZ

REVISTA: ANALYTICA CHIMICA ACTA, 482 (2003) 209-217.

TITULO: New contrubutions to the field of bead injection spectroscopy-flow injection analysis: Determination of cobalt.

AUTORES: M.J. RUEDAS RAMA, A. RUIZ MEDINA, A. MOLINA DÍAZ

REVISTA: ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 376 (2003) 527-533.

TITULO: Implementation of flow-through multisensors with bead injection spectroscopy: Fluorimetric renewable surface biparameter sensor for determination of berillium and aluminium.

AUTORES: M.J. RUEDAS RAMA, A. RUIZ MEDINA, A. MOLINA DÍAZ

REVISTA: TALANTA, 62 (2004) 879-886.

TITULO: Bead injection spectroscopy-flow injection analysis (BIS-FIA): an interesting tool applicable to pharmaceutical analysis. Determination of promethazine and trifluoperazine.

AUTORES: M.J. RUEDAS RAMA, A. RUIZ MEDINA, A. MOLINA DÍAZ

REVISTA: JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS, 35 (2004) 1027-1034.

TITULO: A Prussian blue-based flow-through renewable surface optosensor for analysis of ascorbic acid.

AUTORES: M.J. RUEDAS RAMA, A. RUIZ MEDINA, A. MOLINA DÍAZ

REVISTA: MICROCHEMICAL JOURNAL, 78 (2004) 157-162.

TITULO: A flow-injection renewable surface sensor for the fluorimetric determination of vanadium(V) with Alizarin Red S

AUTORES: M.J. RUEDAS RAMA, A. RUIZ MEDINA, A. MOLINA DÍAZ

REVISTA: TALANTA, 66 (2005) 1333-1339

TITULO: Resolution of biparametric mixtures using Bead Injection Spectroscopic Flow-through renewable surface sensors

AUTORES: M.J. RUEDAS RAMA, A. RUIZ MEDINA, A. MOLINA DÍAZ

REVISTA: Analytical Sciences, 21 (2005) 1-7