

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIA
POSTGRADO EN QUÍMICA ANALÍTICA
(P.Q.A)**

**TESIS DOCTORAL
ACOPLAMIENTO DE LOS SISTEMAS EN
FLUJO UTILIZANDO LA ESPECTROSCOPIA
DE ABSORCIÓN MOLECULAR (UV-VISIBLE, IR)
COMO FORMA DE DETECCIÓN**

www.bdigital.ula.ve

MSc. Maribel Valero

Tutor. Dr. Máximo Gallignani

Co-Tutora. Dra. Rosario Brunetto

Mérida – Venezuela

Marzo - 2004

Quiero expresar mi agradecimiento

Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de cuarto nivel. Igualmente, quiero agradecer a la Ilustre Universidad de Los Andes (ULA) porque a través de su Postgrado en Química Analítica fue posible realizar mis estudios de doctorado

Al Dr. Máximo A. Gallignani y a la Dra. Rosario Brunetto Tutor y Co-Tutora respectivamente de esta Tesis, quienes tienen un papel muy importante en mi trayectoria académica. Además, sus consejos tanto desde el punto de vista profesional como personal siempre fueron oportunos.

Al Laboratorio de Espectroscopia Molecular y al personal que lo integra. Fueron muchos los años de trabajo productivo en un ambiente de respeto y armonía

A la Dra. Marcela Burguera, Dra. Nereida Carrión y el Dr. Bernardo Fontal quienes formaron parte de la comisión para la evaluación de este trabajo aportando sugerencias para la culminación del mismo. Y finalmente, a todos aquellos que de alguna manera creyeron en mí y me dieron algún incentivo para seguir adelante en esos momentos difíciles.

Maribel

RESUMEN

El material de este trabajo se ha dividido en seis capítulos. En algunos de ellos se hacen revisiones críticas de temas muy particulares y en otros, se hacen desarrollos metodológicos donde se utilizan las diversas ideas del acoplamiento de análisis en flujo con detección por espectroscopia molecular. Específicamente, en el **capítulo 1**, se desarrolla un método para la determinación de piruvatos en cebolla mediante el uso de un sistema automatizado por acoplamiento del análisis en flujo con irradiación de microondas y detección por espectroscopia de absorción molecular en el Uv-V. El piruvato, que se forma a partir de una reacción enzimática que se inicia cuando se produce la destrucción del tejido de la cebolla, es considerado un parámetro de calidad en este tipo de muestras. Los niveles de piruvato son determinados; mediante la reacción de éste con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DAN) en medio ácido y con un calentamiento a baja temperatura, cuyo producto de la reacción presenta un espectro con un máximo en 4,5 nm. Esta nueva propuesta a la determinación de piruvato en cebollas, tiene la enorme ventaja que en una sola introducción de la muestra es posible obtener la corrección simultánea de la señal de fondo generado por el exceso del reactivo derivatizante (2,4-DAN).

A partir del capítulo 2, se toma como sistema modelo el análisis de nitrito. Es bien conocido desde hace muchos años que la determinación de este ión ha sido un tema de gran interés para muchos investigadores, debido a que esta especie es altamente tóxica y los seres vivos se encuentran constantemente expuestos al mismo ⁽³⁾. El **capítulo 2**, corresponde a una revisión bibliográfica exhaustiva sobre las diversas metodologías que existen hoy día para la determinación de nitrito en aguas y otras matrices; utilizando la espectroscopia de absorción molecular en la región del ultravioleta-visible como sistema de detección. Aquí, se exploran los diversos montajes y sistemas de reactivos empleados; así como se contrastan las figuras de méritos obtenidas en las diversas propuestas que han sido utilizadas. Entre las conclusiones obtenidas a partir de esta experiencia llama la atención el aporte de los métodos cinéticos

en cuanto a sensibilidad, límites de detección, sencillez y rapidez en el análisis de nitrito. En este sentido, el **capítulo 3**, contiene una revisión bibliográfica exhaustiva sobre los métodos cinéticos. A partir de esta información, en el **capítulo 4**, se hace una propuesta de un método cinético espectrofotométrico para la determinación de trazas de nitrito, basado en su acción catalítica sobre la oxidación de la tionina por parte del bromato de potasio en medio ácido, en un sistema de flujo. Aquí, se utilizan las ideas propuestas en el primer capítulo en cuanto a la adquisición de espectros en la modalidad continua y en un sistema dual.

En el capítulo 5, se explora la potencialidad que tiene la espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier como forma de detección cuando se generan en línea fases gaseosas. Los diversos trabajos que se encuentran en la literatura especializada sobre este tema, fueron revisados en forma crítica. En general, las configuraciones de los sistemas son muy simples y pueden ser adaptados a cualquier espectrómetro IR-TF.

Finalmente, en el **capítulo 6** se desarrolla un nuevo método alternativo rápido y simple para la determinación de nitrito en un sistema acoplado de análisis en flujo con generación de fase gaseosa y detección por espectrometría infrarroja con transformada de Fourier. El método se basa en la conversión de los iones nitrito en medio ácido a óxido nítrico (NO) mediante el uso de ácido ascórbico como reductor. En este punto es interesante destacar que el NO es una molécula gaseosa activa en el IR, que presenta una banda analítica de interés en 1874 cm^{-1} . El óxido nítrico generado en línea se transporta mediante un gas de arrastre e inerte, a una celda de gases que se encuentra alineada al paso óptico de un FT-IR. La mayor ventaja del método es que involucra la separación del analito de la matriz con lo que se elimina las posibles interferencias espectrales.

CONTENIDO	Página
Introducción general	1
Capítulo 1	11
Determinación espectrofotométrica de piruvato en cebollas en un sistema en flujo, asistido por radiación de microondas.	
Capítulo 2	38
Revisión de los métodos de análisis de nitrito basados en la espectroscopia de absorción molecular en el ultravioleta-visible.	
Capítulo 3	69
Revisión crítica de los métodos cinéticos. Una alternativa atractiva para la determinación espectrofotométrica de nitrito en aguas a niveles de traza y ultratrazo.	
Capítulo 4.	94
Desarrollo de un método cinético espectrofotométrico para la determinación de trazas de nitrito, basado en su acción catalítica sobre la oxidación de la tionina por parte del bromato de potasio, en un sistema de flujo.	
Capítulo 5	116
Generación de fases gaseosas en línea con detección por espectrometría infrarroja de transformada de fourier (IR-TF). Una nueva y poderosa técnica analítica.	
Capítulo 6.	148
Diseño de un método para determinar nitrito basado en el acoplamiento de análisis en flujo con generación de fase gaseosa en línea y detección por espectrometría infrarroja con transformada de fourier.	

1 INTRODUCCIÓN

La espectroscopia de absorción molecular (EAM) en las regiones del ultra violeta-visible (UV-V) e infrarrojo (IR) corresponden a dos técnicas instrumentales con mucha historia dentro de la espectroscopia molecular, que han sido ampliamente utilizadas en los laboratorios de análisis tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo. Sin embargo, el historial de la espectrofotometría de absorción molecular en el UV-V se relaciona fundamentalmente a la cuantificación, mientras que la espectrometría infrarroja se ha asociado durante muchos años principalmente a la identificación y elucidación de estructura.

El intervalo de radiación UV-V está comprendido entre 10 y 780 nm, sin embargo desde el punto de vista experimental la región de longitudes de onda mas utilizadas es de 180 a 780 nm debido a que los componentes atmosférico absorben de manera importante por debajo de esta región. La absorción de radiación UV-V, generalmente resulta de la excitación de los electrones de enlace; como consecuencia, los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlaces de las especies objeto de estudio.

La espectroscopia de absorción molecular se basa en la medida de la transmitancia (T) o absorbancia (A) de disoluciones que se encuentran en cubetas transparentes a la radiación, que tienen un camino óptico (b) bien definido. Esta técnica se utiliza en muestras en estado líquido y gaseoso teniendo esta última aplicaciones muy recientes.

Cuando un haz de radiación de una determinada longitud de onda incide sobre una disolución que contiene una especie absorbente, la cantidad de luz absorbida (ignorando pérdidas por reflexión, etc.) es una función de la concentración de la especie en la trayectoria del haz y del espesor de la misma. Esta relación está bien expresada matemáticamente en la conocida ley combinada de Beer-Lambert:

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon \times b \times C$$

Donde **A** corresponde a la absorbancia, **T** es la transmitancia, **P₀** y **P** representan la potencia de la radiación incidente y transmitida respectivamente, **b** es el paso óptico y ϵ es el coeficiente de extinción molar (si **C** es expresada en mol l⁻¹ y **b** en cm). El parámetro ϵ es característico de la especie absorbente y de la transición electrónica involucrada; depende de la longitud de onda, de la temperatura y del índice de refracción. Una representación gráfica de la absorbancia en función de la longitud de onda es lo que se conoce como espectro de absorción. Este describe el comportamiento de absorción (o del coeficiente de absorción molar) de una especie con la longitud de onda. Los espectros de absorción se caracterizan por presentar pocas bandas, que suelen ser anchas y carentes de estructura fina; lo que le imprime a esta técnica instrumental la característica de ser poco selectiva; por lo tanto las aplicaciones en el análisis cualitativo están en cierta medida limitadas. En contraste, la absorción de radiación por moléculas a longitudes de ondas específicas se usa para el análisis cuantitativo debido a la relación directa entre la absorbancias y la concentración descrita con anterioridad.

Existen tres tipos de transiciones electrónicas y estas incluyen: 1) electrones σ , π y n , 2) electrones d y f y 3) electrones de transferencia de carga ^(1,2). Las especies absorbentes que contienen electrones σ , π y n incluyen iones y moléculas orgánicas, así como algunos aniones inorgánicos. A pesar de que prácticamente todas las moléculas orgánicas son capaces de absorber radiación ultravioleta visible, porque todas contienen electrones de valencia que pueden ser excitados a niveles de energía superiores, no todas presentan una absorción importante en la región espectral experimentalmente accesibles (180-780). La mayoría de las aplicaciones de espectroscopia de absorción en compuestos orgánicos se basan en las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ y $\pi \rightarrow \pi^*$. Ambas transiciones requieren la presencia de grupos funcionales no saturados (cromóforos) que aportan los electrones π . La absorción de los cromóforos

simples en la región del UV accesible ($> 180 \text{ nm}$) resulta de la transición $n \rightarrow \pi^*$ y los coeficientes de extinción molar para estas transiciones son generalmente muy bajos, normalmente se encuentran entre 10 y $100 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. En contraste, las absorciones correspondientes a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ generalmente aparecen en el UV lejano ($< 180 \text{ nm}$), pero los coeficientes de extinción molar normalmente oscilan entre 1000 y $10.000 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ⁽¹⁾. Sin embargo, cuando las moléculas orgánicas presentan en su estructura grupos cromóforos o especies que presenten efectos multicromofórico y/o alto nivel de conjugación, se producen desplazamientos importantes de los máximos de absorción hacia longitudes de ondas largas (efecto batocrómico) con incrementos sustanciales en los coeficientes de extinción molar (efecto hiperocrómico) ⁽³⁾.

Con respecto a los sistemas inorgánicos, la presencia en las moléculas de transiciones de transferencia de carga, que se caracterizan por muy elevados coeficientes de absorción molar abre una interesante perspectiva bajo la óptica de la cuantificación ⁽¹⁾.

La espectroscopia de absorción molecular en el UV-V permite el análisis de ciertas especies cuya absorción es inicialmente muy débil o bien su absorción se encuentra en una parte del espectro en las que coexisten otras absorciones que interfieren. Con este fin, la medida de absorbancia está precedida de una transformación química del analito en un derivado que presenta una absorción fuerte en el UV-V. La reacción involucrada debe ser específica, total, rápida, reproducible y conducir a un derivado estable en solución. En este sentido, los agentes complejantes tienen una amplia aplicación en la determinación de especies inorgánicas. Entre estos reactivos destacan el ion tiocianato para la determinación de hierro, cobalto o molibdeno; el anión del peróxido de hidrógeno para la determinación de titanio, vanadio o cromo y el ión yoduro para la determinación del bismuto paladio o telurio ^(1,2).

Los agentes quelantes orgánicos que forman complejos coloreados estables con cationes, son de mayor importancia debido a que estos complejos

presentan coeficientes de absorción muy altos. Como ejemplos se pueden mencionar la 1,10 -fenantrolina para la determinación de cantidades muy pequeñas de hierro, la dimetilglioxina para determinar el níquel, el dietilditiocarbamato para el cobre y la difenilditiocarbazona para el plomo ^(1,2).

Entre los reactivos que han sido ampliamente utilizados para la determinación de algunos aniones inorgánicos destacan: el molibdato de amonio para determinar fosfato; la cloramina T conjuntamente con piridina y el ácido barbitúrico para la determinación de cianuro, el óxido de mercurio conjuntamente con nitrato de hierro (III) y nitrato de aluminio se utilizan para determinar sulfato y finalmente, la determinación de nitrito se basa en la reacción del ión con una amina aromática primaria en medio ácido para generar una sal de diazonio; seguida por una reacción de acoplamiento con una amina aromática o un fenol. En la mayoría de estas reacciones, se obtiene un producto que presenta una intensa absorción en el visible ⁽⁴⁾.

Otra forma en la que se ha proporcionado selectividad a la espectrofotometría de absorción molecular en el UV-V, es utilizando la técnica como detector en sistemas cromatográficos ^(1,5).

En cuanto a la espectroscopia infrarroja es una herramienta versátil que se aplica a la elucidación de estructuras en una gran variedad de muestras orgánicas, inorgánicas y biológicas. La región del infrarrojo (IR) del espectro abarca la radiación comprendida entre 12.800 y 10 cm^{-1} que corresponde a longitudes de onda de $0,78$ a $1000\text{ }\mu\text{m}$. Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de instrumentación, el espectro infrarrojo se suele dividir en tres regiones: infrarrojo cercano (NIR: $12.800\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), infrarrojo medio (MID: $4000\text{-}100\text{ cm}^{-1}$) y el infrarrojo lejano ($100\text{-}10\text{ cm}^{-1}$); sin embargo las regiones más utilizadas son las del NIR y especialmente la región del MID. Las medidas en el IR pueden ser realizadas en la modalidad de transmisión o reflectancia, siendo la primera la que ha tenido mayor desarrollo y aplicación ^(1,2,6,7)

El espectro IR de moléculas poliatómicas se basa en vibraciones moleculares,

cada una depende de las masas atómicas, de la fuerza de los enlaces y de las interacciones intermoleculares o intramoleculares. Como resultado el espectro IR de un compuesto orgánico proporciona una única característica que permite que sea distinguido de otros compuestos incluyendo isómeros.

La espectroscopia de absorción de radiación infrarroja obedece a una ley similar a la ley de Beer-Lambert, de tal manera que puede ser usada con fines cuantitativos ^(1,2,6,7). La mayor ventaja de la espectroscopia IR sobre otras técnicas espectroscópicas, es que prácticamente todos los compuestos muestran absorción (o emisión), por tanto pueden ser analizadas cualitativamente y/o cuantitativamente. Además es una técnica no destructiva y permite medidas "in situ" (en el lugar) y a distancia de casi cualquier muestra independientemente del estado físico de ésta y muchas veces sin tratamiento previo.

Desde el punto de vista histórico la espectroscopia de absorción infrarroja en la modalidad de transmisión, tuvo su gran auge y desarrollo en el ámbito del análisis químico cualitativo y particularmente bajo la óptica de los químicos orgánicos. Es una técnica instrumental que se ha caracterizado, y se caracteriza, por ser una poderosa herramienta para la identificación de grupos funcionales, y en general, para la elucidación de estructuras moleculares ⁽¹⁾. Sin embargo, existen al menos 4 factores que han abierto las puertas de la espectrometría infrarroja al campo del análisis químico cuantitativo: i) la aparición en el mercado de los espectrómetros infrarrojos de transformada de Fourier (IR-TF), que incorporan las conocidas ventajas de Connes, Fellgett y Jacquinot (1,2,6,7), ii) la aparición en el mercado de nuevos materiales transparentes a la radiación infrarroja totalmente inertes al agua, iii) la comercialización de nuevas celdas, incluyendo celdas para ser utilizadas en sistemas de flujo, así como celdas de múltiples reflexiones que permiten aumentar el paso óptico en fase gaseosa y iv) la incorporación de esta técnica instrumental por parte de los químicos analíticos. Como consecuencia de esto, a partir de los años 90, se ha visto un crecimiento importante en el número de trabajos publicados en las revistas más relevantes de la química analítica, en

los que está involucrada la instrumentación IR-TF.

La espectrometría IR-TF es una técnica analítica simple y rápida, la cual proporciona valiosa información cuantitativa acerca de la composición de las muestras y de los efluentes cromatográficos ⁽⁸⁾. En general la espectrometría infrarroja se puede utilizar en muestras líquidas, sólidas y gaseosas. Sin embargo, el uso del IR-TF dentro del análisis cuantitativo presenta diversos inconvenientes. El análisis de líquidos o de muestras disueltas requiere la utilización de celdas con un paso óptico conocido, generalmente muy pequeño, y la selección previa de un solvente adecuado. Por lo general las limitaciones que imponen los solventes, los pasos ópticos utilizados, así como la transparencia e inercia química de los materiales de las ventanas de las celdas limita la aplicación de esta técnica dentro del análisis cuantitativo. Esta situación es particularmente crítica cuando se trabaja en sistemas acuosos, en donde las zonas de transparencia óptica son limitadas y los pasos ópticos requeridos inferiores en muchos casos a 0,05 mm ^(9, 10). En fase sólida, el uso y preparación de las pastillas con matoros a calientes es laborioso y consume un tiempo importante. Además, se requiere la incorporación de un estándar interno para lograr que las medidas obtenidas sean independientes del paso óptico. En contraste, la fase gaseosa es muy adecuada para realizar determinaciones por espectrometría infrarroja ⁽⁸⁾ debido a varios factores, entre ellos: i) la transparencia de los gases (los gases monoatómicos, así como los diatómicos homonucleares son inactivos en el IR), ii) la señal de fondo (background) de estos sistemas es muy baja, y iii) las celdas gaseosas de reflexiones múltiples, ofrecen la posibilidad de trabajar con grandes pasos ópticos (varios metros), que proporcionan buenas sensibilidades. Por estas razones, la espectrometría IR ha sido muy utilizada como forma de detección en cromatografía de gases (CG) ^(8, 11, 12) y también para el análisis de muestras pirolizadas ^(8, 13, 14).

Por otra parte, la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA), introducida a mediados de los años 70 por Ruzcika y Hansen en Dinamarca ⁽¹⁵⁾, y por Steward en Estados Unidos ⁽¹⁶⁾, ha sido acoplada a muchas técnicas instrumentales con el fin de automatizar métodos de análisis ya clásicos,

debido a las ventajas que aporta en términos de simplicidad, fácil construcción, bajo consumo de muestras y reactivos, versatilidad, alta frecuencia de análisis, y precisión. La técnica consiste en la inserción, de una cantidad discreta y exacta de la muestra en un flujo portador (mediante una jeringa o válvula de inyección) de manera rápida y reproducible, en la corriente de un flujo portador. La muestra insertada desarrolla un perfil de concentración característico que al pasar por el detector en línea con el flujo genera una señal transitoria de pico característica ^(15, 17) Los primeros acoplamientos de los sistemas FIA se hicieron con detección espectrofotométrica, mientras que el IR ha sido una de las últimas técnicas espectroscópicas en ser hibridadas.

Los acoplamientos FIA-EAM-UV-V que han sido desarrollados y descritos en la literatura se restringen al seguimiento de la medida de absorbancia a una longitud de onda fija en función del tiempo, lo cual restringe enormemente la información que puede proporcionar el espectro de absorción en cuanto a:

- 1) Pureza del sistema,
- 2) Presencia de impurezas,
- 3) Selección del criterio de medida,
- 4) Corrección de la absorbancia mediante la selección de una línea de base adecuada.
- 5) Corrección por el efecto Schildenler (Efecto de índice de refracción).
- 6) El uso de la espectroscopia derivativa

Es de esperarse que en los próximos tiempos, la introducción de los equipos con arreglo de diodos -que se están popularizando a una velocidad interesante dentro de los sistemas cromatográficos- que permiten la adquisición de los espectros de absorción como función del tiempo en sistemas continuos (como la cromatografía), establezcan una revolución real de esta técnica instrumental; posiblemente en la misma magnitud que la introducción de equipos infrarrojos con transformada de Fourier en la espectrometría infrarroja, obligando con ello a una revisión seria de muchos de los métodos de análisis que se utilizan en la actualidad.

Sin embargo, con el uso de equipos dispersivos es posible la adquisición del espectro de absorción a partir de diseños de sistemas en los que se utilice el análisis en flujo. En estos diseños la muestra y los reactivos son transportados separadamente, impulsados por una bomba peristáltica y a un flujo constante hasta un punto donde convergen y se produce la reacción. El espectro de absorción se obtiene cuando el producto generado pasa en forma continua por la celda de flujo colocada a la entrada del detector, permitiendo de esta manera aprovechar la información que proporciona el espectro

Por otra parte, a pesar que la técnica FIA ha sido ampliamente utilizada con vanos detectores, el acoplamiento FIA-IR no es muy frecuente. Mientras la detección espectroscópica FT-IR es usada como técnica de rutina en cromatografía de gases, su uso en cromatografía líquida, en análisis por inyección en flujo (FIA) o análisis por inyección secuencial es poco frecuente. Entre las razones mas importantes destacan: i) la baja transparencia de muchos de los disolventes que se utilizan, especialmente la fuerte absorción de agua ii) la baja sensibilidad comparada con otras técnicas como UV/VIS o fluorescencia, iii) la espectrometría FT-IR no es considerada una técnica de detección valiosa, iv) los problemas que surgen de obtener información adecuada a partir de señales transitorias de muestras inyectadas y finalmente v) son muy pocos los químicos analíticos y por ende los laboratorios de química analítica que emplean la instrumentación FT-IR.

Los desarrollos metodológicos que se han propuesto en los últimos 15 años, donde involucran acoplamiento FIA-FT-IR proporcionan: i) una forma simple, segura y reproducible para llenar y limpiar la celda de flujo, ii) repetitividad y exactitud, iii) un ahorro importante en términos de reactivos y tiempo de análisis, iv) una vigilancia continua de la línea base y la determinación exacta del máximo de absorción y v) determinación simultánea de una serie de compuestos en la misma muestra ⁽¹¹⁾.

En los últimos 8 años el grupo de Miguel de la Guardia ^(8, 18-27) ha hecho desarrollos metodológicos muy interesantes con generación de fases gaseosas

y espectrometría FT-IR. Estos se basan en la generación en línea de una fase de vapor a partir de muestras líquidas o sólidas mediante una simple volatilización de la muestra o una reacción química. Estos desarrollos han sido utilizados para determinar alcoholes en muestras de solventes orgánicos como cloroformo, estabilizados con alcohol ⁽⁸⁾, en sangre ⁽¹⁸⁾, productos cosméticos y bebidas alcohólicas ⁽²¹⁾. Otros han permitido el análisis de solventes de pinturas y gasolinas ^(22, 23) así como el análisis de solventes de pinturas y gasolinas ^(22, 23) así como el análisis de carbonatos en aguas sedimentos y apatitas carbonatadas ⁽²⁴⁻²⁷⁾. Los trabajos mas recientes en cuanto a generación de fases gaseosas son los reportados por Galignani y colaboradores ⁽²⁸⁻²⁹⁾ quienes desarrollaron el acoplamiento del análisis en flujo con generación de hidruros, utilizando la espectrometría IR-TF como forma de detección para la determinación de algunos elementos formadores de hidruros.

El principal objetivo de este trabajo es desarrollar diversos métodos de análisis fundamentados en el acoplamiento del Análisis en Flujo (AF) utilizando la espectroscopia de absorción no dispersiva (EAM) en el ultravioleta - visible y la espectrometría IR-TF como forma de detección para la determinación de piruvato y nitrito en muestras reales.

2 BIBLIOGRAFÍA

- 1 Show D. A., Leary J.L., Análisis Instrumental, Mc Graw Hill-Interamericana de España 4^{ta} Edición, Madrid (1994).
- 2 Willard H. H., Lynne L.M., Dean J. A., Settle F. A. Métodos instrumentals de análisis. Grupo Editorial Iberoamericana. México. 1991.
- 3 Silverstein R. M., Bassler G. C., Morrill T. C. Identificación espectrometría de compuestos orgánicos. Editorial DIANA, 1^{era} Edición, México 1980.
- 4 Bettina Schweizer, Shihua Fan, Dr. Hanswilly Muller. Techniques for flow Injection analysis in UV/Vis spectroscopy. Perkin Elmer Corporation. Vol II 152-156, 1993.
- 5 Valcárcel M. C., Gómez A. H. Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverté Barcelona.
- 6 Coonley R.T., Espectroscopia Infrarroja, Editorial Alambra, 1^{era} edición española, Madrid, España, (1979).
- 7 Ferraro J.R., Basile L.J., (Eds), Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Application to Chemical Systems. Academic Press, New York, (1978).
- 8 Lopez-Anreus E., Garrigues S., de la Guardia M., Vapor generation Fourier transform infrared spectrometry: a new analytical technique. Analytica Chimica Acta. 308 (1995) 25-35.
- 9 Gallignani M, Garrigues S, de la Guardia M. Derivative Fourier Transform spectrometric determination of ethanol in alcoholic beverages. Analytica Chimica Acta, (1994)275-283.
- 10 Gallignani M, Garrigues S, de la Guardia M. Derivative Fourier Transform Infrared Spectrometric determination of ethanol in beers. Analyst, 119(1994) 1773-1778.
- 11 Putzig C.I., Leugers M. A., McKelvy M.I., Mitchell G.E., Nyquist R.A., Papenfuss R. R., YurgaL, Infrared Spectrometry. Review. Analytical Chemistry, 64 (1992) 270R-R302.
- 12 White R.L., Gas Chromatography-Fourier Transform Infrared Spectrometry. Review. Appl.Spectrosc". Review, 23(3-4) (1987) 165-245.
- 13 Bacanu M., Dumitrescu P., Simu C., Analysis of Gases (Molecular Hydrogen. Oxygen and Nitrogen) in Titanium Hvdrides. Review. Chim. (Bucarest) 40 (1989) 804-807.
- 14 Price D., Horrocks A.R., Akalin M., Use of evolved gas analysis to investigate the gaseous pirólisis products from flame retarded cotton and polyester-

cotton fabrics. Anal. Proc., (6) (1990) 148-150.

- 15 Ruzicka, J. A., y Hansen E. H., Flow Injection Analysis. Analytica Chimica Acta. 1975, 78,145-157.
- 16 Stewart, K.K., Beecher and Hare P. EA, Anal. Biochem, 1976, 70, 167.
- 17 Ruzicka, J. A., y Hansen E. H., Flow injection analysis. 2nd ed. Wiley, New York, 1988, p 380.
- 18 Perez-Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Direct vapor generation Fourier transform infrared spectrometric determination of ethanol in blood, Analytica Chimica Acta 121 (1996) 123-129.
- 19 Perez-Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Vapour generation-Fourier transform infrared direct determination of ethanol in alcoholic beverages, Analyst, 121 (1996) 928.928.
- 20 Garrigues J.M., Perez-Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Direct determination ethanol and methanol in liquid samples by means of vapor phase-Fourier transform spectrometry. Vibrational Spectroscopy, 5 (1997) 219-228.
- 21 Perez Ponce A., Rambla F.J., Garrigues J.M., Garrigues S. , de la Guardia M., Partial least squares-Fourier transform infrared spectrometric determination of methanol and et Vapour-phase generation. Analyst, 123 (1998) 1253-1258.
- 22 Lopez-Anreus E., Garrigues S., de la Guardia M., Vapour generation-Fourier transform infrared spectrometric determination of benzene. toluene and methyl tert-butyl gasolines, Analytica Chimica Acta, 333 (1996) 157-165.
- 23 Lopez-Anreus E, Garrigues S., de la Guardia M., Simultaneous Vapour phase Fourier transform infrared spectrometric determination of butyl acetate, toluene and me ketone in paint solvents. Analyst, 123 (1998) 1247-1252.
- 24 Perez Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Determination of carbonates in waters by on-line vapor generation FTIR, Vibrational Spectroscopy, 16 (1998) 61-67.
- 25 Perez Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Microwave-assisted Vapour generation Fourier transform infrared spectrometric determination of carbonates in waters, Chimica. Acta, 358 (1998)235-243.

- 26** Perez Ponce A., Garrigues J.M., Garrigues S., de la Guardia M., Vapour phase Fourier transform infrared spectrometric determination of carbonate in sediments. Analyst, (1998) 1817-1821.
- 27** Casella A.R., de Campos R.C., Garrigues S., de la Guardia M., Rossi A., Fourier transform infrared determination of CO₂; evolved from carbonate in carbonated apatites, Frezen Analytical Chemistry., 367 (2000) 556-561.
- 28** Galignani M*, Ayala C., Brunetto M.R, Burguera J.L, Burguera M., Flow analysis-Hydride generation-Fourier transform Infrared Spectrometry-Analysis Hydride generation Fourier transform Infrared Spectrometry-A new analytical technique for the individual and simultaneous determination of antimony, arsenic and tin, Analyst, 127(12) (2002)1705-1712.
- 29** Galignani M.*, Ayala C., Brunetto M.R, Burguera M., Burguera J.L., Flow analysis-Hidride-generation-Fourier transform Infrared Spectrometric determination of antimony pharmaceuticals. Talanta, 59 (2002) 923-934.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO 1
DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMETRICA DE PIRUVATO EN
CEBOLLA EN UN SISTEMA EN FLUJO, ASISTIDO POR RADIACIÓN DE
MICROONDAS

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolla un sistema acoplado de análisis en flujo, con irradiación de microondas y detección espectrofotométrica para la determinación de piruvato en cebollas. La determinación de piruvato se fundamenta en la reacción de derivatización de la 2,4-dinitrofenilhidracina propuesta por Schwimmer y Weston ⁽⁶⁾. La reacción es catalizada térmicamente en línea mediante el uso de radiación de microondas. El criterio de medida utilizado fue la absorbancia a 445 nm corregida (mediante la línea de base establecida entre 300 y 700 nm) del espectro obtenido en un sistema continuo utilizando el blanco de la muestra como referencia. El intervalo dinámico (5 - 35 mg piruvato l⁻¹), el límite de detección (3 σ , 0,16 mg l⁻¹) la reproducibilidad (< 2 %, DSR), los porcentajes de recuperación cuantitativos obtenidos a partir de licuados de cebollas fortalecidos con una solución de piruvato (96 - 102 %), así como la frecuencia de análisis, son realmente adecuados para la determinación rutinaria de piruvato en muestras de cebollas.

www.bdigital.ula.ve

1 INTRODUCCIÓN

El sabor picante de la cebolla es la principal característica que explica su gran popularidad. La cebolla (*Allium cepa*) es un importante vegetal del género *Allium* y tiene una amplia aplicación en todo el mundo como condimento en la preparación de alimentos. Una fracción importante de toda la cebolla que se produce a nivel mundial, se utiliza industrialmente para la producción de productos alimenticios, así como ingredientes culinarios. Sin embargo durante su producción comercial, se generan cantidades significativas de desechos; los cuales consisten en el tope, la base, la capa más externa (concha) y la capa exterior más fresca. Con vistas a aprovechar este material, algunas empresas se han dedicado a la explotación de estos desechos como fuente de ingredientes alimenticios, entre los cuales destaca la obtención de aceites y esencias que se utilizan como aditivos del sabor ⁽¹⁾.

Tanto el olor como el sabor que las caracterizan, se produce solo después de la destrucción de su tejido, debido al rápido catabolismo que produce la acción de la enzima allinasa sobre un grupo de compuestos endógenos (sulfóxido de alquénil cisteína) que son los responsables del olor y sabor característicos de éstas ⁽¹⁻⁴⁾. En esta reacción, se producen: amoníaco, piruvato y una variedad de compuestos volátiles y no volátiles de azufre. La Figura 1 ilustra la reacción particular para el compuesto sulfóxido de trans-(+)-S-(1-propenil)-1-cisteína que es el componente mayoritario en la cebolla y el precursor del factor lacrimógeno (ácido 1-propenilsulfénico o S-óxido tiopropanal) característico ⁽⁵⁾.

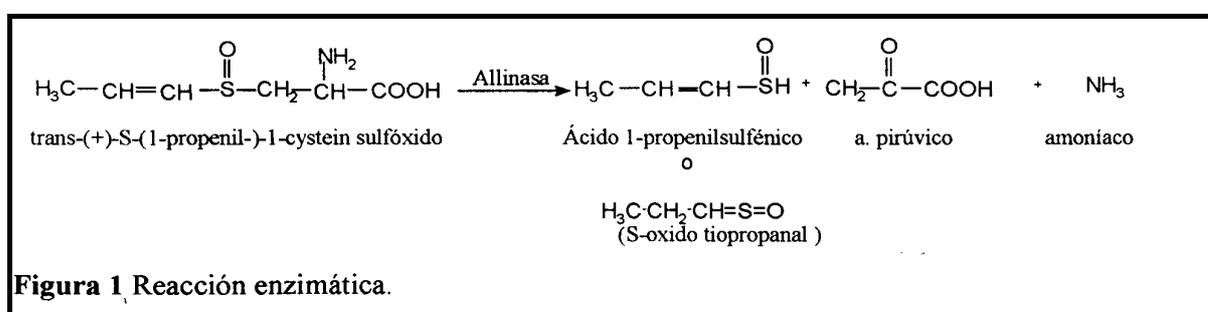


Figura 1. Reacción enzimática.

El picante de la cebolla puede ser determinado midiendo alguno de los productos de la reacción por cromatografía de gases (CG), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o por métodos espectrofotométricos ⁽⁷⁾. Mientras que el sabor puede ser determinado midiendo los precursores del sabor utilizando HPLC o CG ⁽¹⁾ o midiendo la actividad enzimática de la allinasa ⁽⁴⁾.

El análisis de piruvato, como una forma de evaluación de algunas características de sabor y picor, resulta realmente competitivo frente al análisis directo de los precursores del sabor o de algunos de los componentes volátiles ⁽¹⁾. La determinación espectrofotométrica de los piruvato presentes en la cebolla, se basa esencialmente en tres métodos ⁽⁶⁾:

Un primer método (A), se basa en la oxidación del nucleótido de la difosfopiridina reducido (DNPH) por acción del piruvato proveniente de la cebolla, en presencia de un exceso de deshidrogenasa láctica cristalina. Se mide la disminución de absorbancia a 340 nm debida a la oxidación de DNPH ⁽⁴⁾. Este método ha sido automatizado en un sistema de análisis por inyección en flujo con detección espectrofotométrica ⁽⁸⁾.

Un segundo método (B) se fundamenta, en la reacción de derivatización del piruvato con la 2,4, dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) descrita en 1961 por Schwimmer y Weston ⁽⁶⁾ (ver Figura 2). El producto de reacción (la 2,4-dinitrofenil hidrazona del ácido pirúvico) presenta un máximo de absorción cercano a los 420 nm. Con este método se determina la cantidad total de 2,4-DNPH que reacciona con los carbonilos. El procedimiento consiste en adicionar a 1ml del filtrado de la muestra de cebolla (que contiene al piruvato), 1 ml de 2,4-DNPH 0.0125 % (p/v) en 2 N HCl y 1 ml de agua. Luego de 10 minutos a 37°C, se adicionan 4 ml de NaOH 0.6 N y se mide la absorbancia a 420 nm. Este método requiere una etapa adicional, que consiste en hacer correcciones de la señal de background que se genera por la presencia de carbonilos no pirúvico, presentes en la cebolla ⁽²⁾.

Un tercer método (C) evalúa la concentración de la 2,4 dinitrofenilhidrazona del

ácido pirúvico, después de una etapa de extracción en la cual se elimina el exceso de 2,4-DNPH y la 2,4-dinitrofenilhidrazona proveniente de carbonilo no pirúvico. Para esto, el jugo de la cebolla diluido en 50 ml de agua, se trata con un exceso de 2,4-dinitrofenilhidracina 0.2 % (p/v) en HCl 2 N. Luego de 1 hora, a la solución se le hacen tres extracciones sucesivas con 25 ml de acetato de etilo. La capa acuosa se desecha y extracto de orgánico, se trata con 3 porciones de 10 ml de NH₄OH 2 N. A continuación se desecha la capa de acetato de etilo y la porción amoniacal, se trata con 10 ml de acetato de etilo. Posteriormente el extracto amoniacal se usa para la determinación, diluyéndolo hasta 50 ml. Se toma 1 ml de esta solución y se lleva a 10 ml con amonio 2N. Finalmente, se mide en forma selectiva la absorbancia de la 2,4-dinitrofenilhidrazona del ácido pirúvico a 370 nm. Para la calibración, se utiliza un estándar de 2,4-dinitrofenilhidrazona del ácido pirúvico recristalizado (212°C) y disuelto en amonio 2 N.

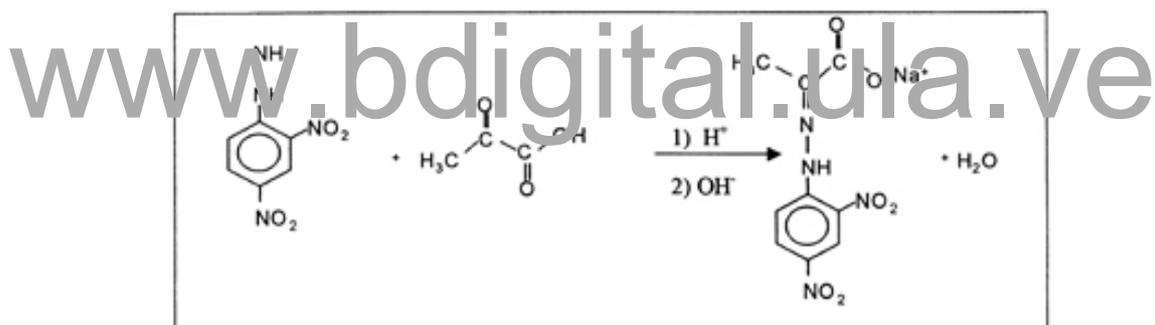


Figura 2 Reacción de derivatización, entre el ácido pirúvico y la 2,4 dinitrofenilhidracina.

El mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la reacción (Ver Figura 2), consiste en una adición nucleofílica del compuesto nitrogenado básico al carbono carbonílico, seguida por una reacción de eliminación con salida de una molécula de agua. El pH juega un papel muy importante en esta reacción, ya que la protonación del oxígeno carbonílico hace al carbono correspondiente más susceptible al ataque por el nucleófilo. Por tanto, en lo que respecta al compuesto carbonilo, la adición se favorece a una acidez elevada. Sin embargo, la 2,4-DNPH también puede protonarse para formar el ion H₃-N⁺-G (G: es el resto de la molécula), que carece de electrones no compartidos, de

modo que pierde su carácter nucleofílico. En consecuencia, las condiciones óptimas de reacción, resultan de una situación de compromiso ⁽⁹⁾.

En nuestro conocimiento, no existe ningún precedente bibliográfico sobre la determinación de piruvato en un sistema automatizado de Inyección en Flujo con detección espectrofotométrica y menos aún con corrección simultánea del blanco químico y de la muestra.

El presente trabajo tiene por objeto desarrollar un procedimiento automatizado y simple, basado en la reacción de derivatización propuesta por Schwimmer y Weston, con prestaciones analíticas adecuadas para el análisis rutinario de piruvato en muestras de cebolla. El método se fundamenta en el acoplamiento de un sistema de flujo, asistido por radiación de microondas, con detección espectrofotométrica.

La mayor ventaja del método propuesto, consiste en que con una sola introducción de la muestra se logra la corrección simultánea del background que error/ene del exceso estequiométrico de la 2,4-DNP-H utilizado así como de la 2,4-dinitrofenilhidrazona proveniente del carbonilo no pirúvico de la muestra.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentación

La Figura 3 presenta el diagrama esquemático del montaje de Análisis en Flujo (FA) asistido por radiación de microondas (HM) y con detección espectrofotométrica utilizado en el presente trabajo. Consiste básicamente en una serie de canales (C₁-C₃, C'₁-C'₃) propulsados por dos bombas peristáltica programables (P₁ y P₂) de cuatro canales Ismatec IPC, cuatro serpentines de mezcla (R₁,R'₁,R₄,R'₄), un horno de microondas (HM), dos serpentines de reacción (R₂ y R'₂), dos serpentines de enfriamiento (R₃ y R'₃), un baño de agua/hielo y un detector Uv-Visible.

Las medidas de absorbancia se obtuvieron con un espectrofotómetro de absorción molecular Ultravioleta-Visible de doble haz Perkin Elmer, modelo Lambda 20, equipado con dos celdas de flujo con un paso óptico de 1 cm y 160 μ l de volumen interno en los compartimentos de trabajo y referencia. El equipo se controla a través de un computador personal mediante el software UV WinLamp para lambda 2-40.

Como fuente la radiación de microondas, se utilizó un horno de microondas focalizado Prolabo (HM), modelo 301, con un intervalo de potencia comprendido entre 10 y 200 W (frecuencia máxima de 2450 MHz) cuyo ciclo de calentamiento se controla a través de un programador marca Prolabo modelo Maxidigest TX-32, el cual permite acelerar la reacción de adición. El baño de agua/hielo se colocó a la salida del HM, con el objeto de enfriar la efluentes calientes del mismo y de esa forma evitar la formación de burbujas en solución y fluctuaciones o turbulencias en el flujo. En la Tabla 1 se resumen las condiciones espectroscópicas y del sistema de análisis en flujo utilizadas en el presente trabajo.

En los estudios preliminares se utilizaron celdas estándar de cuarzo de 1 cm de paso óptico, así como un baño termostatzado GCA/Precision Scientific, Modelo 253.

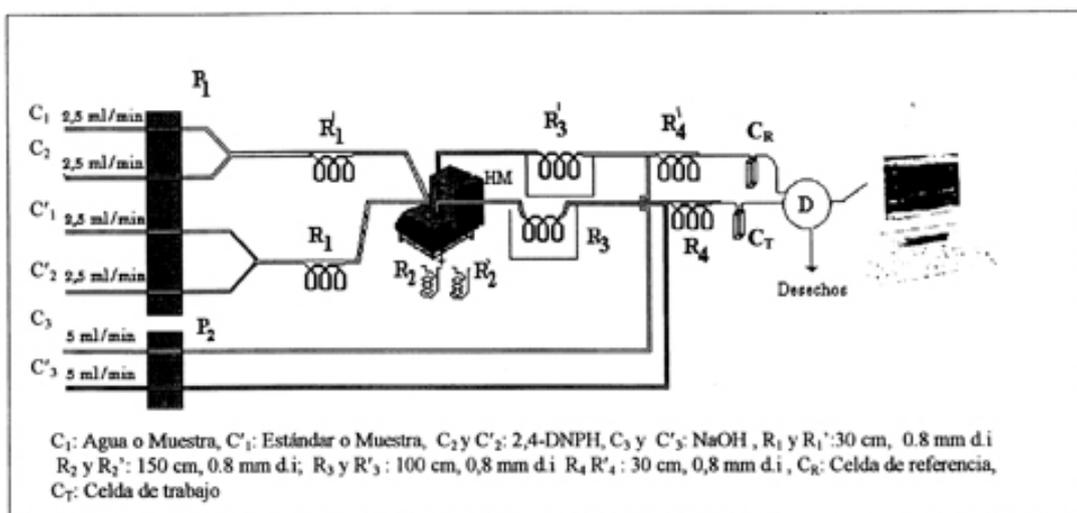


Figura 3 Diagrama esquemático del sistema de Análisis en Flujo, asistido por radiación de microondas y detección espectrofotométrica utilizado en el presente trabajo.

2.2 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el agua utilizada fue purificada en un sistema Milli-Q TOC (Millipore). En el resto del trabajo se designará como agua DI.

Se preparó una solución patrón de 500 mg piruvato l⁻¹, a partir de piruvato de sodio (C₃H₃O₃Na) de 99 % de pureza (SIGMA) pesando exactamente y disolviendo en agua 0,1596 g de la sal y llevando hasta aforo a 250 ml con agua DI.

La solución de 2,4-dinitrofenilhidracina (C₆H₆N₄O₄) (Riedel-de Haën) de 1000 mg l⁻¹ se preparó diariamente pesando exactamente 0,2500 g del reactivo. Este se disuelve y se lleva a aforo a 250 ml con HCl 1M.

La solución de NaOH 1M se preparó pesando exactamente 10,110 g del reactivo (98.9% de pureza) (ANALAR) y llevando a un volumen de 250 ml con agua DI previamente descarbónica.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 1 Condiciones óptimas de operación del sistema propuesto

Parámetros Espectroscópicos	
Velocidad de barrido	480 nm min ⁻¹
Resolución	1 nm
Intervalo espectral	700 – 300 nm
Fuente de radiación	Filamento de Tungsteno- H ₂
Detector	Fotomultiplicador WRs30
Celdas de trabajo	Celda de flujo de 1 cm de paso óptico y 160 µl de volumen interno
Celda de referencia	Celda de flujo de 1 cm de paso óptico y 160 µl de volumen interno
Parámetros asociados al sistema de Análisis en Flujo (AF) y al horno de microondas (HM)	
Flujo de la muestra (Canal C ₁)	2,5 ml min ⁻¹
Flujo del blanco de la muestra (Canal C ₃)	2,5 ml min ⁻¹
Composición de la muestra y el blanco	Ver Sección 2.3
Flujo de la 2,4-DNPH (Canales C ₂ y C ₄)	2,5 ml min ⁻¹
Concentración de la 2,4-DNPH	1000 mg l ⁻¹ en HCl 1M
Flujo del NaOH (Canales C ₅ y C ₆)	5 ml min ⁻¹
Concentración de NaOH	1M
Serpentines de Mezcla (R ₁ y R' ₁)	Teflón, 30 cm (0,8 mm d.i)
Serpentines de Mezcla (R ₄ y R' ₄)	Teflón, 30 cm (0,8 mm d.i)
Potencia del Horno de Microondas	40% de su capacidad total
Serpentines de radiación (R ₂ y R' ₂)	Teflón, 150 cm (0,8 mm d.i)
Serpentines de enfriamiento (R ₃ y R' ₃)	Teflón, 100 cm (0,8 mm d.i)

2.3 Preparación de las muestras y blancos

En la realización del presente trabajo, se analizaron cebollas que se comercializan en diversas regiones del país.

Para la preparación de las muestras, inicialmente se eliminan previamente las hojas externas. A continuación el bulbo se corta en dos mitades ecuatorialmente, y estos a su vez se cortan nuevamente en dos mitades, a fin de obtener 4 cuartos.

2.3.1 Muestras

Un cuarto de la cebolla previamente pesado (aproximadamente 20 gramos) se licúa con 50 ml de agua DI hasta obtener una mezcla de fina pulpa y jugo de cebolla, que se deja en reposo a 25°C por 15 minutos con el fin de obtener la

máxima producción de piruvato ^(1,4). A continuación, la mezcla de pulpa y jugo se filtra con papel Watman N° 50, se toman 5 ml del filtrado y se diluyen a un volumen final de 50 ml con agua DI. De esta forma la solución resultante está lista para el análisis. El procedimiento se realiza en forma análoga en otros dos cuartos para de esa forma realizar el análisis por triplicado.

2.3.2 Blanco de las muestras

La preparación del blanco de la muestra se fundamenta en la desactivación de la enzima allinasa. En la literatura existen dos procedimientos descritos para cumplir con ese objetivo: (A) Tratamiento de la muestra con ácido tricloroacético y (B) Tratamiento de la muestra con radiación de microondas.

Procedimiento A: Un cuarto de la cebolla, previamente pesada, se licúa con 50 ml de ácido tricloroacético 5 % (p/v). Posteriormente se sigue el mismo procedimiento descrito para la muestra.

Procedimiento B: En un vaso precipitado, se coloca un cuarto de la cebolla previamente pesada y envuelta en papel para film. A continuación se introduce en un horno de microondas convencional a una potencia de 70 Watios durante tres minutos. A continuación se licúa con 50 ml de agua DI, y se sigue el procedimiento descrito para la muestra.

Las diluciones finales 1:10 de los licuados de muestras y blancos de las mismas se guardan bajo refrigeración hasta el momento del análisis, y son estables por un período de 1 semana.

2.4 Procedimiento

Inicialmente se calibra el cero instrumental haciendo un barrido de agua vs agua. A continuación las muestras y los reactivos se colocan en sus respectivos canales a temperatura ambiente como se indica en la Figura 3, bajo las condiciones de operación indicadas en la Tabla 1. En esta etapa inicial en el canal de la muestra (C_1) y del blanco de la muestra (C'_1), se coloca agua, y de esta forma se verifica el cero instrumental bajo las condiciones de trabajo.

La muestra (estándares) y la solución ácida de 2,4-DNPH propulsados a través de los canales C_1 y C_2 por la bomba peristáltica P_1 a una velocidad de flujo de $2,5 \text{ ml min}^{-1}$ se mezclan por el serpentín de reacción R_1 . A continuación, la solución resultante fluye en forma continua a través del serpentín de reacción (R_2) insertado dentro de la cavidad activa del horno de microondas focalizado, en donde se acelera el proceso de incubación de la reacción. El afluyente caliente continua su trayectoria pasando por el serpentín R_3 colocado en un baño de agua/hielo con el objeto de enfriar a la solución. Por último, la solución resultante se mezcla en R_4 con la solución 1M de NaOH, propulsada por la bomba peristáltica P_2 a través del canal C_3 a una velocidad de flujo de 5 ml min^{-1} . La solución continúa su trayectoria hacia la celda de flujo colocada a la entrada del detector.

En forma paralela y simultánea, el blanco de la muestra sigue exactamente los mismos pasos en el montaje a través del circuito formado por C'_1 , C'_2 , C'_3 , R'_1 , R'_2 , R'_3 y R'_4 para pasar en forma continua por la celda de flujo de referencia.

En el procedimiento propuesto, el espectro de absorción se realiza haciendo pasar en forma continua y simultánea a la muestra y al blanco de la muestra por las celdas de flujo de trabajo y de referencia respectivamente. Esto permite realizar en forma directa y simultánea la corrección del blanco "químico" (exceso de 2,4-DNPH) y del carbonilo no pirúvico de la muestra.

Al momento de introducir la muestra, se activa el horno de microondas, y al cabo de 25 segundos se da la orden instrumental para la adquisición del espectro de absorción. Se toman tres espectros en forma consecutiva, de forma de analizar por triplicado cada muestra (cada cuarto de la cebolla). El tiempo que se requiere para realizar el análisis por triplicado es aproximadamente de 2,5 minutos.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estudios preliminares

El procedimiento sugerido por Schwimmer y Weston ⁽⁶⁾ para la determinación espectrofotométrica de piruvatos es engorroso, involucrando diversas etapas como se indica a continuación:

- 1) El pre tratamiento de la muestra.
- 2) La reacción inicial entre los piruvatos y la 2,4-DNPH en medio de HCl.
- 3) Incubación de la solución resultante por 10 minutos a 37°C.
- 4) Alcalinización de esta solución con NaOH.
- 5) Medida espectrofotométrica de la solución a 445 nm.
- 6) Se sigue el mismo procedimiento desde el paso 2 para las muestras desactivadas, y el valor de absorbancia asociado, se le resta al valor obtenido de la muestra.

Con el objetivo de automatizar este procedimiento mediante un montaje simple de análisis en flujo con detección espectrofotométrica, se realizaron estudios preliminares relativos al comportamiento de absorción de los reactivos y productos de reacción bajo estudio. Estas experiencias se llevaron a cabo en "batch", utilizando celdas estándar de cuarzo de 1 cm de paso óptico y con una velocidad de barrido de 480 nm min⁻¹.

