

**Aplicación de la Quimiometría para el aprovechamiento analítico de reactivos generales. Revisión de la incertidumbre instrumental y del Límite de Detección multivariable.**

**Juan Zuriarrain Ocio**

**TESIS DE LA UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA**

**QUIMICA APLICADA**

**Fecha de Lectura: 16/07/2010**

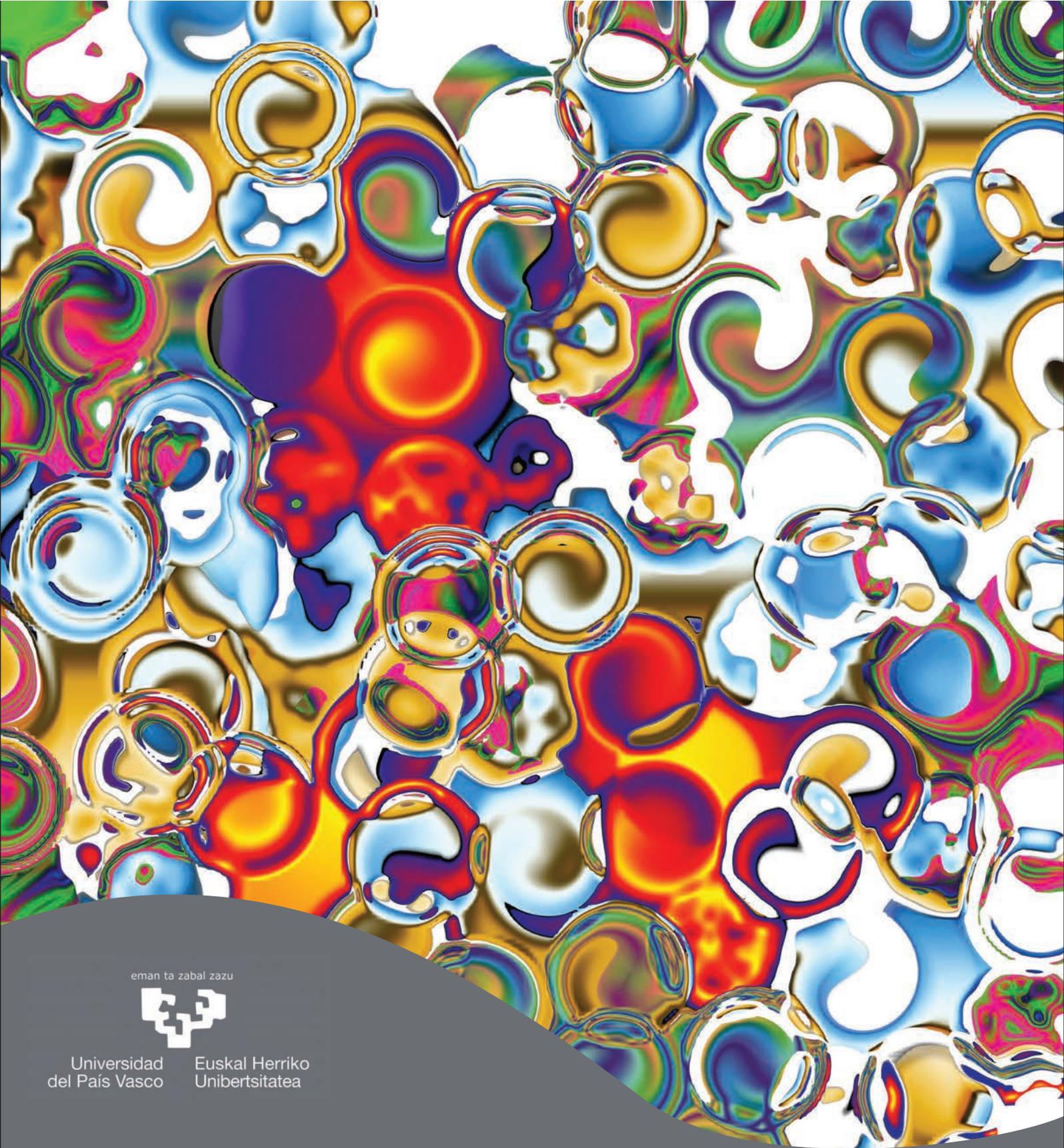
**INDICE E INTRODUCCIÓN**



Juan Zuriarrain Ocio, 2010

<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

<http://addi.ehu.es//handle/10810/5574>



eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Aplicación de la Quimiometría para el aprovechamiento analítico de reactivos generales. Revisión de la incertidumbre instrumental y del Límite de Detección multivariable.

---

Juan Zuriarrain Ocio

Donostia-San Sebastián 2010



eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

*Aplicación de la Quimiometría para el  
aprovechamiento analítico de reactivos generales.  
Revisión de la incertidumbre instrumental y del  
Límite de Detección multivariable.*

Esta tesis doctoral ha sido desarrollada en el Grupo de Química Analítica del Departamento de Química Aplicada de la Facultad de Química de San Sebastián (Universidad del País Vasco) bajo la dirección del **Dr. Carlos Ubide Sebastián**.

**Juan Zuriarrain Ocio**  
Donostia-San Sebastián, 2010

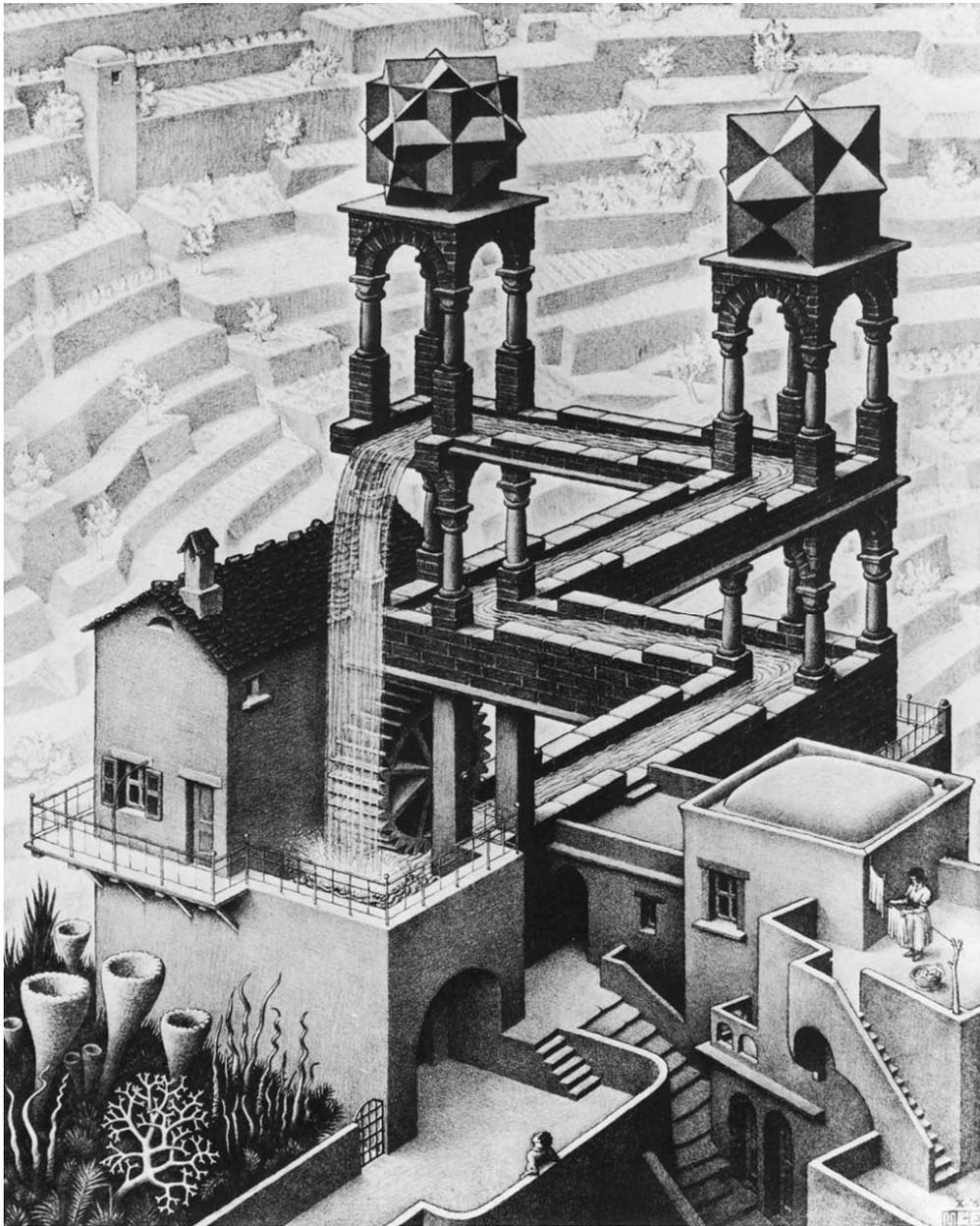


*Por muy extraño que pueda parecer, quiero dedicarme a mi mismo esta tesis. Durante su realización he pasado malas rachas personales y en muchos momentos no veía posible terminarla; Sin embargo ahora que la tengo en mis manos, se que me ayudará a echar la vista atrás y ver que la superación de las adversidades está en manos de uno mismo.*



## AGRADECIMIENTOS

---



*Cuando bebas agua, recuerda la fuente. (Proverbio Chino).*



Hasta ahora he pasado muchísimo tiempo con la escritura de la Tesis, pero creo que este apartado me debería costar tanto o más que todo el texto que vendrá a continuación porque sois muchos a los que debo agradecer el apoyo, comprensión, consejos, hombros para llorar, cervezas para compartir, abrazos, chistes para reír...y en fin, el cariño y paciencia que me habéis mostrado hasta el día de hoy que tenéis esta memoria en vuestra mano.

Primeramente debo agradecer a mis aitas, Tito y Pili, obviamente mi existencia, pero más aún el esfuerzo que ambos han realizado para sacar a la familia adelante y el apoyo incondicional que me han prestado en todas las etapas de mi vida. Muchas gracias, me siento orgulloso de vosotros.

A mis hermanos Iñaki, Miguel y Andoni; Probablemente no sepan muy bien qué suponen para mi porque apenas hablamos de ello, pero voy a aprovechar estas líneas para hacerles ver que para mi han sido, son y serán una referencia en la vida. En ellos tengo el reflejo perfecto de lo que supone la superación de una persona que a pesar de sus limitaciones es más grande que nadie por todo lo que tiene en su interior; La capacidad de emprendimiento y lo que supone salir adelante, sacarse uno mismo las castañas del fuego y triunfar en el intento; Y por supuesto el futuro, alguien que quizá no en la misma rama pero si con las mismas inquietudes sobre el conocimiento con el que espero poder discutir, debatir y consensuar muchas de las decisiones, que deba tomar tanto en lo que a la ciencia se refiere, como en la propia vida. Muchas gracias.

Aunque ya no esté con nosotros, a mi abuela Felipa. Ella probablemente no tenía ni idea de que es eso de una tesis, pero desde que comencé mi andadura por el mundo de la Química recibí por su parte todo el apoyo; Creo que se sentirá muy orgullosa allá donde esté de que al fin pueda conseguir este objetivo. Gracias.

Al resto de familiares, tíos, primas y primo, sobri-primos... que por ser muchos no los iré nombrando, pero de todos ellos he recibido muchísimo apoyo y cariño sin el que esto hubiera sido más que imposible. Muchísimas gracias a todos.

Algunos considerarán que puede ser un formalismo, pero quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Doctor D. Carlos Ubide por haber dirigido todo el proceso de realización de esta Tesis Doctoral, sin su tutela estoy convencido que este trabajo no hubiese llegado a buen puerto. Su labor como director ha abarcado más allá del aporte de sus profundos conocimientos de la Química en general o de los métodos cinéticos de análisis en particular; Ha participado en las decisiones importantes que han

dado rumbo a este trabajo, más como un compañero que como director. Me siento muy orgulloso de haber aprendido juntos. Pienso que es una persona diferente, y digo diferente... de la que se puede aprender valores importantes como el gusto por las cosas bien hechas, pasión por la música, el cine o los coches de época, los buenos puros, el buen comer y el mejor beber... vamos, como dirían los *Monty Python*, siempre mirando hacia el lado brillante de la vida "*Always Look on the Bright Side of Life*". Muchas gracias Carlos.

