

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ELECTROQUÍMICA



TESIS DOCTORAL

***DESARROLLO DE TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS
APLICABLES A METALES EN FLUIDOS BIOLÓGICOS
DE INTERÉS BIOSANITARIO.***

DETERMINACIÓN DE Cu EN LCR.

(LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO)

M^a del Pilar Ambel Carracedo

Badajoz, 1999



**DESARROLLO DE TÉCNICAS ELECTROANALÍTICAS APLICABLES A
METALES EN FLUIDOS BIOLÓGICOS DE INTERÉS BIOSANITARIO.
DETERMINACIÓN DE Cu EN LCR.
(LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO)**

por

M^a del Pilar Ambel Carracedo

Visado en Badajoz, a 13 de Julio de 1999

Fdo: Antonio Sánchez Misiego,
Catedrático de Química Analítica
de la Universidad de Extremadura

Fdo: Rosa M^a García- Moncó Carra,
Profesora Titular de Química Analítica
de la Universidad de Extremadura

Memoria de Investigación presentada para optar al Grado de Doctor dentro del Programa de Doctorado “Química Analítica y Electroquímica”.

Fdo: M^a del Pilar Ambel Carracedo

FRANCISCO VINAGRE JARA, Director del Departamento de Química Analítica y Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura,

CERTIFICO :

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL , con el título “ *Desarrollo de técnicas electroanalíticas aplicables a metales en fluidos biológicos de interés biosanitario. Determinación de Cu en LCR (Líquido Ceforraquídeo)* ” , ha sido realizado bajo la dirección de los profesores Dres. D. Antonio Sánchez Misiego y Dña. Rosa M^a García-Moncó Carra, en el Departamento de Química Analítica y Electroquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y reúne los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias, dentro del Programa de Doctorado “ Química Analítica y Electroquímica”.

Y para que conste, expido y firmo la presente certificación en Badajoz a 13 de Julio de 1999.

ÍNDICE

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- OBJETO Y PLAN DE TRABAJO	1
I.2.- EL COBRE EN LA VIDA	5
I.2.1.- Introducción	5
I.2.2.- Funciones fisiológicas	10
I.2.3.- Funciones biológicas	13
I.2.4.- Deficiencia y toxicidad	16
I.2.5.- Enfermedades relacionadas.....	19
I.2.6.- Enfermedad de Wilson.....	24
I.3.- TÉCNICAS USADAS EN EL ANÁLISIS DE ELEMENTOS	
TRAZA (COBRE)	28
I.3.1.- Espectrometría de absorción.....	28
I.3.2.- Espectrofotometría de emisión	31
I.3.3.- Análisis por activación neutrónica.....	34
I.3.3.1.- Análisis Instrumental (INAA).....	34
I.3.3.2.- Análisis Radioquímico (RNAA).....	35
I.3.4.- Técnicas electroanalíticas	39
I.3.4.1.- Técnicas voltamperométricas	39
I.3.4.2.- Técnicas con preconcentración.....	47
* Voltamperometrías	47
* Potenciometrías	50
I.3.4.3.- Electroodos de trabajo.....	51
I.3.5.- Otras consideraciones	53

CAPÍTULO II.- ESTUDIOS VOLTAMPEROMÉTRICOS (CON PRECONCENTRACIÓN) EN MEDIOS MODIFICADOS CON ETILENDIAMINA Y DERIVADOS.

II.1.- INTRODUCCIÓN	56
II.2.- PARTE EXPERIMENTAL	59
II.2.1.- Reactivos	59
II.2.2.- Aparatos.....	60
II.2.3.- Procedimiento.....	61
II.3.- ESTUDIOS CON ETILENDIAMINA .	
(RESULTADOS , DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES)	62
II.3.1.- Comportamiento del fondo.....	62
II.3.2.- Estudio del tiempo de acumulación.....	69
II.3.3.- Estudio del potencial de acumulación	87
* Estudio en DPV	87
* Estudio en SWV	91
II.3.4.- Influencia de la presencia de oxígeno.....	96
II.3.5.- Calibrados para diferentes concentraciones de cobre	109
II.4.- ESTUDIOS CON DERIVADOS DE LA ETILENDIAMINA.	
(RESULTADOS , DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES)	115
II.4.1.- Resultados con la modalidad DPV	116
II.4.2.- Resultados con la modalidad SWV	120
II.4.3.- Estudio conjunto por DPV y SWV.....	124

**CAPÍTULO III.- ESTUDIOS POTENCIOMÉTRICOS (CON
PRECONCENTRACIÓN) EN MEDIOS MODIFICADOS CON
ETILENDIAMINA Y DERIVADOS.**

III.1.- INTRODUCCIÓN.....	127
III.2.- PARTE EXPERIMENTAL.....	128
III.2.1.- Reactivos	128
III.2.2.- Aparatos	129
III.2.3.- Procedimiento	130
III.3.- ESTUDIOS CON ETILENDIAMINA .	
(RESULTADOS , DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES)	132
III.3.1.- Estudios en medio etiléndiamina	132
III.3.1.1.- Ensayos previos.....	132
III.3.1.2.- Influencia de los tiempos de acumulación	137
III.3.1.3.- Influencia de la concentración de cobre	
a diferentes tiempos de acumulación.....	141
III.3.1.3.a.- Estudios para Tac = 1 minuto.....	141
III.3.1.3.b.- Estudios para Tac = 2, 3 y 5 minutos	143
III.3.1.4.- Estudio de la presencia de diferentes	
agentes oxidantes.....	144
III.4.- ESTUDIOS CON DERIVADOS DE LA ETILENDIAMINA.	
(RESULTADOS , DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES)	148
III.4.1.- Influencia de la intensidad de redisolución	149
III.4.2.- Influencia de la concentración de Hg ²⁺	151
III.4.3.- Estudio comparativo de los tres reactivos	153
III.4.4.- Influencia de la concentración de cobre	155

CAPÍTULO IV.- APLICACIONES ANALÍTICAS A FLUIDOS BIOLÓGICOS (LCR).

IV.1.- VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA.....	158
IV.1.1.- Planteamiento general para muestras reales.....	158
IV.1.2.- Ensayos con LCR de perro.....	159
IV.1.2.1.- Primeros ensayos	159
IV.1.2.2.- Influencia del tiempo de acumulación	163
IV.1.2.3.- Influencia de la materia orgánica en la sensibilidad del método.....	165
IV.1.2.4.- Determinación del contenido de cobre en LCR de perro	167
IV.1.3.- Ensayos con LCR de cerdo	169
IV.1.3.1.- Primeros ensayos	169
IV.1.3.2.- Influencia del tiempo de acumulación	172
IV.1.3.3.- Influencia de la materia orgánica en la sensibilidad del método.....	172
IV.1.3.4.- Determinación del contenido de cobre en LCR de cerdo.....	174
IV.1.4.- Ensayos con LCR humano.....	175
IV.1.4.1.- Primeros ensayos	175
IV.1.4.2.- Influencia del tiempo de acumulación	178
IV.1.4.3.- Influencia simultánea del tiempo de acumulación y de la materia orgánica en la sensibilidad del método.....	181

IV.1.4.4.- Determinación del contenido de cobre en LCR humano	184
IV.1.4.5.- Optimización del procedimiento para analizar LCR humano	185
IV.1.5.- Calidad analítica de los resultados.....	195
IV.1.5.1.- Evaluación de la precisión del método	195
IV.1.5.2.- Evaluación de la exactitud del método	196
IV.1.6.- Ensayos con derivados de la EN.....	200
IV.2.- POTENCIOMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA	203
IV.2.1.- Planteamiento general.....	203
IV.2.2.- Ensayos con LCR de perro.....	204
IV.2.2.1.- Primeros ensayos	204
IV.2.2.2.- Influencia del tiempo de acumulación.....	208
IV.2.2.3.- Determinación del contenido de cobre en LCR de perro	211
IV.2.2.4.- Influencia de la cantidad de muestra utilizada.....	211
IV.2.3.- Ensayos con LCR de cerdo	217
IV.2.4.- Ensayos con LCR humano.....	226
IV.2.5.- Calidad analítica de los resultados.....	233
IV.2.5.1.- Evaluación de la precisión del método	233
IV.2.5.2.- Evaluación de la exactitud del método	236
IV.2.6.- Ensayos con derivados de la EN.....	240
CONCLUSIONES.....	244
BIBLIOGRAFÍA.....	247

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

I.1.- OBJETO Y PLAN DE TRABAJO

La presente Memoria forma parte de una línea de investigación más amplia, conformada por los directores de la misma y que podría resumirse como orientada hacia el estudio y diseño de nueva metodología electroanalítica para la determinación de oligoelementos en matrices (en particular fluidos) de naturaleza biológica. En esta oportunidad, concretamente, se ha dirigido la atención al cobre (dentro de los primeros) y al líquido cefalorraquídeo (LCR) (dentro de los segundos).

En forma resumida, los principales problemas con que se enfrenta el presente trabajo son los siguientes:

a) La presencia de cobre en concentraciones extraordinariamente pequeñas, para cuya determinación no existen técnicas analíticas adecuadas, ni por su sensibilidad, rapidez, economía, cantidad de muestra necesaria, etc., limitaciones mucho más acusadas si se considera la naturaleza de las muestras en estudio, tales como líquido cefalorraquídeo (LCR), etc.

b) La presencia de materia orgánica (M.O.) en las muestras, que interfiere gravemente en las técnicas electroanalíticas que se pretenden aplicar, especialmente cuando el objeto final son los análisis "in situ" e "in vivo" y por lo tanto no se puede recurrir a la mineralización de las muestras.

c) El vacío bibliográfico encontrado, consecuencia sin duda y en primer lugar por la elevada dificultad intrínseca del tema abordado.

De los tres aspectos enumerados, probablemente sea el segundo el que, por ser el menos estudiado, presente en estos momentos un mayor calado analítico y, por consiguiente, merezca mayor atención y comentario. Es bien conocido que la materia orgánica (M.O.) presente en los fluidos biológicos participa en mayor o menor proporción en fenómenos de adsorción sobre superficies de mercurio e igualmente son de dominio general las excepcionales propiedades que este metal aporta cuando se utiliza como electrodo de trabajo en técnicas electroanalíticas. Lo primero ha motivado frecuentes abandonos del mercurio con fines analíticos, dado que la adsorción incontrolada de materia orgánica en su superficie, la consiguiente disminución de ésta y en general su comportamiento irregular, no solo disminuye la sensibilidad analítica sino también (y lo que es más grave) proporciona resultados erráticos de imposible interpretación.

Capítulo I. Introducción

Lo segundo justifica la insistencia de algunos investigadores por estudiar en profundidad el mecanismo de adsorción de la M.O. sobre mercurio para, de esta manera, aumentar el campo de aplicación de los electrodos de mercurio (gotas, película, amalgama, etc.) al análisis de analitos ahora interferidos (iones metálicos y otros) o al de las propias sustancias interferentes.

Sánchez Misiego y colaboradores han llevado a cabo estudios que abordan esta temática, algunos de ellos publicados (**1, 2**) y otros por publicar, utilizando como analito el cobre presente en agua de mar. Podrá discutirse si el agua de mar puede o no calificarse como fluido biológico, pero lo cierto es que tiene nexos de unión científicamente muy interesantes con los aceptados universalmente como fluidos biológicos: plasma, LCR, sudor, orina, saliva, etc. Por ejemplo, en su seno se desarrolla una parte importante de los seres vivos (animales y vegetales), los cuales obtienen de ella la principal parte de sus alimentos, presenta una composición salina que a su vez condiciona una presión osmótica compatible con los seres vivos que en ella se desarrollan, presenta recursos fisico- químicos que garantizan la necesaria termorregulación o la constancia de pH (también ligeramente alcalino, a semejanza de la mayoría de los fluidos biológicos), etc.

El agua de mar también posee una amplia variedad de M.O., que en buena proporción interactúa con los iones metálicos en ella presentes; pero , a diferencia con los fluidos biológicos, su contenido en esta M.O. es bastante menor, de tal manera que los estudios indicados de Sánchez Misiego y colaboradores han constituido a manera de puente de unión entre las matrices exentas de materia orgánica (bien en origen o después de mineralizar) y las matrices aquí conocidas como fluidos biológicos. Así, se ha demostrado que el cobre presente en el agua de mar (monovalente y divalente, y al menos parcialmente ligado a la materia orgánica) se libera en su totalidad si se modifica el medio hasta valores suficientemente ácidos ($\text{pH} \approx 2$ con HCl) o en presencia de etilendiamina (EN) hasta pH superiores a 9; en otras palabras, anulando la capacidad complejante de la M.O., (que es el recurso más frecuente), o compitiendo con ésta acudiendo para ello a una sustancia de mayor capacidad complejante. Se comprobó igualmente que estos procesos son químicamente reversibles y cuantitativos y que la sensibilidad del método electroanalítico está muy condicionada a que el proceso de redisolución lleve al cobre hasta Cu (I) o Cu (II) y, muy especialmente, a que dicho proceso de redisolución sea o no electroquímicamente reversible

(esto último solo aplicable a técnicas en que el barrido de potenciales no sea lineal). En cuanto a la M.O., se concluyó que el cobre incorporado en adiciones estándar ofrece similar

Capítulo I. Introducción

comportamiento al cobre presente en el agua de mar, de manera que dicha M.O., actúa sin discriminar su origen. Y de otro lado se demostró que su presencia no afecta significativamente ni a la sensibilidad ni a la repetitividad de los resultados, si se les compara con los obtenidos con matrices sintéticas de agua de mar, pero sin M.O.; lo que debe interpretarse como que los anunciados fenómenos de adsorción no constituyen interferencia cuando se opera en las condiciones indicadas.

Pero no ocurre lo mismo cuando se sustituye el agua de mar por plasma sanguíneo, por ejemplo. En este caso las señales de redisolución son mucho menores e inconstantes, comprobándose que el electrodo de mercurio se deteriora con el tiempo progresivamente, de manera especial si se opera con película. La explicación de esta fenomenología se encuentra en que ahora la concentración de M.O. es mucho mayor y su adsorción sobre la superficie de mercurio es lo suficientemente cuantiosa como para interferir; de hecho, cuando se opera con agua de mar en la que se ha enriquecido entre 10 y 50 veces su contenido orgánico, los fenómenos observados son similares (3). Si se da la vuelta a toda esta descripción se deduce que “ la interferencia causada por el material orgánico cuando se opera con electrodos de mercurio debería eliminarse diluyendo la matriz lo suficiente ” ; obviamente esto no es tan sencillo, sobre todo cuando el analito está a nivel de traza, pero en todo caso ahora el problema sería otro: encontrar procedimientos lo suficientemente sensibles.

Caminando por esta vía, en la presente Memoria se acude a condiciones (reactivos) que operan en medios moderadamente alcalinos, que propician que el proceso de redisolución involucre dos electrones ($\text{Cu}^0 \rightarrow \text{Cu}^{2+}$) y que sea electroquímicamente reversible; todo ello aplicado a un tipo de matriz perteneciente al grupo de fluidos biológicos y con un contenido en M.O. moderadamente bajo; podría decirse que intermedio entre el agua de mar y otros fluidos biológicos, de forma que se añadiría un nuevo eslabón a la cadena de estudios que se van conformando: muestras sintéticas o mineralizadas, agua de mar,...LCR... , otros fluidos biológicos.

Desde el punto de vista de las técnicas electroanalíticas, se ha recurrido a las más sensibles, bien porque admiten preconcentración (voltamperometrías en sus variantes DPP y SWV), bien porque dicha preconcentración la tienen incorporada “per se” (potenciometría de redisolución). Por las razones expuestas, la electródica empleada ha sido siempre de mercurio (gota o película) y los reactivos modificadores estuvieron circunscritos a los de la familia o

Capítulo I. Introducción

derivados de la etilendiamina, ya que otros reactivos ensayados han resultado no eficaces o requieren estudios que exceden el objeto de esta Memoria.

En definitiva, el OBJETO del presente trabajo, se centra en los siguientes puntos :

1.- Aportar nuevos conocimientos al fenómeno interferente que supone la presencia de M.O. en las matrices objeto de análisis mediante técnicas electroanalíticas que usan electrodos de mercurio.

2.- Incorporar al procedimiento analítico nuevas estrategias que permitan el empleo del mercurio como material electródico en técnicas electroanalíticas aplicadas al análisis directo de oligoelementos en fluidos biológicos.

3.- Diseñar nueva metodología analítica aplicable al control de cobre en LCR, como aportación al diagnóstico y seguimiento de enfermedades relacionadas con dicho parámetro, como la de Wilson.

I.2.- EL COBRE EN LA VIDA

I.2.1.- Introducción

Además de los elementos químicos mayoritarios (desde C, H, O , hasta Ca , P , Na , K, y Mg), el cuerpo humano contiene cantidades traza de la mayor parte de los elementos del Sistema Periódico (S. P.). En la Tabla I.2.1.1. se resumen algunos datos sobre contenido total, absorción y excreción de 23 elementos traza; se trata de valores medios correspondientes a mediciones realizadas en diversos órganos, tejidos y líquidos corporales de sujetos de unos 70 Kg de peso corporal (4) .

Muchos de estos elementos traza son considerados esenciales para la vida, conservación de la salud y reproducción; se conocen con cierta precisión sus funciones como cofactores enzimáticos o como electrolitos en los líquidos corporales, así como su importancia en los sistemas de transporte de oxígeno o como componentes de macromoléculas que no tienen acción enzimática.

La lista de elementos químicos con función biológica ha ido ampliándose progresivamente; ello ha sido posible gracias a la puesta a punto de técnicas adecuadas para realizar análisis en muestras orgánicas (alimentos o tejidos) altamente purificadas, es decir, descontaminadas de elementos químicos procedentes del medio ambiente (de origen extraorgánico); todo lo cual ha permitido, a su vez, estudiar el efecto de deficiencias de elementos traza específicos sobre numerosos aspectos fisiológicos, tanto en animales y plantas como en seres humanos.

Algunos investigadores especialistas en el estudio de la significación biológica de los elementos traza sugieren que, probablemente, todos los elementos del S.P. tienen (o se descubrirá que tienen) alguna función fisiológica. De todas formas, ciertos elementos tales como Cd, Pb y As están ya muy caracterizados por sus propiedades tóxicas y nocivas sobre el metabolismo humano. Puede decirse que con las solas excepciones del Fe y I, la importancia fisiológica de los demás elementos traza presentes en la dieta se está empezando a conocer recientemente. De hecho ciertas alteraciones de determinadas funciones fisiológicas se comienzan a asociar con deficiencias nutricionales de elementos traza específicos; por ejemplo, flúor y caries dental, cromo e intolerancia a la glucosa, cobre e hipercolesterolemia, etc. En este

Capítulo I. Introducción

sentido, conviene siempre tener muy en cuenta los efectos de los tratamientos tecnológicos utilizados en la industria alimentaria (refinados, liofilizados, etc.) sobre el contenido de elementos traza (u oligoelementos) que, en última instancia, son consumidos por los individuos, para bien o para mal.

TABLA I.2.1.1.
ELEMENTOS TRAZA PRESENTES EN LOS SERES HUMANOS.

Elemento (en orden de abundancia)	Contenido medio en el cuerpo (70Kg) (mg)	Facilidad de absorción a partir de la dieta (%)	Concentración en plasma (µg/dl)	Órganos de acumulación principal	Ruta de excreción principal
Hierro	3500-4500	5-15	100	Hígado,Bazo	Bilis
Flúor	2600-4000	40-100	20-100	Dentadura	Orina
Cinc	1600-2300	31-51	100	Piel,Huesos	Páncreas,Bilis
Silicio	1100	1-4	500	Piel	-
Plomo	122	5	15-40	Hueso	Bilis
Aluminio	50-150	0.1	13-17	Pulmón	Orina
Cobre	60-80	30-60	100	Hígado	Bilis
Boro	48	99	-	Hueso	Orina
Cadmio	30-38	25	0.1-0.7	Riñón,Hígado	Orina
Bario	22	1-15	10-20	¿ Piel ?	Orina
Selenio	21	35-85	7-30	¿ Riñón ?	Orina
Germanio	20	Fácil	-	Bazo	Orina
Iodo	10-20	100	2-4	Tiroides	Orina
Estaño	14	2	-	Hígado,Bazo, Pulmón	Orina
Arsénico	8-20	5	10-64	¿Piel,Cabello?	Orina,Bilis
Manganeso	12-16	3-4	1-2	Hígado,Hueso	Bilis
Molibdeno	9-16	40-100	1-3	¿Hígado?	Orina
Mercurio	13	5-10	0.5-1	Riñón	-
Vanadio	10	0.1-1.5	0.5-2.3	¿Grasa?	Orina
Titanio	9	1-2	-	Pulmón	Orina
Níquel	5-10	3-6	2-4	Piel,Hígado	Orina
Cromo	1-5	1	0.15	Bazo,Corazón	Orina
Cobalto	1.1-1.5	63-97	0.007-6	Hígado,Grasa	Orina

El cobre, lo mismo que el cinc y otros muchos elementos traza, se encuentra en altas concentraciones en la porción germinal de las semillas de los cereales integrales. Además, son buenas fuentes de cobre las leguminosas, hígado, crustáceos y moluscos. Por el contrario, la carne, leche, derivados lácteos, cereales descascarillados y productos de panadería, son alimentos relativamente pobres en cobre.

Los sistemas biológicos han hecho buen uso de las propiedades del cobre, especialmente su capacidad para aceptar y donar electrones (es decir, como participante en reacciones de oxidación-reducción) mientras forma complejo con alguna proteína; de hecho, los iones del cobre forman fácilmente complejos con los aminoácidos, generalmente más estables que los que éstos forman con otros iones metálicos.

El cobre normalmente se encuentra como un constituyente de proteínas, no como ion libre, sino formando parte principalmente de enzimas, y son esas relaciones " proteínas- cobre / enzimas " las que están implicadas en funciones metabólicas vitales.

En términos de valores medios, el ser humano adulto contiene del orden de entre 50-80 o 70-100 mg de cobre total en su organismo, según los autores. Por lo tanto su concentración corporal es notablemente inferior a la del hierro o cinc . (5). La toma media de cobre es 2-5 mg/día y de esta cantidad se absorbe alrededor de una tercera parte. Para mantener un balance normal, deben ocurrir pérdidas de aproximadamente 0,6-1,6 mg/día, además de las pérdidas fecales de Cu no absorbido. El 80% del total de Cu se elimina por la bilis, 0,5-1,3 mg/día. El resto, 0,1-0,3 mg, se pierde a través de la orina y el sudor.

Por lo que respecta a su distribución corporal, en la Tabla I.2.1.2. (4) se indica que en el ser humano los niveles de cobre más elevados pueden medirse en hígado y en cabello; otros órganos que tienen altas concentraciones de cobre son el cerebro y el corazón , mientras que las concentraciones en otros órganos o tejidos son considerablemente más bajas y relativamente similares entre sí. Desde el punto de vista de masa corporal, se puede considerar que el hígado, tejido muscular y sangre, albergan la mayor cantidad de cobre del organismo, aunque pueden encontrarse cantidades menores del elemento en otras células y tejidos . Curiosamente, hay una alta concentración de cobre en el hígado fetal durante los tres últimos meses del embarazo, y sólo alrededor del cuarto año del niño el cobre en hígado revierte a los niveles normales de adultos.

Capítulo I. Introducción

Por su parte, los niveles de cobre en sangre total de individuos sanos están normalmente en el rango de 1,1-1,5 mg/l, aunque estos valores pueden fluctuar con la edad, ejercicio y condición de salud. (6).

TABLA I. 2.1.2.
CONCENTRACIONES DE HIERRO Y COBRE EN VARIOS ÓRGANOS DE
INDIVIDUOS ADULTOS

	Hierro ($\mu\text{g/g}$)	Porcentaje de contenido corporal	Cobre ($\mu\text{g/g}$)	Porcentaje de contenido corporal
Sangre	500	70	1.2	8
Hígado	180	8	7	13
Riñón	16	0.1	2.7	1
Corazón	20	0.1	3.4	1
Cerebro	33	1.4	4.6	9
Bazo	70	0.2	1.2	0.1
Pulmón	19	0.5	1.6	2
Músculo	9	6 ?	1.1	38
Cabello	-	-	15	-
Médula ósea	300	5 ?	-	-

Todos los fluidos del cuerpo contienen complejos de cobre, encontrándose altas concentraciones en bilis, la cual proporciona el mejor camino excretor para el cobre. Por otra parte, la orina contiene muy bajos niveles de cobre.

I.2.2.- Funciones fisiológicas

La gran importancia del cobre se pone de manifiesto cuando se consideran las enzimas que requieren el mismo. Las enzimas del cobre están extensamente distribuidas dentro del cuerpo; ellas cumplen varias y diversas funciones, que incluyen catálisis tanto de oxidación-reducción como de protección a nivel celular junto a radicales superóxido. Al menos diez enzimas son conocidas por ser sus funciones dependientes de cobre, y si disminuye la función de alguna de ellas probablemente se produzcan defectos en el metabolismo.

Citocromo-c-oxidasa: es el componente terminal de la cadena transportadora de electrones de la membrana interna de la mitocondria en todas las células de mamíferos y es requerida por las células para producir toda la energía necesaria para conducir las reacciones bioquímicas que requieren energía.

Dopamina-β-hidroxilasa: es esencial para la conversión de Dopamina → NorAdrenalina, una hormona neural que juega un importante papel en la transmisión de impulsos nerviosos.

Lisil-oxidasa: es necesaria para los enlaces de elastina y colágeno durante la formación, mantenimiento y reparación del tejido conectivo.

Superóxido dismutasa: (ver Figura I.2.2.1.) (4) se requiere para prevenir la acumulación de radicales superóxido que causan daño celular; la enzima responsable es una metaloenzima de cobre-cinc encontrada en el citosol de todas las células.

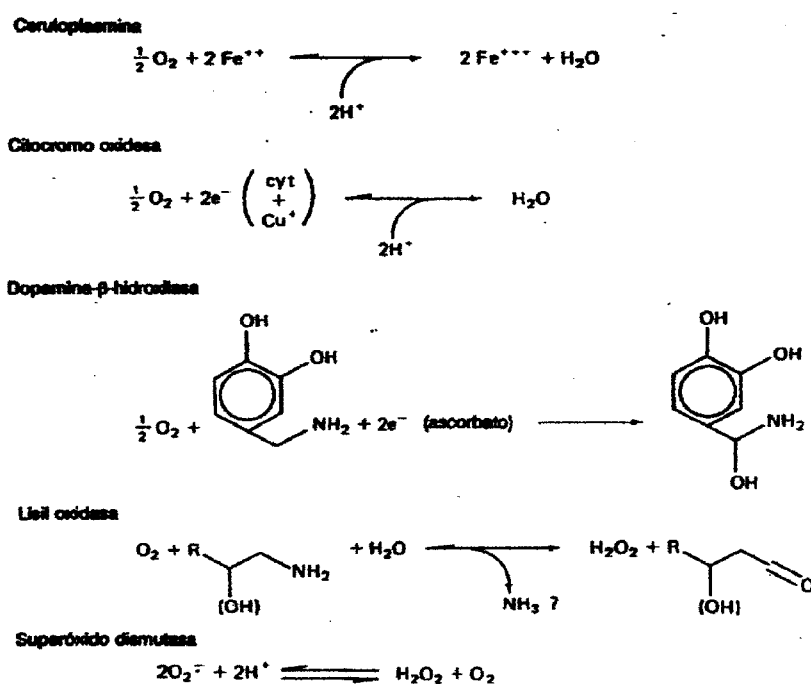
Ceruloplasmina, proteína que aloja la mayor cantidad de cobre extracelular (plasmático y del líquido intersticial), ejerce una cierta actividad oxidasa (muy débil e inespecífica), pero que puede tener importancia en los procesos de transferencia del hierro contenido en los depósitos celulares a la molécula de transferrina, la cual transporta hierro a la médula ósea y a otros lugares del organismo que precisan del elemento.

Esta función de la ceruloplasmina explica, en parte, que las sintomatologías de las anemias por deficiencia de hierro y por deficiencia de cobre, sean muy parecidas.

El cobre también es requerido por un número de aminas oxidasas que son responsables de fallos de aminas.

La relación del cobre con todo este sistema tan variado de enzimas significa que alteraciones en el metabolismo del cobre tienen importantes efectos: en general en relación al aprovechamiento de energía y, más específicamente, en el sistema nervioso y en el tejido conectivo.

FIGURA I.2.2.1.
REACCIONES CATALIZADAS POR ENZIMAS QUE CONTIENEN COBRE EN MAMÍFEROS



Además, el cobre es esencial para el crecimiento saludable y la reproducción de un gran número de plantas, debido a su existencia como constituyente de varias proteínas, principalmente enzimas, las cuales tienen variadas pero importantes funciones metabólicas. Estas proteínas que contienen cobre (proteínas de cobre o enzimas de cobre) tienen funciones clave en: respiración, fotosíntesis, lignificación y metabolismo de fenol, síntesis de proteínas y regulación de auxinas (hormonas de crecimiento).

Como con otros micronutrientes, el metabolismo de las plantas se deteriora cuando el contenido en cobre está por encima o por debajo de unos valores establecidos, debido a la gran influencia que tiene en variados procesos.

I.2.3.- Funciones biológicas

El cobre está implicado en determinadas e importantes funciones a nivel biológico, entre las que cabe destacar las siguientes :

Síntesis de Hemoglobina: El descubrimiento, en ratas, de que el cobre y sólo él evita la anemia resistente al hierro ha sido seguido en otros trabajos que revelan la notable interdependencia entre cobre e hierro. En cerdos, por ejemplo, se ha comprobado que una deficiencia de cobre puede indicar una defectuosa absorción de hierro por el tracto gastrointestinal. La ceruloplasmina, proteína de cobre, juega un papel principal en la movilización del hierro desde las células del retículo endotelial. En ovejas y ganado vacuno, la deficiencia de cobre lleva a la acumulación de hierro en hígado y a una inferior extensión en otros órganos, por ejemplo el bazo.

Pigmentación y textura de pelo: Uno de los signos más fácilmente reconocibles de la deficiencia de cobre en animales son el cambio en el color y la textura del pelo. El fundamento químico del cambio de color es una alteración en el metabolismo de la tirosina, un precursor de la melanina.

Función nerviosa: Diversos trastornos del sistema nervioso central incluyendo ataxia, temblor, ataque clónico, hipomielinización o desmielinización y reducidos niveles de esfingolípidos son sintomáticos de deficiencia de cobre en muchos animales. Animales de experimentación con dietas deficientes en cobre muestran lesiones necróticas en cerebro.

La función del cobre en el cerebro es asociada probablemente con dopamina y noradrenalina, las cuales se encuentran en concentraciones más bajas de lo normal en el tronco cerebral de corderos y ratas con deficiencias de cobre. Bajas concentraciones de dopamina y adrenalina se asocian en humanos con la enfermedad del Parkinson, una enfermedad caracterizada por temblores moderados y alteraciones motoras.

Protección frente a radicales superóxido: La dismutación de aniones superóxido por enzimas superóxidodismutasas de cobre y cinc, potencialmente proporciona menos aniones superóxido nocivos por convertirlos en H₂O₂ menos reactiva.

Tejido conectivo: Se descubrió en 1961 (7) que el cobre juega un papel importante en la maduración del tejido conectivo por vía de la enzima lisil-oxidasa, una enzima encontrada casi exclusivamente en este tejido. Los órganos más vulnerables en tejido conectivo son : sistema cardiovascular, huesos y pulmones.

Integridad cardiovascular: Probablemente la indicación más importante de la deficiencia de cobre es la que afecta a la integridad y elasticidad de las arterias, de considerable significación en la etiología de enfermedades cardiovasculares. Así, se ha observado en animales (pollos, cerdos, gatos, ratas, etc) que una deficiencia de cobre puede provocar la debilitación repentina y ruptura de una arteria principal, incluso del corazón. En humanos, esta alteración arterial es frecuentemente el suceso terminal en pacientes con enfermedad de Menkes.

Huesos: Los huesos de animales con deficiencia de cobre son más frágiles de lo normal. Esta anomalía se ha detectado en diferentes especies animales, así como en pacientes con enfermedad de Menkes. Por ejemplo, un síntoma común de la deficiencia de cobre en ovejas es un aumento de la incidencia de fracturas espontáneas de huesos. El defecto parece estar asociado con los componentes orgánicos y no con el material cristalino del hueso; se cree que la causa son las defectuosas uniones del colágeno ya que el colágeno total en huesos deficientes en cobre suele estar inafectado.

Pulmones: La función normal del pulmón depende de las células del parénquima del pulmón apoyadas por el colágeno extracelular y elastina. Se ha observado que el enfisema pulmonar en animales puede ser debido a fallos en su formación originados a su vez por deficiencias de cobre.

Inmunocompetencia: En trabajos recientes se han encontrado que, en animales con dieta pobre en cobre, aparecen importantes reducciones en el número de células de anticuerpos, lo que facilita la posibilidad de adquirir infección por Salmonella Typhimuriun. (8).

El cobre ha sido recientemente asociado con el metabolismo lipídico, lo que induce a pensar que el metabolismo de lípidos puede ser más sensible a los cambios de estado del cobre que a la anemia. Trabajos en ratas, han mostrado que la deficiencia de cobre puede aumentar de forma importante el colesterol en plasma. Además, hay modificaciones en la unión de colesterol a diferentes tipos de lipoproteínas que están asociadas con un aumento de riesgo de arterioesclerosis, una enfermedad en la cual se almacenan sustancias grasas en las paredes arteriales. La evidencia que asocia lípido y metabolismo de cobre viene de la identificación de agentes (9) que pueden:

- Aumentar el colesterol en plasma e inhibir la absorción de cobre.
- Disminuir el colesterol en plasma y mejorar la absorción de cobre .