3.2 Estudio del comportamiento de absorción de los reactivos y productos de reacción

En la Figura 4 se presentan los espectros de absorción de los diversos reactivos involucrados en la reacción en el intervalo comprendido entre 300 y 700 nm, utilizando agua como referencia. Las Figura 4a y 4b muestran el comportamiento de absorción de soluciones de 125 mg 2,4-DNPH l⁻¹, preparadas en medio ácido (HCl 1M) y alcalinizada con NaOH 1M respectivamente. La solución ácida (4a) presenta una absorción continua por debajo de los 500 nm, con un máximo definido en 340 nm, mientras la solución alcalina (4b) muestra un máximo de menor intensidad en 370 nm, y una segunda absorción intensa centrada por debajo de los 300 nm. Por su parte, las soluciones de NaOH, HCl, y de 20 mg piruvato l⁻¹ (en medio ácido y alcalino) son totalmente transparentes en esa región espectral estudiada.

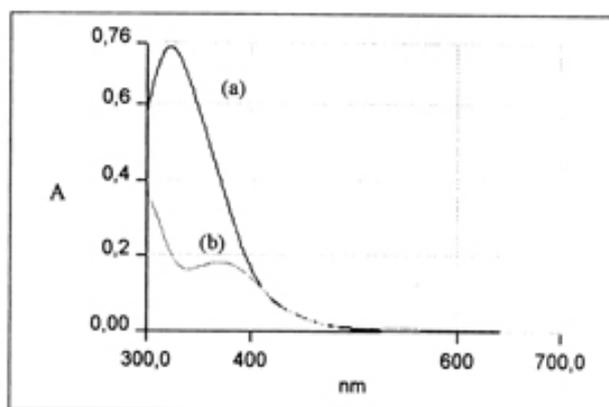


Figura 4 Espectro de absorción de los reactivos involucrados en la reacción de derivatización de la 2,4-DNPH. (a) Solución de 125 mg 2,4-DNPH l⁻¹ en HCl 1 M, (b) Solución de 125 mg 2,4-DNPH l⁻¹ alcalinizada con NaOH 1 M.

En la Figura 5-1 a 5-IV se muestran en forma comparativa los espectros de absorción de: (a) el producto de reacción, (b) la 2,4-DNPH alcalinizada y (c) la sustracción de ambos. En esta experiencia se mantuvo constante la concentración de piruvato en (20) mg l⁻¹, mientras que la concentración de 2,4-DNPH, se varió entre 0 y 2000 mg l⁻¹. De esta Figura se desprenden las siguientes conclusiones:

1. En todos los casos estudiados, la 2,4-DNPH absorbe a la longitud de onda de máxima absorción del producto de reacción.
2. El máximo de absorción del producto de reacción se desplaza a menores longitudes de onda, al aumentar la concentración de 2,4 DNPH.
3. La sustracción de ambos espectros corresponde al espectro de absorción real del producto de reacción (sin contribución del 2,4-DNPH), con un máximo de absorción definido en 445 nm.

Para corroborar la última aseveración, se compararon los espectros logrados mediante esta opción del software del equipo (sustracción de espectros) con aquellos obtenidos utilizando la 2,4-DNPH alcalinizada como referencia. En ningún caso se observó una diferencia significativa.

3.3 Criterio de la medida instrumental

El criterio de medida seleccionado fue la absorbancia a 445 nm, corregida por la línea de base establecida entre 300 y 700 nm del espectro de absorción obtenido en el doble sistema de flujo descrito en la sección anterior (Ver Figura 5IV). En la sección 3.4.3.1, se discute la selección de la línea de base.

3.4 Espectros de absorción obtenidos en un sistema de flujo continuo

En esta sección se contrastaron los espectros de absorción obtenidos mediante un sistema de flujo para una solución de 20 mg piruvatos l⁻¹ y de 1000 mg 2,4-DNPH l⁻¹ con el correspondiente obtenido en un procedimiento clásico en "batch". La velocidad de barrido se varió entre 60 y 1920 nm min⁻¹ y el flujo de la solución entre 4 y 12 ml min⁻¹. En esta experiencia, se utilizó como referencia la solución alcalinizada de 2,4-DNPH en las mismas condiciones, colocada en una celda estándar de cuarzo de 1 cm de paso óptico. En ningún caso se observó una diferencia significativa entre los espectros.

www.bdigital.ula.ve

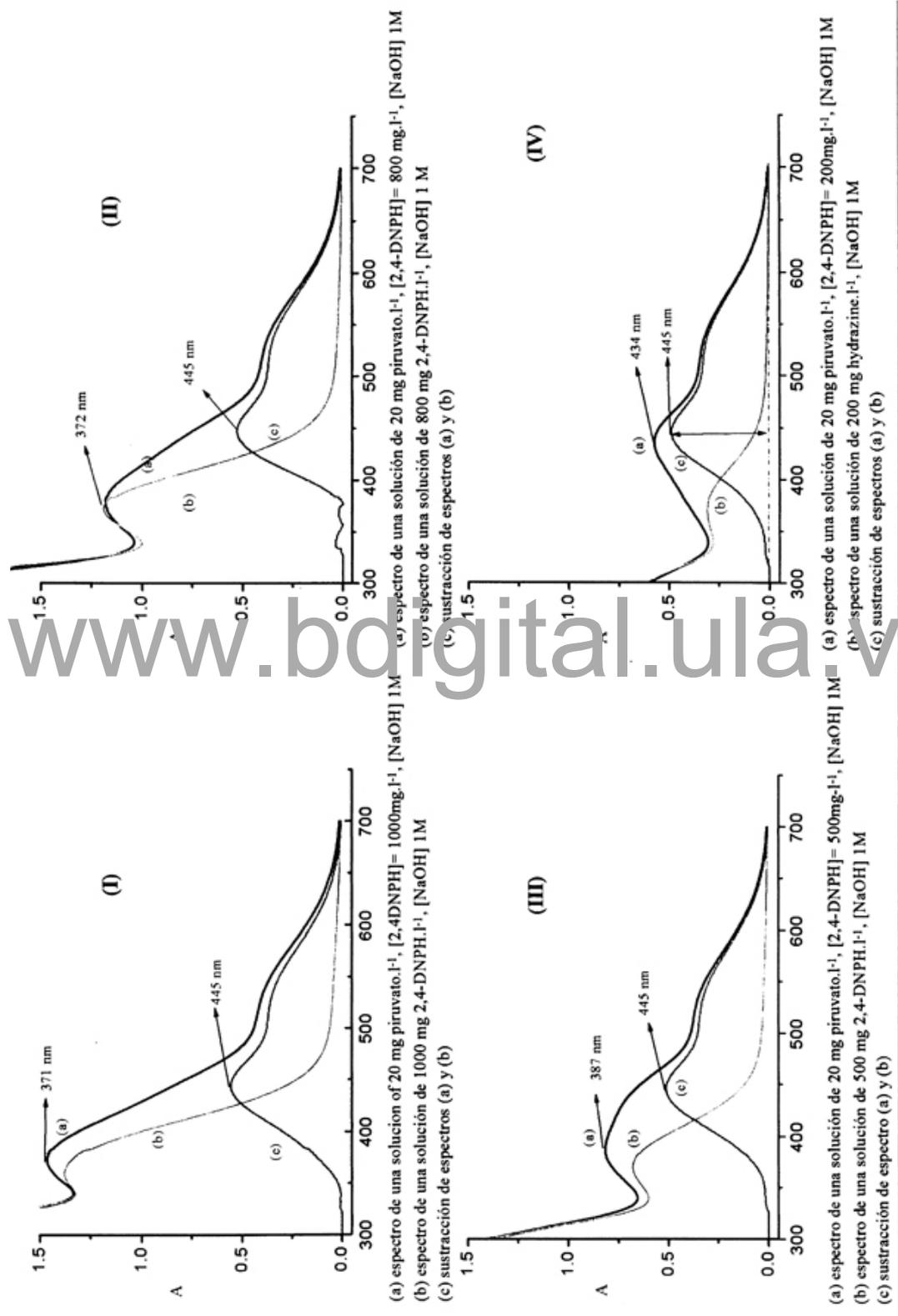


Figura 5 Espectros de reactivos y productos

Por último se estudió el espectro de absorción de la misma solución, pero en esta ocasión haciendo pasar en forma simultánea y en las mismas condiciones de flujo, a la solución de 2,4-DNPH alcalinizada a través de otra celda de flujo, utilizada como referencia. En esta experiencia se utilizó una velocidad de barrido de 480 nm min^{-1} y el flujo total se varió entre 4 y 12 ml min^{-1} , encontrándose en todos los casos resultados consistentes.

Estos resultados permiten sustentar la propuesta del presente trabajo, en la cual la utilización de un sistema paralelo y simultáneo de flujo continuo para la muestra y el blanco de la muestra, permite realizar la determinación directa de piruvato en muestra de cebollas con las correcciones del blanco correspondientes a los reactivos utilizados (la 2,4-DNPH) y al carbonilo no "pirúvico" presentes en la muestra.

3.5 Optimización de los parámetros del sistema acoplado propuesto de análisis en flujo con detección espectrofotométrica

El sistema acoplado de análisis en flujo con detección espectrofotométrica propuesto involucra la optimización de diversos parámetros de tipo físico, químico y espectroscópico. Los parámetros físicos se relacionan con el montaje propuesto, los químicos a la reacción que se desarrolla, mientras que los espectroscópicos se refieren a parámetros instrumentales y al criterio de medida seleccionado.

La optimización del sistema se llevó a cabo por el método univariado (un parámetro a la vez). Sin embargo, tras cada optimización se revisaba el sistema general, verificando la validez de cada parámetro seleccionado.

3.5.1 Parámetros Físicos

En este trabajo se estudiaron diversas configuraciones, diámetros de tubería, y flujos, con el fin de automatizar de una forma simple el procedimiento descrito por Schwitter y Weston. La Tabla 1, resume las condiciones óptimas seleccionadas, con vistas a presentar un método de análisis con características

analíticas adecuadas para llevar a cabo la determinación de piruvatos en muestras de cebolla.

3.5.2 Parámetros espectroscópicos

Entre los parámetros espectroscópicos que se deben seleccionar se encuentran el intervalo espectral, la velocidad de barrido, la resolución y el criterio de medida. La selección de algunos de estos tópicos se discutió en los estudios preliminares. Las condiciones de operación se resumen en la Tabla 1.

3.5.3 Parámetros químicos

Entre los parámetros de tipo químico que se deben optimizar se encuentran la concentración de HCl, 2,4-DNPH, NaOH, el pretratamiento de la muestra y las condiciones de la catálisis térmica por irradiación de microondas.

3.5.3.1 Efecto de la concentración de 2,4-DNPH y de HCl

La presencia de ácido clorhídrico en la solución de 2,4-DNPH es necesaria, ya que aumenta la solubilidad de ésta en la solución, y al mismo tiempo proporciona las condiciones adecuadas para que se produzca la adición nucleofílica sobre el carbono carbonílico del piruvato. La Figura 6 muestra el efecto que presenta sobre la señal instrumental de una solución de 20 mg piruvatos l^{-1} , la concentración de HCl presente en soluciones de 1000 mg l^{-1} de 2,4-DNPH. El intervalo estudiado fue de 0,25 a 2 M. En ella se observa que la señal analítica disminuye con la concentración a lo largo del intervalo estudiado. Este comportamiento probablemente se deba a la protonación del grupo amino de la 2,4-DNPH, que hace menos probable el ataque nucleofílico. Se seleccionó un valor de 1M, ya que en estas condiciones la solubilidad de la 2,4-DNPH, así como la sensibilidad del sistema son adecuadas.

La Figura 7 muestra el efecto de la concentración de 2,4-DNPH sobre la señal analítica de 20 mg piruvatos l^{-1} . La señal analítica aumenta con la concentración de 2,4-DNPH en el intervalo de 0 a 300 mg l^{-1} ($n_{2,4-DNPH} / n_{Piruvatos} = 6,6$), y a partir de esa concentración la señal alcanza un plateau, indicando

que la reacción ha llegado a su terminación. Se seleccionó una concentración de 2,4-DNPH de 1000 mg l⁻¹ para el resto del trabajo, ya que de esa forma se asegura un adecuado exceso estequiométrico del reactivo para todas las muestras y soluciones del calibrado. Es requisito realizar la corrección de la absorbancia mediante una línea de base establecida entre 300 y 700 nm para corregir los desplazamientos en la línea de base.

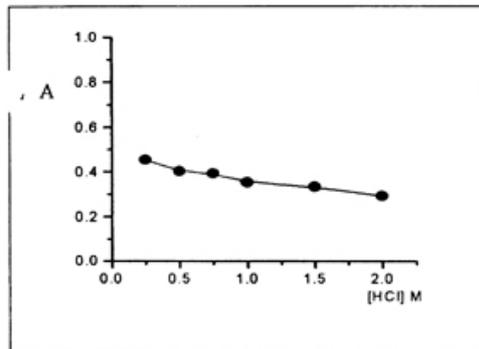


Figura 6 Efecto de la concentración de HCl en la solución de 2,4-DNPH (Canales C₂ y C'₂) sobre la señal analítica de una solución de 20 mg piruvato l⁻¹. ([2,4-DNPH]= 1000 mg l⁻¹, [NaOH]=1,0

1)

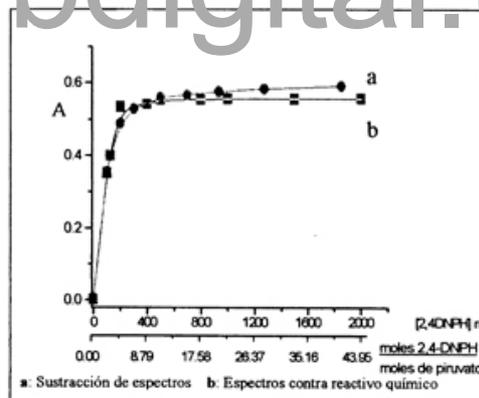


Figura 7 Criterios de evaluación. Efecto de la concentración de 2,4-DNPH sobre la señal analítica de 20 mg l⁻¹ de piruvato. ([NaOH]= 1M, [HCl]_{2,4-DNPH}=1 M).

3.5.3.2 Efecto de la concentración de NaOH

En esta sección se estudió el efecto de la concentración de NaOH en el intervalo de 0 a 3 M sobre la señal analítica de una solución de 20 mg piruvatos l⁻¹. Los resultados se presentan en la Figura 8 y en ella se observa que la señal analítica crece con la concentración de OH⁻ en la región comprendida entre 0 y

0,8 M, ya partir de ese valor alcanza un valor constante en el resto del intervalo. Se seleccionó una concentración de NaOH 1M para el resto del trabajo.

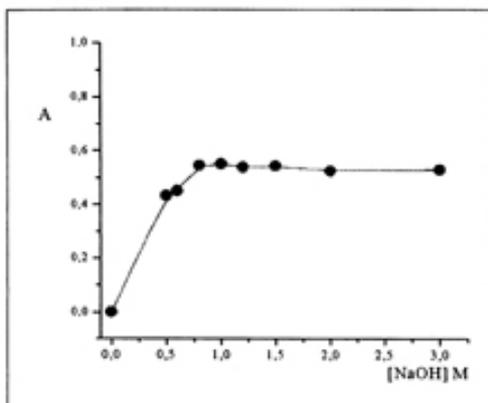


Figura 8 Efecto de la concentración de NaOH (Canales C₃ y C'₃) sobre la señal analítica de una solución de 20 mg piruvato l⁻¹ ([2,4-DNPH]= 1000 mg l⁻¹, [HCl]_{2,4-DNPH} =1 M).

3.5.3.3 Optimización de los caudales de las soluciones.

Los estudios preliminares indicaron claramente que el espectro de absorción no se ve afectado por la velocidad de barrido espectral, ni por el caudal de la solución resultante que entra a la celda de flujo en el intervalo comprendido entre 4 y 12 ml min⁻¹. Por lo tanto la selección de la velocidad de los flujos de los diversos canales, depende exclusivamente de las condiciones impuestas por el horno de microondas focalizado.

3.5.3.4 Catálisis térmica. Efecto de la potencia de la radiación del horno de microondas.

La reacción entre la 2,4-DNPH y el piruvato es lenta y requiere de tiempo para llegar a término. En la literatura se ha sugerido incubar la reacción a 35 - 40° por varios minutos para acelerada ⁽⁴⁾.

La Figura 9 muestra el comportamiento de la señal analítica de una solución de piruvato de 20 mg l⁻¹ con el tiempo para diversas temperaturas. A temperatura ambiente (curva 1) la reacción tarda cerca de 20 minutos en alcanzar su culminación. A 37 °C (entre 35 y 40), la señal analítica crece con el tiempo

hasta los seis minutos y a partir de allí se mantiene constante (curva 2). Para temperaturas superiores a 50°C la señal analítica crece con el tiempo, alcanzando la señal de referencia a los 4 minutos y permaneciendo constante hasta aproximadamente los 6 minutos. Sin embargo, para tiempos mayores la curva sufre una inflexión y la señal decrece con el tiempo, lo que parece sugerir la descomposición del producto de la reacción. Se repitió la experiencia, pero en esta ocasión se utilizó una muestra real de cebolla, encontrándose los mismos resultados.

La radiación de microondas ha sido extensamente utilizada en la química analítica con la finalidad de acelerar reacciones químicas ⁽¹⁰⁻¹⁴⁾

La selección de las condiciones generales de operación del horno de microondas es crítico, ya que deben propiciar un medio adecuado para la catálisis térmica, pero evitando condiciones de sobrecalentamiento que pueden producir perturbaciones en el flujo, la formación de burbujas de gas dentro de la tubería o la descomposición misma del producto de reacción

Los parámetros que están involucrados en esta etapa son: (i) El caudal de la solución que entra en los serpentines de reacción (R_2 y R'_2) (2,4-DNPH + Muestra), (ii) La longitud y diámetro interno del serpentín de reacción, (iii) El tiempo de residencia, que es la resultante de las condiciones anteriores y (iv) La potencia de operación del horno de microondas.

Las condiciones de trabajo seleccionadas se resumen en la Tabla 1.

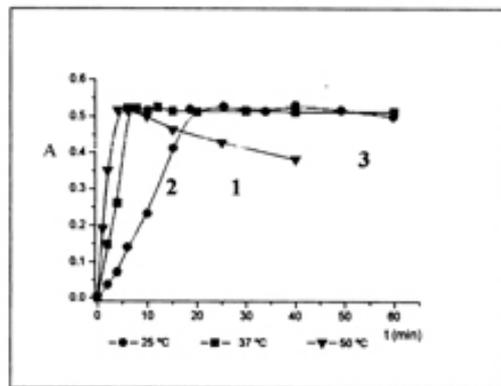


Figura 9 Efecto del tiempo de incubación sobre la absorbancia de una solución de 20 mg piruvato l⁻¹, para distintas temperaturas de incubación.

La Figura 10, muestra el comportamiento de la señal analítica de una solución de 20 mg piruvatos l⁻¹ con la potencia del horno de microondas (curva a) utilizando un serpentín de teflón de 150 cm de longitud y 0,8 mm de diámetro interno como reactor (R₂ y R'₂). En ella se observa que la señal analítica crece con la potencia hasta un valor de 30 % de la potencia total, y se mantiene constante en el intervalo comprendido entre 30 y 50 %. Para valores superiores a 50 % se generan serios problemas de calentamiento, que obligan a interrumpir la toma del espectro de absorción. La experiencia se repitió utilizando una muestra real de cebolla, observándose el mismo comportamiento (Figura 10 b). Sobre la base de estos resultados, se seleccionó un valor de 40 % para el resto del trabajo.

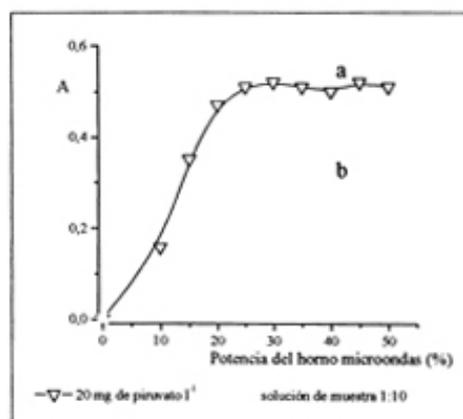


Figura 10 Efecto de la potencia del HM sobre la respuesta instrumental de: ▽ 20 mg de piruvato l⁻¹, ■: Muestra real de cebolla

3.5.3.5 Pre-tratamiento de la muestra

El procedimiento utilizado para el tratamiento previo de la muestra se describe en detalle en la sección 2.3.1. El piruvato es el producto de una reacción enzimática. Por lo tanto, cabe esperar que se requiera de cierto tiempo para que la reacción llegue a su culminación, desde el momento en que la cebolla es cortada.

En esta sección se estudió el efecto del tiempo de reposo del licuado de pulpa y jugo de cebolla en el intervalo comprendido entre 0 y 60 minutos sobre la producción de piruvato. Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura 11, y en ella se observa que la señal analítica crece con el tiempo en la zona de 0 a 6 minutos, manteniéndose constante para tiempos superiores. Esto indica que a los seis minutos, la reacción enzimática alcanza su culminación.

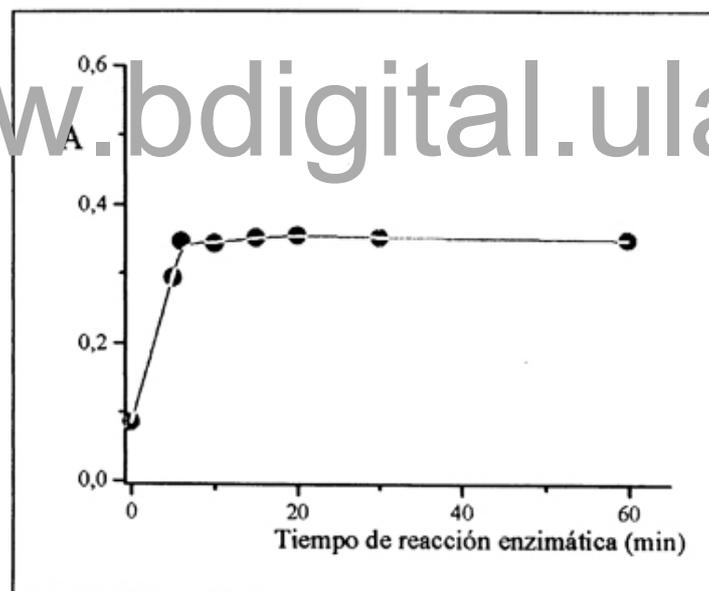


Figura 11 Efecto del tiempo de reacción en el desarrollo de piruvato.

Estudios adicionales indican que el licuado de pulpa y jugo de cebolla, conservados en forma adecuada bajo refrigeración es estable por un periodo de 1 semana.

Con respecto al tratamiento para obtener el blanco de la muestra, se estudiaron

los procedimientos A y B descritos en la sección 2.3.2, encontrándose resultados similares. Debido al nivel insignificante de la señal del blanco encontrada en la mayoría de las muestras, se realizaron estudios fortaleciendo al blanco de la misma, con una solución de piruvato, encontrando en todos los casos resultados coincidentes y satisfactorios.

El procedimiento A resulta más cómodo, y por esta razón se seleccionó para el resto del trabajo.

3.6 Figuras de mérito para la determinación de piruvatos por el procedimiento propuesto

En la Tabla 2, se resumen las características analíticas obtenidas para la curva de calibración de piruvato por el procedimiento propuesto. La calibración se realizó entre 0 y 35 mg piruvato l⁻¹ bajo las condiciones de operación que se presentan en la Tabla 1 (Ver Figura 12). El límite de detección se estableció como la concentración de analito, cuya señal instrumental corresponde a tres veces la desviación estándar de 11 blancos "químico". Por su parte el límite de cuantificación se estableció con un criterio similar, pero con una relación de diez.

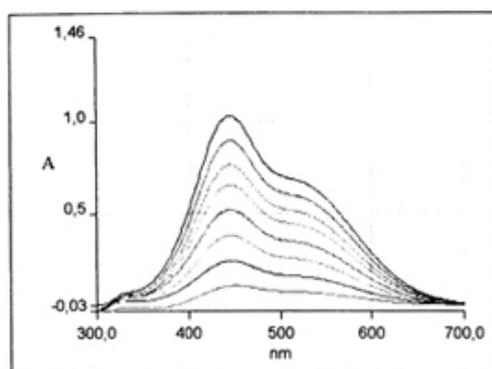


Figura 12 Curva de calibración. Espectros de absorción de soluciones de piruvato entre 5 y 35 mg piruvato l⁻¹.

Tabla 2 Figuras de mérito

Parámetro	Valor
Ecuación de la recta	$A = 0,002 + 0,0250 [\text{piruvato}]^a$
Coefficiente de correlación (r^2)	0,99988
Intervalo dinámico (mg l^{-1})	1-35
Límite de detección (mg l^{-1}) ^b	0,16
Límite de cuantificación (mg l^{-1}) ^c	0,7
Desviación estándar relativa (%) ^d	1,25

a [piruvato] indica la concentración de piruvato en mg l^{-1}

b Definido como la concentración de piruvato cuya señal corresponde a tres veces la desviación estándar del blanco

c Definido como la concentración de piruvato cuya señal corresponde a diez veces la señal del blanco

d Obtenida de 10 réplicas de una solución de 20 mg l^{-1} piruvato.

3.7 Estudios de efecto de matriz

Con el objetivo de establecer la presencia o ausencia de interferencias por parte de la matriz, se realizó un estudio de adición de estándar en la modalidad clásica de volumen de muestra constante, volumen de estándar variable y volumen final constante. Para ello se prepararon una serie de soluciones a las que se añadieron 2 ml de la muestra y cantidades conocidas de una solución estándar de 100 mg l^{-1} .

En la Figura 13, se presentan de manera comparativa las curvas que se obtuvieron para la curva de calibrado y la adición de estándar. Haciendo una comparación entre, las ecuaciones correspondientes, se puede observar que dichas pendientes no difieren significativamente.

La prueba estadística de significación (comparación de las medias), usando como hipótesis nula que las dos pendientes son iguales y con un nivel de significación de 5% ($P=0.05$), determinaron que no existen diferencias significativas entre los dos valores. Estos resultados, permitieron establecer la cuantificación de piruvato en cebolla mediante la interpolación de los valores de absorbancia de las distintas muestras en una curva de calibración realizada con estándares en medio acuoso.

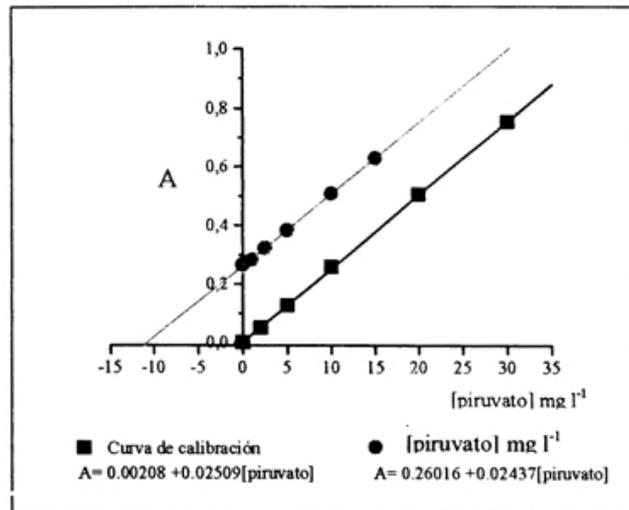


Figura 13 Estudios de adición de estándar.

3.8 Exactitud del procedimiento propuesto. Estudios de recuperación y análisis comparativos por métodos de referencia

Para establecer inicialmente la exactitud del procedimiento propuesto, se realizaron diversos estudios de recuperación. Para esta experiencia, cada muestra fue analizada por cuadruplicado, tomando un volumen constante de muestra y adicionando concentraciones variables y conocidas de piruvatos para obtener una concentración final del analito añadido, entre 2 y 10 mg l⁻¹. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3 y en ellos se puede observar que en todos los casos el % de recuperación fue cuantitativo ⁽⁹⁶⁻¹⁰²⁾. Estos resultados revelan que el procedimiento propuesto, en general, se encuentra libre de errores sistemáticos.

Para establecer de validez de la metodología propuesta, se analizaron 5 muestras por nuestro método y por dos procedimientos descritos en la literatura ^(4,6). Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas como se observa en la Tabla 4, lo que corrobora la exactitud del método propuesto.

Tabla 3 Estudios de recuperación

Muestra	[Piruvato](añadido) (mg l ⁻¹)	[Piruvato] (recuperado) (mg l ⁻¹)	Recuperación (%)
1	0	10,2	-----
	10	19,9	97
	20	29,4	96
	25	35,4	101
2	0	17,2	-----
	2	19,2	100
	5	22,3	102
	10	27,0	98

Tabla 4 Comparación de resultados con métodos de referencia

Muestra	Procedimiento 1 ⁽⁴⁾ mg g ⁻¹ (muestra seca)	Procedimiento 2 ⁽⁶⁾ mg g ⁻¹ (muestra seca)	Este estudio mg g ⁻¹ (muestra seca)
1	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,6 ± 0,2
2	4,0 ± 0,1	3,6 ± 0,1	3,8 ± 0,2
3	4,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,4 ± 0,2
4	4,5 ± 0,1	5,0 ± 0,1	4,7 ± 0,3
5	5,3 ± 0,2	5,0 ± 0,1	5,3 ± 0,2

www.bdigital.ula.ve

3.9 Análisis de muestras reales

Se analizaron un total de once muestras las cuales fueron clasificadas en dos grupos. Las muestras del 1-8 corresponden a cebollas amarillas, mientras que las muestras que van del 9 al 11 corresponden a cebollas moradas. Estas fueron analizadas por el método propuesto y los resultados se presentan en la Tabla 5. Para el primer grupo el contenido de piruvatos en muestras húmedas varía desde 0,21 hasta 1,20 mg g⁻¹ con una media de 0,35 ± 0,09 mg g⁻¹. Por su parte las muestras del grupo dos presentaron un contenido mayor de piruvatos cuyo intervalo varía entre 0,97 a 1,20 con una media de 1,06 ± 0,12.

En la Tabla 6, se presentan algunos intervalos de concentración de piruvato en cebolla encontrados en algunos trabajos. Es importante señalar que estos valores, corresponden a alguna parte de la cebolla; es decir, la base, la capa mas externa, el centro, etc.; así como también dependen de las condiciones de

almacenamiento. Debido a esto, es difícil establecer una comparación ya que las muestras analizadas en el presente trabajo, no se les conoce las condiciones de almacenamiento, ni tampoco se realizaron estudios tomando en consideración la zona de la muestra. Sin embargo, si se establece una comparación de manera global, se puede decir que el contenido de piruvato encontrado en las muestras analizadas están en el orden de concentración a los reportados en la literatura.

Tabla 5 Contenido de piruvatos en cebollas que se comercializan en Venezuela

	Contenido de piruvato (mg g⁻¹) (muestra húmeda)	Contenido de piruvato (mg g⁻¹) (muestra seca)
Cebolla	X ± s (n = 3)	X ± s (n = 3)
1	0,21 ± 0,01	3,6 ± 0,2
2	0,27 ± 0,02	3,8 ± 0,2
3	0,37 ± 0,02	4,4 ± 0,2
4	0,37 ± 0,02	4,7 ± 0,3
5	0,46 ± 0,02	5,3 ± 0,2
6	0,47 ± 0,01	5,5 ± 0,2
7	0,35 ± 0,02	6,7 ± 0,3
8	0,36 ± 0,01	6,8 ± 0,2
9	0,97 ± 0,01	14,0 ± 0,2
10	1,01 ± 0,02	14,5 ± 0,3
11	1,20 ± 0,02	17,0 ± 0,3

Tabla 6 Contenido de piruvato en cebollas reportados en la literatura

Contenido de piruvato (mg g⁻¹) (muestra húmeda)	Referencia
1,04	6
0,17-1,65	6
0,05- 1,67 *	1
0,09 – 0,98**	1
0,21-1,20	Este trabajo

*(Cebollas almacenadas) ** (cebollas frescas)

4 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrolló un método automatizado para la determinación de piruvato en cebollas basado en la reacción de derivatización de la 2,4 dinitrofenilhidracina propuesto por Schwimmer y Weston. El sistema desarrollado utiliza un sistema de flujo con detección espectrofotométrica y catálisis térmica por radiación de microondas.

La metodología propuesta reduce en forma considerable los tiempos de análisis, ya que su diseño permite:

- 1) Realizar la incubación de la reacción entre los piruvatos y la 2,4-DNPH en línea, asistida por radiación de microondas.
- 2) Con una sola introducción de la muestra (y del blanco de la muestra) realizar el análisis con corrección simultánea del blanco químico (exceso de 2,4-DNPH) y del blanco de la muestra (carbonilo no pirúvico presentes en la muestra).
- 3) Con una sola introducción de la muestra realizar el análisis por triplicado.

Los estudios de adición de estándar y de recuperación realizados, así como los análisis comparativos de diversas muestras con métodos de referencia, indican que el procedimiento propuesto está libre de interferencias.

Las características analíticas del procedimiento propuesto en cuanto a intervalo dinámico, límite de detección y frecuencia de análisis lo hacen adecuado para el análisis rutinario de piruvatos en muestras de cebollas.

El método se encuentra libre de interferentes y de posibles errores que por lo general están presentes en los métodos manuales.

El principio del método propuesto, puede ser fácilmente incorporado en laboratorios con dotación limitada. En este caso, puede realizarse la incubación de la muestra en forma manual y trabajar con un montaje simple para la alcalinización del incubado y su detección espectrofotométrica.

El estudio espectroscópico del sistema conduce a la posibilidad de utilizar otros criterios de evaluación que serán explorados en otro trabajo.

www.bdigital.ula.ve

5 BIBLIOGRAFÍA

1. Bacon J.R, Moates G.K, Ng A, Rhodes M.J.C, Smith A.C, Waldron K.W. Quantitative analysis of flavour precursors and pyruvate levels in different tissues and cultivars of onion (allium cepa). Food Chemistry 64 (1999) 257-261.
2. Thomas D.J, Parkin K.L, Simon P.W. Development of a simple pungency indicator test for onions J. Sci. Food Agric. 60 (1992) 499 (499-504).
3. Guyer D.E, Sinha N.K. Supercritical carbon dioxide extraction of onion flavours-relationship of onion pyruvate content on flavour yield. J. Sci. Food Agric 69 (1995) 457-460.
4. Wall M. M. Corgan J.N. Relationship between pyruvate analysis and flavor perception for onion pungency determination. Hort Science 27 (1992) 9 1029-1030.
5. Whitaker R. J. Development of flavor, odor and pungency in onion and garlic. advances in food research. Department of Food Science and Technology University of California, Davis California. Editorial Board. 22 (1976) 73-133.
6. Schwimmer S., Weston W. J. Enzymatic development of pyruvic acid on onion as a measure of pungency. Agricultural and Food Chemistry. 9 (1961) 4301-304.
7. Kil Sun y Yoo, Leonard M Pike. Development of an automated system for pyruvic acid analysis in onion breeding. Scientie Horticulture. 82(1999) 193-201.
8. Weicker H., Haegele H., Komes B., Wermer A. determination of alanine, lactate, pyruvate, 8-hydroxybutyrate and actoacetate by flow iniecton analysis (FIA). Int. J. Sports Med. 5(1984) 47.
9. Morrison R. T. Boyd R. N. Química orgánica. 5ta edición. Pearson Educación New York. (1998) 767-768.
10. Gallignani M, Bahsas H. Brunetto M., Burguera J. L, Burguera M, Petit de Peña Y. A time based flow injection-cold vapor atomic absorption spectrometry system with on-line microwave sample pretreatment for the determination of inorganic and total mercury in urine. Analytica Chimica

Acta. 369 (1998) 57-67.

11. Gallignani M., Valero M., Brunetto M. R., Burguera J. L., Burguera M, Petit de Peña Y. Sequential determination of Se(IV) and Se(VI) by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry with hcl/hbr microwave aided pre-reduction of Se(VI) to Se(IV). Talanta. 52 (2000) 1015-1024.
12. Gallignani M, Valero M. Marcó Lue M, Capote T, Burguera J. L, Brunetto M.R, Burguera M. Flow Injection-Spectrophotometric determination of pyruvates in onion. 8th INTERNATIONAL CONFERENCE ON FLOW ANALYSIS. Junio 25-29 del 2000. Book of Abstracts. Trabajo P-385. Warsaw, Poland.
13. Gallignani M, Sánchez A. Brunetto M., Burguera J. L, Burguera M. A flow injection-microwave radiation system for sequential determination of nitrite and nitrate in water. 8th INTERNATIONAL CONFERENCE ON FLOW ANALYSIS. Junio 25-29 del 2000. Book of Abstracts. Trabajo P-311. Warsaw, Poland.
14. Burguera M, Burguera J. L. Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis. Analytica Chimica Acta. 366 (1998) 63-80.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve
CAPÍTULO 2
REVISION DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS DE NITRITO BASADOS EN LA
ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN MOLECULAR EN EL ULTRA
VIOLETA-VISIBLE

RESUMEN

En el presente trabajo se hace una evaluación acerca de los diversos procedimientos analíticos que existen en la literatura especializada para la determinación de nitritos por Espectroscopia de Absorción Molecular en el Ultravioleta Visible. Los procedimientos analíticos para la cuantificación de este ión se pueden agrupar en tres grandes bloques, a saber: Métodos basados en la reacción de Griess-Ilosvay, Métodos Cinéticos y Métodos basados en el uso de nuevos reactivos. Las características analíticas de estos procedimientos -en cuanto a su sensibilidad, límite de detección, rapidez, reproducibilidad etc., varían en forma considerable. Las razones principales son: la gran variedad de reactivos que pueden ser utilizados en cada uno de éstos, así como también el acoplamiento de técnicas y las diferentes configuraciones de los sistemas utilizados.

www.bdigital.ula.ve

1 INTRODUCCIÓN

La presencia de nitritos en el medio ambiente tiene distintas fuentes naturales, las cuales son una consecuencia directa del ciclo del nitrógeno. En aguas subterráneas y superficiales la nitrificación puede incrementar los niveles del ión hasta alcanzar valores que oscilan entre 200-1500 $\mu\text{g l}^{-1}$ ⁽¹⁾

En la industria alimenticia el nitrito de sodio se usa como aditivo en las charcuterías y salazones, en donde cumple algunas funciones, entre las cuales se pueden destacar:

- Al combinarse con la mioglobina del músculo da lugar a la nitrosomioglobina, que es responsable del color de los productos de charcutería.
- Contribuye a la formación del aroma y sabor de los productos de charcutería.
- Inhibe el desarrollo de bacterias, especialmente la *Clostridium botulinum* que produce el envenenamiento potencialmente fatal conocido como botulismo.⁽²⁾

Su toxicidad está principalmente relacionada con su participación directa en la oxidación férrica de la hemoglobina (Hb) normal, a metahemoglobina (metHb); la cual es incapaz de transportar el oxígeno a los tejidos. Cuando la cantidad de metHb es 10% superior a la Hb se observa una manifestación clínica, conocida como metahemoglobinemia, que produce cianosis y en mayores concentraciones conduce a la asfixia⁽¹⁾.

También presenta una toxicidad indirecta, cuando reacciona con aminas o amidas para producir compuestos de N-nitroso -nitrosamina y nitrosamidas respectivamente-, los cuales poseen efectos cancerígenos y mutagénicos⁽³⁾. El origen de estos productos puede ser exógeno-vegetales, alcoholes, productos sintéticos, cigarrillos, etc.- o endógenos -formación in vitro-. En este último caso, su formación en el organismo se hace a partir de aminas o amidas que se encuentran en la alimentación -pescados, conservas, etc.-, o que pueden metabolizarse a partir de las sustancias químicas de síntesis -medicamentos,

etc.-. Las nitrosaminas producen un efecto carcinogénico en el hígado, esófago, en el sistema respiratorio y riñones. Por su parte, las nitrosamidas afectan el sistema nervioso periférico y central y a los órganos del sistema gastrointestinal. Sin embargo, los ensayos realizados con distintos compuestos N-Nitroso en distintas especies animales incluidos los primates, señalan diferencias entre especies en la respuesta a estos compuestos. Estos resultados muestran la dificultad de atribuir con certeza una respuesta neoplásica específica en el hombre a un determinado compuesto N-Nitroso. En cuanto a los efectos mutagénicos, Magee y col. ⁽⁴⁾ y Montesano y col. ⁽⁴⁾ demostraron que casi todas las nitrosamidas son mutagénicas con casi todos los indicadores genéticos, circunstancia que se atribuyó a la formación no enzimática de reactivos alquilizantes. Por otro lado, Pasternak ⁽⁴⁾ notificó que las nitrosaminas tenían una amplitud mucho más limitada de actividad mutagénica en ensayos realizados con *Drosophila Melanogaster*. Por esto, las limitaciones actuales respecto a los datos disponibles sobre dosis-respuesta en animales y su interpretación, y el conocimiento inadecuado del mecanismo biológico de las carcinogénesis impiden una estimación cuantitativa del riesgo para el hombre que pueda estar asociado con las distintas exposiciones a los compuestos N-Nitroso. Sin embargo, estudios de laboratorio realizados por Terracini y col. ⁽⁴⁾ en ratas, demostraron que en presencia de niveles iguales o superiores a 5 mg Kg⁻¹ de un compuesto N-Nitro se produce siempre una respuesta carcinogénica.

Debido al impacto perjudicial sobre la salud que tienen los nitritos, algunos organismos han establecido límites de tolerancia de este ion en fuentes alimenticias y aguas. En la Tabla 1, se presentan los niveles de concentración máximos admisibles para este ión en aguas potables, emitidas por algunas organizaciones internacionales competentes para países europeos y latinoamericanos, entre ellos Venezuela ⁽⁵⁻⁷⁾

Tabla 1. Límite de concentración máximo permitido para nitritos en aguas potables, emitidos por los países de Norteamérica, la Unión Europea y Latinoamérica en mg l⁻¹.

OMS 1995	CAN 1995	USA 1998	EEC 1991	UNK 1991	GER 1990
3	3,2	1	0,1	0,1	0,1
ITA 1985	SPN 1990	GUT 1998	NIC 1994	PER 1999	VEN 1998
0,1	0,1	0,01	1	0,9	0,03

CÓDIGOS

OMS	Organización Mundial de la Salud	ITA	Italia
CAN	Canadá	SPN	España
USA	Estados Unidos de América	GUT	Guatemala
EEC	Unión Económica Europea	NIC	Nicaragua
UNK	Reino Unido	PER	Perú
GER	Alemania	VEN	Venezuela

Sin embargo, el exagerado uso de nitrito como aditivo en la preservación de alimentos, como fijador de los colores y como un inhibidor de la oxidación en procesos industriales, hace que los niveles de éste, en ciertas aguas, no repasan estos límites.

Existe un gran número de métodos que permiten determinar la cantidad de esta especie en fluidos biológicos, alimentos y muestras ambientales. Entre estos, se pueden mencionar aquellos que utilizan técnicas Electroquímicas ⁽⁸⁾, como la polarografía de pulso diferencial, voltimetría cíclica, potenciometría o cronoamperometría, Métodos cromatográficos ⁽⁹⁻¹¹⁾, como cromatografía iónica con detección por conductividad, detección UV o cromatografía de gases con detección por ionización en llama (GC-FID), y aquellos que se basan en el uso de técnicas Espectroscópicas, como Espectroscopia de Absorción Molecular en el ultravioleta visible, Fluorescencia o Quimioluminiscencia Molecular ^(12-14,24-29).

El presente trabajo, tiene como objetivo hacer una revisión de los métodos de análisis para la determinación de nitrito en diversas matrices, que utilizan a la par Espectroscopia de Absorción Molecular en el Ultravioleta-Visible (Uv-V) como forma de detección.

2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL IÓN NITRITO BASADOS EN LA ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN MOLECULAR EN EL ULTRAVIOLETA-VISIBLE.

2.1 Absorción natural del ion nitrito

El nitrito, presenta una absorción natural en la región del Uv-Visible, como se puede observar en la Figura 1. En ella aparecen dos bandas; una de gran intensidad ubicada en la zona del Uv a 209 nm y otra de menor intensidad situada al comienzo del visible con un máximo en 354 nm. La caracterización analítica de estas bandas se presenta en la Tabla 2. La banda de 209 nm es muy intensa; sin embargo, debido a las múltiples interferencias en esta zona espectral, es poco útil desde el punto de vista experimental. Por otra parte, la sensibilidad que proporciona la banda de 354 nm, es poco adecuada para la determinación de NO_2^- en la mayoría de las matrices de interés. Esto ha conducido a la búsqueda de formas alternativas mucho más sensibles que permitan la determinación de este ion a niveles de concentración muchos más bajos que los proporcionados con el uso de estas bandas.

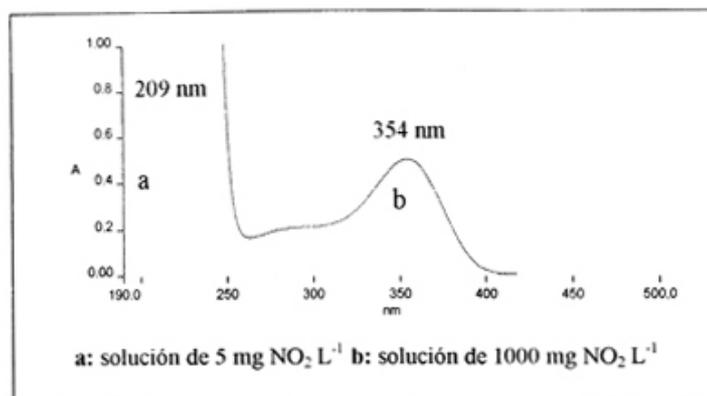


Figura 1 Espectro de absorción del ion NO_2^-

Tabla 2 Características analíticas de la curva de calibración para nitrito en las bandas de 209 y 354 nm ⁽¹⁵⁾.

Parámetro	Valor	
	$\lambda = 209 \text{ nm}$	$\lambda = 354 \text{ nm}$
Ecuación de la recta	$A = -0,003 + 0,1720 \cdot [\text{NO}_2^-]$	$A = 4 \times 10^{-4} + 5,01 \times 10^{-4} \cdot [\text{NO}_2^-]$
Sensibilidad	0,1720	$5,01 \times 10^{-4}$
Límite de detección [*] (mg l^{-1})	0,002	3
Intervalo dinámico (mg l^{-1})	0,5 - 15	50 - 1000
Límite de cuantificación (mg l^{-1}) ^{**}	0,005	12

A: Absorbancia y $[\text{NO}_2^-]$: concentración de nitritos expresada en mg l^{-1} .

^{*} Concentración de analito cuya señal corresponde a 3 veces la desviación estándar del blanco

^{**} Concentración de analito cuya señal corresponde a 10 veces la desviación estándar del blanco

Los métodos de análisis fundamentados en esta técnica instrumental se pueden agrupar en tres grandes bloques:

Métodos Basados en la Reacción de Griess-Ilosvay.

Métodos Cinéticos.

Métodos Basados en el Uso de Nuevos Reactivos.

2.2 Métodos basados en la reacción de Griess-Ilosvay

La gran mayoría de los métodos espectrofotométricos que se han desarrollado

para la determinación de nitrito tienen su base en la reacción de Griess-Ilosvay ⁽¹⁶⁾. Esta reacción involucra la diazotización en medio ácido de una amina aromática primaria con el anión, para generar una sal de diazonio; seguida por una reacción de acoplamiento con una amina aromática o un fenol. En esta última etapa se produce un compuesto "azo", que generalmente presenta una intensa absorción en el visible.

Jay B. Fox, Jr. ⁽¹⁶⁾, realizó un estudio sobre la cinética y el mecanismo de la reacción de Griess. Los resultados de ese estudio determinaron que la cantidad del azocompuesto formado por la reacción de una variedad de compuestos como la anilina y derivados de la naftilamina con los nitritos, depende de un gran número de factores; como son:

- La clase y concentración del reactivo usado, incluyendo la posición del sustituyente en el anillo.

- Combinaciones específicas y concentraciones relativas de la especie nitrosable y el reactivo de acoplamiento.

- Reacciones paralelas del nitrito con otro sustituyente que no sea el grupo amino. Reacciones paralelas del nitrito con el reactivo de acoplamiento.

- Formación de más de un tipo de pigmento.

- Oxidación del intermediario (ion diazonio) y/o del azocompuesto. La presencia de óxido de nitrógeno en el aire.

- El pH y la temperatura.

En todos los casos, los investigadores han intentado controlar el medio de la reacción. Sin embargo, el pH y la temperatura del medio siguen siendo los factores críticos.

2.2.1 El mecanismo de la reacción de Griess-Ilosvay

El mecanismo propuesto para la reacción de Griess-Ilosvay, que involucra la

formación de un azocompuesto del tipo (Ar-N=N-Ar), se desarrolla en varias etapas:

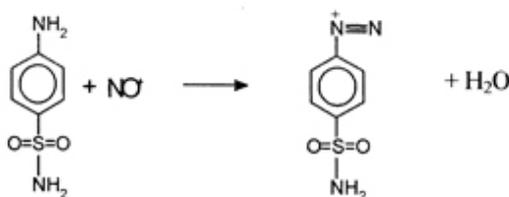
- 1) Formación del ión nitrosonio (nitrosación).
- 2) Formación de una sal de diazonio
- 3) Formación del azocompuesto

En la práctica el ión nitrosonio -electrófilo- se genera in situ por la reacción del nitrito de sodio en presencia de ácido clorhídrico. Luego, la etapa de nitrosación consiste de un ataque electrofílico del ^+NO con desplazamiento del H^+ en el sitio de mayor disponibilidad de electrones (en el nitrógeno de la amina aromática primaria) para producir la sal de diazonio. La etapa de formación del azocompuesto, consiste en una sustitución electrofílica aromática en la que ión diazonio es el reactivo atacante. La condición para que se produzca la reacción de copulación es que el anillo aromático que sufre el ataque por el ión diazonio debe contener un grupo de fuerte tendencia a liberar electrones (NH_2 , $-OH$). Por lo general, la sustitución se realiza en la posición para- con respecto al grupo activante (17),

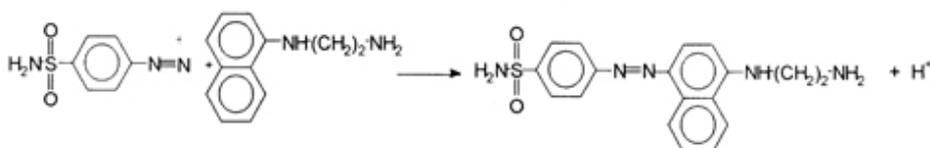
- 1) Formación del ión nitrosonio (NO^+)



- 2) Formación del ión diazonio ($Ar-N_2^+$)



- 3) Formación del azocompuesto ($Ar-N=N-Ar$)



Mecanismo propuesto para la formación de un azocompuesto

OH, por lo que el ión fenóxido es mucho más reactivo que el fenol no ionizado y por tanto, más lenta la copulación. En consecuencia, desde el punto de vista de la amina y el fenol la copulación se favorece con una acidez baja. Así, las condiciones óptimas para la etapa de copulación son el resultado de un compromiso ⁽¹⁷⁾.

2.2.3 Interferencias en la reacción de Griess-Ilosvay

Los métodos basados en la reacción de Griess se encuentran afectados por la presencia de iones. Los interferentes que han sido reportados con más frecuencia, y que además suelen estar presentes en muestras reales son: el Cu (II) y Fe (II). Altas concentraciones de Cu (II), producen un efecto negativo sobre la señal de absorbancia del azocompuesto formado, ya que su presencia cataliza la descomposición de la sal de diazonio ⁽¹⁸⁾. En general, la salida que se le ha dado para minimizar estas interferencias catiónicas, es la adición de agentes complejantes tales como EDTA. Otra solución experimental que se ha propuesto para solventar los problemas de interferencias por cationes, consiste en pasar la muestra a través de una columna de intercambio catiónico antes de la reacción ⁽¹⁵⁾.