La Dra. Miren Ostra Beldarrain no consta como codirectora de esta tesis, pero por su trabajo, dedicación, consejos y conocimientos bien podría aparecer de la mano de Carlos Ubide. Ella fue quien me explicó las primeras nociones acerca de la calibración multivariable, con ella aprendía a manejar y a descubrir los intrínsecos del Unscrambler, pocas han sido las decisiones que he tomado sobre este trabajo que no haya consultado con ella. Pero también he compartido la asistencia a congresos, Lisboa, Montpellier, Como...etc, y unas cuantas cañas, kalimotxos o gyn tonics en alguna que otra cena que hemos hecho los compañeros del laboratorio. En miles de ocasiones ha supuesto para mí un espejo en el que reflejarme y su tesis está siendo como un libro de cabecera. Eskerrik asko Miren.

Hay una persona a la que tengo que agradecer de todo corazón su apoyo, ánimo, confianza, y sobretodo su fe en mí...Con esa persona he pasado la mayor parte del tiempo y he vivido la mayoría de las emociones durante la carrera, como enterarnos de esa última nota de Química Técnica en el pasillo, he sufrido haciendo millones de trabajos pero siempre estaba a mi lado, los primeros póster nunca finalizaban sin pasar su aprobación, he compartido la asistencia a mi primer congreso, sus visitas a Mallorca, en fin millones de vivencias. La decisión de seguir con el aprendizaje y aventurarme en la realización de la tesis hubiese sido imposible sin ella. Se que si alguien se va a sentir orgullosa de que esto llegue a buen término...va a ser esa persona. Muchas gracias Gemita.

Han sido muchos los años que he pasado en el laboratorio de Química Analítica, y muchas las personas que he ido viendo pasar, y que me han ido ayudando. El día que entré a trabajar me encontré por aquí a una serie de personas a las que no puedo dejar de agradecerles, dado que fueron mi primera referencia para saber como desenvolverme con los instrumentos y material de laboratorio... Muchas gracias Gorka, Patxi, Idoia, Iñaki.

Al poco tiempo y ya establecido, comenzó a integrarse en el grupo otra serie de grandes personas que han sido mucho más que simples compañeros de mesa o de trabajo: Nuria y su escritorio repleto de iconos; Maitena y su alegría contagiante aparte de su peculiar carácter, es única; Danielson con su divertidas batallitas y su ritmo Alavés-patatero; Nagore con su sonrisa perpetua y su inocencia a la hora de caer en mis bromas y baciles; Raulillo y su particular visión de la vida, todo es mucho más sencillo de lo que nos pueda parecer en un principio; Ainara y las incesantes discusiones mano a mano, como si de un matrimonio se tratase. Ahora tengo alrededor unas compañeras excepcionales. Todas y cada una de ellas me está aportando su particular granito de arena para la construcción de esta memoria. Ane, Uxoia y por supuesto Mainer...ay Mainer, creo que nos has vuelto a todos un poco locos, pero gracias a ti hemos mejorado nuestro trabajo por tus ganas de superación, de aprendizaje, y perfeccionamiento, pero también hemos aprendido cosas sobre cine o a pronunciar *København* (Copenhague). Eskerrik asko guztioi.

Por supuesto que no dejo de agradecer al resto de profesores/as del grupo de Química Analítica, con ellos he compartido mucho de mi tiempo, en las tertulias del café de las 11:00h o en los hamaiketakos de los cumpleaños, pero también por la inestimable ayuda que me han prestado para alcanzar este objetivo. Iñaki, Gloria, Rosa, Esmeralda, Muchas gracias.

No puedo olvidarme del Profesor D. Alfonso Casado Riobó. Directamente no habré participado en el desarrollo de esta tesis, pero desde que asistí a sus clases supe que uno podía disfrutar y divertirse con la Química Analítica, así que probablemente sea gran culpable de que terminase decidiendo emprender este camino. Gracias Alfonso.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Víctor Cerdà Martín, Catedrático de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares, por la aportación de sus conocimientos sobre las técnicas de flujo y la automatización, que son la base de uno de los capítulos de esta memoria, pero mucho más por la acogida que recibí nada más pisar suelo Mallorquín, me integré perfectamente en su grupo de trabajo, las puertas de su despacho estuvieron siempre abiertas para cualquier tipo de consulta, tanto científica como turística... y por supuesto aquella extraordinaria cena en Valldemossa, aun puedo saborear aquel espectacular arroz caldoso con chipirones y piñones... Moltes gràcies Víctor.

En extensión agradezco a todo el resto del grupo, más que de trabajo, grupo humano, por acogerme, integrarme y dedicarme parte de su tiempo a enseñarme a utilizar los dichos espectrofotómetros USB, a realizar montajes de tubos, racores, jeringas etc. No puedo dejar de nombrar a la Doctora Carme Pons por compartir además de sus conocimientos, sus amistades; Al profesor Dr. José Manuel Estela, y su gusto por las langostas del Cantábrico; Al Dr. Enrique Gómez, a la Dra. Laura Ferrer, al Dr. Burkhard Horstkotte, a la Dra. Yamila Fajardó, a Toni, a la Dra. Francesca Mas, a la Dra. Graciela de Armas, a la Dra. Luz Olivia Leal... Moltes gràcies a tots.

Debo agradecer al Dr. Javier Galbán Bernal, Catedrático de la Universidad de Zaragoza y a las Doctoras Susana de Marcos Ruiz e Isabel Sanz Vicente pertenecientes al grupo de biosensores analíticos de la Universidad de Zaragoza por haber participado directamente en el trabajo sobre los CCDs de esta memoria. Creo que ha sido una colaboración muy provechosa y me siento orgulloso de haber participado con ellos. Muchas gracias.

Agradezco a Santiago MasPOCH Andrés, Catedrático de Química Analítica en el Departamento de Química de la U.A.B. Aquella conversación en el despacho de Carlos acerca del Límite de Detección para los métodos de calibración multivariable y cómo calcularlo, fue el inicio de horas trabajando con matrices y vectores, leyendo libros en principio incomprensibles con miles de ecuaciones...para al final poder realizar una propuesta propia. Por supuesto nunca olvidaré cuando nos invitaste a todo el grupo de Carlos a cenar al *Café de la Princesa* durante las JAI 2005, guardo muy grato recuerdo de aquella velada. Moltes gràcies Santi.

Agradezco a la Universidad del País Vasco E.H.U, por la concesión una beca predoctoral. El apoyo económico siempre da seguridad y estabilidad suficiente para desarrollar el trabajo con una mayor tranquilidad.

Fuera del ámbito científico, pero que no por ello han dejado de ser importantes para culminar este trabajo, tengo que agradecer a un montón de amigos que han sabido apoyarme, aconsejarme, ayudarme en los momentos más difíciles, alentarme para que siguiera adelante o simplemente estar ahí cuando los he necesitado para desconectar del trabajo.

Xabi y Dever, muchísimas gracias por haberme escuchado las innumerables chapas sobre este trabajo, por ayudarme a tirar hacia delante en mis peores momentos, por reprenderme cuando por mis historias he dejado de lado mis responsabilidades, y

hacerme encauzar de nuevo mi dirección. Aitortxito: aún no sabes leer, pero en cuanto aprendas a hacerlo, y espero ayudarte a ello, quiero que sepas que aquel día que te tuve como muerto en mis manos, me hiciste valorar lo que realmente supone la vida, y aprendí a relativizar lo que para mí podía suponer el mayor de los problemas. Se que no lo hiciste queriendo, pero aun y todo debo darte las gracias.

Juancar, David, Andoni, Txavo, y compañía, por estar ahí incondicionalmente. Que sirvan estas líneas para haceros llegar mis más que sinceras gracias; vuestro apoyo, consejos, y aliento me han servido en innumerables ocasiones para conseguir esto. Se que lo vamos a celebrar como lo merecen las mejores ocasiones brindando con alguna que otra espumosa.

Otros muchos son los amigos especiales (Eli, Lohitzu, Aiert, Ainara, Nane, Martín, Eva, Mikel, Vane, Gus...) de distintas cuadrillas los que me han ayudado en todo el proceso de la tesis, pero entre todos ellos quiero agradecer especialmente a Eukene. Ella ha supuesto un verdadero apoyo en todos los peores momentos que me han ido surgiendo. Ella siempre ha sabido escucharme y entenderme y sobre todo hacerme ver que de los momentos más difíciles es de los que más se aprende, y con ella he aprendido un montón. Eskerrik asko Euki.

Por representar mi futuro y mi próxima función, tengo que agradecer la confianza que ha depositado en mi Domingo Arina Pena. A partir de ahora, y de su mano espero poder aplicar todos los conocimientos adquiridos durante todo este proceso, y aquellos que aprenda de su enorme experiencia en el mundo de la sidra para profundizar aun más si cabe en el conocimiento de las variedades de manzanas del País Vasco, y de sus propiedades.

A la ideóloga y artífice de la portada de esta memoria. A ti te debo el mérito que estoy seguro que va a tener este impresionante diseño. Muchas gracias Helen.

Y por concluir esta sección, que casi se convierte en un capítulo más, no me puedo olvidar de toda esa gente que he conocido en congresos a los que he asistido, o bien en el que organizamos el año pasado aquí en Donosti. Con alguno de ellos mantengo una muy buena relación, y siguen siendo un perfecto apoyo tanto científicamente como, y para mi más importante, en mi vida. De entre todos vosotros, y especialmente por lo que sois para mi; Gràcies Silvia, gracias Mertxe.



*Todos los seres estamos en el mundo para algo. Nuestra existencia tiene un sentido. Cada uno tenemos una misión que cumplir. Un camino que seguir. Un sueño que conquistar y que vivir. Un tesoro para buscarlo y encontrarlo. Una Leyenda Personal. Una vocación.*

*(El Alquimista. Paulo Coelho).*



# ÍNDICE GENERAL

---

## INTRODUCCIÓN

I	Consideraciones sobre los métodos cinéticos de análisis.....	3
I.1.1.	Poder discriminante. ....	5
I.1.2.	El uso de la quimiometría .....	7
I.1.2.1.	<u>Diseño experimental:</u> .....	7
I.1.2.2.	<u>Calibración:</u> .....	10
I.1.3.	Técnicas de flujo. ....	11
II	Reactivos poco específicos generados “in situ” para métodos cinéticos de análisis. ....	14
II.1.1.	Bromo. ....	15
II.1.2.	Reactivo de Fenton (FR). ....	17
III	Consideraciones sobre la incertidumbre espectrofotométrica .....	20
IV	Consideraciones sobre el límite de detección en calibración multivariable. ....	25
IV.1.1.	Distintas propuestas. ....	28
IV.1.1.1.	<u>Señal Analítica Neta:</u> .....	28
IV.1.1.2.	<u>Propuestas basadas en fórmulas:</u> .....	28
IV.1.1.3.	<u>Transformación de modelos multivariables a univariantes:</u> .....	28
IV.1.1.4.	<u>Clasificadores neuronales:</u> .....	29
	<u>OBJETIVOS</u> .....	31

## CAPÍTULO 1: EL REACTIVO DE FENTON Y SU EMPLEO PARA DETERMINACIONES ANALÍTICAS. QUIMIOMETRÍA APLICADA A PERFILES CINÉTICOS DE REACCIÓN.