I.2.4.- Deficiencia y toxicidad

La eficacia con la que tiene lugar la **absorción de cobre** varía ampliamente no sólo entre tipos de animales, sino entre sus diferentes razas, incluso está influenciado por la composición dietética. (10). De hecho, el poco cobre presente en la leche es muy bien absorbido por los animales, alcanzando una eficacia del 50% o superior; tal eficaz utilización del cobre, combinada con las normalmente altas reservas en el hígado de animales recién nacidos, protege a los animales jóvenes de las consecuencias de las antedichas bajas concentraciones de cobre en la leche.

En resumen: No es posible juzgar la adecuación de la dieta de cobre simplemente atendiendo a la ingesta del mismo, puesto que no todo este cobre es absorbido: Se estima que la fracción absorbida oscila entre el 25 y cerca del 60%.

La absorción de cobre ocurre principalmente en el medio ácido del estómago e intestino superior, probablemente formando complejos con aminoácidos y péptidos (5), y puede ser disminuida con iones calcio, potasio y amonio en concentraciones relativamente altas.

Además, molibdeno y azufre son dos de los más importantes factores de la dieta identificados, que reducen la eficacia de la absorción de cobre. (11,12) . Los mecanismos implicados no son del todo conocidos pero , con independencia de los mismos, es importante considerar los contenidos de ambos, molibdeno y azufre, en dietas cuando se intenta predecir la suficiencia de diferentes ingestas de cobre.

Se han desarrollado ecuaciones, basadas en datos procedentes de experimentos con ovejas y dietas con diferentes contenidos en Mo y S, para predecir la eficacia de la absorción de cobre; la validez de tales ecuaciones parece depender de la naturaleza de la dieta tanto como de los contenidos de Mo y S, y puede aplicarse solamente por encima de un rango particular de contenido en molibdeno. Así una dieta tan pequeña como 1 mg de molibdeno por Kg puede limitar la utilización del cobre para el crecimiento de ganado (12) .

En cuanto a la influencia que puede ejercer el hierro, se observó que dietas que contienen más de 350 mg/ Kg de hierro en materia seca pueden inhibir notablemente la utilización de cobre por el ganado, aunque no han sido demostrados síntomas clínicos asociados. En general, parece que materia seca que contiene cerca de 800 mg de Fe/ Kg puede tener el mismo efecto inhibitorio sobre la retención de cobre que el causado por 5 mg/ Kg de molibdeno.

Igualmente, altas cantidades de cinc y cadmio, a niveles presentes en el ambiente, pueden inducir la deficiencia de cobre en rumiantes. Durante algún tiempo se ha sabido que cinc y cadmio en exceso son complejados con proteínas ricas en cisteína (metalotioneínas), las cuales también tienen capacidad de complejar cobre. Parece que cinc y cadmio en exceso podría estimular la formación de metalotioneínas, las cuales aislarían también cobre.

Por otra parte, las situaciones **deficitarias de cobre** son relativamente frecuentes, como se deduce de las determinaciones de cobre realizadas en suero de individuos pertenecientes a “ poblaciones normales ” (13) .

Los principales síntomas que aparecen como consecuencia de la deficiencia de cobre son: concentraciones menores de cobre y ceruloplasmina en suero, un tipo de anemia similar a la que se presenta por deficiencia de hierro, neutropenia y degeneración del tejido vascular (con hemorragia) por una inadecuada síntesis de elastina y, quizás también, de colágeno.

Las situaciones corporales deficitarias de cobre son originadas casi siempre por insuficiente aporte del catión en la dieta. También puede estar causada por pérdidas excesivas del elemento, lo que por ejemplo puede suceder en individuos sometidos a tratamientos de diálisis renal.

En individuos adultos deficitarios de cobre, la administración oral de sulfato de cobre (hasta 2 mg/ comprimido) constituye la terapia adecuada para restablecer los niveles plasmáticos normales del catión.

Todos los micronutrientes se presentan en tejidos animales y plantas en muy bajas concentraciones (ppm) y elementos tales como cobre, hierro, cinc y manganeso pueden a veces interactuar en los lugares de absorción o utilización y, posiblemente, durante el transporte y almacenamiento. Como resultado de ello, el exceso relativo de alguno de dichos elementos puede inducir desórdenes metabólicos que a menudo se presentan como una deficiencia de otros

Capítulo I. Introducción

cationes metálicos. Por lo tanto, no se debe considerar al cobre (o a ningún otro micronutriente) aisladamente porque macroelementos y otros elementos traza pueden tener efectos acusados en su relación ingesta / absorción y utilización en plantas y animales.

En general, cuando el cobre penetra en el organismo por vía oral su **toxicidad** es relativamente pequeña, tanto en los seres humanos como en los animales.

A diferencia del hierro y del cinc, la biodisponibilidad del cobre contenido en la dieta es muy alta. La acumulación de cobre en los tejidos empieza a ser significativa cuando la cantidad del elemento en la dieta es de 200 a 500 veces superior a los valores normales. E incluso en estos casos, la toxicidad del cobre es causada no tanto por el propio catión, cuanto porque el cobre interfiere en la absorción y distribución corporal de otros iones metálicos, particularmente, hierro y cinc.

Ya se ha dicho que los problemas de toxicidad de cobre en animales dependen mucho de la dieta ingerida no sólo de cobre, sino también de molibdeno, azufre, cinc, cadmio e hierro, todos los cuales actúan como antagonistas de la absorción de cobre y su retención en el organismo; por ejemplo, la reducción en el contenido de molibdeno de la dieta puede producir toxicidad por cobre. Sin embargo, esto ocurre solamente cuando en la dieta predominan especies ricas en cobre y pobres en molibdeno, tales como el trébol subterráneo.

I.2.5.- Enfermedades relacionadas

Hay estudios que indican que el cobre puede tener gran significancia en diversas enfermedades de adultos. El primer estudio de balance de cobre, presentado por Tompsett en 1936, mostró que los adultos normalmente eliminan diariamente entre 2,0-2,5 mg de cobre en heces, orina, piel, saliva y menstruación. Este rango está actualmente en línea con la dietética recomendada (2,0-3,0 mg de cobre por día) por la OMS y la National Research Council (USA) (**14**). Durante el embarazo la necesidad se cree que está en el rango de 3-4 mg por día. (**15**).

Se ha encontrado que diversas enfermedades en el hombre están asociadas con elevados niveles de cobre en suero lo cual indica claramente la intervención y probablemente la importancia del cobre en la salud humana. (**16**); en esta línea se contempla un amplio repertorio de enfermedades tales como: enfermedad de Addison, anemia aplásica, síndrome de Banti, algunos carcinomas, desórdenes del sistema nervioso central, diabetes, enfermedad de Hodgkin, anemia por deficiencia de hierro, leucemia, malaria, esquizofrenia y anemia perniciosa. Sin embargo, los mecanismos implicados en la elevación de cobre en suero no se conocen.

Hay enfermedades innatas , tales como las enfermedades de Wilson y de Menkes, que consisten en alteraciones que afectan al metabolismo del cobre en sentidos opuestos.

La enfermedad de Menkes se debe a una alteración asociada al cromosoma X de los varones, aparece antes del tercer mes y por lo general termina con la vida del niño antes del sexto año. Se manifiesta por un conjunto de síntomas característicos de deficiencia de cobre; está originada por la incapacidad intestinal y hepática (más o menos acentuada) para transportar el catión. En esta enfermedad se ha observado que el cobre se acumula en otras células tales como los fibroblastos. Aún no se conoce su curación y los intentos de control de la enfermedad han resultado decepcionantes. (**17**).

Desafortunadamente, el cobre administrado oralmente a los pacientes con esta enfermedad es muy pobremente absorbido, ya que el cobre tiende a acumularse en las celdas mucosales. Y por otra parte, la terapia de cobre intravenosa sólo tiene un éxito parcial en el tratamiento de la enfermedad (**18**).

Por su parte, la enfermedad de Wilson no suele diagnosticarse hasta bien entrada la adolescencia, pues no es hasta entonces cuando comienzan a aparecer los síntomas derivados de la acumulación tóxica de cobre en hígado, riñón, córnea y sistema nervioso central, con la consiguiente reducción de la excrección corporal del catión. La enfermedad, además, se caracteriza por una menor biosíntesis hepática de ceruloplasmina.

El tratamiento terapéutico a base de agentes quelantes de cobre puede ser eficaz, mejorando las expectativas de vida, sobre todo si la enfermedad se encuentra en sus primeros estadios y los efectos tóxicos de la misma todavía no son excesivamente marcados.

El cáncer origina una alteración muy marcada en la distribución corporal y metabólica del cobre. Estudios realizados en animales y en seres humanos revelan que en patologías cancerosas están elevadas las concentraciones séricas de ceruloplasmina y cobre; se produce una disminución del turnover corporal del cobre; los niveles del catión en hígado y riñón son más bajos y, al menos, en ratas, se produce un incremento de la absorción intestinal de cobre.(**13**).

La velocidad de síntesis de ceruloplasmina, así como la propia estructura de la misma proteína, está alterada y se producen modificaciones en los mecanismos de distribución y metabolismo del cobre. Por otra parte, en seres humanos que consumen dietas en las que la relación Cu/Zn es baja, se ha podido observar una mayor incidencia de cáncer de estómago .

En estados inflamatorios es frecuente que las concentraciones séricas de cobre y ceruloplasmina estén aumentadas de un 20 a un 30% , lo que podría sugerir un efecto positivo del cobre y de la ceruloplasmina en el proceso de curación de heridas y en la restauración del tejido conectivo de la zona dañada en la que se desarrolló el proceso inflamatorio.

Ya se ha descrito, en párrafos anteriores, la importancia de la ceruloplasmina como fuente proveedora de cobre a todas las células , y como proteína de crucial importancia. Las observaciones clínicas relativas a las variaciones de la concentración de ceruloplasmina sérica son de gran valor en el diagnóstico de patologías asociadas con las distintas funciones de esta curiosa α_2 -glicoproteína, que es mucho más que una simple biomolécula transportadora de cobre.

En la Tabla I.2.5.1. (**13**) se resumen las principales situaciones corporales en las que es posible establecer una conexión entre las concentraciones séricas de cobre y de ceruloplasmina. Se observa, que la determinación de los niveles séricos de la glicoproteína puede ser de gran utilidad en el diagnóstico y valoración clínica de determinadas enfermedades. En este sentido cabe señalar que, clínicamente, siempre es preferible determinar específicamente la ceruloplasmina sérica (enzimáticamente o por radioinmunoensayo), que la concentración total de cobre en suero.

TABLA I. 2.5.1.
CONCENTRACIONES SÉRICAS DE COBRE Y DE CERULOPLASMINA EN
SITUACIONES DIVERSAS

Situación	Cambios en las concentraciones séricas de cobre y ceruloplasmina
Condiciones normales	
Menstruación	
Fase proliferativa	No cambio (Cu)
Fase luteínica	No cambio (Cu)
Embarazo	
Segundo trimestre	↑ 90 % (Cp)
Tercer trimestre	↑ 135 % (Cp)
Uso de anticonceptivos orales	
Con estrógenos	↑ 74 % (Cu)
Con sólo progestógenos	No cambio (Cp)
Fumador	
	↑ 21 % (CpO)
Enfermedad infecciosa	
Bronquitis	↑ 37 % (CpO)
Hepatitis	
<i>Aguda</i>	↑ 22 % (Cp)
<i>Crónica</i>	No cambio (Cp)
Tuberculosis	↑ 47 % (Cu)
Fiebre tifoidea	↑ 33 % (Cu)
Vacuna vírica (equina)	↑ 27 % (Cu)
Enfermedad no infecciosa	
EPOC	↑ 37 % (CpO)
Epilepsia	↑ 14 % - 53 % (Cu)
Fibroadenoma	↑ 42 % (CpO)
Enfermedad fibroquística mama	↑ 78 % (CpO)
Diálisis renal (crónica)	No cambio (Cp)
Cirrosis hepática	

Capítulo I. Introducción

<i>Biliar</i>	↑ 69 % - 92 % (Cp / Cu)
<i>No biliar</i>	↑ 22 % (Cp)
Esclerosis múltiple	↑ 18 % (CpO)
Infarto de miocardio (agudo)	↑ 22 % - 230 % (Cu / CpO)
Psoriasis	↑ 29 % (Cu)
Insuficiencia renal	Pequeña var. (Cp / Cu)
Cirugía (no de cáncer)	↑ 24 % (Cu)
Úlceras / pólipos	↑ 33 % (CpO)
Enfermedad de Wilson	↓ 65 % (Cp)
Desórdenes relacionados con los medicamentos	
Síndrome de abstinencia de alcohol	↑ 15 % (Cu)
Terapia de metadona	↑ 91 % (Cp)

Cp = Ceruloplasmina, medida inmunológicamente.

CpO = Ceruloplasmina, medida como actividad oxidasa.

Cu = Concentración sérica de cobre.

A continuación se estudiará en profundidad la principal enfermedad originada por exceso de cobre, y objeto y fin de nuestros estudios : la enfermedad de Wilson.

I.2.6.- Enfermedad de Wilson

En 1912 Samuel Wilson, neurólogo americano, publicó una monografía con la descripción completa de una **enfermedad degenerativa** caracterizada principalmente por la **destrucción de hígado y tejido nervioso, incluyendo regiones lenticulares del cerebro**. Wilson llamó a su enfermedad “degeneración lenticular progresiva” y, aunque no la relacionó con el metabolismo del cobre, sospechaba la probable presencia de un agente tóxico. Un año después se identificó el tóxico como el cobre, cuando fueron encontradas cantidades excesivas de este metal en el hígado, aunque la literatura no recogió nuevas noticias de este factor hasta 1.929, cuando se descubrieron grandes cantidades de cobre en cerebro y en hígado de pacientes con enfermedad de Wilson.**(19)**.

Antes de los años 50, la enfermedad de Wilson era fatal; el curso de la enfermedad variaba entre los pacientes; a veces se dañaba el hígado y sus manifestaciones, tales como la ictericia, fatiga, dolor abdominal, precedidos de desórdenes neurológicos, a la vez que, a menudo, habla defectuosa y torpeza, anunciaban el ataque de la enfermedad.

En 1.956 se descubrió que la penicilamina podría detener el acúmulo de cobre, invirtiendo el curso de la enfermedad y restaurando las expectativas normales de vida. La dosis terapéutica normal de Penicilamina es 1 g/día tomados con el estómago vacío para aumentar la absorción; aunque la capacidad quelante de los isómeros D y L de la penicilamina presumiblemente es la misma, el fármaco se administra en la forma D, pues se ha comprobado que en niños y adultos jóvenes el isómero L interfiere en la acción de la piridoxina.

También se recomienda evitar alimentos ricos en Cu, como hígado, chocolate, nueces, setas, melazas, guisantes, brécoles y mariscos. Por otro lado, algunos autores sugieren además tomar pequeñas cantidades de sulfuro de potasio vía oral para bloquear la absorción de Cu.

Ya se ha hablado anteriormente de las proteínas del cobre presentes en los mamíferos, de sus funciones y de sus propiedades; pero ninguna de estas proteínas, excepto la ceruloplasmina, presentan niveles anormales en pacientes con Wilson; la atención se ha centrado, pues, en esta proteína, como principal sospechosa de la acumulación de Cu en el organismo.

Capítulo I . Introducción

La CERULOPLASMINA tiene un P.M. : 132.000 dalton y contiene 6-8% de carbohidratos. Está compuesta por una cadena simple de polipéptidos con 1.065 aminoácidos. El contenido de Cu de la ceruloplasmina es 0,3%, que se corresponde con 6 átomos de Cu por molécula.

La ceruloplasmina tiene actividad oxidasa hacia varios componentes, incluyendo aminos aromáticas, fenoles, cisteína, ácido ascórbico y el ión ferroso. No se conoce si esta capacidad general de oxidación es significativa fisiológicamente; parece segura su participación en la movilización del hierro, desde sus depósitos como ferritina y hemosiderina, hasta la transferrina, que es la proteína que lo transporta en plasma.

En ferritina, hemosiderina y transferrina, el hierro está en estado férrico. Se cree que, para atravesar las membranas de las células de los depósitos, el metal debe estar reducido al estado ferroso. La capacidad ferroxidasa de la ceruloplasmina interviene en la reoxidación del hierro al estado férrico en la superficie de las células del depósito para poderse incorporar a la transferrina.

La concentración normal de ceruloplasmina en adultos está entre 200-400 mg/l de sangre. Sobre el 90% del Cu que se encuentra en plasma, está unido a la ceruloplasmina, y el resto, 60-120 µg/l se une mayoritariamente a la albúmina y algo a histidina ó glutamina.

En un 90% de pacientes con Wilson, los niveles de ceruloplasmina en suero están más bajos que los normales. En algunos casos la proteína está prácticamente ausente. Normalmente, sobre 0,5 mg de Cu al día se usan en la síntesis y catabolismo de ceruloplasmina. Eventualmente, la acumulación de Cu excede la capacidad de depósito del hígado, vertiéndose al torrente sanguíneo, y precipitando en zonas como cerebro, riñón y ojos.

La **falta de ceruloplasmina es la causa principal** del acúmulo de cobre, aunque alrededor de un 5% de pacientes con enfermedad de Wilson tienen normales los niveles de ceruloplasmina.

Capítulo I. Introducción

Desde el punto de vista genético, la enfermedad de Wilson es una alteración heredada. El gen defectuoso es *recesivo* y ocurre con una frecuencia próxima a 1 en cada 90 personas, sin preferencia por ningún grupo racial.

El gen defectuoso se localiza en el cromosoma **13** y debe estar involucrado en la regulación de otros metales pesados también, porque el Cu no es el único metal que se acumula en los pacientes con enfermedad de Wilson.

Los signos clínicos de la enfermedad, consisten en la acumulación tóxica de Cu en hígado, cerebro y otros órganos. Es característica la deficiencia de la proteína plasmática transportadora del metal, la ceruloplasmina. Los efectos tóxicos del Cu en el hígado pueden manifestarse como hepatitis aguda, cirrosis del hígado o hepatosplenomegalia asintomática. Las manifestaciones iniciales son extrahepáticas. Los primeros signos clínicos en la mayoría de los pacientes son *trastornos neurológicos o psiquiátricos* y siempre se *observan anillos de Kayser-Fleischer*. Estos depósitos de cobre verdes o dorados en la membrana de Descemet de la córnea no interfieren nunca con la visión, pero siempre indican que se ha liberado cobre hepático y hay daño cerebral.

Las principales *manifestaciones neurológicas* son trastornos del movimiento, particularmente temblor de movimiento o de reposo. Son comunes la espasticidad, rigidez, corea, salivación, disfagia y disartria. Son evidentes las alteraciones psiquiátricas, en parte debidas a efectos tóxicos del cobre sobre el cerebro.

Desde un punto de vista patogénico el defecto metabólico en la enfermedad de Wilson es la incapacidad de mantener un balance de cobre cercano a cero. En circunstancias normales todo el cobre tisular existe como elemento prostético de las proteínas con cobre, tales como: **citocromo-oxidasa, tirosinasa , superóxido dismutasa y ceruloplasmina**. Normalmente existe poca o ninguna cantidad de cobre libre (cobre no proteínico). En la enfermedad de Wilson hay más cobre que el que puede unirse específicamente a las proteínas con cobre; este cobre es tan tóxico entonces como el exceso de hierro, cinc, mercurio o plomo. Probablemente la toxicidad de estos cationes se debe en gran parte a combinaciones anormales con proteínas que normalmente no contienen metales.

Capítulo I . Introducción

En el cerebro el cobre en exceso se distribuye en forma ubicua. La necrosis de las neuronas puede ser precedida por la aparición de células de Opalski y de Alzheimer tipo II; sin embargo, ninguna es específica de la enfermedad de Wilson. El aumento de cobre en los riñones produce muy poco o ningún cambio estructural y comunmente no se altera la función renal.

Como ya se ha dicho, la enfermedad de Wilson tiene su origen o fundamento en una disminución anormal de la cantidad de ceruloplasmina, proteína encargada de transportar el cobre en la sangre y en el cerebro. A nivel cerebral , el fluido más importante y característico es el líquido cefalorraquídeo (LCR) o fluido cerebroespinal, que se forma y circula por los ventrículos cerebrales y meninges. Si disminuye genéticamente la cantidad de la proteína (ceruloplasmina) que transporta, controla y retiene el cobre, éste queda libre en cuantía mucho más elevada que la normal en situaciones no patológicas, convirtiéndose en un material tóxico; precisamente, este incremento en la cantidad de cobre libre en el LCR es la causa de los signos clínicos de la enfermedad y, a su vez, constituye un parámetro utilizado para el diagnóstico y control evolutivo de la enfermedad de Wilson. Así, mientras que en personas sanas la presencia de Cu en LCR no suele superar las 100 ppb, en personas con esta enfermedad son frecuentes niveles del orden de 200 ppb.

El único antecedente en España de análisis de cobre en LCR se debe a la Dra. Suquía Múgica (20) , quien en su Tesis Doctoral hace una breve incursión en el tema; acudiendo al método de aspiración directa y siguiendo técnicas de absorción atómica, establece como límite de detección 35 ppb de cobre.

I.3.- TÉCNICAS USADAS EN EL ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA (COBRE)

Vista la importancia de la presencia de cobre, no sólo en humanos sino también en animales y plantas, se procedió a revisar los métodos más adecuados para su determinación. Existen diferentes métodos analíticos suficientemente sensibles para medir concentraciones tan pequeñas como las que dan carácter a los elementos traza ; cada uno de ellos aporta sensibilidades especialmente grandes según qué elementos, en qué tipos de matrices y según en qué tipo de condiciones, de manera que no resulta posible relacionar elementos concretos con métodos analíticos concretos. De ahí la importancia de conocer las características más generales de cada uno de éstos, de forma que se disponga de criterios para seleccionar el método idóneo para cada problema planteado, tomando en todo caso, entre los criterios de selección, parámetros que hagan referencia al límite de detección, al límite de confianza y a la economía.

I.3.1.- Espectrometría de absorción

La espectrometría de absorción es un método para análisis elemental, especialmente para muestras en disolución. Es muy sensible, puede detectar elementos en el rango de unas pocas ppm (atomización por llama) o en el rango de unas pocas ppb (atomización electrotérmica), no siendo importante en la mayoría de los casos en qué forma molecular se encuentre el metal puesto que mide la concentración total, en todas las formas moleculares de la muestra. La técnica en sí es muy selectiva; de hecho, el análisis del metal se puede llevar a cabo en presencia de otros muchos elementos sin, normalmente, tener que separar el elemento analizado de los otros de la muestra, con la ventaja que esto supone pues simplifica el proceso, ahorra tiempo y evita errores.

Desde el punto de vista instrumental, la espectrofotometría de absorción atómica ha contado con los primeros instrumentos comerciales modernos para el análisis de trazas de elementos. Posteriormente, instrumentaciones para otros métodos, como la Fluorescencia de rayos X y la Espectrometría de I.C.P., han sido también bastante difundidos. De todas formas,

Introducción : Técnicas en el análisis de trazas

todavía la espectrofotometría de absorción atómica en todas sus variantes (llama, electrotérmico, generación de hidruros y zeeman) sigue siendo un método comúnmente utilizado.

En estos métodos la preparación de las muestras es uno de los factores críticos que determinan la calidad del resultado de los análisis : cualquier error en la preparación, se reflejará en los resultados. Por este motivo, la mayoría de las muestras no pueden ser analizadas tal y como se obtuvieron y necesitan algún tratamiento previo al análisis propiamente dicho. Incluso si la muestra original está en fase líquida , con frecuencia es necesario un pretratamiento, como dilución, preconcentración, extracción, El pretratamiento de muestras puede incluir el uso de resinas quelantes y/o extracción, con objeto de obviar elementos que puedan interferir o para separar los elementos buscados. De otra parte, debe indicarse que el sistema de atomización es clave en aspectos de interés analítico tan relevantes como la sensibilidad, límite de detección, precisión y exactitud de las determinaciones.

La *Atomización por llama* es uno de los métodos de atomización usados en los análisis por absorción atómica. Para cada elemento hay varios rangos óptimos de trabajo a diferentes longitudes de onda, que en el caso del cobre son : 2-8 $\mu\text{g/ml}$ a 324.7 nm ; 6-24 $\mu\text{g/ml}$ a 327.4 nm y 70-280 $\mu\text{g/ml}$ a 222.6 nm.

La *Atomización electrotérmica* se utiliza en numerosas variantes, entre las cuales hay que destacar: Horno de grafito, Tubo de carbono, Atomización en tubo de grafito,.....

La función de ambas atomizaciones (por llama y electrotérmica) es la generación de átomos de analito libres y en condiciones para ser excitados a la longitud de onda determinada. La Atomización por llama es simple, reproducible y se obtienen buenos resultados, pero tiene una limitación: la sensibilidad. Para un gran número de elementos, las técnicas de horno son más sensibles que las de llama y permite determinar concentraciones cientos de veces más pequeñas que aquellas que son posibles determinar por llama, aunque el análisis es mucho más largo.

Una parte de los factores que pueden causar señales analíticas de las muestras diferentes a las que presentan las disoluciones estándar son físicos: así, la viscosidad, causada por ejemplo por una diferente temperatura entre muestra y estándar. El cobre en disolución acuosa puede dar lugar a curvas de calibrado con pendiente muy diferente a la producida por cobre en disolvente orgánico. De tal forma que si la disolución acuosa contiene una cierta cantidad de sales inorgánicas o de algún material orgánico, la misma cantidad debería ser añadida a los estándares. Por ejemplo, para el análisis de cantidades traza de cobre en suero, el Cu es lixiviado con ácido tricloroacético al 12.5 % ; por lo tanto, los estándares también deberán contener 12.5 % de dicho ácido, (21) .

Hay otro tipo de interferencias que están en función de cómo interactúan en determinadas proporciones las concentraciones de elemento y analito. Por ejemplo, el análisis de 0.5% de cobre en acero necesita de la separación previa del hierro, generalmente por extracción, o de la preparación de disoluciones patrón con el mismo contenido en hierro que la muestra.

Contrariamente a los espectrómetros de emisión o espectrómetros ICP, que pueden leer señales de muchos elementos simultáneamente, los espectrómetros de absorción atómica son secuenciales, midiendo cada elemento a un tiempo. Este sistema secuencial hace los análisis mucho más largos en tiempo, factor que debe ser tenido en cuenta en cuanto al rendimiento o costo por elemento calculado.

I.3.2.- Espectrometría de emisión

Espectrometría de emisión atómica:

Está basada en los aspectos “ópticos” de emisión característicos de los átomos excitados y es la técnica utilizada desde más antiguo. En la espectrometría de emisión óptica la radiación emitida por el analito se lleva con la ayuda de un sistema de iluminación al espectrómetro, en el cual se resuelve dicha radiación, se mide la intensidad a la longitud de onda seleccionada y la señal obtenida se lleva a un computador, desde el cual se suele controlar también el plasma y el espectrómetro.

En la espectrometría de emisión óptica, las intensidades de las líneas de la red espectral se utilizan como señales analíticas y son proporcionales a la concentración del analito. Los límites de detección se determinan a partir del fondo espectral y sus fluctuaciones. Probablemente el condicionante fundamental en las prestaciones analíticas de estas técnicas y, por lo tanto, en su desarrollo haya residido en las fuentes de excitación ; de hecho, las fuentes calificadas de tradicionales (llama, arco y chispa) introducen limitaciones que han llevado al diseño de otros sistemas de excitación más eficaces, entre los que el más popular ha sido el denominado de plasma acoplado inductivamente (ICP). El plasma así obtenido puede ser objeto de análisis espectroscópico de emisión atómica o acoplarse a un espectrómetro de masas para recoger información analítica del correspondiente espectro de masas.

El ICP-Espectrometría de emisión atómica (ICP- AES) es un muy poderoso método para determinar, tanto de forma simultánea como secuencial, elementos traza en disolución. La precisión analítica asequible con esta técnica es alta ; así, cuando se determinan niveles de concentración de 10 a 20 veces los límites de detección, se consiguen desviaciones estándar relativas del orden del 1%.

ICP- AES tiene un amplio rango de aplicaciones , por ejemplo en el campo de muestras geológicas, pero un interesante y quizás su principal campo de aplicación reside en el análisis de

muestras relacionadas con el medio ambiente. Basado en el trabajo de Garbarino y Taylor para análisis de aguas (22), se han propuesto métodos para analizar aguas residuales (23), (24) en los que se trata la descomposición de la muestra, los rangos analíticos y las interferencias espectrales para 22 elementos.

El uso de diferentes técnicas de preconcentración para el análisis de aguas naturales ha resultado de especial importancia; éstas, por ejemplo, pueden estar basadas en extracción líquido- líquido de complejos (25, 26), en coprecipitación por ejemplo con $\text{In}(\text{OH})_3$ (27) o absorción sobre acetato de celulosa (28).

Otra importante serie de aplicaciones de ICP-AES se encuentra en el campo de las muestras biológicas. Así se ha demostrado que elementos como Ca, Fe, **Cu**, Mg, Na y K pueden ser determinados simultáneamente en suero humano. Esta aplicación es válida incluso cuando se trata de microcantidades de suero, las cuales después de una dilución 1: 5, permiten el análisis directo de 50 μl de muestra (29). En estos casos las microcantidades de las muestras biológicas, se evaporan en una varilla de carbón o en un horno de grafito e incluso la inserción directa es también muy utilizada, consiguiéndose límites de detección inferiores al nanogramo.

El *ICP-Espectrometría de Masas (ICP-MS)*, empleando fuentes iónicas a vacío moderado (del orden de mbar) y presión atmosférica, se inició en los años sesenta y experimentó un gran avance con el trabajo de Houk y col. (30), los cuales hicieron uso de plasma acoplado inductivamente como fuente iónica (ICP- MS).

Ya en su primer trabajo, estos autores mostraron satisfactoriamente que el poder de detección de ICP- MS era superior y que las interferencias espectrales, especialmente a masas más altas, eran más pequeñas si se las compara con las correspondientes de ICP-AES.

La técnica ICP- MS tiene todas las ventajas presentadas por la técnica ICP- AES, incluyendo posibilidades para un calibrado fácil con soluciones sintéticas o por adición estándar así como posibilidades para una rápida determinación de multielementos y su poder de detección es mucho más alto que en ICP- AES. Así, para muestras biológicas y médicas, la técnica ICP- MS permite ampliar considerablemente el número de elementos que pueden ser determinados directamente en fluidos corporales. De hecho, en suero y a través de la técnica ICP- AES sólo pudo determinarse directamente Na, Ca, Mg, Fe, Cu y Zn, mientras que la técnica ICP- MS

Introducción : Técnicas en el análisis de trazas

permite el estudio de muchos más elementos traza en muestras clínicas (**31**) (se determinó Mg, Al, Cr, Mn, Fe, Ni, **Cu**, Zn y Se en proteínas) .

Por otro lado, se obtuvieron resultados muy concordantes con otras técnicas cuando se analizaron en orina elementos tales como Pb, Cd, Hg y Tl. Igualmente se utilizó esta técnica (ICP- MS) para la determinación de Pb en sangre (**32**) y estudios de biodisponibilidad de Pb (**33**).

En análisis medioambiental ha ocurrido también algo parecido. En agua de mar, el contenido en sales es demasiado alto y es necesario aislar los elementos a determinar mediante procedimientos tales como extracción líquido- líquido o técnicas de absorción. Beauchemin y col.(**34**) describieron un método para determinar Ni, **Cu**, Zn, Mo, Cd, Pb y U. En agua de río se determinó directamente Na, Mg, K, Ca, Al, V, Cr, Mn, **Cu**, Zn, Sr, Mo, Sb, Ba y U , mientras que Co, Ni, Cd y Pb se midieron posteriormente previo tratamiento (**35**). El límite de detección para ICP-AES está entre 1-20 ng/ml y para ICP- MS es del orden de sub-ng/ml.

I.3.3.- Activación neutrónica

I.3.3.1.- Análisis instrumental (INAA)

El análisis químico por activación está basado en las propiedades de los núcleos atómicos y no en los electrones ; se trata pues de un análisis elemental ; es decir, determina el contenido de diferentes elementos, pero no puede decir en qué forma química (compuestos, estados de oxidación, etc.) están. El fundamento del análisis se basa en una reacción entre el elemento a analizar y proyectiles nucleares (neutrones o pequeñas partículas cargadas aceleradas, por ejemplo protones, deuterones, ^3He o partículas α , o fotones gamma). La reacción puede escribirse en la misma forma que una reacción química:



La información analítica radica en la medida de la cantidad de producto (pesado o ligero) después de someter a la muestra a un flujo de proyectiles conocido durante un tiempo conocido. Estas cantidades de producto son muy pequeñas, de tal manera que para su medida hay que recurrir a métodos nucleares, ya que los métodos químicos son insuficientemente sensibles. Otra de las características de estas técnicas es que las medidas del producto deben hacerse al poco tiempo de su formación (incluso la formación y la medida se hacen simultáneamente a veces) ya que la energía radiada por el producto y hasta la identidad de ésta pueden evolucionar rápidamente. En otras ocasiones (sobre todo cuando el producto pesado es el radiactivo) la medida de la radiactividad puede demorarse. Cada elemento ofrece un determinado comportamiento frente a cada tipo de proyectil, de manera que la elección de éste es un primer aspecto de selectividad de estas técnicas ; por otra parte, la radiactividad de cada producto pesado también presenta determinadas características, lo que posibilita el análisis simultáneo de muchos componentes. No obstante lo dicho, con frecuencia hay que acudir a una separación previa a la medida de la radiactividad ; cuando esto ocurre la técnica se llama Análisis Radioquímico por Activación (RAA), mientras que si la discriminación se realiza sólo aplicando la diferenciación entre los tipos de radiación la técnica recibe el nombre de Análisis Instrumental por Activación (IAA).