También se ha reportado la interferencia negativa del I^- , debido a su reacción directa con el nitrito en medio ácido ⁽¹⁹⁾. Por todo lo expuesto, los desarrollos metodológicos deben incluir un estudio de interferentes. Generalmente, éstos se presentan en forma de niveles de tolerancia, que se definen en como la concentración de interferente que genera un cambio en la absorbancia del analito de $\pm 3\%$ ⁽²⁰⁾ o $\pm 5\%$ ⁽²¹⁾.

2.2.4 Sistemas de reactivos que se utilizan en la formación de azocompuestos (Reacción de Griess-Ilosvay)

Las combinaciones de reactivos que han sido utilizadas con más frecuencia para desarrollar la reacción de Griess son:

- Sulfanilamidodihidrocloruro de N-(1-naftil) etilendiamina.

- 3-nitroanilina Idihidrocloruro de N-(l-naftil) etilendiamina.
- 4-nitroanilinaldihidrocloruro de N-(l-naftil) etilendiamina o l-naftol.
- Otras combinaciones.

2.2.4.1 Métodos basados en el sistema de reactivos sulfanilamidal dihidrocloruro de N-(l-naftil) etilendiamina

En el año de 1961 V. Shinn⁽²²⁾ propuso la utilización de la sulfanilamida (SUL) como el reactivo para la diasotización y el dihidrocloruro de N-(l-naftil) etilendiamina (NED) como reactivo de acoplamiento. Desde entonces, son muchos los métodos desarrollados basados en esta reacción. De hecho, el método oficial para análisis de nitritos se fundamenta en su uso⁽²³⁾.

En la Figura 2a, se muestra el espectro de absorción de la SUL. En ésta se observa la presencia de dos bandas ubicadas en la región ultravioleta. La primera con un máximo bien definido en 258 nm, mientras que la otra presenta una situación de la señal por debajo de 195 nm. Por otra parte, el reactivo NED (ver Figura 2b), muestra varios máximos localizados en 208, 242 y 321 nm respectivamente. Es de destacar que ambos espectros presentan una absoluta transparencia a longitudes de onda superiores a los 450 nm. El azocompuesto formado a partir de este sistema presenta una banda con un máximo ubicado alrededor de 541 nm, como se puede observar en la Figura 3.

El "*Análisis por Inyección en Flujo (FIA)*", con detección espectrofotométrica, ha sido extensamente utilizado para el desarrollo de métodos automatizados. En ese sentido, la reacción de Shinn ha sido la base de diversos desarrollos metodológicos para evaluar el contenido de nitritos en diversas matrices, fundamentados en el acoplamiento de FIA con la Espectroscopia de Absorción Molecular en el Ultravioleta-Visible. En la Figura 4, se ilustra el montaje básico que se utiliza en muchos procedimientos descritos en la literatura. Este, consiste de una bomba peristáltica que propulsa en forma continua tres canales: (C); el portador que generalmente es agua, R₁; solución de

sulfanilamida acidificada y R₂; la solución del NED. Los estándares y muestras se introducen en el canal portador mediante una válvula de inyección. De esta forma, el estándar (o la muestra) reacciona con la sulfanilamida en el serpentín de reacción L₁. La solución resultante se mezcla con el NED en el serpentín de reacción L₂, en donde se produce la reacción de copulación. Por último, el azocompuesto es transportado al detector espectrofotométrico en donde se monitorea en forma continua la absorbancia a 545 nm.

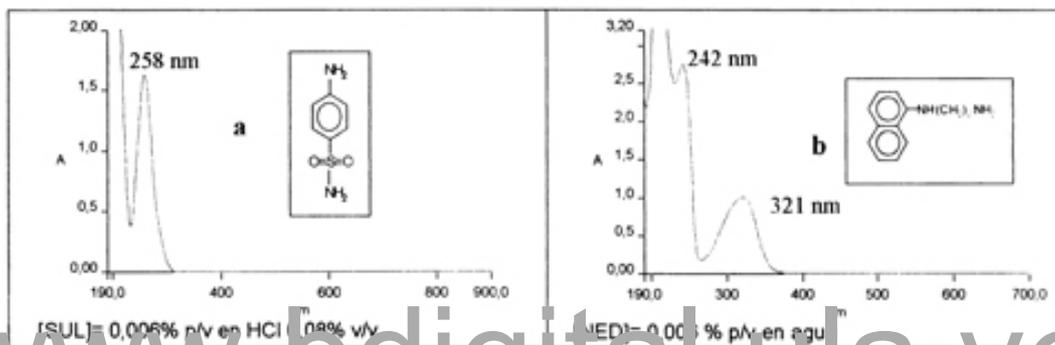


Figura 2 Espectros de absorción de la SUL y el NED

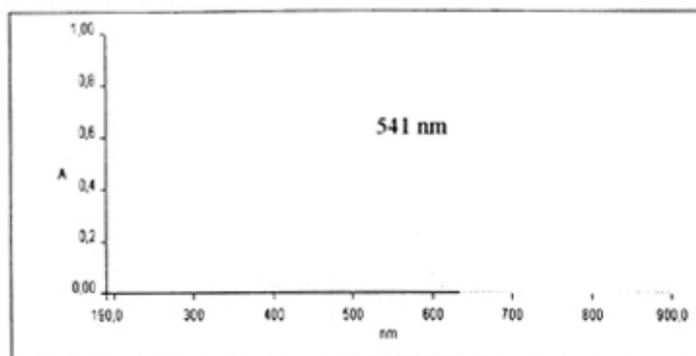


Figura 3 Espectro de absorción del azocompuesto formado a partir del sistema de reactivos NO₂⁻ - SUL - NED

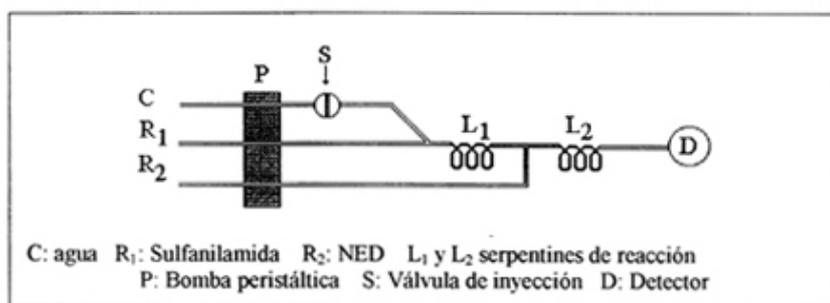


Figura 4 Diagrama de flujo para la determinación de nitrito con el sistema de reactivo SUL/NED.

Estos procedimientos en general, muestran buenas prestaciones analíticas, las cuales se resumen y contrastan en la Tabla 3.

Tabla 3 Características analíticas de métodos de análisis por inyección en flujo con detección espectrofotométrica basados en la reacción de Shinn

Muestra	Volumen de muestra (μl)	Inyección Dinámica (μg NO ₂ L ⁻¹)	Límite de detección ^a (μg NO ₂ L ⁻¹)	cv (%)	Frecuencia de análisis (h ⁻¹)	Ref
Agua de mar	100	46-1150	2,3	1	30	24
Agua y suelos	75	100-500	50	0,5	90	25
Aguas superficiales y subterráneas	100	320-1600		0,83	72	26
Aguas de río	-	0-10.000 ^b	100	1,9	22	27
Agua de desecho urbano	92	56 - 5000	200	1,1	60	28

^a Concentración de analito cuya señal corresponde a 3 veces la desviación estándar del blanco

^b rango lineal

^c Coeficiente variacional

El "Análisis por Inyección Secuencial" (SIA) también ha sido utilizada para desarrollar métodos automatizados fundamentados en la reacción de Shinn. Oms y col. ⁽³⁰⁾ propusieron un sistema SIA para la determinación de nitritos en aguas de desechos y extractos acuosos de aerosoles atmosféricos, utilizando el sistema de reactivos SULINED. En la Figura 5, se presenta el *manifold* utilizado. Para realizar una medida con esta configuración, se sigue los siguientes pasos:

- Aspiración de 160 μl de agua a través del puerto 6 y colocado en RC1.
- Aspiración de 80 μl de muestra a través del puerto 2 y llevado a RC1
- Aspiración de 160 μl de NaOH 0.5M por el puerto 1 y transportado a RC1.
- Inyección del contenido de RC1 en el serpentín RC2, el cual se encuentra en un baño a 40°C.
- Aspiración de 160 μl del reactivo sulfanilamida+NED+HC1 en RC1 por el puerto 3.
- Aspiración de 400 μl de la solución que se encuentra en RC2 a RC1 por el puerto 4.
- Aspiración de 160 μl del reactivo sulfanilamida+NED+HC1 en RC1 por el puerto 3.
- inyección al detector del contenido en RC1 usando agua como solución portadora, a través del puerto 5.
- Medida de la absorbancia a 540 nm.

El intervalo lineal fue 0-18.400 $\mu\text{g NO}_2 \text{ l}^{-1}$, con un límite de detección de 70 $\mu\text{g NO}_2 \text{ l}^{-1}$ y un CV de 1,5 %. Sobre la base de esta configuración, mas tarde, éstos autores ⁽³¹⁾ describieron un sistema de SIA que permite la determinación de nitritos en una configuración de "sandwich". Esta configuración, consiste en la introducción de la muestra entre dos zonas del reactivo de Griess. El nitrito es determinado en un extremo de la zona de muestra inyectada mediante la formación del azocompuesto y detección espectrofotométrica. El método fue aplicado al análisis de nitritos en aguas de mar corrientes y minerales, con un intervalo dinámico de 23-1840 $\mu\text{g NO}_2^- \text{ l}^{-1}$.

Con el objeto de adaptar estos métodos al análisis de trazas (ultratrazas), algunos investigadores han incorporado sistemas de preconcentración en los montajes experimentales. Manuel Miró y col. ⁽³²⁾, plantearon un método para la determinación de nitritos en aguas naturales, usando una extracción en fase sólida en línea con SIA basado en la retención del azocompuesto resultante de la reacción de Griss-Ilosvay sobre una fase estacionaria de sílica gel químicamente modificada (C₁₈), por adsorción en fase reversa. El azocompuesto, es eficientemente eluido con una mezcla de metanol-agua (80:20, v/v) y detectado a 540 nm. El límite de detección reportado fue de 0,32 $\mu\text{g NO}_2\text{-l}^{-1}$ para 10 ml de muestra. Aseguran que el sistema de preconcentración propuesto tiene las ventajas que ofrecen los sistemas SIA entre los cuales destaca; versatilidad, se reduce el consumo de muestra y reactivos y permite la automatización del análisis. Sin embargo, el método propuesto presenta dos inconveniente importantes: se requiere un volumen mínimo de muestra a preconcentrar (10 ml) -si se requiere sensibilidad- y presenta una baja frecuencia de muestreo. Esto se debe a que se usan velocidades de flujo bajas, condición necesaria para lograr una buena extracción. En la Tabla 4, se resumen las características más importantes de este y otros métodos, usando la técnica SIA.

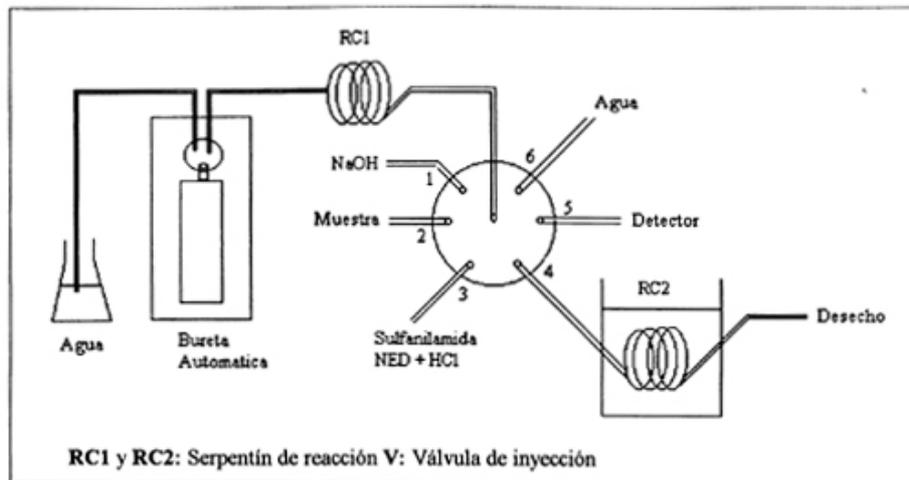


Figura 5 Representación esquemática del acoplamiento de análisis por inyección secuencial (SIA) con detección espectrofotométrica desarrollado para la determinación de nitritos utilizando la reacción de Shinn (SUL/NED) ³⁰.

Tabla 4 Características analíticas de métodos de análisis por inyección secuencial con detección espectrofotométrica basados en la reacción de Shinn.

Muestra	Intervalo Dinámico ($\mu\text{g NO}_2 \text{ L}^{-1}$)	Límite de detección ($\mu\text{g NO}_2 \text{ L}^{-1}$) ^b	C _v (%)	Volumen de muestra (μl)	Frecuencia de análisis (h^{-1})	Ref.
Agua de desechos extractos atmosféricos	0 - 18400 ^a	70	1,5	80	-	30
Aguas minerales, corrientes	23 - 1840	100	<2	1800	10	31
Aguas de lluvia, mar, lagos y corrientes	13,4 - 160	5,9	4	1 ml	15	32 ^c
	0,83 - 20	0,32	2,8	10 ml	3	

^a Intervalo lineal ^b Concentración de analito cuya señal corresponde a 3 veces la desviación estándar del blanco

^c Sistema de preconcentración en línea. Para 1 ml de muestra el factor de preconcentración fue 17 y para 10 ml 170.

2.2.4.2 Métodos basados en el sistema de reactivos 3-nitroanilina/dihidrocloruro de N-(1-naftil) etilendiamina

La 3-nitroanilina es otra de las aminas aromáticas primarias que ha sido utilizada con éxito en la reacción genérica de Griess. La 3-nitroanilina (3-NA), presenta un espectro de absorción similar al de la SUL, pero su máximo se ubica en 256 nm. De igual forma, el azocompuesto formado muestra un comportamiento de absorción similar al del sistema SUL/NED pero con el máximo de absorción en 538 nm.

En 1991, Rathore y Tiwari ⁽³³⁾ idearon un procedimiento manual para la determinación de nitritos en aguas contaminadas utilizando la 3-nitroanilina como especie nitrosable y el NED para el acoplamiento. La reacción conduce a la formación de un azocompuesto color púrpura, el cual presenta un máximo de absorbancia en 535 nm. Se estudió el efecto de ciertos parámetros como: la acidez de la reacción de diasotización, concentración de 3-nitroanilina, concentración del NED y temperatura. El método fue aplicado al análisis de nitritos en aguas de río. Los autores reportan un intervalo dinámico de 10 a 800 $\mu\text{g NO}_2 \text{ l}^{-1}$ y una desviación estándar relativa de 0,59 %. También destacan, que en el método propuesto la tolerancia al Cu(II) es superior que la que presentan las metodologías que utilizan la reacción de Shinn.

En 1996 Ahmed M. J. y col ⁽³⁴⁾, adaptaron el sistema 3-NA/NED en una configuración FIA para determinar nitritos en muestras alimenticias, aguas, suelos y bebidas. En la Figura 6, se ilustra el *manifold* experimental utilizado. Los estándares y las muestras fueron introducidos por el sistema a través de una válvula (V), en una corriente de la solución portadora (NH_4Cl) propulsada por una bomba peristáltica (P). En el punto S, la muestra es dividida en dos segmentos iguales por una válvula selectora. Uno de estos segmentos se mezcla directamente con los reactivos en medio ácido en el serpentín L_3 , y posteriormente la mezcla resultante fue transportada al espectrofotómetro donde se midió la absorbancia a 535 nm. Este diseño, se prestó posteriormente para ser utilizado con otros propósitos utilizando el segundo segmento. El

método propuesto por estos autores, presentó un intervalo dinámico de 10-2200 $\mu\text{g NO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$, con un límite de detección de 1 $\mu\text{g NO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$ y un coeficiente variacional que osciló entre 0,1 y 2 %. La frecuencia de análisis fue de 30 muestras h^{-1} y la estabilidad reportada para el azocompuesto de 24 horas. En la Tabla 5 se contrastan las características analíticas reportadas en estos trabajos.

2.2.4.3 Métodos basados en el sistema de reactivos 4-NA/NED o 1-Naftol

A diferencia de las especies nitrosables mencionadas anteriormente, la 4-nitroanilina presenta una banda adicional, ubicada en la región del visible específicamente en 379 nm. El espectro de absorción del azocompuesto formado con el NED es similar a los sistemas anteriores, pero el máximo de absorción se ubica en 545 nm. La sensibilidad que se obtiene con el uso de este sistema es muy baja si se compara con los anteriores.

www.bdigital.ula.ve

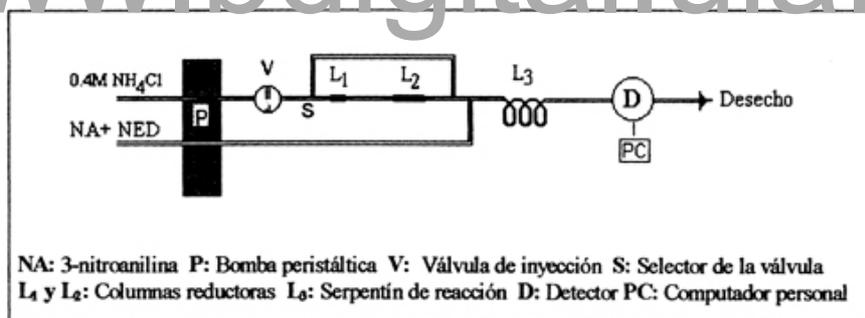


Figura 6 Representación esquemática del montaje utilizado para la determinación de nitritos basado en la reacción de Grises con el sistema de reactivos 3-NA/NED ⁽³⁴⁾.

Tabla 5 Características analíticas de algunos trabajos donde utilizan la 3-nitroaniilina como especie nitrosante.

Muestra	Intervalo dinámico ($\mu\text{g NO}_2 \text{ L}^{-1}$)	Límite de detección ($\mu\text{g NO}_2 \text{ L}^{-1}$) ^a	CV (%)	Volumen de muestra (μl)	Frecuencia de análisis (h^{-1})	Ref .
Agua de ríos contaminados	10 - 800	-	0,5 9	-	-	33
Alimentos, aguas Suelos	10 - 2200	1	0,1 - 2	100	30	34

^a Concentración de analito cuya señal corresponde a 3 veces la desviación estándar del blanco

Esta especie nitrosable también ha sido utilizada con l-naftol ⁽³⁵⁾, azuleno, etc. Sin embargo, los productos o azocompuestos formados a partir de varios reactivos de acoplamiento presentan una estabilidad muy baja ⁽¹²⁾.

Las técnicas de preconcentración han sido utilizadas con el propósito de mejorar la sensibilidad en los procedimientos donde se utiliza la 4-nitroanilina. Albas y col. ⁽³⁾ desarrollaron un método simple y sencillo para determinar nitritos en agua por espectrometría en fase sólida; utilizando el sistema de reactivos 4-nitroanilina/ l-naftol. El fundamento del procedimiento, se basa en la formación del azocompuesto por reacción del NO_2^- con el sistema de reactivos propuesto. A continuación, se introduce una esponja de poliuretano (PUF) cortada en forma de paralelepípedo (10 mm x 35mm x 2 mm) dentro de la solución. Esta se agita por 10 minutos de forma de colectar (retener) en forma cuantitativa el producto de la reacción en el PUF. Finalmente, este se introduce en una celda 1 cm de paso óptico que contiene benceno y se realizan las medidas espectrofotométricas con un blanco del PUF en benceno. Estas medidas, fueron realizadas usando un programa que permite *monitorear* la absorbancia a tres longitudes de onda: 710, 625 y 530 nm respectivamente. La absorbancia corregida (A^*) a 625 nm (λ_2) de la especie coloreada absorbida en el PUF, se utilizó para la cuantificación, ya que se correlaciona lineal mente con la concentración de nitritos. La Absorbancia corregida se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$A^* = (A_{f, \text{azo}} - A_f)\lambda_2 - [(A_{f, \text{azo}} - A_f)\lambda_1 + (A_{f, \text{azo}} - A_f)\lambda_3]$$

Donde $A_{f, \text{azo}}$ y A_f , representan los valores de absorbancia del azocompuesto en el PUF y el blanco del PUF respectivamente. Las lecturas de absorbancia a 710 y 530 nm se realizaron para compensar y eliminar los efectos de atenuación causados por la matriz (PUF) y los reactivos. En este trabajo, se estudió el efecto sobre la respuesta instrumental de ciertos parámetros como: el pH en la primera y segunda etapa de la reacción, concentración de los reactivos, así como los límites de tolerancia de algunos iones interferentes. Los autores reportan un intervalo lineal de 0-140 $\mu\text{g l}^{-1}$ con un límite de detección de $5\mu\text{g l}^{-1}$, un CV que varió entre 0,41 y 0,80 % y un porcentaje de recuperación promedio de 99 %.

2.2.4.4 Otras Combinaciones de reactivos

También se han propuesto otras variantes de la reacción de Griess-Ilosvay, que consisten en el uso de sistemas de reactivos distintos a los que se mencionaron anteriormente. Entre ellos se encuentran: (1) *o*-nitroanilina / ácido 1-aminonaftaleno-2-sulfónico⁽³⁶⁾, (2) ácido *p*-aminofenil mercaptoacético (APA) / NED⁽³⁷⁾, (3) sulfapiridina (SP) / 1-naftol-4-sulfonato de sodio (NS)⁽³⁸⁾, SUL/ (NS)⁽³⁸⁾, sulfatiazola (ST) / NS⁽³⁸⁾ y *p*-aminoacetofenona (PA)/ NED⁽²⁰⁾.

Como forma de mejorar la sensibilidad, en la mayoría de los casos, se incluye una etapa de preconcentración del azocompuesto, bien sea por retención de este en una columna empacada con naftaleno y yoduro de tetradecildimetilbencilamonio⁽³⁸⁾ o mediante la preconcentración del azocompuesto como su ion asociado con dodecil sulfato; sobre un filtro de membrana soluble en un solvente orgánico⁽²¹⁾. En el primer caso, la característica más resaltante de los procedimientos, es que el sólido adsorbente en la columna puede ser usado una sola vez para preconcentrar, ya que éste junto con el azocompuesto, son disueltos con 5 ml de dimetilformamida. En el segundo caso, la característica más resaltante del método es que el reactivo *p*-aminoacetofenona, propuesto como diazotizante, tiene un sustituyente hidrofóbico que puede ser asociado

con un surfactante aniónico que contenga una larga cadena alquílica como el dodecilsulfato de sodio lo que permite que el ion asociado pueda ser colectado. De esta forma, se logra una buena selectividad y sensibilidad.

En la Tabla 6, se resumen las características analíticas de algunos trabajos, donde se usan los sistemas de reactivos mencionados anteriormente.

Tabla 6. Características analíticas de algunos trabajos donde utilizan distintas especies nitrosables y distintos reactivos de acoplamiento.

Muestra	Sistema de reactivos	Intervalo lineal ($\mu\text{g NO}_2 \text{ L}^{-1}$)	Límite de detección ($\mu\text{g NO}_2 \text{ L}^{-1}$)	CV (%)	Factor de preconcentración	Ref.
Aguas y suelos	SUL/NS	6,6 - 131	4,6	0,48	8	38
Aguas y suelos	SP/NS	6,6 - 158	5,25	0,43	5	38
Aguas y suelos	ST/NS	6,6 - 131	3,3	0,51	6	38
Agua de ríos, subterráneas y superficiales	PA/NED	0,32 - 3,2	0,1	2,17	>100	21

2.3 Métodos Cinéticos

Los métodos cinéticos representan una alternativa muy atractiva para la determinación de nitritos a niveles de ultratrazas. Estos procedimientos, se fundamentan en el efecto catalítico del ion NO_2^- - en la oxidación en medio ácido por parte del ion bromato de diversos compuestos orgánicos. Entre los compuestos orgánicos que han sido utilizados destacan: Tionina⁽³⁹⁾, Rojo de Pirogalol⁽⁴⁰⁾, Verde B de Naftol^(41,42), Procloperazina⁽⁴³⁾, Azul Cresil brillante⁽⁴⁴⁾, Piridina-2aldehído 2- piridilhidrazona⁽⁴⁵⁾, Acido Carmínico⁽⁴⁶⁾ y Gallocyanina⁽⁴⁷⁾.

El criterio de cuantificación, se basa en la disminución de la absorbancia del compuesto orgánico, que se relaciona directamente con la concentración del ión nitrito y con el tiempo de medida. La Figura 7, ilustra con claridad estos comportamientos. En la Figura 7(1), se presenta la variación en el espectro de

absorción de la tionina con la concentración de nitritos cuando se mantiene constante el tiempo de medida. Por su parte, la Figura 7(2); muestra la variación del espectro de absorción del rojo de pirogallol con el tiempo, en una experiencia en la que se mantiene constante la concentración de nitritos. En éstos sistemas, la sensibilidad se relaciona con el tiempo de medida. A mayores tiempos, mejor sensibilidad (ver Figura 7b), pero la frecuencia de análisis disminuye. Por ello, la condición que se adopta es un compromiso que está determinado por la concentración del analito en la muestra de interés.

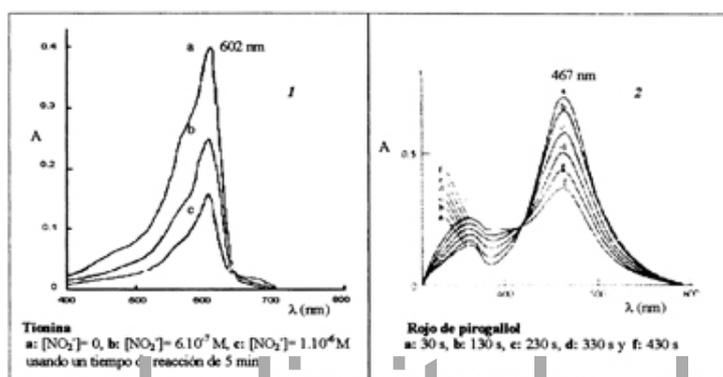


Figura 7. Espectros de absorción de la tionina (1) y el rojo pirogallol (2) (1): Variación en la absorbancia con la concentración del ion nitrito y (2): Cambios de absorbancia con el tiempo, para una concentración fija de 100 µg NO₂⁻ L⁻¹.

El análisis por inyección en flujo también ha sido incorporado con éxito en estos sistemas, con el objeto de automatizar la metodología. Zhang y col. ⁽⁴¹⁾, desarrollaron un sistema FIA con detección espectrofotométrica para la determinación de NO₂ en aguas naturales vía oxidación del verde naftol por parte del bromato de potasio. El *manifold* utilizado se presenta en la Figura 8. En este diseño, la muestra (S) se introduce mediante un canal propulsado por una bomba peristáltica (P₁) a la válvula de inyección y posteriormente a una corriente portadora (C). A continuación, el segmento inyectado se mezcla con una corriente de una solución de bromato de potasio (R₁). Luego, con una solución de Verde de Naftol (R₂) en el serpentín de reacción (SR), el cual se encuentra sumergido en un baño de agua con temperatura controlada (T). Finalmente, la mezcla resultante se transporta a la celda de flujo del

espectrofotómetro de absorción, en donde se realiza la medida espectrofotométrica a 722 nm.

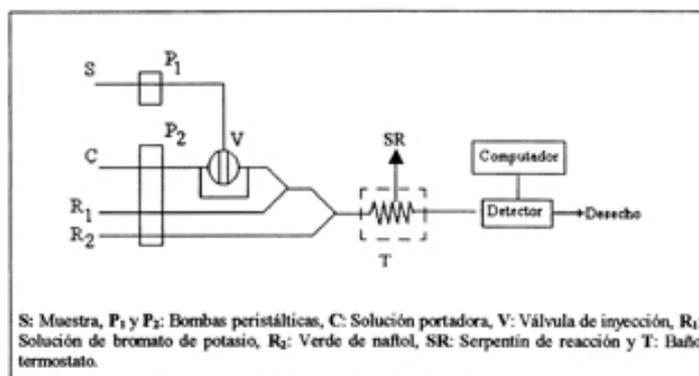


Figura 8. Representación esquemática del sistema acoplado de análisis por inyección en flujo con detección espectrofotométrica, para la determinación de nitritos usando métodos cinéticos.

En la Tabla 7, se resumen las características más importantes de algunos métodos cinéticos descritos para la determinación de nitrito.

Tabla 7 Características analíticas de los procedimientos cinéticos

Muestra	Especie orgánica	Intervalo Dinámico ($\mu\text{g NO}_2^- \text{L}^{-1}$)	Límite de Detección ($\mu\text{g NO}_2^- \text{L}^{-1}$) ^a	CV (%)	Tiempo de reacción	Ref.
Aguas naturales	Tionina	0,32 - 55,2	0,09	2,6	5min	39
Aguas naturales	Rojo Pirogalol	3 - 1000	1	1,8	3min	40
Aguas naturales	Ácido Carminico	0,2 - 14	0,04	1,7	3 min	46
Métodos Cinéticos por FIA						
Muestra	Especie orgánica	Intervalo Dinámico ($\mu\text{g NO}_2^- \text{L}^{-1}$)	Límite de Detección ($\mu\text{g NO}_2^- \text{L}^{-1}$) ^a	CV (%)	Frecuencia de análisis (h^{-1})	Ref.
Aguas naturales	Verde de B Naftol	2 - 200	0,5	2	30	41
Aguas naturales	Verde de B Nnaftol	2 - 200	0,5	2	50	42
Agua y productos alimenticios	Gallocyanina	10 - 2500	1	1,7	20	47

^a Concentración de analito cuya señal corresponde a 3 veces la desviación estándar del blanco

2.4 Métodos basados en el uso de nuevos reactivos

Otra alternativa válida para el análisis de nitritos, se fundamenta en la reacción del anión con ciertos compuestos orgánicos en medio ácido. Los trabajos que se describen en esta sección, pueden dividirse en dos bloques: El primer bloque incluye aquellos trabajos en donde la absorbancia del compuesto orgánico disminuye con la concentración del ion. El segundo grupo, se refiere a propuestas en donde se genera un nuevo compuesto, cuya absorbancia se incrementa con la concentración de los nitritos.

En el primer grupo, los reactivos que han sido utilizados son: 5,10,15,20-tetrakis(4-aminofenil)porfina ⁽⁴⁸⁾, complejo azul de fosfomolibdeno ⁽⁴⁹⁾, etc. En el segundo, los reactivos que reaccionan con el NO_2^- son: 4-iodo-N,N-dimetilanilina ⁽⁵⁰⁾ 3,6-diamino acridine ⁽⁵¹⁾, etc.

Kawakami y Igarashi en 1996 ⁽⁴⁸⁾, desarrollaron un método para la determinación de nitritos en aguas naturales, usando el reactivo 5,10,15,20-tetrakis(4-aminofenil)porfina (TAPP). Este compuesto presenta una banda muy intensa en 434 nm a un pH por debajo de 2, como se observa en la Figura 9. La reacción con nitrito en solución ácida, produce un ligero desplazamiento a longitudes de onda mas largas y la absorbancia disminuye de una manera significativa. El criterio de evaluación utilizado es la disminución de la absorbancia de esa banda, que se correlaciona directamente con la concentración de nitritos en cierto intervalo de concentración. Pocas sustancias interfieren ya que el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la reacción es una diasotización. El tiempo requerido para completar la reacción fue de 30 minutos a 30°C y a un pH de 1. La reacción depende del pH y de la temperatura. Utilizando una celda con 1 cm de paso óptico, el límite de detección reportado por este procedimiento fue de 0,18 $\mu\text{g NO}_2^- \text{ L}^{-1}$ con una desviación estándar relativa de 1% para 10 determinaciones de una solución de 9 $\mu\text{g NO}_2^- \text{ L}^{-1}$.

Nidal A. y col. en 1999 ⁽⁴⁹⁾, publicaron un desarrollo metodológico que se basa

en la oxidación del azul de fosfomolibdeno por parte del ion nitrito. En este sistema, se tiene que la disminución de la absorbancia absoluta a 814 nm (azul), es directamente proporcional a la concentración de nitritos. En este trabajo, se estudiaron parámetros como: la acidez, la estabilidad del complejo, el tiempo de reacción, la temperatura, la concentración de los reactivos, y los límites de tolerancia de iones interferentes. Utilizando celdas de 1 cm de paso óptico, los autores reportan un intervalo dinámico de 500 a 2000 $\mu\text{g NO}_2\text{-L}^{-1}$ con una desviación estándar relativa de 2,6 % para 5 medidas y un límite de detección de 200 $\mu\text{g NO}_2\text{-L}^{-1}$. Este procedimiento fue aplicado para determinar nitritos en agua, productos a base de carne y vegetales.

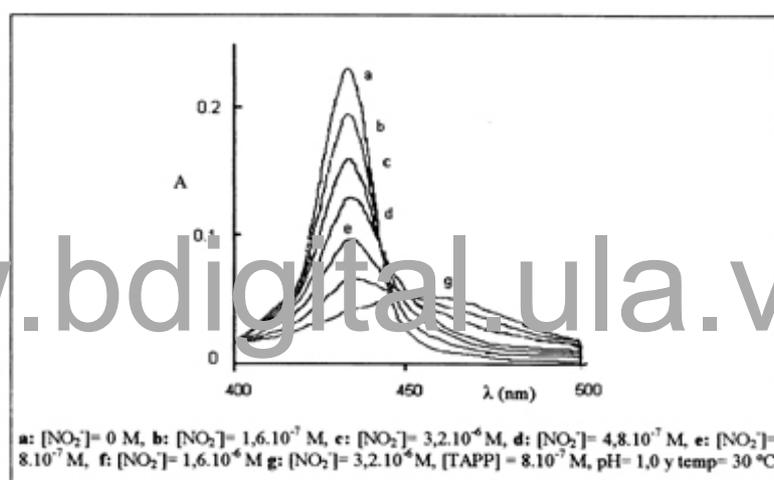


Figura 9 Espectro de absorción del TAPP a distintas concentraciones de nitrito

Nikonorov y Moskvín,⁽⁵⁰⁾ publicaron en 1995 un trabajo sobre la determinación de nitritos en aguas naturales y aguas de desechos, usando 4-iodo-N, N-dimetilanilina (IDAN). En el espectro de absorción de este compuesto se observó la transparencia del mismo a longitudes de onda superiores a los 300nm. La reacción con nitritos en medio ácido produce el compuesto 4-nitroso-N, N-dimetilanilina, el cual presenta un máximo de absorción centrado en 350 nm, como se observa en la Figura 10. Los autores, indican que las características más resaltantes del método propuesto son: la cinética de la reacción, la estabilidad del reactivo y el producto, así como la ausencia de factores interferentes. En cuanto a la velocidad de la reacción, esta se ve

favorecida con el incremento de la acidez y la temperatura. A temperatura ambiente y condiciones de acidez óptimas, la reacción se completó en solo 10 min. En cuanto a la estabilidad del reactivo aseguran que las soluciones son estables en HC1 1M por 3 meses y la estabilidad del producto fue calculada en 8 horas a temperatura ambiente. Con este reactivo, el límite de tolerancia de iones interferentes tales como: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} sulfato, nitratos y fosfatos fue alto (un exceso de 10^4 veces). El método propuesto tolera la presencia del ión cúprico hasta un nivel de 0.1M y presenta un intervalo lineal de 0 a 3200 $\mu\text{g NO}_2 \text{ L}^{-1}$ con un límite de detección de $6,6 \mu\text{g NO}_2^{-1} \text{ L}^{-1}$, utilizando una celda de 5 cm de paso óptico.

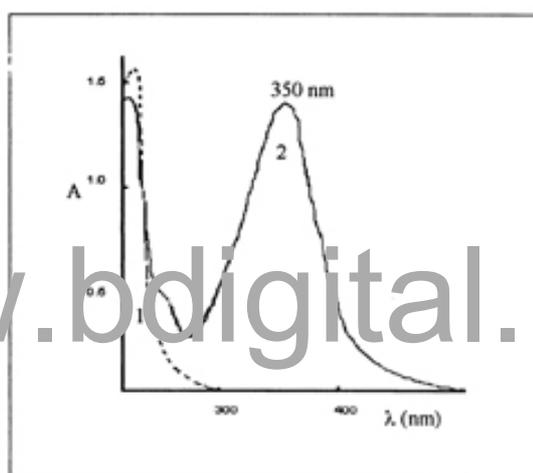


Figura 10. Espectro de absorción del IDAN (1) y del producto de la reacción con el ion nitrito (2) (IDAN, $2 \times 10^{-4} \text{ M}$; nitritos $1000 \mu\text{g L}^{-1}$).

Guerrero G. y col. ⁽⁵¹⁾, desarrollaron un método de inyección en flujo continuo con detección espectrofotométrica basada en la reacción de la 3,6-diamino acridina (sulfato de proflavin) con el ion nitrito en medio ácido. El sulfato de proflavin en medio ácido, muestra dos bandas localizadas entre 260-265 y 400-450 nm respectivamente (ver Figura 11a). Por su parte, el espectro de absorción del producto de la reacción presenta cuatro bandas definidas, dos de las cuales se encuentran solapadas con las correspondientes del reactivo. Sin embargo, las otras dos bandas, situadas en 328 y 545 nm son de interés analítico (ver Figura 11b). La solución de proflavin (protegida de la luz) es

estable por largos periodos de tiempo incluso con fluctuaciones de temperatura. Sin embargo, la estabilidad del producto es de dos horas, siempre y cuando la temperatura se mantenga por debajo de los 40°C. En este trabajo, los autores presentan la optimización correspondiente a todos los parámetros FIA asociados al sistema, así como aquellos correspondientes a la reacción química (concentración temperatura, pH etc). La medida espectrofotométrica, se lleva a cabo a 328 nm, utilizando una celda de flujo con un volumen muerto de 18µl y paso óptico de 1 cm. El intervalo dinámico reportado, fue desde 60 hasta 4000 µg NO₂⁻ l⁻¹, utilizando un volumen de inyección de 457 µl.

Este procedimiento se caracteriza por su rapidez, simplicidad en el diseño, es altamente competitivo con otros desarrollos en FIA en cuanto a su sensibilidad y selectividad y sobre todo el reactivo utilizado no es cancerígeno.

En la Tabla 8, se presentan las características más importantes de estos métodos.

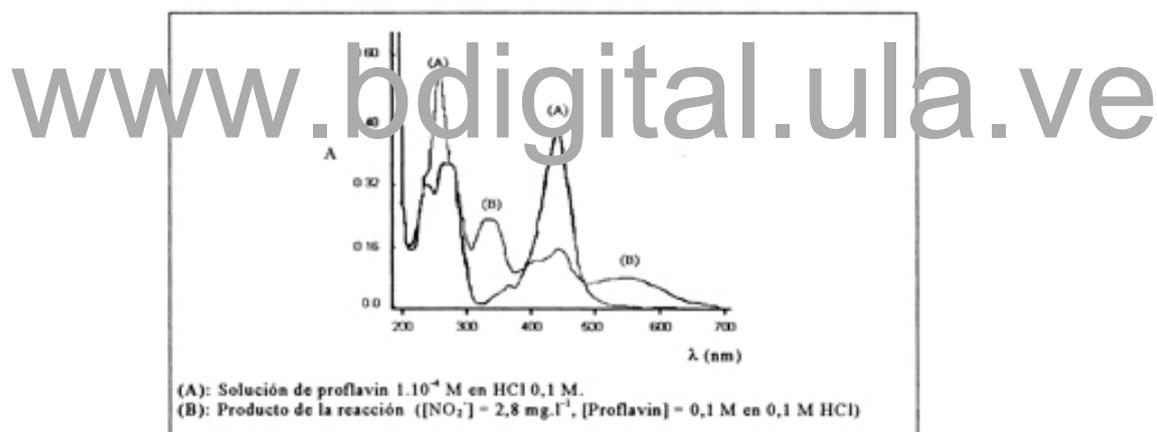


Figura 11 Espectros de absorción de reactivos y productos de reacción en el sistema Nitrito-Proflavin.

Tabla 8 Características analíticas de procedimientos cinéticos.

Muestra	Especie orgánica	Intervalo dinámico ($\mu\text{g NO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$)	Límite de detección ($\mu\text{g NO}_2 \cdot \text{l}^{-1}$)	CV (%)	Ref.
Aguas naturales aguas de desechos	A	0.32-55.2	2	2.6	44*
Aguas	B	60-4000	-	0.5	45
Aguas naturales	C	0-18.4 ^a	0.18	1	46
Aguas productos alimenticios y vegetales	D	200-3600	200	2.4	47

* Concentración de analito cuya señal corresponde a 3 veces la desviación estándar del blanco

^a intervalo lineal

A: 4-iodo-N,N-dimetilanilina B: 3,6-diamino acridine C: 5,10,15,20-tetrakis(4-aminofenil)porfina (TAPP).

D: complejo azul de (osfamidibleno

* celda de 5 cm de paso óptico

3 CONCLUSIONES

En la literatura especializada se encuentran una gran variedad de métodos de análisis para el ion nitrito en diversas matrices, que utilizan a la Espectroscopia de Absorción Molecular en el Ultravioleta-Visible como forma de detección.

La formación de azocompuestos constituyen las reacciones más utilizadas en los diseños metodológicos que permiten la determinación de este ion en diversas matrices; bien sea usando métodos manuales o diseños automatizados (FIA o SIA).

Diversas técnicas de preconcentración han sido adaptadas a las metodologías descritas, con el fin de mejorar las prestaciones analíticas en cuanto a sensibilidad y límite de detección. Esto ha permitido extender la aplicación de estos métodos de análisis a ultratrazas, pero con un costo significativo en lo referente al tiempo de análisis.

Los métodos cinéticos y los métodos desarrollados usando nuevos reactivos, constituyen una alternativa válida para la determinación de nitritos en aguas y

productos alimenticios. Se caracterizan por su sencillez, ya que la reacción se desarrolla en una sola etapa, y son métodos muy sensibles. Además, en la mayoría de los casos la tolerancia que presentan a los interferentes es superior a los reportados cuando se trabaja con la reacción de Griess.

La elección de algunos de estos procedimientos como métodos de rutina están determinados por muchos factores tales como: costos, el tiempo de análisis, el uso de reactivos altamente peligrosos, la sensibilidad requerida, la selectividad, la exactitud y la disponibilidad de los reactivos, entre otros.

Los métodos de análisis de nitritos basados en procesos luminiscentes serán tratados en un próximo tópico.

www.bdigital.ula.ve

4 BIBLIOGRAFÍA

1. http://www.who.int/water_sanitation_health/GDWQ/Chemicals/nitrate_nitritesum.htm
2. Brown T. L., LeMay H. E., Bursten B. E. Química. La Ciencia Central. Quinta edición Prentice-Hall Hispanoamericana, SA 905. 1991
3. Tsezou A., Kitsiou-Tzeli S., Galla A., Gourgiotis D., Papageorgiou J., Mitrou S., Molibdas P. and Sinaniotis C. High nitrate content in drinking water. Cytogenetic effects in exposed children. Archives of Environmental Health. 51,458-461, 1996.
4. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Criterios de salud ambiental 5 Nitratos y Nitritos de N-nitroso. Publicación Científica 394, México, D F, 1980.
5. Gaceta oficial de la república de Venezuela N° 34892 del 29 de Enero de 1992.
6. Guías para la calidad del agua potable. Publicación Científica N° 181, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, 522 Twenty-Third Street, N.W. Washington, D.C. 20037. E.U.A 1,56-84, 1985'.
7. <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/caliagua/caliagua.html>. Normas internacionales para la calidad del agua de bebida. valores institucionales aportados por la OMS. CEPIS. OPS Y CEE.
8. Harrington W. G., Chang S. K. and Kozeniauskas R. Determination of nitrite ion using pulse polarography. Analytica. Chimica Acta. 49,2272-2275, 1977.
9. Vincenzo Di Matteo, Ennio Esposito. Methods for the determination of nitrite by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Journal of Chromatography A. 789,213-219, 1997.
10. Blanco D, Martinez L. Mangas J.J., Dapena E. and Gutierrez D. Determination of nitrate and nitrite in tap water and vegetables by high performance liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography.

www.bdigital.ula.ve

- 18, 2445-2456, 1995.
11. Archana Jain, Roger M. Smith, Karishna K. Verma. Gas chromatographic determination of nitrite in water by pre-column formation of 2-phenylphenol with flame ionization detection. Journal of Chromatography. A. 760,319-325, 1997.
 12. Fox J.B. The determination of nitrite: A Critical Review. CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry. 15, 283-313, 1985
 13. Motomizu S., Mikaza H. and Toei K. Fluorimetric Determination of nitrite in natural waters with 3-aminonaphthalene-1.5-disulphonic acids by flow-injection analysis. Talanta. 33, 729-732, 1986.
 14. Dunham A. J., Barkley R. M. and Sievers R. E. Aqueous nitrite ion determination by selective reduction and gas-phase nitric oxide chemiluminescence. Analytical Chemistry. 67,220-224, 1995.
 15. Sanchez Argenis. Evaluación del contenido de nitrato y nitrito en aguas por inyección en flujo con espectroscopia de absorción molecular en el uv-visible. tesis de licenciatura. Universidad de Los Andes- Facultad de Ciencias. 1999.
 16. Jay B. Fox, Jr. Kinetics and Mechanisms of the Griess Reaction. Analytical Chemistry. 51, 1493-1502, 1979.
 17. Morrison R. T. Boyd R. N. QUÍMICA ORGÁNICA. Quinta Edición. Pearson Educación. New York. 954- 956,964. 1998.
 18. Gregorio C. T. y Marciales L. Análisis de aguas y líquidos residuales y ensayos de laboratorio. Editorial Innovación Tecnológica. Facultad de Ingeniería- Universidad Central de Venezuela. 1998
 19. Pavel Mikuska, Zbynek Vecera, Zbynek Zdráhal. Flow-injection chemiluminescence determination of ultra low concentration of nitrite in water. Analytica Chimica Acta. 316,261-268, 1995.
 20. Kiyoshi Horita, Genfeng Wang, Mastada Satake. Spectrophotometric determination on nitrate and nitrite in soil and water samples with a diazotizable aromatic amine and coupling agent using column preconcentration on naphthalene supported with ion-pair of tetradecyldimethylbenzylammonium and iodide. Analytica Chimica Acta.

www.bdigital.ula.ve

- 350, 295-303, 1997.
21. Xuexin Gu, Tianze Zhou, Dayong Qi. Determination of trace nitrite ion in water by spectrophotometric method after preconcentration on an organic solvent-soluble membrane filter. Talanta. 43, 169-175, 1996
 22. Shinn M. B. Colorimetric method for determination of nitrite Ind. Eng: Chem. Anal. Ed. 13, 33, 1941.
 23. AOAC, Method 36.1.21, in: Official Methods of Analysis, 16 th ed., AOAC, ,8-9. 1995
 24. Anderson LeiF. Simultaneous Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow injection analysis. Analytica Chimica Acta. 110, 123-128, 1979.
 25. Giné M.F., Bergamin H.F. Zagatto E.A. and Reis B.F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flow injection analysis. Analytica Chimica Acta..114, 191-197, 1980.
 26. Jacobus F. Van Staden. Automated simultaneous determination of nitrate and nitrite by pre-valve reduction of nitrate in flow-injection system. Analytica Chimica Acta 138, 403-408, 1987
 27. Anatol Kojlo, Ewa Gorodkiewicz. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in a flow-injection system. Analytica Chimica Acta. 302, 283-287, 1995
 28. Gabriel D., Baeza J., M. Valero F. and Lafuente J. A. Novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban waste water treatment plant based on n/d criteria. Analytica Chimica Acta. 359, 173-183, 1998.
 29. Ruzicka J. Marshall G.D. Sequential injection: a new concept for chemical sensors. process analysis and laboratory assays. Analytica Chimica Acta .. 237, 329-343, 1990.
 30. M.T. Oms, A. Cerdá, V. Cerdá. Sequential injection analysis of nitrites and nitrates. Analytica Chimica Acta. 315, 321-330, 1995.
 31. Cerdá A.M.T. Oms, Forteza R. Cerdá, V. Sequential injection sandwich technique for the simultaneous determination of Nitrate and Nitrite. Analytica Chimica Acta. 371, 63-71, 1998.

32. Miró M., Cladera A., Estela J.M. and Cerdá V. secuential injection spectrophotometric analysis of nitrite in natural waters using an on-line solid-phase extraction and preconcentration method. Analyst. 125, 943-948, 2000.
33. H.P.S. Rathore and S.K. Tiwari. Spectrophotometric determination of nitrite in polluted waters using 3-nitroanilina. Analytica Chimica Acta. 242, 225-228, 1991.
34. Ahmed M.J., Stalikas C.D. Tzouwara-Karayannis S. M. and Karayannis M. I. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow-injection Analysis. Talanta. 43, 1009-1018, 1996.
35. Abbas M. N. and Mostafa G. A. Determination of Traces of Nitrite and Nitrate in Water by Solid Phase Spectrophotometric. Analytica Chimica Acta. 410, 185-192, (2000).
36. Rachana K., Lata C. y Gupta V.K. Extraction-spectrophotometric determination of nitrite using 1-aminonaphthalene-2-sulphonic acid. Analyst. 116, 667-669, 1991.
37. Tandan P.K. and Rathore D.P.S. Spectrophotometric determination of nitrite in water. Analyst. 113, 1073-1076, 1988.
38. Kiyoshi Herita, Genfeng Wang, Mastada Satake. Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in soil and water samples with a diazotizable aromatic amine and coupling agent using column preconcentration on naphthalene supported with ion-pair of tetradecyldimethylammonium and iodide. Analytica Chimica Acta. 350, 295-303, 1997.
39. Jiang M., Jiang F., Duan J, Tang X. and Zhao Z. Spectrophotometric determination of trace nitrite based on catalytic oxidation of thionine by potassium bromate. Analytica Chimica Acta. 234, 403-407, 1990.
40. Ensafi A. and Samimifar M. Kinetic spectrophotometric determination of low levels of nitrite by catalytic reaction between pyrogallol red and bromate. Talanta. 40, 1375-1378, 1993.
41. Zhang Zhi-Qi, Gao Lou-Jun, Zhan Han-Ying and Liu Qian-Guang. Catalytic Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and

- nitrate with a flow injection system. *Analytica Chimica. Acta* 370, 59-63, 1998.
42. Zhang Zhi-Qi, Gao Lou-Jun, Zhan Han-Ying. Flow- injection catalytic spectrophotometric determination of nitrite using the redox reaction between naphthol green b and potassium bromate. *Talanta.* 47, 497-501, 1998.
43. Mohamed A.A, El-shahat M.F., Fukasawa T., Iwatsuki M., Sensitive determination of nitrite using its catalytic effect on the bromate oxidation of prochlorperazine. *Analyst.* 121, 89-92, 1996.
44. Ensafi A.A. and Rezaii B. Kinetic-spectrophotometric determination of nitrite by its catalytic effect on the oxidation of brilliant cresyl blue by bromate. *Microchemical Journal.* 50, 169-177, 1994.
45. Montes R. and Iasema j.j. spectrophotometric reaction-rate method for the determination of nitrite in water with pyridene-2-aldehyde 2-pyridylhydrazone. *Talanta.* 34, 1021-1026, 1987.
46. Manzoori J. L., Mohammad H. S., Haji-Shabani A.M. Spectrophotometric determination of nitrite based on its catalytic effect on the oxidation of carminic acid by bromate. *Talanta.* 46, 1379-1386, 1998.
47. Ensafi A. A., Kazemzadeh A. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection. *Analytica Chimica. Acta.* 382 15-21, 1999.
48. Kawakami T. Igarashi S. Highly sensitive spectrophotometric determination of nitrite ion using 5,10,15,20-tetrakis(4-aminophenyl) porphine for application to natural waters. *Analytica Chimica. Acta.* 333, 175-180, 1996
49. Nidal A. Z., Maher A. A., Abdullah F.E. Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate using phosphomolybdenum blue complex. *Talanta.* 50, 819-826, 1999.
50. Nikonorov V. V. and Moskvina L. N. Spectrophotometric determination of nitrite with 4-iodo-n,n-dimethylaniline. *Analytica Chimica. Acta.* 306, 357-360, 1995.
51. Guerrero S. R., Gomez C. B. and Martinez J. C. Flow-injection analysis-

spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in water samples
by reaction with protlavin. Talanta. 43, 239-246, 1996.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO 3

**REVISIÓN CRÍTICA DE LOS MÉTODOS CINÉTICOS. UNA ALTERNATIVA A
TRACTIVA PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE
NITRITO EN AGUAS A NIVELES DE TRAZA Y ULTRA TRAZA**

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Este capítulo es una revisión de los métodos catalítico cinéticos que se han propuesto en la literatura para la determinación espectrofotométrica de nitrito en aguas a niveles traza y ultratrazo. Estos métodos se basan en el efecto catalítico cinético de este ión en la oxidación de diversas moléculas orgánicas, por parte del ión bromato en medio ácido. Estos procedimientos son simples y requieren de una instrumentación sencilla y accesible a muchos laboratorios. El principal objetivo del presente trabajo es hacer una revisión comparativa y crítica de los diversos desarrollos metodológicos propuestos, así como proponer algunas alternativas metodológicas que aún no han sido exploradas.

www.bdigital.ula.ve

1 INTRODUCCIÓN

El nitrito es un intermediario activo en el ciclo del nitrógeno, que se produce por la oxidación incompleta del amonio o por la reducción de los nitratos. Las sales de nitrito se utilizan como preservadores en la industria de los alimentos y como inhibidor de corrosión en las aguas de diversos procesos industriales ^(1,2). El nitrito es uno de los contaminantes comunes que se encuentran en la atmósfera y en las aguas naturales. A manera de ejemplo, el nitrito que se forma durante la biodegradación de los nitratos, del nitrógeno amoniacal y de la materia orgánica nitrogenada, representa un importante indicador de la polución fecal en las aguas naturales ^(3,4).