1.	Introducción .....	37
2.	Experimental .....	40
2.1.	Reactivos: .....	40
2.2.	Instrumentación: .....	41
2.3.	Ordenadores, programas y tratamiento de datos: .....	41
2.4.	Procedimientos: .....	43
2.4.1.	<u>Procedimiento para muestras sintéticas.</u> .....	43
2.4.2.	<u>Procedimiento para muestras de pesticidas comerciales.</u> .....	43
2.4.3.	<u>Procedimiento para muestras de aguas.</u> .....	44

<b>3. Resultados y discusión:</b>	46
<b>3.1. El reactivo de Fenton, consideraciones generales:</b>	46
<b>3.2. Optimización:</b>	49
<b>3.3. Calibración:</b>	53
<b>3.4. Aplicación:</b>	58
3.4.1. <i>Efecto de otras especies y modelado de interferencias:</i>	60
3.4.2. <i>Modelado de la interferencia del disolvente:</i>	64
3.4.3. <i>Uso del reactivo de Fenton para determinaciones multicomponentes.</i>	68
3.4.4. <i>Determinación de atrazina en aguas</i>	70
<b>4. Conclusiones</b>	74
<i>ANEXOS</i>	75

***CAPÍTULO 2 AUTOMATIZACIÓN Y TÉCNICAS DE FLUJO; VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA MSFIA PARA ANÁLISIS CINÉTICOS Y SU APLICACIÓN A LA GENERACIÓN DE REACTIVOS IN SITU.***

<b>1. Introducción:</b>	87
<b>1.1. Análisis por inyección secuencial (SIA):</b>	89
<b>1.2. Análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA):</b>	92
<b>2. Experimental</b>	94
<b>2.1. Reactivos:</b>	94
<b>2.2. Instrumentación y software:</b>	94
<b>2.3. Procedimientos:</b>	95
2.3.1. <i>Validación de la metodología del análisis por inyección en flujo con multijeringa (MSFIA).</i>	96
2.3.1.1. <i>Estudio de la cinética de de formación de bromo:</i>	97
2.3.1.2. <i>Generación de reactivos “in situ”. La reacción bromo-ácido salicílico:</i>	97
2.3.2. <i>Sistema sia para la generación de reactivos “in situ”.</i>	97
2.3.2.1. <i>Sistema SIA para generar bromo:</i>	97
<b>3. Resultados y discusión</b>	98
<b>3.1. Validación de la metodología del análisis por inyección en flujo con multijeringa (MSFIA)</b>	98
3.1.1. <i>Estudio de la cinética de de formación de bromo:</i>	98
3.1.2. <i>Órdenes parciales respecto a los reactivos:</i>	100

3.1.3. <u>Cálculo de la constante de velocidad (<math>k_{br}</math>) usando todo el perfil cinético (método integral)</u> .....	102
3.1.4. <u>Generación de reactivos “in situ”. La reacción bromo-ácido salicílico:</u>	108
3.2. <b>Sistema SIA para la generación de bromo “in situ”</b> .....	110
3.2.1. <u>Sistema SIA para aplicaciones cinéticas con bromo generado “in situ”</u>	113
4. <b>Conclusiones</b> .....	114

### CAPÍTULO 3: INCERTIDUMBRE EN LOS ESPECTROFOTÓMETROS MODERNOS

1. <b>Introducción</b> .....	117
2. <b>Aspectos teóricos:</b> .....	120
3. <b>Experimental</b> .....	126
3.1. <b>Reactivos:</b> .....	126
3.2. <b>Instrumentación y procesado de datos:</b> .....	126
3.3. <b>Procedimientos:</b> .....	127
3.3.1. <u>Medidas manuales (en “batch”):</u> .....	127
3.3.2. <u>Medidas en flujo por inyección secuencial (SI):</u> .....	129
3.3.3. <u>Obtención de datos simulados:</u> .....	130
4. <b>Resultados y discusión:</b> .....	131
4.1. <b>Luz parasita</b> .....	131
4.2. <b>Incertidumbre para espectrofotómetros de diodos:</b> .....	132
4.3. <b>Incertidumbre para sistemas en flujo:</b> .....	138
4.3.1. <u>Inyección secuencial (SI):</u> .....	139
4.3.2. <u>Sistema cromatográfico (HPLC):</u> .....	140
4.4. <b>Incertidumbre para espectrofotómetros de acoplamiento de carga (CCD):</b>	141
4.4.1. <u>Analogía de los cubos y la lluvia:</u> .....	142
a) <b>Transformación fotónica:</b> .....	142
b) <b>Lectura de carga:</b> .....	143
c) <b>Amplificación de salida:</b> .....	143
4.4.2. <u>Ruido espacial vs. ruido temporal:</u> .....	145
4.4.3. <u>Incertidumbre para el espectrofotómetro USB 2000</u> .....	147
4.5. <b>Algunas consideraciones importantes acerca de los espectrofotómetros de acoplamiento de carga (CCD):</b> .....	150
4.5.1. <u>Efecto de la refrigeración:</u> .....	150
a) <b>No uniformidad</b> .....	150

b) Ley de Beer: QE 65000.....	152
c) USB 4000. Al congelador: .....	153
4.5.2. <i>Consideraciones acerca espectrofotómetros sin rendija de entrada:</i> ...	156
5. Conclusiones.....	158
<i>ANEXO III</i> .....	159

*CAPÍTULO 4: EL LÍMITE DE DETECCIÓN EN LOS MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE: PROPUESTA PARA EL CÁLCULO DEL L.O.D. SIGUIENDO LAS RECOMENDACIONES DE LA I.U.P.A.C. Y UTILIZANDO EXCLUSIVAMENTE LOS DATOS PROPIOS DEL PROCESO DE CALIBRACIÓN*

1. Introducción .....	165
2. Aspectos teóricos: .....	166
3. Experimental.....	174
3.1. Reactivos.....	174
3.2. Instrumentación.....	174
3.3. Programas y procesado de datos.....	175
4. Resultados y discusión.....	178
4.1. NIR data:.....	178
4.2. Datos simulados de fluorescencia: .....	180
4.3. Datos de inyección secuencial:.....	183
4.4. Datos de la reacción de Fenton:.....	187
5. Conclusiones.....	190
<i>ANEXO IV</i> .....	191
<i>CONCLUSIONES GENERALES</i> .....	194

*PUBLICACIONES*

1. Fenton's reagent for kinetic determinations .....	203
2. Interference modelling, experimental design and pre-concentration steps in validation of the Fenton's reagent for pesticides determination. ....	211
3. Uncertainty in modern spectrophotometers .....	219
4. Detection limit estimator for multivariate calibration by an extension of the IUPAC recommendations for univariate methods.....	225
5. CCD detectors for molecular absorption spectrophotometry. A theoretical and experimental study on characteristics and performance. ....	233

## INTRODUCCIÓN

---

- I. CONSIDERACIONES SOBRE LOS MÉTODOS CINÉTICOS DE ANÁLISIS
- II. REACTIVOS POCO ESPECÍFICOS GENERADOS “IN SITU” PARA MÉTODOS CINÉTICOS DE ANÁLISIS.
- III. CONSIDERACIONES SOBRE LA INCERTIDUMBRE ESPECTROFOTOMÉTRICA
- IV. CONSIDERACIONES SOBRE EL LÍMITE DE DETECCIÓN EN CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE.



*Alicia entonces se escapa, corriendo tras un conejo blanco, entra a un agujero tras él... y acaba en el país de las Maravillas.*



## I. CONSIDERACIONES SOBRE LOS MÉTODOS CINÉTICOS DE ANÁLISIS

La química analítica moderna comprende un amplio rango de métodos basados en los cambios físicos, químicos o físico-químicos que experimentan las sustancias, con o sin separación previa del analito.

Sea de la naturaleza que sea, cualquier proceso se produce a una velocidad finita, tendiendo a una situación de equilibrio, y por lo tanto se pueden contemplar dos regiones (Figura 1): una zona cinética (dinámica) en la cual el sistema se aproxima al equilibrio, y una estática que ocurre una vez que todo el proceso implicado en el sistema ha logrado el equilibrio<sup>1</sup>. Ambas regiones son de gran importancia y contienen gran información para la Química Analítica.

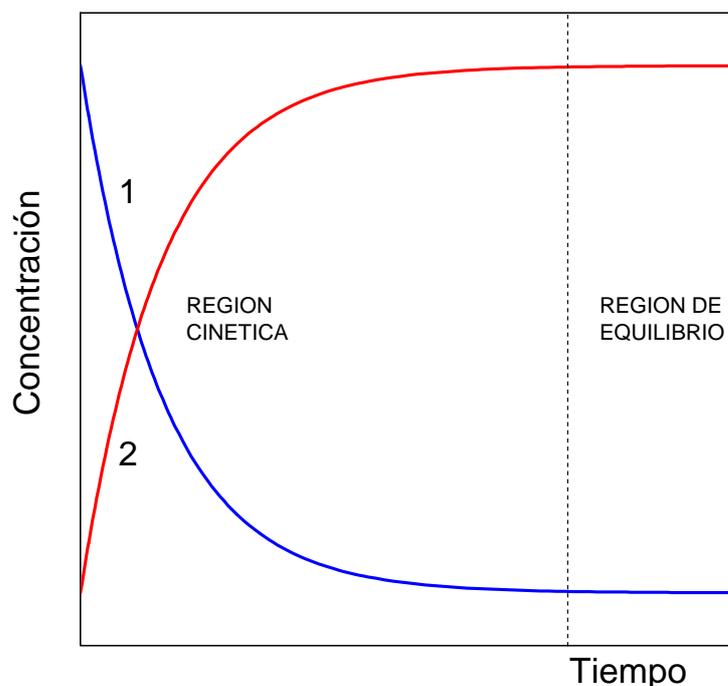


Fig. 1: Regiones cinética y de equilibrio de una reacción química en la que se sigue la desaparición de un reactivo (1) y la aparición de productos (2) en función del tiempo.

El término “*método de equilibrio*” no es muy preciso desde un punto de vista físico-químico, ya que puede llevar a la conclusión de que las mediciones se realizan siempre en condiciones de equilibrio y que por lo tanto únicamente las reacciones reversibles satisfacen estas condiciones. De hecho todos los métodos conocidos como de equilibrio, tanto los clásicos (gravimetrías, volumetrías, etc) como los físico-

<sup>1</sup> H. L. Pardue, *Kinetic aspects of analytical chemistry*, Anal. Chim. Acta, 216 (1989), 69-107.

químicos (instrumentales), se aplican en condiciones de “estado estacionario”, es decir tanto en equilibrio como al finalizar la reacción. Sin embargo no todas las reacciones cumplen los requisitos que presentan las medidas estáticas. Algunas de ellas presentan procesos laterales; en otros, el equilibrio se alcanza muy lentamente o el producto final no se forma cuantitativamente. Es en este tipo de casos, cuando son preferibles los métodos cinéticos<sup>2</sup>.

Según la IUPAC un método cinético de análisis es un método analítico en el que la velocidad de reacción, o una magnitud relacionada con ella, se mide y se utiliza para calcular concentraciones<sup>3</sup>.

Se diferencian de los métodos termodinámicos por una serie de características que pueden hacerlos más interesantes entre las cuales se señalan las siguientes<sup>4</sup>:

- No es necesario medir el valor absoluto del parámetro seleccionado para seguir la reacción (absorbancia, potencial...etc) sino la variación del mismo con el tiempo, con lo que pueden evitarse el tipo de interferencias que afectan a dicho parámetro (turbidez, otros absorbentes, potencial de unión líquida...etc) pero que no intervienen en la reacción.
- Permiten utilizar ciertas reacciones que mediante los métodos de equilibrio se desechan debido a que no cumplen las condiciones exigidas por éstos. Así por ejemplo pueden ser aplicados a reacciones lentas, a reacciones que no hayan terminado o incluso a reacciones con estequiometría desconocida. Esto se debe a que para medir la velocidad de reacción basta con que reaccione una pequeña fracción de la sustancia.
- Mediante los métodos cinéticos es posible seguir reacciones que presentan fenómenos secundarios, consecutivos y/o reversibles siempre que se mida en las proximidades del momento inicial, cuando únicamente se ha transformado del 3 al 5 % del componente principal a determinar.
- Son útiles en la determinación de trazas y ultratrazas de ciertas sustancias (catalizadores) debido al poder de amplificación química que posee la acción catalítica, o bien de otras que modifican la actividad catalítica.

---

<sup>2</sup> D. Pérez-Bendito and M. Silva; *Kinetic methods in analytical chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, (1988), pp. 13-15.

<sup>3</sup> G. Svehla; *Nomenclature of kinetic methods of analysis*. *Pure & App. Chem.*, 65, 10 (1993), 2291-2298

<sup>4</sup> Enric Casassas en *Métodos cinéticos de análisis*; Ed. M. D. Perez Bendito, M. Valcárcel Cases; Córdoba, (1983), pp. 29 - 32.

- Posibilitan el análisis de mezclas de sustancias químicamente análogas sin previa separación, únicamente aprovechando diferencias en su reactividad frente a un reactivo común.

Sin embargo existen algunas desventajas que han hecho que los métodos cinéticos de análisis fuesen descartados, frente a los métodos de equilibrio, hasta la aparición de instrumentación más moderna y nuevas técnicas de cálculo mucho más potentes.

- Están sometidos a exigencias muy rígidas en cuanto a precisión y sensibilidad de los aparatos de medida de la variación del parámetro escogido y del tiempo.

- Es necesario controlar rigurosamente múltiples factores de los que depende la velocidad de reacción, tales como: temperatura, pH, presencia de interferentes, naturaleza de disolventes...etc.

- No todas las reacciones son adecuadas para utilizarse como base de un método cinético. Deben ser suficientemente lentas como para que su tiempo de semirreacción supere el tiempo necesario para obtener una mezcla homogénea de los reaccionantes.

- La cantidad de datos generados supera con creces a la que se produce con los métodos basados en medidas en el equilibrio (aunque hoy en día esto ya no se considera como un inconveniente sino muchas veces como una ventaja).