Dentro de las modalidades posibles del IAA, la más desarrollada es la que utiliza neutrones como proyectiles, mientras que la información se basa en la radiación gamma característica de cada radionúclido, discriminada y medida con ayuda de un espectrómetro de rayos gamma (INAA). Cabe indicar igualmente que del INAA existen, a su vez, numerosas variantes, cada una de ellas con su campo de aplicación recomendado.

El INAA es una de las técnicas más sencillas para el análisis de elementos traza. Las muestras se introducen en botes de polietileno o polipropileno para irradiación corta, o en viales de cuarzo introducidos a su vez en un bote de aluminio para prolongada irradiación. No pueden usarse viales de vidrio o botes de PVC puesto que se vuelven muy radiactivos debido a la formación de ^{38}Cl o ^{24}Na , respectivamente. En general, el INAA no es recomendable para la determinación de elementos traza, puesto que la radiactividad de los elementos mayoritarios lo impide. De ahí que aún teniendo el Cu un límite de detección bastante inferior al ng, no pueda analizarse en concentraciones inferiores a ppm.

1.3.3.2.- Análisis radioquímico (RNAA)

Mientras que la técnica INAA es más popular que la RNAA, debido a su simplicidad, esta última permite determinar concentraciones mucho menores que aquella, puesto que las interferencias de otros radionúcleos se reducen considerablemente. Esto obliga, por contra, a procedimientos más complejos, pues mientras que la técnica INAA incluye solamente medidas de activación y actividad, la RNAA incluye también disolución de la muestra y separación del analito. En algunos casos, las interferencias pueden eliminarse por decaimiento de la radiación (“enfriamiento”) y entonces la técnica INAA puede ser utilizada, pero lo más frecuente es que no se pueda acudir a esta estrategia, bien porque los radionúclidos tengan vidas más cortas que las interferencias, bien porque el tiempo de enfriamiento sea tan grande que no tenga interés práctico.

El uso de separaciones radioquímicas en análisis de activación de neutrones complementa el análisis por INAA, permitiendo la medida de elementos adicionales de baja concentración. Por ejemplo, Chatt y col. (36) , midieron la concentración de elementos traza en muestras de alimentos, por INAA, tales como As, Br, Ca, Cl, Co, Cr, Fe, I, K, Mg, Mn, Na, Rb, Sc, Se, Sn y Zn, mientras que por RNAA pudieron medir también la concentración de Au, **Cu** , Hg, Mo, y Sb.

De igual modo, Zeisler y col. (37) , en su análisis de elementos traza en hígado humano, midieron muchos elementos por INAA, pero para alguno de ellos tuvieron que usar RNAA. Yinsong y col. (38) determinaron elementos traza tales como Br, Ca, Cl, Cr, Na, ...etc en pelo humano y algunos órganos internos utilizando INAA, mientras que para la determinación de As, Cd, **Cu** , Hg y Zn utilizaron RNAA. En resumen, en orden a conseguir la sensibilidad definitiva para la técnica INAA, es frecuentemente necesario separar el o los elementos de interés de otros radionúcleos de la muestra.

Una de las etapas más importantes (y obligada) del RNAA es la disolución de las muestras , por lo que merece especial atención. Así, las muestras irradiadas durante mucho tiempo, pueden haber sufrido una considerable radiolisis, primando la formación de productos gaseosos. Es aconsejable, por esta razón, enfriar el recipiente irradiado antes de abrirlo. La mayoría de las radiaciones largas se hacen en ampollas de cuarzo (se elige cuarzo, porque contiene muy pocos elementos activables mientras que el vidrio contiene sodio y, por lo tanto, las ampollas de metal y/o de vidrio son demasiado radiactivas y peligrosas). Es importante recordar, que se están disolviendo y separando materiales radiactivos.

Por regla general las muestras biológicas pueden ser mineralizadas por diferentes métodos, los cuales se pueden dividir en dos grupos: Incineración por vía seca y digestión por vía húmeda. Debido a la simplicidad del método y a su aplicabilidad a gran número de muestras, se usa principalmente la incineración por vía seca (en hornos a temperaturas que oscilan entre 400° y 700°C.) . Este tipo de digestión permite determinar Mn, **Cu**, Zn, Sb, Na y Hg aunque no son completamente recuperados.(39).

Más popular que la incineración por vía seca para el caso de la técnica RNAA, es la digestión por vía húmeda. Es frecuente la rapidez con que se disuelve el material biológico por

ebullición con ácido nítrico y perclórico o sulfúrico o ambos a la vez. El ácido sulfúrico se añade a veces para reducir el peligro de explosión debida al ácido perclórico. También hay que tener cuidado y no permitir que la mezcla en ebullición se evapore hasta sequedad. Por estos motivos, la mayoría de los laboratorios evitan el uso de perclórico y nítrico, o mezclas de nítrico y sulfúrico. La incorporación del horno microondas para el calentamiento de muestras con mezclas ácidas suele llevar a una rápida disolución, entre 5 y 10 minutos. (40). En muchos laboratorios la técnica más usual consiste en calentar la muestra (100- 500 mg) con una mezcla ácida durante toda la noche a aproximadamente 140-170°C en una bomba de descomposición de teflón a alta presión, o bien en un sistema de reflujo.

La otra etapa característica del RNAA se refiere a las separaciones radioquímicas. Estas pueden ser agrupadas siguiendo diferentes criterios, por ejemplo, métodos de separación, áreas de aplicación, o separaciones totales frente a separaciones de pocos elementos, o según los elementos separados. Parece que desde un punto de vista práctico, la mejor elección de clasificación es según el área de aplicación.

Los principales métodos de separación son:

- 1°.- Separación en columnas.
- 2°.- Extracción con solvente.
- 3°.- Precipitación.
- 4°.- Destilación.

El método más popular es la separación en columnas. El uso de columnas que realizan extracción en fase sólido- líquido, es preferible a la extracción líquido- líquido debido a su rapidez, alta eficacia, facilidad de manejo y menor peligro de radiaciones de riesgo y contaminación radioactiva.

En muestras biológicas y para separar **Cu**, Dybczynski y col. (41) disolvieron las muestras en una mezcla nítrico- perclórico con vanadio (IV) como catalizador de oxidación. después de ajustado el pH la disolución fue cargada en una columna LIX 70 y la columna fue eluida con NaNO_3 1M + NH_2PO_2 0.24M y pH próximo a 3.4 ; de esta forma el **Cu** es retenido en la columna y posteriormente eluido con HCl 4M. Rajadhyaksha y Turel (42) separaron **Cu** de la solución del material digerido por extracción subestequiométrica con cloroformo que contenía 2- mercaptobenzotiazol. Whitley y col. (43) extrajeron **Cu** de la fase acuosa con

Introducción : Técnicas en el análisis de trazas

neocuprina en cloroformo. Cortés y col. (44) mineralizaron el material biológico con $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, evaporaron a sequedad y disolvieron el residuo en HCl 6M. El ^{24}Na fue retirado por una columna HAP; para asegurar que todo el **Cu** está en estado de oxidación +1 se añade Na_2SO_3 y para precipitarlo como CuCNS se añade una disolución de KSCN .

I.3.4.- Técnicas electroanalíticas

I.3.4.1.- Técnicas voltamperométricas

La voltamperometría engloba un grupo de métodos electroanalíticos en los que la información sobre el analito se obtiene a partir de medidas de la intensidad de corriente que fluye en una celda de electrólisis , cuando se aplica una diferencia de potencial a un sistema de electrodos adecuado.

Históricamente, la voltamperometría se desarrolló a partir de la polarografía, que fue descubierta por el químico checoslovaco Jaroslav Heyrovsky a principios de 1920 (45), cuando estudiaba las propiedades que poseía el electrodo de gotas de mercurio (EGM) . Actualmente, la polarografía es sólo una rama de la voltamperometría, a pesar de que ésta se desarrolló a partir de aquélla.

En líneas muy generales, la voltamperometría se basa en aplicar una señal de excitación a un electrodo de trabajo que se encuentra en una celda electroquímica. Esta señal es, simplemente, un potencial variable que provoca una respuesta de intensidad de corriente característica en la que se basa el método. Existe una amplia gama de formas de generar las señales a las que se puede someter al electrodo de trabajo, lo que da lugar a la variedad de técnicas voltamperométricas existentes. En la Figura I.3.4.1.1. pueden observarse las formas más comunes de las señales de excitación utilizadas en voltamperometría :


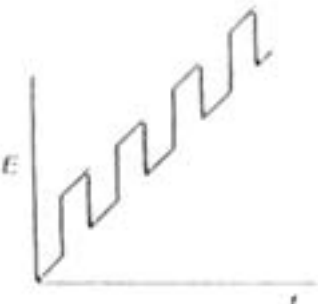

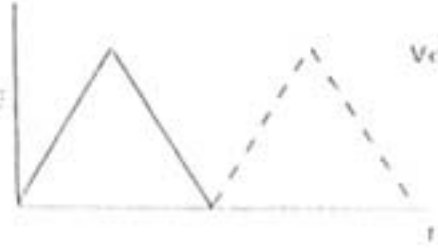
- La señal clásica es el barrido lineal (a). Es un barrido de potencial de corriente continua , que aumenta linealmente en función del tiempo, registrándose la intensidad desarrollada.

-Las señales de excitación de impulsos (b y c). Las intensidades de corriente se miden a diferentes tiempos durante la vida de estos impulsos.

- La onda de forma triangular (d) , donde el potencial primero aumenta linealmente hasta un máximo para después disminuir con una pendiente del mismo valor numérico hasta su

valor original ; este proceso se puede repetir numerosas veces.

FIGURA I.3.4.1.1.
SEÑALES DE EXCITACIÓN EN VOLTAMPEROMETRÍA

<u>Nombre</u>	<u>Forma de la señal</u>	<u>Tipo de Voltamperometria</u>
(a) Barrido lineal		Polarografía Voltamperometria hidrodinamica
(b) Impulso diferencial		Polarografía de impulso diferencial
(c) Onda cuadrada		Voltamperometria de onda cuadrada
(d) Triangular		Voltamperometria ciclica

Actualmente, las técnicas voltamperométricas utilizan un sistema de tres electrodos, que se sumergen en una celda que contiene una disolución del analito en un electrolito soporte, no electroactivo. El primero es el electrodo de trabajo, que se caracteriza porque su potencial se hace variar con el tiempo y debe ser fácilmente polarizable, lo cual se consigue mediante electrodos de pequeño tamaño. El segundo elemento es el electrodo de referencia, cuyo potencial no varía mientras se realiza la medición. En tercer lugar está el electrodo auxiliar, también denominado contraelectrodo, que suele ser de platino y cuya función es permitir que ocurra el proceso de electrólisis entre él y el electrodo de trabajo, liberando de esta responsabilidad al electrodo de referencia.

Durante los años 60, la polarografía de corriente continua se convirtió en una técnica decadente en los laboratorios analíticos debido, fundamentalmente, a la baja velocidad del método, unos límites de detección insuficientes, al uso de aparatos inadecuados y a una presentación de los datos obtenidos poco habitual. Estas limitaciones se superaron con creces con los métodos de impulsos, basados en la superposición de pulsos de corriente sobre la rampa de corriente continua. Se pueden observar cuatro variantes (46) :

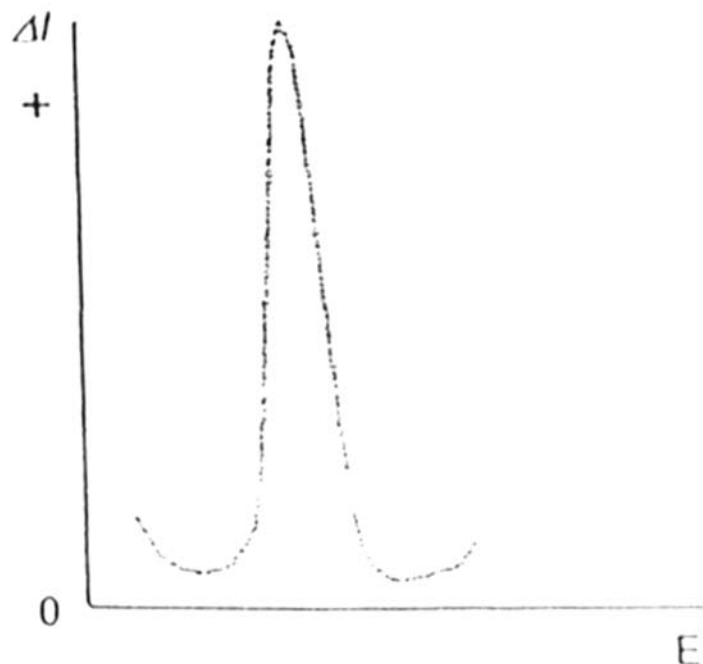
- a) Voltamperometría normal de impulsos.
- b) Voltamperometría diferencial de impulsos.
- c) Voltamperometría normal diferencial de impulsos.
- d) Voltamperometría de onda cuadrada.

De estas cuatro variantes , la segunda y la cuarta son las utilizadas en este trabajo, por lo que se las dedica un tiempo especial.

La Voltamperometría diferencial de impulsos está basada en el hecho de que tras un cambio repentino en el potencial aplicado, que origina un aumento en la corriente faradaica y en la corriente capacitiva por encima de los valores correspondientes a la rampa de corriente continua, la corriente capacitiva decae mucho más rápidamente que la corriente faradaica.

La diferencia entre las intensidades integradas se registra originando un voltamperograma en forma de pico, como el que aparece en la Figura I.3.4.1.2.

FIGURA I.3.4.1.2.
VOLTAMPEROGRAMA DIFERENCIAL DE IMPULSOS.

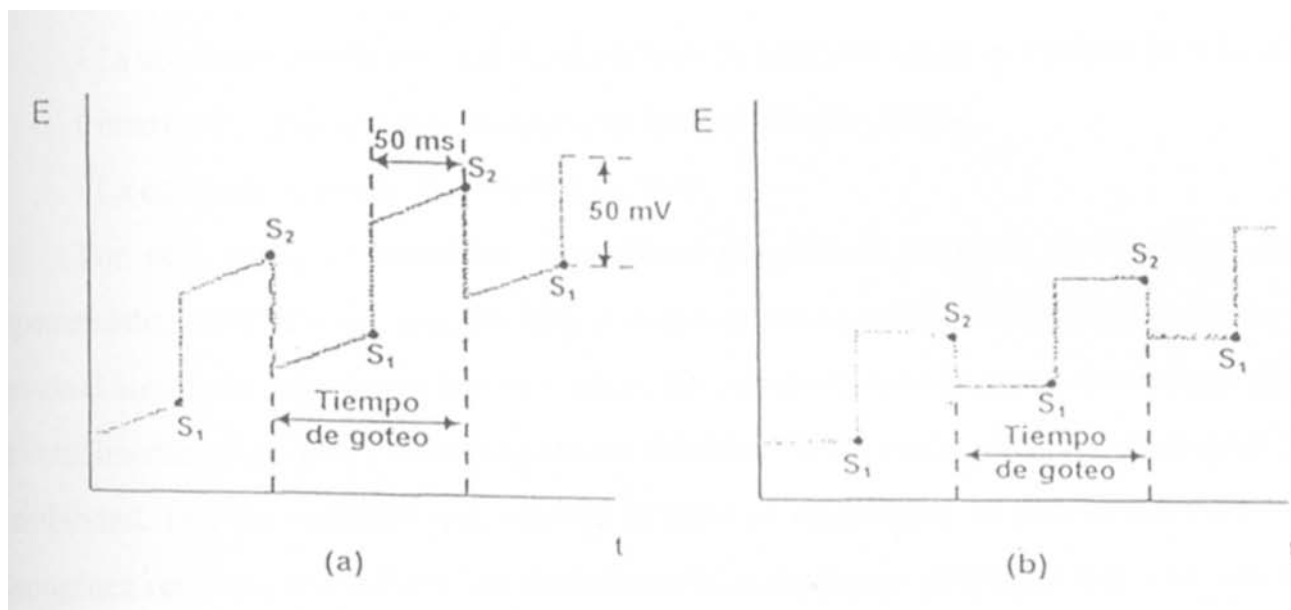


Estas curvas en forma de pico que proporciona la voltamperometría diferencial de impulsos, tanto en reacciones reversibles como irreversibles, se acercan mucho a la forma teórica. Así, se obtiene un área diferencial consistente en un pico de corriente cuya altura es directamente proporcional a la concentración de analito. Se puede aumentar la intensidad de pico incrementando la amplitud del impulso, pero si este aumento es excesivo puede producir distorsiones en el pico que afecten al cálculo de la medida de la curva.

En general, en la voltamperometría diferencial de impulsos se procede superponiendo un impulso de potencial constante a cada paso de una escalera de potencial, concretamente, al final de cada escalón. Las concentraciones de las especies en la superficie del electrodo vienen determinadas por la escalera de potencial. La forma de registrar las muestras de corriente es tomando una de ellas justo antes de aplicar el impulso y la segunda justo al final del impulso

como se puede observar en la Figura I.3.4.1.3. , donde se muestra la señal utilizada en instrumentos analógicos (a) , que se obtiene por superposición de un impulso periódico a un barrido lineal y la señal empleada en instrumentos digitales (b) , que implica la combinación de un impulso de salida con una señal en escalera.

FIGURA I.3.4.1.3.
SEÑALES DE EXCITACIÓN EN VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS



En la práctica, el tiempo que dura el impulso de potencial suele ser de 50 ms y, cuando se persiguen fines analíticos, los impulsos suelen ser del orden de 100mV, obviándose la limitación impuesta por esta técnica de utilizar únicamente bajas amplitudes de impulso. Con esta diferencia se logra un aumento en la respuesta al potencial que debe compensar la pérdida de resolución y el incremento de corriente de carga, factores que, en última instancia, limitaban el mínimo de concentración detectable. El valor óptimo del impulso de potencial aplicado suele encontrarse en el intervalo de 50-100 mV, no siendo aconsejable utilizar valores mayores porque se llega a empeorar la respuesta.

El aumento de sensibilidad obtenido con esta técnica respecto a la polarografía clásica

se atribuye a dos fenómenos: el aumento de la corriente faradaica y la disminución de la corriente no faradaica. Cuando una especie electroactiva está presente en la capa de disolución alrededor del electrodo (interfase) y el potencial aumenta súbitamente, se produce un aumento de corriente que bajará la concentración de especie hasta el nivel exigido por el nuevo potencial. Una vez alcanzada la concentración de equilibrio, para el potencial determinado, la corriente decae hasta un nivel suficiente para contrarrestar la difusión. La medición de la corriente se realiza antes de que este aumento haya decaído totalmente.

La corriente medida incluye dos componentes:

- La corriente que se encarga de disminuir la concentración en la capa de difusión (interfase) hasta el valor exigido por la ecuación de Nernst.
- La corriente máxima de difusión.

Por otra parte, la corriente capacitiva, surgida al imponer el impulso, decrece exponencialmente con el tiempo, por lo que es prácticamente cero al final de la vida de la gota, cuando el área de su superficie varía muy poco. Si se mide en ese momento, la corriente residual es virtualmente eliminada y se consigue una relación señal- ruido máxima, mejorando así la sensibilidad. Hay que señalar que cuando la gota se desprende, la disolución vuelve a ser homogénea respecto al analito y, en consecuencia, a cualquier potencial dado, se observa el mismo aumento de intensidad para cada impulso de potencial.

La limitación fundamental de esta técnica estriba en su aplicabilidad, debido a la lentitud característica en la cinética de transferencia de electrones (irreversibilidad). Este factor queda reflejado en una respuesta del analito al potencial aplicado menor de la esperada teóricamente y, por tanto, un aumento del límite de detección. También se detecta un aumento en la anchura de los picos, o sea, una menor resolución de éstos, lo cual no interesa. Por último, indicar que esta lentitud origina una gran dependencia del proceso electroquímico con respecto a otras especies presentes en la disolución. Así, cuando hay que analizar muestras con estas características, como puede ser el caso de las muestras biológicas, hay que tener en cuenta que la matriz existente puede alterar la respuesta dada por el analito de interés. Generalmente, los límites de detección con esta técnica son dos o tres órdenes de magnitud más bajos que los de la polarografía clásica y se sitúan en el rango de 10^{-7} M a 10^{-8} M.

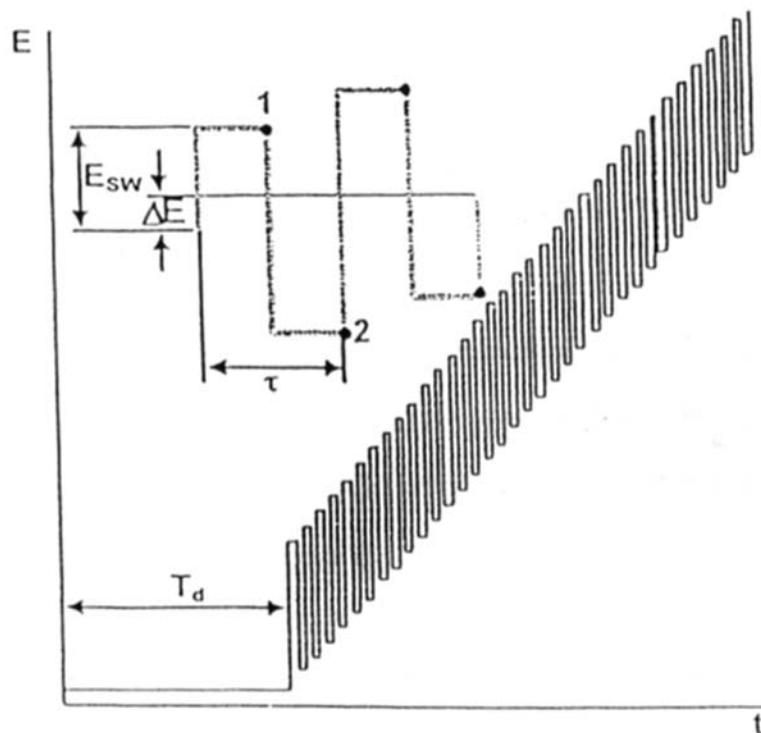
Generalmente, las aplicaciones cuantitativas de la voltamperometría diferencial de impulsos se basan en la obtención de curvas de calibrado, en las que se representan las alturas de los picos en función de la concentración del analito. En algunos casos se puede utilizar el método de la adición estándar en vez de curvas de calibrado. En ambos casos es esencial que la composición de los estándares sea lo más parecida posible a la composición de la muestra, tanto en las concentraciones de analito como en el pH. Así, se pueden obtener precisiones y exactitudes relativas en el intervalo del 1 al 3% para concentraciones 10^{-7} M y mayores.

En la voltamperometría de onda cuadrada (Figura I.3.4.1.4.) la señal de excitación se compone de una escalera de potencial con una altura de escalón de un valor ΔE_s , a la que se superpone en cada escalón un impulso de voltaje de valor $2E_{sw}$. Dicho impulso se aplica al comenzar cada paso o escalón y durante la mitad del tiempo de duración de éste (periodo τ). La corriente originada como respuesta al potencial aplicado se mide al final del medio ciclo directo y del medio ciclo inverso.

Habitualmente, cada escalón dura unos 5 ms y la amplitud ΔE_s , que suma cada paso de la escalera, suele poseer un valor de 10 mV. La magnitud de impulso , $2E_{sw}$, suele ser 50 mV. Así, para realizar un barrido de potencial que cubra 1 V, sólo son necesarios 0.5 segundos. Según esto, es fácil deducir que una de las ventajas añadidas de esta técnica es la rapidez con la que se obtiene un voltamperograma.

FIGURA I.3.4.1.4.

SEÑAL DE EXCITACIÓN EN VOLTAMPEROMETRÍA DE ONDA CUADRADA



En un impulso, una reacción electroquímica reversible queda sometida a suficiente potencial como para que se origine la reducción en el impulso directo (I_1) y se oxide rápidamente en el impulso inverso (I_2). En consecuencia, el impulso de avance originará una corriente catódica o de reducción de intensidad I_1 , y el impulso inverso dará lugar a una corriente anódica o de oxidación de intensidad I_2 . Generalmente, se representa de forma gráfica (ΔI), la diferencia $I_1 - I_2$, obteniéndose así los voltamperogramas. Dicha diferencia es directamente proporcional a la concentración del analito (especie oxidada).

Debido a la velocidad de la medida puede conseguirse aumentar la precisión del análisis realizando un promedio de los resultados de diversos barridos voltamperométricos. Se han conseguido límites de detección para esta técnica en el rango de $10^{-7} - 10^{-8}$ M. También ofrece ventajas el acoplamiento a un detector de HPLC, constituyendo ésto un ejemplo de disposición de técnicas en serie.

I.3.4.2.- Técnicas con preconcentración

*** Voltamperometrías**

La electroanalítica ha desarrollado técnicas de preconcentración propias, es decir, basadas en su propia naturaleza y fundamento y con unas características especialmente provechosas desde el punto de vista analítico. Aquí radica una de las vías para minimizar el cociente I_c / I_f ; aumentar I_f a base de concentrar la especie electroactiva presente en la disolución problema (mejor, una parte representativa de ésta) en un pequeño espacio , bien en la superficie de un electrodo sólido o en una gota o película de mercurio.

Esta etapa de preconcentración ofrece diferentes modalidades, que se pueden resumir en dos : por vía electrolítica (con o sin estímulo de potencial) y por vía adsorptiva, es decir, por motivaciones electrostáticas pero sin que se produzca transferencia de electrones. La etapa final o de medida consiste en un barrido de potenciales durante el cual ocurre la redisolución de la o las sustancias acumuladas en el electrodo, utilizando para ello técnicas voltamperométricas tales como la de barrido lineal, diferencial de impulsos, de onda cuadrada, etc.

La preconcentración conlleva un nuevo incremento de sensibilidad de otros 2 o 3 órdenes de magnitud, por lo que es factible operar con concentraciones de analito 10^{-10} M o incluso inferiores ; sensibilidades que son comparables , por lo tanto, a las de otras técnicas no electroanalíticas caracterizadas por su gran sensibilidad.

Una cualidad más de estas técnicas de redisolución se configura en el procedimiento de preconcentración del mismo, caracterizado por su rapidez, el no necesitar en general la adición de reactivos, no requerir cambios de fase (de ahí que se le haya calificado también de preconcentración interna) , etc. ; todo ello frente a otros procedimientos que conllevan aspectos negativos desde el punto de vista analítico : adición de reactivos, precipitación, eliminación o cambio de disolvente, etc .

Los métodos de redisolución engloban una variedad de procedimientos electroquímicos que constan de tres pasos, con una etapa inicial común característica .

- Etapa de preconcentración o acumulación : en todos estos procedimientos el primer paso

es una preconcentración del analito sobre el electrodo de trabajo en una disolución agitada. Gracias a ello se logra concentrar la especie en un volumen mucho más reducido, comparado con el volumen de la disolución, es decir, la concentración del analito es mucho mayor en la superficie del electrodo que en el seno de la disolución. La transformación no es cuantitativa, por lo que para conseguir resultados reproducibles es necesario controlar perfectamente los parámetros hidrodinámicos (tiempo de concentración , agitación , temperatura, área del electrodo y potencial inicial aplicado). Esta técnica se puede usar tanto con electrodo de gota de mercurio suspendida como con ciertos electrodos sólidos.

- Etapa de reposo : después de un tiempo perfectamente medido, se para la electrolisis y la agitación, pero se mantiene constante el potencial inicial. Durante este tiempo se consigue homogeneizar la sustancia sobre el electrodo y recuperar el régimen de difusión.

- Etapa de redisolución : durante esta fase se determina el analito depositado mediante un procedimiento voltamperométrico, previa redisolución del mismo por aplicación de un barrido de potenciales en sentido contrario al inicial. Este barrido puede realizarse por diversas técnicas, aunque las basadas en impulsos son las más generalizadas porque proporcionan mejores resultados.

Estas técnicas voltamperométricas de redisolución (con acumulación previa o preconcentración) se pueden clasificar según la naturaleza de los procesos de acumulación y redisolución en tres grupos.

a) En la voltamperometría de redisolución anódica (ASV) el analito se deposita electrolíticamente sobre el electrodo al aplicarle un potencial constante más negativo que el de la especie redox de interés, quedando ésta reducida y acumulada en el electrodo. Al aplicar posteriormente un barrido de potencial positivo al electrodo, se origina la redisolución de la especie en forma oxidada, que provoca una corriente anódica que se registra en forma de voltamperograma. Para ésto, se pueden usar tanto electrodos sólidos como de mercurio.

b) En la voltamperometría de redisolución catódica (CSV) en primer lugar se aplica al electrodo de trabajo un potencial más positivo que el del analito. Existen dos variedades de esta técnica, dependiendo del tipo de electrodo utilizado. Cuando se emplea un electrodo atacable, el analito se acumula en su superficie formando una capa de sal poco soluble, compuesta por la

sustancia a determinar y los iones procedentes del electrodo de trabajo ; esto tiene interés para el análisis tanto de sustancias orgánicas como inorgánicas. Así, si el material del electrodo es mercurio, éste se oxida y reacciona con el analito dando una sal poco soluble. Posteriormente se aplica al electrodo un barrido de potencial negativo, de forma que se redissuelve la sal mercuríca por reducción del ión mercuríco, originándose una corriente catódica que será representada gráficamente en forma de un voltamperograma. Para obtener resultados reproducibles es recomendable utilizar electrolitos de fondo de elevada pureza, electrodos de mercurio y eliminar de forma efectiva el oxígeno de la disolución a analizar. La segunda variante es la que se realiza sobre electrodos inertes de carbono o de metales nobles y tiene utilidad para la determinación de iones como Mn (II) o Pb (II), que pueden acumularse por deposición anódica de sus óxidos de valencia superior.

c) La voltamperometría de redissolución adsorbtiva (AdSV) se diferencia de las anteriores en que no se lleva a cabo una deposición electrolítica, sino que se produce una deposición por adsorción física del analito sobre el electrodo de trabajo, aunque el proceso de adsorción se favorece aplicando al electrodo un potencial algo más positivo que el propio de la sustancia electroactiva. Una vez transcurrido el tiempo estimado de adsorción, se aplica un barrido de potenciales hacia valores más negativos al electrodo y durante el barrido de potenciales catódicos se registra la intensidad, que será proporcional a la concentración del analito. Esta variante, en ocasiones, se ha englobado dentro de la CSV, pues la etapa de redissolución es la misma. En cualquiera de estos procesos de redissolución, la sensibilidad alcanzada depende de la concentración de la especie a determinar en el electrodo y , por lo tanto, de la geometría de éste, así como de la duración y rendimiento de la etapa de preconcentración.

*** Potenciometrías**

A las anteriores técnicas voltamperométricas de redisolución debe incorporarse la Potenciometría, cuyo fundamento consiste en que el analito se redisuelve por incorporación de un oxidante al proceso siguiendo los cánones de una valoración redox; a su vez , el oxidante puede ser de naturaleza química (Hg^{2+} por ejemplo) o electroquímica (una corriente anódica).

Debe matizarse que todas estas técnicas tienen en común su carácter “ no absoluto ” en cuanto a que en la etapa de preconcentración no interviene todo el analito sino una parte proporcional. Por el contrario, mientras que en la etapa de redisolución las técnicas voltamperométricas siguen siendo “no absolutas” (sólo se redisuelve una mínima parte del analito concentrado) , en la Potenciometría es bien diferente ; ahora la redisolución transcurre a consecuencia de una oxidación total o parcialmente química y, sobre todo , porque las señales cualitativas y cuantitativas surgen cuando todo el metal amalgamado vuelve a la disolución ; es decir, mientras las técnicas voltamperométricas conllevan solo un proceso indicador en el electrodo de trabajo, en las potenciometrías de redisolución se dan dos procesos en el electrodo de trabajo : uno, global, de total oxidación de la especie preconcentrada y, otro, indicador de que dicha especie se ha agotado en el electrodo, a través de un cambio (en este caso, ascenso) brusco en el potencial (similar a lo que ocurre en una valoración potenciométrica convencional). Los avances tecnológicos permiten hoy día el procesado (concretamente, una derivación) necesario para transformar la curva “ en S ” típica de las valoraciones en señales en forma de pico , lo que favorece la sensibilidad y la selectividad de la técnica . Otra de las ventajas de esta técnica es que no interfiere la presencia de oxígeno en la disolución (lo que facilita el análisis) y que tolera mejor la presencia de materia orgánica modificadora de la naturaleza de la superficie del electrodo a través de procesos adsortivos.

1.3.4.3.- Electroodos de trabajo

El electrodo de trabajo de un sistema electroquímico es aquél cuyo potencial es controlado automáticamente y varía en función del tipo de técnica o análisis que se vaya a realizar. Su tamaño suele ser reducido, con vistas a favorecer lo más posible su capacidad de polarización. El valor del potencial del electrodo de trabajo se expresa respecto al del electrodo de referencia, que se mantiene constante durante la medida.

El intervalo de potenciales en el que cada uno de estos electrodos puede ser utilizado en disoluciones acuosas varía y depende del material del electrodo y también de la composición de la disolución en la que vaya a estar sumergido el electrodo.

El diseño de nuevos electrodos, tanto en lo que atañe a su naturaleza como a su configuración y tamaño, ha supuesto también un avance decisivo para que los Métodos Electroanalíticos ocupen hoy día un lugar importante en el concierto de la metodología analítica. De hecho, se han incorporado nuevos materiales : metales, carbono y derivados, mezclas, electrodos modificados en superficie, electrodos compósitos, bioelectrodos y un amplio repertorio de términos más o menos asumidos por el entorno científico.

En la presente Memoria se ha trabajado exclusivamente con electrodos de mercurio , por lo que se hará algo más de hincapié acerca de ellos.