La determinación de nitrito es de suma importancia debido a su impacto perjudicial en la salud humana. Su toxicidad se debe principalmente a su interacción con los pigmentos de la sangre, para producir metahemoglobinemia. La reacción del ion con aminas secundarias y terciarias, así como con amidas produce compuestos N-nitroso, algunos de los cuales son conocidos por sus efectos cancerígenos, teratogénicos y mutagénicos ^(3,5). Por estas razones, la determinación de nitrito en matrices biológicas, medioambientales, agrícolas, geoquímicas y ecológicas adquiere una importancia significativa. Por ello, en la actualidad existe una necesidad creciente de nuevos desarrollos metodológicos simples y sensibles para la determinación de trazas y ultratrazas de nitritos en muestras naturales y artificiales.

Existen numerosos desarrollos metodológicos que utilizan técnicas como: quimioluminiscencia, voltametría, amperometría, polarografía, cromatografía iónica, fluorescencia molecular, etc., para la determinación de nitrito en una variedad de matrices; muchos de los cuales han sido considerados en algunos interesantes y completos reviews ^(6,7). Todos estos métodos presentan ventajas y desventajas. Sin embargo, muchos de ellos involucran tiempos de análisis largos y/o el uso de instrumentación costosa, por lo que no son adecuados o no son accesibles para llevar a cabo análisis rutinarios en muchos laboratorios.

En la actualidad, la gran mayoría de los métodos utilizados para la determinación de nitrito son espectrofotométricos ⁽⁶⁻⁸⁾, y se fundamentan en la reacción de Ilosvay-Griess ⁽⁹⁾. Esta reacción involucra la diasotización en medio ácido de una amina aromática primaria con el anión, para generar una sal de diazonio; seguida por una reacción de acoplamiento con una amina aromática o un fenol. En esta etapa se produce un compuesto "azo", que generalmente presenta una intensa absorción en el visible. Entre las principales desventajas que se atribuyen a estos métodos destacan: i) la obtención de límites de detección relativamente altos ($LD > 20 \mu\text{g l}^{-1}$) el uso de reactivos tóxicos, iii) el tiempo de la reacción de acoplamiento suele ser alto y iv) están sujetos a serios efectos interferentes ^(3,10). En lo concerniente a la sensibilidad, hay que destacar que existen desarrollos metodológicos recientes en los que se mejora en forma significativa la sensibilidad y por ende el límite de detección, incorporando al montaje experimental sistemas de concentración ⁽¹¹⁻¹³⁾. Sin embargo, esta variante experimental conlleva a un aumento significativo en el tiempo de análisis.

En la búsqueda de sensibilidad, los métodos cinéticos catalíticos representan una de las alternativas más atractivas para la determinación de nitrito a niveles traza y ultratrazas ^(8,14-16). En general estos métodos son muy simples y requieren de una instrumentación muy sencilla. Utsumi y colaboradores ⁽¹⁷⁾ desarrollaron un método espectrofotométrico basado en el efecto cinético del ion nitrito en la decoloración del complejo Fe (III)-tiocianato en HNO_3 diluido, en presencia de yoduros. El intervalo dinámico de trabajo fue de 0,0005 a $10 \mu\text{g ml}^{-1}$, pero no se reportan valores concernientes a la precisión del método. Koupparis y colaboradores ⁽¹⁸⁾ desarrollaron un método para la determinación de nitritos basado en su efecto cinético sobre la reacción de diazotización de la sulfanilamida y acoplamiento con el N-(1-naphtil)etilendiamino dicloruro. Sin embargo, el límite de detección reportado es poco atractivo ($0,0125 \mu\text{g ml}^{-1} \text{NO}_2$) Concepción Sánchez-Pedreño y colaboradores ⁽¹⁹⁾ desarrollaron un método cinético espectrofotométrico para la determinación de nitritos a niveles traza que se fundamenta en el efecto inhibitorio que ejercen en la reacción entre

el I_2 y el ácido etilendiaminotetracético, con un intervalo dinámico de trabajo de 3 a 100 $ng\ ml^{-1}$. B. Liang y colaboradores ⁽²⁰⁾ desarrollaron un método cinético espectrofotométrico para la determinación de nitrito basado en el efecto catalítico de este ion en la reacción redox entre la clorpromazina y el peróxido de hidrógeno, con un intervalo dinámico de 10-1.500 $ng\ NO_2^-\ ml^{-1}$, y un límite de detección de 3 $ng\ ml^{-1}$. Por su parte Jiang Zhi-Liang y colaboradores ⁽²¹⁾ reportaron un método para la determinación de nitritos basado en el fuerte efecto catalítico que presenta el anión en la oxidación del naranja de metilo por parte del bromato en medio de ácido sulfurico diluido, con un intervalo dinámico de trabajo de 0,32 a 55 $ng\ ml^{-1}$, y un límite de detección de 1 $ng\ ml^{-1}$. El seguimiento de la reacción se realizó por voltametría de barrido lineal.

En los últimos años se han publicado una serie de métodos espectrofotométricos para la determinación de nitritos en aguas, que se basan en el efecto catalítico cinético de los nitritos en la oxidación de diversas moléculas por parte del ión bromato en medio ácido ^(2,8). El principal objetivo de presente trabajo es hacer una revisión y una evaluación crítica de los diversos desarrollos metodológicos propuestos, así como discutir sobre algunas alternativas metodológicas que no han sido aún exploradas.

2 FUNDAMENTOS DE LOS MÉTODOS CINÉTICOS

El principio fundamental de estos métodos se basa en la reacción de oxidación de ciertas moléculas orgánicas por parte del bromato en medio ácido, la cual está catalizada por la presencia del ión nitrito en la solución ⁽⁸⁾. Evidentemente, la molécula orgánica en cuestión debe presentar absorción en la región del Uv-visible (generalmente en el visible), mientras que la forma oxidada suele ser transparente en esa región espectral. Sin embargo, también se han reportado sistemas en donde el producto de la oxidación es el que presenta absorción en el visible ⁽²²⁾. Entre las especies orgánicas que han sido empleadas se encuentran: piridina-2-aldehído-2-piridilhidrazona ⁽¹⁾, ácido carmínico ⁽²⁾, prochlorperazina ⁽²²⁾, azul cresil brillante ⁽²³⁾, clorofosfonazo PN ⁽²⁴⁾, azul de nilo ⁽²⁵⁾, verde B de naftol ^(26,27), tionina ^(28,29), rojo de pyrogallol ^(3,10), gallocianina ⁽⁴⁾,

etc.

En estos procedimientos generalmente se observa que la depresión en la absorción de la especie orgánica, producto de la oxidación de la molécula, es proporcional a la concentración de nitritos y al tiempo de reacción. La concentración de la especie catalítica se puede determinar a través de diversos métodos entre los que destacan los métodos de: concentración constante, velocidad constante, velocidad inicial, y tiempo constante ^(14,15,16,28,30), donde el método de la velocidad inicial y especialmente el de tiempo constante son los más utilizados. El mayor inconveniente que presentan los métodos cinéticos, desde el punto de vista experimental, radica en que las reacciones suelen ser lentas, lo que se traduce en tiempos de análisis elevados. Sin embargo, se han desarrollado algunos procedimientos automatizados sobre la base de la oxidación del verde B de naftol ^(26,27), la tionina ⁽²⁶⁾, el rojo de pirogallo ⁽³⁾ y la gallocianina ⁽⁴⁾, en los cuales se mejora considerablemente la frecuencia de análisis.

En los procedimientos manuales (*batch*), inicialmente se introducen al cuartzo de las muestras (estándares) con un contenido conocido de nitritos en una serie de matraces calibrados. A continuación se añaden en forma secuencial volúmenes conocidos de las soluciones de los diversos reactivos involucrados en la reacción (cromóforo, ácido y por último bromato de potasio). Las soluciones se llevan a un volumen fijo y la reacción de oxidación se deja transcurrir durante un tiempo pre-establecido. En la modalidad de la velocidad inicial, se registra la absorbancia de cada solución como una función del tiempo. A partir de la representación gráfica: Absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción ($A_{\lambda_{max}}$) contra tiempo se calcula la pendiente de la curva ($\Delta A/\Delta t$) en la zona inicial de la misma (la velocidad inicial). A partir de esa información se construye la curva de calibración del sistema graficando la velocidad de reacción contra la concentración de nitrito $[\text{NO}_2^-]$. Las velocidades obtenidas para las muestras se interpolan en la curva de calibración que se obtiene a partir de las soluciones estándar, y de esa forma se determina la concentración de nitritos en las muestras. Por otra parte, en el método de

tiempo constante la reacción de oxidación se detiene a un tiempo pre-seleccionado, añadiendo en forma manual úrea sólida (entre 0,1 y 0,3 g) a todas las soluciones estándar y muestras ^(1,2,10,28). Por lo general, los matraces calibrados se mantienen sumergidos en un baño de agua con una temperatura controlada cercana a los 30°C, con el objeto de acelerar la reacción. Finalmente, las soluciones se introducen en la celda de medida y se adquiere su espectro de absorción. El procedimiento se repite en forma análoga para el blanco, que corresponde a la solución con el cromóforo en ausencia de nitritos, y se evalúan las medidas de absorbancia para las muestras y estándares (A), así como para el blanco (A₀). Por lo general se utiliza la absorbancia en la longitud de onda de máxima absorción. Sin embargo, es recomendable establecer una corrección en base a una línea de base adecuada, para corregir posibles desplazamientos del espectro de absorción con respecto al cero instrumental. La respuesta instrumental que se suele seguir es la relación logarítmica entre A₀ y A ^(1,2,10). Sin embargo, también se ha utilizado como medida instrumental la disminución de la absorbancia en el máximo de absorción ($|\Delta A|_{\max} = A_0 - A$) como se ilustra en la Figura 1 ⁽²³⁾. La calibración del sistema se hace mediante la representación gráfica de log (A₀/A) contra la concentración de nitrito [NO₂⁻] (o $|\Delta A|$ contra [NO₂⁻]).

En este tipo de procedimientos hay dos aspectos que se deben resaltar: i) después de la adición de la urea las soluciones se mantienen estables, y su absorción constante por varias horas, y ii) el conteo del tiempo de medida se inicia al finalizar la adición de la solución de bromato.

En condiciones óptimas de trabajo, la sensibilidad de estos métodos se relaciona con el tiempo de medida. A mayores tiempos mejor es la sensibilidad, pero la frecuencia de análisis disminuye. Por ello, la condición que se adopta en última instancia, es un compromiso que está determinado por la concentración del analito en la muestra de interés. Los mayores inconvenientes que presentan estos métodos son: i) los errores asociados a cualquier procedimiento manual, ii) son tediosos y iii) los tiempos de análisis suelen ser muy elevados.

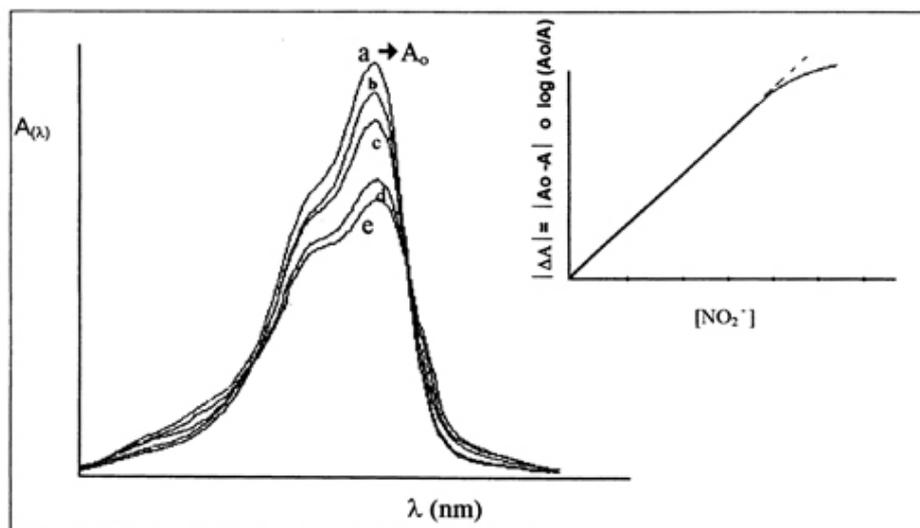


Figura 1 Efecto de la concentración de nitritos en el espectro de absorción del compuesto orgánico. (a) Espectro de referencia (A_0 corresponde a la señal de referencia)- Cromóforo en presencia de bromato, pero en ausencia de nitritos. (b-e) Estándares y nuestras (A corresponde a la absorbancia de la solución, en el máximo de absorción)-Cromóforo en presencia de bromato y en concentraciones crecientes de nitrito.

Por otra parte, los sistemas que han sido automatizados se basan en acoplamientos de análisis por inyección en flujo con detección por espectroscopia de absorción molecular en el UV-visible (AIF-EAM-UVV). En las Figuras 2A y 2B se presentan montajes típicos AIF-EAM-UVV utilizados para la determinación de nitritos mediante métodos cinéticos. Estos sistemas consisten de una bomba peristáltica que propulsa en forma continua a las diversas soluciones de trabajo (solución portadora, ácido, bromato de potasio y el compuesto orgánico) a través de varios canales. La solución resultante, producto de la mezcla en línea de las soluciones mencionadas, fluye en forma continua a través de la celda de flujo (ver Figura 2). Entonces se registra en forma continua la absorbancia de la especie orgánica (en ausencia de nitrito), en su máximo de absorción, como una función del tiempo. De esta forma se establece a partir de la solución de referencia la línea de base (A_a), que en ocasiones puede ser el cero instrumental. La mayor ventaja que ofrece este

diseño es que permite controlar durante todo el análisis el *background* del mismo. En una segunda instancia se introduce en el canal de la solución portadora, generalmente mediante una válvula de inyección, un volumen discreto de la muestra (estándar) que contiene al analito catalizador. Este se mezcla con las soluciones previamente descritas y se produce la reacción de oxidación, ya con la catálisis del ión nitrito. El segmento de la muestra dispersada en el sistema descrito, fluye a través de la celda de flujo en donde se registra la señal como función del tiempo. La señal de la muestra (A) se presenta como una curva gaussiana negativa, en la que el valor absoluto de la absorbancia ($|\Delta A| = |A - A_0|$) es directamente proporcional a la concentración de nitrito, como se ilustra en la Figura 3. En estos sistemas, el tiempo de medida se controla mediante el caudal de los diversos canales, así como por el diámetro interno y la longitud del serpentín de reacción colocado antes de la celda de flujo (ver Figura 2A). La calibración del sistema se hace mediante la representación gráfica $|\Delta A|$ contra $[\text{NO}_2^-]$. En general, en los montajes experimentales se incorpora un largo serpentín de reacción sumergido en un baño de agua cuya temperatura se controla y mantiene mediante el uso de un termóstato, con el fin de acelerar la reacción (ver Figura 2).

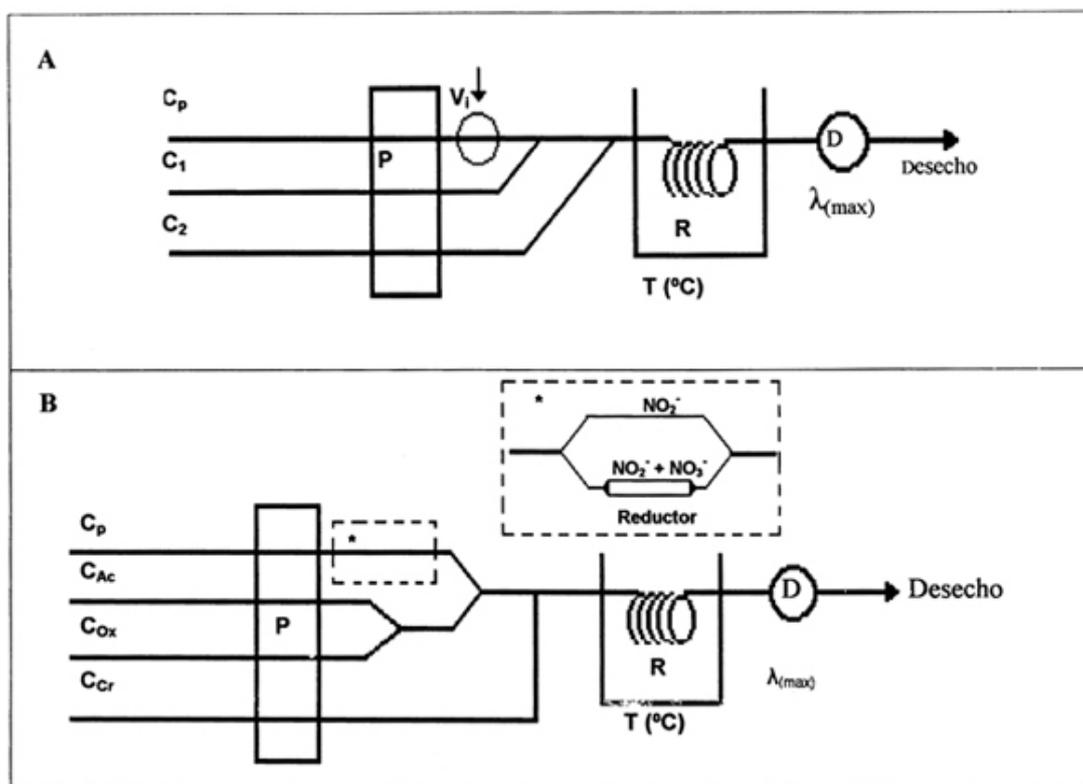


Figura 2. Diagramas esquemáticos de algunos sistemas de flujo con detección espectrofotométrica utilizados en métodos cinéticos catalíticos para la determinación de nitritos. P: bomba peristáltica, C_p : canal de la solución portadora, C_{Ac} : canal de la solución ácida, C_{Ox} : canal de la Solución de bromato de potasio, C_{Cr} : canal de la solución del cromóforo. Los canales C_1 y C_2 pueden propulsar a la solución oxidante ($KBrO_3$) o la del cromóforo. El orden varía con el método desarrollado (ver texto y Tabla 1B), R: serpentín de reacción, B: termóstato, D: detector.

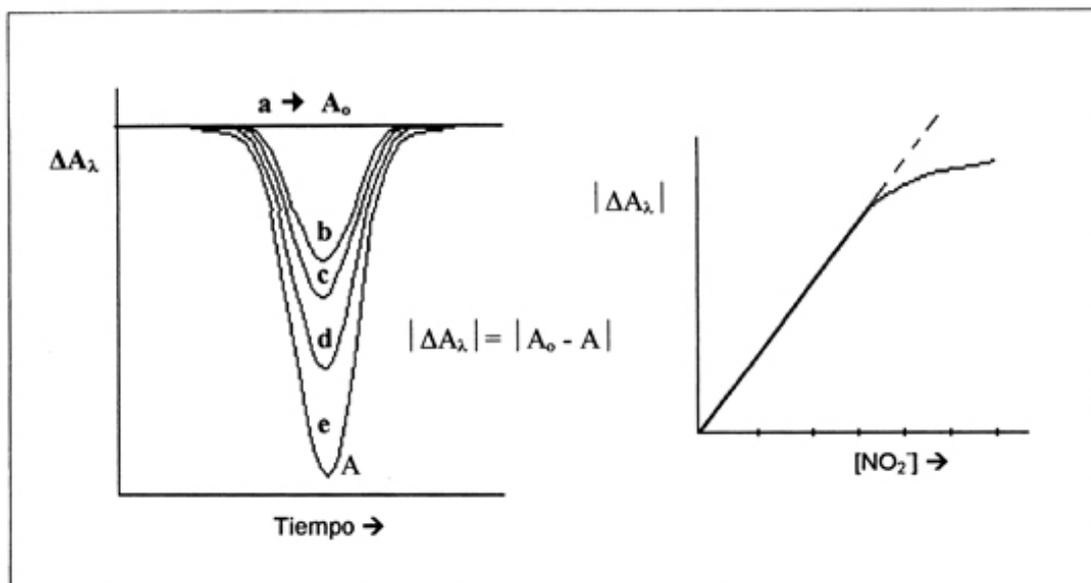


Figura 3 Curva de calibración típica en un sistema de análisis por inyección en flujo con detección espectrofotométrica (AIF-EAM-UVV). (a) Solución de referencia (A_0 corresponde a la señal de la solución de referencia), (b-e) Estándares /Muestras (A corresponde a la absorbancia, a la longitud de onda de trabajo, de soluciones con concentraciones variables y crecientes de NO_2^-)

3 COMPARACIÓN DE LOS DIVERSOS DESARROLLOS METODOLÓGICOS

R. Montes y J.J. Lasema ⁽¹⁾ realizaron un desarrollo metodológico manual basado en el efecto catalítico del ión nitrito en la oxidación de la piridina 2-aldehído 2-pyridylhidrazona (PAPH) por parte del bromato en medio ácido. La optimización del sistema la realizaron tanto en medio de $HClO_4$ como en HCl ; y utilizaron el método de las velocidades iniciales ^(28,30). El procedimiento sugerido (con HCl) consiste en adicionar en balones de 25 mL en los que previamente se han introducido alícuotas de muestra (estándares) con un contenido de nitritos de 1,2 a 100 μg : 3 mL de solución de Cr^{+3} ($5 g L^{-1}$), 1 mL de PAPH $1,5 \cdot 10^{-3} M$, 1,0 mL de HCl 1,5 M y 1 mL de $KBrO_3$ 0,075 M (ver Tabla 1A). Las soluciones se llevan a un volumen fijo de 25 mL y la absorbancia de cada solución se registra como función del tiempo a 372 nm. Se calcula la velocidad de reacción para cada solución por la pendiente ($\Delta A/\Delta t$) de la representación gráfica $A_{372 \text{ nm}}$ contra tiempo en la zona inicial de la curva. A

partir de esa información se construye la curva de calibración del sistema graficando la velocidad de reacción contra la concentración de nitrito. Los estudios de recuperación (90-118 %) se realizaron con aguas minerales y superficiales fortalecidas con el anión. Los estudios de interferencias de 45 especies sobre una solución de $0,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ indicaron que el método tolera la presencia de grandes cantidades de amonio y nitrato, pero está sujeto a las interferencias por parte de Pd^{+2} , Cu^{+2} , que forman complejos con el PAPH, y de especies electro activas como Br^- , I^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$, H_2O_2 , etc., las cuales son toleradas hasta una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. Sin embargo, la presencia del ión Cu^{+2} puede ser tolerada (hasta $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) por adición de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ EDTA a la muestra. Las características analíticas del método propuesto se presentan en la Tabla 2A. El método se utilizó para evaluar el contenido de nitritos en aguas provenientes de un río altamente contaminado, por estar en las cercanías de una industria de alimentos, encontrando valores comprendidos entre $0,268$ y $0,360 \mu\text{g mL}^{-1} \text{NO}_2^-$.

A.A. Mohammed y colaboradores (24) describen un procedimiento analítico manual en el que utilizan el sistema proclorperazina (PRP) / H_3PO_4 / KBrO_3 / NO_2^- (ver Tabla 1A). En este sistema es importante destacar que el producto de la oxidación del PRP es el que muestra absorción en el visible, con un máximo de absorción en 525 nm. Al igual que en el caso anterior, se utiliza el método de las velocidades iniciales. Las principales interferencias provienen del yoduro y el vanadio, que catalizan la reacción de oxidación del PRP. Los estudios de interferencias se llevaron a cabo con una solución de $30 \text{ ng mL}^{-1} \text{NO}_2^-$; y encuentran que especies iónicas como: I^- , IO_4^- , SCN^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$, S^{-2} y V^{+5} , presentan un límite de tolerancia de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que especies como Co^{+2} , Cr^{+3} , Mn^{+2} , Mo^{+6} , W^{+6} , Zr^{+4} , Hg^{+2} , Ag^+ y Br^- se toleran hasta una concentración de $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por su parte el Hg^{+2} y el EDTA son tolerados en concentraciones de 2 y $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Sobre la base de estos resultados, los autores recomiendan la adición de Hg^{+2} y EDTA a las muestras para suprimir las interferencias del I^- y del vanadio. La metodología propuesta, cuyas principales características analíticas se resumen en la Tabla 2A, se

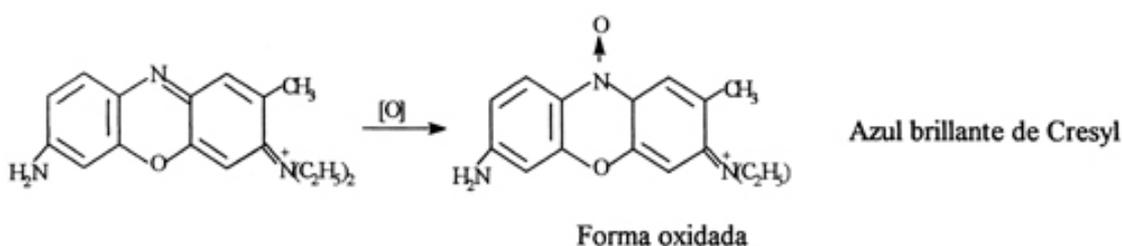
utilizó para analizar muestras de aguas del río Toku, Japón y aguas de lluvia de la misma ciudad, encontrando valores comprendidos entre 170-190 y 19,0-19,4 $\text{ng ml}^{-1} \text{NO}_2^-$, respectivamente.

J.L. Manzoori y colaboradores ⁽²⁾ desarrollaron un procedimiento manual basado en el sistema ácido carmínico / H_2SO_4 / BrO_3^- / NO_2^- , en el que utilizan el método de los tiempos constantes. En el proceso sugerido, tras la introducción de las alícuotas de muestra, ácido y cromóforo (ver Tabla 1A), las soluciones son diluidas hasta un volumen de 8 mL con agua, y los balones se colocan en un baño de agua con una temperatura de $30,0 \pm 0,1$ °C durante 10 min. En ese punto se adiciona la solución de BrO_3^- , que ha sido mantenida a la misma temperatura, y se lleva a aforo. La absorbancia de las soluciones se mide a los 3 min a 490 nm. La medida instrumental que utilizan es la relación logarítmica de A_0 / A .



Los investigadores realizan un exhaustivo estudio de interferencias utilizando como referencia una solución de $10 \text{ ng mL}^{-1} \text{NO}_2^-$, y concluyen que el método está bastante libre de interferencias, tolerando elevadas concentraciones de amonio y nitratos. La menor tolerancia la presentan especies como: IO_3^- , CrO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, Bi^{+3} y Fe^{+3} , las cuales pueden estar presentes hasta una concentración de $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$. Por su parte especies iónicas como CrO_4^{2-} , Hg^{+2} , Ba^{+2} , Mo^{+6} y W^{+6} presentan un límite de tolerancia de $1 \mu\text{g ml}^{-1}$. El método propuesto, cuyas figuras de mérito se indican en la Tabla 2A, fue utilizado para evaluar el contenido de nitritos en agua del río Talkheroud (Irán) y aguas de lluvia de Irán, encontrando valores de 33,6 y $55,2 \text{ ng ml}^{-1} \text{NO}_2^-$, respectivamente.

A.A. Ensafi A.A. y B. Rezaii B⁽²³⁾ desarrollaron una metodología manual basada en el sistema Azul de cresyl brillante / H₂SO₄ / KBrO₃ / NO₂⁻. El procedimiento sugerido (ver Tabla 1 A) es muy similar al anterior, pero en este caso todas las soluciones de trabajo, así como la celda espectrofotométrica se mantienen a una temperatura de 30 ± 1°C. La absorbancia de las soluciones se evaluó a 595 nm, el tiempo de medida se fijó en 3 min, y la respuesta instrumental utilizada fue $|\Delta A_{\lambda=595\text{nm}}|$. En la Tabla 2A se presentan las figuras de mérito del método.

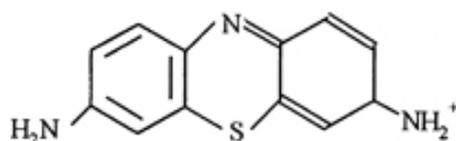


Los estudios de interferencias se realizaron con una solución de 100 ng mL⁻¹ NO₂⁻. Los mayores interferentes fueron los iones V³⁺, V⁵⁺, Fe³⁺, Ce⁴⁺ y Hg²⁺, los cuales aceleran la reacción de oxidación. Por otra parte, iones como SO₄²⁻ y S₂O₃²⁻ presentaron un límite de tolerancia masa Interferente / masa Nitrito = 25, el Hg⁺ y el Br⁻ de 300, e iones como el Fe²⁺, I⁻ y S₂O₃²⁻ de 500. La tolerancia al Fe³⁺ se puede incrementar hasta 50 µg mL⁻¹ por adición de KF 1 % (m/v) a las muestras. El método descrito se utilizó para la determinación de nitritos en aguas de río y de manantiales de Irán, así como en embutidos, encontrando valores de 0,035; 0,278 y 3,550-7,230 µg mL⁻¹ NO₂⁻, respectivamente. El método también se aplicó para a la determinación del contenido de nitritos en sales como KNO₃ y NaNH₄.

A. Ensafi y M. Keyvanfard⁽²⁵⁾ propusieron un método manual basado en el sistema químico Azul de Nilo/Ácido/KbrO₃/Nitrito, similar a los anteriores. En este caso se mide la disminución de la absorbancia del cromóforo a 595 nm. Los estudios de interferencias indican que el método propuesto está bastante libre de interferencias por parte de los iones comúnmente presentes en las aguas. El método fue aplicado al análisis de nitritos en muestras de embutidos

y aguas, con resultados satisfactorios

M. Jiang y colaboradores ⁽²⁸⁾ desarrollaron un método cinético manual basado en la oxidación de la tionina por palie del bromato en medio ácido (ver Tablas 1A y 2A).



Estructura de la Tionina

Los autores proponen para describir el proceso cinético la siguiente ecuación:

$V = -d[TN]/dt = k \cdot [NO_2] \cdot [TN]^m \cdot [BrO_3^-]^n$, en donde V es la velocidad del proceso, k es la velocidad de reacción, y $[NO_2]$, $[TN]$, y $[BrO_3^-]$ representan las concentraciones de nitrito, tionina y bromato, respectivamente. Bajo las condiciones de trabajo utilizadas ($[BrO_3^-] \gg [TN], [NO_2^-]$) encuentran que la reacción es de primer orden ($m = 1$) y llegan a la siguiente expresión:

$\log(A_0/A) = (1/2) \cdot 2,303 \cdot k \cdot [NO_2^-] \cdot t$. Para la evaluación de la concentración de nitritos utilizan el método de los tiempos constantes, como se describe en la Tabla 1A. La absorbancia de las soluciones se evaluó a 602 nm, utilizando una catálisis térmica a 30° C durante 5 min.

El método se aplicó a la determinación de NO_2^- en aguas superficiales, ríos y lagos del Japón, encontrando valores comprendidos entre 0,008 y 0,223 $\mu g mL^{-1} NO_2^-$. Adicionalmente analizaron dos muestras de embudidos con contenidos de 6,8 y 7,5 $\mu g mL^{-1} NO_2^-$. Las figuras de mérito del sistema descrito se presentan en la Tabla 2A.

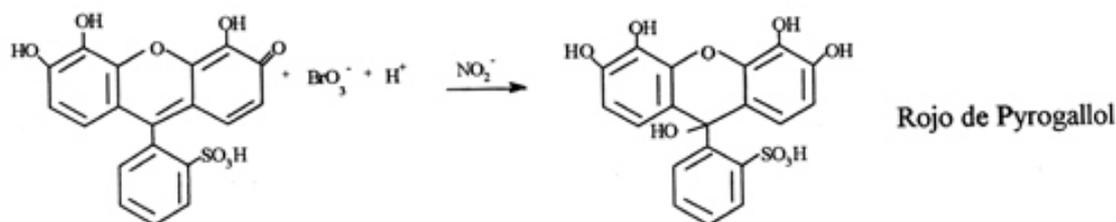
Los autores describen un amplio estudio de interferencias de más de 40 especies aniónicas y catiónicas que suelen acompañar a los nitritos en las muestras de agua. La menor tolerancia se encuentra por parte de los sulfuros y yoduros, que muestran un efecto interferente positivo al estar presentes en una proporción molar mayor a 10 con relación al nitrito.

El grupo de Ubetrlingen de Perkin Elmer ⁽²⁹⁾, desarrolló un sistema automatizado AIF-EAM-UVV basado en el sistema Tionina/H₂SO₄/Bromato/Nitrito con figuras de mérito atractivas para el análisis rutinario de nitritos a niveles de ultratrazas en aguas (ver Tablas 1B y 2B). El montaje experimental utilizado es similar al que se muestra en la Figura 2A. En este caso el ácido se incorpora directamente en la solución del cromóforo (C₁) y el montaje incorpora un largo serpentín de teflón adicional (400 cm de longitud y 0,8 mm de d.i.) en el punto de confluencia de los canales C_p y C₁ para la mezcla de la solución ácida de tionina y la muestra. La absorbancia se registra a 599 nm; y el sistema trabaja a temperatura ambiente. Los estudios de interferencias realizados sobre una solución de 30 ng mL⁻¹, mostraron que las especies menos toleradas fueron Cl⁻, Co⁺³, Cr⁺³ y Fe⁺³, que presentan efectos interferentes a partir de concentraciones de 3,0; 0,1; 0,1 y 2 µg mL⁻¹ respectivamente.

Zhang Zhi Qu y colaboradores ⁽²⁶⁾ desarrollaron un procedimiento espectrofotométrico automatizado en el que utilizan el sistema Verde E de Naftol / H₃PO₄ / KBrO₃ / NO₂ (ver Tablas 1B y 2B). El montaje experimental utilizado es similar al descrito en la Figura 2A. En este caso se utiliza una solución de sulfato de amonio 3 % (p/v) como solución portadora (C_p) y el medio ácido (H₃PO₄) se incorpora en la solución del oxidante (C₁, Figura 2A). La absorbancia de la solución resultante se registra en forma continua a 722 nm y el serpentín de reacción (R) se mantiene sumergido en un baño de agua a 50 °C. Los estudios de interferencia que se realizaron sobre una solución de 80 ng mL⁻¹ NO₂⁻ mostraron una gran tolerancia al nitrato, siendo los mayores interferentes los iones I⁻, S⁻² y V⁺⁵, los cuales causan una interferencia positiva a partir de una relación [Interferente]/[Nitrito] = 1. El efecto de los sulfuros e yoduros se explica por la probable destrucción del compuesto orgánico, mientras que la interferencia del vanadio se debe a su efecto catalítico sobre la reacción. El método se aplicó a la determinación de nitritos en aguas de ríos y lagos de la República China encontrando valores comprendidos entre 0 y 0,158 µg mL⁻¹ NO₂⁻.

Estos mismos autores adaptaron el montaje descrito con anterioridad para la determinación secuencial de nitritos y nitratos ⁽²⁷⁾. Para ello incorporan una válvula de 8 canales con dos bucles de inyección y un reductor de cadmio-zinc para la reducción heterogénea en línea del nitrato a nitrito. De esta forma, uno de los bucles se llena con la muestra original, mientras que el otro se llena con la muestra que ha pasado por la columna reductora. El procedimiento se basa en una doble inyección secuencial de los dos bucles de inyección, cuyas señales corresponden a la suma de nitritos + nitratos y nitritos, respectivamente. El método se utilizó para la determinación de ambos iones en aguas de líos y lagos de la República de China, encontrando valores de 0 - 0,158 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NO_2^- y 0,116 - 0,956 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NO_3^- .

Ali A. Ensafi y colaboradores ⁽¹⁰⁾ desarrollaron un método manual basado en el sistema Rojo de Pyrogallo1/ H_2SO_4 / KBrO_3 / NO_2^- para la determinación de nitritos. El espectro de absorción del rojo de pyrogallol (RPG) presenta un máximo de absorción a 467 nm, mientras que la forma oxidada presenta el máximo de absorción en 335 nm.



El procedimiento sugerido, así como las figuras de mérito del método propuesto se presentan en las Tablas 1A y 2A. La absorbancia de las soluciones se evaluó a 467 nm, el tiempo de medida se mantuvo constante en 3 min, y la temperatura del serpentín de reacción en 30°C. Los estudios de interferencias indican que especies como :V(V), V(III), Ce(IV), As(III) e IO_4^- afectan a la señal del analito a partir de una proporción $[\text{Interferente}]/[\text{Analito}] > 5$, mientras que especies iónicas como Mo^{+6} , Bi^{+3} , Ce^{+3} , Ag^+ , Cr^{+3} , SCN^- , I^- , Br^- , S^{-2} , Hg^{+2} lo hacen a partir de una relación de 30. Por otra parte, iones como Fe^{+3} , Cl^- , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ no interfieren en una relación 1000/1. Es importante resaltar que el nitrato no

afecta a la señal del analito incluso en proporciones tan altas como 10^6 , lo que indica que el método puede ser utilizado para la determinación de trazas de nitritos en nitratos. El método se utilizó para la evaluación del contenido de nitritos en aguas de ríos, lagos, aguas superficiales y de desecho de Irán, encontrando valores de 0,020; 0,110; 0,035 y 0,250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

A. Kazernzadeh y A. Ensafi ⁽³⁾ desarrollaron un procedimiento automatizado para la determinación secuencial de nitritos y nitratos basados en el sistema químico descrito anteriormente. El montaje experimental que utilizan es similar al descrito en la Figura 2B. La muestra se inyecta en el canal del portador y se divide en dos fracciones. La primera sigue la trayectoria tradicional para la determinación de nitritos, mientras que la segunda fracción atraviesa dos columnas de Cadmio y de cobre respectivamente, antes de mezclarse con las soluciones de cromóforo, ácido y oxidante. De esta forma, en esa fracción de la muestra el nitrato se reduce en forma cuantitativa a nitrito, lo que permite la evaluación de los nitritos + nitratos presentes en la muestra. La concentración de nitratos se determina sobre la base de la diferencia de ambas señales. La señal analítica que se sigue es la absorbancia a 465 nm, que se relaciona linealmente con la concentración de nitritos. En el procedimiento sugerido todas las soluciones de trabajo se mantienen a $30,0 \pm 0,1$ °C. Los estudios de interferencias realizados sobre una solución de $50 \text{ ng mL}^{-1} \text{ NO}_2^-$, mostraron que especies como el Fe^{+3} y el Bi^{+3} , son toleradas hasta una relación masa (Interferente) / masa (Nitrito) de 0,5; mientras que especies como SCN , Br^- , I^- , Cr^{+4} , Ag^+ , Hg^{+2} , Hg^+ , IO_4^- , As^{+3} , Fe^{+2} , VO_3^- presentan efectos interferentes a partir de una relación de 0,2. El método se utilizó para la determinación de nitritos y nitratos en muestras alimenticias previamente digeridas de embutidos, salami, harinas, y quesos Tabriz y Gorgan. Los valores encontrados fueron $0,1521 \pm 0,004$; $0,092 \pm 0,003$; $0,250 \pm 0,004$; $0,030 \pm 0,002$; $0,020 \pm 0,003$ $\mu\text{g g}^{-1} \text{ NO}_2^-$ y $0,070 \pm 0,003$; $0,048 \pm 0,004$; $< \text{LD}$; $1,750 \pm 0,004$; $2,160 \pm 0,003$ $\mu\text{g g}^{-1} \text{ NO}_3^-$, respectivamente. También se analizaron muestras de aguas superficiales y aguas de mar, encontrando valores que oscilan entre 0,03 - 0,04 $\mu\text{g mL}^{-1} \text{ NO}_2^-$ y 1,05 - 1,54 $\mu\text{g mL}^{-1} \text{ NO}_3^-$ para el primer grupo; mientras que en las aguas de

mar los valores fueron de 0,04 - 0,050 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NO_2^- y 0,20 - 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NO_3^- .

Estos mismos autores desarrollaron un procedimiento automatizado para la determinación secuencial de nitratos y nitritos utilizando el sistema de Gallocyanina / H_2SO_4 / KBrO_3 / NO_2^- ⁽⁴⁾. El montaje utilizado es análogo al descrito con anterioridad (ver Figura 2B). En este sistema, se sigue el comportamiento de la absorbancia a 530 nm y se trabaja a una temperatura de 23°C (ver Tablas 1B y 2B). El método propuesto se aplicó a la determinación de nitritos y nitratos en aguas superficiales, aguas de mar y productos alimenticios previamente digeridos. Las aguas superficiales presentaron contenidos de 0,010 - 0,030 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NO_2^- y 0,840 - 1,710 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NO_3^- , mientras que en las aguas marinas el contenido de nitritos y nitratos osciló entre 0-0,080 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y 0,10 - 0,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Por otra parte, en las muestras alimenticias analizadas (embutidos de carne, *calbus marta*, harina y quesos Trabiz y Gorgan) el contenido de nitritos y nitratos encontrado fue de: 0,030; 0,060; 0,470; 0,030; 0,040 $\mu\text{g g}^{-1}$ NO_2^- y < LD; LD; 1,670; 2,200; 3,180 $\mu\text{g g}^{-1}$ NO_3^- , respectivamente. Los estudios de interferencias indicaron que especies como: Ag^+ , SO_3^{2-} , Br^- e I^- presentan un efecto interferente sobre una solución de 50 ng mL^{-1} NO_2^- , cuando están presentes en una proporción masa Interferente / masa Nitrito ≥ 1 . Por otra parte especies como el Fe^{+2} y Fe^{+3} interfieren a partir de una proporción de 5.

Xingguo Chen y colaboradores (24) desarrollaron un sistema de análisis por inyección en flujo con detección espectrofotométrica similar a los descritos con anterioridad basado en el sistema químico Clorofosfonazo-pN/ H_2SO_4 / KBrO_3 / NO_2^- , siguiendo la disminución de la absorbancia del cromóforo a 551 nm. El método propuesto fue aplicado a la determinación de nitritos en muestras de aguas y suelos con resultados satisfactorios.

4 EVALUACIÓN CRÍTICA DE LOS MÉTODOS CINÉTICOS

Los métodos cinéticos representan una alternativa experimental, simple y válida, para la determinación espectrofotométrica de nitritos a niveles de

ultratraza en aguas. La instrumentación requerida, así como los reactivos necesarios para su implementación, son de fácil acceso para muchos laboratorios. En casi todos estos desarrollos se ha impuesto el uso de la modalidad de tiempo constante, por su simplicidad.

En los desarrollos manuales, el mayor inconveniente radica en que los tiempos de análisis son muy elevados, por lo que la frecuencia de análisis suele ser pequeña. Por otra parte, los procedimientos suelen ser tediosos, particularmente por el requisito de tener que detener a un tiempo muy controlado la reacción, por adición a la solución de urea sólida. Por otra parte, los desarrollos automatizados basados en acoplamiento de AIF con detección espectro foto métrica han solventado estos inconvenientes. En estos métodos, el control de los diversos parámetros asociados al sistema es riguroso, lo que evita los problemas y errores asociados a los procedimientos manuales, mejora la precisión en las medidas instrumentales y aumenta de forma importante la frecuencia de análisis.

Las características analíticas de estos procedimientos son adecuadas para el análisis rutinario de nitritos en aguas, e incluso muchos de ellos están diseñados para la determinación secuencial de nitritos y nitratos. En lo referente a la sensibilidad y al límite de detección, estos desarrollos metodológicos tienen prestaciones superiores a aquellos que se fundamentan en la reacción de Griess. La sensibilidad de los métodos cinéticos es elevada, siendo en muchos casos el límite de detección real inferior a 1 ng ml^{-1} , lo que permite el análisis a niveles de ultratrazas. Adicionalmente el control de algunos parámetros del sistema como son: el tiempo de residencia en el serpentín de reacción, la temperatura de operación y el volumen de inyección, permitiría establecer un conjunto de curvas de calibración con diversos intervalos dinámicos de trabajo. Esto propiciaría una novedosa versatilidad al método, para adecuarlo a distintos tipos de muestras.

En lo referente a las interferencias, los estudios realizados por los diversos investigadores, indican que las mayores interferencias surgen de especies

electro activas como el $S_2O_3^{-2}$, S^{-2} , I^- , Br^- , etc. Este comportamiento es lógico, ya que pueden intervenir en el sistema redox. Sin embargo, estas interferencias no son más significativas que las reportadas para la reacción de Griess.

Los diseños de acoplamientos AIF-EAM-UVV que han sido desarrollados, se limitan al uso de espectrofotómetros dispersivos, en los cuales se trabaja bajo la modalidad de "*time drive*". En este caso tan solo es posible la observación del comportamiento de la absorbancia a una longitud de onda fija. Estos diseños establecen un buen control sobre el background del sistema a la longitud de onda de trabajo, pero están estrictamente limitados en lo referente a la medida instrumental. La modificación del montaje instrumental para permitir la adquisición del espectro de absorción, ya sea en continuo, en la modalidad de "flujo parado" o por incorporación de un detector de arreglo de diodos; ampliaría las posibilidades en ese sentido. Por otra parte el diseño de desarrollos metodológicos de acoplamientos en sistemas de análisis por inyección secuencial (SIA) utilizando detectores de tipo dispersivos o de arreglo de diodos es, en estos momentos, un campo inexplorado.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 1A Condiciones óptimas de operación de diversos métodos cinéticos espectrofotométricos manuales desarrollados para la determinación de nitritos en aguas

Compuesto (Cromóforo)	Masa de NO ₂ Añadida	Cromóforo (C)		Ácido (A)		Bromato (Ox)	Aforado (ml)	λ (nm)	Tiempo de medida	T (°C)	Ref.
		V _C / [C]	V _A / [A]	V _{Ox} / [Ox]							
PAPH	1,1 – 23 (µg) → (1)	1,0 mL → (2) 1,5.10 ⁻³ M	6,5 mL → (3) HClO 1,5.10 ⁻¹	1,0 mL → (4) 0,012 M	25	372	(*)	25	1		
PAPH ^(a)	1,2 – 100 (µg) → (1)	1,0 mL → (3) 1,5.10 ⁻³ M	1,0 mL → (4) HCl 0,5 M	1,0 mL → (5) 0,075 M	25	372	(*)	25	1		
Proclor- perazina ^(b)	5 – 350 (ng) → (1)	0,2 mL → (3) 8,0.10 ⁻⁴ M en H ₃ PO ₄ 5M	-----	0,20 mL → (4) 0,250 M	25	525	(*)	25	19		
Acido Carmínico	2,0 – 140 (ng) → (1)	1,0 mL → (3) 1,5.10 ⁻³ M	1,0 mL → (2) H ₂ SO ₄ 1,8 M	1,0 mL → (4) 3,8.10 ⁻² M	30	490	13 min (**)	30	2		
Azul brillante de Cresilo	0,05 – 10 (µg) → (1)	1,0 mL → (3) 1,44.10 ⁻⁴ M	0,8 mL → (4) H ₂ SO ₄ 3,0 M	1,0 mL → (4) 0,02 M	30	595	3 min (**)	30	23		
Azul de Nilo	0,05 – 11 (µg) → (1)	1,0 mL → (3) -----	1,0 mL → (2) -----	1,0 mL → (4) -----	25	595	4,5 min (**)	25	25		
Tionina	3,30 – 550 (ng) → (1)	1,0 mL → (3) 8,0.10 ⁻⁴ M	0,8 mL → (2) H ₂ SO ₄ 2,0 M	0,8 mL → (4) 0,02 M	30	602	5 min (**)	30	28		
Rojo de Pyrogallol	0,03 – 10 (µg) → (1)	2,0 mL → (3) 2,5.10 ⁻⁴ M	1,0 mL → (4) H ₂ SO ₄ 1,5.10 ⁻¹	2,0 mL → (4) 7,5.10 ⁻³ M	30	467	3 min (**)	30	10		

^(a) La etapa (2) consiste en añadir 1 mL de solución de Cr³⁺ de 5 g l⁻¹. ^(b) La etapa (2) consiste en adicionar 0,1 mL de Hg²⁺ 10⁻³ M y 0,1 mL de EDTA 0,05 M. (*) Utilizan el método de las velocidades iniciales. (**) Utilizan el método de los tiempos constantes. (1), (2), (3), (4), (5): Representan el orden de adición de las diversas soluciones.