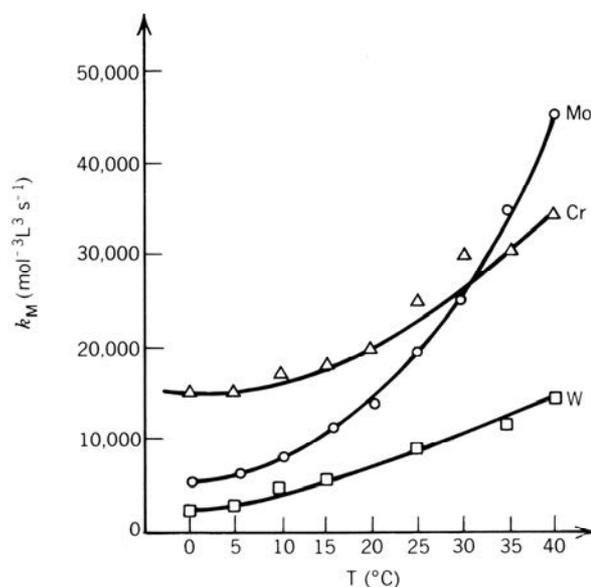
### **I.1.1. Poder discriminante.**

De entre las características que se han señalado anteriormente, los métodos cinéticos de análisis son especialmente interesantes debido a su capacidad discriminante y a su selectividad. Ésta se consigue mediante la selección de unos reactivos o ciertas condiciones con las que se produzcan diferencias en la velocidad de reacción entre el analito de interés y los posibles interferentes<sup>5</sup>, que bien podrán ser otros analitos de interés. Por ejemplo, muchas enzimas catalizan selectivamente un solo sustrato, permitiendo de ese modo el análisis cuantitativo de ese sustrato aun en presencia de

---

<sup>5</sup> D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler and S. R. Crouch; *Fundamentos de Química Analítica 8ª Ed.*; Thomson, Madrid (2005), p. 889.

otros similares<sup>6</sup>. Otras veces, como ya se ha mencionado, variando algunas de las condiciones del sistema (variables discriminantes) se consigue que dos o más analitos de interés reaccionen con diferentes velocidades y de ese modo sea posible su determinación. Esto puede verse claramente en la **Figura 2** en la que se observa cómo al variar la temperatura en el rango de 0 a 40 °C distintos catalizadores ejercen diferente actividad catalítica<sup>7</sup> en el sistema  $I^- + BrO_3^-$ .



**Fig. 2:** Variación del coeficiente de velocidad ( $k_M$ ) con la temperatura para molibdeno, cromo y wolframio como catalizadores de la reacción indicadora Ioduro – Bromato.

Una vez que existen o se consiguen diferencias entre la velocidad de reacción de los distintos componentes, se pueden aplicar diversos métodos cinéticos de análisis. Así por ejemplo Quencer y Crouch<sup>8</sup> hacen una clasificación muy general en dos apartados: métodos utilizables para mezclas que presentan grandes diferencias de velocidad entre sus componentes y aquéllos para las mezclas que presentan pequeñas diferencias de velocidad de reacción. Otros autores (H. A. Mottola, D. Pérez Bendito, etc) los clasifican según el modelo cinético de la reacción<sup>9,10</sup>

<sup>6</sup> P. Srisawasdi, P. Jearanaikoon, N. Wetprasit, B. Sriwanthana, M. H. Kroll, P. H. Lolekha; *Application of Streptomyces and Brevibacterium cholesterol oxidase for total serum cholesterol assay by the enzymatic kinetic method*; Clin. Chim. Acta 372 (2006), 103–111.

<sup>7</sup> C. M. Wolf and J. P. Schwing, Bull. Soc. Chim. Fr., 679 (1976) en H. A. Mottola; *Kinetic aspects of analytical chemistry*; Wiley, New York, (1988); pp. 44 – 46.

<sup>8</sup> B. M. Quencer and S. R. Crouch; *Multicomponent kinetic methods*; Crit. Rev. Anal. Chem., 24(3) 1993; pp. 243-262.

<sup>9</sup> H. A. Mottola; *Kinetic aspects of analytical chemistry*; Wiley, New York, (1988); pp. 15.

<sup>10</sup> D. Pérez-Bendito and M. Silva; *Kinetic methods in analytical chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, (1988), pp. 13-15.

### I.1.2. El uso de la Quimiometría

Los métodos cinéticos clásicos, en general, utilizan únicamente parte de la información cinética disponible (algunos se limitan a la utilización del comienzo de la reacción, casi ninguno aprovecha la información espectral...etc), y en muchos casos son métodos gráficos. Sin embargo la aparición de nuevo instrumental como espectrofotómetros de diodos, dispositivos de carga acoplada (CCD), aparatos de difracción circular (CD) etc. ha hecho que surjan nuevas posibilidades en el campo de las determinaciones cinéticas. Tanto los aparatos de diodos como los CCD permiten almacenar varios espectros en la zona de UV-VIS en cada segundo, lo que significa que la cinética de reacción puede ser seguida simultáneamente a varias longitudes de onda del espectro y no sólo a una o a unas pocas como se hacía con los métodos clásicos.

Toda esta información, que antes no podía ser aprovechada, ahora puede ser utilizada gracias al uso de ordenadores más potentes y con mayor capacidad de almacenamiento que, además, permiten el uso de métodos matemáticos más complejos y más eficientes que los tradicionales, aumentando de este modo el poder analítico. Lo que se conoce por *Quimiometría*, según una definición aportada por Siebert<sup>11</sup>: “*es la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos, así como de los principios de la buena ciencia de la medida, para extraer de forma eficiente información útil de datos químicos*”. La Quimiometría abarca un gran número de temas (filtrado de señales, optimización, reconocimiento de pautas, etc.) siendo de gran importancia los dedicados al diseño experimental y a la calibración.

#### I.1.2.1. Diseño experimental:

El diseño de experimentos es una metodología organizada y estructurada que se usa para determinar las relaciones existentes entre los distintos factores ( $X$ ) que afectan a un proceso y el resultado de ese proceso ( $Y$ ). Fue desarrollado por primera vez en los años 1920 y los 30, por *Sir Ronald A. Fisher*, renombrado matemático y genetista<sup>12</sup>.

Consiste en una estrategia para adquirir conocimiento empírico sobre el sistema en estudio, es decir, conocimiento basado en el análisis de los propios datos y no en modelos teóricos. Puede ser aplicado siempre que se trate de investigar cualquier

<sup>11</sup> Karl J. Siebert, *Chemometrics in Brewing - A Review*. J. Am. Soc. Brew. Chem., 59, 4 (2001), 147-156.

<sup>12</sup> Carrie Clark; *Experimental Design: Thumbnail Biographies*  
[www4.stat.ncsu.edu/~gumpertz/thumbnaillbios/Fisher1.doc](http://www4.stat.ncsu.edu/~gumpertz/thumbnaillbios/Fisher1.doc), (visto en 2010).

fenómeno con la intención de aprender sobre él o bien mejorar su funcionamiento. Los experimentos son generalmente costosos y acarrear un consumo de tiempo considerable, por lo tanto será interesante minimizar el número total de experimentos a realizar, mientras se asegure que cada experimento individual nos reporte tanta información y/o ahorro como sea posible, es decir hacerlos lo más eficientes posible. Por ejemplo, en vez de variar una sola variable (factor) cada vez, manteniendo el resto de los factores constante, que sería la forma tradicional de hacer los experimentos de optimización, pueden variarse varios factores simultáneamente de una forma sistemática y elegante, utilizando el concepto de diseños factoriales<sup>13</sup>.

Construir un diseño significa elegir cuidadosamente un pequeño número de experimentos que deben ser llevados a cabo bajo unas condiciones bien controladas<sup>14</sup>.

Los siguientes pasos están interrelacionados en la construcción de un diseño:

- Definir el objetivo de la investigación; por ejemplo, una mejor comprensión del proceso, búsqueda de condiciones óptimas, o reducir el número de variables relevantes, etc.
- Definir las variables que se controlarán durante el experimento (variables del diseño) y sus niveles o rangos de variación.
- Definir las variables que se medirán para describir el resultado de cada experimento (variables de respuesta) y examinar su precisión.
- Elegir, entre los diseños habituales disponibles, el más compatible con el objetivo marcado, con el número de variables y precisión de las medidas, y que tenga un coste razonable.

Generalmente los experimentos más simples en química son relativamente rápidos, y pueden repetirse, si hiciera falta, bajo condiciones más o menos diferentes con cierta facilidad. Es por ello que no todos los químicos ven la necesidad del diseño experimental a lo largo de su carrera. Sin embargo, la mayoría de los experimentos cotidianos son costosos. Por ejemplo, optimizar las condiciones para una síntesis o mejorar la separación cromatográfica de isómeros puede llevar días o meses de trabajo personal, y es esencial bajo tales circunstancias tener una buena apreciación de los fundamentos del diseño experimental. Existen varias razones importantes por las que el

---

<sup>13</sup> K H. Esbensen, *Multivariate data analysis – In practice*. 5º Ed., CAMO Software AS, Oslo (2006), 361.

<sup>14</sup> [http://www.camo.com/rt/Resources/design\\_of\\_experiment.html](http://www.camo.com/rt/Resources/design_of_experiment.html), (visto en 2010).

químico puede llegar a ser más productivo si entiende las bases del diseño de experimentos, entre las que principalmente se incluyen las siguientes<sup>15,16</sup>.

- *Screening*. Este tipo de experimentos implica saber extraer qué factores son los más relevantes para el éxito de un proceso. Un ejemplo podría ser el estudio de una reacción química, que depende de la proporción de disolvente, concentración del catalizador, velocidad de agitación, temperatura...etc. Puede que existan más de 10 factores relevantes, y entre ellos habrá algunos que puedan eliminarse del estudio, y otros que habrá que estudiar con más profundidad.

- *Optimización*. Esta es una de las aplicaciones más comunes del diseño experimental en la Química. Se trata de conseguir mejorar el rendimiento en una síntesis orgánica, reducir el tiempo de una técnica cromatográfica, aumentar la señal obtenida en el detector...etc. Los métodos sistematizados pueden conseguir alcanzar puntos óptimos mejores. El simplex<sup>17</sup>, por ejemplo, es uno de los métodos clásicos para la optimización aunque pueden usarse otros diferentes para buscar el punto óptimo, como el diseño central compuesto.

- *Ahorro de tiempo*. En el campo de la industria ésta es posiblemente la mayor de las motivaciones para usar el diseño experimental. Para conseguir esto son muy buenos ejemplos el diseño factorial fraccionado, el diseño de Taguchi o el Plackett-Burman, aunque en general todos los diseños contemplan este objetivo.

- *Modelos cuantitativos*. Los diseños con dos niveles por cada factor son muy interesantes en análisis exploratorio y pueden resultar ser modelos muy útiles, pero en muchas áreas de la química, tales como la calibración, es interesante tener varios niveles por cada factor, como para los casos de espectros de mezclas de varios componentes. Muchos de estos diseños están basados en el diseño central compuesto y la obtención de curvas de respuesta.

Se ha mencionado anteriormente que una de las servidumbres más importantes de los métodos cinéticos de análisis es su dependencia de una gran cantidad de variables químicas y físicas (concentraciones, temperatura, fuerza iónica, tiempo, etc). En muchas

---

<sup>15</sup> R. G. Brereton, *Chemometrics. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*; Wiley, Chichester, 2003. 15-19.

<sup>16</sup> G. Hanrahan and K. Lu; *Application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization*; Crit. Rev. Anal. Chem. 36 (2006), 141-151.

<sup>17</sup> R. G. Brereton, *Chemometrics. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*; Wiley, Chichester, 2003. 97-102

de las ocasiones, al menos, algunas de ellas están relacionadas, por lo que el diseño experimental, es la técnica de optimización más adecuada.

### I.1.2.2. Calibración:

En Química Analítica, calibración es el conjunto de operaciones que permiten establecer, en condiciones específicas, la relación existente entre los valores indicados por un instrumento de medida o un sistema de medida o los valores representados por una medida material o un material de referencia, y los valores correspondientes a una magnitud obtenidos mediante un patrón de referencia<sup>18</sup>. La fórmula matemática que relaciona las variables de respuesta o señales analíticas con las concentraciones es la ecuación de calibración o modelo.

En el caso de los métodos cinéticos de determinación, además de los métodos de calibración más clásicos<sup>19</sup> existen muchos y variados métodos con algoritmos matemáticos para la determinación de analitos, como regresiones no lineales<sup>20</sup>, filtro de Kalman<sup>21</sup>, etc.; pero estos métodos no sirven para un caso general donde quizá, no se conozca de manera precisa el modelo cinético ni las constantes de velocidad, o en aquellos sistemas afectados de *efecto sinérgico*<sup>22</sup>.

Unos métodos que sí pueden funcionar en diferentes situaciones de las anteriormente citadas son los conocidos con el nombre genérico de Calibración Multivariable; No necesitan ninguna ecuación a ajustar, ni los valores de las constantes de velocidad, ni los coeficientes que relacionan señal y concentración, etc. Algunos de ellos, aún siendo métodos lineales, pueden ajustar no linealidades<sup>23</sup>, con lo que pueden ser utilizados con diferentes órdenes de reacción y para situaciones muy variadas.