El mercurio, elemento metálico que se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente, constituye uno de los materiales más apropiados para construir un electrodo de trabajo, debido a que posee un buen número de propiedades muy favorables para esta función. La más importante, probablemente, sea su elevado sobrepotencial con respecto al hidrógeno, destacando también la gran uniformidad que presenta cualquier superficie de mercurio y su gran reproducibilidad, siempre que se encuentre libre de impurezas.

Los tipos que se utilizan en voltamperometría son :

- Electrodo de gotas de mercurio (EGM o DME : “ Dropping Mercury Electrode ”).
- Electrodo de película de mercurio (EPM o FME : “ Film Mercury Electrode ”).
- Electrodo de gota estática de mercurio (EGEM o SMDE : “Static Mercury Drop Electrode”).
- Electrodo de gota suspendida de mercurio (EGSM o HMDE : “ Hanging Mercury Drop Electrode ”).

Además de los electrodos de gotas y desde los años sesenta se vienen utilizando , cada vez con más frecuencia, los electrodos de película ; éstos consisten en una fina capa (o conjunto de microgotas) de mercurio depositada sobre un soporte sólido, generalmente de carbón o metálico . Su funcionamiento es parecido al de la gota, pero reúne una serie de ventajas que le hacen más recomendable para determinadas circunstancias ; por ejemplo, su relación superficie/volumen es mucho mayor, permite su uso en técnicas hidrodinámicas o como detector en cromatografía líquida, puede configurarse como ultramicroelectrodo, opera con menos cantidad de mercurio, etc. Por contra, su superficie activa no siempre es reproducible, lo cual restringe su uso a procedimientos comparativos con disoluciones patrón ; en este sentido debe indicarse que se ha dedicado mucha atención por parte de los investigadores a este problema y que cada vez se va superando mejor (2).

I.3.5.- Otras consideraciones

Aparte de las técnicas analíticas de mayor importancia ya comentadas, existen otras que también se utilizan para la determinación de trazas, bien solas o con el apoyo de alguna otra técnica, bien de separación o de detección . Así , la determinación de elementos traza por medio del análisis cromatográfico requiere un procedimiento de separación que permita distinguir las especies conforme a su composición elemental ; es decir, en este caso la cromatografía actuaría como un sensible sistema de detección . Esto explica el gran desarrollo de la espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) con detección cromatográfica líquida de alta resolución (HPLC) ; de hecho han aparecido numerosas publicaciones (47) que colocan a esta técnica como la mejor para la especiación elemental en muestras reales a nivel traza, aunque los límites de detección no han quedado claros para muchos elementos . En un trabajo posterior (48) y entre otros límites de detección se ha fijado el del cobre en 6.8 ppb . También se ha publicado en un estudio acerca de metaloproteínas de Zn , Cu y Cd en mejillones, la posibilidad de determinar estos metales a niveles de sub-ppm (49).

Por lo que respecta a la especiación química , ésta se manifiesta fundamentalmente en dos campos bien distintos : geosfera y biosfera . En este segundo caso su objetivo principal es contribuir a elucidar aspectos tales como la trayectoria bioquímica, el diagnóstico médico o la prospección en el caso de materiales fósiles. En las ciencias médicas, el establecimiento de valores de referencia fidedignos con rangos estrechos para varios elementos traza es decisivo para tomar medidas terapéuticas en situaciones de deficiencia o de exceso ; a su vez, los controles analíticos de estos elementos permiten mejores y más rápidos diagnósticos.

Las técnicas analíticas actuales son capaces de detectar cantidades extremadamente pequeñas de elementos químicos en la biosfera y su desarrollo es suficiente como para servir de herramienta de rutina en la determinación de ultra-trazas. Indudablemente, el progreso tecnológico ha contribuido decisivamente a la posible determinación de elementos traza en sistemas biológicos, y, del mismo modo, las exigencias en cuanto a garantía de la calidad analítica han motivado el desarrollo y uso de una gran variedad de materiales biológicos de referencia . Sin embargo, todavía aparecen datos analíticos incoherentes, lo que limita el avance

en este campo científico y demuestra, a su vez, que el problema no se limita al desarrollo de técnicas analíticas más sensibles , sino que es bastante más complejo (50) .

En definitiva, puede afirmarse que el campo de investigación en torno a los elementos traza está todavía muy abierto, es prácticamente inagotable y está limitado solamente por la imaginación de los investigadores ; se dice que una prudente mezcla de conocimientos analíticos y de intuición biológica parece decisiva para el éxito de los citados estudios acerca de elementos traza (50) .

Las características comunes de los procesos de especiación son muestreo, preconcentración, separación química y control de calidad. Virtualmente todos los métodos analíticos son aplicados en especiación química (51) . En investigaciones bioquímicas, los métodos más importantes de preconcentración y separación son cromatografía y electroforesis (52-56 , 56-65) . Ambos se utilizan para identificar proteínas (66-72) . Pero la cromatografía con gel a menudo es preferida cuando se tiene que preparar las alícuotas para análisis de trazas (66-68, 68-70) , aunque también se usa la electroforesis (72) . Después de la mineralización, el método más frecuentemente aplicado es el cambio iónico (71-75) . Por lo que se refiere a las técnicas analíticas , el análisis por activación de neutrones es a menudo preferido para evitar, por otra parte , la inevitable contaminación de los agentes mineralizantes. La especiación de elementos traza está basada en una secuencia cada vez mayor de procedimientos que podrían denominarse intrusos (o sin tradición analítica) . Así, parece evidente que el modelado computacional para deducir la especiación o reparto en una concentración total determinada es una primera etapa (76-82) . Obviamente, para desarrollar esta etapa se necesita un buen conocimiento de las constantes de estabilidad y un método fidedigno para computar coeficientes de actividad (78, 83-85) .

Por lo que respecta al uso de métodos electroanalíticos en la especiación de elementos, hoy día está algo limitado, a pesar de que por su propia esencia estos métodos reúnen muy buenas condiciones para dicha labor. Actualmente se utilizan sobre todo para distinguir entre complejos “ lábiles ” y “ no lábiles ” , entendiéndose para el primer grupo aquellos complejos en los que el metal está biodisponible; en el caso del Cu y a modo de ejemplos, se encuentran en el bloque de lábiles los siguientes: Cu-cisteína, Cu-glicina, Cu-NTA, Cu-citrato y Cu-ácido tánico (86) .

La adsorción de materia orgánica en los electrodos de Hg interfiere con la mayoría de los procedimientos electroanalíticos desarrollados (**86, 87, 88**) , de ahí la necesidad de eliminar previamente dicha M.O. ; aunque a veces se recurre a la radiación UV para descomponer esta materia orgánica (**89**), no siempre se consiguen los resultados deseados, por lo que el recurso más generalizado y eficaz es la mineralización ácida.

CAPÍTULO II.

***ESTUDIOS VOLTAMPEROMÉTRICOS
(CON PRECONCENTRACIÓN) EN MEDIOS MODIFICADOS
CON ETILENDIAMINA Y DERIVADOS***

II.1.- INTRODUCCIÓN

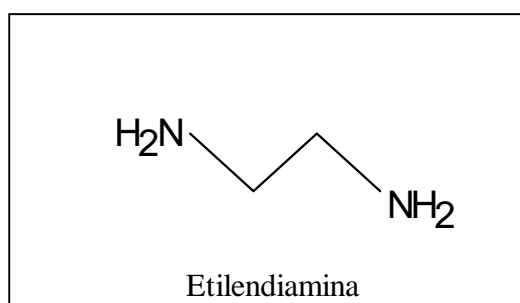
Tal como se anunció en la Introducción de esta Memoria, se han realizado estudios comparativos con diferentes reactivos modificadores del medio. La importancia de este tipo de estudios presenta una doble faceta de gran relevancia :

De una parte , la competencia que estos reactivos entablarán con otros agentes presentes en la matriz, liberando con ello mayor o menor fracción del analito , según la fortaleza relativa de los diferentes complejos susceptibles de formarse. Esto tiene una gran trascendencia en el capítulo “especiación” .

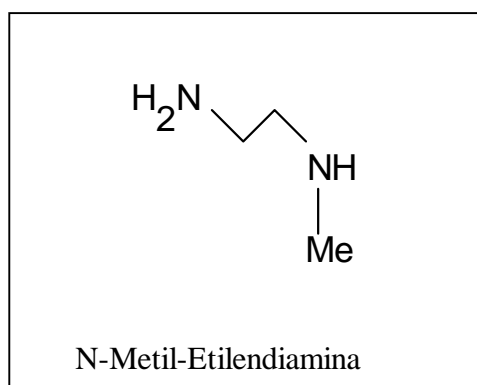
De otra parte, debe considerarse que todos los métodos electroanalíticos basados en estímulos diferenciales (voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada o diferencial de impulsos o la potenciometría de redisolución, por ejemplo) aportan señales analíticas cuya cuantía depende directamente del grado de reversibilidad electroquímica del proceso electródico. Por lo tanto, la sensibilidad del método estará en función de todo aquello que afecta a dicho grado de reversibilidad, como es la naturaleza del medio y, más concretamente, del reactivo que acompaña a las especies metálicas en los procesos electródicos.

Los reactivos seleccionados en este caso fueron :

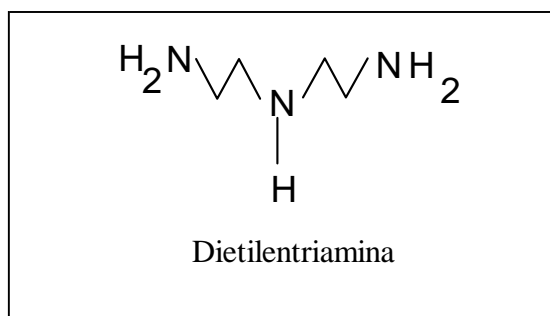
* ETILENDIAMINA: $C_2H_8N_2$: 1,2-DIAMINOETANO



* N-METIL-ETILENDIAMINA : $C_3H_{10}N_2$: N-METIL-1,2-DIAMINOETANO



* DIETILENETRIAMINA : $C_4H_{13}N_3$: 2,2'-IMINO BIS (ETILAMINA)



Los principales criterios para llegar a esta selección fueron :

a) El reactivo cabecera de grupo, la Etilendiamina, (EN), ha sido muy estudiado y, por lo tanto, es bien conocido por su capacidad para formar complejos estables con los iones del cobre, especialmente con el Cu (II). También se conoce el comportamiento electroquímico del cobre en medio EN, donde interviene en procesos reversibles , muy aptos por consiguiente para ser utilizados en técnicas electroanalíticas.

b) Del mismo modo se conoce la capacidad complejante de los otros dos reactivos, N-Metil-Etilendiamina (N-MET-EN) y Dietilentriamina (DENTRI), con los iones cúprico. Su estructura química, parecida a la que presenta la EN, hace suponer que sus comportamientos electroquímicos sean también parecidos.

c) Debe considerarse también la faceta competitiva de estos reactivos frente a la M.O. presente en la matriz, de tal manera que esto puede dar lugar a un comportamiento diferencial (aunque secuencial) en cuanto a su capacidad para liberar el cobre de las muestras; todo lo cual podría facilitar, la interpretación de los fenómenos observados y, obviamente, aumentar el interés de los estudios.

El presente estudio persigue en esencia y para cada reactivo las condiciones experimentales óptimas para la determinación de cobre en la escala de concentraciones habitual según el tipo de muestras que se pretende analizar, aplicando para ello las técnicas voltamperométricas con etapa previa de preconcentración, concretamente las modalidades de onda cuadrada (SWV) y diferencial de impulsos (DPV). Todo ello sobre muestras exentas de M.O. ; es decir, se trata de un trabajo obligado y preliminar al que después se abordará empleando muestras reales de LCR.

II.2.- PARTE EXPERIMENTAL

II.2.1.- Reactivos

-- Disolución de Etilendiamina 0,15 M , preparada a partir del reactivo para síntesis de MERCK-Schuchardt, mantenido en cámara fría y protegido de la luz. Se caracteriza además por:

* $d_{20^{\circ}/4^{\circ}}$: 0.896 - 0.898 g / ml

* PM : 60.10 g / mol

-- HCl 30% , suprapuro, de MERCK . * : PM : 36.46 g/mol.

-- Disolución patrón de Cobre de 1000mg/l en Cu (II) ,a pH =2, mantenida en cámara fría y protegida de la luz, preparada a partir de una disolución Tritisol (Merck) . A partir de ella, por diluciones, se preparan otras de 100, 1 y 0,1 ppm en Cu (II) respectivamente, añadiendo HClO₄ en cantidad apropiada para mantener este pH.

-- Agua desionizada mediante el sistema MiliQ (waters system) .

-- Nitrógeno N 50, mantenido a 1 bar de presión, para eliminar el oxígeno de las disoluciones y proporcionar la formación de la gota en el electrodo.

-- Disolución de N-Metil-Etilendiamina (N-MET-EN) 0.15 M preparada a partir del reactivo N-Methylethylene-diamine, 95 % , Aldrich.

-- Disolución de Dietilenetriamina (DENTRI) 0.15 M preparada a partir del reactivo Diethylenetriamine (bis [2-Aminoethyl] amine) , Sigma.

II.2.2- Aparatos

-- AUTOLAB para la realización de estudios voltamperométricos, de Eco-Chemie, PSTAT 10, con módulo de ECD activo.

-- VA STAND 663, de Metrohm, con un electrodo multimodo de mercurio, electrodo de referencia de Ag / AgCl (KCl sat) y contraelectrodo de carbono vítreo, equipado con agitador y sonda para el nitrógeno. El electrodo de mercurio se utilizó en modo SMDE.

Todos los potenciales que aparecen en este capítulo van referidos al potencial del electrodo de referencia indicado.

El sistema está controlado por un PC Intel Pentium 133 MHz , provisto del paquete de programas GPES versión 3.3.

-- Todo el material de vidrio y propileno fue sometido a 60° C en baño de HCl durante tres días ; enjuagado con agua desionizada y en baño a 60° C de HNO₃ (2 mol/l) durante otros tres días ; enjuagado nuevamente con agua desionizada y mantenido en baño de HNO₃ hasta su uso.

II.2.3.- Procedimiento

Para el estudio de los parámetros y medidas que se investigaron siguiendo las técnicas elegidas de voltamperometría diferencial de impulsos y voltamperometría de onda cuadrada (DPV y SWV) , se utilizó una celda polarográfica que contenía 5 ml de agua (previamente tratada MiliQ) , una determinada cantidad de electrolito soporte (generalmente 10 μ l de HCl 1:10) , y las cantidades de disolución de concentración conocida de EN, N- MET- EN y DENTRI necesarias en cada caso para proporcionar el pH adecuado. Se eliminó el oxígeno disuelto mediante el paso de una corriente de N₂ durante un tiempo de 300 segundos en un principio, y 30 segundos para las posteriores medidas.

Seguidamente se procede a la acumulación de la especie electroactiva sobre el electrodo de mercurio, aplicando un potencial de acumulación de -1.0 V durante un tiempo de 1 minuto, durante el cual se mantiene agitada la disolución. Transcurrido dicho tiempo, y tras 5 segundos de reposo, tiempo de equilibrio, se realiza el barrido de potencial hacia valores más positivos, hasta el completo desarrollo de la onda u ondas de oxidación. (de -0.6 V a + 0.1 V).

Después de cada medida se renueva la superficie del electrodo con la consiguiente formación de una nueva gota de igual superficie.

Se realizaron sucesivas adiciones de cobre con el objeto de hacer calibrados y obtener las señales para los diferentes derivados.

En tanto no se estudie como variable o se indique explícitamente, los parámetros y condiciones utilizados son los que se indican en este Procedimiento General.

II.3.- ESTUDIOS CON ETILENDIAMINA . (RESULTADOS , DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES).

II.3.1.- Comportamiento del fondo

Según lo proyectado en esta Memoria, posteriormente se llevarán a cabo ensayos con disoluciones en las que presumiblemente la concentración de cobre será del orden o inferior a 1 ppb ; lo cual significa que, por muy sensible que sea la técnica y condiciones empleadas, las señales analíticas correspondientes serán muy pequeñas ; de ahí la necesidad de evaluar previamente las señales de fondo o blanco; de éstas serán responsables , de una parte, los reactivos que se van a incorporar a la muestra y, de otra, el propio ruido de fondo achacable al instrumental utilizado.

A tenor de los ensayos previstos será necesario HCl (normalmente 10 μ l del reactivo señalado en su momento) y EN (en general se operará con varios cientos de μ l de disolución de EN 0.15 M) . Otro de los criterios utilizados posteriormente para fijar la cantidad idónea de EN es el pH (aproximadamente 9) y el potencial de los picos de redisolución (aproximadamente - 390 mV) . Por todo ello, los estudios de evaluación de fondo se han llevado a cabo con los tres tipos de disoluciones siguientes :

Disolución a): 10 ml agua (miliQ), 100 μ l HCl 1:10, y 500 μ l EN 0,15 M



pH \approx 7

Disolución b) : Disolución a) + 200 μ l EN 0,15 M \Rightarrow pH \approx 8

Disolución c) : Disolución b) + 300 μ l EN 0,15 M \Rightarrow pH \approx 9

Como puede observarse, se ha operado con cantidades de HCl y de EN muy superiores a las normalmente utilizadas, al objeto de poner de manifiesto la aportación de estos reactivos a la señal de redisolución de manera más fehaciente.

De otra parte, las condiciones de trabajo (especialmente durante la etapa de preconcentración) constituyen otro de los factores más influyentes en la configuración del ruido de fondo . Por ello, en los experimentos a desarrollar se han incorporado también como variables en estudio tanto el potencial como el tiempo de deposición ; de este último se han seleccionado cuatro valores de uso habitual en este tipo de análisis, mientras que del primero se ha estudiado el potencial de uso más frecuente y otros dos , ligeramente superior e inferior respectivamente.

Los resultados obtenidos utilizando la variante DPV se han resumido en la Tabla II.3.1.1., mientras que en la Figura II.3.1.1. aparece su correspondiente representación.

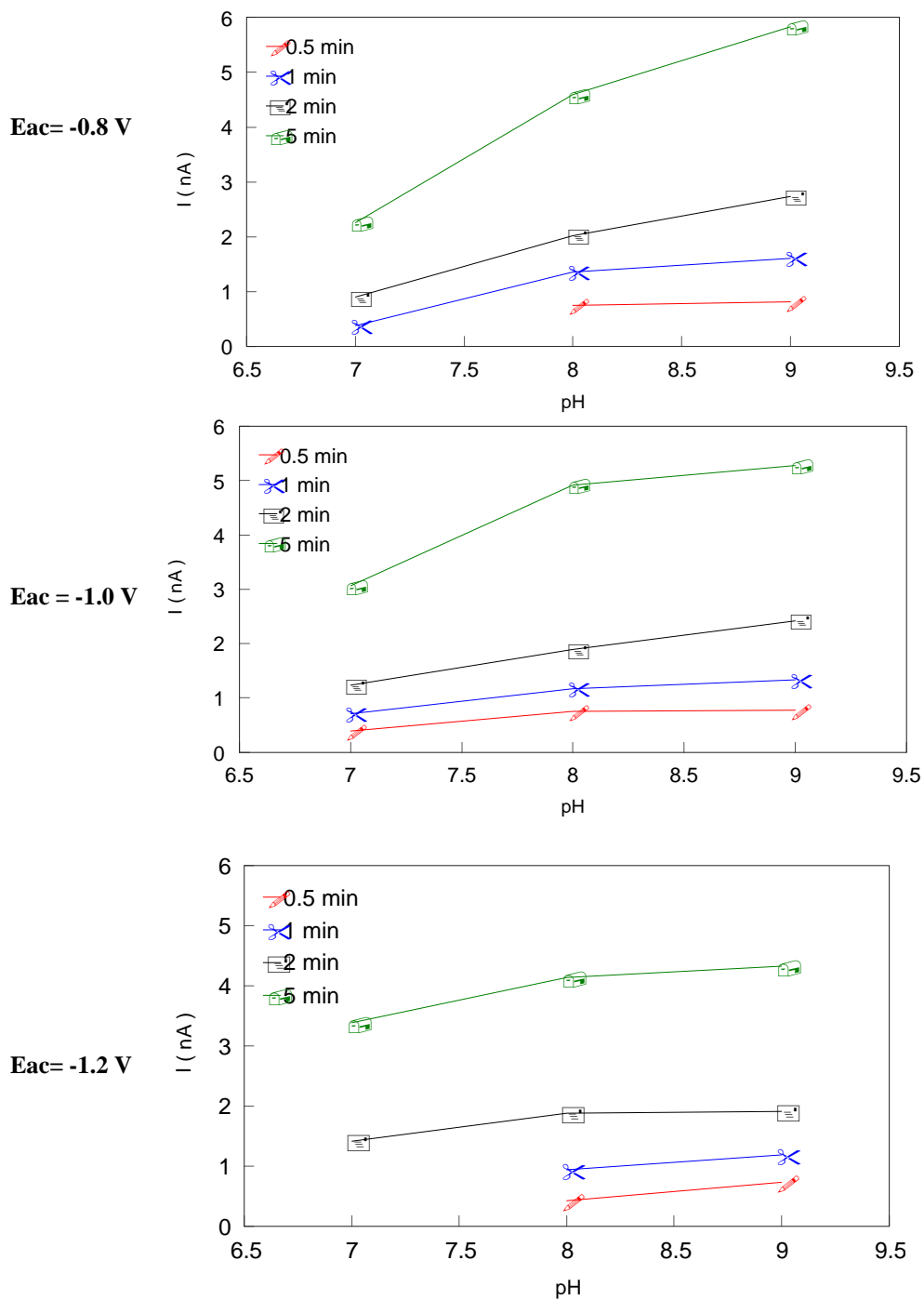
TABLA II.3.1.1.
COMPORTAMIENTO DEL FONDO . DPV

		1 Edep = -0.8 V	2 Edep = -1.0 V	3 Edep = -1.2 V			
T_{ac} (min)		-E (mV)	I (nA)	-E (mV)	I (nA)	-E (mV)	I (nA)
0.5	a	-	-	258	0.39	-	-
	b	258	0.75	366	0.75	353	0.43
	c	405	0.81	400	0.77	392	0.74
1	a	263	0.38	261	0.71	-	-
	b	368	1.36	363	1.17	361	0.94
	c	395	1.61	400	1.33	392	1.19
2	a	261	0.90	253	1.23	251	1.42
	b	363	2.02	373	1.89	356	1.88
	c	392	2.74	388	2.42	380	1.91
5	a	258	2.26	256	3.06	256	3.39
	b	363	4.59	363	4.92	358	4.14
	c	395	5.83	388	5.28	373	4.33

FIGURA II.3.1.1.

COMPORTAMIENTO DEL FONDO . DPV.

Participación de EN y potencial y tiempo de deposición.



Las Conclusiones que se pueden deducir de este estudio son las siguientes :

* Los valores del pH para cada disolución son los normales, si se considera la cantidad de EN necesaria para neutralizar la acidez del HCl.

* Las señales obtenidas corresponden fundamentalmente a pequeñas impurezas de cobre, como se deduce de los potenciales de pico (su evolución con el pH y con la presencia de más o menos EN) y de sus intensidades (evolución ante pequeñas adiciones de cobre).

* La constancia de los E de pico de redisolución para cada disolución es la esperada , toda vez que su rango de dispersión alcanza unos pocos milivoltios :

Disolución a) : $\bar{E} = - 257 \pm 3 \text{ mV}$.

Disolución b) : $\bar{E} = - 362 \pm 4 \text{ mV}$.

Disolución b) : $\bar{E} = - 392 \pm 6 \text{ mV}$.

* La evolución de estos E de pico desde las disoluciones **a** hasta las **c** es la prevista : cuanto mayor es el exceso de EN se observan potenciales más negativos.

* La evolución de I desde las disoluciones **a** hasta las **c** también encaja en lo previsible: A medida que aumenta el exceso de EN, el proceso electroquímico se torna más reversible y se observan intensidades mayores.

* En ambos casos los incrementos son mayores cuando se pasa de disoluciones **a** \rightarrow **b** que cuando se pasa de disoluciones **b** \rightarrow **c** , lo que indica que en las disoluciones **b** la mayor parte del Cu^{2+} está ya bajo control de la EN

* Los Eac ensayados proporcionan señales de redisolución muy parecidas , tanto en desarrollo (I) como en ubicación (E) , denotándose en todo caso y en conjunto una mayor estabilidad y desarrollo de las señales cuando se deposita a -1.0 V , por lo que este parámetro se fijó en el citado valor.

* En cuanto a la incidencia de los diferentes Tac , se constata que la evolución de I es conforme a lo previsto , advirtiéndose mayor coherencia con la teoría en las disoluciones **c** , probablemente porque en éstas se haya alcanzado una situación de máxima estabilidad.

Capítulo II. Estudios voltamperométricos con preconcentración. EN y derivados

Siguiendo el mismo protocolo procedimental se hicieron estudios paralelos aplicando la técnica SWV . Las disoluciones preparadas para ello fueron :

Disolución a) : 10 ml agua (miliQ), 100 μ l HCl 1:10, y 500 μ l EN 0,15 M

↓

$$\text{pH} \approx 7 \Rightarrow \bar{E} = - 273 \pm 3 \text{ mV}$$

Disolución b) : Disolución a) + 200 μ l EN 0,15 M \Rightarrow pH \approx 8 $\Rightarrow \bar{E} = - 376 \pm 2 \text{ mV}$

Disolución c) : Disolución b) + 300 μ l EN 0,15 M \Rightarrow pH \approx 9 $\Rightarrow \bar{E} = - 406 \pm 2 \text{ mV}$

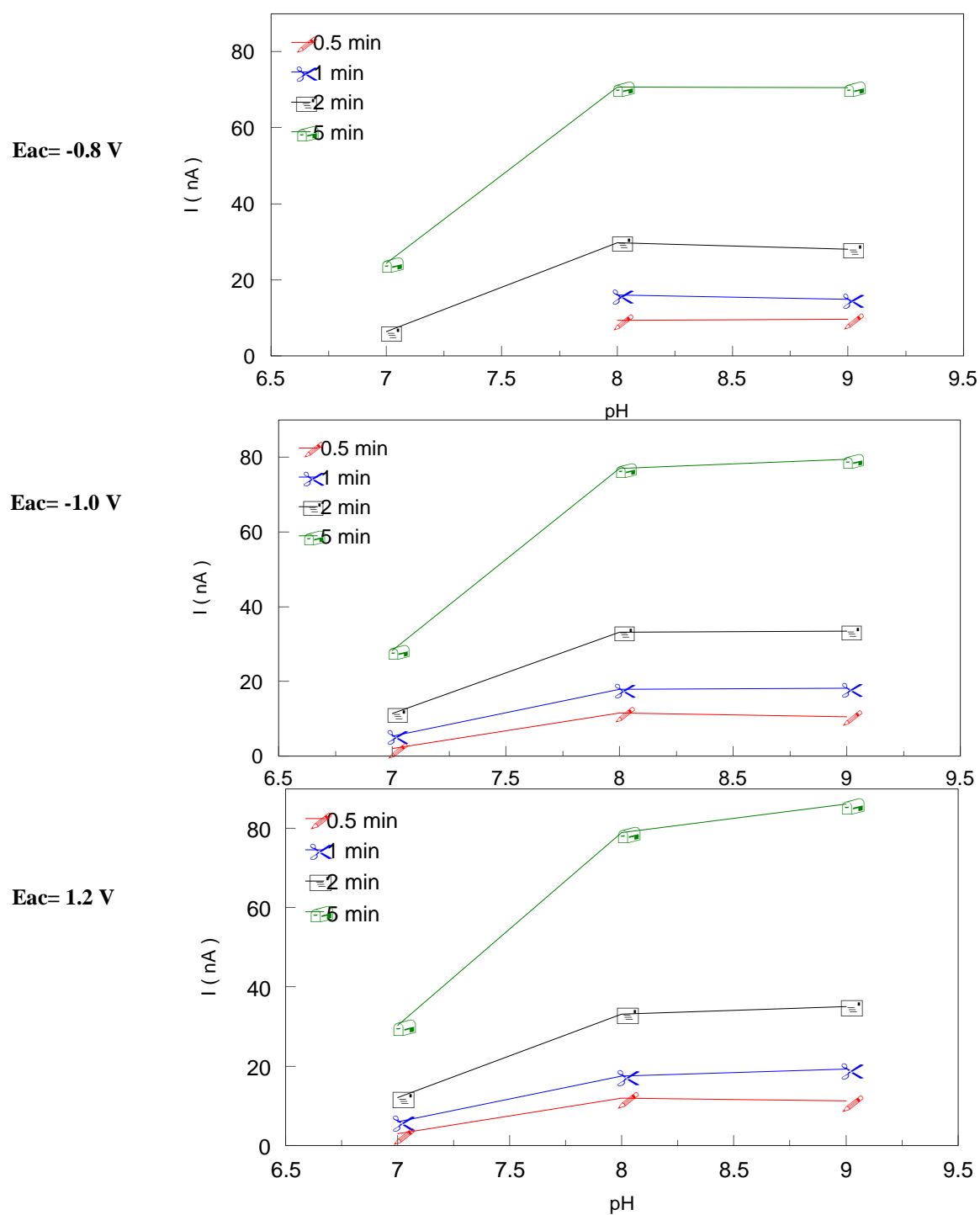
Los resultados obtenidos se han resumido en la Tabla II.3.1.2. y en la Figura II.3.1.2. En principio se llega a conclusiones muy parecidas a las descritas cuando se utiliza DPV, si bien en este caso cabe indicar que la cuantía de las señales es ahora de un orden de magnitud mayor, lo cual permite establecer a su vez dos consideraciones ; en primer lugar que la mayor aportación al ruido de fondo se debe probablemente a impurezas de cobre (presentes en los reactivos, en las paredes de las celdas o en el mismo mercurio que configura el electrodo de trabajo), ya que es bien conocido por estudios precedentes que en las condiciones de trabajo y cuando el analito es cobre, la técnica SWV es de un orden de magnitud más sensible que la DPV. En segundo término y a tenor del incremento de I cuando se adiciona cobre a la disolución, puede establecerse que, operando con 100 μ l de HCl 1:10 y 1000 μ l de EN 0.15 M , la señal de fondo equivale a una concentración de cobre del orden de 0.5 ppb ; dado que lo normal es trabajar con cantidades de reactivos sensiblemente inferiores, puede concluirse que también podrán determinarse concentraciones de cobre sensiblemente inferiores a 0.5 ppb.

TABLA II.3.1.2.

COMPORTAMIENTO DEL FONDO . SWV.

		1 E dep = - 0.8 v	2 E dep = -1.0 V	3 E dep = -1.2 V			
T _{ac} (min)		-E (mV)	I (nA)	-E (mV)	I (nA)	-E (mV)	I (nA)
0.5	a	-	-	441	2.04	270	2.94
	b	378	9.40	375	11.6	378	11.9
	c	402	9.56	407	10.6	407	11.2
1	a	-	-	266	5.41	273	5.88
	b	373	16.0	378	17.9	375	17.5
	c	405	14.8	402	18.2	405	19.3
2	a	278	6.36	273	11.4	275	12.1
	b	375	29.8	375	33.1	375	33.1
	c	407	28.1	407	33.4	407	35.0
3	a	275	24.3	270	28.3	273	30.3
	b	375	70.7	375	76.9	375	79.0
	c	407	70.6	407	79.4	407	86.2

FIGURA II.3.1.2.
COMPORTAMIENTO DEL FONDO . SWV.
Participación de EN y potencial y tiempo de deposición.



II.3.2.- Estudio del tiempo de acumulación

La previsible necesidad de tener que trabajar con concentraciones de cobre inferiores a 1 ppb ha obligado a replantear estudios acerca de la incidencia de este parámetro; sabido es que uno de los parámetros más influyentes en la sensibilidad de estas técnicas de redisolución es el tiempo de acumulación de metal (analito) en la superficie del electrodo. Obviamente , cuanto mayor es el tiempo de electrodeposición mayor es la concentración del metal en la amalgama y mayor la magnitud de la señal analítica . Por lo tanto, se trata de un parámetro decisivo en la concreción de la sensibilidad ; no obstante y paralelamente a la magnitud de la señal analítica, también aumentan otros fenómenos que contribuyen al ruido o fondo, de forma que no es recomendable desde el punto de vista analítico aumentar indefinidamente el tiempo de acumulación; ello con independencia de que el tiempo del análisis en principio debe tomarse como un factor negativo y, por consiguiente, con inclinación a minimizar.

De otra parte , la circunstancia de que de las técnicas voltamperométricas (DPV y SWV) empleadas en este trabajo sea la segunda la intrínsecamente más sensible ha motivado que el presente estudio se haya circunscrito especialmente a la primera de las citadas técnicas, es decir a DPV, por ser la que en mayor medida puede necesitar de este recurso instrumental.

Como se ha indicado, se estudió la influencia del tiempo de acumulación con intención de disminuir en lo posible el límite de detección. A tal efecto se realizaron los experimentos para diferentes concentraciones de Cu (II) y, para cada una de ellas, se estudiaron los tiempos de acumulación : 5, 4, 3, 2 y 1 minuto respectivamente.

El estudio se inició operando con concentraciones de Cu (II) de 5, 3 y 2 ppb, pero posteriormente se centró en 1 ppb de Cu (II) en celda, de manera que fue con esta concentración de cobre con la que se profundizó, realizando diferentes series para cada tiempo de acumulación, lo que permite evaluar la reproducibilidad de las señales y la respuesta de los electrodos. Se realizaron una serie de calibrados para cada tiempo de acumulación estudiado. Igualmente, se realizó el estudio con 0 ppb Cu (II) en celda.

EXPERIMENTOS CON 5 ppb Cu (II)

Se preparó una celda para el estudio voltamperométrico por DPV que contenía 10 ml de agua (mili Q), 10 μ l HCl 1:10 y 500 μ l EN 0.15 M. Sobre esta disolución se añadieron 50 μ l Cu (II) 1 ppm (suponen realmente en celda 4.75 ppb de Cu (II)). Se midieron las señales a diferentes tiempos de acumulación, resultando los datos que se presentan en la Tabla II.3.2.1.