Tabla 1B Condiciones óptimas de operación de diversos métodos cinéticos espectrofotométricos automatizados desarrollados para la determinación de nitritos en aguas

Compuesto (Cromóforo)	Nitritos (Muestra / Estándar)		Portador	Activo [Aceto] Caudal	Oxidante	Cromóforo	Serpentin de reacción		λ (nm)	Ref.
	Rango de trabajo	V _i (μL)					Composición Caudal	Longitud T (°C)		
2A* Tionina	NO ₂ ⁻ - N: 2,0 - 60 ng mL ⁻¹	200	2A: C_p Agua 1,4 mL min ⁻¹	-----	2A: C₂ 40 g l ⁻¹ 1,4 mL min ⁻¹	2A: C₁ 7.10 ⁻⁴ M en H ₂ SO ₄ 0,08M 1,4 mL min ⁻¹	R**= 400 cm T= Ambiente	599	29	
2A Verde B de Naftol	NO ₂ ⁻ : 2,0 - 200 ng mL ⁻¹	90	2A: C_p (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 % (p/v) 1,8 mL min ⁻¹	-----	2A: C₁ 0,1 M + H ₃ PO ₄ 1M 1,8 mL min ⁻¹	2A: C₂ 4,0 . 10 ⁻⁴ M 1,8 ml min ⁻¹	R*= 400 cm T = 50 °C	722	26	
2A Verde B de Naftol	NO ₂ ⁻ : 2,0 - 200 ng mL ⁻¹ NO ₃ ⁻ : 10 - 1.000 ng mL ⁻¹	90	2A: C_p (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 % (p/v) 1,8 mL min ⁻¹	-----	2A: C₁ 0,1 M + H ₃ PO ₄ 1M 1,8 mL min ⁻¹	2A: C₂ 4,0 . 10 ⁻⁴ M 1,8 mL min ⁻¹	R*= 400 cm T = 50 °C	722	27	
2B Rojo de Pyrogallol	NO ₂ ⁻ : 0,003-1,5 μg mL ⁻¹ NO ₃ ⁻ : 0,03 -2,0 μg mL ⁻¹	200	2B: C_p Agua 0,54 mL min ⁻¹	2B: C_{Ac} H ₂ SO ₄ 0,14 M 0,54 mL min ⁻¹	2B: C_{Ox} 1,40.10 ⁻² M 0,54 mL min ⁻¹	2B: C_{Cr} 4,75 . 10 ⁻⁵ M 0,54 ml min ⁻¹	R* = 180 cm T = 30 °C	465	3	
2B Galloyanina	NO ₂ ⁻ : 0,010-2,5 μg mL ⁻¹ NO ₃ ⁻ : 0,020-3,50 μg mL ⁻¹	200	2B: C_p NH ₄ Cl 0,20 M 0,49 mL min ⁻¹	2B: C_{Ac} H ₂ SO ₄ 0,35 M 0,49 mL min ⁻¹	2B: C_{Ox} 0,060 M 0,49 mL min ⁻¹	2B: C_{Cr} 1,48 . 10 ⁻⁴ M 0,49 mL min ⁻¹	R*= 200 cm T = 23 °C	530	4	
Cloro- Fosfonazo pN	NO ₂ ⁻ : 50 - 1000 ng mL ⁻¹	-----	2B: C_p Agua 0,50 mL min ⁻¹	2B: C_{Ac} H ₂ SO ₄ 0,50 mL min ⁻¹	2B: C_{Ox} KBrO ₃ 0,50 mL min ⁻¹	2B: C_{Cr} 1 . 10 ⁻⁴ M 0,50 mL min ⁻¹	R*= 200 cm T = 25 °C	551	21	

2A y **2B** corresponden a los diagramas esquemáticos presentados en las Figuras 2A y 2B. **2A***: En este montaje existe un serpentín de reacción adicional de 400 cm de longitud y 0,8 mm de diámetro interno en el punto de confluencia de C_p y C₁ (Ver Figura 2A). (R*): Serpentin de reacción de 400 cm de longitud de teflón (0,5 mm de diámetro interno). (R**): 0,5 mm de diámetro interno.

Tabla 2A Comparación de las figuras de mérito de diversos métodos cinéticos espectrofotométricos manuales desarrollados para la determinación de nitritos

Compuesto (Cromóforo)	Curva de calibración (Ecuación), (r)	LD (µg mL ⁻¹)	Intervalo dinámico (µg mL ⁻¹)	Precisión (DER)	Sistema	Ref.
PAPH	$(\Delta A/\Delta t) = 0,052 + 1,22 \cdot [NO_2]$ in HCl ([NO ₂] en µg mL ⁻¹)	0,027 (µg mL ⁻¹)	0,04 – 4 (µg mL ⁻¹)	1,5 % (0,46 µg mL ⁻¹ ; n = 10)	Manual (*)	1
PAPH	$(\Delta A/\Delta t) = 0,053 + 3,63 \cdot [NO_2]$ in HClO ₄ ([NO ₂] en µg mL ⁻¹)	0,021 (µg mL ⁻¹)	0,04 – 0,92 (µg mL ⁻¹)	2,2 % (0,46 µg mL ⁻¹ ; n = 10)	Manual (*)	1
Prochlor-Perazina	$(\Delta A/\Delta t) = 4,5 \cdot 10^{-3} + 6 \cdot 10^{-4} [NO_2]$ ([NO ₂] en ng mL ⁻¹) (r = 0,9998)	0,008 (ng mL ⁻¹)	0 - 70 (ng mL ⁻¹)	2,1 % (10 ng mL ⁻¹ ; n = 5) 0,9 % (40 ng mL ⁻¹ ; n = 5)	Manual (*)	19
Acido Carminico	$\log(A_0/A) = 1,6 \cdot 10^{-3} + 0,011 [NO_2]$ ([NO ₂] en ng mL ⁻¹)	0,004 (µg mL ⁻¹)	0,2 – 14 (ng mL ⁻¹)	1,7 % (6 ng mL ⁻¹ ; n = 6)	Manual (**)	2
Azul brillante de cresilo	$\Delta A = 4,26 \cdot 10^{-3} + 1,132 [NO_2]$ ([NO ₂] en µg mL ⁻¹) (r = 0,9998)	0,1 (ng mL ⁻¹)	0,5 – 1.000 (ng mL ⁻¹)	1,1 % (10 ng mL ⁻¹ ; n = 10) 0,8 % (500 ng mL ⁻¹ ; n = 10)	Manual (**)	23
Azul de Nilo	$\Delta A = a_0 + k[NO_2]$ -----	1 (ng mL ⁻¹)	5 - 1100 (ng mL ⁻¹)	1 % (20 ng mL ⁻¹ ; n = 10)	Manual (**)	25
Tionina	$\log(A_0/A) = 0,016 + 4,16 \cdot 10^5 [NO_2]$ ([NO ₂] en mol L ⁻¹) (r = 0,9984)	0,003 (µg mL ⁻¹)	0,32 – 55 (ng mL ⁻¹)	2,6 % (46 ng mL ⁻¹ ; n = 6)	Manual (**)	28
Rojo de Pyrogallol	$\log(A_0/A) = -4,1 \cdot 10^{-3} + 0,934 [NO_2]$ ([NO ₂] en µg mL ⁻¹) (r = 0,9993)	0,10 (µg mL ⁻¹)	0,003-1,0 (µg mL ⁻¹)	1,8 % (0,01 µg mL ⁻¹ ; n = 8) 1,2 % (0,05 µg mL ⁻¹ ; n = 8)	Manual (**)	10

(*) Método de las velocidades iniciales. (**) Método de los tiempos constantes

Tabla 2B Comparación de las figuras de mérito de diversos métodos cinéticos espectrofotométricos en sistemas de flujo desarrollados para la determinación de nitritos

Compuesto (Cromóforo)	Curva de calibración (Ecuación), (r)	LD *	Intervalo Dinámico	Precisión (DER)	Sistema	Frecuencia	Ref.
Tionina	$\Delta A = -0,0040 - 0,01530 [\text{NO}_2]$ ($[\text{NO}_2]$ en ng mL^{-1}) (r = 0,9916)	1,0 (ng mL^{-1})	2 - 60 (ng mL^{-1})	1,62 % (20 ng mL^{-1} , n = 5) 1,01 % (30 ng mL^{-1} , n = 5)	AIF-	50 h^{-1}	29
Verde B de Nafтол	$\Delta A = 0,0014 + 3,27 \cdot 10^{-3} [\text{NO}_2]$ ($[\text{NO}_2]$ en ng mL^{-1}) (r = 0,9992)	0,5 (ng mL^{-1})	2 - 200 (ng mL^{-1})	1,8 % (80 ng mL^{-1} , n = 6)	AIF-	50 h^{-1}	22
Verde B de Nafтол	$\Delta A = 0,0014 + 3,27 \cdot 10^{-3} [\text{NO}_2]$ ($[\text{NO}_2]$ en ng mL^{-1}) (r = 0,9992) $\Delta(\Delta A) = -0,0093 + 6,79 \cdot 10^{-4} [\text{NO}_3]$ ($[\text{NO}_3]$ en ng mL^{-1}) (r = 0,9990)	0,5 (ng mL^{-1}) 2,5 (ng mL^{-1})	2 - 200 (ng mL^{-1}) 10 - 2000 (ng mL^{-1})	1,8 % (80 ng mL^{-1} , n = 6) 1,6 % (500 ng mL^{-1} , n = 6)	AIF-	30 h^{-1}	23
Rojo de Pyrogallol	$\Delta A = a_0 + k [\text{NO}_2]$ No se reportan ecuaciones $\Delta A = a_0 + k [\text{NO}_3]$ No se reportan ecuaciones	0,001 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 0,016 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,003-1,5 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 0,03-2,0 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,6 % (0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n = 10) 1,2 % (0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n = 10) 1,6 % (0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n = 10) 1,2 % (0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n = 10)	AIF-	20 ± 3 h^{-1}	3
Gallocyanina	$\Delta A = a_0 + k [\text{NO}_2]$ No se reportan ecuaciones $\Delta A = a_0 + k [\text{NO}_3]$ No se reportan ecuaciones	0,001 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 0,002 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,010-2,5 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) 0,020-3,5 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1,7 % (0,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n = 10) 1,2 % (0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n = 10) 1,8 % (0,02 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n = 10) 1,3 % (0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$, n = 10)	AIF-	20 ± 3 h^{-1}	4
Cloro fosfonazo-PN	$\Delta A = a_0 + [\text{NO}_2]$ No se reportan ecuaciones	0,01 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0,05 - 1,0 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-----	AIF	83	24

* LD: Límite de detección (3σ)

5 BIBLIOGRAFÍA

1. Montes R, Laserna J.J. Spectrophotometric reaction-rate method for the determination of nitrite in waters with pyridine 2-aldehyde 2-pyridylhydrazone. Talanta 34, 1021-1026, 1987.
2. Manzoori J. L., Mohammad H. S., Haji-Shabani A.M. Spectrophotometric determination of nitrite based on its catalytic effect on the oxidation of carminic acid by bromate. Talanta. 46, 1379-1386, 1998.
3. Kazemzadeh A, Ali A, Ensafi. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow-injection with spectrophotometric detection. Microchemical Journal. 69,159-166, 2001.
4. Ali A, Ensafi, Kazemzadeh A Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection. Analytica Chimica Acta. 382, 15-21, 1999.
5. Tsezou A, Kitsisou-Tzeli S., Galla A., Gourgiotis D., Papageorgiou J., Mitrou S., Molibdas P., Sinaniotis C. Archives of environmental health 51, 451-461, 1996.
6. Fox J.B. The Determination of Nitrite: A Critical Review. CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry. 15, 283-313, 1985
7. Moorcroft M. J.; Oavis J. Compton R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. Talanta 54 785-803, 2001.
8. Gallignani M., Valero M., Sánchez A. Brunetto R, Burguera J.L., Burguera M. La Determinación de nitritos. Parte 1. Métodos fundamentados en la espectroscopia de absorción molecular en el ultravioleta visible. Sociedad Venezolana de Química. 24, 3-15, 2001.
9. Jay B. Fox, Jr. Kinetics and Mechanisms of the Griess Reaction. Analytical Chemistry. 51, 1493-1502, 1979.
10. Ensafi A. and Samimifar M. Kinetic spectrophotometric determination of low levels of nitrite by catalytic reaction between pyrogallol red and bromate. Talanta. 40, 1375-1378, 1993.
11. Miró M., Caldera A, Estela J.M. and Cerdá V. secuential injection spectrophotometric analysis of nitrite in natural waters using an on-line solid-phase extraction and preconcentration method. Analyst. 125, 943-

948, 2000.

12. Xuexin Gu, Tianze Zhou, Dayong Qi. Determination of trace nitrite ion in water by spectrophotometric method after preconcentration on an organic solvent-soluble membrane filter. *Talanta*. 43, 169-175, 1996
13. Kiyoshi Horita, Genfeng Wang, Mastada Satake. Spectrophotometric determination of nitrate and nitrite in soil and water samples with a diazotizable aromatic amine and coupler agent using column preconcentration on a naphthalene supported with ion-pair of tetradecyldimethylbenzylammonium and iodide. *Analytica Chimica Acta*. 350, 295-303, 1997.
14. Mottola H.A. Kinetics Aspects in Analytical Chemistry Willey, New York, 1988.
15. Perez-B. D, Siva M. Kinetic Methods in Analytical Chemistry Ellis Horwood, Chichester, England, 1988.
16. Mark H. R., Rechnitz G. A. Kinetics Analytical Chemistry Willey, New York, 1968.
17. Utsunoi S., Okutani T., Sakuragawa A., Kenmotsu A. Determination of trace amount of nitrite by its kinetic effect *Bull Chem Soc Japan* 51: 3496-3499, 1979.
18. Koupparis M.A., Walczak K.M., Malmstadt H. V. Kinetic determination of nitrite in waters by using a stopped-flow analyzer *Analyst* 107: 1309-1315, 1982
19. Sanchez Pedreño C., Sierra M. T., Sierra M. I., Sanz A. Kinetic determination of trace amount of nitrite based on its inhibitory effect on the photochemical reaction between iodine and ethylenediaminetetraacetic acid *Analyst* 112, 837-840, 1987.
20. Liang B., Iwatsuki M., Fukasawa T. Catalytic spectrophotometric determination of nitrite using the chlorpromazine hydrogen-peroxide redox reaction in acetic-acid medium. *Review Analyst* 119, 2113-2117, 1994.
21. Jiang Zhi-Liang, Qin Hai-Cuo, Wu Da-Qiang. Catalytic kinetic determination of ultratrace amounts of nitrite with detection by linear-

- sean voltametry at DME. Talanta 39, 1239-1244, 1992.
22. Mohamed A.A., El-shahat M.F., Fukasawa T., Iwatsuki M., Sensitive determination of nitrite using its catalytic effect on the bromate oxidation of prochlorperazine. Analyst. 121, 89-92, 1996.
23. Ensafi A.A., and Rezaii B. Kinetic-spectrophotometric determination of nitrite by its catalytic effect on the oxidation of brilliant cresyl blue by bromate. Microchemical Journal. 50, 169-177, 1994.
24. Xingguo C., Ketai W., Zhide H., Zhengfeng Z. Kinetic flow injection spectrophotometric determination of nitrite by its catalytic effect on the oxidation of chlorophosphonazo-pn by bromate. Analytical Letter 29, 2015-2023, 1996.
25. Ensafi Ali A., Keyvanfard M. Selective kinetic spectrophotometric determination of nitrite in food and water. Anal. Lett. 27, 169-182, 1994.
26. Zhang Zhi-Qi, Gao Lou-Jun, Zhan Han-Ying. Flow-injection catalytic spectrophotometric determination of nitrite using the redox reaction between naphthyl green B and potassium bromate. Talanta. 47, 497-501, 1993.
27. Zhang Zhi-Qi, Gao Lou-Jun, Zhan Han-Ying. Catalytic Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate with a flow injection system. Analytica Chimica Acta. 370, 59-63, 1998.
28. Mian Jiang, Fang Jiang, Jin Duan, Xueyuan Tang and Zaofan Zhao. Spectrophotometric determination of trace nitrite based on catalytic oxidation of thionine by potassium bromate. Analytica Chimica Acta. 234, 403-407, 1990.
29. Bettina Schweizer, Shihua Fan, Dr. Hanswilly Muller. Techniques for flow Injection analysis in UV/Vis spectroscopy. Perkin Elmer Corporation. Vol II 152-156, 1993.
30. Pardue H. L. Kinetic aspects of analytical-chemistry. Analyt Chim 216: 69-107, 1989.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO 4

**DESARROLLO DE UN MÉTODO CINÉTICO ESPECTROFOTOMÉTRICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE NITRITO, BASADO EN SU
ACCIÓN CATALÍTICA SOBRE LA OXIDACIÓN DE LA TIONINA POR PARTE
DEL BROMATO DE POTASIO, EN UN SISTEMA DE FLUJO**

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un método cinético automatizado de análisis en flujo continuo con detección espectrofotométrica para la determinación de nitrito en aguas. El método se fundamenta en el efecto acelerador que tiene el ion nitrito en la reacción redox entre la tionina y el bromato de potasio en medio ácido. El criterio de medida utilizado fue el valor absoluto de la absorbancia a 599 nm del espectro de absorción obtenido en un sistema doble de flujo, corregido mediante una línea de base establecida entre 700 y 400 nm. Se optimizaron diversos parámetros físicos, químicos y espectroscópicos, propios del sistema. Las condiciones experimentales de reacción seleccionadas fueron: $[\text{BrO}_3^-] = 0,06 \text{ M}$, $[\text{Tionina}] = 8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (en 1,5 % (v/v) de H_2SO_4); y la reacción fue catalizada utilizando un baño de agua a una temperatura controlada de 32,5 °C. Bajo estas condiciones la determinación de nitrito se llevó a cabo en muestras de aguas de río de la zona de Mérida en un intervalo dinámico de 0,6 a 8 $\mu\text{g l}^{-1}$, con un límite de detección de 0,2 $\mu\text{g l}^{-1}$ y un coeficiente de variación de 1,9 %.

www.bdigital.ula.ve

1 INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen numerosos desarrollos metodológicos para la determinación de nitrito en una variedad de matrices ^(1,2). La razón principal está en el impacto perjudicial que tiene este ión sobre la salud. Su toxicidad está principalmente relacionada con su interacción con los glóbulos rojos para producir metahemoglobinemia. Su reacción con aminas o amidas conduce a la formación de compuestos N-nitroso, algunos de los cuales presentan propiedades cancerígenas y mutagénicas ⁽²⁾. La mayoría de los desarrollos metodológicos se basan en la reacción de Griess, que involucra la diasotización en medio ácido de una amina aromática primaria con el anión, para generar una sal de diazonio; seguida por una reacción de acoplamiento con una amina aromática o un fenol. En esta etapa se produce un compuesto "azo", que generalmente presenta una intensa absorción en el visible ^(2,3). Entre las principales desventajas reportadas de estos métodos destacan la obtención de límites de detección altos ($LOD > 20 \mu\text{g l}^{-1}$) y el uso de reactivos altamente tóxicos ^(3,4). Sin embargo, en algunos trabajos se ha descrito un incremento en la sensibilidad del sistema mediante el uso de celdas de pasos ópticos mayores a un centímetro ⁽⁶⁾ o por la incorporación de técnicas de preconcentración ⁽⁷⁾.

En la búsqueda de métodos espectroscópicos alternativos para superar estos inconvenientes, los métodos cinéticos representan una salida experimental atractiva para la determinación de nitritos a niveles ultra trazas ⁽³⁾. Estos procedimientos se fundamentan en que la velocidad de oxidación de ciertos compuestos orgánicos por parte del ión bromato en medio ácido, se incrementa por la presencia del ión nitrito. Entre los compuestos orgánicos que han sido utilizados destacan: verde B de naftol ⁽⁸⁾, piridina-2-aldehído-2-piridilhidrazona ⁽⁹⁾, gallocianina ⁽¹⁰⁾, rojo de pyrogallol ^(4,5), azul cresil brillante ⁽¹¹⁾, ácido carminico ⁽¹²⁾, tionina ⁽¹³⁾, etc.

El criterio de cuantificación en estos métodos se basa en la disminución de la absorbancia del compuesto orgánico, que se relaciona directamente con la concentración del ión nitrito y con el tiempo de medida. En condiciones óptimas

de trabajo, la sensibilidad de estos métodos se relaciona con el tiempo de medida; a mayores tiempos mejor es la sensibilidad, pero la frecuencia de análisis disminuye. Por ello, la condición que se adopta en última instancia, es un compromiso que está determinado por la concentración del analito en la muestra de interés.

El mayor inconveniente que presentan estos métodos, desde el punto de vista experimental, radica en que las reacciones suelen ser lentas, lo que dificulta su automatización. Sin embargo, se han desarrollado algunos procedimientos automatizados sobre la base de la oxidación del verde B de naftol ^(8,14), la gallocianina ⁽¹⁰⁾, el rojo de pirogallol ⁽⁵⁾ y la tionina ⁽¹⁵⁾. En general, en estos procedimientos se incorpora un largo serpentín de reacción sumergido en un baño de agua cuya temperatura se controla y mantiene mediante el uso de un termóstato, con el fin de acelerar la reacción.

Los objetivos del presente trabajo son: i) hacer una evaluación crítica sobre los diversos métodos cinéticos que han sido publicados en la literatura sobre la determinación de nitritos, y ii) desarrollar un sistema de análisis en flujo con detección espectrofotométrica utilizando la acción catalítica del ión nitrito sobre la reacción de oxidación de la tionina por parte del ión bromato en medio ácido, para la determinación de nitritos en aguas. Esto con el objeto de disponer en el laboratorio de un método de análisis con figuras de mérito adecuadas en cuanto a sensibilidad, precisión, exactitud y tiempo de análisis, para la determinación rutinaria de nitritos en aguas.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentación

En la Figura 1 se presenta el montaje del sistema en flujo continuo, con detección espectrofotométrica utilizado en el presente trabajo para la determinación de nitrito en aguas. El sistema consiste básicamente en el ensamblaje de accesorios y equipos comerciales. Consta de una bomba peristáltica (P) Ismatec IPC de 8 canales, equipada con tubos de Tygon para la

propulsión de las soluciones de muestras y reactivos, dos serpentines de reacción (R y R'), un termostato (B), dos celdas de flujo, CR y CT (Starna, 160 μ l de volumen interno y 1 cm de paso óptico), y un detector (D). El sistema incluye una válvula selectora de canales (V) que permite el paso selectivo de la solución de nitritos o de agua DI.

Las medidas de absorbancia se realizaron con un espectrofotómetro de doble haz Perkin Elmer, Modelo Lambda 20, equipado con fuentes de radiación de hidrógeno y tungsteno. El equipo se controla a través de un computador personal mediante el software Uv WinLab para la serie lambda 2-40.

Como fuente de calentamiento se utilizó un baño termostato LAUDA, Ecoline RE 106, con capacidad para controlar cambios de temperatura en $\pm 0,1$ °C.

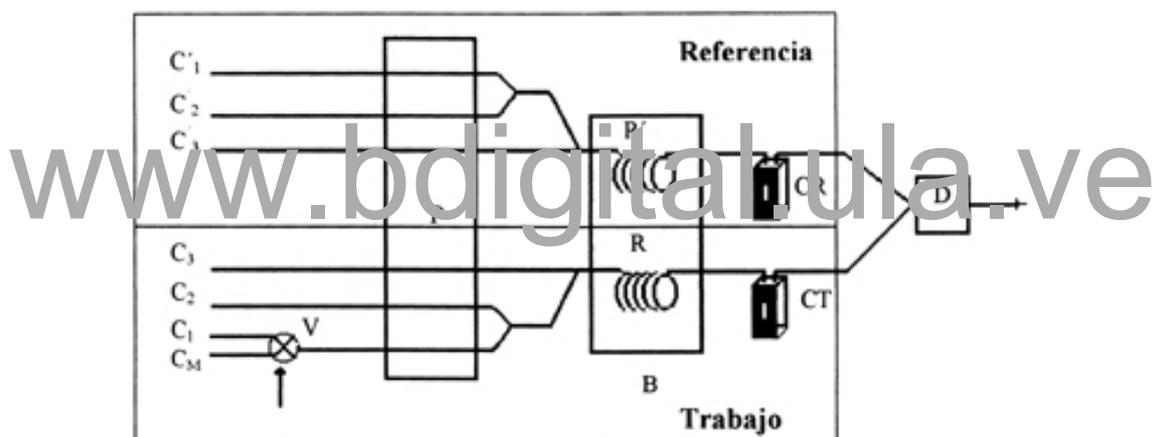


Figura 1 Diagrama esquemático del sistema de Análisis en Flujo Continuo utilizado en el presente trabajo. P: Bomba peristáltica, V: Válvula selectora, C₁ y C'₁: Portador C_M: Muestra (o soluciones estándar); C₂, C'₂: Tionina

2.2 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el agua utilizada fue purificada en un sistema Milli-Q TOC (Millipore). En el resto del trabajo se hará mención de la misma como DI.

Se preparó una solución patrón de nitrito de 1000 mg l^{-1} a partir de nitrito de sodio (Analar) secado previamente en una estufa durante 5 horas a una temperatura de $110 \text{ }^\circ\text{C}$. Se pesaron $1,5148 \text{ g}$ de NaNO_2 , los cuales fueron disueltos y llevados a un volumen final de 1 litro con agua DI. A esta solución se le colocó 1 g de NaOH para prevenir la liberación de ácido nitroso y 1 ml de cloroformo, grado espectroscópico, para prevenir el desarrollo bacterial. Las soluciones estándar se prepararon diariamente por dilución adecuada del stock en agua DI.

Se preparó 1 litro de solución de H_2SO_4 15% (v/v) por dilución adecuada de ácido sulfúrico concentrado. Se prepararon 500 ml de una solución $8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ de tionina (ACROS) en medio de H_2SO_4 $1,5 \%$ (v/v). Para esto se disolvieron $0,0105 \text{ g}$ del reactivo en agua DI, se adicionaron 50 ml de ácido sulfúrico 15% (v/v), y finalmente se llevó a un volumen final de 500 ml . Esta solución es estable, bajo refrigeración, durante una semana. Para los estudios de optimización se prepararon soluciones con concentraciones de tionina y H_2SO_4 adecuadas a los requerimientos.

Se prepararon 500 ml de una solución $0,15 \text{ M}$ de Bromato de potasio disolviendo $12,525 \text{ g}$ de KBrO_3 (Riedel-de Haen) en agua y llevando a aforo hasta 500 ml con agua DI.

Las soluciones de trabajo se prepararon en forma diaria, por dilución adecuada de las soluciones descritas con anterioridad.

2.3 Tratamiento de las muestras

En este trabajo se analizaron muestras de aguas de río provenientes de la ciudad de Mérida (Albarregas y Chama), así como de aguas servidas por Aguas de Mérida. La toma y conservación de las muestras se llevo a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Burguera y colaboradores ⁽¹⁶⁾. Las mismas fueron filtradas utilizando un filtro de membrana con tamaño de poro de $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ y conservadas en refrigeración a una temperatura de 4°C . Las muestras fueron analizadas en un tiempo máximo de 12 h después de su

recolección.

2.4 Procedimiento

Los reactivos y muestras fueron colocados a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) en sus respectivos canales como se indica en la Figura 1, bajo las condiciones experimentales que se indican en la Tabla 1. Es importante destacar que el diseño utilizado corresponde a un doble sistema de flujo que incorpora un espectrofotómetro de doble haz como detector, en el cual el recorrido del blanco corresponde a una imagen especular del correspondiente a la muestra.

La duración y función de cada una de las etapas involucradas en el procedimiento propuesto se detallan en la Tabla 2. La bomba peristáltica (P), se mantiene encendida durante todo el análisis para propulsar de forma continua al agua DI (C_1, C_1') y a las soluciones de tionina ácida (C_2, C_2'), y de bromato (C_3, C_3'). El análisis se desarrolla en tres etapas: i) iniciación del sistema, ii) introducción de la muestra (estándar) y iii) adquisición del espectro de absorción (ver Tabla 2). En la etapa de iniciación, se calibra el sistema haciendo pasar en forma simultánea y sincronizada a la solución ácida de tionina previamente mezclada con la solución de BrO_3^- en R y R', a través de las celdas de trabajo y referencia. En esta etapa la válvula selectora de canales hace pasar agua por el canal C_1 . Bajo esas condiciones se establece el *background* del sistema y se toma el espectro real del blanco del sistema en una modalidad continua en la región espectral comprendida entre 700 y 400 nm, utilizando una velocidad de barrido de 960 nm min^{-1} . La duración de esta etapa de es aproximadamente 108 s.

Tabla 1 Condiciones de operación del sistema

Parámetros	Valor
Espectrofotómetro	
Velocidad de barrido nm min^{-1}	960
Resolución (nm)	1
Intervalo espectral (nm)	400- 700
Criterio de medida	El valor absoluto de la absorbancia a 599 nm corregida por una línea de base establecida entre 700 y 400 nm
Sistema de análisis en flujo (AF)	
Concentración de bromato de potasio (canales C_3 y C'_3)	0,06 M
Caudal del reactivo bromato de potasio (C_3 , C'_3)	$1,3 \text{ ml min}^{-1}$
Concentración de tionina (Canales C_2 y C'_2)	$8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$
Concentración de ácido sulfúrico en la Tionina	1,5 % (v/v)
Caudal de la Tionina en H_2SO_4 (C_2 , C'_2)	$1,3 \text{ ml min}^{-1}$
Caudal de muestra o estándar (C_M)	$1,6 \text{ ml min}^{-1}$
Caudal del portador, agua DI (C_1 y C'_1)	$1,6 \text{ ml min}^{-1}$
Temperatura del baño	$32,5 \text{ }^\circ\text{C}$
Serpentines de reacción (R y R')	600 cm (0,8 mm d.i)

Tabla 2 Secuencias de operación del sistema utilizado

	Secuencia/Función	Tiempo	Espectrofotómetro	P_1
Iniciación del sistema ^a				
I-a	Introducción del portador	80 s	-----	ON
I-b	Definición del <i>background</i>	19 s	Background	ON
I-c	Espectro del blanco	19 s	Scans	ON
0	Etapas de limpieza ^b	60 s	-----	ON
1	Llenado	80 s	-----	ON
2	Espectro de la muestra	19 s	Scans	ON

^a La iniciación del sistema se realiza solo al comienzo de la sesión experimental

^b Esta etapa solamente se realiza cuando se introduce al sistema una nueva muestra o soluciones estándar

En la segunda etapa, V se activa para introducir la muestra (estándar) a través del canal C_M , en el sistema. La muestra tarda cerca de 70 s en llegar a la celda; sin embargo el tiempo de esta etapa se fijó en 80 s, con el fin de asegurar un adecuado llenado del sistema y evitar de esa forma efectos de memoria. A continuación la muestra se mezcla con la solución ácida de tionina y la solución resultante se mezcla nuevamente con la solución de bromato en el serpentín de reacción R, que está sumergido en un baño de agua cuya temperatura está controlada en $32,5 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$. De esta forma la reacción de oxidación de la

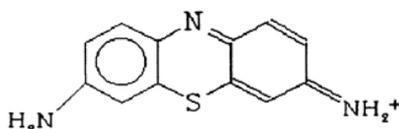
tionina por el ión bromato se ve catalizada por la presencia de los iones nitrito y por el efecto térmico. Finalmente la solución resultante fluye a través de la celda de trabajo y va al drenaje. En este momento se activa el comando scans del espectrofotómetro (etapa 3) y se adquiere el espectro de absorción por triplicado entre 700 y 400 nm, a una velocidad de 960 nm min^{-1} . La adquisición de cada espectro requiere de 19 s. Por lo tanto, el tiempo necesario para el análisis de una muestra por triplicado desde el momento en que se introduce al sistema es de aproximadamente 2,3 minutos. Cuando se va a introducir una nueva muestra (estándar) al sistema, se hace activa la válvula selectora y se propulsa agua por el canal el por un periodo de 30 s (ver etapa 0, Tabla 2) con el fin de limpiar el sistema y evitar problemas de memoria. En este punto, es importante destacar nuevamente que en el sistema propuesto, el blanco hace un recorrido equivalente, paralelo al de la muestra, lo cual garantiza que la muestra y el blanco fluyen en forma sincronizada y simultánea a través de las celdas de trabajo y referencia, respectivamente (ver Figura 1). Este diseño experimental garantiza que el espectro de absorción que se obtiene, esté corregido en tiempo real y en forma adecuada por el grado de oxidación de la tionina producido por el bromato, en ausencia de nitrito.

La absorbancia a 599 nm de los espectros de absorción obtenidos en el sistema descrito, corregida mediante una línea de base establecida entre 700 y 400 nm, se evalúa en estándares y muestras. Los datos obtenidos para las muestras se interpolan en la curva de calibración construida a partir de estándares introducidos en el sistema en forma análoga a las muestras.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estudios preliminares en "batch". Espectros de absorción de los reactivos

La tionina ha sido utilizada como un indicador redox ⁽¹⁷⁾, así como en la determinación de ciertos oxidantes como el Vanadio (V), Cromo (VI), etc. ⁽¹⁸⁾. Se ha encontrado que algunos oxidantes como el iodato, el clorato y el bromato, en presencia de trazas de nitritos, oxidan de forma irreversible a la tionina en medio ácido, siendo el producto de la reacción incoloro. Por otra parte, en ausencia de nitritos, la reacción procede muy lentamente ⁽¹³⁾.



Estructura de la Tionina

Las experiencias preliminares se llevaron a cabo en "batch", utilizando celdas estándar de cuarzo de 1 cm de paso óptico y con una velocidad de barrido de 960 nm min⁻¹, utilizando agua como referencia.

Inicialmente se estudiaron los espectros de absorción de los diversos reactivos involucrados en el sistema, así como el efecto de la oxidación de la tionina por parte del bromato en presencia y en ausencia del ión nitrito. La tionina presenta absorción entre 650 y 425 nm (ver Figura 2a), con un máximo bien definido en 599 nm, y un hombro situado en 562 nm; mientras que las soluciones de H₂SO₄, BrO₃⁻ y NO₂⁻ son totalmente transparentes en la región espectral bajo estudio. El producto de la oxidación de la tionina no absorbe en esta región espectral ⁽¹³⁾. Por su parte, en las Figuras 2b-e se muestra el efecto de la oxidación de la tionina por parte del bromato en ausencia de nitritos (Fig. 2b) y en presencia de concentraciones crecientes de NO₂⁻ entre 2 y 5 µg NO₂⁻ l⁻¹ (Fig. 2c-e). Este efecto se manifiesta por una depresión del espectro de absorción, que es proporcional a la concentración del ión nitrito. Sin embargo, es

importante destacar que bajo las condiciones experimentales de trabajo se produce la oxidación de la tionina por parte del bromato aun en ausencia de NO_2^- , como se observa en la Figura 2b.

Para estas experiencias se adicionaron en forma manual y secuencial en un aforado de 10 ml las soluciones de nitrito (para dar una concentración final 0 y $5 \mu\text{g l}^{-1}$) tionina ácida y bromato, siguiendo el procedimiento descrito por Jiang y colaboradores ⁽¹³⁾. Las soluciones fueron mantenidas durante 3 min en un baño de agua a $32,5^\circ\text{C}$. Al cabo de ese tiempo la reacción de oxidación de la tionina fue detenida por adición de 0,3-0,4 g de úrea sólida ^(4,13). Es importante destacar que el conteo del tiempo se comienza tras la adición de la solución de bromato.

Los resultados obtenidos en estas experiencias preliminares indican claramente que la reacción de oxidación de la tionina por parte del bromato, en medio ácido, se desarrolla a diferentes velocidades en presencia y ausencia de nitritos. Esta condición impone la necesidad de un sistema en el que las condiciones experimentales sean muy controladas, y en el que se establezca como referencia una solución de tionina oxidada exclusivamente por el bromato.

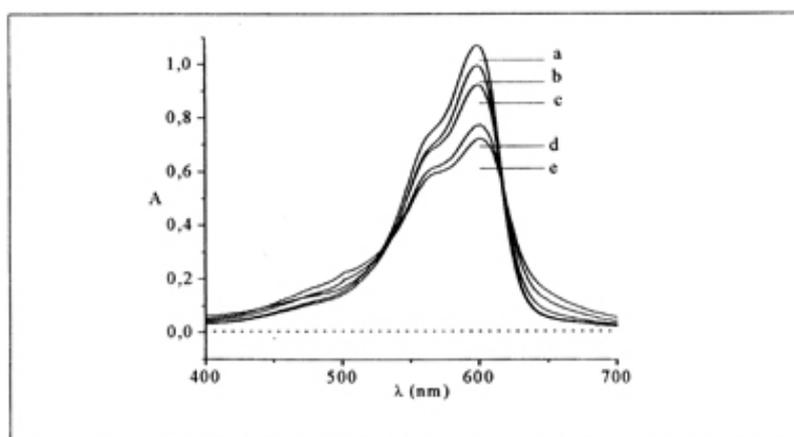


Figura 2 Espectro de absorción de una solución $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ de tionina. Condiciones: a: en 1,5 % v/v H_2SO_4 , b: en 1,5 % v/v H_2SO_4 y 0,06 M de KBrO_3 , c-e: en 1,5 % v/v H_2SO_4 y 0,06 M de KBrO_3 y concentraciones variables de nitrito entre 2 y $5 \mu\text{g l}^{-1}$.

3.2 Estudios preliminares en el sistema de flujo

Los resultados iniciales en el sistema de flujo se realizaron utilizando agua en la celda de referencia. Para este propósito se estableció el *background* y el blanco del sistema haciendo pasar agua por todos los canales de los módulos de referencia y de trabajo (Ver Figura 1). A continuación se hace pasar agua DI y las soluciones de tionina ácida y bromato por los canales C_1 , C_2 y C_3 del módulo de trabajo, mientras se continua pasando agua DI por los canales C_1' , C_2' y C_3' del módulo de referencia y se establece el espectro de absorción de referencia de la tionina oxidada por el bromato (Ver Figura 3A-a). Finalmente se activa la válvula de selección, se introduce en el sistema la solución de nitritos a través del canal CM y se adquiere el nuevo espectro de absorción (Ver Figura 3A-b). La Figura 3B-a presenta el espectro de absorción obtenido mediante espectroscopia substractiva (diferencia entre los espectros 3A-a y 3A-b). Para validar el diseño experimental propuesto, se estableció inicialmente el *background* y el blanco del sistema haciendo pasar agua DI, solución ácida de tionina y de bromato por los canales C_1 y C_1' , C_2 y C_2' y C_3 y C_3' respectivamente. A continuación se introduce la solución de nitritos a través del canal CM, y se obtiene directamente el espectro corregido como se ilustra en la Figura 3B-b. El espectro obtenido por este procedimiento corresponde a la imagen especular del obtenido por espectroscopia substractiva. Entonces, los espectros obtenidos por ambos procedimientos (Figuras 3B-a y 3B-b) son idénticos, pero de signo contrario, lo cual establece la validez del sistema propuesto.

El diseño experimental propuesto aporta diversas ventajas, entre las cuales destacan: i) se obtiene directamente el espectro de absorción corregido por la oxidación de la tionina producida por el bromato (en ausencia de nitritos), ii) la corrección se hace en tiempo real, y iii) se corrigen directamente los efectos que pueden generar pequeñas fluctuaciones en parámetros experimentales como la temperatura, etc. en la absorción de soluciones de referencia y trabajo.

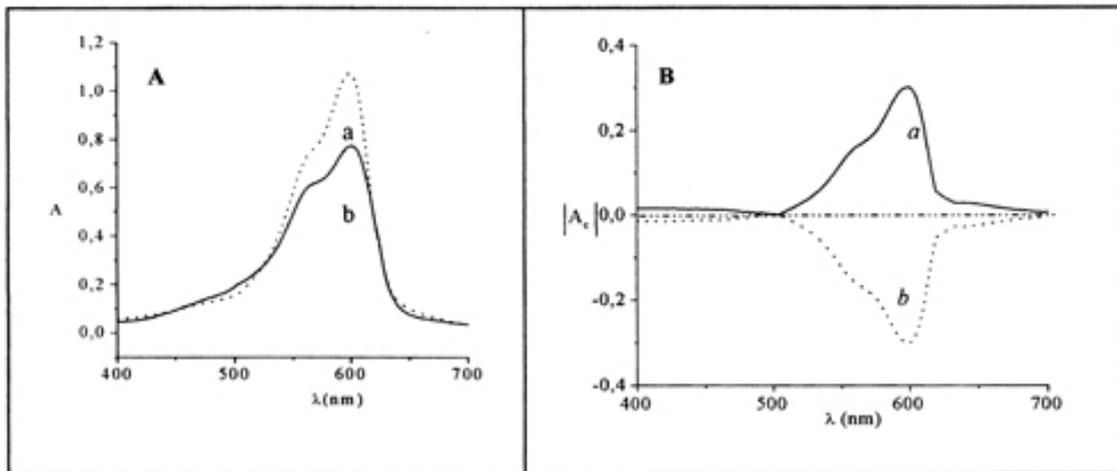


Figura 3 Espectros de absorción de la tionina. A: (a): Solución de tionina ácida en presencia de bromato y (b): solución de tionina ácida en presencia de bromato y una cantidad conocida de nitritos, utilizando agua en el módulo de referencia. B: (a) Espectro obtenido de la substracción de A(a) y A(b). (b): espectro que se obtiene cuando se hace pasar la tionina acidificada y el bromato por el módulo de referencia y por el modulo de trabajo se hace pasar las mismas soluciones pero en presencia de nitrito.

3.3 Criterio de medida

Existen diversos criterios de medida que pueden ser utilizados, como son: la absorbancia a 599 nm corregida por varias líneas de base, el área integrada, etc. Sin embargo, en el presente trabajo, el criterio de medida seleccionado fue el valor absoluto de la absorbancia a 599 nm, obtenida a partir del espectro de absorción, corregida por una línea de base establecida entre 700 y 400 nm.

3.4 Optimización de las condiciones de operación

Inicialmente se probaron diversos montajes y relaciones de flujos con el objeto de seleccionar la mejor configuración para el sistema de análisis propuesto. El ensamblaje que se muestra en la Figura 1, produjo el mejor compromiso entre la señal analítica, la reproducibilidad y el tiempo de análisis.

En el sistema propuesto, existen diversos parámetros instrumentales, de la

reacción química y del sistema de flujo que deben ser optimizados. La concentración de los diversos reactivos, la longitud de los serpentines de reacción y la temperatura fueron optimizados por el método univariado, mientras que los parámetros instrumentales y el caudal de los diversos canales fueron seleccionados en base a experiencias previas desarrolladas en nuestro laboratorio (Ver Tabla 1). Sin embargo, tras cada optimización se chequeó la validez de los parámetros previamente seleccionados. Todas estas experiencias se llevaron a cabo con una solución de $4 \mu\text{g NO}_2^- \text{L}^{-1}$.

3.5 Selección de los parámetros instrumentales

Con respecto a los parámetros instrumentales, se fijó el intervalo espectral en 700-400 nm, ya que define completamente el espectro de absorción de la tionina (ver Figura 2a). Por otra parte, experiencias previas desarrolladas en nuestro laboratorio sobre la adquisición de espectros de absorción en sistemas de flujo con detección espectrofotométrica en modo continuo⁽¹⁹⁻²¹⁾, indican que la velocidad de barrido tiene muy poca influencia sobre la calidad del espectro de absorción. En este punto, es importante destacar que el espectrofotómetro Perkin Elmer, Lambda 20, fija automáticamente la resolución en 1 nm, independientemente de la velocidad de barrido seleccionada. Sobre la base de estos resultados se fijó la velocidad de barrido en 960 nm min^{-1} , con el objeto de minimizar el consumo de reactivos y el tiempo de análisis.

3.6 Optimización de los parámetros relacionados con las reacciones químicas

Está bien establecido en la literatura, que la oxidación de la tionina en medio ácido por parte del ión bromato es una reacción lenta, y es acelerada por la presencia de trazas de nitrito. Sin embargo, la reacción de oxidación procede en cierta extensión, aún en ausencia de nitritos.

La reacción de oxidación de la tionina, y por lo tanto la disminución en la absorción de la misma está fuertemente influenciada por la concentración de los diversos reactivos involucrados en el sistema (tionina, H_2SO_4 , NO_2^- , BrO_3^-)

así como con el tiempo de medida. Este último parámetro se relaciona directamente con el tiempo de residencia, el cual depende de la longitud de los serpentines de reacción y con la velocidad de flujo de los diversos canales.

Inicialmente se estudió el efecto de la concentración de tionina sobre la sensibilidad del sistema. La Figura 4A muestra el efecto de la concentración de tionina en el intervalo comprendido entre $1 \cdot 10^{-5}$ y $1 \cdot 10^{-4}$ M sobre la señal analítica de la solución bajo estudio. Los resultados indican que la señal analítica se incrementa con la concentración de tionina; sin embargo, para concentraciones superiores a $8 \cdot 10^{-5}$ M se observa la formación de un precipitado. Sobre la base de estos resultados se seleccionó una concentración de $8,1 \cdot 10^{-5}$ M para el resto del trabajo, que coincide con la concentración de tionina seleccionada por Jiang y colaboradores ⁽¹³⁾.

La reacción de oxidación por parte del ión bromato requiere de un medio ácido. Por otra parte, está bien establecido en la literatura que el efecto catalítico por parte de los iones nitritos también está afectado por la acidez del medio, siendo el pH óptimo inferior a 3 ⁽¹⁴⁾. Jiang y colaboradores ⁽¹³⁾ estudiaron el efecto de diversos ácidos como HCl, H₃PO₄ y H₂SO₄ sobre la oxidación de la tionina por el bromato de potasio, encontrando los mejores resultados con el uso de ácido sulfúrico. En el presente trabajo, el ácido se incorporó directamente en la solución de tionina ⁽¹⁵⁾. Sobre la base de esta información, se estudió el efecto de la concentración de H₂SO₄ en la solución de tionina en el intervalo de 0 a 2,0 % (v/v) sobre la señal analítica de la solución de referencia. Los resultados encontrados que se presentan en la Figura 4B, muestran que la señal crece con la concentración de ácido, alcanzando un máximo definido a una concentración de 1,5 % (v/v). Para concentraciones de ácido sulfúrico superiores, la señal analítica ($|A_C|$) disminuye drásticamente, lo que indica que bajo esas condiciones experimentales, la oxidación de la tionina por parte del bromato en ausencia de nitritos (A_0), es superior a la oxidación que se produce en presencia del ión NO₂⁻ (A), lo que se traduce en una disminución de la sensibilidad del sistema.

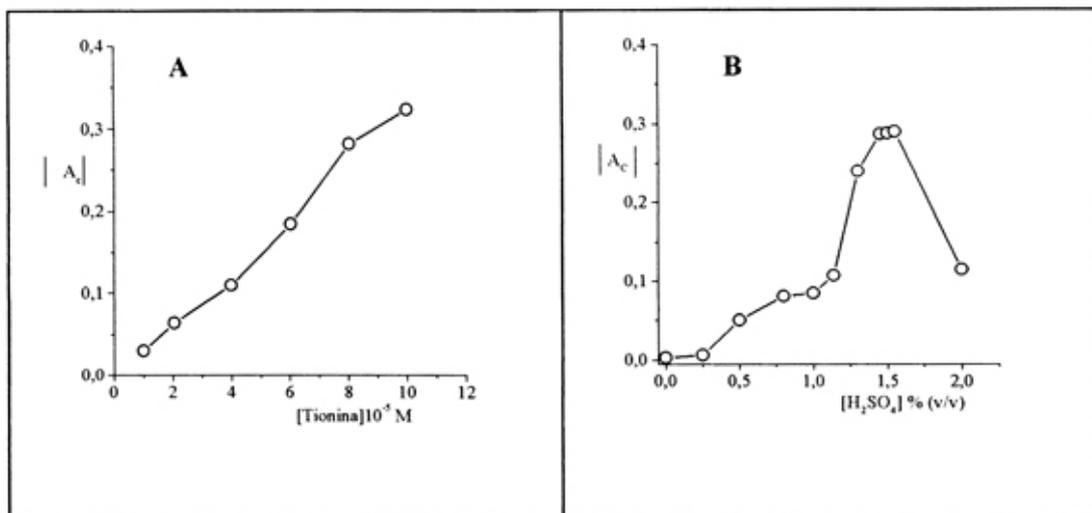


Figura 4 A: Efecto de la concentración de tionina sobre la sensibilidad. Condiciones $KBrO_3$ 0,06 M; H_2SO_4 1,5 % v/v y temperatura 32,5 °C. **B:** Efecto de la concentración de ácido sulfúrico sobre la señal analítica de una solución de $4 \mu g$ de $NO_2^- L^{-1}$. Condiciones: $[tionina] 8 \cdot 10^{-5} M$, $KBrO_3$ 0,06 M y temperatura 32,5 °C.

La concentración del ión bromato es un parámetro crítico en el sistema, ya que es el agente oxidante y en cierta forma es el que establece la señal de referencia. El efecto de la concentración de BrO_3^- en el intervalo de 0,025 a 0,1 M sobre la señal analítica de la solución de referencia se presenta en la Figura 5. La señal crece fuertemente con la concentración del oxidante, y alcanza un máximo entre 0,055 y 0,065 M. Mayores incrementos en la concentración producen una pronunciada caída en la señal analítica, lo que deprime la sensibilidad del sistema. Sobre la base de estos resultados se seleccionó una concentración de $KBrO_3$ 0,06 M para el resto del trabajo.

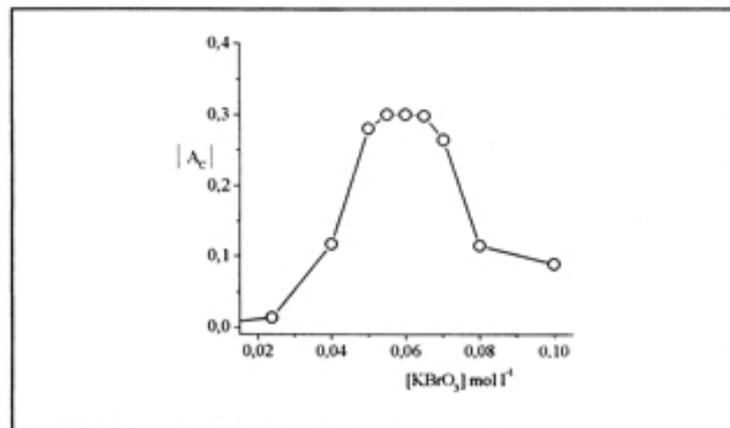


Figura 5. Efecto de la concentración de bromato de potasio sobre la señal de absorbancia de una solución de $4 \mu\text{g NO}_2^- \text{ l}^{-1}$. Condiciones [tionina] $8 \cdot 10^{-5}$ M en H_2SO_4 1,5 % v/v y temperatura $32,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

La oxidación de la tionina por el ión bromato, aún en presencia de nitritos es lenta. Esta reacción puede ser acelerada mediante una catálisis térmica ⁽¹³⁾. La Figura 6, muestra el efecto de la temperatura del baño de agua (ver Figura 1) entre 27 y 36°C (ver Figura 1) sobre la señal analítica. La absorbancia de la muestra aumenta rápidamente con la temperatura hasta alcanzar un máximo a $32,5 \text{ }^\circ\text{C}$. Mayores incrementos en este parámetro deprimen la señal analítica considerablemente, lo que indica claramente que la temperatura aumenta de manera importante la velocidad de reacción entre el bromato y la tionina. Sobre la base de estos resultados se fijó una temperatura de operación de $32,5 \text{ }^\circ\text{C}$ para el resto del trabajo.

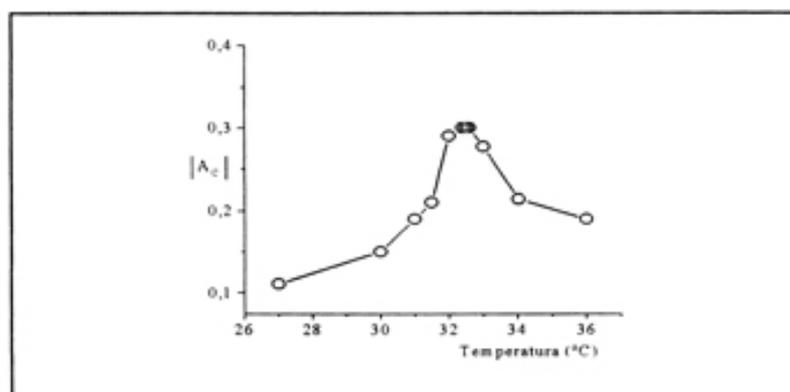


Figura 6 Efecto de la temperatura sobre la respuesta instrumental que genera una solución de $4 \mu\text{g NO}_2^- \text{ L}^{-1}$. Condiciones: KBrO_3 : 0,06 M; H_2SO_4 1,5 % v/v, [Tionina] $8 \cdot 10^{-5}$ M.

3.7 Optimización de los parámetros del sistema de flujo

El efecto de la catálisis térmica está directamente relacionada con el tiempo de residencia, el cual está definido por el caudal de los diversos canales, así como por la longitud del serpentín de reacción (R).