---

<sup>18</sup> AEN/CTN 66 - Gestión de la calidad y evaluación de la conformidad; *Sistemas de gestión de las mediciones. Requisitos para los procesos de medición y los equipos de medición*; UNE-EN ISO 10012:2003.

<sup>19</sup> D. Pérez-Bendito and M. Silva; *Kinetic methods in analytical chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, (1988), p. 25

<sup>20</sup> T. Garcia, A. Coteron, M. Martinez and J. Aracil; *Kinetic modelling of esterification reactions catalysed by immobilized lipases*, Chem. Eng. Sci., 51 (11) 1996, 2841-2846.

<sup>21</sup> Brown, S. D.; *The Kalman filter in analytical chemistry*, Anal. Chim. Acta, 181 (1986), 1.

<sup>22</sup> Efecto sinérgico: Efecto causado por un analito en el comportamiento de otro. Tradicionalmente ha supuesto una fuente importante de error en las determinaciones cinéticas multicomponentes. Puede tener su origen en interacciones reactivo-disolvente, cambios en los coeficientes de actividad, cambios en las constantes de velocidad debido a efectos catalíticos por impurezas, uso de reactivo en defecto estequiométrico, etc.

<sup>23</sup> Cullen, T. F. and Crouch, S. R.; *Multicomponent kinetic determinations using multivariate calibration techniques*; Microchim. Acta, 126 (1997), 1.

La Calibración Multivariable se engloba dentro de la Quimiometría y se introdujo en la Química en la década de los 60, al empezar a utilizarse los ordenadores en el proceso de análisis de datos. Su objetivo puede ser tanto la determinación simultánea de varios analitos<sup>24</sup>, la de un único analito en presencia de una matriz compleja que participa en la señal analítica<sup>25</sup>, o simplemente, la mejora de la relación señal/ruido o la eliminación de interferencias<sup>26</sup>. En el caso de las determinaciones multicomponentes se aprovecha, para resolver el sistema, tanto la diferencia cinética como la espectral entre los analitos o los productos formados.

### I.1.3. Técnicas de flujo.

Las técnicas de flujo son una herramienta muy útil para resolver una gran variedad de problemas prácticos; son mucho más que un simple medio de introducir las muestras en los instrumentos de medida. Ofrecen posibilidades muy interesantes a la hora de estudiar algunas reacciones, de implementar técnicas de separación, de monitorizar *online* sistemas que evolucionan, de llevar a cabo determinaciones multicomponentes, etc. Todo esto hace que se mejoren significativamente propiedades analíticas muy valoradas como sensibilidad, selectividad, rapidez, precisión<sup>27</sup>, etc. y que presenten una serie de ventajas respecto a las técnicas manuales.

- Requieren una menor participación humana.
- Permiten manipular un mayor número de muestras y reactivos a la vez.
- Presentan elevadas velocidades de muestreo.
- Permiten trabajar con reactivos y productos inestables generándolos “*in situ*” y en continuo<sup>28</sup>.
- Superan algunas desventajas de ciertos detectores (como el alto contenido salino en Espectroscopia de Absorbancia Atómica (AAS), o la adsorción en el electrodo

---

<sup>24</sup> Stenberg J.C., Stills H. S. and Schwedeman R. H.; *Spectrophotometric Analysis of Multicomponent Systems Using Least Squares Method in Matrix Form. Ergosterol Irradiation System*, Anal. Chem., 32 (1960), 84).

<sup>25</sup> G. López-Cueto, J. F. Rodríguez-Medina and C. Ubide; *Individual kinetic determinations using partial least squares calibration*, Analyst, 122 (1997), 519-523.

<sup>26</sup> R. Bro; *Multivariate calibration. What is in chemometrics for the analytical chemist?*; Anal. Chim. Acta 500 (2003), 185-194.

<sup>27</sup> M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro; *Flow injection analysis: A useful alternative for solving analytical problems*; Anal. Chem, 337 (1990), 662-666.

<sup>28</sup> G. Den Boef; *Unstable reagents in flow analysis*; Anal. Chim. Acta. 216 (1989), 289-297.

de trabajo en técnicas electroanalíticas) y dificultades provenientes de las cinéticas de reacción.

- Permiten la implementación de técnicas no cromatográficas de separación.
- Reducen costes analíticos.

Sin embargo algunos investigadores han visto las técnicas de flujo como una mera adaptación de los métodos manuales correspondientes anteriormente citados, sin un propósito de innovación analítico muy claro, y aumentando la complejidad experimental y, con ella, el número de variables a controlar.

En el desarrollo histórico de las técnicas de flujo se pueden considerar dos etapas diferenciadas<sup>29</sup>. Una en la que el sistema puede ser controlado fácilmente de forma exclusivamente manual, y la técnica de flujo es una alternativa que posee determinadas ventajas. Esto corresponde a las técnicas de análisis en flujo segmentado (SFA) y análisis por inyección en flujo (FIA). En una segunda etapa, el uso de los ordenadores se hace prácticamente imprescindible, lo que ocurre por ejemplo con el análisis por inyección secuencial (SIA) o con el análisis por inyección en flujo con multijeringa (MSFIA). En estas técnicas es imposible la reproducción manual de la secuencia de acontecimientos que se dan en el sistema de flujo, siendo estrictamente necesario el control de sus elementos mediante programas de ordenador.

Uno de los mayores inconvenientes de los programas comerciales diseñados en un principio fue su alta especificidad ya que iban dirigidos a la implementación de una técnica o un método concreto. Para evitar el tener que familiarizarse con distintos programas, cada vez que se emplee una técnica, o una configuración distinta, actualmente existen varias plataformas comerciales versátiles aplicadas a las técnicas de flujo automatizadas o semiautomatizadas como lo son *FlowTek*<sup>®30</sup>, desarrollado por el grupo de Van Staden, *FIALab*<sup>®</sup> del grupo de Ruzicka<sup>31</sup>, o el desarrollado por el grupo de trabajo de V. Cerdà, *Autoanalysis*<sup>® 32</sup>, que se detalla concisamente en su monografía “Introducción a los Métodos de Flujo” de reciente publicación<sup>33</sup>.

---

<sup>29</sup> Víctor Cerdà, *Introducción a los Métodos de Análisis en Flujo*, SCIWARE S.L., Palma de Mallorca (2006), 4.

<sup>30</sup> Global FIA, Inc.; *Sequential injection analysis and flow injection analysis*; <http://www.globalfia.com/index.php>; (visto en 2010).

<sup>31</sup> FIALab Instruments; *Welcome to FIALab*; <http://www.flowinjection.com/>, (visto en 2010).

<sup>32</sup> SCIWARE S.L.; *Autoanalysis*; <http://130.206.130.217:8080/sciware/Autoanalysis.do>, (visto en 2010).

<sup>33</sup> V. Cerdà. *Introducción a los Métodos de Análisis en Flujo*, SCIWARE S.L., Palma de Mallorca (2006), 215-226.

Ya se ha dicho que muchos de los inconvenientes que poseen los métodos cinéticos de análisis son fruto de la dificultad de control de las condiciones de reacción (pH, fuerza iónica, temperatura, concentraciones de los reactivos...etc.). El control automatizado de la mezcla de disoluciones, de la secuencia de medidas, y de los demás procesos inherentes al procedimiento analítico, minimiza errores aleatorios y sistemáticos en la medida del tiempo<sup>34</sup>, que pueden darse cuando la mezcla se hace de forma manual (*batch*). Por lo tanto, se aumenta de este modo la precisión del método de análisis<sup>35</sup>.

Como conclusión se puede decir que muchas de las limitaciones que presentaban los métodos cinéticos de análisis, son ahora subsanadas tanto por los nuevos métodos de cálculo, que los hacen más selectivos e independientes de las condiciones, como por la instrumentación automatizada y las técnicas de flujo<sup>36</sup>. En conjunto puede decirse que los métodos cinéticos son ahora más competitivos y, al menos en algunos casos, pueden ser una alternativa a los procedimientos basados en el equilibrio y a los cromatográficos.

---

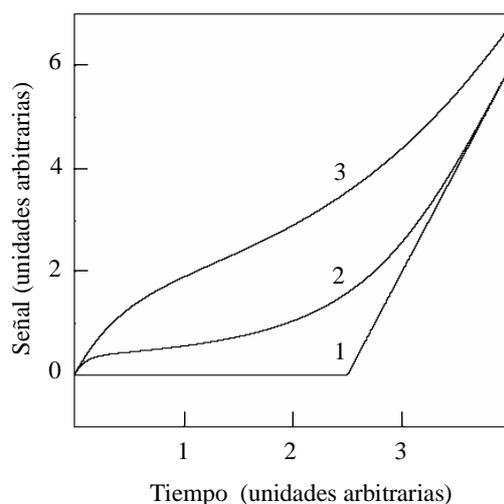
<sup>34</sup> S. R. Crouch; *Kinetic methods for intelligent automation*; Chem. and Intell. Lab. Syst., 8 (1990), 259-273.

<sup>35</sup> G. D. Christian and J. E. O'Reilly, *Instrumental Analysis*. 2<sup>nd</sup> Ed, Allyn and Bacon Inc., Massachussetts (1986), p. 583.

<sup>36</sup> T. K. Vel Krawczyk, M. Trojanowicz, N. El-Murr; *Enhancement of Selectivity of Electrochemical Detectors by Kinetic Discrimination in Flow-Injection Systems*; Lab. Rob. Autom., 12 (4) 2000; 205-215.

## II REACTIVOS POCO ESPECÍFICOS GENERADOS “IN SITU” PARA METODOS CINETICOS DE ANALISIS.

Existen procedimientos en los que el reactivo se genera o se añade a la mezcla de reacción a una velocidad constante, monitorizándose la reacción mediante una señal experimental proporcional a la concentración de las especies presentes. Por ejemplo, cuando sólo el reactivo da señal experimental se encuentran curvas como las de la figura adjunta (Figura 3), en las que el perfil varía dependiendo de la velocidad de generación/adición y de la reacción reactivo-analito. Cuando también los analitos/productos originan una respuesta experimental, la señal estará compuesta por una mezcla de de las señales del reactivo y de los analitos/productos. Se genera así una señal compleja, con gran contenido de información cinética, que puede depender únicamente de la concentración de la especie de interés, si el resto de las condiciones se mantienen bajo control.



**Fig. 3:** Perfiles de reactivo para diferentes velocidades de reacción. 1) Reacción instantánea; 2) Reacción con velocidad de reacción media; 3) Reacción con velocidad de reacción muy lenta.

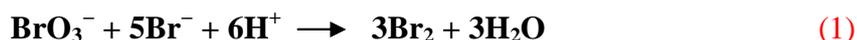
Este tipo de información cinética apenas ha sido usada con fines analíticos, debido probablemente a la dificultad de encontrar un parámetro que esté directamente relacionado con la concentración del analito. Sin embargo los perfiles cinéticos dependen tanto del mecanismo de reacción como de la concentración del analito. Además, también se ha indicado que, se puede relacionar cualquier perfil de reacción completo con la concentración del analito, aplicando calibración multivariable. En estos

casos, no es necesario considerar conceptos tales como estequiometría, punto final, etc. Como consecuencia, los perfiles de reacción pueden ser utilizados con fines analíticos siempre que se realice previamente una calibración adecuada<sup>25</sup>.

En la presente memoria se propone la utilización de algunos reactivos muy poco utilizados en la práctica analítica por dos razones fundamentalmente: por su baja selectividad (reaccionan con muchos compuestos) y por el peligro o la dificultad de su manejo (son inestables, corrosivos, etc.). Es el caso del Bromo y del reactivo de Fenton. El primero de los inconvenientes se intenta solucionar mediante la utilización de una selectividad extra, proveniente de la cinética y del uso de los métodos de calibración multivariable. El segundo de los inconvenientes se aborda mediante la generación de los reactivos “in situ”, ya sea por mezclas manuales (en “batch”) o utilizando técnicas de flujo.

### II.1.1. Bromo.

La mezcla bromato-bromuro ha sido largamente utilizada, para aplicaciones analíticas, como forma de generar bromo de manera controlada<sup>37</sup>. La generación de bromo es una reacción de cinética lenta muy estudiada desde hace tiempo y cuya estequiometría es:



El modelo cinético de esta reacción responde a la siguiente ecuación<sup>38</sup>:

$$v = -\frac{d[\text{BrO}_3^-]}{dt} = -\frac{1}{5} \frac{d[\text{Br}^-]}{dt} = \frac{1}{3} \frac{d[\text{Br}_2]}{dt} = k_{\text{Br}} [\text{BrO}_3^-] [\text{Br}^-] [\text{H}^+]^2 \quad (2)$$

En medio neutro la mezcla bromato – bromuro puede mantenerse sin reacción aparente durante cierto tiempo. La forma frecuente de operar en análisis cinético es la de añadir una mezcla de bromato – bromuro, en medio neutro, como último reactivo a una mezcla de reacción ácida. El bromo que se va formando en estas condiciones da lugar normalmente a reacciones de bromación de compuestos orgánicos. Se eligen

<sup>37</sup> H. A. Laitinen, W. E. Harris; *Chemical Analysis*, 2<sup>nd</sup> Ed., McGraw Hill, New York, 1975, p. 371.