TABLA II.3.2.1.

Experimentos para 5 ppb de Cu (II). Diferentes tiempos acumulación.

DPV

Tac (min)	5	4	3	2	1
Ip (nA)	18.54	14.44	10.67	6.718	3.242
Ep (V)	-0.395	-0.395	-0.397	-0.397	-0.397

Tras la obtención de la medida para el tiempo de acumulación de 1 minuto, se procedió a la realización de un calibrado, realizando tres adiciones de 60 μ l Cu (II) 1 ppm cada una de ellas, por tanto suponen incrementos próximos a 6 ppb Cu (II). Los resultados se presentan en la Tabla II.3.2.2. y se representan en la Figura II.3.2.1 .

TABLA II.3.2.2.

Calibrado para 5 ppb Cu (II) . Tac = 1 minuto . DPV

		Cu (II) (ppb)	I (nA)
Señal inicial	Muestra		3.412
1ª adición	6		7.723
2ª adición	12		12.13
3ª adición	18		16.11

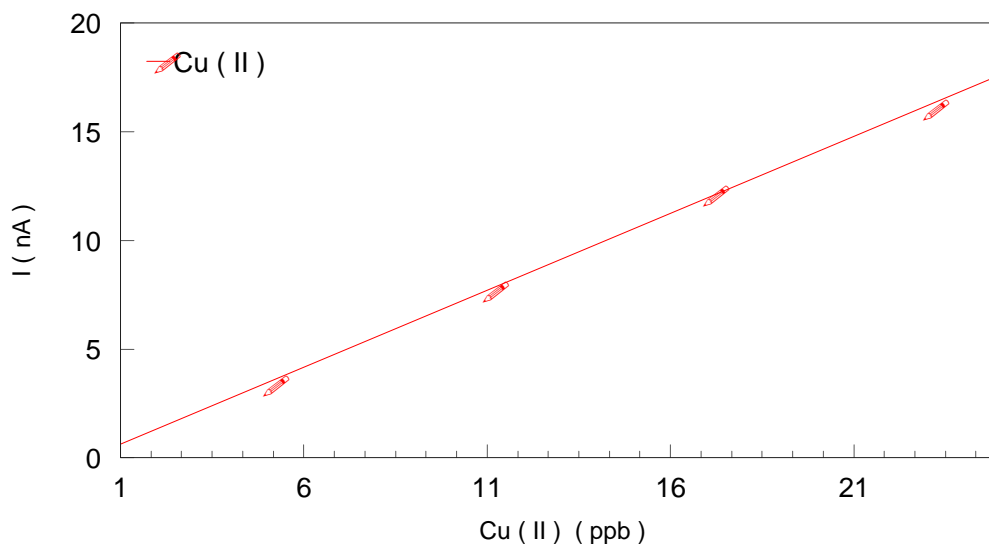
Señal : 5 ppb Cu (II) . Adiciones : cada una de 6 ppb Cu (II) .

FIGURA II.3.2.1

Estudio del tiempo de acumulación

Calibrado para 5 ppb Cu (II). Tac = 1 minuto.

DPV



De este calibrado, para 5 ppb Cu (II)(realmente en celda suponen **4.75 ppb** Cu (II)) y con un tiempo de deposición de 1 minuto, se obtienen los siguientes resultados:

A = 3.4686
B = 0.7083
r = 0.9998
Recuperación = **4.8 ppb** Cu (II).

EXPERIMENTOS CON 3 ppb Cu (II)

Se preparó una celda para el estudio voltamperométrico por DPV que contenía 10 ml de agua (mili Q), 10 μ l HCl 1:10 y 400 μ l EN 0.15 M. Sobre esta disolución se añadieron 30 μ l Cu (II) 1 ppm (suponen realmente en celda 2.90 ppb de Cu (II)). Se midieron las señales que aparecían en los voltamperogramas a diferentes tiempos de acumulación, según se presenta en la Tabla II.3.2.3.

TABLA II.3.2.3.

Experimentos para 3 ppb de Cu (II). Diferentes tiempos acumulación.

DPV

Tac (min)	5	4	3	2	1
Ip (nA)	14.05	11.28	8.456	5.604	2.544
Ep (V)	-0.388	-0.388	-0.388	-0.388	-0.385

Tras la obtención de la medida para el tiempo de acumulación de 1 minuto, se procedió a la realización de un calibrado, realizando tres adiciones de 50 μ l Cu (II) 1 ppm cada una de ellas, por tanto suponen incrementos próximos a 5 ppb Cu (II). Los resultados se presentan en la Tabla II.3.2.4. y se representan en la Figura II.3.2.2 .

TABLA II.3.2.4.

Calibrado para 3 ppb Cu (II). Tac = 1 minuto. DPV

	Cu (II) (ppb)	I (nA)
Señal inicial	3	2.544
1ª adición	8	5.616
2ª adición	13	9.659
3ª adición	18	13.61

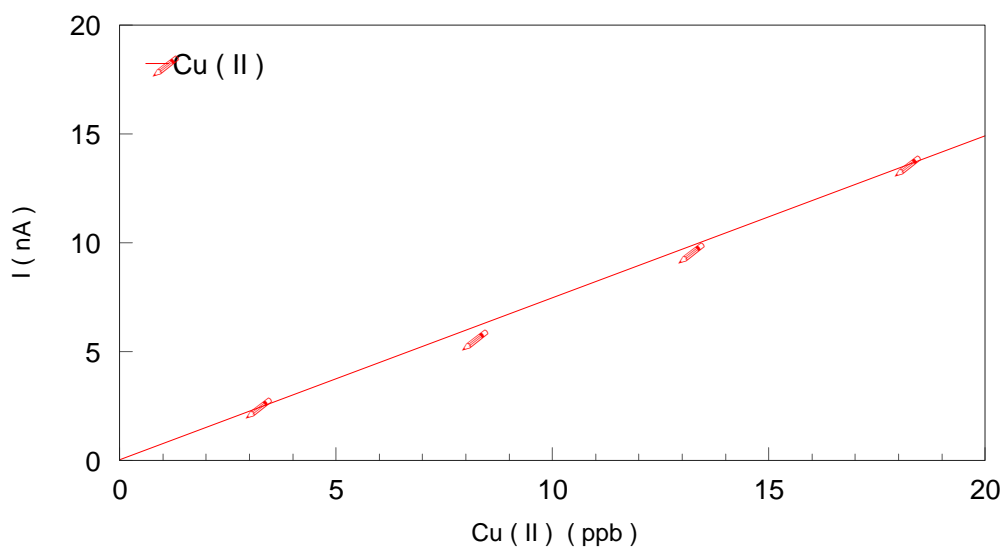
Señal : 3 ppb Cu (II). Adiciones : cada una de 5 ppb Cu (II).

FIGURA II.3.2.2.

Estudio tiempo de acumulación

Calibrado para 3 ppb Cu (II). Tac = 1 minuto .

DPV



Capítulo II. Estudios voltamperométricos con preconcentración. EN y derivados

De este calibrado, para 3 ppb Cu (II)(realmente en celda suponen **2.90 ppb** Cu (II)) y con un tiempo de deposición de 1 minuto, se obtienen los siguientes resultados :

$$\begin{aligned} A &= 2.2711 \\ B &= 0.7448 \\ r &= 0.9993 \\ \text{Recuperación} &= \mathbf{3.04 \text{ ppb}} \text{ Cu (II)}. \end{aligned}$$

EXPERIMENTOS CON 2 ppb Cu (II)

Se preparó una celda para el estudio voltamperométrico por DPV que contenía 10 ml de agua (mili Q), 10 μl HCl 1:10 y 400 μl EN 0.15 M. Sobre esta disolución se añadieron 20 μl Cu (II) 1 ppm (suponen realmente en celda 1.93 ppb de Cu (II)). Se midieron las señales que aparecían en los voltamperogramas a diferentes tiempos de acumulación, según se presenta en la Tabla II.3.2.5 .

TABLA II.3.2.5.

Experimentos para 2 ppb de Cu (II). Diferentes tiempos acumulación.

DPV

Tac (min)	5	4	3	2	1
Ip (nA)	8.199	6.308	4.595	2.875	1.481
Ep (V)	-0.385	-0.385	-0.385	-0.385	-0.383

Tras la obtención de la medida para el tiempo de acumulación de 1 minuto, se procedió, como en los casos anteriores, a la realización de un calibrado, realizando tres adiciones de $30 \mu\text{l}$ Cu (II) 1 ppm cada una de ellas, por tanto suponen incrementos próximos a 3 ppb Cu (II) . Los resultados se presentan en la Tabla II.3.2.6. y se representan en la Figura II.3.2.3.

TABLA II.3.2.6.

Calibrado para 2 ppb Cu (II) . $T_{ac} = 1$ minuto. DPV

	Cu (II) (ppb)	I (nA)
Señal inicial	2	1.481
1ª adición	5	3.755
2ª adición	8	5.692
3ª adición	11	8.156

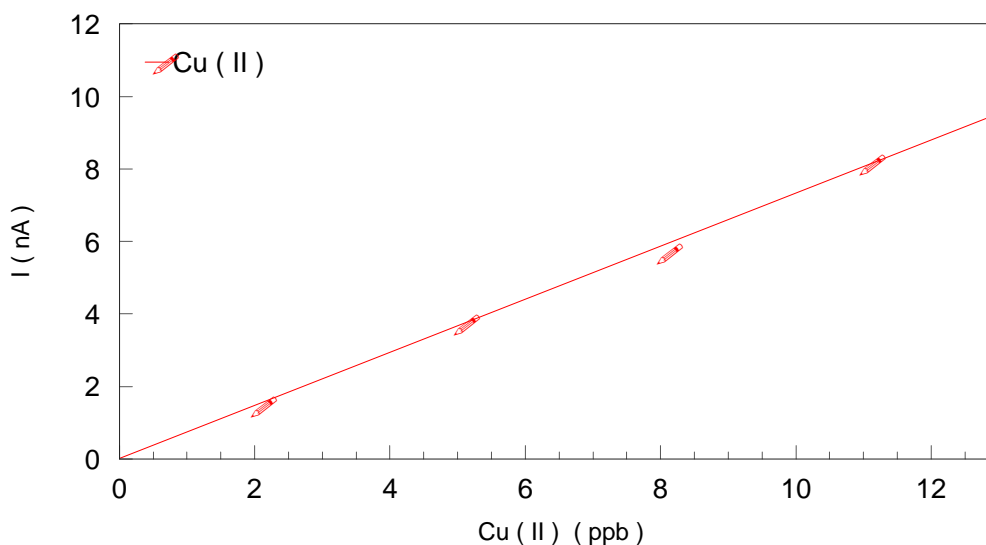
Señal : 2 ppb Cu (II) . Adiciones : cada una de 3 ppb Cu (II)

FIGURA II.3.2.3.

Estudio tiempo de acumulación

Calibrado para 2 ppb Cu (II) . $T_{ac} = 1$ minuto .

DPV



De este calibrado, para 2 ppb Cu (II) (realmente en celda suponen **1.93 ppb** Cu (II)) y con un tiempo de deposición de 1 minuto, se obtienen los siguientes resultados:

$A = 1.4767$
$B = 0.7320$
$r = 0.9991$
Recuperación = 2.0 ppb Cu (II)

EXPERIMENTOS CON 1 ppb Cu (II)

Se prepararon disoluciones en la celda que contenían 10 ml agua (mili Q), 10 μ l HCl 1:10 y 300 μ l EN 0.15 M. Sobre ellas se añadieron 10 μ l Cu (II) de 1 ppm (que suponen en celda realmente 0.97 ppb Cu (II)). Se realizaron tres adiciones de 20 μ l Cu (II) de 1 ppm (supone aproximadamente 2 ppb Cu (II) en celda cada adición). Los resultados obtenidos para estos calibrados se presentan en la Tabla II.3.2.7. ; en esta Tabla se ha incorporado una columna con los valores de las pendientes de hipotéticas representaciones I vs [Cu], al objeto de facilitar la comparación de los resultados ; circunstancia que se pone de manifiesto aún mejor en la última columna de la Tabla, en la que se han incluido los valores de dichas pendientes esta vez relativizadas por los tiempos de acumulación empleados en cada caso. Las medidas de las señales, para cada tiempo y adición, se presentan en la Tabla II.3.2.8 . En la Tabla II.3.2.9. se presenta un resumen de todos los ensayos con los valores medios obtenidos en cada apartado. A continuación , en la Figura II.3.2.4. y a modo de ejemplos, se han incorporado algunos de los voltamperogramas resultantes.

Del mismo modo y a manera de resumen, en la Figura II.3.2.5. se han representado las rectas de calibrado para diferentes tiempos de acumulación, donde se ve el elevado grado de linealidad de todos y cada uno de ellos.

TABLA II.3.2.7. INFLUENCIA DEL Tac ([Cu (II)] = 1 ppb). DPV.

Tiempo acum.(min)	Cobre Recup. (ppb)	r	P (nA/ppb)	Pr(nA/ppb/min)
5	0.90	0.9986	2.82	0.564
	0.86	0.9988	3.08	0.619
	1.08	0.9994	2.93	0.587
	1.03	0.9999	2.88	0.577
	0.96	0.9999	2.88	0.576
4	0.96	0.9998	2.57	0.642
	0.96	0.9999	2.55	0.636
	0.96	0.9999	2.54	0.635
	0.97	0.9998	2.55	0.636
	0.96	0.9999	2.57	0.643
3	0.97	0.9999	1.98	0.659
	0.96	0.9999	1.97	0.656
	0.97	0.9999	1.96	0.655
	0.94	0.9999	2.03	0.677
	0.97	0.9999	1.99	0.663
	0.93	0.9998	2.06	0.679
2	0.97	0.9999	1.51	0.755
	0.98	0.9997	1.46	0.728
	0.97	0.9993	1.43	0.712
	0.97	0.9999	1.45	0.726
	1.00	0.9998	1.38	0.690
1	0.97	0.9997	0.726	0.726
	0.97	0.9999	0.744	0.744
	1.00	0.9998	0.727	0.727
	1.00	0.9978	0.709	0.709
	0.98	0.9999	0.767	0.767

TABLA II.3.2.8.
SEÑALES PARA LOS CALIBRADOS . DPV.
1 ppb Cu (II), Diferentes tiempos.
(3 adiciones de 2 ppb de Cu (II))

Tiempo acum (minutos)	I (nA) Señal (1 ppb Cu(II))	I (nA) 1ª adición (2 ppbCu(II))	I (nA) 2ª adición (2 ppb Cu(II))	I (nA) 3ª adición (2 ppb Cu(II))
5	2.632	8.097	13.08	19.54
	3.046	8.374	14.92	21.52
	3.000	9.241	15.23	20.60
	2.996	8.755	14.44	20.30
	2.767	8.507	14.30	20.04
4	2.449	7.653	12.51	17.85
	2.447	7.519	12.62	17.75
	2.480	7.455	12.59	17.71
	2.521	7.544	12.45	17.79
	2.513	7.582	12.72	17.95
3	1.928	5.881	9.827	13.79
	1.991	5.848	10.17	14.21
	1.887	5.800	9.756	13.68
	1.951	5.803	9.706	13.74
	1.965	5.890	9.906	13.90

2	1.452	4.377	7.247	10.32
	1.501	4.275	7.139	10.24
	1.385	4.193	6.744	9.835
	1.441	4.261	7.256	10.15
	1.423	4.140	6.815	9.713
1	0.7352	2.100	3.637	5.065
	0.7325	2.216	3.717	5.224
	0.7578	2.264	3.714	5.123
	0.7348	2.021	3.711	4.900
	0.7671	2.279	3.786	5.370

TABLA II.3.2.9.
INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ACUMULACIÓN (Resumen).
1 ppb Cu (II). DPV. Valores medios .

Tiempo ac. (min)	Nº de Experim.	Recuper. (ppb)	r	Pend. (nA / ppb)	Pend. rel. (nA/ppb/min)
5	5	0.95	0.9993	2.92	0.584
4	5	0.96	0.9999	2.56	0.639
3	5	0.93	0.9998	2.00	0.667
2	5	0.98	0.9997	1.45	0.723
1	5	0.98	0.9994	0.736	0.736

FIGURA II.3.2.4.
VOLTAMPEROGRAMAS OBTENIDOS PARA 1 ppb Cu (II).
Tiempo de acumulación 5 minutos
DPV.
(Ver Tabla II.3.2.8)

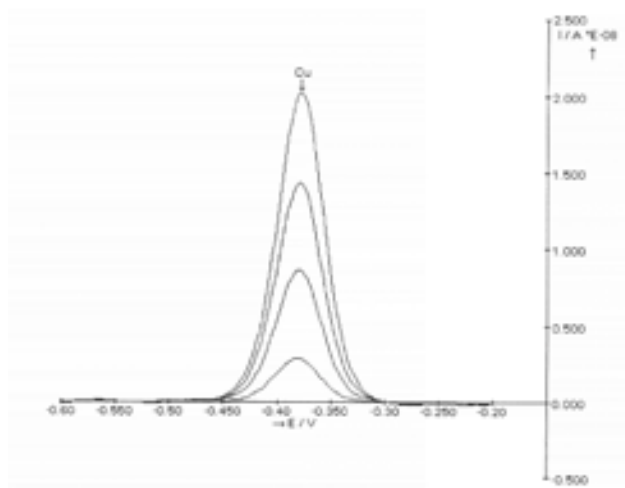


FIGURA II.3.2.4. (Continuación)
Tiempo de acumulación 4 minutos

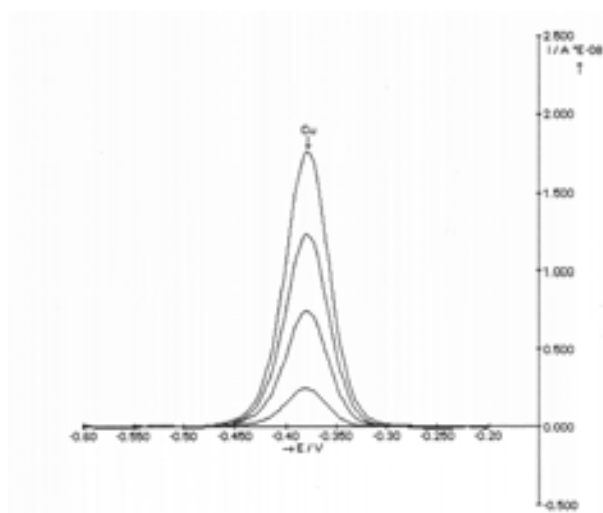


FIGURA II.3.2.4. (Continuación)

Tiempo de acumulación 3 minutos

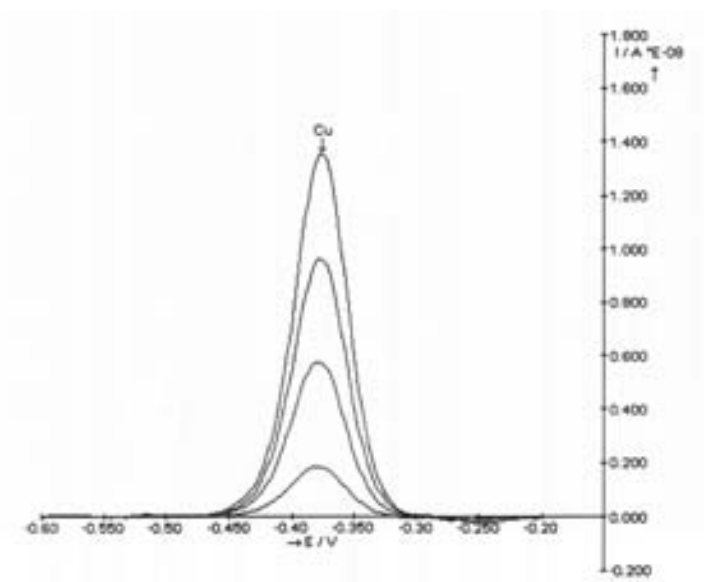


FIGURA II.3.2.4.

Tiempo de acumulación 2 minutos

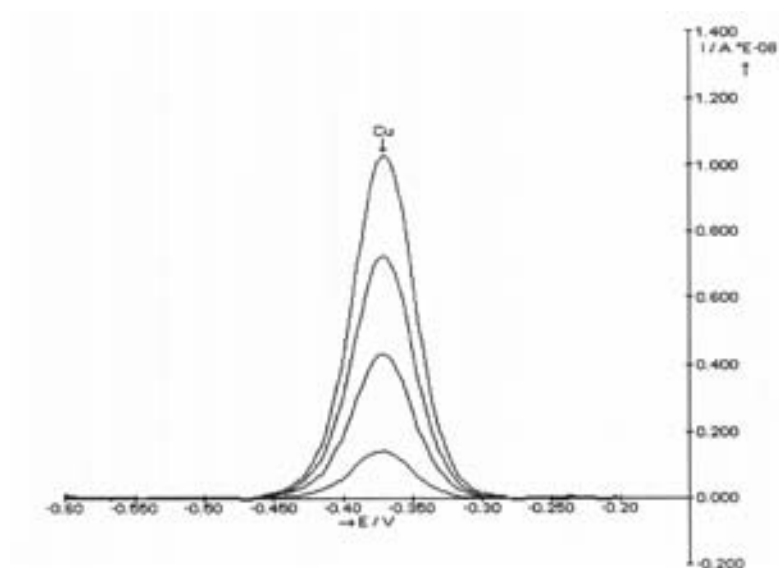


FIGURA II.3.2.4. (Continuación)

Tiempo de acumulación 1 minuto.

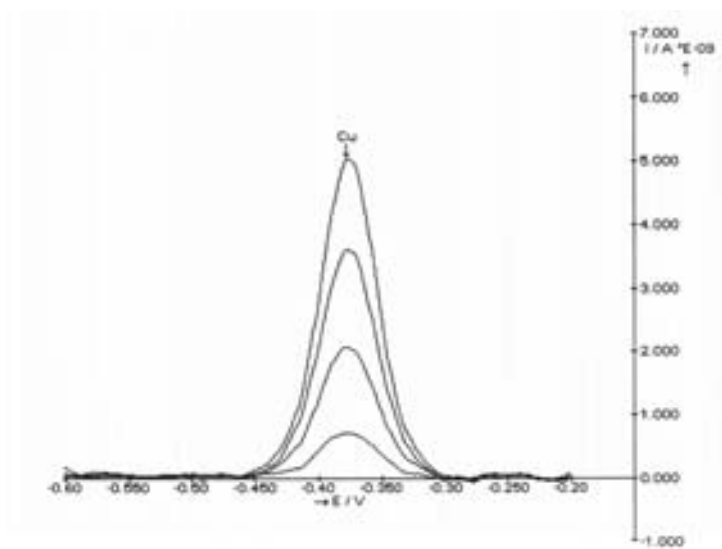
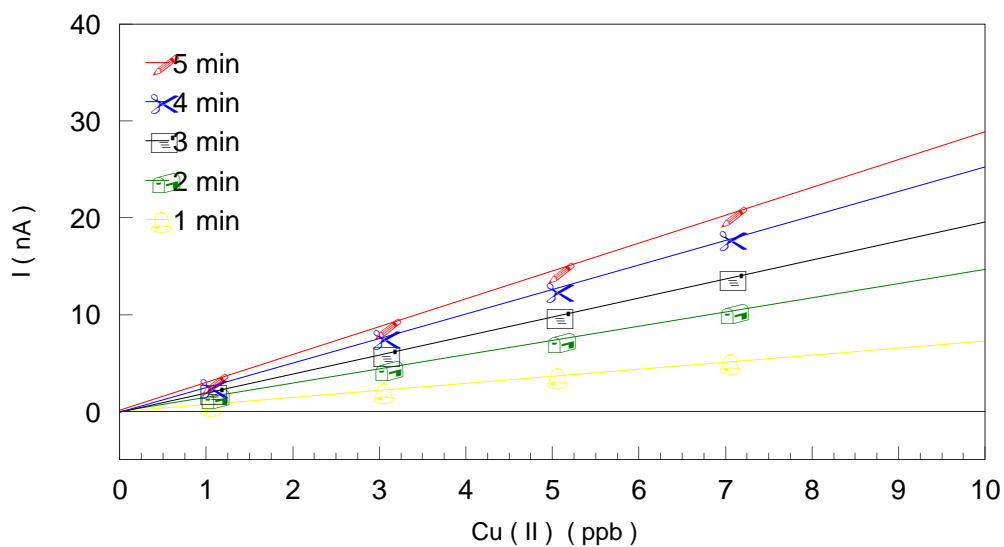


FIGURA II.3.2.5.

RECTAS DE CALIBRADO OBTENIDAS PARA 1 ppb Cu (II).

Diferentes tiempos de acumulación.



EXPERIMENTOS CON 0 ppb Cu (II)

Al objeto de corroborar las conclusiones obtenidas en el apartado II.3.1. , se repitió el estudio precedente , pero esta vez sin añadir cobre en un principio ; es decir, según la terminología empleada se operó con 0 ppb de cobre.

Se preparó una celda que contenía 10 ml de agua (mili Q), 10 μ l HCl 1:10 y 300 μ l EN 0.15 M. Esta disolución se consideró como muestra, se midieron las señales a diferentes tiempos de acumulación, resultando los datos que aparecen en la Tabla II.3.2.10.

TABLA II.3.2.10.
Experimentos para 0 ppb Cu (II) . Diferentes tiempos acumulación.
DPV

Tac (min)	5	4	3	2	1
Ip (nA)	0.7335	0.6112	0.5019	0.3322	0.1367
Ep (V)	-0.375	-0.378	-0.373	-0.378	-0.383

Tras la obtención de la medida para el tiempo de acumulación de 1 minuto, se procedió a la realización de un calibrado, realizando tres adiciones de 10 μ l Cu (II) 1 ppm cada una de ellas, suponiendo por tanto cada una aproximadamente 1 ppb Cu (II). Los resultados se presentan en la Tabla II.3.2.11. y se representan en la Figura II.3.2.6.

TABLA II.3.2.11.

Calibrado para 0 ppb Cu (II). Tac = 1 minuto. DPV

	Cu (II) (ppb)	I (nA)
Señal inicial	-	0.1367
1ª adición	1	0.7437
2ª adición	2	1.561
3ª adición	3	2.304

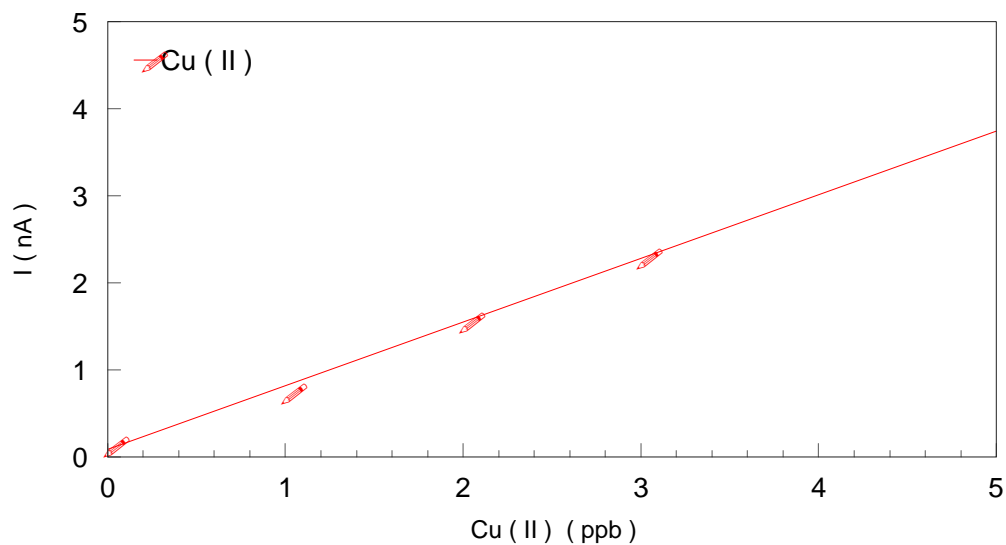
Señal : 0 ppb Cu (II) . Adiciones : cada una de 1 ppb Cu (II) .

FIGURA II.3.2.6.

Estudio del tiempo de acumulación.

Calibrado para 0 ppb Cu (II) . Tac = 1 minuto.

DPV



Capítulo II. Estudios voltamperométricos con preconcentración. EN y derivados

De este calibrado, para 0 ppb Cu (II) y con un tiempo de deposición de 1 minuto, se obtienen los siguientes resultados :

$$\begin{aligned} A &= 0.0885 \\ B &= 0.7319 \\ r &= 0.9984 \\ \text{Recuperación} &= \mathbf{0.1 \text{ ppb Cu (II)}} \end{aligned}$$

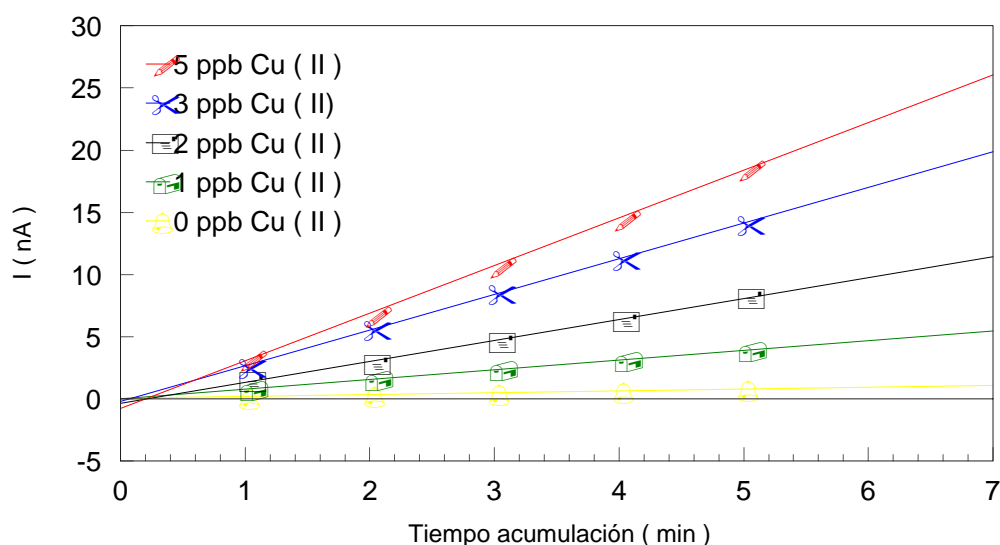
Finalmente, en la Tabla II.3.2.12 se han incluido los principales datos obtenidos en los estudios realizados en este apartado mientras que en la Figura II.3.2.7 se han representado dichos datos.

TABLA II.3.2.12.
INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ACUMULACIÓN. (CUADRO RESUMEN)
DPV

	[Cu²⁺] puesto				
Tac (min)	5 ppb	3 ppb	2 ppb	1 ppb	0 ppb
1	3.242	2.544	1.481	0.767	0.137
2	6.718	5.604	2.875	1.567	0.332
3	10.67	8.456	4.595	2.389	0.502
4	14.44	11.28	6.308	3.096	0.611
5	18.54	14.05	8.199	3.904	0.734
Pend (nA/min)	3.75	2.90	1.70	0.784	0.15
Pend (nA/min ppb)	0.75	0.97	0.85	0.78	-

FIGURA II.3.2.7.

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ACUMULACIÓN
(Ver Tabla II.3.2.12)



De este estudio en torno a la variable instrumental tiempo de acumulación pueden obtenerse las siguientes conclusiones :

- Los resultados son en todos los aspectos coherentes con las previsiones teóricas. Así, la magnitud de las señales aumenta a medida que lo hace el tiempo de acumulación, circunstancia por la cual esta variable será muy a tener en cuenta cuando interese incrementar la sensibilidad del método porque las muestras reales objeto de análisis así lo exijan.

- También se observa un elevado grado de proporcionalidad (ver los valores de las pendientes relativas en la Tabla II.3.2.12) entre las variables antes citadas (intensidad y tiempo de acumulación), lo cual permite concluir que al aumentar el tiempo de acumulación no aparecen fenómenos parásitos que obliguen a limitar esta variable.

- Los calibrados obtenidos aportan una calidad analítica muy elevada , lo que permite concluir que al menos en el rango estudiado el tiempo de acumulación no constituye restricción alguna para los estudios a realizar posteriormente.

II.3.3.- Estudio del potencial de acumulación

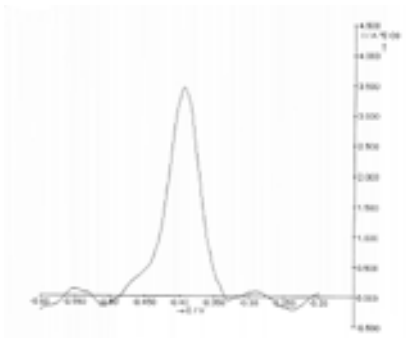
Estudio en DPV

Se estudió la influencia del potencial de acumulación, de manera que se pudiera elegir así el más apropiado para obtener los voltamperogramas en las mejores condiciones analíticas en función de los análisis a realizar.

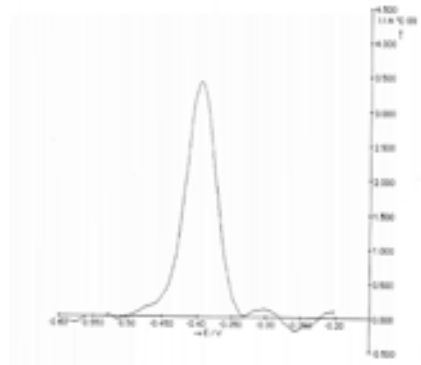
Para la realización de este estudio se prepararon disoluciones que contenían 10 ml agua (miliQ), 10 μ l HCl 1:10 y 500 μ l EN 0.15 M. Sobre esta disolución se añadieron 50 μ l de disolución de Cu (II) de 1 ppm, lo que supone en celda del orden 5 ppb de Cu (II). Se midieron las señales obtenidas para un tiempo de acumulación de 1 minuto, a diferentes potenciales de deposición. El estudio consistió en dos series totalmente diferentes, con el fin de evaluar la reproducibilidad de las medidas. En una primera parte, se utilizó la técnica DPV, presentándose algunos de los voltamperogramas registrados en la Figura II.3.3.1.