Inicialmente se estudió el efecto de la longitud del serpentín de reacción (R y R') en el intervalo de 0 a 1000 cm, que corresponde a un tiempo de residencia de 0 a 143 s, sobre la señal analítica de nuestra solución de referencia. Los resultados encontrados, que se presentan en la Tabla 3, indican que la señal analítica se incrementa con la longitud del serpentín hasta los 600 cm, a partir de lo cual mayores incrementos en este parámetro se traducen en una disminución de la sensibilidad. Sobre la base de estos resultados se seleccionó un valor de 600 cm para el resto del trabajo.

Tabla 3 Efecto de la longitud del serpentín de reacción (R y R')

Longitud (cm)	Señal analítica
0	0,025 ± 0,001
100	0,050 ± 0,001
200	0,095 ± 0,001
400	0,170 ± 0,001
500	0,210 ± 0,001
600	0,282 ± 0,002
800	0,115 ± 0,002
1000	0,065 ± 0,001

3.8 Características analíticas del sistema

El sistema se caracterizó analíticamente bajo las condiciones experimentales que se indican en la Tabla 1. La ecuación de la curva de calibración obtenida con estándares de nitrito entre 0 y 8 $\mu\text{g NO}_2\text{L}^{-1}$ fue: $|A_c| = -0,0069 + 0,07827 [\text{NO}_2^-]$, con un coeficiente de regresión (r) de 0,9991; en donde A_c representa la absorbancia de las soluciones de trabajo a 599 nm corregida mediante una línea de base establecida entre 700 y 400 nm y $[\text{NO}_2^-]$ la concentración de nitritos expresada en $\mu\text{g L}^{-1}$. El límite de detección (3σ) definido como 3 veces

la desviación estándar del blanco fue de $0,2 \mu\text{g l}^{-1}$, mientras que el límite de cuantificación (10σ) fue de $0,6 \mu\text{g l}^{-1}$. La precisión del sistema, expresada mediante la desviación estándar relativa de 6 medidas independientes de una solución de $4 \mu\text{g NO}_2^- \text{l}^{-1}$, fue de 1,9 %.

3.9 Estudios de recuperación

Para esta experiencia se utilizaron muestras de aguas de ríos de la zona; fortalecidas con cantidades exactamente conocidas de nitrito dentro del intervalo de trabajo. Las mismas fueron analizadas por triplicado y los resultados obtenidos, que se presentan en la Tabla 4, fueron en todos los casos cuantitativos (98-102 %).

Tabla 4 Estudios de recuperación

Muestra	[NO ₂ ⁻] añadido $\mu\text{g L}^{-1}$	[NO ₂ ⁻] encontrado $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperación (%)
1	0	< LD*	---
	2	2,02	102
	2,5	2,52	100
2	0	< LD*	---
	1	0,98	98
	2	1,98	99

* LD: Límite de detección

3.10 Estudio de interferencias

Se estudió el potencial efecto interferente de más de 40 especies aniónicas y catiónicas que pueden estar presentes en las muestras de agua. El límite de tolerancia se definió como la máxima cantidad de interferente cuyo efecto sobre la señal analítica de una solución de 4 ng NO_2^- fuese inferior a $\pm 5 \%$. Los resultados obtenidos muestran que el método presenta una muy elevada tolerancia a grandes cantidades de cationes metálicos alcalinos y alcalinotérreos, así como a diversos aniones comunes en muestras de aguas. De igual forma muestra una gran tolerancia a especies nitrogenadas como el amoníaco y los nitratos. Especies como CO_3^{2+} , Ti^{4+} , Hg^{2+} , Br^- y CN^- son tolerados en una relación $m_{\text{Interferente}}/m_{\text{Nitrito}} = 50:1$, mientras que el Fe^{3+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ag^+

muestran su efecto interferente a partir de una relación 200:1. Cationes como el Cr^{3+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+} y Hg^{+2} no muestran ningún efecto sobre la señal analítica aún en relaciones superiores a 1000: 1

Los aniones I^- y S^{-2} son los mayores interferentes, siendo su límite de tolerancia de 50 ng ml^{-1} . El efecto interferente de los yoduros se puede eliminar por adición de Hg^{+2} , mientras que los sulfuros pueden ser eliminados bajo la forma de H_2S . Los cloruros, que están presentes en aguas potables interfieren cuando están presentes en una concentración superior a 3 mg l^{-1} . Por esta razón deben ser eliminados cuando se analizan este tipo de aguas.

Tabla 5 Comparación de las figuras de merito de algunos métodos basados en la reacción de Griess para la determinación de nitritos en aguas.

Muestra	Volumen de muestra (μl)	Intervalo Dinámico ($\mu\text{g NO}_2 \text{ l}^{-1}$)	Límite de detección ($\mu\text{g NO}_2 \text{ l}^{-1}$)	CV (%)	Frecuencia de análisis (h^{-1})	Ref.
Aguas de mar	100	46 - 150	2,3	1	30	22
Aguas superficiales y subterráneas	100	520 - 1500	-	0,83	72	23
Aguas de río	-	0 - 10.000 ^b	100	1,9	22	24
Agua de desecho urbano	92	56 - 5000	200	1,1	60	25
Aguas de lluvia, mar, lagos y corrientes	1 ml	13,4 - 160	5,9	4	15	7 ^a
	10 ml	0,83 - 20	0,32	2,8	3	

^a Sistema de preconcentración en línea. Para 1 ml de muestra el factor de preconcentración fue 17 y para 10 ml 170.

Tabla 6 Comparación de figuras de merito de algunos métodos cinético con los obtenido en este trabajo.

Muestra	Especie orgánica	Intervalo Dinámico ($\mu\text{g NO}_2^- \text{ l}^{-1}$)	Límite de Detección ($\mu\text{g NO}_2^- \text{ l}^{-1}$) ^a	CV (%)	Frecuencia de análisis (h^{-1})	Ref
Aguas naturales	Rojo Pirogalol	3-1000	1	1,8	Manual	4
Alimentos y agua	Rojo Pirogalol	3-1500	1	1,6	20	5
Aguas naturales	Verde de B Nnaftol	2 - 200	0,5	2	50	8
Aguas de río	Pyridene-2-aldehyde 2-pyridylhydrazone	40 - 4000		1,5	Manual	9
Agua y productos alimenticios	Gallocyanina	10 - 2500	1	1,7	20	10
Aguas	Ácido carminico	0,2 - 14	0,04	1,7	Manual	12
Aguas naturales	Tionina	0,32-55,2	0,09	2,6	Manual	13
Aguas naturales	Verde de B Naftol	2 - 200	0,5	2	30	14
Aguas naturales	Tionina	0,6-8	0,2	1,9	21	*

* Este trabajo

4 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se desarrolló un método cinético automatizado basado en el acoplamiento de un sistema de flujo dual con detección espectrofotométrica para la determinación de nitritos en aguas. Por otra parte, a pesar de utilizar un doble sistema de flujo, el consumo de reactivos está en el mismo orden de otros desarrollos metodológicos que utilizan sistemas de inyección en flujo con detección espectrofotométrica, debido a los bajos caudales utilizados, así como a la velocidad de barrido seleccionada. Sin embargo, la incorporación en el sistema de un detector de arreglo de diodos, permitiría disminuir el consumo de reactivos en una proporción realmente importante y atractiva.

El diseño experimental propuesto, permite la adquisición directa y en tiempo real del espectro de absorción corregido por el grado de oxidación producido por el bromato en ausencia de nitritos, lo cual representa una ventaja atractiva frente a otros desarrollos metodológicos propuestos en la literatura. Adicionalmente, el disponer del espectro de absorción corregido, abre un abanico de posibilidades en la selección del criterio de medida como son el uso

de la espectroscopia derivativa, o el uso de áreas integradas, que podrían incrementar la sensibilidad del sistema.

La sensibilidad del método es superior a la que ofrecen los desarrollos metodológicos que se fundamentan en la reacción de Griess, e incluso compiten abiertamente con algunos métodos que incorporan etapas de preconcentración, como se indican en la Tabla 5. Por otra parte, las figuras de mérito obtenidas son comparables a las reportadas para otros métodos cinéticos, como se observa en la Tabla 6.

La simplicidad del método, así como las figuras de mérito que presenta, lo hacen adecuado para el análisis rutinario de nitritos en aguas. Adicionalmente, con algunas modificaciones podría ser la base para la determinación secuencial de nitritos y nitratos en agua, mediante la incorporación de un sistema reductor en la configuración propuesta.

5 BIBLIOGRAFÍA

1. Fox J.B. The determination of nitrite: A Critical Review. CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry. 15, (3) 283-313, 1985.
2. Matthew J Moorcroft, James Davis, Richard G. Compton. Detection and determination of nitrate and nitrite: a Review. Talanta. 54. 785-803, 2001.
3. Gallignani M., Valero M., Sánchez A. Brunetto R., Burguera J.L, Burguera M. La Determinación de nitritos. Parte I. Métodos fundamentados en la espectroscopia de absorción molecular en el ultravioleta visible. Sociedad Venezolana de Química. 24, 3-15, 2001.
4. Ensafi A. and Samimifar M. Kinetic Spectrophotometric determination of low levels of nitrite by catalytic reaction between pyrogallol red and bromate. Talanta. 40, 1375-1378, 1993.
5. Kazemzadeh A., Ali A, Ensafi. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow-injection with spectrophotometric detection. Microchemical Journal. 69, 159-166, 2001.
6. Nikonorov V. V. and Moskvina L. N. Spectrophotometric determination of nitrite with 4-iodo-N,N-dimethylaniline. Analytica Chimica Acta. 306, 357-

360, 1995.

7. Miró M., Cladera A., Estela J.M. and Cerdá V. Sequential injection spectrophotometric analysis of nitrite in natural waters using an on-line solid-phase extraction and preconcentration method. *Analyst.* 125, 943-948, 2000.
8. Zhang Zhi-Qi, Gao Lou-Jun, Zhan Han-Ying. Flow-injection catalytic spectrophotometric determination of nitrite using the redox reaction between naphthol green B and potassium bromate. *Talanta.* 47, 497-501, 1998.
9. Montes R. and Laserna J.J. Spectrophotometric Reaction-Rate Method for the Determination of nitrite in water with pyridene-2-aldehyde-2-pyridylhydrazone. *Talanta* 34, 1021-1026, 1987.
10. Ali A, Ensafi, Kazemzadeh A. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 382, 15-21, 1999.
11. Ensafi A. A. and Rezaii B. Kinetic-spectrophotometric determination of nitrite by its catalytic effect on the oxidation of brilliant cresyl blue by bromate. *Microchemical Journal.* 50, 169-177, 1994.
12. Manzoori J. L., Mohammad H. S., Haji-Shabani AM. Spectrophotometric determination of nitrite based on its catalytic effect on the oxidation of carminic acid by bromate. *Talanta.* 46, 1379-1386, 1998,
13. Mian Jiang, Fang Jiang, Jin Duan, Xueyuan Tang and Zaofan Zhao. Spectrophotometric determination of trace nitrite based on catalytic oxidation of thionine by potassium bromate. *Analytica Chimica Acta.* 234, 403-407, 1990.
14. Zhang Zhi-Qi, Gao Lou-Jun, Zhan Han- Ying. Catalytic Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate with a flow injection system. *Analytica Chimica Acta.* 370, 59-63, 1998.
15. Bettina Schweizer, Shihua Fan, Dr. Hanswilly Muller. Techniques for flow injection analysis in UV/Vis spectroscopy. Perkin Elmer Corporation. Vol II 152-156, 1993.
16. Burguera J. L., Burguem M., Belandria M.G. The amount of lead in

roadside soil and some lichen species and their correlation with motor vehicle traffic volume. in: J.P Vernet (Ed) heavy metals in the environmental. vol 2, CEP Consultants. pp 460-463, 1999.

17. Bishop E. Indicators, Pergamon, Oxford, 1972.
18. Sierra F., Sánchez-Pedreño C., Pérez-Ruiz., Martínez-Lozano C. Determination of periodate with photoreduced thionine. Analytica Chimica Acta. 94,129-133, 1977.
19. Sánchez. A. "Evaluación del contenido de nitritos y nitratos en aguas por inyección en flujo con espectroscopia de absorción molecular en el uv-visible". (Tesis de grado). Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela), 1999.
20. Gallignani M., Valero M. Lue M. Marcó, Capote T, Burguera J. L., Burguera M. Flow injection spectrophotometric determination of pyruvates in onions. 8th International Conference on flow analysis (Flow Analysis VIII).Warsaw, Poland. Book of Abstracts, 278, 2000.
21. Valero M., Gallignani M., Brunetto M. Lue M., Capote T, Burguera J. L., Burguera M. R., Determinación de piruvatos en cebollas por espectroscopia derivativa de absorción molecular en el uv-visible. V Congreso Venezolano de Química, Maracaibo (Venezuela), pp. 733-736, 2001.
22. Anderson LeiF. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow iniection analysis. Analytica Chimica Acta. 110, 123-128, 1979.
23. Jacobus F. Van Staden. Automated simultaneous determination of nitrate and nitrite by prevalve reduction of nitrate in flow-injection system Analytica Chimica Acta. 138, 403-408, 1982
24. Anatol Kojlo, Ewa Gorodkiewicz. Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in a flow-iniection system. Analytica Chimica Acta.302, 283-287, 1995.
25. Gabriel D., Baeza J., M. Valero F.
26. and Lafuente J. A novel FIA configuration for the simultaneous determination of nitrate and nitrite and its use for monitoring an urban

waste water treatment plant based on N/D criteria. *Analytica Chimica*
Acta 359, 173-183, 1998.

www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento-No Compartir

www.bdigital.ula.ve
CAPÍTULO 5
LA GENERACIÓN DE FASES GASEOSAS EN LÍNEA CON DETECCIÓN
POR ESPECTROMETRÍA INFRARROJA DE TRANSFORMADA DE
FOURIER (IR-TF). UNA NUEVA y PODEROSA TÉCNICA ANALÍTICA

RESUMEN

En el presente trabajo se hace una revisión crítica de los trabajos que han aparecido en la literatura especializada sobre la generación de fases gaseosas en línea, y su determinación vía espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (IR-TF). Se revisan diversos procedimientos analíticos reportados para la determinación de alcoholes y carbonatos en varias matrices, mezclas de tolueno, benceno y metil, ter-butil éter en gasolinas, y acetato de butilo, tolueno y metil etil cetona en solventes comerciales para pintura; cuyas figuras de mérito son adecuadas para las aplicaciones propuestas. En todos los casos, los resultados que se reportan muestran una buena coincidencia con aquellos obtenidos mediante métodos de referencia. También se revisa el desarrollo reciente del acoplamiento del análisis en flujo con generación de hidruros y detección por IR-TF para la determinación individual y simultánea de antimonio, arsénico y estaño, así como algunas aplicaciones propuestas para esta técnica. Todo esto con vistas a mostrar la real potencialidad analítica que presenta la técnica de generación de fases gaseosas con detección por espectrometría IR-TF.

1 INTRODUCCIÓN

La espectroscopia de absorción infrarroja en la modalidad de transmisión, tuvo su gran auge y desarrollo en el ámbito del análisis químico cualitativo y particularmente bajo la óptica de los químicos orgánicos. Es una técnica instrumental que se ha caracterizado, y se caracteriza, por ser una poderosa herramienta para la identificación de grupos funcionales, y en general, para la elucidación de estructuras moleculares ⁽¹⁾. Sin embargo, existen al menos 4 factores que han abierto las puertas de la espectrometría infrarroja al campo del análisis químico cuantitativo: i) la aparición en el mercado de los espectrómetros infrarrojos de transformada de Fourier (IR-TF), que incorporan las conocidas ventajas de Connes, Fellgett y Jacquinot ⁽²⁻⁴⁾, ii) la aparición en el mercado de nuevos materiales transparentes a la radiación infrarroja totalmente inertes al agua, iii) la comercialización de nuevas celdas, incluyendo celdas para ser utilizadas en sistemas de flujo, así como celdas de múltiples reflexiones que permiten trabajar con grandes pasos ópticos en fase gaseosa y iv) la incorporación de esta técnica instrumental por parte de los químicos analíticos. Como consecuencia de esto, a partir de los años 90, se ha visto un crecimiento importante en el número de trabajos publicados en las revistas más relevantes de la química analítica, en los que está involucrada la instrumentación IR-TF.

La espectrometría IR-TF es una técnica analítica simple y rápida, que proporciona valiosa información cuantitativa acerca de la composición de las muestras y de los efluentes cromatográficos ⁽⁵⁾. En general la espectrometría infrarroja se puede utilizar en muestras líquidas, sólidas y gaseosas. Sin embargo, el uso del IR-TF dentro del análisis cuantitativo presenta diversos inconvenientes. El análisis de líquidos o de muestras disueltas requiere la utilización de celdas con un paso óptico conocido, generalmente muy pequeño, y la selección previa de un solvente adecuado. Por lo general las limitaciones que imponen los solventes, los pasos ópticos utilizados, así como la transparencia e inercia química de los materiales de las ventanas de las celdas limita la aplicación de esta técnica dentro del análisis cuantitativo. Esta

situación es particularmente crítica cuando se trabaja en sistemas acuosos, en donde las zonas de transparencia son limitadas y los pasos ópticos requeridos inferiores en muchos casos a 0,05 mm^(6,7). En fase sólida, el uso y preparación de las pastillas con haluros alcalinos es laborioso y consume un tiempo importante. Además, se requiere la incorporación de un estándar interno para lograr que las medidas obtenidas sean independientes del paso óptico. En contraste, la fase gaseosa es muy adecuada para realizar determinaciones por espectrometría infrarroja⁽⁵⁾ debido a varios factores, entre ellos: i) la transparencia de los gases (los gases monoatómicos, así como los diatómicos homonucleares son inactivos en el IR), ii) la señal de fondo (*background*) de estos sistemas es muy baja, y iii) las celdas gaseosas de reflexiones múltiples, ofrecen la posibilidad de trabajar con grandes pasos ópticos (varios metros), que proporcionan buenas sensibilidades. Por estas razones, la espectrometría IR ha sido muy utilizada como forma de detección en cromatografía de gases^(5,8,9) y también para el análisis de muestra pirolizadas^(5,10,11)

En los últimos años han parecido en la literatura una serie de trabajos, en los cuales se volatiliza en forma selectiva al analito, o los analitos presentes en la muestra, y la fase gaseosa generada se analiza por espectrometría IR-TF. Todos estos trabajos utilizan sistemas de análisis por inyección en flujo, en los cuales la fase gaseosa se genera en línea. Esta metodología ha sido aplicada a la determinación de etanol en muestras de cloroformo estabilizadas con el alcohol⁽⁵⁾, en bebidas alcohólicas⁽¹²⁾ y en sangre;⁽¹³⁾ a la resolución de mezclas de alcoholes (etanol y metanol) en bebidas alcohólicas y productos cosméticos^(14,15), al análisis simultáneo de benceno, tolueno y metil, ter-butil éter en gasolinas⁽¹⁶⁾ y de acetato de etilo, tolueno y metil-etil cetona en solventes comerciales de pinturas⁽¹⁷⁾. También ha sido utilizada para la determinación de carbonatos en aguas^(18,19), sedimentos y apatitas carbonatadas^(20,21). En estos trabajos, las prestaciones analíticas de las metodologías propuestas compiten abiertamente con las correspondientes a los diversos métodos de referencia utilizados.

Recientemente, Galignani y colaboradores desarrollaron el acoplamiento del

análisis en flujo con la generación de hidruros, utilizando la espectrometría IR-TF como forma de detección ^(22,23) En este trabajo preliminar se describe la determinación individual y simultánea del antimonio, arsénico y estaño, mediante la generación de la estibina (SbH_3), la arsina (AsH_3) y el estannano (SnH_4). Estos investigadores, también realizaron un desarrollo metodológico basado en el acoplamiento mencionado, para la determinación de antimonio en muestras farmacéuticas (*glucantime*), obteniendo resultados precisos y exactos ^(22,24)

El principal objetivo del presente trabajo es hacer una revisión crítica de las diversas aplicaciones que han aparecido en la literatura especializada en los últimos años, sobre la generación de fases gaseosas y su detección vía IR-TF, y mostrar con ello la real potencialidad que tiene esta técnica analítica.

2 CONSIDERACIONES GENERALES-PRECEDENTES

En el año 1995, el grupo de Miguel de la Guardia, Salvador Garrigues y colaboradores de la Universidad de Valencia, España, publicó un trabajo titulado "*Vapour generation Fourier transform infrared spectrometry. A new analytical technique*" ⁽⁵⁾. En este trabajo se propone una nueva técnica para la introducción directa de las muestras en el análisis espectrométrico por IR-TF. La técnica se fundamenta en la introducción de un volumen discreto de muestra dentro de un reactor de volatilización calentado eléctricamente, en donde se volatiliza(n) "selectivamente" el (los) compuesto(s) que se desea(n) analizar. El montaje experimental (Ver Fig. 1) consiste en un sistema simple de análisis por inyección en flujo (AIF) de un solo canal en el cual se genera en línea una fase gaseosa; y que utiliza a la espectrometría IR-TF como forma de detección (AIF-GFG-IRTF). El sistema utiliza un canal con un portador gaseoso (N_2), e incorpora un reactor de volatilización de vidrio pyrex con un volumen interno de 2,5 ml, dentro del cual se inyectan las muestras (estándares) a través de un *septum*. La temperatura dentro del reactor se controla mediante una termocupla, y todo el sistema de calentamiento se opera mediante un controlador de calentamiento eléctrico externo. La fase gaseosa que se genera,

se transporta mediante un gas de arrastre dentro de una celda de gases IR, en donde se registran los espectros IR-TF ($2000 - 600 \text{ cm}^{-1}$) como una función del tiempo. En este trabajo se utilizó una celda de gases de reflexiones múltiples Wilmad, Modelo 3.2, equipada con ventanas de KBr, la cual está alineada en forma permanente. La celda presenta un volumen interno de 100 ml y un paso óptico de 3,2 metros.

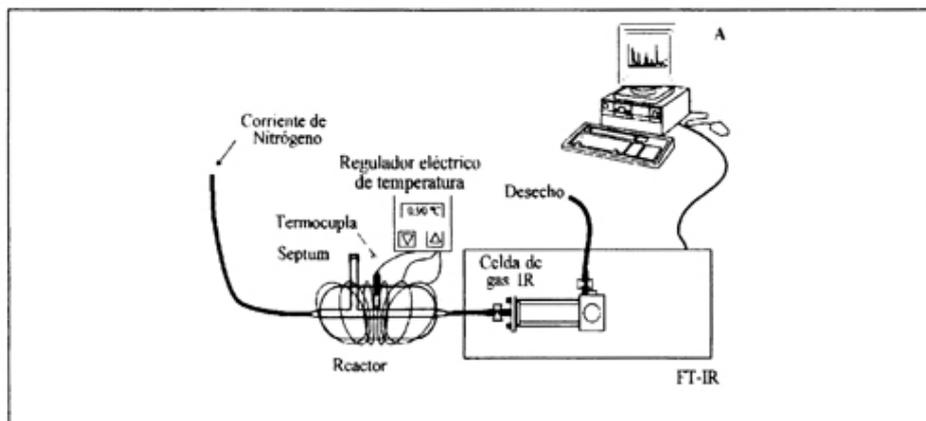


Figura 1 Diagrama esquemático del sistema propuesto de análisis por inyección en flujo de fase gaseosa y espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (AIF-GFG-IRTF) para la determinación de etanol en diversas matrices, mezclas de benceno, tolueno y MTBE en gasolinas, y mezclas de tolueno, acetato de butilo, y metil etil cetona en solventes para pinturas.

La metodología propuesta se utilizó para la determinación de etanol en muestras de cloroformo estabilizadas con este alcohol, bajo las siguientes condiciones experimentales: volumen de inyección = $25 \mu\text{l}$, temperatura del reactor = 90°C , resolución = 8 cm^{-1} , y flujo de $\text{N}_2 = 410 \text{ ml min}^{-1}$. La Figura 2A muestra los espectros IR-TF en fase gaseosa del cloroformo y el etanol puros (Fig. 2A-a), así como el correspondiente a una solución de CHCl_3 , estabilizada con 1 % (v/v) del alcohol (Fig. 2A-b). Las bandas analíticas seleccionadas para el etanol y el CHCl_3 fueron las de 1066 cm^{-1} y 931 cm^{-1} respectivamente. El criterio de medida utilizado fue el cociente entre las absorbancias de las bandas de 1066 cm^{-1} y 931 cm^{-1} , corregidas ambas por la absorbancia a 835

cm^{-1} . También se estudió como criterio de medida el uso del cociente entre los valores de la primera derivada de los espectros en las bandas mencionadas. Los autores indican que el uso del cociente como forma de calibración, produce resultados más exactos y precisos que los que se obtienen mediante el uso de la calibración clásica directa con las absorbancias corregidas. El trabajo presenta un estudio sistemático del efecto de diversos parámetros experimentales como son la temperatura del reactor, el volumen de inyección, la resolución y el flujo de Nitrógeno sobre la sensibilidad y precisión de las medidas analíticas. Las características analíticas del sistema propuesto obtenidas bajo las condiciones óptimas de trabajo indicadas, resultan adecuadas para la aplicación propuesta (Ver Tabla 1A). El método propuesto se utilizó para el análisis de cinco muestras comerciales de CHCl_3 estabilizadas con 1% (v/v) de etanol, y los resultados encontrados, que oscilan entre $1,01 \pm 0,02$ y $1,29 \pm 0,05$, no difieren significativamente con aquellos obtenidos mediante un procedimiento de referencia (AIF-NIR).

A partir de este trabajo preliminar, el grupo de Valencia ha realizado nuevas contribuciones, aplicando la metodología propuesta a diversas matrices. En este punto, es importante destacar que en los sistemas AIF que se van a discutir a lo largo del presente trabajo, inicialmente se registran los espectros como una función del tiempo. A continuación, sobre la base de la información adquirida, se definen los picos AIF (FIAGramas o quemigramas). Esto se logra definiendo un criterio para la medida instrumental, que puede ser la absorbancia a cierto número de onda, la absorbancia del máximo con corrección por línea de base, el área integrada en cierto intervalo espectral, etc. En este punto, se toma la medida instrumental definida, en cada espectro adquirido, y se registra como una función del tiempo. Esto se logra mediante el uso de softwares adecuados. En el presente trabajo no se discute este último tópico; sino que se hace hincapié en el criterio de medida instrumental seleccionado.

3 LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOLES (ETANOL y METANOL)

En esta sección se describirán algunos trabajos en los que se aborda la determinación de alcoholes (etanol y metanol), en forma individual (etanol), o en mezclas en matrices como bebidas alcohólicas, sangre y productos cosméticos.

Amparo Pérez-Ponce y colaboradores ⁽¹²⁾, proponen un procedimiento simple para la determinación de etanol en bebidas alcohólicas en un montaje similar al descrito en la sección anterior (Ver Fig. 1). El método se basa en la inyección de un volumen discreto de muestra (1 μ l) dentro del reactor, que se mantiene a una temperatura de 80-100 °C. Bajo estas condiciones el etanol es volatilizado e introducido en la celda de gases mediante un flujo de nitrógeno de 300 ml min^{-1} , trabajando a una resolución de 8 cm^{-1} . La celda de gases es la misma descrita en la sección anterior, pero en esta ocasión equipada con ventanas de ZnSe. La Figura 2B-a presenta los espectros IR-TF en fase gaseosa obtenidos en el sistema propuesto del agua (- - -) y de una solución de etanol 10 % (v/v) en agua (- - -). El etanol muestra una serie de bandas potencialmente útiles, entre las cuales los autores seleccionaron con fines analíticos la banda de 1050 cm^{-1} . Por su parte, la Figura 2B-b muestra el comportamiento de esta banda en una solución acuosa de etanol al 10 % (v/v), así como en muestras de vino y cervezas. La medida instrumental que se utilizó fue la absorbancia integrada entre 1150 y 950 cm^{-1} . Las figuras de mérito obtenidas para cada una de esas calibraciones se resumen en la Tabla 1 A. El método descrito está libre de interferencias por parte del vapor de agua y de los azúcares presentes en las muestras. La metodología propuesta se utilizó para determinar el contenido de etanol en muestras de ron (40,1 \pm 0,8), whisky (42,7 \pm 0,6 % (v/v)), sidra (4,11 \pm 0,09 - 4,28 \pm 0,04 % (v/v)), cervezas (5,45 \pm 0,07 - 7,31 \pm 0,09 % (v/v)), cervezas con bajo contenido alcohólico (0,57 \pm 0,04 - 0,626 \pm 0,006 % (v)), cervezas sin alcohol (0,00 \pm 0,03 - 0,168 \pm 0,007 % (v/v)), y vinos (10,22 \pm 0,03 - 23,01 \pm 0,05 % (v/v)); y los resultados obtenidos presentan una buena concordancia con los obtenidos por diversos métodos de referencia establecidos (NIR-IR y procedimientos picnométricos).

El mismo diseño experimental fue utilizado para la determinación de etanol en sangre completa y en suero sanguíneo ⁽¹³⁾. En este caso se utilizó un volumen de inyección de 10 μl , la temperatura del reactor se mantuvo en 90°C, el flujo de N_2 se fijó en 400 ml min.^{-1} y la resolución nominal en 8 cm^{-1} . En la Figura 2C se presentan los espectros IR-TF obtenidos a partir de sangre, completa en ausencia (Fig. 2C-a) y presencia (Fig. 2C-b) del alcohol. En esta última se observa con claridad la aparición de la banda característica de etanol en 1050 cm^{-1} ; la cual se utiliza para su cuantificación utilizando el mismo criterio descrito en la aplicación anterior. El intervalo de trabajo, la ecuación que describe a la curva de calibración, el límite de detección, así como la precisión del método propuesto se presentan en la Tabla 1 A. El método se probó en muestras reales de sangre completa, naturales y fortalecidas con etanol, con un contenido de etanol comprendido entre 0 y 1,2 g l^{-1} . La exactitud de los resultados obtenidos no fue evaluada.

J.M. Garrigues y colaboradores ⁽¹⁴⁾ proponen un método, utilizando el montaje previamente descrito, para la determinación simultánea de etanol y metanol en muestras de bebidas alcohólicas y productos cosméticos. En este caso se utiliza un volumen de inyección de 1 μl , una temperatura de operación del reactor de 80°C, un flujo de nitrógeno de 300 ml min.^{-1} , una resolución nominal de 8 cm^{-1} , y el espectro IR-TF se registra en el intervalo comprendido entre 2000 y 700 cm^{-1} . El espectro IR-TF en fase gaseosa de soluciones acuosas de etanol y metanol al 10 % (v/v), así como de soluciones acuosas de: etanol 5 % (v/v), metanol 1 % (v/v) , y una mezcla de ambos en concentraciones del 5 % y 1 % (v/v), respectivamente (Ver Figura 3) muestra dos absorciones características del etanol en 1050 y 880 cm^{-1} , y una absorción simple del metanol a 1030 cm^{-1} . El criterio de medida seleccionado fue la absorbancia integrada en los intervalos de 1025 - 950 cm^{-1} y 950-820 cm^{-1} . La primera corresponde a la contribución de ambos alcoholes, mientras que la segunda se correlaciona estrictamente con la concentración de etanol. Por lo tanto, la resolución del sistema requiere el uso de ecuaciones, las cuales se resumen en la Tabla 1B. La acetona, el 1-propanol, el 2-propanol y el acetato de etilo, no

interfieren en la determinación en concentraciones equivalentes a la del metanol. El método propuesto fue utilizado para la determinación de etanol y metanol en muestras de tequila yagua de colonia (eau du cologne) fortalecidas con metanol. Estas muestras presentaron un contenido de etanol cercano al 49 y 38 % (v/v), respectivamente. Por su parte, el nivel de metanol añadido en ambos casos se varió entre 0,35 y 3,38 % (v/v), siendo su evaluación en todos los casos satisfactorios.

Los resultados encontrados para el etanol presentaron una buena coincidencia con los obtenidos a través de procedimientos de referencia, mientras que la exactitud en los valores del metanol se evaluó mediante estudios de recuperación.

Por su parte, Amparo Pérez-Ponce y colaboradores ⁽¹⁵⁾ realizaron el mismo estudio pero utilizando PLS (partial least squares)-IRTF para el análisis de la fase gaseosa generada. Se utilizaron diversos sets de estándares y diferentes intervalos de números de onda para la calibración. Los mejores resultados (el menor error de predicción) se obtuvieron a partir de un set de estándares integrado por soluciones acuosas de etanol (2,5 – 22,5% v/v) y de metanol (0,5 – 3,5 % v/v).

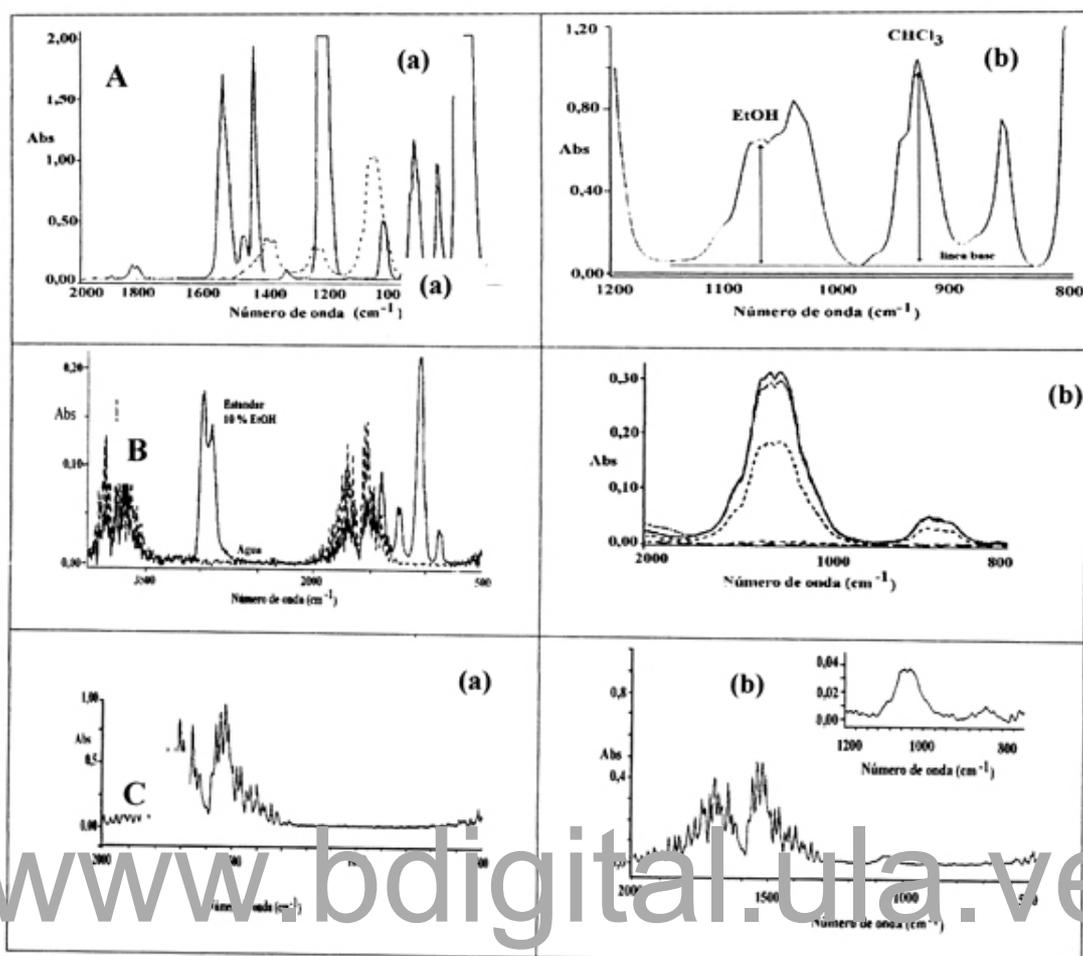


Figura 2 Espectros IR-TF en fase gaseosa de etanol en diversas matrices. (A) Etanol en cloroformo, (a) etanol puro (-----) y cloroformo puro (—), (b) solución 1 % (v/v) de etanol en cloroformo. (B) Etanol en bebidas alcohólicas, (a) agua (trazado discontinuo) y solución de etanol al 10 % (v/v) en agua (trazo continuo), (b) expansión de la banda de 1050 cm^{-1} correspondiente a: una solución de etanol al 10 % (v/v) en agua (---), vino (—), cerveza (.....). (C) Etanol en sangre: (a) muestra de sangre sin etanol, (b) muestra de sangre fortalecida con $1,2\text{ g l}^{-1}$ de etanol. La condiciones experimentales de cada aplicación se indican en el texto y en la Tabla 1A.

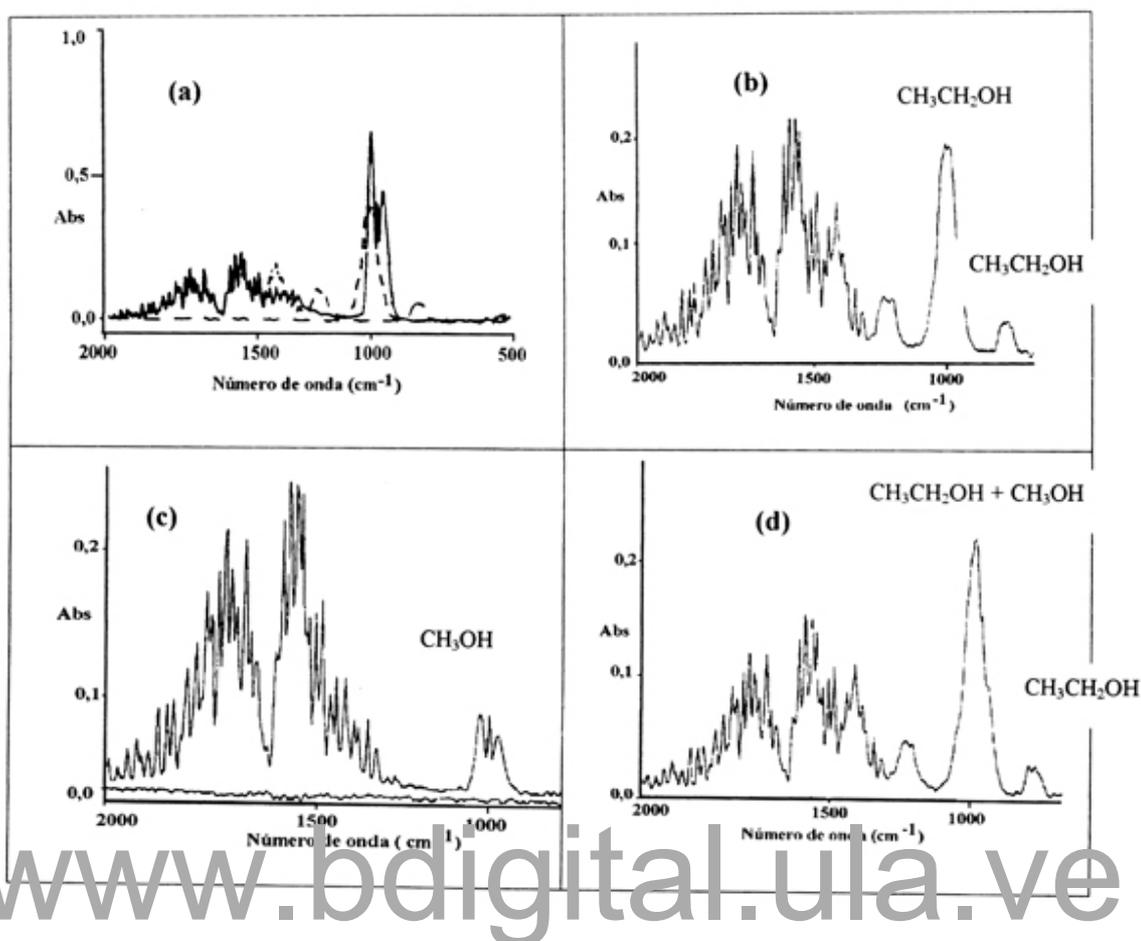


Figura 3 Espectro IR-TF en fase gaseosa de etanol, metanol y mezcla de ellos. (a) soluciones acuosas al 10 % (v/v) de etanol (-----) y metanol (—). (b) solución acuosa de 5 % (v/v) de etanol, (c) solución acuosa 1 % (v/v) de metanol, y (d) solución acuosa de etanol 5 % (v/v) y metanol 1 % (v/v). Las condiciones experimentales se indican en el texto y en la Tabla 1B.

Tabla 1 Determinación de etanol en diversas matrices

A: Etanol en solventes (cloroformo), bebidas alcohólicas y sangres									
Matriz	V _{iny} (µl)	T _{iny} (°C)	Flujo N ₂ (ml min ⁻¹)	Rango % (v/v)	Excepción ^(a) C _{cal} % (v/v)	r ^(b)	LD ^(c) % (v/v)	F ^(d) (h ⁻¹)	Precisión ^(e) (%)
Etanol en:									
Cloroformo ⁽⁵⁾	2,5	90	410	-----	A _{Et} /A _{ClCHO} = 0,023 + 0,858 C D _{Et/ClCHO} = 0,020 + 0,436 C	0,9993	0,02	-----	DER: 3,7-4,6 % (n = 5, 1% v/v) DER: 6,5-8,3 % (n = 5, 1% v/v)
Bebidas varias ⁽¹²⁾									
Alcohólicas	1	80	300	20 - 50,0	A _c = 2,30 + 0,894 C	0,9997	0,06	15	s: 0,40 % (n = 5, 30 % v/v)
-Cervezas	1	80	300	1 - 12,5	A _c = 0,997 + 1,064 C	0,9998	0,02	15	s: 0,13 % (n = 5, 5,0 % v/v)
-Cervezas	1	100	300	1 - 12,5	A _c = 0,997 + 0,7077 C	0,9990	0,06	15	s: 0,14 % (n = 5, 5,0 % v/v)
-Vinos	1	100	300	1 - 20,0	A _c = 0,997 + 0,7500 C	0,9999	0,06	15	s: 0,06 % (n = 6, 10 % v/v)
Sangre ⁽¹³⁾	10	90	400	0-2 (g l ⁻¹)	A = 0,120 + 0,995 C (g l ⁻¹)	0,995	0,02 (g l ⁻¹)	40	DER: 1,1 % (n = 4, 0,8 g l ⁻¹)
B: Mezclas de etanol y metanol en bebidas alcohólicas y productos químicos ⁽⁶⁾									
Matriz	Alcohol	Intervalo de Integración	Intervalo de Trabajo % (v/v)	Excepción de la curva de calibrado ^(a)	LD ^(c) % (v/v)	F ^(d) (h ⁻¹)	Precisión ^(e) (n, C)		
Mezclas sintéticas ⁽¹⁴⁾	Etanol	950-820 cm ⁻¹	2,5 - 32,5	A = 0,025 ± 0,016 + [0,0844 ± 0,0008] C _{Et}	0,3	69	0,0019 (4, 12,5)		
	Etanol	1025-950 "	2,5 - 32,5	A = [0,021 ± 0,011] + [0,0938 ± 0,0005] C _{Et}	0,3	69	0,0010 (4, 12,5)		
	Metanol	1025-950 "	0,5 - 3,5	A = [0,024 ± 0,014] + [0,453 ± 0,0007] C _{Me}	0,05	69	0,014 (4, 1,50)		
Eau-de cologne fortalecida con metanol ⁽¹⁴⁾	Etanol	950-820 cm ⁻¹	30 - 80	A = [-0,76 ± 0,11] + [0,115 ± 0,002] C _{Et}	0,4	69	0,03 (5, 50)		
	Etanol	1025-950 "	30 - 80	A = [-0,33 ± 0,23] + [0,119 ± 0,004] C _{Et}	0,5	69	0,07 (5, 50)		
	Metanol	1025-950 "	0,5 - 3,5	A = [-0,02 ± 0,03] + [0,445 ± 0,013] C _{Me}	0,04	69	0,012 (5, 2,0)		
Bebidas (Tequila) fortalecidas con metanol ⁽¹⁴⁾	Etanol	950-820 cm ⁻¹	20 - 50	A = [-0,03 ± 0,009] + [0,092 ± 0,003] C _{Et}	0,24	69	0,023 (6, 30)		
	Etanol	1025-950 "	20 - 50	A = [-0,05 ± 0,110] + [0,103 ± 0,003] C _{Et}	0,21	69	0,04 (6, 30)		
	Metanol	1025-950 "	0,5 - 3,5	A = [0,05 ± 0,030] + [0,442 ± 0,014] C _{Me}	0,13	69	0,016 (6, 2,0)		

^(a) La señal instrumental que se utiliza en cada aplicación se detalla en el texto. ^(b) (r): Coeficiente de correlación, ^(c) LD: Límite de detección (3σ), ^(d) F: Frecuencia de análisis (muestras por hora), ^(e) La precisión de estos sistemas se expresa mediante la desviación estándar (s) o la desviación estándar relativa (DER), que se obtienen a partir de n determinaciones de una solución de concentración C. ⁽⁶⁾ Las figuras de mérito descritas en la Tabla 1B se obtuvieron bajo las siguientes condiciones experimentales: V_{iny} = 1 µl, T_{iny} = 80 °C, Flujo_{N2} = 300 ml min⁻¹, Resolución = 8 cm⁻¹.

4 EL ANÁLISIS DE SOLVENTES DE PINTURAS Y GASOLINAS

E. López-Anreus y colaboradores ⁽¹⁶⁾ sobre la base de experiencias previas de ese grupo en la determinación de benceno, tolueno y metil-ter-butil éter (MTBE) en gasolinas ⁽²⁵⁻²⁸⁾, desarrollaron un método para la determinación simultánea de estos componentes en gasolina utilizando la metodología descrita. Para esta aplicación utilizan un volumen de inyección de 1 μ l, una temperatura del reactor de 90°C, un flujo de nitrógeno de 400 ml min.⁻¹, una resolución nominal de 8 cm⁻¹; y en esta ocasión utilizan la acumulación de 2 *scans* para la adquisición de cada espectro. El espectro de referencia se obtiene para el flujo de N₂ indicado, mediante la acumulación de 10 *scans*. El espectro IR-TF se registra como función del tiempo en la región espectral comprendida entre 1600 y 500 cm⁻¹, y se utilizan las bandas de 673 cm⁻¹ (671-675), 729 cm⁻¹ (727-731) y 1212 cm⁻¹ (1210-1214) para la cuantificación del benceno, tolueno y MTBE, respectivamente. Esto se ilustra en la Figura 4, en donde se presentan los espectros obtenidos a partir de estándares de benceno, tolueno y MTBE preparados en hexano, así como de muestras comerciales de gasolina.

En el trabajo los autores discuten en forma crítica la utilización de diversos criterios de medida, así como diferentes líneas de base para la corrección de la absorbancia en los máximos de absorción. Los límites de detección así como la precisión varían con el criterio de medida considerado. De esta forma los límites de detección reportados varían entre 0,2 y 0,5 % (v/v) para el tolueno, 0,02 y 0,08 % (v/v) para el benceno y 0,05-0,06 % (v/v) para el MTBE. Por su parte, la precisión (DER, n = 5) varía entre 0,5-1,9 %, 0,6-1,8 % y 0,8-1,8 % para la determinación en una muestra con un contenido de benceno, tolueno y MTBE de 3 % (v/v), 9 % (v/v) y 4 % (v/v) respectivamente. Los resultados obtenidos para muestras comerciales de gasolina con diversos contenidos de benceno (2-3 % (v/v)), tolueno (7-13 % (v/v)) y MTBE (1-7 % (v/v)), muestran una buena concordancia con los obtenidos mediante procedimientos cromatográficos y por IR-TF en fase líquida.

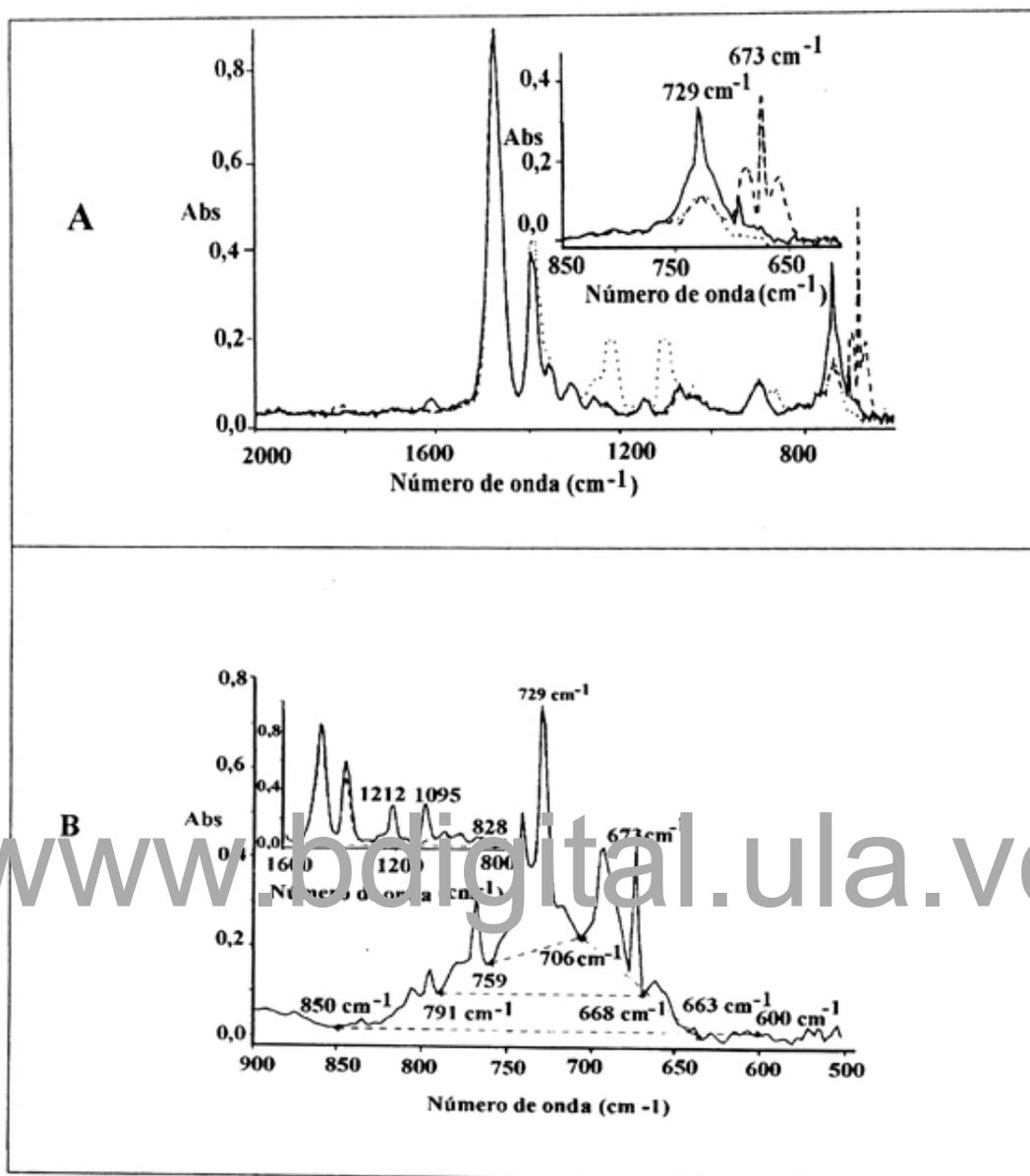


Figura 4 Espectros IR-TF en fase gaseosa de la gasolina y alguno de sus componentes, (A): Componentes de la gasolina en hexano: (a) (-----) benceno 5 % (v/v) en hexano, (b) (—) tolueno 5 % (v/v) en hexano, (c) (.....) MTBE 5 % (v/v) en hexano. Inserto: ampliación de la región espectral comprendida entre 850 y 600 cm^{-1} : (-----) solución de benceno 5 % (v/v) en hexano, (—) solución de tolueno 5 % (v/v) en hexano, (.....) hexano puro. (B) Espectros de gasolinas comerciales, Inserto: (—) gasolina sin plomo (con MTBE), (-----) gasolina con plomo (sin MTBE). Las condiciones experimentales se indican en el texto.