<sup>38</sup> J. H. Espenson; *Chemical Kinetics and Reaction Mechanism* 2<sup>nd</sup> Ed., McGraw Hill, New York, 1995, 5.

condiciones de reacción tales que la reacción de generación de bromo sea más lenta que la del consumo del mismo por parte de los analitos. Esto conduce a que el bromo generado sólo aparezca en la mezcla de reacción una vez que todo el analito se ha consumido<sup>39</sup>. La aparición de bromo en la disolución (normalmente indicada por la decoloración de naranja de metilo) indica el final del consumo de bromo, de forma que el tiempo transcurrido es indicación de la concentración inicial de analito presente. De esta manera, se establece un sencillo método a tiempo variable que ha sido utilizado para determinar especies como cresoles, xilenoles, etil y metil fenoles, paracetamol, ácido acetilsalicílico, ácido salicílico, etc<sup>40</sup>. Este tipo de metodología sólo permite determinar un analito o bien la suma de todos los analitos que reaccionan rápidamente con bromo, pero no permite determinaciones multicomponentes ni individuales en presencia de otros compuestos que den reacción. Más recientemente se han propuesto determinaciones multicomponentes con bromo, aprovechando particularidades del equilibrio ceto – enólico, en determinaciones de mezclas binarias con acetona<sup>41</sup> y en determinaciones de mezclas binarias con ácido acetilsalicílico<sup>42</sup>.

El uso de la calibración multivariable, aplicada a datos cinético-espectrofotométricos a varias longitudes de onda, ha demostrado, además, que la mezcla bromuro-bromato puede utilizarse con carácter general para determinaciones cinéticas multicomponentes, y así se ha aplicado a la determinación de mezclas de ácido acetilsalicílico y paracetamol en productos farmacéuticos<sup>43</sup>. No obstante, esta es la única aplicación que se ha encontrado de la mezcla bromuro-bromato con esta finalidad y en estas condiciones. Sin embargo, las posibilidades son muchas debido a que:

- el bromo da reacciones de sustitución, adición y oxidación-reducción con diferentes especies orgánicas.

---

<sup>39</sup> R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, M. Valcarcel, H. M. Widmer; *Analytical Chemistry. A Modern approach to analytical science; 2<sup>nd</sup> Ed.*, Wiley, Weinheim, 2004, p. 439.

<sup>40</sup> D. Pérez – Bedito, and M. Silva; *Kinetic Methods In Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester (1988), 146.

<sup>41</sup> G. López-Cueto, M. Ostra, C. Ubide; *The bromination of acetone. Application to multicomponent kinetic determinations*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 372 (2002), 347.

<sup>42</sup> G. López-Cueto, M. Ostra, C. Ubide; *The acetylsalicylic acid – bromine system for multicomponent kinetic determinations*; *Anal. Bioanal. Chem.*, 374 (2002), 915.

<sup>43</sup> G. López-Cueto, M. Ostra, C. Ubide; *New way of application of the bromate–bromide mixture in kinetic analysis*; *Anal. Chim. Acta*, 445 (1) 2000, 117.

- la velocidad de estas reacciones es en muchos casos lenta y, en general, el modelo cinético depende de cada compuesto. Esta es la base de la discriminación cinética.

- el bromo tiene bandas de absorción tanto en el visible como en el ultravioleta. Ello permite elegir un gran número de longitudes de onda, según interese seguir sólo la variación en la concentración de las reaccionantes o de los productos o de todos ellos simultáneamente (discriminación espectral y/o cinética).

Todo esto hace que puedan abrirse nuevas posibilidades en la utilización de bromo, generado “in situ” como reactivo para determinaciones cinéticas multicomponentes.

### II.1.2. Reactivo de Fenton.

Hace unos 30 años se dijo:

*“Aunque en principio las reacciones inducidas en cadena se pueden utilizar como base de pruebas cualitativas muy sensibles, es muy difícil controlar suficientemente las condiciones para que se puedan obtener resultados cuantitativos”<sup>44</sup>.*

Las reacciones inducidas han sido frecuentemente consideradas como fuentes de error en la práctica analítica<sup>45</sup>. Siempre se generan en sistemas redox en los que el oxidante y el reductor intercambian diferente número de electrones. Usualmente se han clasificado en dos grandes grupos: reacciones acopladas y reacciones inducidas en cadena<sup>46</sup>. En el primer caso se generan estados de reacción intermedios muy reactivos durante el proceso, pero puede hacerse que la reacción transcurra cuantitativamente de acuerdo a una estequiometría fija. En el segundo caso, normalmente están involucradas especies radicales y la extensión de la reacción inducida puede alcanzar en teoría, límites altamente no estequiométricos. Este último grupo de reacciones son una fuente de error importante en determinaciones analíticas y probablemente esa sea la razón por

<sup>44</sup> H. A. Laitinen, W.E. Harris, *Chemical Analysis 2<sup>nd</sup> Ed.*, McGraw-Hill, New York (1975), 301.

<sup>45</sup> L. J. Csányi, in I.M. Kolthoff, J.P. Elving (Eds.) *Treatise on Analytical Chemistry 2<sup>nd</sup> Ed. Part I, Vol 2*; Wiley, New York (1979), p 711.

<sup>46</sup> A. I. Medalia; *Induced Reactions in Analytical Chemistry*; Anal. Chem. 27 (1955), 1678.

la que apenas han sido utilizadas con fines analíticos<sup>47</sup>. Otras razones a tener en cuenta son el carácter transitorio de los radicales y su alta reactividad, lo que origina sistemas químicos muy complejos con una estequiometría no definida.

El reactivo de Fenton (FR) es una mezcla de peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y una sal de hierro (II)<sup>48</sup>, que frecuentemente se usa para la oxidación y degradación de sustancias orgánicas, debido a su alto poder oxidante y a su simplicidad<sup>49,50</sup>. La oxidación de sustancias orgánicas con FR se conoce como la reacción de Fenton<sup>51</sup>, la cual es de hecho una reacción inducida en cadena. El reactivo real en la mezcla  $\text{H}_2\text{O}_2$ -  $\text{Fe}^{2+}$  es un intermedio altamente reactivo, pero existe mucha controversia acerca de él. En disoluciones acuosas, la especie más comúnmente aceptada ha sido el radical hidroxilo ( $\bullet\text{OH}$ )<sup>52</sup>, aunque también se ha propuesto el ión ferrilo ( $\text{FeO}^{2+}$ )<sup>53</sup>. Ambas propuestas todavía se defienden firmemente por grupos de investigadores muy activos y hay dos publicaciones relativamente recientes que revisan la bibliografía relevante a favor del radical hidroxilo<sup>54</sup> o del ion ferrilo<sup>55</sup>. Ambas especies son extremadamente reactivas y se han comparado algunas de sus propiedades termodinámicas<sup>56</sup>.

Cualquiera que sea la especie intermedia, se debe esperar poca selectividad cuando se usa el FR dada su alta reactividad, y esto probablemente ha sido una de las razones adicionales que han limitado el uso del FR con fines analíticos, de hecho, sólo se ha encontrado una aplicación analítica reciente de la química de Fenton, en la que se determina peróxido de hidrógeno en fase gas en el ambiente<sup>57</sup>. Sin embargo, las

---

<sup>47</sup> L. J. Csányi, in I.M. Kolthoff, J.P. Elving (Eds.); *Treatise on Analytical Chemistry*, 2<sup>nd</sup> Ed. Part I, Vol 2, Wiley, New York (1979), 769.

<sup>48</sup> L. J. Csányi, in C.H. Bamford and C.F.H. Tipper (Eds.), *Comprehensive Chemical Kinetics*, Vol 7, Elsevier, Amsterdam (1972), 564.

<sup>49</sup> S.M. Arnold, W.J. Hickey, R.F. Harris; *Degradation of Atrazine by Fenton's Reagent: Condition Optimization and Product Quantification*; Environ. Sci. Technol., 29 (8) 1995, 2083.

<sup>50</sup> S. Chiron, A. Fernandez-Alba, A. Rodriguez, J.A. Peres; *Pesticide chemical oxidation: state-of-the-art*; Wat. Res., 34 (2) 2000, 366.

<sup>51</sup> E. Neyens, J. Baeyens; *A review of classic Fenton's peroxidation as an advanced oxidation technique*; J. Hazard. Mater. 98 (2003), 33-50.

<sup>52</sup> W. G. Barb, J. H. Baxendale, P. George, K. R. Margrave; *Reactions of ferrous and ferric ions with hydrogen peroxide*; Trans. Faraday Soc. 47 (1951) 462.

<sup>53</sup> W.C. Gray, M.H. Gorin, *Ferryl ion, a compound of tetravalent iron*; J. Am. Chem. Soc. 54 (1932), 2124.

<sup>54</sup> C. Walling, *Intermediates in the Reactions of Fenton Type Reagents*; Acc. Chem. Res., 31 (1998), 155.

<sup>55</sup> H.B. Dunford; *Oxidations of iron(II)/(III) by hydrogen peroxide: from aquo to enzyme*; Coord. Chem. Rev., 233-234 (2002), 311.

<sup>56</sup> W. H. Koppenol, J.F. Liebman; *The oxidizing nature of the hydroxyl radical. A comparison with the ferryl ion ( $\text{FeO}^{2+}$ )*; J. Phys. Chem., 88 (1984), 99.

<sup>57</sup> J. Liu, S.M. Steinberg, B.J. Jonson; *A high performance liquid chromatography method for determination of gas-phase hydrogen peroxide in ambient air using Fenton's chemistry*; Chemosphere, 52 (2003), 815.

posibilidades que tiene como reactivo a utilizar en determinaciones individuales o en mezclas multicomponentes residen en que:

- Posee un alto poder oxidante y reacciona con un gran número de posibles analitos de naturaleza orgánica.
- La generación de los intermedios altamente reactivos incluye alguna etapa lenta, aunque la reacción de estos con los compuestos orgánicos sea generalmente rápida. El conjunto es, por lo tanto, un proceso lento, aunque solamente en tanto en cuanto lo es la aparición del reactivo en el seno de la disolución. No obstante, la diferente reactividad del intermedio reactivo con los diferentes sustratos puede dar lugar a discriminación cinética<sup>58</sup>.

Igual que el reactivo de Fenton, podrían utilizarse otras mezclas de reacción que generan radicales libres distintos al  $\bullet\text{OH}$ , como pueden ser el  $\bullet\text{HO}_2$  o los radicales sulfato<sup>59</sup>.

Así pues, tanto en el caso del bromo como en el del reactivo de Fenton pueden esperarse reacciones de cinética lenta entre el reactivo y los diferentes sustratos, independientemente de la velocidad de generación de los reactivos. En estas condiciones el seguimiento de la cinética de la reacción puede aportar discriminación cinética que, unida a la discriminación espectral, puede ser bien aprovechada por los métodos de calibración multivariables para proponer nuevos métodos analíticos de resolución de mezclas de sustancias relacionadas (determinaciones multicomponentes).

---

<sup>58</sup> Walter Z. Tang and C. P. Huang; *Effect of chlorine content of chlorinated phenols on their oxidation kinetics by Fenton's reagent*; *Chemosphere*, 33 (8) 1996, 1621-1635.

<sup>59</sup> C. H. Bamford, C. F. H. Tipper (Eds.); *Comprehensive chemical kinetics*, Vol. 7; Amsterdam (1972), pp 554-568.

### III CONSIDERACIONES SOBRE LA INCERTIDUMBRE ESPECTROFOTOMETRICA

La forma más habitual de abordar la resolución de muestras complejas (muchos analitos, efectos de la matriz, etc.) ha sido el uso de la cromatografía. Gracias a la quimiometría y la automatización, problemas que antes no podían ser resueltos por métodos cinéticos de análisis, hoy en día tienen una posibilidad de competir con la cromatografía.