Los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla II.3.3.1. y aparecen representados en la Figura II.3.3.2.

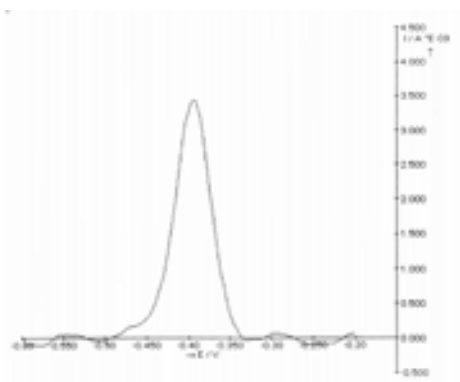
FIGURA II.3.3.1.
VOLTAMPEROGRAMAS A DIFERENTES E_{ac} (DPV).



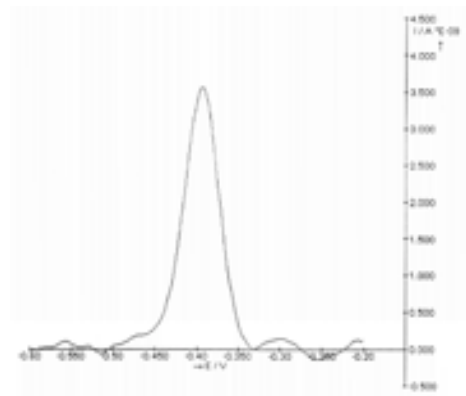
$E_{ac} = -0.7 \text{ V}$



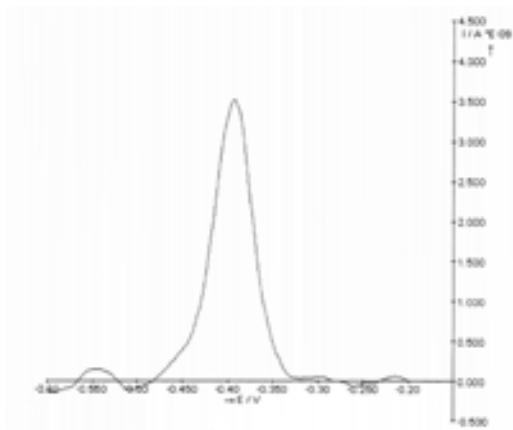
$E_{ac} = -0.8 \text{ V}$



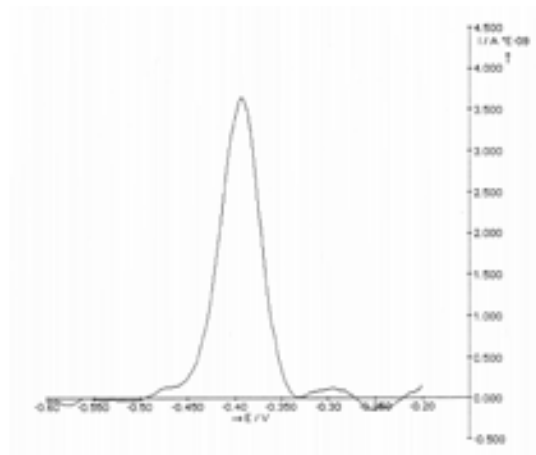
$E_{ac} = -0.9 \text{ V}$



$E_{ac} = -1.0 \text{ V}$



$E_{ac} = -1.1 \text{ V}$



$E_{ac} = -1.2 \text{ V}$

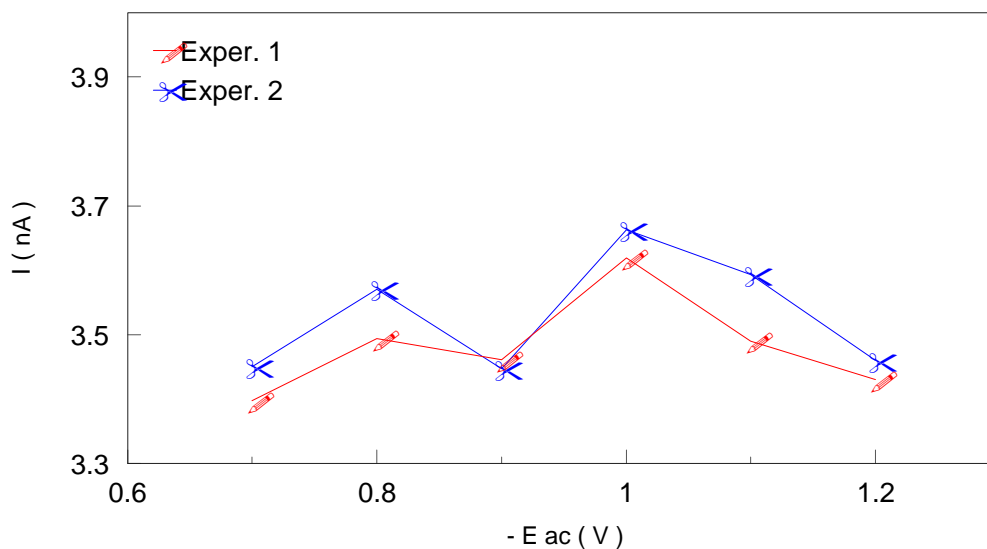
TABLA II.3.3.1.

INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN. (DPV).
(5 ppb de Cu (II))

1ª experiencia		2ª experiencia		
E acum. (V)	Ep (V)	Ip (nA)	Ep (V)	Ip (nA)
-0.7	-0.397	3.397	-0.395	3.450
-0.8	-0.397	3.494	-0.395	3.570
-0.9	-0.397	3.461	-0.395	3.447
-1.0	-0.395	3.619	-0.395	3.663
-1.1	-0.395	3.490	-0.392	3.593
-1.2	-0.397	3.430	-0.395	3.460

GRÁFICA II.3.3.1.

INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN .
(Ver Tabla II.3.3.1)



Capítulo II. Estudios voltamperométricos con preconcentración. EN y derivados

La observación de todo este material permite concluir , en primer lugar, que en todos los casos los voltamperogramas registrados están bien conformados y, en segundo, que los resultados son prácticamente iguales en las dos experiencias. Desde el punto de vista del principal objetivo de este apartado se concluye lo siguiente :

* Los E_p de los voltamperogramas son significativamente constantes; es decir, no se ven afectados por la variable en estudio.

* Las I_p varían muy poco en el intervalo del potencial de acumulación estudiado . No obstante , se observa un ligero máximo cuando se usa $E_{ac} = - 1.0 \text{ V}$.

* Con independencia de que hubiera algún cambio en el comportamiento de esta variable al pasar a muestras reales, el E_{ac} más aconsejable y que se aplicará en estudios posteriores es -1.0 V .

Estudio en SWV

Los estudios anteriores se han repetido siguiendo la técnica SWV, utilizando para ello disoluciones y procedimiento totalmente iguales a los descritos, con la lógica excepción de los parámetros específicos de la técnica, cuyos valores fueron los habituales.

Al igual que se realizó con DPV, se estudió la influencia del potencial de acumulación para elegir el más adecuado, trabajando en SWV y realizando una purga con Nitrógeno durante 60 segundos para eliminar el oxígeno presente. Se realizó una preconcentración durante un tiempo de 1 minuto de acumulación.

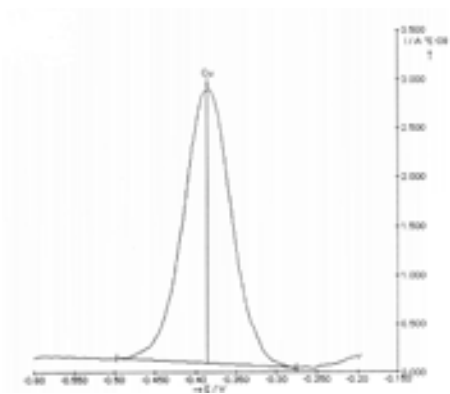
Con independencia de la atención especial que se le presta en otro apartado se ha querido ensayar aquí la diferencia que pueda existir al operar con disoluciones en contacto con el aire (con oxígeno) o desoxigenadas; sabido es que el oxígeno puede interferir o no en procesos electroanalíticos, según las circunstancias y según la técnica aplicada; obviamente, uno de los factores más influyentes en estos fenómenos es el potencial impuesto al electrodo, es decir, la variable estudiada en este apartado. Por tal motivo, después de cada estudio en atmósfera abierta se ha pasado N₂ a las disoluciones durante 5 minutos y se ha repetido el estudio, esta vez en ausencia de oxígeno.

En la Figura II.3.3.2, en la Tabla II.3.3.2 y en la Gráfica II.3.3.2, se ha incluido información semejante a la dada al usar DPV, pero en esta ocasión utilizando disoluciones previo paso de nitrógeno.

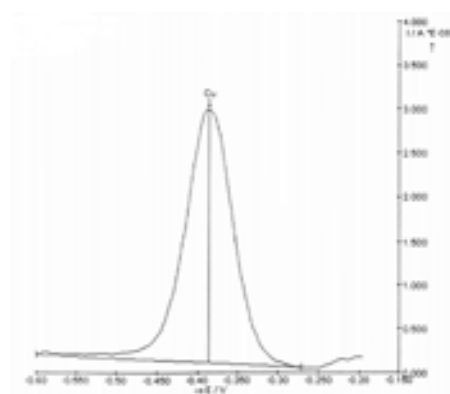
Y en la Figura II.3.3.3, en la Tabla II.3.3.3 y en la Gráfica II.3.3.3 aparece información paralela a la anterior, obtenida con las mismas disoluciones y técnica SWV, pero en esta ocasión utilizando disoluciones en contacto con el aire.

En términos generales, las conclusiones aplicables a la técnica SWV son las mismas que las descritas para DPV. Además, debe enfatizarse el hecho de que la sensibilidad es ahora significativamente mayor (corroborando con ello lo dicho en el apartado anterior) y que la presencia o no de oxígeno en la disolución no ejerce influencia alguna en los resultados.

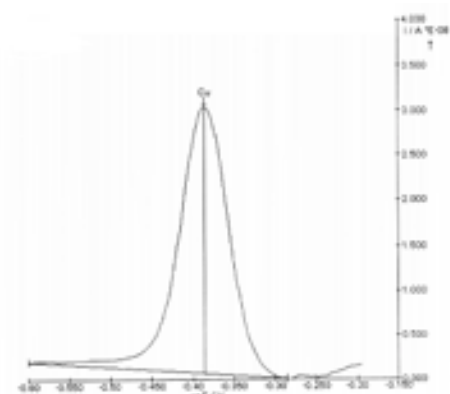
FIGURA II.3.3.2.
VOLTAMPEROGRAMAS A DIFERENTES E_{ac} (SWV, con N_2)



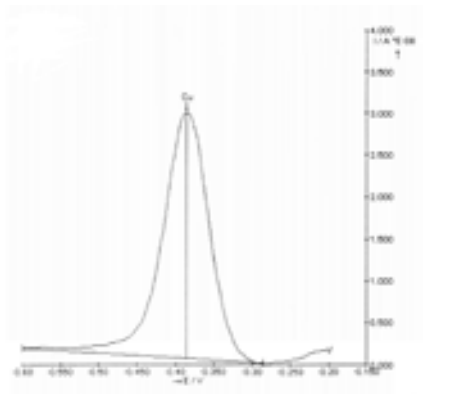
$E_{ac} = -0.7 \text{ V}$



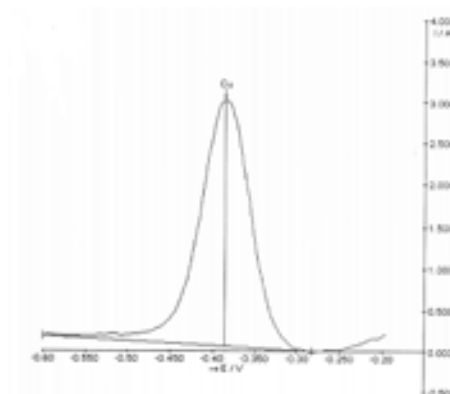
$E_{ac} = -0.8 \text{ V}$



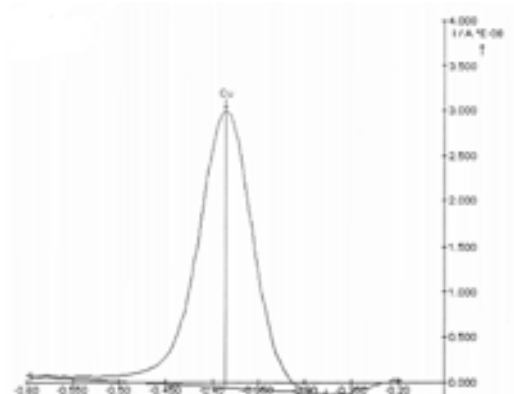
$E_{ac} = -0.9 \text{ V}$



$E_{ac} = -1.0 \text{ V}$



$E_{ac} = -1.1 \text{ V}$



$E_{ac} = -1.2 \text{ V}$

TABLA II.3.3.2.
INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN. (SWV, con N₂)
(5 ppb de Cu (II))

1ª experiencia		2ª experiencia		
E acum. (V)	Ep (V)	Ip (nA)	Ep (V)	Ip (nA)
-0.7	-0.383	26.08	-0.390	28.80
-0.8	-0.380	27.32	-0.392	29.69
-0.9	-0.380	27.05	-0.390	29.45
-1.0	-0.380	28.58	-0.392	30.19
-1.1	-0.380	28.04	-0.392	29.92
-1.2	-0.383	27.28	-0.390	29.98

GRÁFICA II.3.3.2.
INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN
(Ver Tabla II.3.3.2)

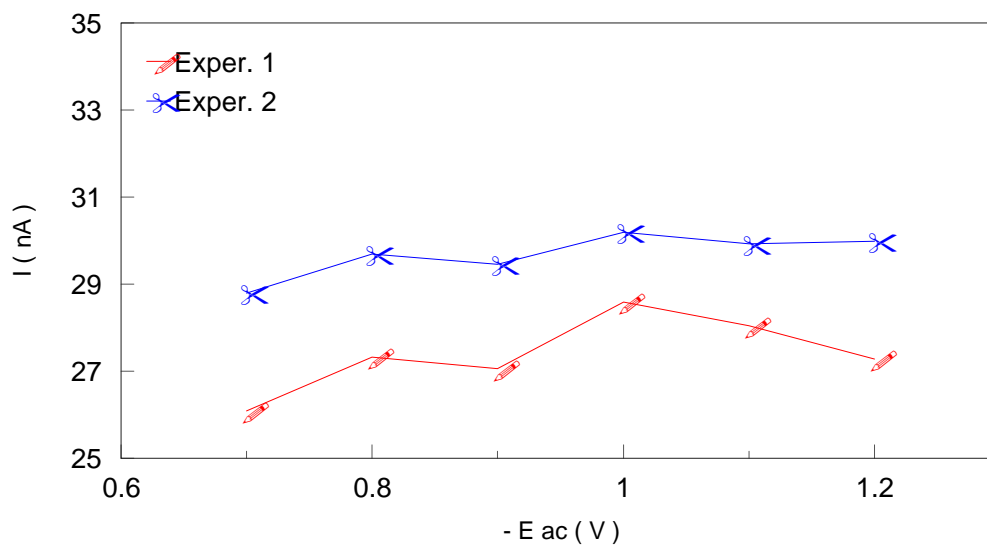
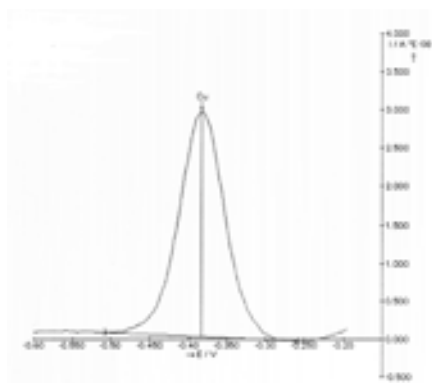
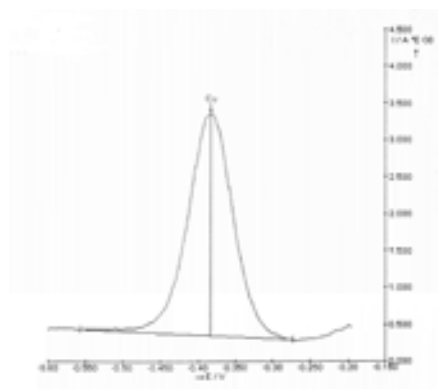


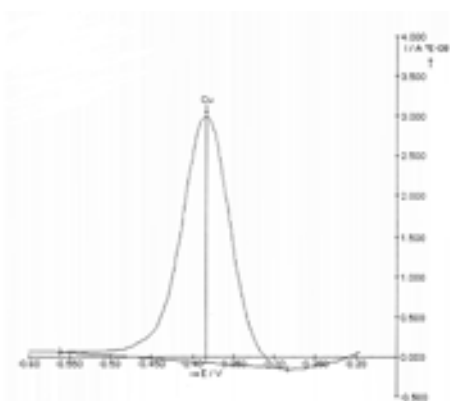
FIGURA II.3.3.
VOLTAMPEROGRAMAS A DIFERENTES Eac (SWV, sin N₂)



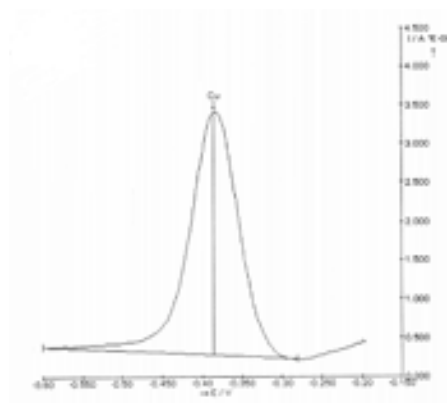
Eac = -0.7 V



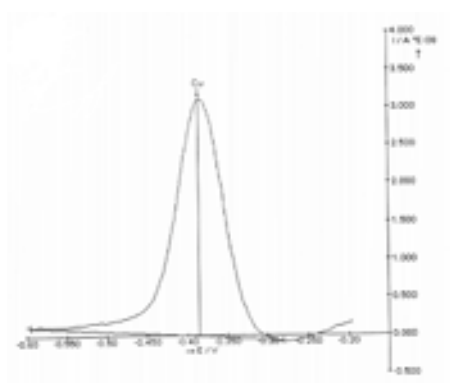
Eac = -0.8 V



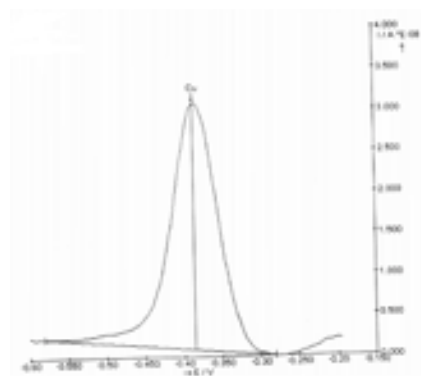
Eac = -0.9 V



Eac = -1.0 V



Eac = -1.1 V

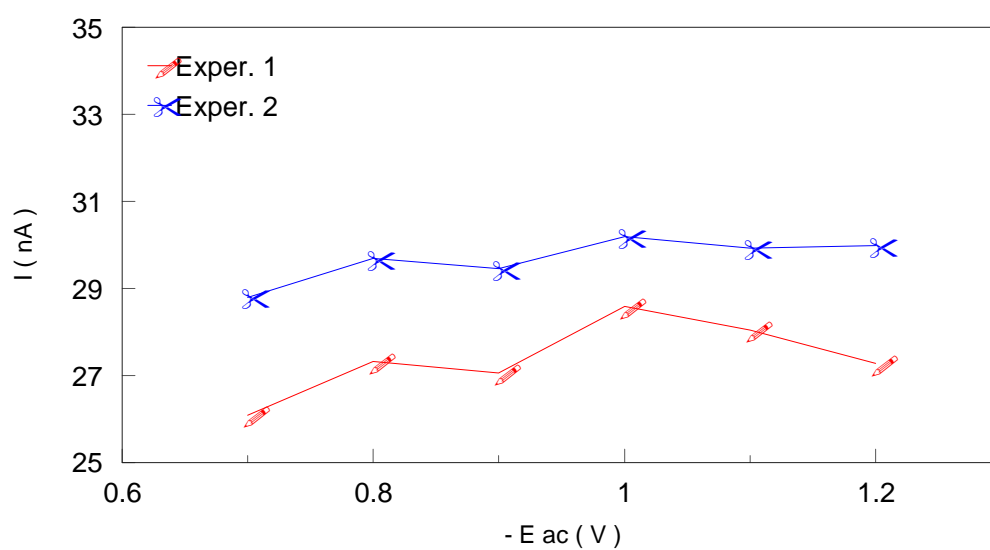


Eac = -1.2 V

TABLA II.3.3.
INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN (SWV, sin N₂)

		1ª experiencia		2ª experiencia	
E acum. (V)	Ep (V)	Ip (nA)	Ep (V)	Ip (nA)	Ip (nA)
-0.7	-0.383	24.94	-0.388	26.89	
-0.8	-0.380	26.40	-0.385	27.13	
-0.9	-0.380	27.24	-0.385	28.10	
-1.0	-0.380	28.82	-0.385	29.42	
-1.1	-0.380	28.58	-0.385	28.95	
-1.2	-0.380	28.65	-0.385	29.27	

GRÁFICA II.3.3.
INFLUENCIA DEL POTENCIAL DE ACUMULACIÓN
(Ver Tabla II.3.3)



II.3.4.- Influencia de la presencia de oxígeno

Cuando se utiliza como técnica electroanalítica la potenciometría de redisolución anódica se ofrecen dos opciones para el oxígeno presente en la disolución de la muestra : bien se mantiene en la disolución y se usa como reactivo oxidante o , en caso contrario, debe retirarse previamente a la etapa de concentración del analito. Por el contrario, la mayor parte de las técnicas voltamperométricas que entrañan algún proceso catódico tienen el inconveniente de que la presencia de oxígeno en la disolución del analito supone una interferencia que, obviamente, necesita eliminarse ; esto obliga a introducir en el proceso una primera etapa destinada a desairear durante varios minutos la disolución, lo cual supone dos inconvenientes ; de una parte, alarga el tiempo (al menos lo duplica) del análisis y, de otra, aumenta la probabilidad de cualquier evolución química (no deseada) del analito .

No obstante lo dicho, en las técnicas basadas en SWV la incidencia de la reducción del oxígeno suele ser lo suficientemente pequeña como para poder prescindir de la etapa de desaireación, con la consiguiente simplificación en el procedimiento analítico. En todo caso, considerando que el análisis de trazas implica trabajar en condiciones límite de sensibilidad (circunstancia que concurre en la presente Memoria) ha parecido oportuno y necesario efectuar un estudio específico para dilucidar si procede o no eliminar la antedicha etapa de desaireación.

Para ello se han realizado dos estudios paralelos (sin pasar nitrógeno y pasándolo) con las mismas disoluciones . Se ha partido de disoluciones con 1 ppb de Cu (II) y se han añadido progresivamente cantidades de disolución madre de Cu (II) que supusieron cada una de ellas un incremento en la concentración del metal de 2 ppb. Teniendo en cuenta que la presencia de oxígeno podría influir en mayor medida durante la etapa de acumulación (catódica) , se ha aplicado a cada una de las disoluciones anteriores diferentes tiempos de concentración (1, 2, 3, 4 y 5 minutos). El resto de condiciones operacionales ha sido el habitual.

Cuando no se pasa nitrógeno se obtienen voltamperogramas como los de la Figura II.3.4.1. . Cada serie se ha repetido 5 veces y en la Tabla II.3.4.1. se exponen los resultados. A modo de ejemplo en la Gráfica II.3.4.1. se han representado los datos correspondientes a una de las series.

FIGURA II.3.4.1.
VOLTAMPEROGRAMAS OBTENIDOS PARA 1 ppb Cu(II).
Tiempo de acumulación 5 minutos
(SWV sin N₂)

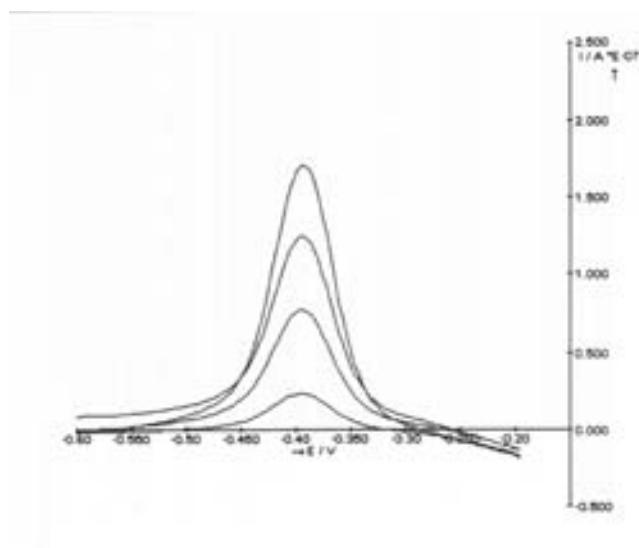


FIGURA II.3.4.1. (Continuación)
Tiempo de acumulación 4 minutos

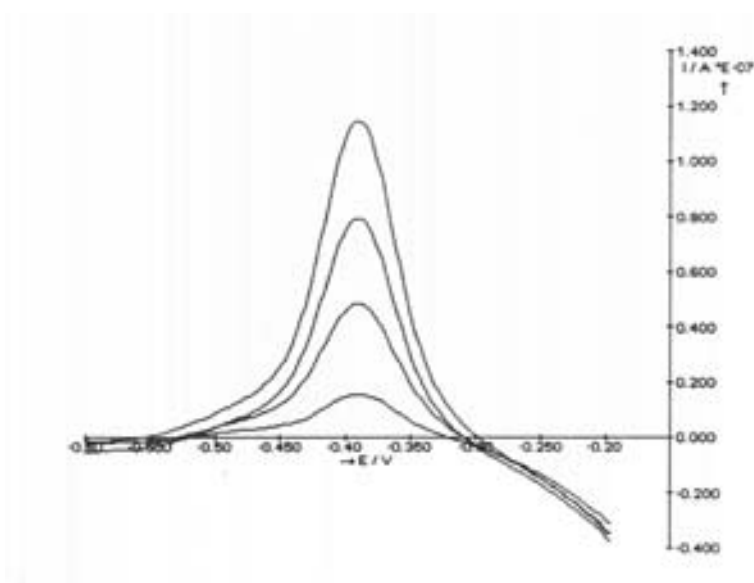


FIGURA II.3.4.1. (Continuación)

Tiempo de acumulación 3 minutos

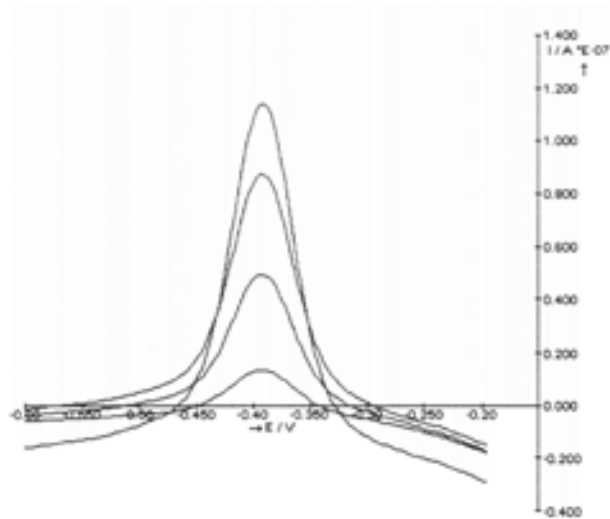


FIGURA II.3.4.1. (Continuación)

Tiempo de acumulación 2 minutos

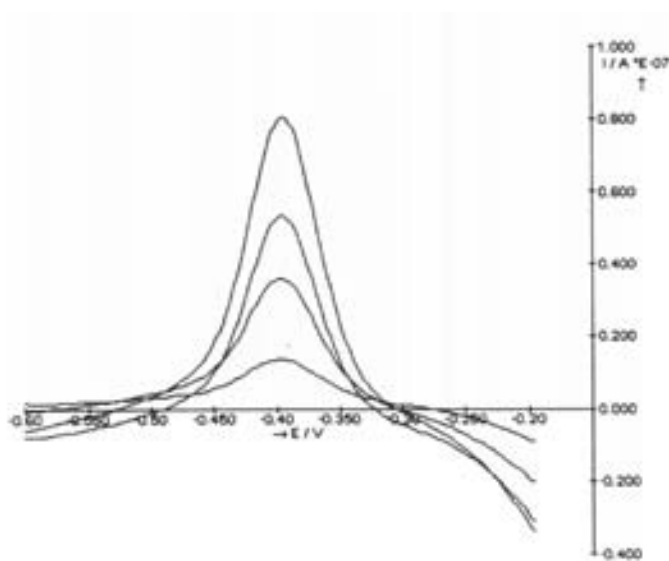


FIGURA II.3.4.1. (Continuación)

Tiempo de acumulación 1 minuto

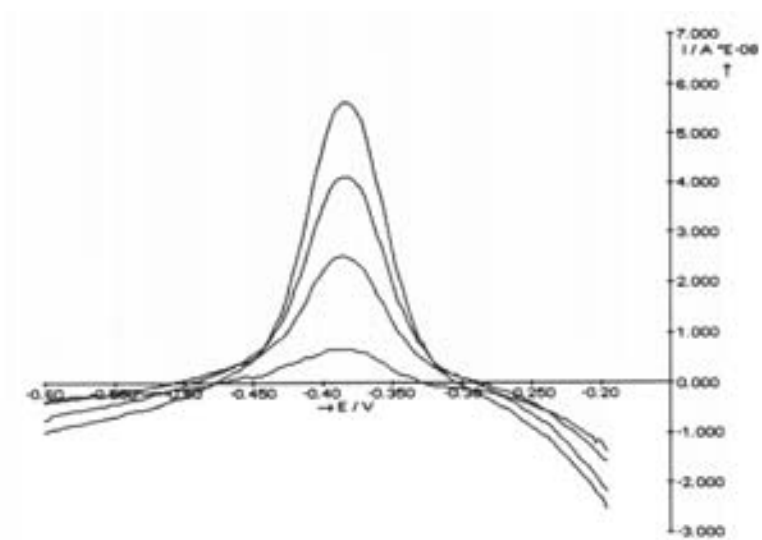
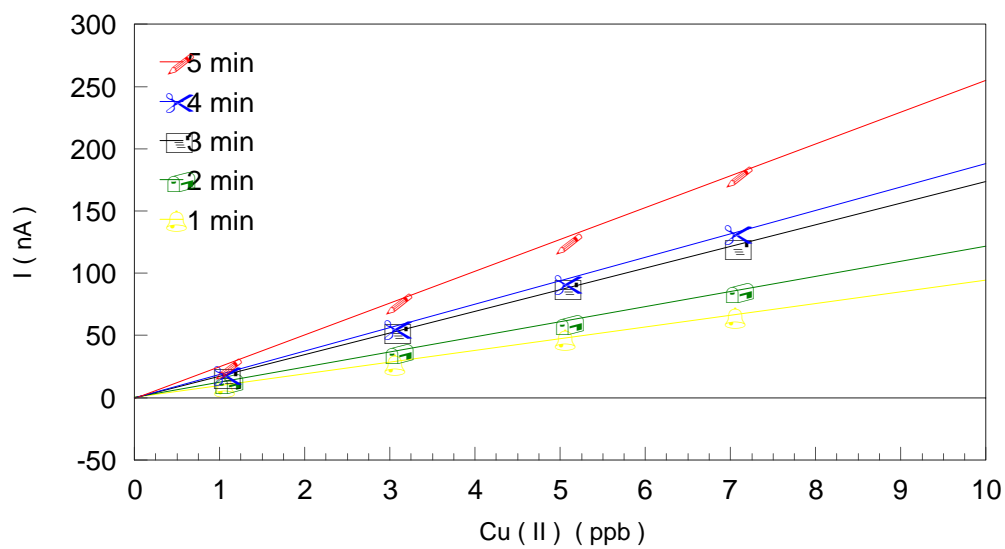


TABLA II.3.4.1.
CALIBRADOS : para 1 ppb de Cu (II) y adiciones de 2 ppb.
(SWV. Sin N₂)

I (nA)						
Tiempo acum. (minutos)	Señal (1 ppb)	1ª adición	2ª adición	3ª adición	Recup (ppb)	r
5	25.47	68.33	102.2	171.5	0.87	0.9991
	26.68	68.12	110.4	165.4	0.96	0.9974
	24.74	69.39	112.5	164.5	0.94	0.9992
	24.64	69.79	118.4	167.4	0.92	0.9998
	25.14	77.04	125.0	179.3	0.92	0.9998
4	18.86	56.49	92.14	132.6	0.92	0.9997
	23.28	70.32	116.9	160.5	0.97	0.9998
	22.25	67.24	107.3	153.0	0.97	0.9997
	21.71	60.88	97.40	145.5	0.92	0.9982
	20.50	59.07	99.46	135.8	0.99	0.9998
3	19.29	54.92	92.77	129.9	0.94	0.9999
	16.78	52.53	88.30	120.7	0.93	0.9997
	18.36	58.83	93.96	131.2	0.97	0.9996
	17.77	55.61	93.56	125.2	0.98	0.9991
	19.44	57.95	99.97	135.0	0.95	0.9994
2	12.49	34.67	56.41	78.22	1.07	0.9999
	12.68	39.85	67.40	90.22	0.96	0.9991
	11.44	33.24	56.95	79.34	0.91	0.9999
	12.64	36.76	60.34	85.70	0.95	0.9999
	13.24	42.42	70.15	95.89	0.95	0.9997
1	9.122	27.23	44.66	61.93	0.98	0.9999
	9.062	24.12	41.48	58.86	0.93	0.9995
	7.881	23.60	41.57	55.73	0.92	0.9991
	9.888	28.19	48.05	65.83	0.97	0.9998
	9.891	31.39	48.72	66.07	1.1	0.9985

GRÁFICA II.3.4.1.
RECTAS DE CALIBRADO PARA 1 ppb Cu (II).
Diferentes tiempos de acumulación.
(SWV . Sin N₂)



Los estudios paralelos a los anteriores, previo paso de nitrógeno a través de la disolución, aportaron información que ha tratado de resumirse en la Figura II.3.4.2. , Tabla II.3.4.2. y Gráfica II.3.4.2. , aplicando la misma estructura con que se operó en la etapa anterior.