En una nueva aplicación ⁽¹⁷⁾ estos investigadores utilizan el procedimiento general esbozado y el montaje experimental descrito para la determinación simultánea de acetato de butilo, tolueno y metil-etil-cetona (MEC) en solventes de pinturas. En esta aplicación, se inyectan 0,2 μl de la muestra en el reactor de vidrio calentado a 80°C, y el flujo de nitrógeno utilizado fue de 415 ml min^{-1} . Los espectros IR-TF se tomaron en el intervalo comprendido entre 2000 y 500 cm^{-1} , acumulando dos *sacns* por cada espectro. Para este análisis se seleccionaron las bandas de 1072 cm^{-1} , 729 cm^{-1} y 1172 cm^{-1} , para la determinación de acetato de butilo, tolueno y MEC, respectivamente (Ver Fig. 5).

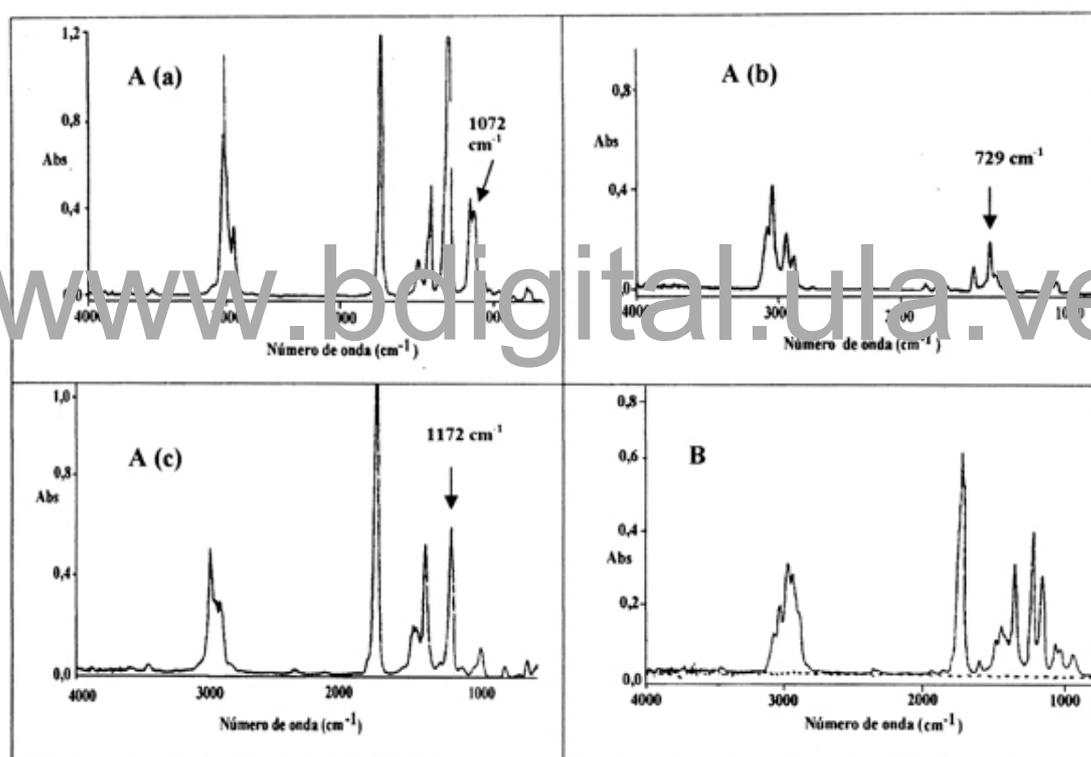


Figura 5 Espectros IR-TF en fase gaseosa de una muestra comercial de un solvente de pinturas y de solventes puros. (A) Espectro de: (a) acetato de butilo puro, (b) tolueno puro, y (c) MEC puro. (B) Espectro de una muestra comercial de solvente para pinturas con un contenido en acetato de etilo, tolueno y MEK de 28,2:32,5:39,3 % (v/v). Las condiciones experimentales se indican en la Tabla 2 y en el texto.

Los autores proponen dos procedimientos para la resolución de esta mezcla. El primer procedimiento se fundamenta en la regresión univariada, preparando curvas de calibración simples para cada uno de los componentes. El criterio de medida utilizado fue: (i) para el acetato de butilo se usó el área integrada entre 1074 y 1070 cm^{-1} , con una corrección por la línea de base establecida entre 1135 y 785 cm^{-1} , (ii) para el tolueno la integración se realizó entre 731 y 727 cm^{-1} y la línea de base de corrección entre 800 y 650 cm^{-1} , y (iii) para la MEC se trabajó con la integración entre 1174 y 1170 cm^{-1} , con corrección por la línea de base entre 1658 y 1135 cm^{-1} . Las curvas de calibración se realizaron inyectando diferentes volúmenes (0 - 0,4 ml) de cada uno de los componentes puros y los valores obtenidos en las muestras fueron interpolados en cada uno de los calibrados individuales. Las figuras de mérito para cada una de las calibraciones se presentan en la Tabla 2. En el segundo procedimiento, la calibración se realizó por *PLS (partial least squares)*. En este caso se utilizaron datos de absorbancia en el intervalo comprendido entre 2033 y 644 cm^{-1} (360 puntos). Para la calibración se utilizó un grupo de 7 estándares preparados por mezcla de los tres componentes a diversas concentraciones. La metodología propuesta se utilizó para el análisis de muestras reales (solventes de pinturas) y cinco (5) muestras sintéticas con contenidos diversos de acetato de butilo (0 - 50 % (v/v)), tolueno (0 - 50,5 % (v/v)) y MEC (0 - 50,5 % (v/v)), utilizando ambas formas de calibración, obteniéndose en todos los casos resultados satisfactorios.

Tabla 2 Características analíticas del sistema AIF-GFG-IRTF propuesto para la determinación de acetato de butilo, tolueno y metil-etil cetona en solventes de pinturas

Compuesto	Intervalo de trabajo (μl)	Ecuación ^(a)	r ^(b)	LD ^(c)	Precisión ^(d) DER (n, C)	F ^(e) (h ⁻¹)
Acetato de Butilo ⁽¹⁷⁾	0,05 - 0,35	$H = [0,05 \pm 0,02] + [6,69 \pm ,09].V$	0,9999	1,4 μg	0,5 % (n= 5)	71
Tolueno ⁽¹⁷⁾	0,05 - 0,35	$H = [0,33 \pm 0,03] + [16,7 \pm 0,10].V$	0,9998	3 μg	0,7 % (n= 5)	71
Metil-etil Cetona ⁽¹⁷⁾	0,05 - 0,35	$H = [0,04 \pm 0,02] + [6,16 \pm 0,09].V$	0,9997	2 μg	1,0 % (n= 5)	71

^(a) La respuesta instrumental (H) utilizada para cada componente se describe en el texto, mientras que V corresponde al volumen de inyección, expresado en μl . ^(b) r: Coeficiente de regresión. ^(c) Límite de detección, definido como 3σ la desviación estándar del blanco. ^(d) La precisión del sistema se define por la desviación estándar relativa obtenida a partir de 5 medidas independientes de cada componente puro ($V_i = 0,2 \mu\text{l}$). ^(e) F: Frecuencia de análisis (muestras por hora). Condiciones experimentales: $V_i = 0,2 \mu\text{l}$, $T_{\text{Reactor}} = 80 \text{ }^\circ\text{C}$, $F_{\text{N}_2} = 415 \text{ ml min}^{-1}$, $R = 8 \text{ cm}^{-1}$.

5 DETERMINACIÓN DE CARBONATOS, BAJO LA FORMA DE CO₂

En esta sección del trabajo se analizan algunos trabajos en los que se plantea la determinación de carbonatos en muestras de aguas ^(18,19), sedimentos ⁽²⁰⁾ y apatitas carbonatadas ⁽²¹⁾. En este punto es importante comenzar describiendo

las formas químicas en que puede estar presente el carbonato en las muestras bajo estudio, así como el comportamiento de absorción de las mismas en el IR.

La Figura 6 presentan los espectros IR-TF en fase sólida (pastillas de KBr) de (a) NaHCO₃, (b) Na₂CO₃, (c) MgCO₃ y (d) CaCO₃, (e) un estándar de CaCO₃ preparado en NaCl, (f) un estándar de CaCO₃ preparado en Ca₃(PO₄)₂, (g) una muestra de apatita carbonatada, y (h) una muestra de sedimento. El carbonato presenta dos bandas bien definidas que corresponden a la vibración C-O. La primera de ellas, muy intensa, centrada en 1400 cm⁻¹; y la segunda de mediana intensidad en 870 cm⁻¹. Ambas bandas sufren pequeños desplazamientos, dependiendo del catión presente en la sal, especialmente si el espectro se toma en fase sólida (Ver Fig. 6-b, c, d). Por otra parte se observan grandes desplazamientos cuando el CO₃⁻² cambia a la forma RCO₃- (Ver Fig. 6a, b) desplazándose la banda de absorción hasta 1350 cm⁻¹ ⁽²⁰⁾. Los suelos y sedimentos naturales contienen una mezcla de carbonatos y carbonatos ácidos con diferentes cationes. Adicionalmente en este tipo de muestras pueden estar presentes algunos aniones inorgánicos como el silicato, que presentan absorción en la misma región espectral que los carbonatos (Ver

Fig. 6-h) ⁽²⁰⁾. Por su parte, las apatitas carbonatadas son apatitas $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ en las cuales algunos grupos fosfatos u hidroxilos han sido sustituidos por carbonatos. El espectro IR de este tipo de apatitas, como el que se presenta en la Figura 6-g, muestra una absorción entre 1427 y 1454 cm^{-1} , característica del stretch asimétrico del carbonato ⁽²¹⁾.

Por su parte, la Figura 7A muestra los espectros IRTF en fase líquida obtenidos a partir de: (a) una solución de Na_2CO_3 con una concentración equivalente en RCO_3^- de 1000 $mg\ l^{-1}$, (b) una solución de $NaHCO_3$ de la misma concentración, (c) un agua mineral, y (d) blanco del sistema (agua). Es evidente que en las últimas dos soluciones se encuentran los dos iones en equilibrio ($CO_3^{2-} + H^+ \rightarrow RCO_3^-$), el cual depende en última instancia del pH de la solución. Al igual que en el espectro en fase sólida, el carbonato muestra su absorción característica en 1400 cm^{-1} (Ver Fig. 7 A-a); la cual sufre de un desplazamiento hipocrómico e hipsocrómico hasta 1350 cm^{-1} al disminuir el pH de la solución (Ver Fig. 7A-b), debido a la protonación del ión carbonato observará una banda cuya posición dependerá de la contribución de ambas especies, como se puede observar en la Figura 7 A-c. Además es importante notar que el espectro del blanco que se obtiene en fase líquida no es despreciable, aún habiendo sido obtenido por la acumulación de 50 *scans*, como se ilustra con claridad en la Figura 7 A-d.

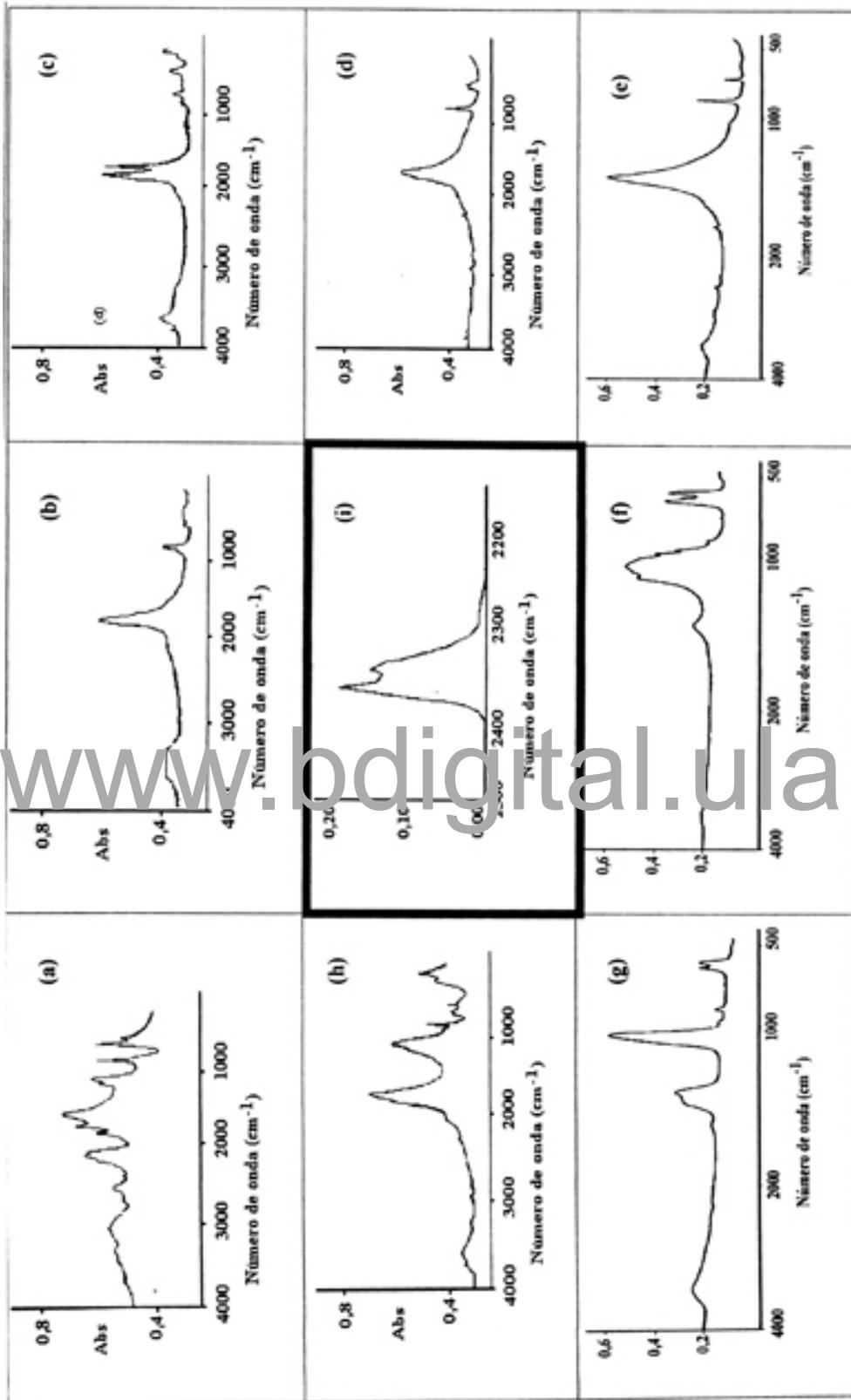
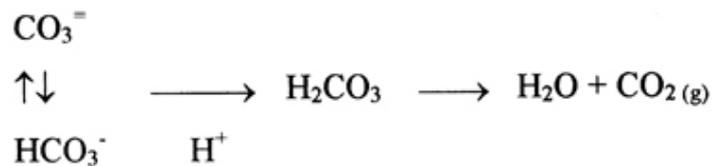


Figura 6. Espectros FTIR en fase sólida y gaseosa de carbonatos. Espectros en fase sólida (pastillas en KBr) de (a) NaHCO_3 , (b) Na_2CO_3 , (c) MgCO_3 y (d) CaCO_3 , (e) CaCO_3 en NaCl , (f) CaCO_3 en $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, (g) una muestra de apatita carbonatada, y (h) una muestra de sedimento. Centro: (i) Espectro IR-ITF en fase gaseosa del CO_2 .

Por todo lo antes expuesto, es evidente que la determinación de carbonatos en muestras sólidas y líquidas vía FT-IR, presenta serios inconvenientes

experimentales. Por otra parte, cuando estas muestras se tratan con suficiente ácido (HCl, HNO₃, etc.), todo el CO₃⁻² y el HCO₃⁻ presente en la muestra se convierte a la forma de CO₂, cuyo espectro IR-TF se caracteriza por presentar un doblete intenso entre 2400 y 2300 cm⁻¹ que corresponde a la extensión asimétrica del CO₂, como se puede observar en la Figuras 6-i y 7B. En este punto, es importante destacar que el vapor de agua presenta una absorción muy pobre en esa región espectral; lo cual facilita la propuesta de trabajo.



Sobre la base de lo antes expuesto, se puede concluir que la espectrometría IR-TF en fase gaseosa proporciona una interesante alternativa instrumental, sensible y selectiva, para la determinación del contenido de carbonatos (totales) bajo la forma química de CO₂ (g) en muestras líquidas y sólidas. Nuevamente, los sistemas que se van a discutir a continuación representan acoplamientos simples de sistemas de inyección en flujo con generación de una fase gaseosa y detección por IR-TF. En todos los casos que se discutirán, se trabajó adquiriendo el espectro IR-TF entre 3000 y 1000 cm⁻¹; y el criterio de medida seleccionado fue la absorbancia integrada entre 2500 y 2150 cm⁻¹

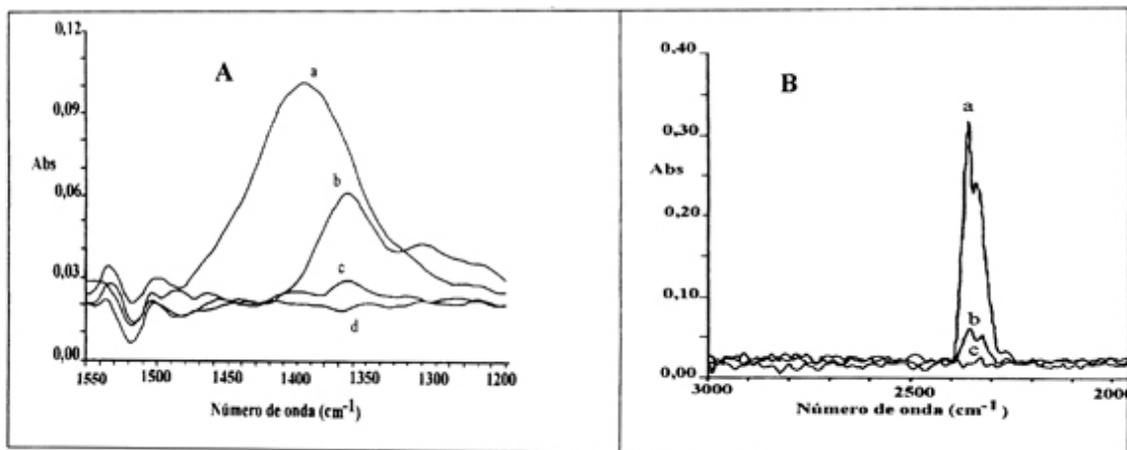


Figura 7 Espectros IR-TF en fase líquida y gaseosa de carbonatos. (A)

Espectros en fase líquida obtenidos a partir de: (a) solución de Na_2CO_3 con una concentración equivalente en HCO_3^- de $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$, (b) solución de NaHCO_3 de la misma concentración, (c) una muestra de agua mineral, y (d) blanco (agua destilada), (B) Espectro en fase gaseosa del CO_2 (g). Los espectros en fase líquida se obtuvieron tras la acumulación de 50 *scans*, en una celda de transmisión con un paso óptico de 0,046 mm, equipada con ventanas de ZnSe, y utilizando agua como referencia. Por su parte, los espectros en fase gaseosa se obtuvieron acumulando tres *scans*, con una celda de gases de 100 ml de volumen interno, y 3,2 metros de paso óptico equipada también con celdas de ZnSe, utilizando N_2 como referencia. Otras condiciones experimentales se indican en el texto.

6 DETERMINACIÓN DE CARBONATOS EN AGUAS

Amparo Pérez Ponce y colaboradores ⁽¹⁸⁾ desarrollaron un método de análisis por inyección en flujo-generación de fase gaseosa y detección por IR-TF para la determinación de la concentración total de carbonatos en aguas. El método se basa en la inyección simultánea de 100 μl de muestra (sin ningún tratamiento previo) y 100 μl de HNO_3 0,025 M en un montaje de dos canales propulsados por una bomba peristáltica, que transportan agua como portador a un caudal de $0,4 \text{ ml min}^{-1}$. Las soluciones introducidas se mezclan mediante una y en un serpentín de teflón de 37 cm de longitud y pasan a través de una unidad de permeación de gases (GPU) calentada eléctricamente a 90°C . La GPU consiste de un tubo poroso de silicio rugoso (60 cm de longitud, 1,6 mm d.e y 0,8 mm de d.i) localizado dentro de un cilindro de vidrio (Ver Figura 8A). La unidad se mantiene a la temperatura indicada con el fin de asegurar la adecuada difusión del CO_2 a través del tubo de silicio. La fase gaseosa que se genera (CO_2 (g), H_2O (g)) es arrastrada mediante un flujo de N_2 de 300 ml min^{-1} a la celda de gases previamente descrita. Por otra parte, en el sistema utilizado, la permeabilidad del vapor de agua a través de la GPU es muy baja. Esto hace que la mayoría de la fase acuosa termine en el drenaje, y de esta forma se reducen los problemas asociados con la potencial condensación del vapor de agua dentro de la celda de gases. Los espectros se obtuvieron

acumulando tres scans a una resolución de 16 cm^{-1} , y se trabajó con el criterio de medida indicado con anterioridad. La calibración del sistema se llevó a cabo con estándares acuosos de Na_2CO_3 tratados de la misma forma que las muestras. La absorbancia integrada de cada muestra y estándar se corrigió con el área correspondiente a la absorbancia integrada obtenida por la inyección de agua destilada en el mismo sistema. Las características analíticas del procedimiento propuesto, bajo las condiciones óptimas de trabajo descritas, son adecuadas para la aplicación propuesta (Ver Tabla 3). El método se aplicó para el análisis de muestras de aguas minerales ($7 - 130 \text{ mg HCO}_3^- \text{ l}^{-1}$) aguas de superficie ($\cong 170 \text{ mg HCO}_3^- \text{ l}^{-1}$), aguas de mar ($\cong 135 \text{ mg HCO}_3^- \text{ l}^{-1}$) y aguas de lago ($46-165 \text{ mg HCO}_3^- \text{ l}^{-1}$); siendo los resultados obtenidos consistentes con los encontrados mediante métodos estándar volumétricos.

Estos autores abordan el mismo tema, pero en esta ocasión proponen el uso de un serpentín de reacción inmerso en un horno de microondas focalizado y un separador de fases en sustitución de la unidad de permeación de gases (Ver Fig. 3A) para la generación y separación de CO_2 a partir de la muestra acidificada ⁽¹⁹⁾. El método se basa en la inyección simultánea de $100 \mu\text{l}$ de muestra y $300 \mu\text{l}$ de HNO_3 $0,1\text{M}$ en un montaje similar al descrito con anterioridad, que utiliza un caudal del portador (agua) de $0,6 \text{ ml min.}^{-1}$. En este diseño, la solución resultante se introduce en un serpentín de reacción de teflón de 88 cm ($0,8 \text{ mm d.i.}$), y a continuación pasa a través de un serpentín de calentamiento de teflón de 100 cm ($0,8 \text{ mm d.i.}$) localizado dentro de la cavidad de un horno de microondas focalizado que trabaja en forma continua a una potencia de 100 W (50% de la potencia total de salida). La fase gaseosa que se genera pesa a través de un separador gas-líquido y se transporta al interior de la celda de gases con la ayuda de un flujo de nitrógeno de 200 ml min.^{-1} . El criterio de medida utilizado es el descrito en la sección preliminar. Los autores reportan dos calibraciones para el sistema, dependiendo de la concentración de las muestras, cuyas características analíticas se resumen en la Tabla 3. La metodología propuesta fue utilizada para el análisis de aguas superficiales ($\cong 162 \text{ mg HCO}_3^- \text{ l}^{-1}$), aguas de desechos ($373-575 \text{ mg HCO}_3^- \text{ l}^{-1}$) aguas minerales

(80-120 mg $\text{HCO}_3^- \text{ l}^{-1}$) y aguas de lago (60-130 mg $\text{HCO}_3^- \text{ l}^{-1}$), siendo los resultados encontrados consistentes con los obtenidos mediante métodos de referencia.

7 LA DETERMINACIÓN DE CARBONATOS EN MUESTRAS SÓLIDAS

Siguiendo la línea de trabajo trazada por estos investigadores sobre la determinación del ión en diversas matrices, la siguiente aplicación versa sobre la determinación de carbonatos en muestras de sedimentos ⁽²⁰⁾. El diagrama esquemático del sistema utilizado en este trabajo se presenta en la Figura 8B, el cual consiste en un montaje simple de un solo canal, que utiliza un portador gaseoso de N_2 , un reactor de vidrio removible para contener a la muestra, una celda de gases y un espectrómetro IR-TF. El reactor está sumergido en un baño de agua cuya temperatura se controla y mantiene en 40°C . El sistema incorpora una válvula de tres vías para dirigir el flujo de N_2 , de forma que el portador gaseoso pase en todos los momentos del análisis a través de la celda de gases. Los envases de vidrio utilizados (el reactor) para contener a las muestras son varios comerciales con un volumen interno cercano a los 13 ml a los que se ha incorporado una entrada de gas, una salida de gas y un septum a través del cual se introduce la solución de ácido; mientras que la celda IR de gases utilizada fue de fabricación casera. Esta consiste en un bloque cilíndrico hueco de teflón con ventanas de ZnSe, con un volumen interno de $490 \mu\text{l}$ y un paso óptico de 39 mm. El método desarrollado consiste en la inyección de 1 ml de HCl (0,25 M) dentro del envase termostatzado de la muestra que contiene 20 mg, (exactamente pesados) de la muestra de sedimento. El CO_2 que se genera bajo esas condiciones, se transporta a la celda de gases mediante un flujo de nitrógeno de 50 ml min.^{-1} , donde se adquiere el espectro IR-TF como función del tiempo bajo las condiciones experimentales descritas. El background del sistema se obtiene previamente colocando el envase de muestra vacío, a través del cual se hace pasar en forma continua el flujo de nitrógeno. Las prestaciones analíticas de este sistema, en las condiciones experimentales descritas se resumen en la Tabla 3. El método se utilizó para el análisis de 6 muestras de sedimentos naturales ($22,7 \pm 0,4 - 76,1 \pm 3 \%$ CaCO_3

p/p) y dos muestras de sedimentos marinos ($48,9 \pm 0,8$ - $52,2 \pm 1,0$ % p/p); y los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas con los obtenidos por métodos de referencia volumétricos.

A. R. Casella y colaboradores ⁽²¹⁾ desarrollaron una metodología para la determinación de carbonatos en apatitas carbonatadas, utilizando básicamente el diseño experimental descrito en el trabajo anterior. En este caso la temperatura del gas de arrastre se controla eléctricamente a 70°C para evitar la posible condensación del vapor de agua

El procedimiento recomendado para esta aplicación es el siguiente. Se introducen 50 mg de muestra (estándar), pesados con exactitud en el interior del reactor. Este se coloca en el sistema FIA, y se calienta a 40°C . A continuación se hace pasar N_2 por el sistema y se define el background del mismo. En este punto se inyectan en el reactor 2,0 ml de HCl 0,5 M a través del *septum*, y el CO_2 que se genera, se transporta a la celda de gases mediante un portador de N_2 a un flujo de 40 ml min.^{-1} . Para la calibración del sistema se prepararon estándares de CaCO_3 en NaCl. Para ello las diversas mezclas $\text{CaCO}_3/\text{NaCl}$ fueron molidas y homogeneizadas en un mortero de ágata durante 15 minutos. Las figuras de mérito del sistema obtenidas bajo las condiciones experimentales indicadas a lo largo del texto, se presentan en la Tabla 3. La metodología descrita se utilizó para el análisis de cuatro (4) muestras de apatitas carbonatadas sintéticas con contenidos de carbonatos entre $0,68 \pm 0,04$ % (p/p) y $14,2 \pm 0,3$ % (p/p). En esta ocasión, los resultados obtenidos por la interpolación en la curva de calibración simple mostraron diferencias significativas con respecto a los encontrados mediante un método de referencia (un sistema comercial para la determinación de CO_2). Sobre la base de estos resultados, los investigadores utilizaron procedimientos de adición de estándar para la calibración del sistema, encontrando bajo estas condiciones resultados satisfactorios.

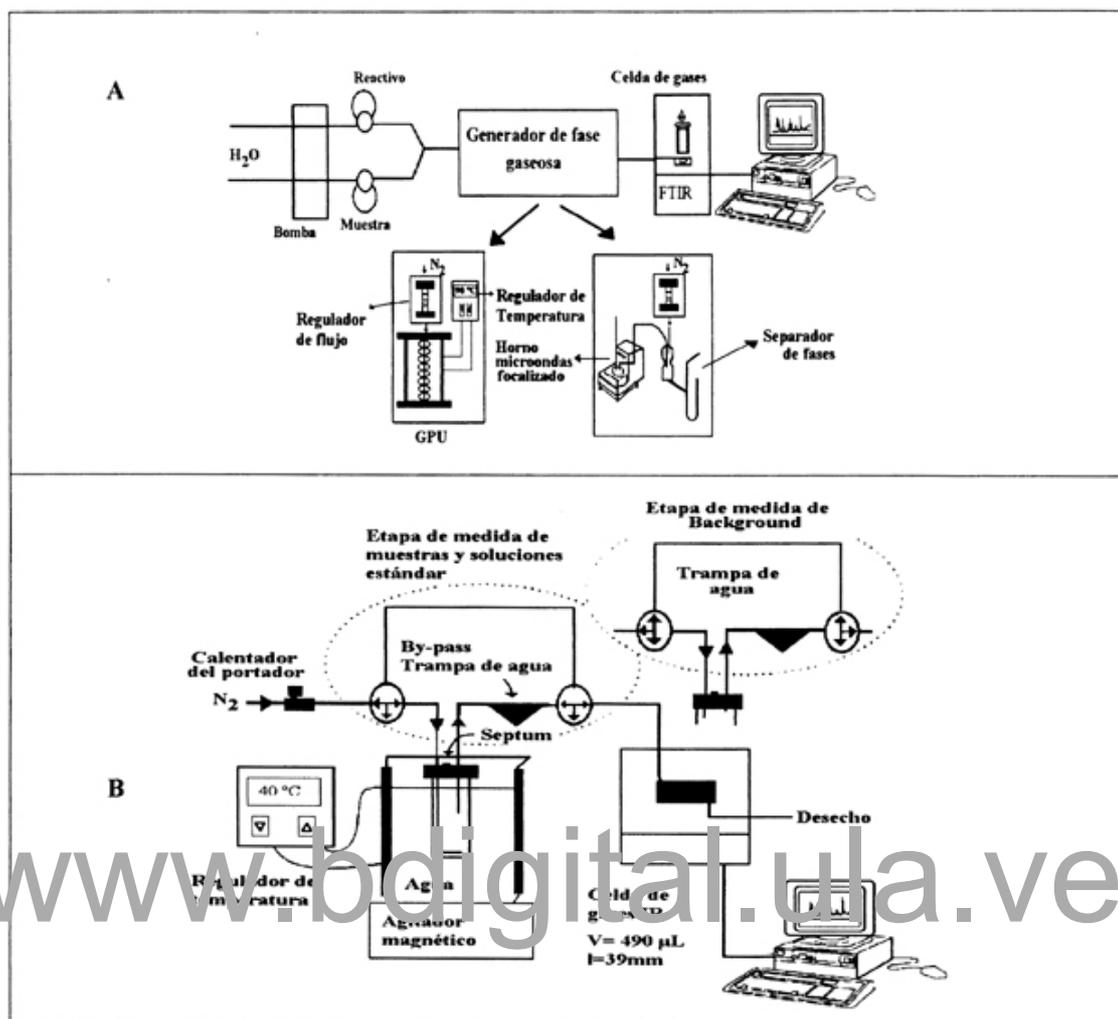


Figura 8 Diagrama esquemático del montaje de Análisis por inyección en flujo-generación de fases gaseosas-IRTF utilizado para la determinación de carbonatos en: (A) aguas, y (B) muestras sólidas.

Tabla 3 Características analíticas de los métodos propuestos para la determinación de carbonatos

Matriz	Intervalo de trabajo ^(a)	Ecuación ^(b)	r ^(c)	LD ^(d)	Precisión ^(e) DER (n, C)	F ^(f) (h ⁻¹)
Aguas ⁽¹⁸⁾	0-300 mg HCO ₃ ⁻ l ⁻¹ V _{inyección} = 100 μl	A=0,06 + 0,0132 C	0,9990	4,6 mg HCO ₃ ⁻ l ⁻¹	1,3 % (6, 150)	30
Aguas ⁽¹⁹⁾	0-1000 mg HCO ₃ ⁻ l ⁻¹ V _{inyección} = 100 μl	A=0,19 + 0,0170 C	0,9998	26 mg HCO ₃ ⁻ l ⁻¹	1,3 % (5, 500)	15
Aguas ⁽¹⁹⁾	0-300 mg HCO ₃ ⁻ l ⁻¹ V _{inyección} = 100 μl	A=0,12 + 0,0160 C	0,9980	15 mg HCO ₃ ⁻ l ⁻¹	2,4 % (6, 200)	15
Sedimentos ⁽²⁰⁾	0-16 mg CaCO ₃ m _{Reactor} = 20 mg	A= -0,14 + 5,95 m	0,9960	0,2 mg CaCO ₃	< 2% (3,muestras)	15
Apatitas ⁽²¹⁾	0-15 % CaCO ₃ (p/p) m _{Reactor} = 50 mg	A= -0,02 + 6,5 C	0,9980	0,2 % CaCO ₃	< 3% (3,muestras)	8

^(a) Se incluye la información referente al volumen de inyección (V_{inyección}) o de la masa introducida al reactor (m_{Reactor}). ^(b) La respuesta instrumental en todos los casos es la absorbancia integrada entre 2500 y 2150 cm⁻¹. ^(c) r: Coeficiente de regresión. ^(d) Límite de detección, definido como 3σ la desviación estándar del blanco. ^(e) La precisión del sistema se define por la desviación estándar relativa de n medidas independientes de una solución de concentración C, o de las muestras. ^(f) F: Frecuencia de análisis (muestras por hora). Las condiciones experimentales se indican en el texto y en la Tabla 3.

8 ESPECTROMETRÍA INFRARROJA DE TRANSFORMADA DE FOURIER COMO DETECTOR PARA LOS ELEMENTOS FORMADORES DE HIDRUROS. UNA NUEVA ALTERNATIVA INSTRUMENTAL.

La generación de hidruros (GH) es una técnica que permite la conversión de analitos como el selenio, telurio, bismuto, arsénico, antimonio, estaño, germanio, cadmio y plomo a su correspondiente hidruro covalente gaseoso. La GH ha sido acoplada con todas las técnicas atómicas (absorción, emisión y fluorescencia), especialmente a la espectroscopia de absorción atómica, y existen diversos reviews en la literatura en donde se resumen las múltiples aplicaciones que ha tenido en muestras y matrices tan diversas como: medioambiente, alimentos, agricultura, materiales geológicos, metalúrgicos y biológicos; plásticos, muestras clínicas, etc. ⁽²⁹⁻³²⁾. La GH también ha sido acoplada, aunque en una proporción muy inferior, a sistemas espectrofotométricos ⁽³³⁻³⁵⁾.

En el año 2002, Gallignani y colaboradores ^(22,23) desarrollaron el acoplamiento del análisis en flujo con la generación de hidruros, utilizando a la espectrometría infrarroja de transformada de Fourier como forma de detección para la determinación de algunos elementos formadores de hidruros. En este acoplamiento se potencian las ventajas inherentes a la instrumentación IR-TF,

así como aquellas correspondientes a las diversas técnicas involucradas: el IR-TF en fase gaseosa, el análisis en flujo y la GH. El acoplamiento fue puesto a punto para la determinación individual y simultánea de arsénico, antimonio y estaño. La Figura 9A muestra el diagrama esquemático del montaje instrumental utilizado. Este consiste de tres bombas peristálticas (P_1 - P_3), un serpentín de reacción (R_1), dos entradas de N_2 , un separador de fases (GPS), una celda de gases IR un detector IR-TF y una trampa con solución de $AgNO_3$ 0,25 M para atrapar a los hidruros a su salida de la celda de gases (GT). Las bombas P_1 y P_2 están sincronizadas en el tiempo para introducir al sistema en forma secuencial a la solución portadora (C_1 , agua) y la muestra (C_2). Por su parte la bomba P_3 propulsa en forma continua a las soluciones correspondientes al canal ácido (C_3 , HCl) y el reductor (C_4 , NaH_4). En este trabajo se utiliza una celda de gases convencional de 10 cm de paso óptico (Wilmad) equipada con ventanas circulares (32x2 mm) de ZnSe, así como una celda de múltiples reflexiones (Cristal Laboratory), con un paso óptico de 7,25 metros, también equipada con ventanas circulares de ZnSe de 25x2 mm. La muestra (C_2) en su trayectoria se acidifica con la solución de HCl (C_3), y la solución resultante reacciona con la solución de NaH_4 (C_4) en el serpentín de reacción R_1 , en donde se genera el hidruro volátil del analito. Una entrada de N_2 ayuda a la separación de las fases líquidas y gaseosas, la cual se completa en el separador de fases gas-líquido (GPS). En ese punto, una segunda entrada de N_2 transporta a la fase gaseosa al interior de la celda de gases en donde se adquiere el espectro IR-TF del hidruro ($4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$ tras la acumulación de tres scans. La Figura 10 muestra los espectros IR-TF obtenidos en el sistema descrito de los hidruros de antimonio (A: estibina, SbH_3), estaño (B: estannano, SnH_4) y arsénico (C: arsina, AsH_3), obtenidos a partir de soluciones estándar de 10 mg l^{-1} de cada uno de ellos. Se observan las bandas de absorción características de los hidruros en cuestión: 1893 , 831 y 781 cm^{-1} para la estibina; 1904 , 695 y 677 cm^{-1} para el estannano; 2125 y 2115 cm^{-1} para la arsina. Adicionalmente, en la Figura 10 D se presenta el espectro obtenido a partir de una solución con un contenido de 10 mg l^{-1} de antimonio, estaño y arsénico, en donde aparecen claramente definidas las

bandas de 1893, 1904 y 2125 cm^{-1} del Sb, Sn y As, respectivamente. La capacidad del sistema propuesto para el análisis simultáneo real, es sin lugar a dudas, una de las grandes ventajas que ofrece. Los investigadores presentan un estudio sistemático de los diversos parámetros involucrados en el sistema (acumulación de scans, resolución nominal, concentración de reactivos, flujo del gas de arrastre, etc.) sobre la calidad analítica de los resultados. En la Tabla 4 se presentan las características analíticas de los calibrados obtenidas bajo las condiciones óptimas de trabajo, Adicionalmente, los autores presentan una evaluación crítica sobre las verdaderas potencialidades que ofrece la metodología propuesta.

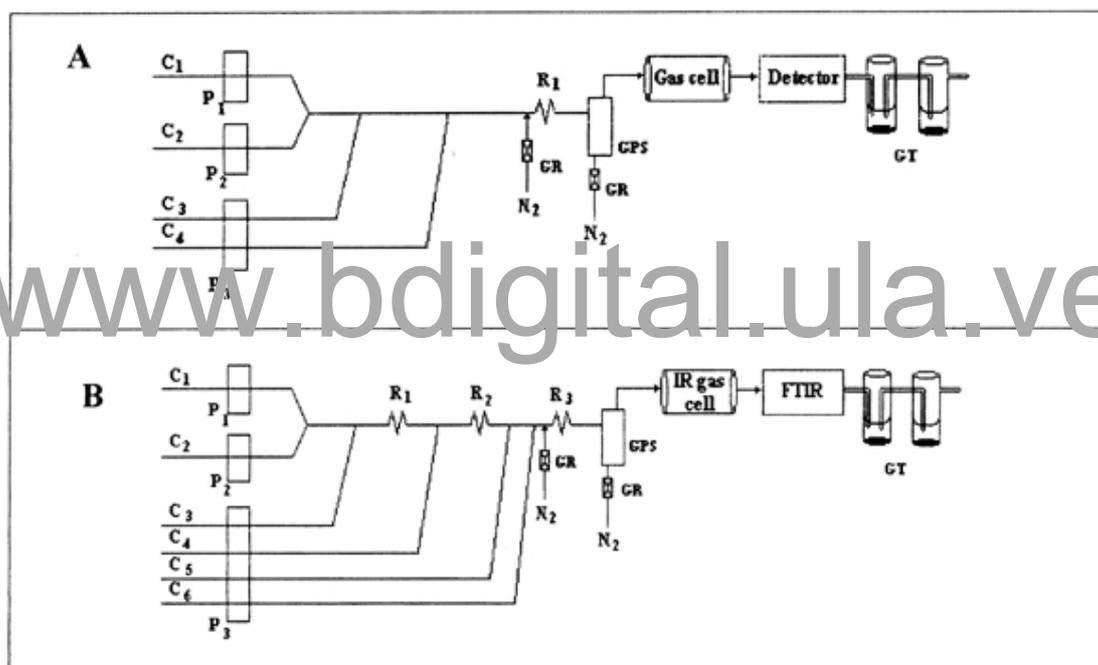


Figura 9 Diagrama esquemático del montaje de Análisis en flujo-generación de hidruros-IRTF utilizado para: (A) muestra sintética de Sb, Sn y As, (B) la determinación de Sb en productos farmacéuticos. P₁, P₂, P₃: bombas peristálticas, R₁, R₂, R₃: serpentines de reacción, C_p: portador, C_M: muestra (estándar), C_H: HCl, C_R: reductor (NaBH₄), C_{PR}: pre-reductor (KI), C_{ox}: oxidante (K₂S₂O₈), SF: separador de fases, RG: regulador de flujo, TG: trampa de gases.

Estos investigadores adaptaron el acoplamiento desarrollado para la

determinación de antimonio en productos farmacéuticos antimoniales como el *glucantime*²⁴. Para esta aplicación, utilizan un montaje de seis canales (Ver Figura 9B). En este sistema, la muestra (previamente diluida 5: 1000 en agua destilada) es oxidada / mineralizada y pre-reducida antes de la reacción propia de la generación del SbH_3 , por tratamiento en línea con soluciones de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ y KI respectivamente. Todo el procedimiento se desarrolla en línea, en un sistema totalmente automatizado. Las características analíticas del sistema (intervalo lineal: 0-600 $\text{mg(Sb)}\text{ l}^{-1}$, límite de detección (3σ) = 0,9 mg l^{-1} , límite de cuantificación (10σ): 3 mg l^{-1} , DER = 0,3 % ($n=5$, 250 mg l^{-1} y una frecuencia de análisis de 25 muestras por hora) obtenidas bajo las condiciones óptimas de trabajo ($[\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8] = 3\%$ (p/v), $[\text{KI}] = 5\%$ (p/v), $[\text{NaBH}_4] = 0,5\%$ (p/v), $[\text{HCl}] = 10\%$ (v/v), Flujo $\text{N}_2 = 50$ y 25 ml min^{-1} , Resolución = 2 cm^{-1} , y N° de scans acumulados para la adquisición de cada espectro = 3), son realmente adecuadas para esta aplicación. El método desarrollado se utilizó para analizar varias muestras de productos farmacéuticos antimoniales como glueantime, pentostan, etc., y los resultados encontrados no difieren significativamente con los reportados por el productor y con los obtenidos por un método de referencia (EAA con llama). La propuesta representa una metodología alternativa interesante y válida para el control de calidad en este tipo de formulaciones farmacéuticas.

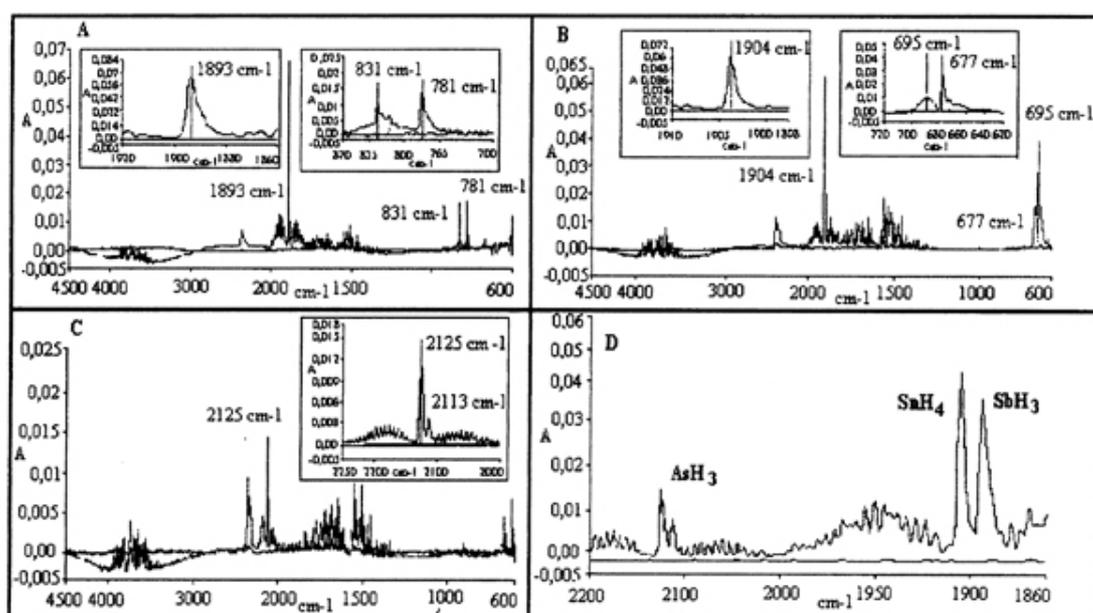


Figura 10 Espectros IR-TF en fase gaseosa de: (A) Estibina, SbH_3 (g), (B) Estannano, SnH_4 (g), (C) Arsina, AsH_3 (g), y (D) SbH_3 (g) + SnH_4 (g) + AsH_3 (g). Los espectros (A, B y C) fueron obtenidos a partir de soluciones de 10 mg l^{-1} de c/u de los elementos, mientras que el (D) se obtuvo a partir de una solución con un contenido de 10 mg l^{-1} de los tres elementos.

Tabla 4 Características analíticas de la determinación de Sb, Sn y As utilizando el acoplamiento AF-GH-IRTF.

Calibration simple (individual) ^a							
Elemento	Ecuación ^e	r ^d	Rango lineal mg l ⁻¹	LD ^e mg l ⁻¹	LQ ^f mg l ⁻¹	DER ^g %	DER ^h %
Sb	$[\text{dA/dv}]_{1893} = 1.8 \times 10^{-5} + 0.00385 [\text{Sb}]$	0.9998	0 - 125	0.25	0.8	0.2	1
As	$[\text{dA/dv}]_{2125} = 2.5 \times 10^{-5} + 0.00085 [\text{As}]$	0.9993	0 - 600	1.2	4	0.3	2.5
Sn	$[\text{dA/dv}]_{1904} = 5.0 \times 10^{-5} + 0.00355 [\text{Sn}]$	0.9999	0 - 150	0.3	1	0.2	1.2
Calibración multielemental ^b							
Elemento	Ecuación ^e	r ^d	Rango lineal mg l ⁻¹	LD ^e mg l ⁻¹	LQ ^f mg l ⁻¹	DER ^g %	DER ^h %
Sb	$[\text{dA/dv}]_{1893} = 5 \times 10^{-5} + 0.00320 [\text{Sb}]$	0.9998	0 - 200	0.3	1	0.1	1.1
As	$[\text{dA/dv}]_{2125} = 2 \times 10^{-5} + 0.00082 [\text{As}]$	0.9995	0 - 750	1.2	4	0.35	2.2
Sn	$[\text{dA/dv}]_{1904} = 8 \times 10^{-5} + 0.00355 [\text{Sn}]$	0.9997	0 - 150	0.3	1	0.2	0.8

^a Soluciones estándar individuales para cada elemento. ^b Soluciones estándar preparadas con los tres elementos. [dA/dv] representa la medida pico-valle de la derivada de primer orden de la banda analítica, y C representa la concentración expresada en mg l^{-1} . ^d r: coeficiente de correlación. ^e LD: límite de detección (3σ). ^f LQ: límite de cuantificación (10σ). ^g ^h Desviación estándar relativa calculada para 5 medidas independientes de una solución de 50 y 10 mg l^{-1} , respectivamente.

9 CONCLUSIONES

En el presente trabajo se presenta una revisión con los trabajos que han aparecido en la literatura especializada en los últimos años sobre la generación de fases gaseosas, utilizando la espectrometría IR-TF como forma de detección. En líneas generales los montajes instrumentales son muy sencillos y pueden ser adaptados a cualquier espectrómetro IR-TF. Las figuras de mérito de los diversos procedimientos analíticos desarrollados son totalmente apropiados para las aplicaciones descritas.

Las fases gaseosas resultan ideales para utilizar la detección por IR-TF debido

a: i) la transparencia de los gases de arrastre, ii) la señal de los blancos es muy baja, y iii) la posibilidad de utilizar celdas con grandes pasos ópticos, que se traduce en una mejora importante en la sensibilidad del sistema. Por otra parte, el uso de la espectrometría IR-TF como un detector sensible, selectivo y simultáneo para los elementos formadores de hidruros abre un fascinante abanico de posibilidades a esta poderosa técnica instrumental: "Generación de fases gaseosas-IR-TF".