Cuando los analitos son sustancias poco volátiles, la técnica empleada por excelencia es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y también la electroforesis capilar (CE), que frecuentemente emplean detectores de absorción molecular ultravioleta-visible. Los mismos detectores son utilizados, en general, en los métodos cinéticos de análisis. Sin embargo, la opinión más generalizada es que los límites de detección de los métodos de HPLC Y CE son más bajos que los obtenidos por métodos espectroscópicos similares. ¿Cómo puede ser esto cierto? , En realidad en los métodos que utilizan HPLC, CE, etc, la banda de analitos se ensancha en su recorrido por el sistema (columna o capilar) con lo que se diluye en extensión no despreciable antes de llegar al detector. Por lo tanto, la utilización adecuada de la capacidad discriminante cinético-espectrofotométrica, aprovechada mediante el uso de la calibración multivariable, debería dar lugar a métodos competitivos de determinación de sustancias en los casos de muestras no excesivamente complejas. Es verdad que en el caso de HPLC Y CE la pequeña cantidad de muestra que se necesita, permite una más eficaz preconcentración, muy útil especialmente para muestras de interés medioambiental, y que la celda espectrofotométrica no es accesible al experimentador; pero el caso es que se pueden encontrar picos cromatográficos (y también de electroforesis capilar) con valores de absorbancia extremadamente bajos (0.002 y menores), y al mismo tiempo con un ruido increíblemente pequeño<sup>60,61</sup>.

Ciertamente el límite de detección depende, además de la sensibilidad, de la precisión de la medida, que a su vez depende de la incertidumbre experimental a que está sometida la misma. En las técnicas cromatográficas y similares, la inyección y el ensanchamiento de la banda introducen una incertidumbre extra que en los métodos

---

<sup>60</sup> D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Analytical Chemistry. An Introduction, 7<sup>th</sup> Ed.*; Saunders College Publishing, Fort Worth (2000), 717.

<sup>61</sup> K.A. Rubinson, J.F. Rubinson; *Análisis Instrumental*; Prentice Hall, Madrid (2001), 740.

exclusivamente espectrofotométricos no debe esperarse. Todas estas consideraciones condujeron a considerar interesante, en nuestro caso, tener una visión actualizada de la incertidumbre espectrofotométrica.

En 1997 Paul De Bièvre escribía que: “*algunos resultados de medidas analíticas se publican sin ningún tipo de estimación de su confianza (incertidumbre) en revistas internacionales (incluso algunas con mucha reputación)*” y que “*Cualquier resultado solo puede ser tomado en consideración, si es que va acompañado por un rango de valores entre el que puede encontrarse; Por lo tanto cualquier valor que no esté acompañado de una estimación de su confianza, no debería publicarse, porque no es un valor*”<sup>62</sup>.

La precisión en la medida de la espectroscopia de absorción molecular está limitada por el error indeterminado, o ruido<sup>63</sup> (hoy en día tiende más a utilizarse la palabra incertidumbre), y depende de una serie de factores<sup>64</sup>. Para entender cómo afecta a la medida cada uno de estos factores, primeramente hay que conocer cuáles son éstos y qué relación tiene cada uno de ellos con el proceso de medida. El proceso más habitual seguido para una medida espectrofotométrica, en un espectrofotómetro de haz sencillo, suele ser:

- 1) Introducción de la disolución de referencia en el camino óptico.
- 2) Medida de la fotocorriente de la disolución de referencia (100% transmitancia).
- 3) Medida de la corriente oscura (0% T).
- 4) Introducción de la disolución de la muestra en el camino óptico.
- 5) Medida de la fotocorriente de la muestra (medida del % de T).

---

<sup>62</sup> P. De Bièvre; *Measurement results without statements of reliability (uncertainty) should not be taken seriously*; Accred. Qual. Assur 2 (1997), 269.

<sup>63</sup> Naturaleza del ruido: El ruido puede clasificarse en cuatro categorías:

- *Ruido térmico o de Johnson*: Proviene de la agitación térmica de los electrones en algunos elementos resistivos de los circuitos (resistencias, condensadores...etc.). Su valor es independiente de la frecuencia.
- *Ruido de disparo*: Proviene de cargas discretas moviéndose aleatoriamente entre las uniones tales como la unión P-N en semiconductores o entre el ánodo y el cátodo en un fotodiodo de vacío. También es independiente de la frecuencia. Tanto el ruido de disparo como el de Johnson se denominan *ruidos fundamentales* dado que dependen de la naturaleza de los aparatos en que aparecen.
- *Ruido de parpadeo*: Su valor es inversamente proporcional a la frecuencia de la señal que se observa, y se le suele denominar ( $1/f$ ).
- *Ruido ambiental*: Es una mezcla de distintos ruidos provenientes del entorno. Tanto el ruido ambiental como el de parpadeo se suelen denominar *ruido en exceso* dado que pueden minimizarse, con un buen diseño de los instrumentos.

<sup>64</sup> G. D. Christian, J. E. O'Reilly; *Instrumental Analysis 2<sup>nd</sup> Ed.*; Allyn and Bacon, Inc.; Massachussets (1986), 846-851.

La precisión global de la medida está relacionada con la precisión en cada uno de estos pasos. Las medidas de los pasos 2, 3 y 5 son imprecisas debido al ruido proveniente del sistema de lectura del amplificador, al ruido de disparo y al ruido en exceso de la corriente oscura. Las medidas de los pasos 2 y 5, además, son imprecisas debido al ruido de disparo de la fotocorriente, parpadeo de la fuente de luz y de la irreproducibilidad que conllevan los pasos 1 y 4. En un espectrofotómetro de doble haz los pasos son un poco distintos pero las causas de incertidumbre son las mismas,

Los errores indeterminados propios de estos pasos se combinan para dar una incertidumbre (error indeterminado) global del valor final obtenido de T. Se puede deducir la relación que existe entre la incertidumbre hallada en la medida de T y la incertidumbre de la concentración que resulta, escribiendo la ley de Beer de la siguiente manera:

$$c = -\frac{I}{\epsilon b} \log T \quad (3)$$

Donde los símbolos tienen su significado habitual. Aplicando derivadas parciales a esta ecuación, y manteniendo  $\epsilon b$  constante, se llega a la expresión:

$$\partial c = \frac{-0.434}{\epsilon b T} \partial T \quad (4)$$

Donde  $\partial c$  se puede interpretar como una incertidumbre de  $c$  que resulta de la incertidumbre (o ruido)  $\partial T$  de  $T$ . Dividiendo esta ecuación por la anterior, se obtiene:

$$\frac{\partial c}{c} = \frac{0.434}{\log T} \times \frac{\partial T}{T} \quad (5)$$

Donde  $\partial T / T$  es el error relativo indeterminado de T, atribuible al ruido de los pasos de medida, y  $\partial c / c$  es el error relativo indeterminado de concentración que de ahí resulta.

La mejor y más habitual medida del error indeterminado es la desviación estándar ( $s$ ), que se mide fácilmente en un instrumento dado haciendo 20 o más medidas repetidas de una disolución absorbente. Sustituyendo los diferenciales de la **ecuación 5** por los correspondientes valores de  $s_T$  y  $s_c$ , resulta:

$$\frac{s_c}{c} = \frac{s_{Abs.}}{Abs} = \frac{0.434}{\log T} \frac{s_T}{T} \quad (6)$$

donde  $s_{Abs}$  y  $Abs$  son la desviación estándar de la absorbancia y la absorbancia respectivamente y  $s_{Abs./Abs.}$  y  $s_T/T$  son desviaciones estándar relativas.

Al observar la **ecuación 6** se encuentra que la incertidumbre en la medida fotométrica de la concentración varía de forma no lineal con la transmitancia. La situación es incluso algo más complicada que lo que aparenta la propia **ecuación 6**, porque la incertidumbre en la transmitancia,  $s_T$ , es en muchas circunstancias también dependiente de  $T$ , aunque la incertidumbre generada por el parpadeo de la fuente y la proveniente de la posición de la celda de medida no lo sean.

Evidentemente, la incidencia de la incertidumbre global en el valor de la absorbancia, es tanto mayor conforme el valor de la absorbancia disminuye. Esta incertidumbre global es la que dictará el menor valor de la absorbancia que puede ser medido con seguridad, y por lo tanto, influye en el cálculo del límite de detección y en el resto de los *parámetros de calidad*<sup>65,66</sup> (“*figures of merit*”) de los métodos espectrofotométricos. Teniendo en cuenta que la forma aditiva de la incertidumbre es la varianza, la incertidumbre global de un método espectrofotométrico será:

$$\frac{s_{Abs}}{Abs} = \sqrt{\sum_i \left( \frac{s_{Abs}}{Abs} \right)_i^2} \quad (7)$$

siendo  $i$  cada uno de los efectos independientes de la incertidumbre. La forma de la **ecuación 7** significa que únicamente las fuentes de incertidumbre numéricamente mayores serán las significativas, debido al efecto cuadrático.

En un estudio teórico y experimental detallado, Rothman, Crouch e Ingle describieron, hace más de 30 años, varias fuentes de incertidumbre instrumentales y

<sup>65</sup> En analítica, los *parámetros de calidad* (“*figures of merit*”) son características de funcionamiento de una determinación analítica. Pueden utilizarse para la elección entre distintos métodos potencialmente útiles y evaluar u optimizar un método que ya está en uso. La importancia de los parámetros de calidad en analítica está generalmente aceptado.

<sup>66</sup> Chemometry Consultancy (Joan Ferré); *Analytical figures of merit*; <http://www.chemometry.com/Research/FOM.html>.

mostraron su efecto neto sobre la precisión de las medidas de absorbancia o transmitancia<sup>67</sup>. La conclusión más importante desde un punto de vista práctico es, probablemente, que en las condiciones más habituales de medida, tanto para instrumentos sencillos como para los de calidad, la fuente de incertidumbre más importante, cuando se mide a absorbancias bajas (y muchas veces no tan bajas), es la dificultad para reproducir la posición de la cubeta. Los autores esperaban mejoras significativas a lo largo del tiempo con los nuevos diseños de portacélulas y con los nuevos detectores y fuentes de luz. Aproximadamente 35 años después, se siguen asumiendo las mismas causas de error y con la misma importancia; es decir, el trabajo anteriormente citado sigue siendo la referencia fundamental y por lo tanto, parece conveniente una revisión experimental de la incertidumbre fotométrica, para actualizar los valores de incertidumbre y para probar la validez de la **ecuación 6** en los nuevos sistemas de medida (diodos, CCD, etc.).

---

<sup>67</sup> L. D. Rothman, S. R. Crouch and J. D. Ingle, Jr.; *Theoretical and experimental investigation of factors affecting precision in molecular absorption spectrophotometry*; *Anal. Chem.*, 47 (1975), 1226-1233.

#### IV CONSIDERACIONES SOBRE EL LÍMITE DE DETECCIÓN EN CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE.

Se ha visto la importancia que tiene la incertidumbre en las determinaciones espectrofotométricas, pero la misma afecta también al resto de las técnicas instrumentales. En el caso de no existir incertidumbre en todo lo relacionado con las medidas analíticas, se podría hacer una corrección del fondo perfecta, sin tener en cuenta si la señal es pequeña o no lo es. Podrían obtenerse resultados absolutamente precisos todas las veces que se midiera, y este método analítico sería el único, aplicable a todos los analitos. Sin embargo, se sabe que un experimento que no esté sujeto a la presencia de incertidumbre es imposible, con lo que tampoco existirá el método de análisis perfecto.

Del mismo modo, si la medida de la señal del fondo no fuera reproducible, la calidad del análisis empeoraría ya que no se podría estar seguro de cuál es el valor del blanco, y qué magnitud restar para corregir el fondo.

Por último, si la señal del fondo fuese constante, pero el nivel de ruido fuera tan alto que no permitiera determinar la magnitud del fondo, no se conseguiría ninguna información útil a menos que se redujese la incertidumbre instrumental.

De estos tres párrafos anteriores se deduce que la precisión y exactitud de un ensayo dependen sobre todo de tres factores: la magnitud de la señal del fondo, la magnitud de la señal del analito y el nivel de la incertidumbre. Estas tres ideas meramente cualitativas, se evalúan con parámetros cuantitativos obtenidos de medidas experimentales: la relación señal/ruido, la sensibilidad y el límite de detección. Estos parámetros, designados de calidad (*figures of merit*), nos ayudarán a realizar una evaluación de un instrumento, de una técnica analítica o de un procedimiento determinado. De estos tres parámetros de calidad el que quizá tenga una mayor relevancia en análisis químicos sea el límite de detección ya que se basa en los tres criterios siguientes<sup>68</sup>:

- Es un número único.
- Se puede utilizar para comparar datos de diferentes laboratorios.
- Si su cálculo se realiza con cuidado, puede usarse, para comparar casi todas las técnicas instrumentales empleadas en análisis químico.

---

<sup>68</sup> K.A. Rubinson, J.F. Rubinson, *Análisis Instrumental*, Prentice Hall, Madrid (2001), 155-156.

La razón de todo ello estriba en que el límite de detección depende tanto de la sensibilidad como de la precisión global del método en cuestión.