FIGURA II.3.4.2.
VOLTAMPEROGRAMAS OBTENIDOS PARA 1 ppb Cu(II).
Tiempo de acumulación 5 minutos
(SWV con N₂)

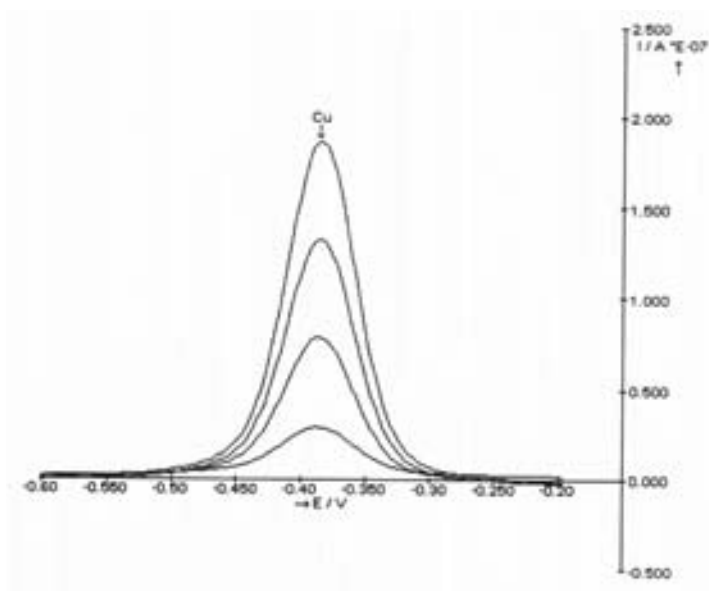


FIGURA II.3.4.2. (Continuación)
Tiempo de acumulación 4 minutos

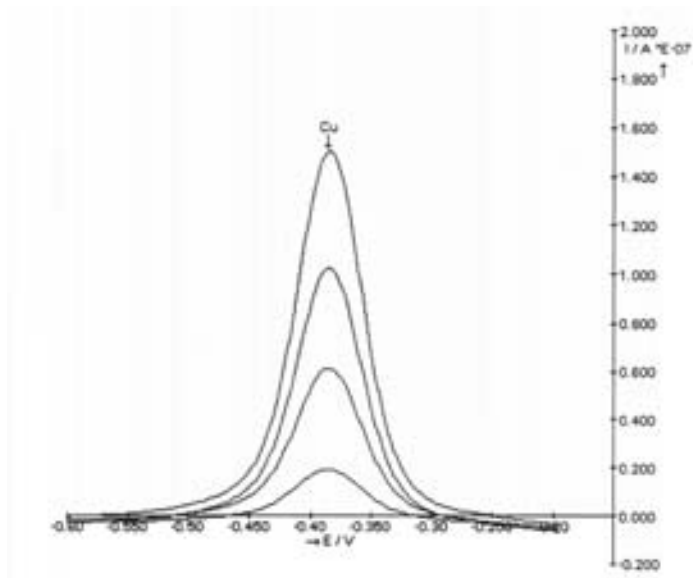


FIGURA II.3.4.2. (Continuación)
Tiempo de acumulación 3 minutos

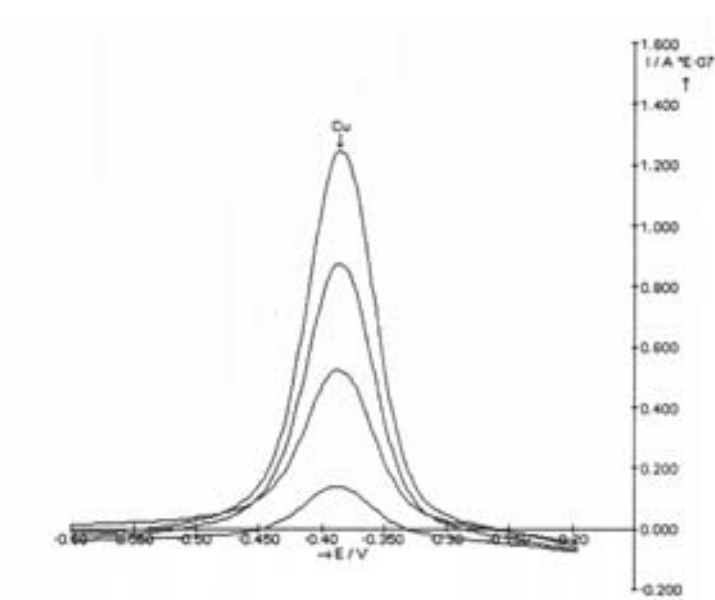


FIGURA II.3.4.2. (Continuación)
Tiempo de acumulación 2 minutos

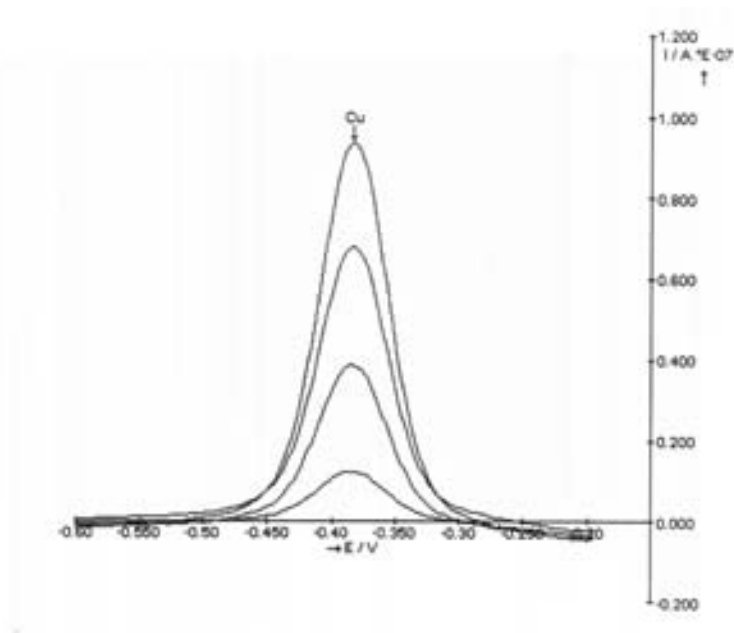


FIGURA II.3.4.2. (Continuación)
Tiempo de acumulación 1 minuto

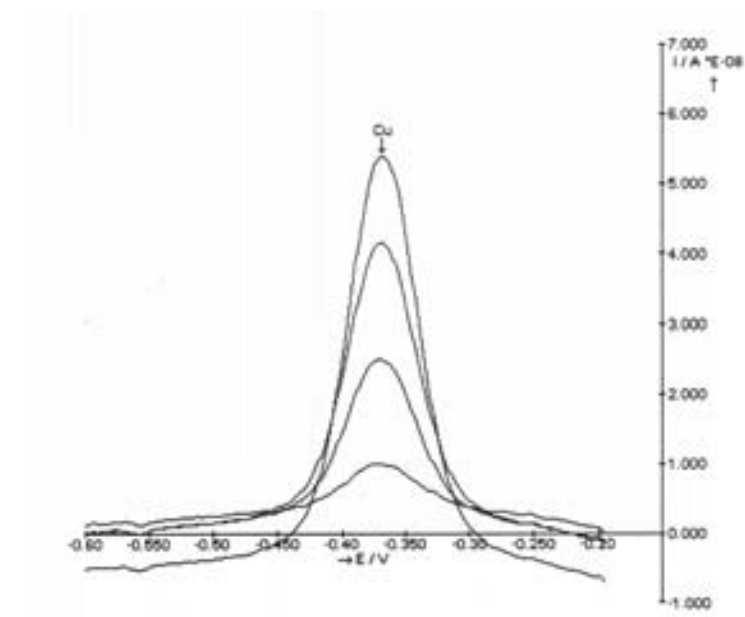


TABLA II.3.4.2.
CALIBRADOS : para 1 ppb de Cu(II) y adiciones de 2 ppb.
(SWV . Con N₂)

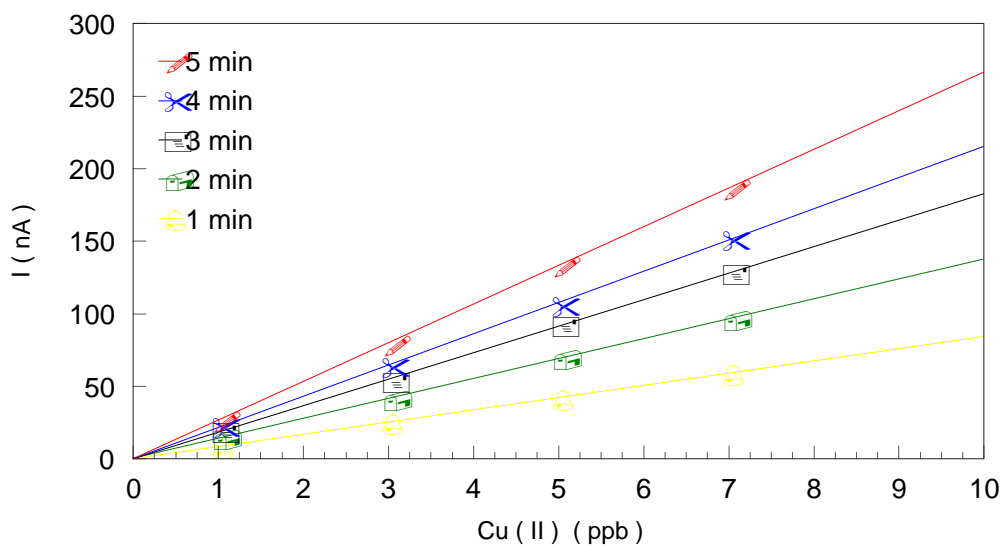
I (nA)						
Tiempo acum (minutos)	Señal (1 ppb Cu(II))	1ª adición	2ª adición	3ª adición	Recup (ppb)	r
5	26.58	79.03	132.9	184.9	0.93	0.9999
	27.01	79.60	133.7	186.7	0.93	0.9999
	27.80	81.38	135.7	190.0	0.94	0.9999
	25.96	75.72	125.6	176.9	0.94	0.9999
	29.05	85.69	143.0	200.6	0.93	0.9999
4	22.44	64.17	106.4	152.0	0.93	0.9998
	23.14	66.43	110.5	154.7	0.96	0.9999
	23.36	69.19	113.4	159.9	0.95	0.9999
	23.10	69.36	114.7	161.6	0.93	0.9999
	23.74	73.44	120.6	168.7	0.93	0.9999
3	19.35	53.50	92.21	128.2	0.94	0.9997
	18.27	53.91	88.87	126.3	0.93	0.9999
	18.35	55.66	93.38	128.5	0.94	0.9998
	18.08	54.54	91.18	127.0	0.93	0.9999
	19.03	57.72	97.48	134.6	0.93	0.9999
2	14.35	41.58	69.07	96.61	0.96	0.9999
	15.16	44.89	74.69	105.4	0.93	0.9999
	14.63	42.05	71.12	99.78	0.93	0.9999
	13.90	41.60	67.93	96.92	0.93	0.9998
	15.06	44.50	72.24	103.5	0.94	0.9997
1	9.734	27.64	44.70	64.18	0.97	0.9996
	7.919	22.10	37.14	52.44	0.95	0.9998
	7.753	22.16	35.96	51.83	0.95	0.9996
	9.281	24.99	41.39	59.31	0.97	0.9995
	8.838	25.19	41.94	59.25	0.95	0.9999

GRÁFICA II.3.4.2.

RECTAS DE CALIBRADO PARA 1 ppb Cu(II)

Diferentes tiempos de acumulación.

(SWV . Con N₂)



En general se observan los mismos fenómenos en ambas series, de manera que como principal conclusión de este estudio podría decirse que la introducción o no en el procedimiento de una etapa de purga con nitrógeno no influye significativamente en los resultados. No obstante, debe indicarse que cuando no se utiliza nitrógeno los resultados analíticos son ligeramente inferiores en calidad; así, por ejemplo, las señales de redisolución son algo más pequeñas, los coeficientes de correlación son un poco inferiores y los potenciales de pico están algo más dispersos. No obstante lo cual, desde el punto de vista práctico no se aprecia diferencia entre ambas variantes procedimentales; bien es cierto que podría tratar de eliminarse (o al menos disminuir) estas pequeñas diferencias por medio de modificaciones en el potencial de acumulación utilizado, pero no es menos cierto que los estudios efectuados con esta variable ponen de manifiesto que la disminución de calidad analítica de los resultados cuando E_{ac} es distinto de -1 voltio es superior a la subida de calidad que se pretende, por lo que no es aconsejable esta estrategia.

Al objeto de disponer de una perspectiva más completa de las modalidades voltamperométricas de posible aplicación a muestras reales, se han repetido las mismas series aplicando DPV. En la Tabla II.3.4.3., se han resumido todos los resultados, que se comentan por sí mismos.

TABLA II.3.4.3.
CUADRO COMPARATIVO . DIFERENTES TÉCNICAS.

Tac (min)	DPV (con N ₂)	SWV (con N ₂)	SWV (sin N ₂)
5	2.362	26.58	25.47
	3.046	27.01	26.68
	3.000	27.80	24.74
	2.996	25.96	24.64
	2.767	29.05	25.14
4	2.449	22.44	18.86
	2.447	23.14	23.28
	2.480	23.36	22.25
	2.521	23.10	21.71
	2.513	23.74	23.66
3	1.928	19.35	19.29
	1.991	18.27	16.78
	1.887	18.35	18.36
	1.951	18.08	17.77
	1.947	19.03	19.44
2	1.452	14.35	12.49
	1.501	15.16	12.68
	1.385	14.63	11.44
	1.441	13.90	12.64
	1.423	15.06	13.24
1	0.7352	9.734	9.122
	0.7325	7.919	9.062
	0.7578	7.753	7.881
	0.7348	9.281	9.888
	0.7671	8.838	9.891

II.3.5.- Calibrados para diferentes concentraciones de cobre.

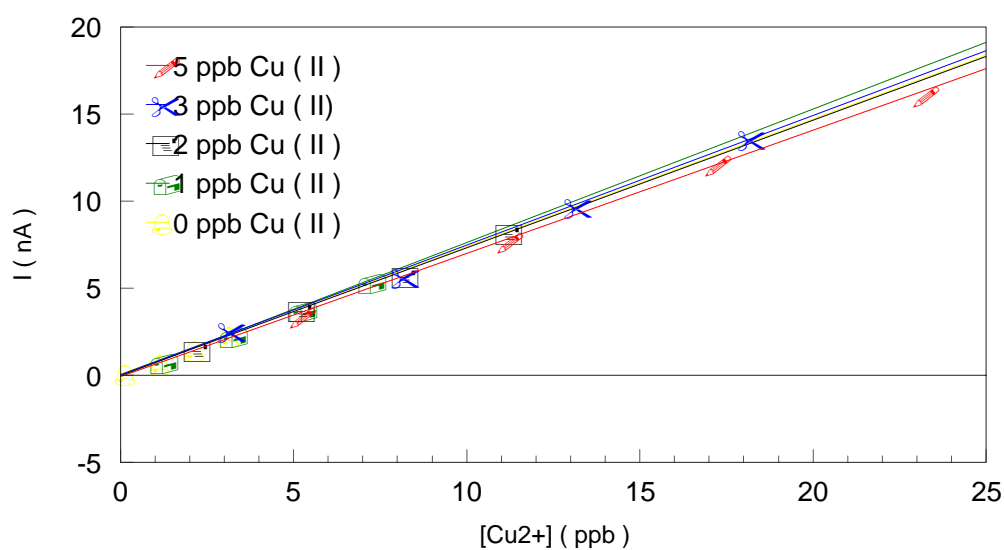
El último apartado de este capítulo ha ido dedicado al estudio del comportamiento de las diferentes técnicas en los posibles calibrados de cobre que posteriormente, con muestras reales, harán falta ; sólo el perfecto conocimiento de este apartado permitirá enjuiciar y justificar los fenómenos observados en estudios semejantes pero con fluidos biológicos. Se ha operado en las condiciones instrumentales y operacionales que, tras los estudios precedentes , parecen óptimas. También se ha procurado cubrir sobradamente el intervalo de concentraciones de cobre con el que presumiblemente se trabajará más adelante , tanto por lo que se refiere a cobre inicial como a las sucesivas adiciones. No se ha introducido en este estudio la variable tiempo de acumulación ; en primer lugar porque ya se conoce el alcance de sus efectos beneficiosos de cara a la sensibilidad del método ; y en segundo lugar porque ya se han comentado las facetas negativas que presenta, especialmente si se considera que no se conocen concretamente sus efectos en matrices reales ; por todo ello se ha fijado el tiempo de acumulación en 1 minuto. Finalmente, habiéndose confirmado en estudios anteriores que la SWV es más sensible que la DPV (al menos en las presentes condiciones de trabajo) , en el presente apartado se ha llegado a concentraciones más bajas cuando se aplica SWV. Por lo demás , el resto de condiciones , parámetros instrumentales y procedimiento general son los habituales, ya indicados anteriormente.

En la Tabla II.3.5.1. y en la Gráfica II.3.5.1. se han resumido los resultados obtenidos por DPV. Con estos datos se confirma que el procedimiento seleccionado y la técnica aplicada permiten resultados analíticos de elevada calidad al menos hasta concentraciones de 1 ppb de cobre.

TABLA II.3.5.1.
CALIBRADOS para diferentes concentraciones de Cu(II)
(DPV)

Cu (II) puesto (ppb)	Cu (II) adiciones (ppb)	Encontrado (ppb)	r	Error %
20	50	21.0	0.9995	5
10	25	9.89	0.9992	-1.1
5	6	4.84	0.9998	-3.2
3	5	3.45	0.9983	1.49
2	3	2.00	0.9991	-0.2
1	2	1.00	0.9999	0.0
0	1	0.05	0.9996	-

GRÁFICA II.3.5.1.
RECTAS DE CALIBRADO para diferentes concentraciones de Cu(II)
(Ver Tabla II.3.5.1)



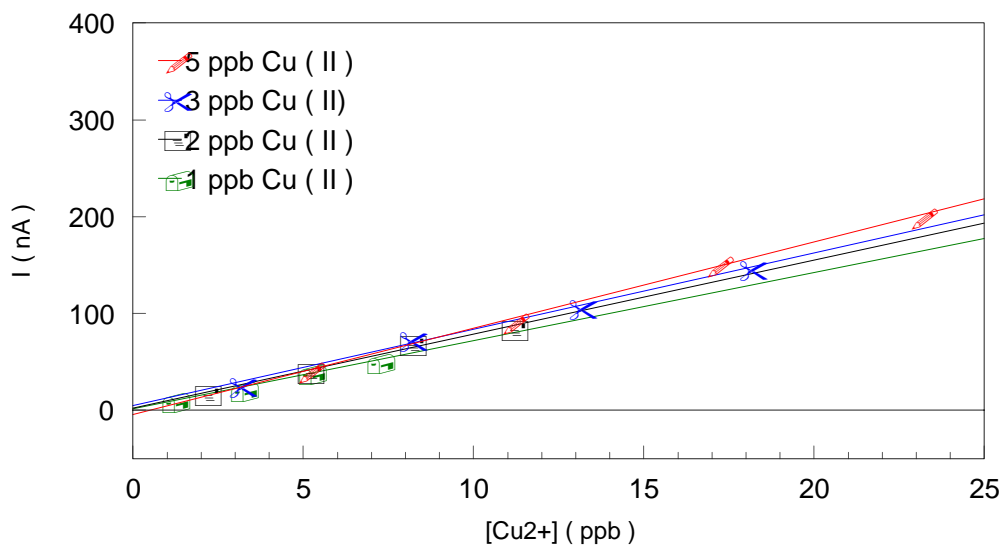
En la Tabla II.3.5.2. y en la Gráfica II.3.5.2. se recogen los correspondientes resultados obtenidos por SWV, incorporando al procedimiento una etapa de desaireación. A partir de estos datos puede corroborarse que el procedimiento y técnica aplicados son válidos para determinar cobre al menos hasta concentraciones del orden de 0.2 ppb.

TABLA II.3.5.2.

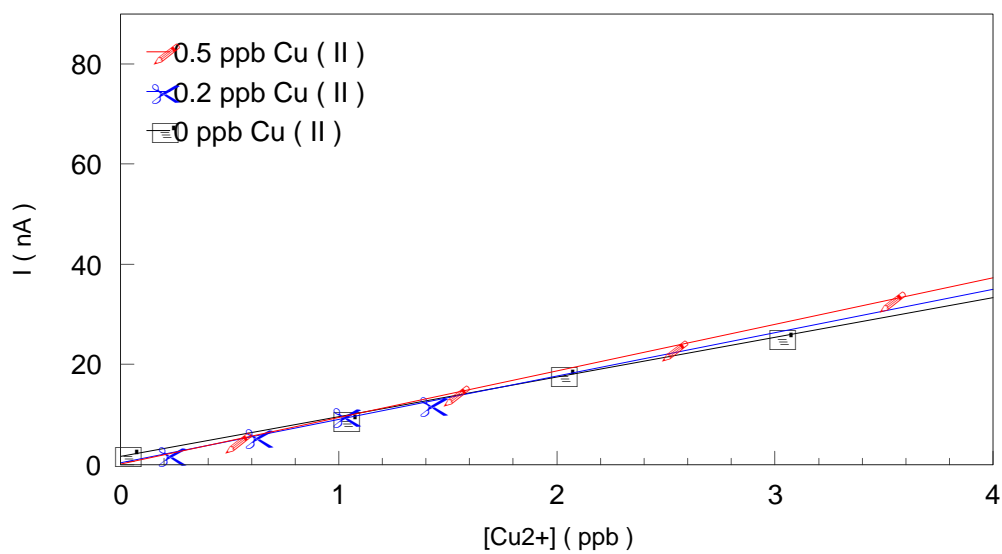
**CALIBRADOS para diferentes concentraciones de Cu (II)
(SWV . Con N₂)**

Cu (II) puesto (ppb)	Cu (II) adiciones (ppb)	Encontrado (ppb)	r	Error %
5	6	4.87	0.9987	-2.6
3	5	2.79	0.9994	-7.0
2	3	1.86	0.9995	-7.0
1	2	0.96	0.9985	-4.0
0.5	1	0.54	0.9987	+8.0
0.2	0.4	0.19	0.9997	-5.0
0	1	0.10	0.9997	-

GRÁFICA II.3.5.2.
RECTAS DE CALIBRADO para diferentes concentraciones de Cu(II)
(Ver Tabla II.3.5.2)



GRÁFICA II.3.5.2. (Continuación)



Por último en la Tabla II.3.5.3. y en la Gráfica II.3.5.3. se recogen los resultados obtenidos en un estudio similar al anterior, pero en el que se ha suprimido la etapa de desaireación. Las conclusiones particulares de este estudio coinciden en su totalidad con las enunciadas en los dos estudios precedentes.

Como comentario de conjunto, puede decirse que las tres variantes de trabajo seleccionadas son válidas para ser aplicadas a las muestras reales, objeto de atención en la segunda parte de esta Memoria. Las recuperaciones de cobre son parecidas en los tres casos y en general superiores al 95 % . Los coeficientes de regresión son elevados (la media de todos los valores de r es 0.9996). Las sensibilidades son igualmente elevadas y aptas para aplicar cualquiera de las técnicas en los trabajos programados más adelante, incluso la DPV; de manera que acudiendo a tiempos de acumulación entre 1 y 5 minutos , la determinación de concentraciones del orden de 0.1 ppb de cobre, no ofrece dificultad alguna.

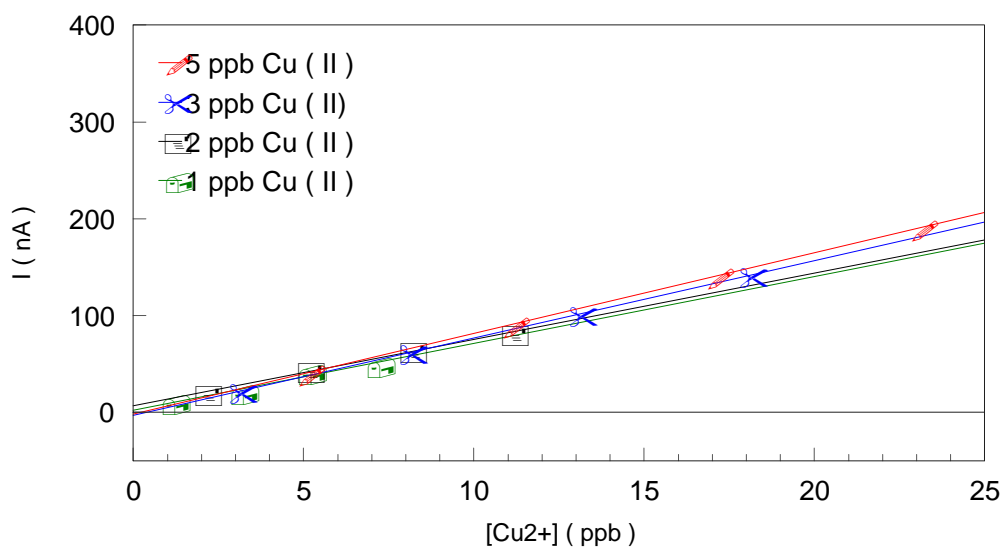
TABLA II.3.5.3.

**CALIBRADOS para diferentes concentraciones de Cu (II)
(SWV. Sin N₂)**

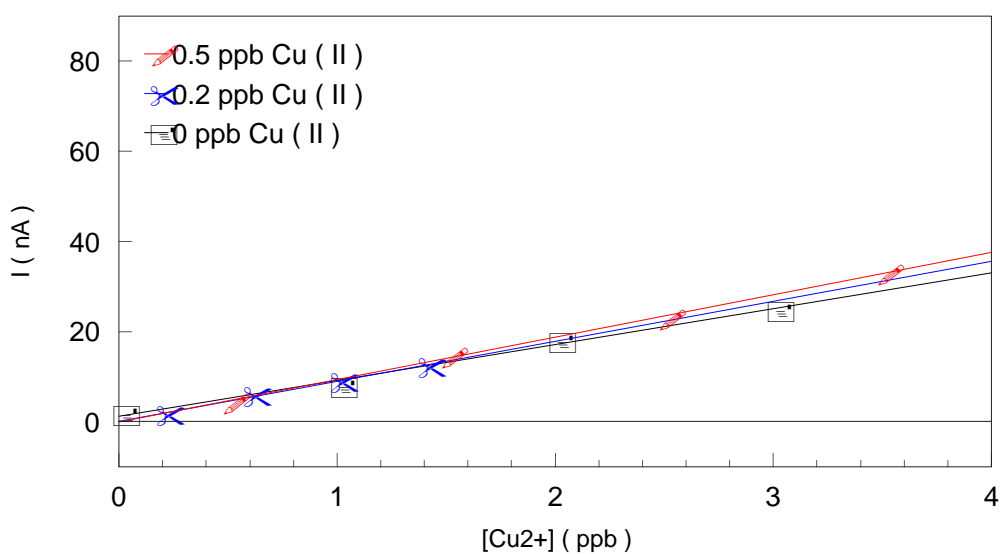
Cu (II) puesto (ppb)	Cu (II) adiciones (ppb)	Encontrado (ppb)	r	Error %
5	6	4.98	0.9994	-0.4
3	5	2.94	0.9989	-2.0
2	3	2.04	0.9992	+2.0
1	2	0.96	0.9993	-4.0
0.5	1	0.49	0.9999	-2.0
0.2	0.4	0.20	0.9998	0.0
0	1	0.08	0.9991	-

GRÁFICA II.3.5.3.

RECTAS DE CALIBRADO para diferentes concentraciones de Cu(II)
(Ver Tabla II.3.5.3)



GRÁFICA II.3.5.3. (Continuación)



II.4.- ESTUDIOS CON DERIVADOS DE LA ETILENDIAMINA.

En el transcurso de este apartado se han realizado estudios con las diferentes variables que pueden influir en la calidad analítica de los resultados. En todos ellos se han observado comportamientos que podrían denominarse normales o esperados, que en términos generales y en síntesis consisten en el aumento de la señal y su desplazamiento hacia valores menos anódicos cuando a la disolución ácida se le añade la cantidad adecuada de modificador. De manera paralela se han llevado a cabo los estudios por las modalidades voltamperométricas de redisolución DPV y SWV.

Las disoluciones contenían por norma general, 5 ml de H₂O, 10 µl de HCl 1:10 y, según el caso, 300 µl de EN 0.15 M , 300 µl de DENTRI 0.15 M o 400 µl de N- MET- EN 0.15 M (experimentalmente, a través del seguimiento del pH, de los potenciales de pico y del desarrollo de las señales, se ha comprobado que la cantidad idónea del último de los reactivos era algo superior al resto, sin que se sepa concretamente el motivo) . En todos los casos , las adiciones de cobre han sido alícuotas de 10 µl de Cu²⁺ de 5 ppm, lo que equivale a incrementos de concentración próximos a 9.26 ppb por cada adición. No obstante, por simplicidad y dada su poca relevancia, en tablas y gráficos se ha operado suponiendo incrementos de 10 ppb.

A partir de todos los estudios efectuados, se ha construido un resumen de aquéllos que se han estimado más significativos y que se incluyen a continuación.

II.4.1.- Resultados con la modalidad DPV

Los parámetros instrumentales comúnmente utilizados fueron :

Eacondic.= -0.1 V

Edep.= -1.0 V

Tequilibrio = 5s

Tacondic = 15 s

Tdep = 1 min

T purga = 5 s

El registro se realizó a través de un barrido de potenciales desde -0.6 V hasta + 0.1 V

Todos los registros de las curvas de redisolución aparecen bien conformados, como se muestra en el ejemplo de la Figura II.4.1.1. En la Tabla II.4.1.1. y en las Gráficas II.4.1.a. , II.4.1.b. y II.4.I.c. se han resumido los resultados más destacados.