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Skoog D.A, Leary J.L., Análisis Instrumental, Mc Graw Hill-Interamericana de España, 4^{ta} Edición, Madrid (1994).
2. Coonley R. T., Espectroscopia Infrarroja, Editorial Alambra, 1^{era} edición española, Madrid, España, (1979)
3. Ferraro J.R., Basile L.J., (Eds), Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Application to Chemical Systems. Academic Press, New York, (1978).
4. Gallignani M., Valero M., Sánchez A., Brunetto M.R., Burguera J.L., Burguera M. La determinación de Nitritos. Parte I- Métodos fundamentados en la espectroscopia de absorción molecular en el ultravioleta-visible. Revista de la Sociedad Venezolana de Química, 24(1), (2001) 3-15.
5. López-Anreus E., Garrigues S., de la Guardia M., Vapour generation Fourier transform infrared spectrometry. A new analytical technique, Anal. Chim. Acta, 308 (1995) 28-35.
6. Gallignani M, Garrigues S, de la Guardia M. Derivative Fourier Transform infrared spectrometric determination of ethanol in alcoholic beverages. Anal. Chim. Acta, 287, (1994) 275-283.
7. Gallignani M, Garrigues S, de la Guardia M. Derivative Fourier Transform Infrared Spectrometric determination of ethanol in beers. Analyst., 119 (1994) 1773-1778.
8. Putzig C.I., Leugers M.A, McKelvy M.I., Mitchell G.E., Nyquist R.A, Papenfuss R.R., Yurga L., Infrared Spectrometry. Review. Anal. Chem., 64 (1992) 270R-R302

9. White R.L., Gas Chromatography-Fourier Transform Infrared Spectrometry. Review. Appl. Spectrosc". Review, 23(3-4) (1987) 165-245.
10. Bacanu M., Dumitrescu P., Simu C., Analysis of Gases (Molecular Hydrogen, Oxygen and Nitrogen) in Titanium Hydrides. Review. Chim. (Bucarest) 40 (1989) 804-807.
11. Price D., Horrocks A.R, Akalin M., Use of Evolved gas Analysis to investigate the Gaseous Pirólisis Products from Flame Retarded Corton and Polyester-Corton Fabrics. Anal. Proc., 27(6) (1990) 148-150.
12. Pérez-Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Vapour generation-Fourier transform infrared direct determination of ethanol in alcoholic beverages, Analyst, 121 (1996) 923-928.
13. Pérez-Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Direct vapor generation Fourier transform infrared spectrometric determination of ethanol in blood, Anal. Chim. Acta, 336, (1996) 123-129.
14. Garrigues J.M., Pérez-Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Direct determination of ethanol and methanol in liquid samples by means of vapor phase-Fourier transform infrared spectrometry, Vibr. Spectrosc., 5 (1997) 219-228.
15. Pérez Ponce A., Rambla F.J., Garrigues J.M., Garrigues S., de la Guardia M., Partial leastsquares-Fourier transform infrared spectrometric determination of methanol and ethanol by vapour-phase generation. Analyst, 123 (1998) 1253-1258.
16. López-Anreus E., Garrigues S., de la Guardia M., Vapour generation-Fourier transform infrared spectrometric determination of benzene, toluene and methyl tert.-butyl ether in gasolines, Anal. Chim. Acta, 333 (1996) 157-165.
17. López-Anreus E., Garrigues S., de la Guardia M., Simultaneous vapour phase Fourier transform infrared spectrometric determination of butyl acetate, toluene and methyl ethyl ketone in paint solvents, Analyst, 123 (1998) 1247-1252.
18. Pérez Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Determination of

- carbonates in waters by on-line vapor generation FT-IR, *Vibr. Spectrosc.*, 16 (1998) 61-67.
19. Pérez Ponce A., Garrigues S., de la Guardia M., Microwave-assisted vapour generation Fourier transform infrared spectrometric determination of carbonates in waters, *Anal. Chim. Acta*, 358 (1998) 235-243.
20. Pérez Ponce A., Garrigues J.M., Garrigues S., de la Guardia M., Vapour phase Fourier transform infrared spectrometric determination of carbonate in sediments, *Analyst*, 123, (1998)1817-1821.
21. Casella A.R., de Campos R.C., Garrigues S., de la Guardia M., Rossi A., Fourier transform infrared determination of CO₂ evolved from carbonate in carbonated apatites, *Frezenius J. Anal. Chem.*, 367 (2000) 556-561.
22. Ayala Carlos, Acoplamiento de la generación de hidruros con la espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (IR-TF). Tesis de Grado. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Mérida, Venezuela (2002).
23. Gallignani M*, Ayala C., Brunetto M.R, Burguera J.L, Burguera M., Flow analysis-hydride generation-Fourier transform Infrared Spectrometry: a new analytical technique for the individual and simultaneous determination of antimony, arsenic and tin, *Analyst*, 127(12) (2002)1705-1712.
24. Gallignani M.*, Ayala C., Brunetto M.R, Burguera M., Burguera J.L., Flowanalysis-Hydride generation-Fourier transform Infrared Spectrometric determination of antimony in pharmaceuticals. *Talanta*, 59 (2002) 923-934.
25. Gallignani M, Garrigues S, de la Guardia M. Direct determination of benzene in gasolines by flow iniection Fourier transform infrared spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 274, (1993) 267-274.
26. Gallignani M., Garrigues S., de la Guardia M., Burguera M., Burguera J.L., Comparative study of different approaches for the Flow Injection-Fourier Transform Infrared determination of toluene in gasolines, *Talanta*, 41 (1994) 739-745.
27. de la Guardia M., Gallignani M., Garrigues S., Flow Iniection derivative

- Fourier Transform Infrared Determination of methyl tert-butyl ether in gasoline, *Analytica Chimica Acta*, 283, (1993) 543-550.
28. Gallignani M., Garrigues S., de la Guardia M., Simultaneous Flow Analysis Fourier transform infrared determination of benzene, toluene and MTBE in petrol, *Analyst*, 119, (1994) 653-657.
29. Declina J., and Tsalev D.L., Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, Willey. Chichester, 1995, pp 151-180.
30. Cámara C. Cámara de grafito y Generación de Hidruros en Espectroscopia Atómica". In: Espectroscopia Atómica Analítica, Cap 6. M. Blanco, V. Cerdá, y A. Sanz Medel Eds., Publicaciones Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España, 1990. pp, 237-257.
31. Fang Z. Flow Injection Atomic Absorption Spectrometry. Cap. 6. John Willey & Sons, Chichester, England, 1995, pp. 106-130.
32. Dedina J., Flow methods in gas-liquid separations. In Flow Analysis with Atomic Spectrometric detectors. Analytical Spectroscopy Library. Volume 8. A Sanz Medel Eds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1999, Cap. 8, pp 237-273.
33. Pinillos S.C., Sanz Asencio J., Galbán Bernal J. Simultaneous determination of arsenic, antimony and selenium by gas phase-diode arfay molecular absorption spectrometry, after pre-concentration in a cryogenic trap. *Analytica. Chimica Acta*, 300 (1995) 321-327.
34. Cabredo S., Galbán J., Sanz J. Simultaneous determination of arsenic. Antimony, selenium and tin by gas phase molecular absorption spectrometry, after two step hydride generation and pre-concentration in a cold trap system. *Talanta*, 46 (1998) 631-638.
35. Sanz Asencio J., Martinez Soria M.T., Plaza Medina M., Pérez Clavijo M. Simultaneous determination of organotin compounds by hydride generation-gas phase molecular absorption spectrometry. *Talanta* 54 (2001) 953-962.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO 6

**DISEÑO DE UN MÉTODO PARA DETERMINAR NITRITO BASADO EN EL
ACOPLAMIENTO DE ANÁLISIS EN FLUJO CON GENERACIÓN DE FASE
GASEOSA EN LÍNEA Y DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA
INFRARROJA CON TRANSFORMADA DE FOURIER**

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolla un método alternativo, rápido y sencillo basado en el acoplamiento del análisis en flujo (AF) con generación de fases gaseosas en línea (GFG), utilizando la espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (FT-IR) como sistema de detección para la determinación de nitrito. El analito es reducido a óxido nítrico (NO) gaseoso mediante su reacción en línea con ácido ascórbico en medio ácido. El NO generado, es transportado por medio de un gas de arrastre a un flujo de 45 ml min^{-1} a un separador de fases y finalmente al interior de una celda de gases para IR que se encuentra alineada al paso óptico de un espectrómetro IR-TF en donde se registra el espectro en la modalidad continua; luego de acumular tres scans a una resolución nominal de 2 cm^{-1} . El criterio de medida utilizado fue la medida de absorbancia en 1875 cm^{-1} con corrección por una línea base establecida entre 1878 y 1872 cm^{-1} . La figuras de mérito del sistema propuesto fueron evaluadas usando una celda de 10 cm de paso óptico con un volumen interno de 60 ml equipada con ventanillas circulares de ZnSe . Los parámetros involucrados en el sistema tales como: concentración de reactivos, velocidad de flujo de los diversos canales, longitud del serpentín de reacción, etc.; fueron optimizados utilizando el método univariado.

Los objetivos principales de este trabajo fueron: i) la generación en línea de óxido nítrico en un sistema de flujo continuo y ii) usar la espectrometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) como forma alternativa y selectiva a la determinación de nitrito a partir de soluciones acuosas.

1 INTRODUCCIÓN

La presencia de nitritos en el medio ambiente tiene distintas fuentes naturales, las cuales son una consecuencia directa del ciclo del nitrógeno ⁽¹⁾. Por otra parte, a nivel de industrias se utiliza como fijador de los colores y como un importante inhibidor de la corrosión en procesos industriales. Sin embargo, la aplicación más conocida y relevante de este anión se encuentra en la industria alimenticia en donde el nitrito de sodio se usa como aditivo en las charcuterías y salazones en donde cumple algunas funciones, entre las cuales destacan:

-Al combinarse con la mioglobina del músculo, da lugar a la nitrosomioglobina, que es responsable del color de los productos de charcutería.

-Contribuye a la formación del aroma y sabor de los productos de charcutería.

-Inhibe el desarrollo de bacterias, especialmente la *Clostridium botulinum* que produce el envenenamiento potencialmente fatal conocido como botulismo ⁽²⁾

Debido a la diversidad de usos que tiene el nitrito es prácticamente imposible no estar en contacto con él en nuestra vida diaria. Así como se conocen sus distintos beneficios en las industrias, no se pueden olvidar los efectos negativos que este tiene para el organismo cuando se encuentra en concentraciones o niveles importantes. Es ampliamente conocido que su toxicidad está principalmente relacionada con su participación directa en la oxidación férrica de la hemoglobina (Hb) normal, a metahemoglobina (metHb); la cual es incapaz de transportar el oxígeno a los tejidos. Cuando la cantidad de metHb es 10% superior a la Hb se observa una manifestación clínica, conocida como metahemoglobinemia, que produce cianosis y en mayores concentraciones conduce a la asfixia ⁽¹⁾.

También presenta una toxicidad indirecta, cuando reacciona con aminos o amidas para producir compuestos de N-nitroso-nitrosamina y nitrosamidas respectivamente-, los cuales poseen efectos cancerígenos y mutagénicos ⁽³⁾

Por todo lo antes expuesto, es evidente que los límites tolerables de este ión en

aguas y otras matrices, particularmente las alimenticias, están normados en legislaciones tanto internacionales como nacionales ⁽⁴⁻⁷⁾. A pesar de esta condición, el uso exagerado de nitrito en los diversos procesos descritos con anterioridad, hace que los niveles de éste, en ciertas fuentes alimenticias yaguas, sobrepasen los límites de tolerancia permitidos por las organizaciones competentes. Por esta razón, existen requerimientos de continuos y constantes de vigilancia de los niveles del ion nitrito tanto en matrices mediambientales como alimenticias.

En este panorama, si bien es cierto que existen en la literatura especializada una importante oferta de métodos para la determinación de nitrito en una amplia gama de matrices, se observa que continúa siendo un tema de mucho interés por parte de los investigadores. De esta forma, en la actualidad se continúan publicando nuevos desarrollos metodológicos que destacan, ya sea por su simplicidad, el grado de automatización y/o la sensibilidad analítica.

Debido al impacto perjudicial sobre la salud que tiene el nitrito, existe un gran número de métodos que permiten determinar esta especie en fluidos biológicos, alimentos y muestras ambientales. Entre estos, se pueden mencionar aquellos que utilizan técnicas electroquímicas⁽⁸⁾, como polarografía de pulso diferencial, voltametría cíclica, potenciometría o cronoamperometría; métodos cromatográficos ⁽⁹⁻¹¹⁾, como cromatografía iónica con detección por conductividad, detección UV o cromatografía de gases con detección por ionización en llama (GC-FID), entre otros^(12-14 24-29). Muchos de ellos han considerado en algunos interesantes y completos *reviews* ⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. Sin embargo, muchos de estos métodos involucran tiempos de análisis elevados y/o el uso de instrumentación costosa y sofisticada, por lo que no son adecuados para el uso en análisis rutinarios.

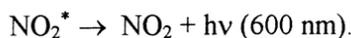
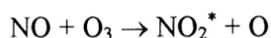
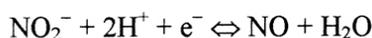
En la actualidad, sin lugar a dudas, la gran mayoría de los métodos utilizados para la determinación de nitrito se basan en la espectroscopia de absorción molecular en el ultravioleta visible; y por lo general, se fundamentan en la reacción de Griess-Ilosvay ⁽¹⁸⁾. Esta reacción involucra la diasotización en

medio ácido de una amina aromática primaria con el anión, para generar una sal de diazonio; seguida por una reacción de acoplamiento con una amina aromática o un fenol. En esta etapa se produce un compuesto "azo", que generalmente presenta una intensa absorción en el visible. Dentro de este planteamiento general, la reacción específica que se ha impuesto, es la reacción de Shinn ⁽¹⁹⁾ en la cual se utilizan la sulfanilamida y el dihidrocloruro de N-(1-naftil)etilendiamina(NED) para las etapas de formación de la sal de diazonio y de acoplamiento, respectivamente. Recientemente, Gallignani y colaboradores ⁽¹⁶⁾ presentaron un review en donde se presentan en forma crítica y comparativa los fundamentos de muchos de estos métodos, sus características analíticas, así como sus ventajas y desventajas.

Una observación detallada de la literatura especializada de los últimos años, denota una importante tendencia hacia el desarrollo de nuevas alternativas metodológicas en la que se disminuyen en forma importante los límites de detección. En la búsqueda de sensibilidad, los métodos espectrofotométricos cinéticos catalíticos representan una de las alternativas más atractivas para la determinación de nitrito a niveles traza y ultratrazas ⁽¹⁰⁻⁴⁾. Estos métodos usualmente se basan en el efecto catalítico que presenta en ion nitrito en la oxidación de ciertas moléculas orgánicas por parte del bromato de potasio; y bajo condiciones experimentales controladas se observa que la disminución en la absorbancia del sustrato orgánico se relaciona en forma lineal con la concentración del anión. Entre las mayores ventajas que proponen éstos métodos, destacan: su simplicidad, los requerimientos de instrumentación sencilla y accesible, así como su sensibilidad analítica. Sin embargo, la potencial interferencia que representan las especies oxidantes que puedan estar presentes en la matriz, es algo que debe tomarse muy en cuenta ⁽²⁵⁾.

En el mismo camino de la búsqueda de sensibilidad, la luminiscencia molecular también aporta ofertas interesantes. Así, se pueden observar diversos métodos fluorescentes que presentan interesantes características analíticas ^(13, 26-28). Sin embargo, la necesidad de un control muy estricto de los parámetros experimentales, los tiempos de análisis, así como los requerimientos en

instrumentación, han restringido mucho su popularidad. Por otra parte, los métodos quimioluminiscentes que han sido descritos en la literatura para la determinación de nitrito merecen un llamado de atención, debido a sus atractivas características analíticas. La mayoría de estos métodos convierten en una primera etapa al ion nitrito, mediante un proceso redox, a la forma gaseosa de óxido nítrico (NO); el cual se evalúa en una segunda etapa mediante una reacción quimioluminiscente con ozono, cuyos productos de reacción son: dióxido de nitrógeno en un estado electrónico excitado, y oxígeno molecular. La especie excitada (NO_2^*) cuando retorna a su estado fundamental emite radiación electromagnética a una longitud de onda de 600 nm ⁽¹⁷⁾. Las reacciones que tienen lugar se indican a continuación:



Los diversos desarrollos metodológicos propuestos se diferencian en el agente reductor utilizado, y en la incorporación de varios sistemas heterogéneos en el diseño (soportes sólidos, membranas de separación de fases, convertidores térmicos, etc.) con el objeto de hacer propuestas de análisis automatizados. Entre los agentes reductores que han sido propuestos para la conversión del nitrito a óxido nítrico destacan: ácido ascórbico ⁽²⁹⁾, ácido fórmico, ácido sulfámico, hidroquinona, Fe (II)/ Hg, yoduro, urea, Ti (III) ⁽³⁰⁾, V (III) ⁽³¹⁾, entre otros. En este punto es interesante destacar que el óxido nítrico es una molécula gaseosa activa en el infrarrojo, que presenta una banda analítica de interés en 1875 cm^{-1} , como se observa en la Figura 1 ⁽³²⁾.

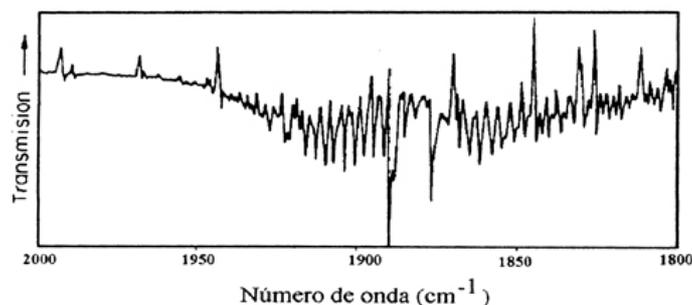


Figura 1 Espectro IRTF en fase gaseosa del óxido nítrico (NO_g) en la región del IR fundamental. (Se observa la banda analítica centrada en 1875 cm^{-1}).

Los desarrollos más recientes en AF-FT-IR en cuanto a la generación de fases gaseosas en línea incluyendo hidruros volátiles a partir de muestras líquidas complejas, han mejorado notablemente la determinación directa por FT-IR. ⁽³³⁻³⁵⁾, debido a la inercia química e inactividad en el IR de los gases diatómicos homonucleares como el N_2 , y de gases de uso común como el argón, así como la disponibilidad comercial de celdas con grandes pasos ópticos. Esto último, se traduce evidentemente en una mejora sustantiva de la sensibilidad de estos sistemas ⁽³⁵⁾.

En la actualidad, no existe ningún precedente bibliográfico en donde se aborde el análisis de nitrito, mediante la generación de una fase gaseosa en línea con detección por espectrometría IR-TF. Sobre esta base, el principal objetivo del presente trabajo es desarrollar un sistema acoplado de análisis en flujo-generación de una fase gaseosa en línea y detección por espectrometría IR-TF para la determinación de nitrito.

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentación

La Figura 2, muestra en forma esquemática el montaje AF-GFG-IRTF propuesto en este trabajo. Este consta de:

- Dos bombas peristáltica programable de alta precisión (P1 y P2) Ismatec ICP de 8 canales equipada con tubería de Tygon para la propulsión de la muestra y los reactivos
- Un serpentín de reacción (R)
- Dos reguladores de flujo para el control de entrada de N_2 (RF1) y aire (RF2). Para regular la entrada de N_2 se utilizó el regulador de flujo (RF1) incorporado en el accesorio de generador de hidruros y vapor frío, Varian modelo VGA 77

- Un separador de fases gas/líquido (SF) del accesorio de generación de hidruros y vapor frío, Varian, modelo VGA-77
- Una celda IR de gases cilíndrica comercial (Willmad, modelo 156A) con un paso óptico de 10 cm, equipada con ventanas circulares de ZnSe de 32 mm de diámetro y 2mm de espesor, con un volumen interno de aproximadamente 60 ml.

Para las medidas espectrales se utilizó espectrómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), Perkin Elmer, modelo Spectrum 2000, equipado con una fuente de Nerst, un detector piroeléctrico (sulfato de triglicerina deuterada, DTGS) y un beamsplitter intercambiable de KBr.

2.2 Reactivos

Todos los reactivos utilizados en este trabajo son de grado analítico: Para la preparación de los diversos patrones así como las diversas soluciones de trabajo, se utilizó agua de alta pureza de $18 \Omega \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ de resistividad suministrada por un sistema de Milli-Q TOC de Millipore. En el resto del trabajo se hará mención de la misma como DI.

Se preparó una solución patrón de nitrito de 1000 mg l^{-1} a partir de nitrito de sodio (Analar) secado previamente en una estufa durante 5 horas a una temperatura de 110°C . Se pesaron 1,5148 g de NaNO_2 , los cuales fueron disueltos y llevados a un volumen final de 1 litro con agua DI. A esta solución se le colocó 1 g de NaOH (Analar) para prevenir la liberación de ácido nitroso y 1 ml de cloroformo (Analar), grado espectroscópico, para prevenir el desarrollo bacterial. Las soluciones estándar se prepararon diariamente por dilución adecuada del patrón en agua DI.

El ácido ascórbico (Analar) fue preparado diariamente a una concentración del 5 % (p/v) en ácido sulfurico (Analar) al 6 % (v/v), utilizando agua DI.

2.3 Procedimiento general

En el sistema propuesto los reactivos y la muestra (estándar) fueron colocados a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) en sus respectivos canales como se ilustra en la Figura 2, bajo las condiciones experimentales que se indican en la Tabla 1.

En una etapa preliminar se establece la señal de fondo ("Background") del sistema haciendo pasar agua por todos los canales y se acumulan tres barridos (scans) en el modo continuo. Seguidamente se adquiere el espectro de referencia del blanco. Esto se logra haciendo pasar agua por el canal de la muestra (C_1) y por el canal C_2 se introduce el agente reductor en medio ácido. Finalmente, se da la orden instrumental para que se acumulen tres "scans"

El sistema AF-GFG-FT-IR propuesto en este trabajo involucra tres etapas:

- i) generación de la fase gaseosa (NO)
- ii) arrastre del óxido nítrico generado -con una corriente de nitrógeno al separador de fases / seguidamente a la celda IR
- iii) adquisición del espectro de absorción.

La muestra y el agente reductor en medio ácido se mezclan en el serpentín R donde el nitrito cuantitativamente se reduce a óxido nítrico. La mezcla gas/líquida es transportada a un separador de fases por una corriente de nitrógeno y finalmente el NO es transportado al interior de la celda de gases donde el espectro IR es obtenido en el modo continuo, luego de acumular tres scans. A la salida de la celda, el NO es atrapado mediante su reacción con oxígeno para generar dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2(\text{g})$) el cual es soluble en agua.

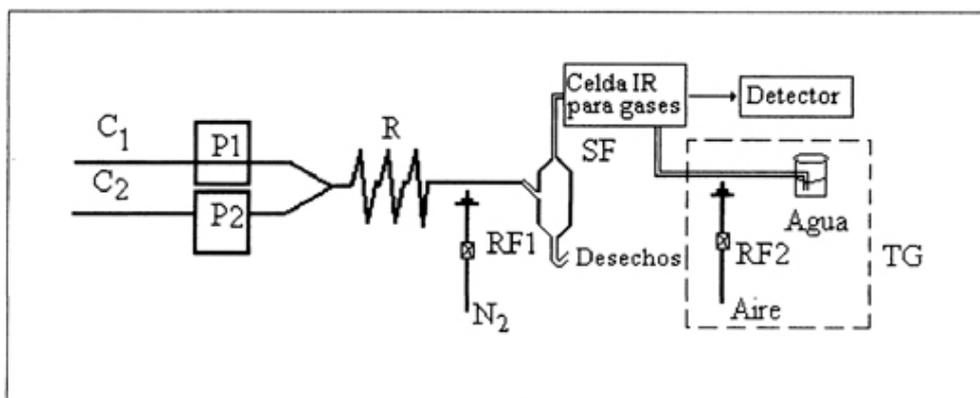


Figura 2 Representación esquemática del sistema AF-GFG-IR-TF. C_1 : muestra, C_2 : agente reductor en medio ácido, P: bomba peristáltica, R: serpentín de reacción, RF: regulador de flujo, SF: separador de fases, TG: trampa de gases.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estudios preliminares

En una primera etapa se estudió el comportamiento de absorción de los reactivos y productos de reacción bajo estudio. En la Figura 3, se muestra el espectro FT-IR del NO obtenido en el sistema propuesto a partir de diferentes concentraciones nitrito. En ella se puede apreciar una banda intensa a 1875 cm^{-1} la cual es de gran interés desde el punto de vista cuantitativo. También se observa la transparencia del blanco en esta región espectral (----).

Como criterio de medida se seleccionó la medida de absorbancia en la banda de 1875 cm^{-1} con corrección de línea base establecida entre 1878 y 1872 cm^{-1} (ver Figura 4). La optimización de los diversos parámetros se llevó a cabo por el método univariado y utilizando una solución de 50 mg l^{-1} de nitrito. Luego de cada optimización se revisaba el sistema general para verificar la validez de los parámetros previamente seleccionados.

Tabla 1 Condiciones de operación del sistema

Parámetros instrumentales	
Fuente de radiación	Fuente para el IR medio Perkin Elmer
Detector	DGTS
Beamsplitter	KBr
Intervalo espectral	4500 -600 cm^{-1}
Banda analítica	1876 cm^{-1}
Criterio de medida	Absorbancia en 1875 cm^{-1} con corrección de línea base establecida entre 1878 y 1872 cm^{-1}
Resolución nominal	2 cm^{-1}
Número de "scans" acumulado para la definición del background y cada espectro	3
Celda de gases	10 cm de paso óptico, ventanas de ZnSe 32x 2 mm circulares volumen interno \cong 60 ml
Parámetros del sistema AF-GFG	
Flujo del canal C ₁	7 ml min ⁻¹
Concentración de ácido ascórbico	5 % (p/v)
Concentración de ácido sulfúrico (en la solución de ácido ascórbico)	6 % (v/v)
Flujo del canal C ₂	1 ml min ⁻¹
Longitud del serbón de reacción (R)	10 cm 0,6 mm Li (PTFE)
Velocidad del flujo de N ₂	45 ml min ⁻¹

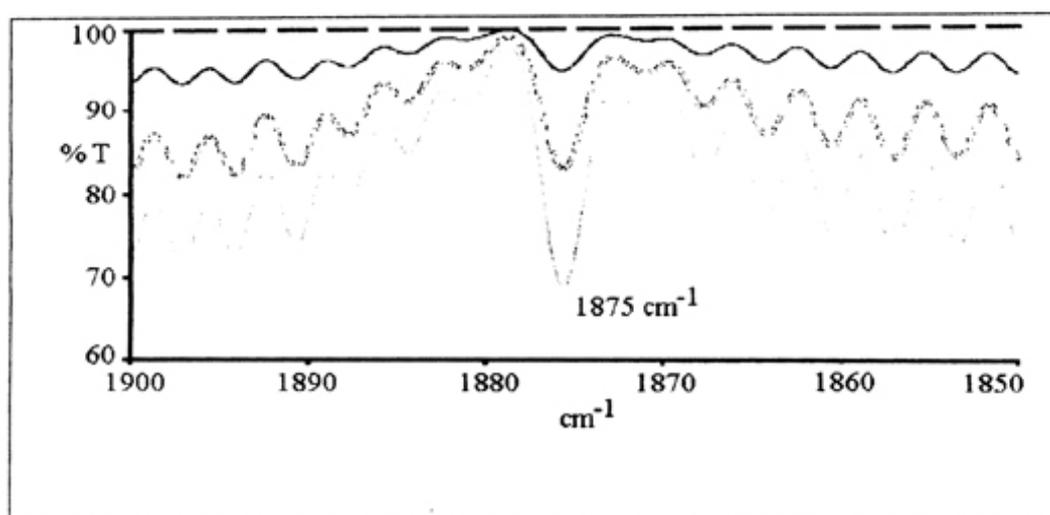


Figura 3 Espectro FT-IR de NO generado a partir de diversas soluciones acuosas de nitrito

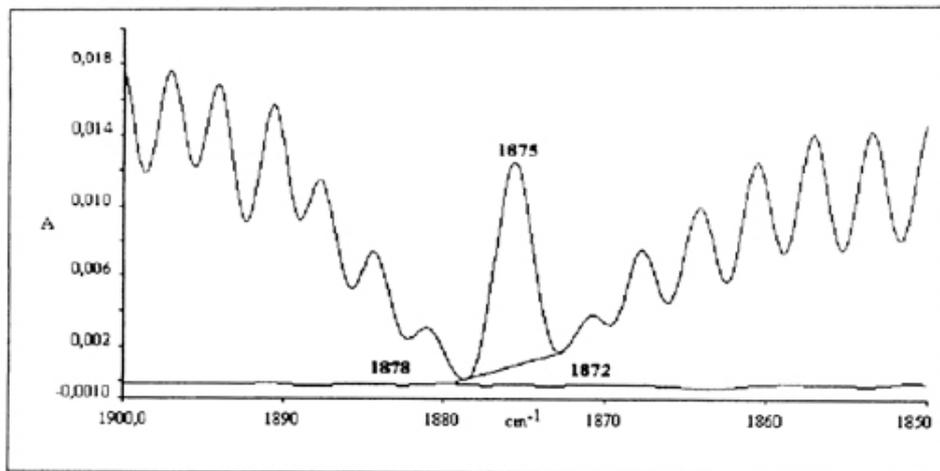


Figura 4 Criterio de medida

3.2 Optimización de los parámetros instrumentales

Algunos parámetros instrumentales, tales como la resolución y el número de espectros acumulados pueden ejercer un efecto importante sobre la calidad de la señal analítica. Una de las ventajas de usar equipos FT-Res es que permite en un tiempo muy breve acumular espectros, permitiendo de esta manera promediar las señales y así lograr mejoras en la relación señal/ruido (ventajas Fellgett) ^(32,35). En este sentido, se estudió el efecto de la acumulación de espectros en el intervalo de 1 a 20 sobre la señal analítica del NO, encontrándose que este parámetro no tiene un efecto importante sobre la relación señal/ruido, Este hecho puede ser debido a la pureza del blanco utilizado en fase gaseosa. Se seleccionó la acumulación de tres espectros para el resto del trabajo.

Dado que la resolución nominal tiene un efecto importante sobre la forma de las bandas de absorción de los espectros, se estudió el efecto de este parámetro en el intervalo de 2 a 32 cm^{-1} sobre la señal analítica. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura S y en ella se observa que al aumentar la resolución nominal se produce una disminución importante de la respuesta instrumental. En este punto, es importante resaltar que con el incremento de este parámetro también se produce un ensanchamiento de la banda analítica y

que el tiempo requerido para la adquisición de tres scans disminuye con el aumento de este parámetro. Sobre la base de estos resultados, se seleccionó una resolución nominal de 2 cm^{-1} para el resto del trabajo. Bajo estas condiciones se requiere de un tiempo de 37 segundos para acumular tres scans.

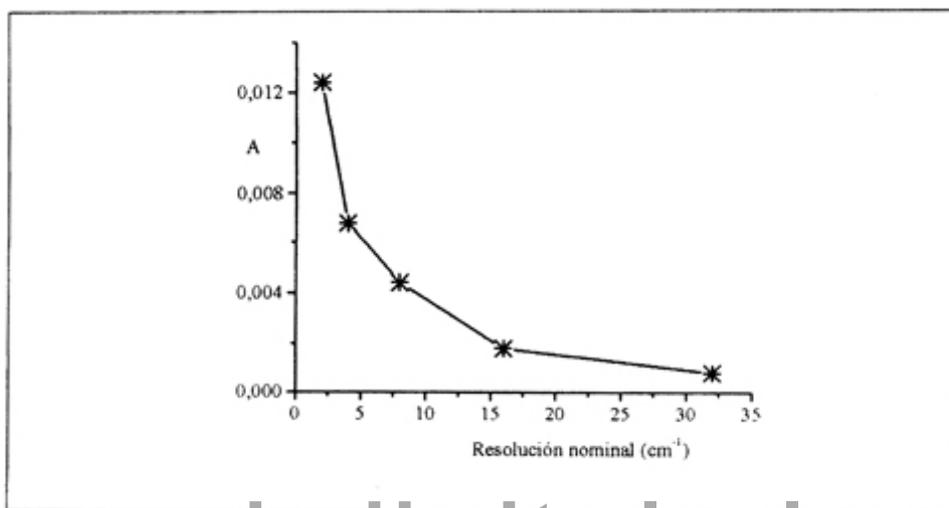


Figura 5 Efecto de la resolución nominal sobre la señal analítica de una solución de $50\text{ mg NO}_2^- \text{ l}^{-1}$, [Ac. Ascórbico] = 5% (p/v) en H_2SO_4 6% (v/v)

3.3 Optimización de los parámetros relacionados con la reacción química

Algunos autores han usado los siguientes criterios para elegir el agente reductor: a) la reacción debe ser rápida y cuantitativa a bajos niveles de concentración de nitritos y b) los reactivos deben ser de baja volatilidad (29, 30). Estos autores han reportado para la formación cuantitativa de NO a partir de soluciones de nitrito, el uso de NaI 0,2 M en ácido acético 13 M; NaI 0,13 M en ácido fosfórico 13 M y ácido ascórbico 0,1 M en ácido sulfúrico 0,05 M respectivamente. En este trabajo se realizaron pruebas con estos agentes reductores y los mejores resultados fueron encontrados con el uso de ácido ascórbico en medio de ácido sulfúrico.

Para la generación de óxido nítrico se requiere de un medio ácido ^(29, 30). En

esta experiencia se estudió el efecto de la concentración de ácido sulfúrico en soluciones de ácido ascórbico sobre la reducción de los nitrito. Para esto, se prepararon diversas soluciones de ácido ascórbico al 5 % (p/v) y se varió la concentración de ácido sulfúrico de 0 a 10 % (v/v). En la Figura 6, se presentan el efecto de este parámetro sobre la señal analítica del NO. En ella se observa que la respuesta instrumental incrementa con la concentración de ácido sulfúrico en el intervalo de 0 al 3 % (v/v) y a partir de este último valor, la señal permanece constante en el resto del intervalo. Se seleccionó una concentración de ácido sulfúrico de 6 % (v/v) para el resto del trabajo.

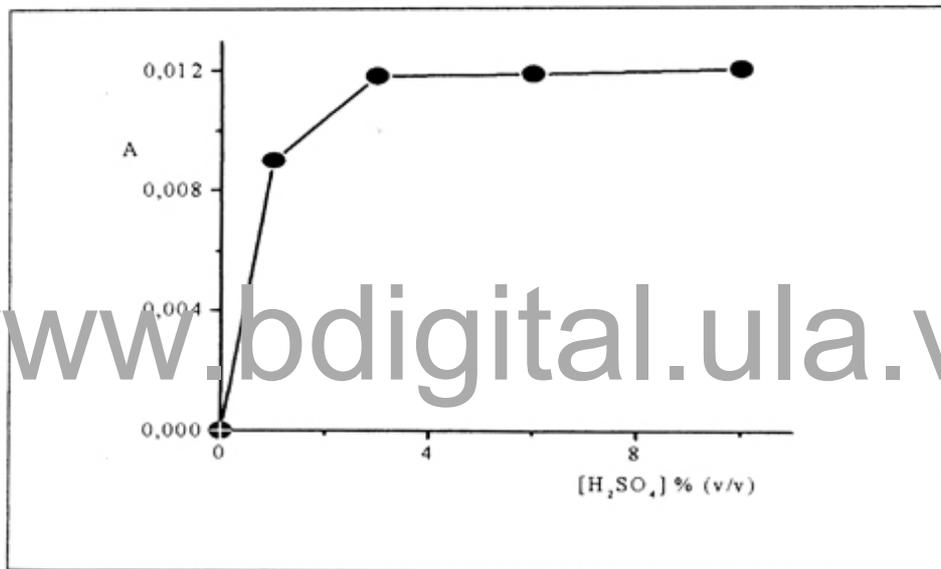
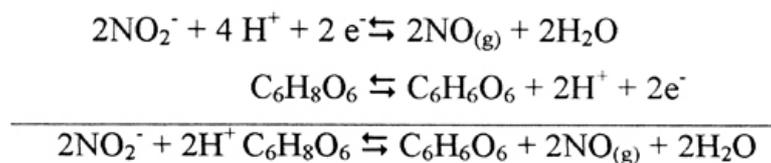


Figura 6 Efecto de la concentración de ácido sulfúrico en la solución de ácido ascórbico sobre la señal analítica del NO generado a partir de soluciones de 50 mg l⁻¹ de nitrito.

El sistema redox entre el ión nitrito y el ácido ascórbico es descrito por



Para evaluar la influencia de la concentración ácido ascórbico sobre la

reducción de nitrito, se prepararon soluciones de este agente reductor en el intervalo de concentraciones de 0 a 10 % (p/v) en medio de ácido sulfúrico al 6 % (v/v). En la Figura 7 se muestra el efecto de este parámetro, en la cual la curva describe un comportamiento similar al descrito para el ácido sulfúrico. Sobre la base de esta experiencia se seleccionó una concentración de 5 % (v/v) de ácido ascórbico.

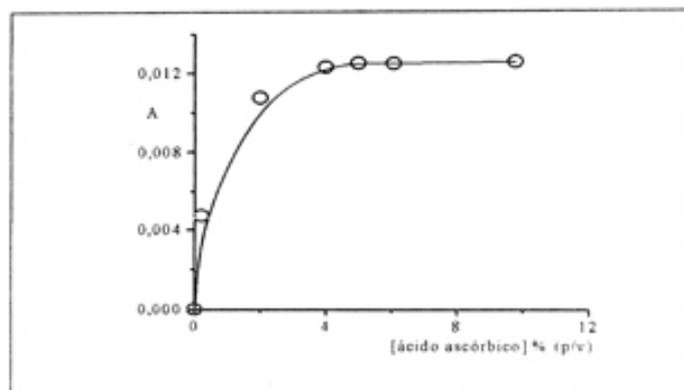


Figura 7 Efecto de la concentración de ácido ascórbico sobre la señal analítica de una solución de $50 \text{ mg NO}_2^- \text{ l}^{-1}$ [$\text{H}_2\text{SO}_4 = 6 \%$ (v/v)]

www.bdigital.ula.ve

3.4 Optimización de los parámetros relacionado con el sistema de flujo

Los parámetros involucrados en esta etapa del sistema son: a) el caudal del fluido portador (C_1) y del reductor (C_2), b) la longitud del serpentín de reacción (R) y c) velocidad de flujo de nitrógeno como gas de "stripping" y de arrastre,

En el sistema propuesto, el caudal de los diversos canales se controla mediante la elección de la tubería (tipo y diámetro interno), así como cambios en la velocidad de propulsión de las bombas peristálticas (P1 y P2). Para el transporte de la muestra se seleccionó tubería de Tygon código negro/violeta de diámetro interno de 2,06 mm que puede proporcionar velocidades de flujo entre $0,420$ y 21 ml min^{-1} , mientras que para el canal reductor se utilizó tubería de Tygon código negro/negro con un diámetro interno de 0,8 mm que puede proporcionar velocidades de flujo entre $0,076$ y $3,8 \text{ ml min}^{-1}$,

Inicialmente se varió el flujo del canal C_1 a través de las revoluciones de la

bomba (P1) entre 2 y 10 ml min⁻¹. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8A, en la que se observa que la absorbancia crece inicialmente con el incremento de este parámetro cuando el flujo varía entre 2 y 6 ml min⁻¹. El intervalo que va desde 6 hasta 10 ml min⁻¹, la respuesta instrumental se hace independiente de este parámetro. Sobre la base de esta experiencia se seleccionó un valor de 7 ml min⁻¹ como caudal del portador.

A continuación, se varió la velocidad de flujo del canal reductor entre 0,5 y 1,5 ml min⁻¹. Es importante destacar en este punto que se seleccionó este intervalo para evitar una disminución excesiva de la señal analítica por efecto de dilución. Los resultados de este estudio se presentan en la Figura 8B. En ella se puede observar que la absorbancia del NO no varía de manera significativa en este intervalo, observándose un ligero máximo cuando la velocidad del flujo del reductor tiene un valor de 1 ml min⁻¹. Este valor fue seleccionado para el resto del trabajo.

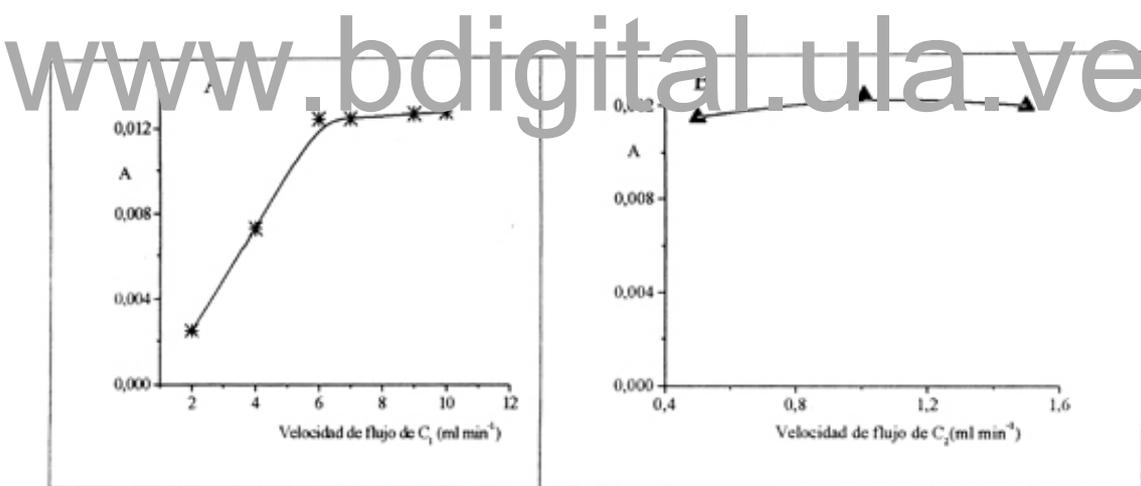


Figura 8 Efecto de la velocidad de flujo del los diversos canales A: Canal de muestra (C₁) B: Canal reductor (C₂) sobre la señal analítica del NO generado a partir de una solución de 50 mg NO₂⁻ l⁻¹ [H₂SO₄]= 6 % (v/v).

La longitud del serpentín de reacción fue variado en un intervalo comprendido entre 0 y 100 cm, utilizando tubería de teflón de 0,8 mm de diámetro interno. El comportamiento de la señal analítica con la variación de este parámetro se ilustra en la Figura 9, donde se observa claramente que la señal aumenta con el incremento de la longitud del serpentín hasta un valor de 40 cm; a partir del

cual la señal se hace independiente de este parámetro en el resto del intervalo estudiado. El valor seleccionado fue de 50 cm para el resto del trabajo.

Con respecto al caudal de nitrógeno el cual se utiliza en el sistema como gas de "stripping" y de transporte del NO, este se fijó en 45 ml min^{-1} ; debido a que se utilizó el regulador de flujo (RF1) incorporado en el accesorio de generador de hidruros y vapor frío, Varian modelo VGA77; el cual limita este parámetro en ese valor. La incorporación de una segunda entrada de N_2 en el separador de fases tal como se utiliza generalmente en los sistemas de generación de hidruros fue descartada, ya que generaba una importante disminución de la señal analítica por efecto de dilución.

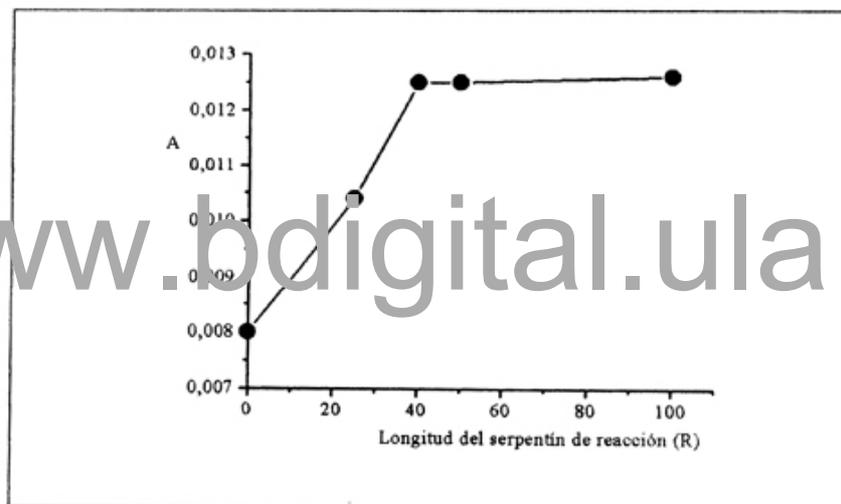


Figura 9 Efecto de la longitud del serpentín de reacción sobre la señal analítica del NO generado a partir de soluciones de 50 mg l^{-1} de nitrito.

3.5 Características analíticas del sistema

En la Tabla 1 se presenta un resumen de las condiciones óptimas de trabajo para la determinación de nitritos mediante el uso de un sistema acoplado de análisis en flujo, con generación de fase gaseosa y detección por espectrometría IR-TF. Bajo estas condiciones se realizó una curva de calibrado a partir de soluciones acuosa de nitritos preparadas entre 0 y 100 mg l^{-1} . La

ecuación de regresión lineal que describe la recta de regresión fue $A = 0,0000868 + 0,000243[\text{NO}_2^-]$ con un coeficiente de regresión (r) de 0,99946, el límite de detección definido como 3 veces la desviación estándar del blanco fue de $0.9 \text{ mg NO}_2^- \text{ l}^{-1}$, mientras que el límite de cuantificación (10σ) fue de $3 \text{ mg NO}_2^- \text{ l}^{-1}$. La precisión del sistema fue de 1,7 %, y se obtuvo a partir de 5 medidas de absorbancia de una solución de 50 mg l^{-1} de nitrito.

4 CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolló un método nuevo, rápido y preciso, basado en el acoplamiento de análisis en flujo, con generación de fase gaseosa y detección por espectrometría de absorción infrarroja con transformada de Fourier para determinar nitrito. El sistema propuesto, el cual permite la reducción cuantitativa en línea de nitrito a óxido nítrico con ácido ascórbico en medio ácido, reduce de manera importante la manipulación de la muestra y hace posible la automatización completa para la determinación de esta especie.

La sensibilidad del método propuesto es baja cuando se usa la celda de gases de 10 cm de paso óptico. Sin embargo, esta puede ser mejorada mediante el uso de celdas con pasos óptico mayores como las celdas de gases de múltiples reflexiones y/o utilizando sistemas de preconcentración como la extracción en fase sólida.

Una de las grandes ventajas del método es que permite la separación del analito de la matriz, minimizando así los problemas asociados a las posibles interferencias espectrales.

Estudios posteriores van dirigidos hacia la búsqueda de mejorar las figuras de mérito y aplicar el desarrollo metodológico al análisis de muestras reales.

5 BIBLIOGRAFÍA

1. http://www.who.int/water_sanitation_health/GDWQ/Chemicals/nitrate

[nitritesum.htm](#)

2. Brown T. L., LeMay H. E., Bursten B. E. Química. La Ciencia Central. Quinta edición Prentice-Hall Hispanoamericana, SA. 905. 1991
3. Tsezou A., Kitsiou-Tzeli S., Galla A., Gourgiotis D., Papageorgiou J., Mitrou S., Molibdas P. and Sinaniotis C. High nitrate content in drinking water. cytogenetic effects in exposed children. Archives of Environmental Health. 51,458-461, 1996.
4. Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Criterios de salud ambiental 5 Nitratos y Nitritos de N-nitroso. Publicación Científica 394, México, D F, 1980.
5. Gaceta oficial de la República de Venezuela N° 34892 del 29 de Enero de 1992.
6. Guías para la calidad del agua potable. Publicación Científica N° 481, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, 522 Twenty-Third Street, N.W. Washington, D.C. 20037. E.U.A. 1, 56-84, 1985
7. <http://www.cepis.ops-oms.org/es/www/calidad/calidadua.html>. Normas internacionales para la calidad del agua de bebida, valores institucionales aportados por la OMS, CEPIS, OPS y CEE.
8. Hassan SSM, Marzouk SAM, Sayour HEM. Selective potentiometric determination of nitrite ion using a novel (4-sulfophenylazo-) 1-naphthylamine membrane sensor. Talanta. 59, 6, 1237-1244, 2003
9. Bilal Butt S., Riaz M., Zafar Iqbal M. Simultaneous determination of nitrite and nitrate by normal phase ion-pair liquid chromatography. Talanta. 55, 789-797, 2001.
10. Blanco D, Martinez L. Mangas J.J., Dapena E. and Gutierrez D. Determination of Nitrate and Nitrite in Tap Water and Vegetables by High Performance Liquid Chromatography. Journal of liquid chromatography. 18, 2445-2456, 1995.
11. Archana Jain, Roger M. Smith, Karishna K. Verma. Gas Chromatographic Determination of Nitrite in Water by pre-column Formation of 2-phenylphenol with Flame Ionization Detection. Journal of

- Chromatography. A. 760,319-325, 1997.
12. Andrade R. Viana CO, Guadagnin SG, Reyes FGR Rath S. A flow-injection spectrophotometric method for nitrate and nitrite, determination through nitric oxide generation. Food Chemistry 80, 4, 597-602, 2003.
 13. Zhang X, Wuang H, Fu NN, Zhang HS. A fluorescence quenching method for the determination of nitrite with rhodamine 110. Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 59, 8, 1667-1672, 2003.
 14. Miró M., Cladera A., Estela J.M. and Cerdá V. Sequential Injection Spectrophotometric Analysis of Nitrite in Natural Waters Using an on-line Solid-Phase Extraction and Preconcentration Method. Analyst. 125,943-948, 2000.
 15. Fox J.B. The Determination of Nitrite: A Critical Review. CRC Critca. Review. Analytical Chemistry. 15, 283-313, 1985.
 16. Galignani M., Valero M., Sánchez A., Brunetto M.R., Burguera J.L., Burguera M. La determinación de Nitritos. Parte I-Métodos fundamentados en la espectroscopia de absorción molecular en el ultravioleta-visible. Revista de la Sociedad Venezolana de Química, 24 1,3-15, 2001.
 17. Matthew J. Moorcroft, James D. Compton R. G. Detection and Determination of Nitrate and Nitrite: A Review. Talanta 54, 785-803. 2001.
 18. Jay B. Fox, Jr. Kinetics and mechanisms of the griess reaction. Analytical Chemistry. 51, 1493-1502, 1979.
 19. Shinn M. B. Colorimetric method for determination of nitrite Ind. Eng: Chem. Anal. Ed. 13, 33, 1941.
 20. Jiang M., Jiang F., Duan J., Tang X. and Zhao Z. Spectrophotometric determination of trace nitrite based on catalytic oxidation of thionine by potassium bromate. Analytica Chimica Acta. 234, 403-407, 1990.
 21. Zhang Zhi-Qi, Gao Lou-Jun, Zhan Han- Ying and Liu Qian-Guang. Catalytic Simultaneous Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate with a flow iniection system. Analytica. Chimica. Acta. 370, 59-63,

www.bdigital.ula.ve

- 1998.
22. Zhang Zhi-Qi, Gao Lou-Jun, Zhan Han- Ying. Flow- injection catalytic spectrophotometric determination of nitrite using the redox reaction between naphthol green B and potassium bromate. Talanta 47,497-501, 1998.
23. Kazemzadeh A, Ensafi Ali. A Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection spectrophotometric detection. Microchemical Journal. 69, 159-166, 2001.
24. Manzoori J. L., Mohammad H. S., Haji-Shabani AM. Spectrophotometric determination of nitrite based on its catalytic effect on the oxidation of carminic acid by bromate. Talanta. 46, 1379-1386, 1998.
25. Galignani M., Valero M., Brunetto M.R. Ayala c., Sanchez A, Burguera M., Burgura J. L. Los métodos cinéticos. Una alternativa atractiva para el análisis espectrofotométrico de nitritos en aguas a niveles de traza y ultratrazas Ciencia (En imprenta).
26. Murad I. H. Helaleh, Korenaga T. Fluorimetric Determination of Nitrite with acetaminophen. Microchemical Journal 64, 242-246, 2000.
27. Hong Wang, Wei Yang, Sha-Cai Liang Zhi-Min Zhang, Hua-Shan Zhang., Spectrofluorimetric determination of nitrite with 5,6-diamino- 1.3-naphthalene disulfonic acid. Analytica. Chimica Acta. 419, 169-173. 2000
28. Murad I. H. Helaleh, Korenaga T. Fluorimetric Determination of Nitrite with acetaminophen . Microchemical Journal. 64, 242-246, 2000.
29. Kanda Y; Taira M. Flow-injection analysis method for the determination of nitrite and nitrate in natural water samples using a chemiluminescence NOx monitor Analytical Sciences, 19, 5, 695-699, 2003.
30. Cox, R. D., Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence, Analytical Chemistry. 1980, 52,332-335.
31. Braman, R. S., y Hendrix, S. A, Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. Analytical Chemistry. 61, 2715-2718, 1989.
32. Ferraro J.R., Basile L.J., (Eds), Fourier Transform Infrared Spectroscopy.

- Application to Chemical Systems". Academic Press, New York, 1978.
33. López-Anreus E., Garrigues S., de la Guardia M., Vapour generation Fourier transform infrared spectrometry. A New Analytical Technique, Analytica Chimica Acta, 308, 28-35, 1995.
34. Gallignani M*, Ayala C., Brunetto M.R, Burguera J.L, Burguera M., Flow analysis-Hydride generation-Fourier transform Infrared Spectrometry-A new analytical technique for the individual and simultaneous determination of antimony, arsenic and tin, Analyst, 127(12) (2002)1705-1712.
35. Gallignani M., Brunetto M. R., Valero M., Ayala C., Sánchez A. La Espectrometría Infrarroja de Transformada de Fourier (IR-TF) en Fase Gaseosa. Revista de la Sociedad Venezolana de Química. (Enviada a publicación, Julio del 2003).
36. Coonley R. T., Espectroscopia Infrarroja Editorial Alambra, 1^{era} edición española, Madrid, España, (1979).

www.bdigital.ula.ve