El concepto de límite de detección ha sido y sigue siendo uno de los más controvertidos en el área de la Química Analítica. Se han propuesto múltiples definiciones a lo largo de los años, así como diversidad de metodologías para su cálculo, lo que ha provocado sin lugar a dudas tal situación. No fue hasta 1995 cuando las organizaciones IUPAC e ISO deliberaron y consensuaron una posición armonizada en cuanto a conceptos y nomenclatura<sup>69</sup>, aunque con pequeños matices distintos. De acuerdo con las dos definiciones, el límite de detección es un parámetro del método analítico definido a priori, porque su cálculo se fija antes de que se realice la medida. El límite de detección (L.O.D.) se define como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede detectarse con cierta fiabilidad por un método analítico determinado<sup>70</sup>.

Respecto a la detección del analito pueden considerarse dos tipos de errores (decisiones erróneas) que deben tenerse en cuenta (Figura 4): Asumir que el analito está presente cuando realmente no lo está (error del tipo I), o aceptar que el analito está ausente cuando en realidad está presente (error del tipo II). La probabilidad de cometer el error del tipo I viene dada por  $\alpha$  mientras que la probabilidad de cometer el error de tipo II se representa mediante  $\beta$ <sup>71</sup>.

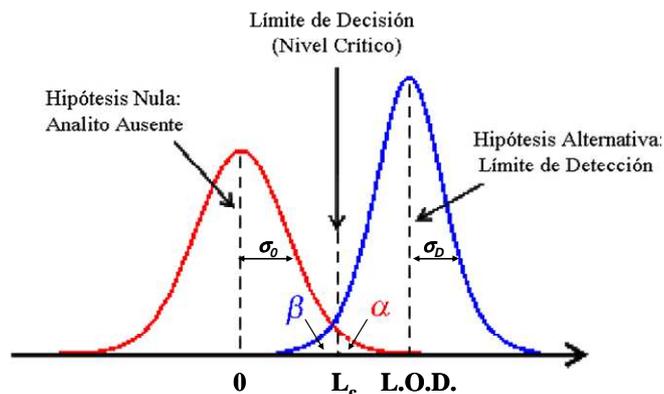


Fig. 4: Distribuciones gaussianas que muestran el límite de detección (L.O.D.) y punto crítico de decisión (L<sub>c</sub>). Se contemplan dos tipos de errores con una probabilidad asociada para cada uno de ellos. El error de contemplar que el analito existe cuando realmente no hay (Error tipo I) y se le asigna una probabilidad  $\alpha$ . Al error de decir que el analito no se encuentra presente cuando en realidad existe (Error del tipo II) se le asigna una probabilidad  $\beta$ .

<sup>69</sup> L. A. Currie; *Detection: International update, and some emerging di-lemmas involving calibration, the blank, and multiple detection decisions*; Chemom. Intell. Lab. Syst.; 37 (1997); 151-181.

<sup>70</sup> L. A. Currie; *Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities*; IUPAC Recommendations 1995; Pure & Appl. Chem., 67 (10) 1995, 1699-1723.

<sup>71</sup> D.L. Massart, G.B.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi and J. Smeyers-Verbeek, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997, p 423.

Los modelos de predicción univariantes solamente son fiables si la señal que se escoge es altamente específica para el analito de interés. Sin embargo, ya se ha visto anteriormente, que cuando los datos univariantes no son muy selectivos, el uso de la Quimiometría desempeña un papel muy importante en la determinación individual de analitos, o incluso de mezclas de ellos.

Los quimiómetros han fomentado el uso de la calibración multivariable desde su aparición en los 70. Los modelos de calibración multivariable apuntan a conseguir un modelo predictivo válido, utilizando múltiples variables predictoras altamente no selectivas. En un informe técnico de la IUPAC<sup>72</sup>, se resume la utilidad potencial de la Quimiometría de la siguiente forma: “*Los mejores niveles de selectividad se pueden conseguir aplicando la Quimiometría en aquellos métodos físico-químicos utilizados para la discriminación entre analitos*”; es decir, que aplicando la Quimiometría se puede extraer eficientemente información selectiva de datos no selectivos. Con la creciente sofisticación de la instrumentación analítica, es inevitable pensar en los modelos de calibración multivariable como los más adecuados, cada uno de ellos con sus propias asunciones, y sus características estadísticas. Es por ello que la estimación de la incertidumbre y de los parámetros de calidad de estos métodos se ha convertido en un área importante de la investigación actual, especialmente en el campo de la Quimiometría.

Con respecto a los *parámetros de calidad* y la estimación de la incertidumbre, no deberían existir diferencias conceptuales entre los métodos de calibración univariantes y multivariantes. Por lo tanto, al describir un método multivariable se deberían incluir los correspondientes parámetros de calidad, y del mismo modo, los informes sobre la concentración de analito predicha por los métodos multivariantes deberían incluir la correspondiente estimación de su incertidumbre. Sin embargo, ya se ha visto que mientras para los métodos univariantes existe consenso sobre las expresiones que se han de utilizar, falta por realizar su generalización a la calibración multivariable. Boqué y Rius<sup>73</sup> han recogido algunas de las propuestas que se realizaron sobre la estimación del límite de detección en la calibración multivariable hasta 1996, pero una revisión más reciente aparece en el informe técnico de la IUPAC de 2006<sup>72</sup>.

<sup>72</sup> A. C. Olivieri, N. M. Faber, J. Ferré, R. Boqué, J. H. Kalivas, and H. Mark; *Uncertainty estimation and figures of merit for multivariate calibration*; IUPAC Technical Report; Pure Appl. Chem., 78 (3) 2006, 633–661.

<sup>73</sup> R. Boque, F. X. Rius; *Multivariate detection limits estimators*; Chemom. Intell. Lab. Syst., 32 (1996), 11-23.

#### IV.1.1. Distintas propuestas.

Entre las distintas propuestas para la estimación del límite de detección en calibración multivariable se recogen las siguientes:

##### IV.1.1.1. Señal Analítica Neta:

La señal analítica neta (NAS: del inglés Net Analytical Signal) correspondiente a un componente en una mezcla, fue definida como la parte de la señal que es ortogonal a los espectros del resto de componentes<sup>74</sup>. En calibración multivariable podría decirse que el vector *NAS* es la parte de la señal en bruto, que es útil para la predicción de un componente. Utilizando la norma de la Señal Analítica Neta, un modelo de calibración multivariable se puede representar exactamente (no de forma aproximada) como una gráfica pseudo-univariable<sup>75</sup> y por lo tanto los parámetros de calidad, y entre ellos el límite de detección pueden derivarse de esta representación de una forma muy similar a la calibración univariable.

##### IV.1.1.2. Propuestas basadas en fórmulas:

Consiste en la aplicación de la fórmula de la propagación de los errores para el error estándar de predicción a un nivel de concentración de cero. La fórmula elegida explica todas las fuentes de error en los datos (señales y concentraciones) para las muestras tanto de calibración como de validación. La estimación del límite de detección realizada de esta manera es específica de cada muestra, es decir, depende del nivel de interferentes que posea la muestra<sup>76</sup>.

##### IV.1.1.3. Transformación de modelos multivariantes a univariantes:

Se trata de realizar una regresión univariante estándar utilizando una señal “sustituta” variable, obtenida de la señal multivariable de la muestra, relacionándola directamente con la concentración del analito en esa muestra. Esta aproximación funcionará bien siempre que el modelo multivariable sea capaz de extraer

---

<sup>74</sup> A. Lorber, *Error propagation and figures of merit for quantification by solving matrix equations*, Anal. Chem., 1986, 58, 1167-1172.

<sup>75</sup> N. M. Faber. *Mean centering and computation of scalar net analyte signal in multivariate calibration*, J. Chemom. 12 (1998), 405.

<sup>76</sup> R. Boqué, M.S. Larrechi, F.X. Rius, *Multivariate detection limits with fixed probabilities of error*, Chemom. Intell. Lab. Syst. 45(1999), 397-408.

eficientemente la señal correspondiente al analito seleccionado. Así por ejemplo utilizando la técnica MCR<sup>77</sup> se podría relacionar la señal de los espectros puros extraídos del modelo con la concentración de los analitos. O bien, como proponen Ortiz y colaboradores<sup>78</sup>, utilizar como señal sustituta, la concentración de analito predicha por el modelo de PLS óptimo para las muestras de calibración.

#### IV.1.1.4. Clasificadores neuronales:

Se trata de una aproximación no paramétrica, que consiste en el entrenamiento de una red neuronal para que optimice simultáneamente las probabilidades de predecir tanto un falso positivo como falsos negativos, para un umbral de concentraciones determinado<sup>79</sup>. Esta aproximación puede ser llevada a cualquier nivel de concentración, y requiere un grupo de muestras de entrenamiento representativo con niveles de concentración bien escogidos por encima y por debajo del umbral límite.

Por lo tanto la existencia de un método para la estimación del límite de detección para métodos de calibración multivariados es de gran interés y sigue abierta a nuevas propuestas.

---

<sup>77</sup> R. Tauler, A. de Juan; *Multivariate curve resolution homepage*; <http://www.ub.edu/mcr/welcome.html>; (visto en 2010).

<sup>78</sup> M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, A. Herrero, M. S. Sánchez, M. B. Sanz, M. E. Rueda, D. Giménez, M. E. Meléndez; *Capability of detection of an analytical method evaluating false positive and false negative (ISO 11843) with partial least squares*; Chemom. Intell. Lab. Syst. 69 (2003), 21-33.

<sup>79</sup> L. A. Sarabia, M. Cruz Ortiz, M. Julia Arcos, M. Sagrario Sánchez, A. Herrero, S. Sanllorente, *Multivariate detection capability using a neural classifier for nonselective signals*, Chemom. Intell. Lab. Syst. 61 (2002), 89.



## OBJETIVOS

---



*"Lo que me llevará al final serán mis pasos, no el camino"  
Fito y Fitipaldis (Antes de que cuente diez)*



No resulta sencillo escribir unos objetivos generales de esta memoria, dado que en el transcurso de la misma, han ido surgiendo nuevos planteamientos que han modificado su dirección.

Desde un principio la motivación principal del trabajo ha sido poder aprovechar con fines analíticos reactivos generales históricamente desechados por su falta de selectividad. Para ello se pensó utilizar la metodología de análisis cinético, conjuntamente con técnicas quimiométricas como el diseño de experimentos, o la calibración multivariable.

Otras técnicas basadas en sistemas de flujo, como el HPLC, están comúnmente más aceptadas en química analítica, debido a sus límites de detección más bajos, y por el ahorro en el consumo de muestra y/o reactivos. El hecho de que este tipo de técnicas, en general, estén unidas a procedimientos automatizados les confiere una mayor reproducibilidad en los análisis y en consecuencia una mayor precisión. Por lo tanto se pretenderá utilizar sistemas de flujo parcialmente automatizados ya que proporcionan una serie de ventajas que hacen más competitivos este tipo de reactivos. Se comprobará la posibilidad de generar este tipo de reactivos “*in situ*” mediante la mezcla en flujo.

La búsqueda de una mayor competitividad para estos reactivos generales, nos hizo adentrarnos en el estudio de la incertidumbre instrumental. Hasta la fecha los estudios que se tomaban como referencia databan de hace más de 30 años por lo que esta materia necesitaba una revisión. Los nuevos espectrofotómetros constan de diferentes sistemas de posicionamiento de la celda de medida, y han aparecido nuevos tipos de detectores, por lo que se plantean una nueva serie de cuestiones:

- ¿Sigue siendo el posicionamiento de la cubeta la mayor fuente de incertidumbre espectrofotométrica?
- ¿Son los espectrofotómetros actuales menos ruidosos que los anteriores?
- ¿La aplicación de sistemas de flujo minimiza la incertidumbre en la medida espectrofotométrica?
- ¿Tienen los nuevos detectores las mismas fuentes de incertidumbre?
- ¿Es importante la refrigeración de los espectrofotómetros cuando se realizan medidas de absorbancia, y merece la pena pagar más por un espectrofotómetro refrigerado?

-¿Cómo influye en la incertidumbre espectrofotométrica la ausencia de rendija de entrada? ¿Puede compensarse de algún modo?

Finalmente, se revisarán las propuestas realizadas acerca del cálculo o estimación del límite de detección cuando se utilizan métodos de calibración multivariable. La mayor parte de las propuestas utilizan una señal subrogada proveniente de los datos multivariados, de forma que por cada muestra de calibración se obtiene una única señal univariante y por tanto se puede aplicar la metodología clásica de cálculo del límite de detección. Se intentará seguir conceptualmente la metodología clásica pero utilizando exclusivamente los propios datos de la calibración para poder estimar el límite de detección multivariable.