FIGURA II.4.1.1 i:EN, ii:DENTRI

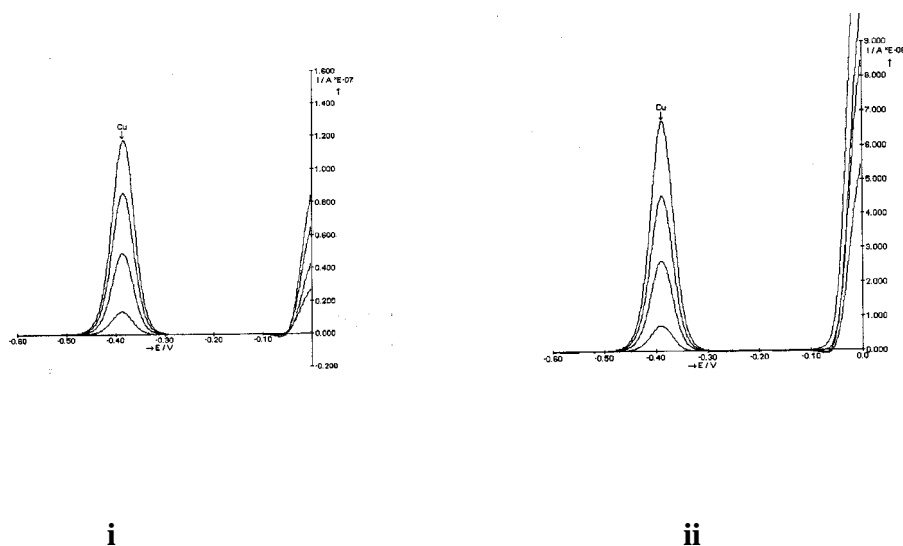


TABLA II.4.1.1.
CALIBRADOS PARA DIFERENTES MODIFICADORES.
DPV

a		b		c		
400 µl N-MET-EN		300 µl EN		300 µl DENTRI		
[Cu ²⁺]ppb	E (mV)	I (nA)	E (mV)	I (nA)	E (mV)	I (nA)
0	-352	9.32	-	-	-	-
10	-324	38.98	-359	34.18	-394	31.46
20	-324	73.41	-369	61.91	-394	52.62
30	-324	110.7	-364	92.02	-389	82.78
40	-324	147.2	-364	130.2	-389	114.0
50	-319	181.8	-369	162.7	-389	139.3

Factor de conversión de concentraciones de Cu²⁺ (Suponiendo V = 5.4ml)

$$1.0 \mu\text{l} \times 5 \text{ ppm} = 5.4 \text{ ml} \times C \text{ ppb} \Rightarrow \Rightarrow 5.0 / 5.4 = 0.926 .$$

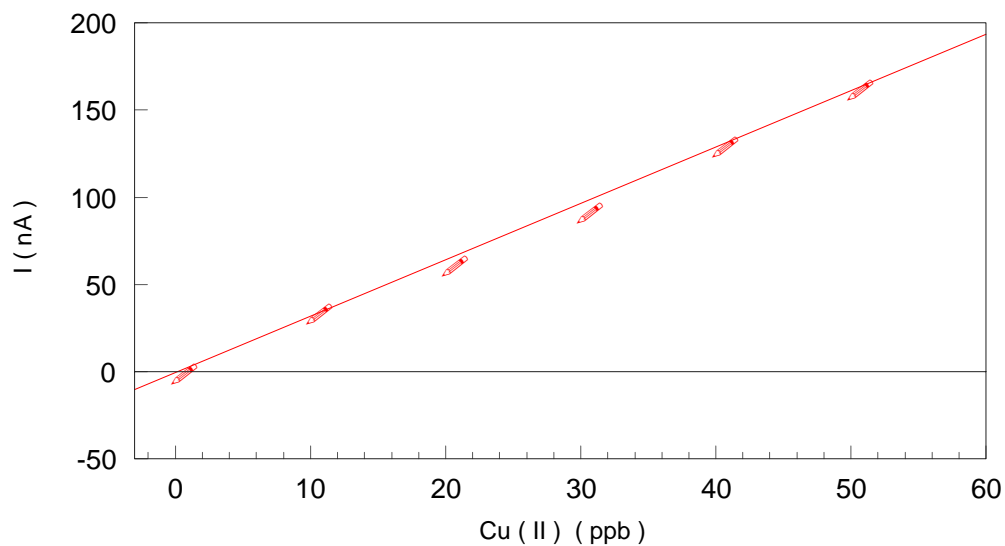
a) N- MET- EN : $I = 6.115 + 3.778 C ; r = 0.9994$

b) EN : $I = -0.665 + 3.49 C ; r = 0.9990$

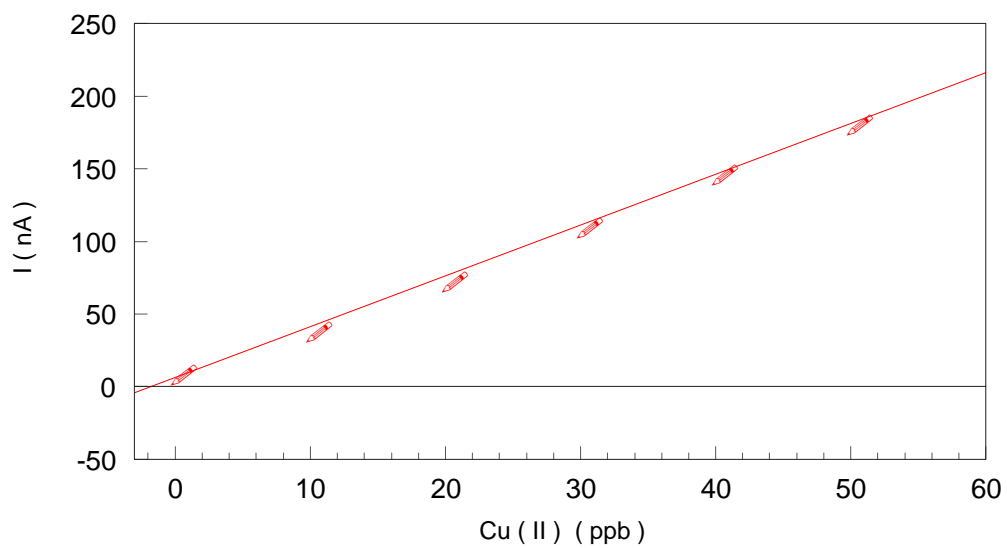
c) DENTRI : $I = 0.435 + 3.01 C ; r = 0.9978$

De su observación a primera vista, se deduce en todos los casos y para cada reactivo constancia en los potenciales y aceptable linealidad en las intensidades.

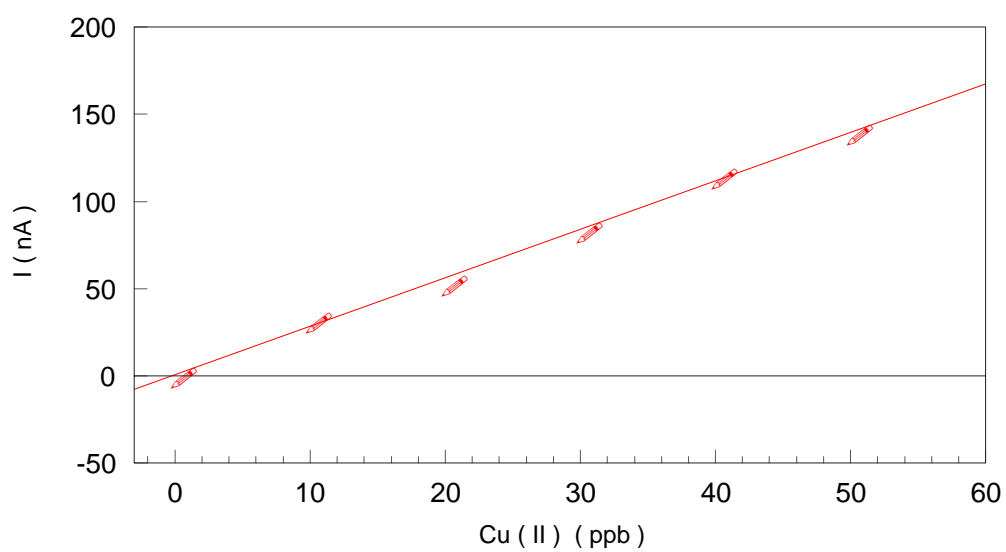
GRÁFICA II.4.1.a.
(Ver Tabla II.4.1.1)



GRÁFICA II.4.1.b.
(Ver Tabla II.4.1.1)



GRÁFICA II.4.1.c.
(Ver Tabla II.4.1.1)



II.4.2.- Resultados con la modalidad SWV

Los parámetros instrumentales comúnmente utilizados fueron :

Eacondic.= -0.1 V

Edep.= -1.0 V

Tequilibrio = 5s

Tacondic = 15 s

Tdep = 1 min

T purga = 5 s

Frecuencia = 50 Hz

De manera similar a lo ocurrido en DPV, los registros obtenidos con SWV están bien desarrollados, como se pone de manifiesto en el ejemplo de la Figura II.4.2.1. En la Tabla II.4.2.1 y en las Gráficas II.4.2.a. , II.4.2.b. y II.4.2.c. se han resumido los resultados más destacados.

FIGURA II.4.2.1 i:EN, ii:N-MET-EN

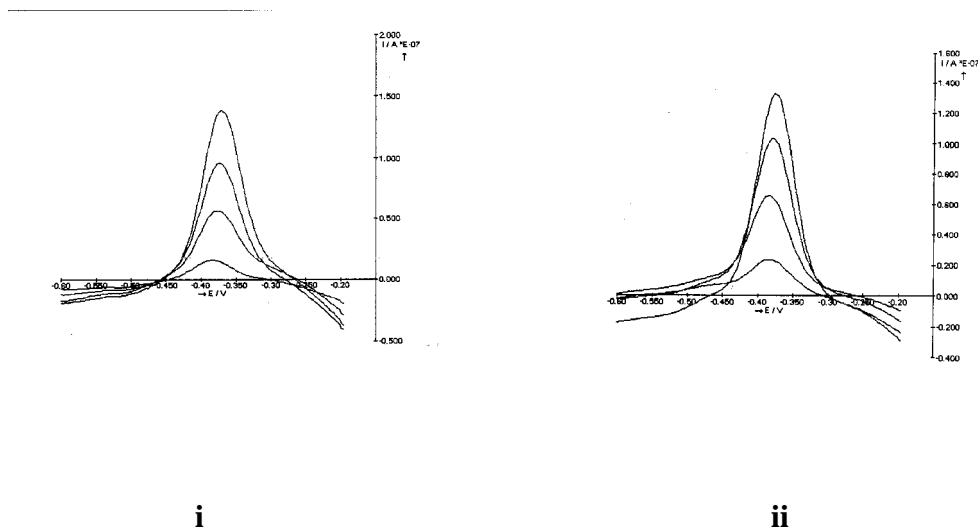


TABLA II.4.2.1.
CALIBRADOS PARA DIFERENTES MODIFICADORES
SWV

		a		b		c	
		400 μl N-MET-EN		300 μl EN		300 μl DENTRI	
[Cu²⁺]ppb	E (mV)	I (nA)	E (mV)	I (nA)	E (mV)	I (nA)	
0	-	-	-	-	-	-	
10	-314	190.2	-334	145.7	-369	136.1	
20	-324	449.2	-329	291.1	-374	294.9	
30	-324	686.2	-334	500.7	-374	426.2	
40	-324	938.7	-329	689.9	-374	571.8	
50	-324	1256	-334	833.4	-374	751.6	

Factor de conversión de concentraciones de Cu²⁺ (Suponiendo V = 5.4ml)

$$1.0 \mu\text{l} \times 5 \text{ ppm} = 5.4 \text{ ml} \times C \text{ ppb} \Rightarrow \Rightarrow 5.0 / 5.4 = 0.926 .$$

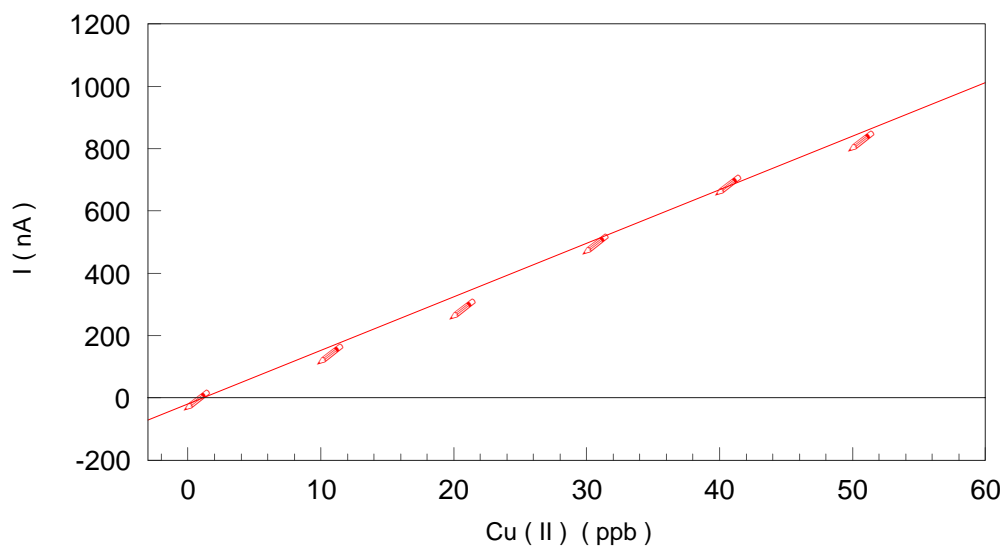
a) N- MET- EN : $I = -39.2 + 27.0 C ; r = 0.9976$

b) EN : $I = -19.1 + 18.5 C ; r = 0.9980$

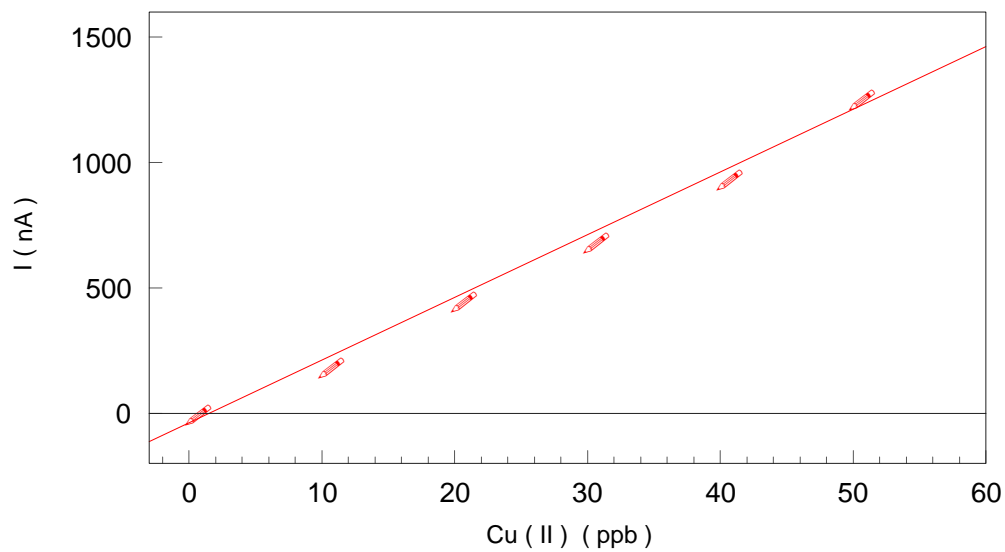
c) DENTRI : $I = -7.74 + 16.0 C ; r = 0.9990$

De forma semejante a lo comentado al usar la modalidad DPV, en este caso se observa práctica constancia en los potenciales de pico para cada reactivo y una variación considerablemente lineal entre concentraciones de cobre e intensidades de pico.

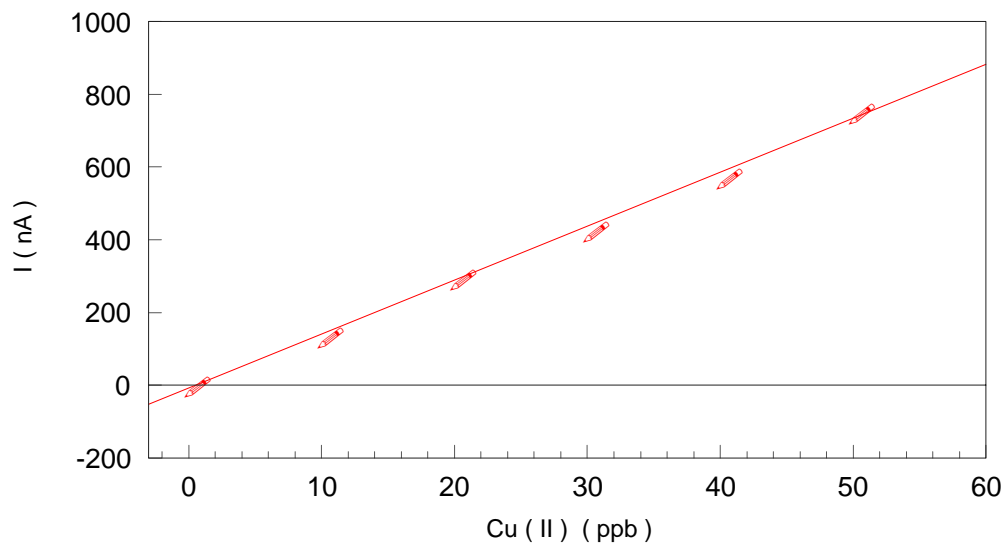
GRÁFICA II.4.2.a.
(Ver Tabla II.4.2.1)



GRÁFICA II.4.2.b.
(Ver Tabla II.4.2.1)



GRÁFICA II.4.2.c.
(Ver Tabla II.4.2.1)



II.4.3.- Estudio conjunto por DPV y SWV

Los resultados obtenidos en los dos subapartados precedentes, ponen de manifiesto fenómenos bastante similares , tanto si se comparan los reactivos entre sí, como si se pone atención en las dos técnicas utilizadas. Por ello y para facilitar algo más la discusión y obtención de conclusiones, en la Tabla II.4.3.1. se ha concentrado toda la información que podría calificarse de útil para estos efectos.

TABLA II.4.3.1.
CAPACIDADES ANALÍTICAS DE LAS TÉCNICAS DPV y SWV

		N-MET-EN	EN	DENTRI	
DPP	-E (mV)	320	365	392	
	a (nA)	6.1	-0.67	0.44	
	b (nA / ppb)	3.8	3.5	3.0	
	r	0.9994	0.9990	0.9978	
SWV	-E (mV)	322	332	374	
	a (nA)	-39.2	-19.1	-7.7	
	b (nA / ppb)	27	19	16	
	r	0.9976	0.9980	0.9990	
		- \bar{E}	321	348	383
		r	0.9985	0.9985	0.9984

Siguiendo la variante DPV y por lo que respecta a los potenciales de las señales de redisolución puede decirse que , en general, los tres reactivos complejan fuertemente el Cu^{2+} , toda vez que en los tres casos hay un importante desplazamiento hacia valores más negativos cuando se añade el reactivo. Pero en todo caso se va a mayor estabilización de los citados complejos según la secuencia N - MET- EN \rightarrow EN \rightarrow DENTRI ; puesto que en este sentido son mayores los desplazamientos del potencial.

Por lo que se puede deducir de las intensidades , hay que indicar que el aumento de las señales tras la adición de cualquiera de los tres reactivos obliga a concluir, en primer lugar que el proceso de redisolución involucra 2 electrones y que es desde el punto de vista electroquímico altamente reversible. Si se diferencia entre los tres reactivos, parece obvio que la sensibilidad disminuye según el orden indicado anteriormente ; es decir, que las mayores señales las facilita la N- MET - EN ; si se aplica este fenómeno a las consideraciones teóricas ya expuestas hay que decir que el sistema $\text{Cu}^{2+} / \text{Cu}^0$ es electroquímicamente reversible en los tres medios, pero lo es algo más en N- MET- EN .

En definitiva y desde un punto de vista analítico-práctico puede decirse que atendiendo a la sensibilidad debe emplearse N - MET - EN ; pero por lo que representa el modificador a efectos de liberación del cobre de la M.O. que forma parte de la muestra real, se hace algo más recomendable el uso de DENTRI. Bajo ambos criterios, la EN ocupa lugares intermedios, las diferencias entre los reactivos no son especialmente importantes y los coeficientes de regresión avalan calidades del método significativamente elevadas.

Cuando se observan los datos correspondientes a SWV, los comentarios y conclusiones que de ellos se derivan son rigurosamente los mismos que los enumerados para DPV. Por lo tanto, sobra su repetición , pasando a realizar un estudio comparado entre ambas técnicas.

La observación de potenciales y calidad analítico-estadística de los resultados (veáanse valores de r) permite concluir que en estos aspectos ambas técnicas son muy parecidas. Pero no ocurre lo mismo al considerar el parámetro “sensibilidad” . Sabido es que DPV y SWV son técnicas que , en general, aportan sensibilidades parecidas y que, según los casos, unas veces es más sensible la primera de dichas técnicas y otras veces lo es la segunda . Y sabido es también

que estas normalmente limitadas diferencias suelen venir condicionadas por el grado de reversibilidad electroquímica del proceso electródico, dado que la variante SWV se ve ligeramente más afectada que la DPV por esta circunstancia. Según los datos experimentales de que se dispone, puede confirmarse que estando todos los procesos (en todos los medios) dotados de un elevado índice de reversibilidad (como se deduce de las altas sensibilidades), el medio N-MET-EN es el que presenta el índice de reversibilidad mayor (como se deduce de que la sensibilidad se multiplique por 7.1 al pasar de DPV a SWV, mientras que en el caso de la EN dicho factor sea sólo 5.4 y 5.3 para la DENTRI.) .

De otra parte y como ya se ha comentado con anterioridad, operar con SWV significa poder prescindir de la etapa preliminar de desaireación de las disoluciones , lo cual significa y abrevia sustancialmente los análisis , ya de por sí más rápidos con SWV. Por lo tanto y según estas últimas consideraciones de tipo práctico, parece más aconsejable la variante SWV que la DPV.

De todo lo anterior puede concluirse que, mientras las exigencias del análisis no decidan otra alternativa o los resultados de los estudios con muestras reales no indiquen otra cosa, considerando también el costo de los reactivos estudiados, su manejabilidad y el conocimiento que se tiene de los mismos, parece más recomendable el empleo de EN.

CAPÍTULO III.

***ESTUDIOS POTENCIOMÉTRICOS
(CON PRECONCENTRACIÓN) EN MEDIOS MODIFICADOS
CON ETILENDIAMINA Y DERIVADOS***

III.1.- INTRODUCCIÓN

Como es fácilmente deducible de los objetivos iniciales de esta Memoria, ésta tiene un fuerte contenido de metodología analítica. En consonancia con lo anterior, la principal atención se ha dirigido al estudio de las condiciones experimentales de trabajo, cuya optimización haga posible resultados de mayor calidad analítica : límite de detección, reproducibilidad y especificidad del método. En este apartado, la técnica seleccionada ha sido la potenciometría de redisolución.

La mejora de las condiciones de trabajo en esta técnica es una actividad bastante compleja, toda vez que influyen en ella múltiples factores dependientes entre sí. En primera instancia, se han llevado a cabo estudios dirigidos a conseguir films de Hg lo máximo de estables y reproducibles, dado que estas características son las más conflictivas de su empleo y donde menos conocimientos físico-químicos se poseen. Fruto de estos estudios, inspirados en otros realizados anteriormente por los directores del presente trabajo (2) , se ha diseñado un medio de operación (pH, composición de la disolución y concentración de Hg^{2+}), unas condiciones de acondicionamiento de la superficie de carbono vitrificado previa a la formación del film, y una programación de potenciales y tiempos de electrodeposición, que ha dado lugar a electrodos de Hg con grados de estabilidad y reproducibilidad superiores a los conocidos.

Por lo que respecta a los aspectos concretos estudiados en este apartado, podrían centrarse en los tres siguientes : la modificación del medio a través de la adición de reactivos que permitan (al menos potencialmente) ventajas en los análisis “in situ” e “in vivo” , como es la posibilidad de operar en presencia de oxígeno (al aire), en tiempos de análisis mínimos, o la medida de señales especialmente pequeñas, etc ; y el diseño de estrategias encaminadas a eliminar o minimizar la incompatibilidad perenne entre la materia orgánica siempre presente en fluidos vivos y el electrodo de mercurio, que hasta la fecha es el más idóneo para este tipo de estudios electroquímicos.

III. 2.- PARTE EXPERIMENTAL

III.2.1.- Reactivos

Los reactivos utilizados en este caso para determinar cobre, han sido en definitiva los mismos que los usados en el capítulo anterior ; en primer lugar por los motivos apuntados entonces, tanto de tipo químico como electroquímico, y, en segundo, porque así se facilita la comparación de los resultados obtenidos por las diferentes técnicas electroanalíticas empleadas.

Es decir, los reactivos han sido los indicados en el apartado II.2.1.

* ETILENDIAMINA : $C_2H_8N_2$: 1,2-DIAMINOETANO.

* N-METIL-ETILENDIAMINA : $C_3H_{10}N_2$: N-METIL-1,2-DIAMINOETANO

* DIETLIENETRIAMINA : $C_4H_{13}N_3$: 2,2'-IMINOBIS (ETILAMINA)

Además se empleó disolución plating 8 g / l de Hg^{2+} preparada disolviendo la cantidad necesaria de $HgCl_2$ (suprapuro Merk) en 1.3 M de HCl. (271.50 g/mol)

III.2.2.- Aparatos

-- Sistema Trace Lab (Radiometer) que contiene celda con tres electrodos : *electrodo de trabajo Glassy carbon* (área de la superficie 7.068 mm^2) , *electrodo de referencia de Ag/AgCl (KCl sat)* y *electrodo auxiliar de platino*. A su vez incluye agitador mecánico de hélice. Opera por conexión a un PC equipado con el TAP 2 , Trace Talk Method Builder y Commander Program (Radiometer) , que proporciona el desarrollo completo de los procedimientos analíticos incluyendo control de potenciales de electrólisis y corrientes aplicadas, registro de potenciales de stripping a un tiempo real de velocidad de 30 KHz (es decir, mide el potencial 30.000 veces / segundo, lo que permite medir a nivel de trazas, a diferencia de lo que ocurre en las valoraciones potenciométricas clásicas) , manipulación de curvas registradas y tratamiento estadístico de datos. Todos los potenciales que aparecen en esta Memoria van referidos al potencial del electrodo de referencia indicado.

III.2.3.- Procedimiento

Para la realización de estas medidas y los estudios de los parámetros que se investigaron, se utilizó una celda para depositar la película de mercurio sobre el electrodo de glassy carbon: es decir, se preparó en primer lugar el electrodo de trabajo. En una celda se añadieron 10 ml H₂O y 1 ml de solución plating, agitando a STIR 5 (rpm). El electrodo de trabajo fue sometido entonces a diferentes potenciales y tiempos según la siguiente programación :

- a) 1 minuto a -0.3 V
- b) 1 minuto a -0.4 V
- c) 1 minuto a -0.5 V
- d) 1 minuto a -0.6 V
- e) 2 minutos a -0.8 V
- f) 5 minutos a -1.0 V

Si todo transcurre correctamente se observa una superficie homogénea sobre el glassy-carbon .

Una vez seguida la secuencia establecida y formada la película de mercurio, el conjunto de electrodos se introdujo en una celda con una disolución blanco conteniendo una determinada cantidad de agua (previamente tratada mili Q) y de disolución clorhídrica de Hg²⁺ de 8000 mg / l . Este Hg²⁺ juega un doble papel ; de una parte, actúa como agente oxidante en la etapa de redisolución y, de otra, se utiliza para mantener en buenas condiciones la película de mercurio ; la cantidad de disolución madre empleada varía según los casos.

Se depositó a E = -1.2 V con un STIR 5 durante un tiempo determinado, y luego 30 segundos de reposo a Stir 0, realizándose posteriormente la valoración (ó redisolución) . El acondicionamiento del electrodo se realizó a -0.9 V durante 10 segundos con un STIR 5. Sobre esta disolución se añadió cobre, en diferentes concentraciones según los casos para, posteriormente , conseguir señal constante con la adición de EN 0.15 M o del reactivo que se

Capítulo III. Estudios potenciométricos con preconcentración. EN y derivados.

esté estudiando . Tras todo lo cual, y una vez comprobado que la señal fue reproducible, se realizaron adiciones estándar de Cu^{2+} y se cuantificó la concentración de cobre, tanto en los estudios previos en medio acuoso como en el LCR (capítulo IV).

Las condiciones en que se realizaron los análisis fueron diferentes, según los parámetros estudiados en cada caso y los objetivos perseguidos. Se especificarán, pues, en cada apartado.

Con el fin de obtener las condiciones óptimas para la realización de los análisis, se han ido modificando las variables que pueden afectar a la señal analítica, y que se van a ir estudiando en la Parte Experimental.

III.3.- ESTUDIOS CON ETILENDIAMINA . (RESULTADOS , DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES) .

III.3.1.- Estudios en medio Etilendiamina.

III.3.1.1.- Ensayos previos

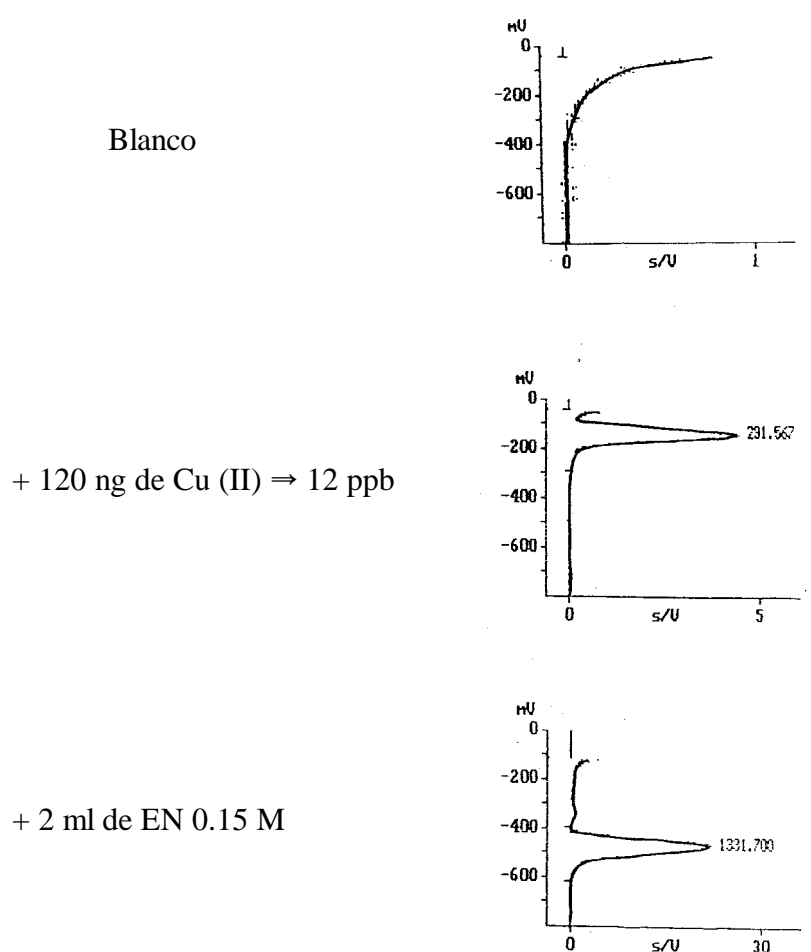
Los estudios voltamperométricos encontrados en la bibliografía y contrastados en el capítulo II dan cuenta de cómo la adición de etilendiamina (EN) al medio provoca un proceso electroquímico más reversible y que condiciona la aparición de señales de redisolución de mayor magnitud y mejor calidad. Esto hace suponer que operando con la técnica potenciométrica también debe mejorarse la señal de redisolución. Los primeros ensayos efectuados consistieron en constatar cómo las señales potenciométricas de redisolución del cobre en medio ácido (HCl) alcanzan desarrollos considerablemente mayores cuando se añade a la disolución la suficiente cantidad de EN como para neutralizar la acidez de la disolución y para que quede el exceso de EN necesario para complejar todo el cobre presente. En concreto, las condiciones experimentales fueron :

- * Blanco : 8 ml de H₂O + 100 μ l de Hg²⁺ (8000 mg/l)
- * E dep = -1200 mV
- * T ac = 1 minuto
- * T rep = 30 segundos
- * I = 1 μ A
- * Barrido de potenciales : -1300 a 0.0 mV en medio ácido
-1300 a -200 mV en medio EN

Capítulo III. Estudios potenciométricos con preconcentración. EN y derivados.

Las representaciones proporcionadas por el aparato se muestran en la Figura III.3.1.1.1. Se observa que, en coherencia con lo esperado, las señales alcanzan una calidad analítica bastante superior a la conseguida en medio ácido.

Figura III.3.1.1.1 : Representaciones obtenidas

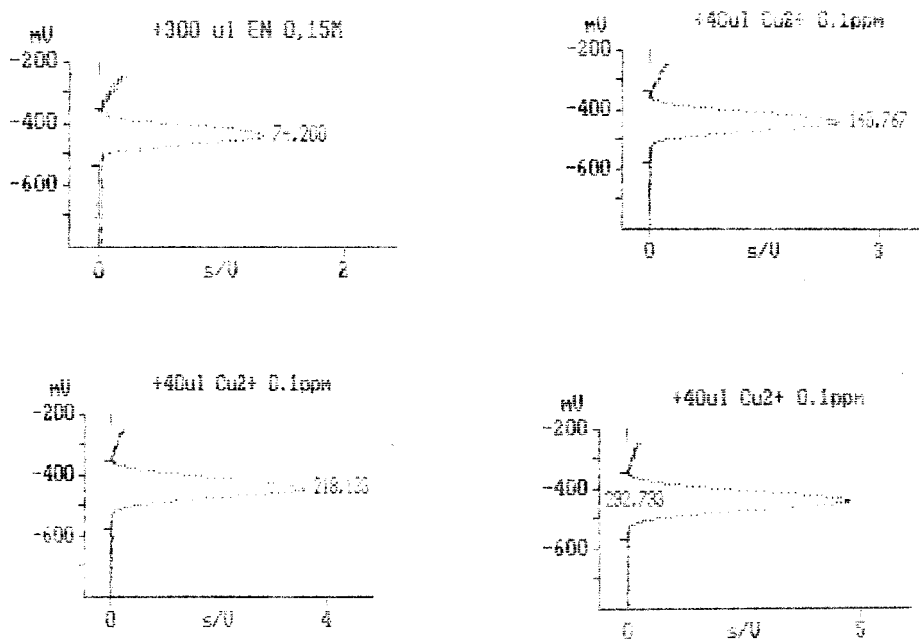


Capítulo III. Estudios potenciométricos con preconcentración. EN y derivados.

En principio se pensó en rebajar las concentraciones de cobre empleadas al objeto de evaluar el límite de detección del método, pero se desistió de ello bajo la base de que el grado de sensibilidad encontrado y la función ejercida por la EN eran más que suficientes para continuar estudios dirigidos hacia los objetivos marcados en esta Memoria. A título de ejemplo, en la Figura III.3.1.1.2. se presentan las gráficas proporcionadas por el aparato cuando se opera en las siguientes condiciones :

- * Blanco : 8 ml de H₂O + 100 μ l de Hg²⁺ (8000 mg/l)
- * EN añadida : 300 μ l de EN 0.15 M
- * E dep = -1200 mV
- * T ac = 5 minutos
- * T rep = 30 segundos
- * I = 1 μ A
- * Cantidad de Cu por adición : 4 ng (\approx 0.4 ppb)

Figura III.3.1.1.2 : Representaciones obtenidas



Capítulo III. Estudios potenciométricos con preconcentración. EN y derivados.

A continuación se han resumido los resultados deducidos de dichas gráficas:

Señal obtenida con 0.4 ppb Cu(II) :	74.200	s/V
1ª adición	: 145.767	s/V
2ª adición	: 218.133	s/V
3ª adición	: 292.733	s/V
recuperac (ng)	: 4.03	⇒ 0.403 ppb en celda
r	: 0.9999	

Durante algunos de los ensayos realizados se obtuvieron algunos resultados erráticos, de origen no localizado. Se pensó que, considerando las concentraciones tan pequeñas con que se trabaja, uno de los posibles orígenes de dichos resultados podría residir en los materiales con que estaban hechas las celdas de trabajo, concretamente material plástico. Por tal motivo, se diseñaron una serie de experimentos encaminados a aportar información al respecto (todos ellos se realizaron sin intensidad de redisolución, al objeto de que esta variable no distorsionara los resultados), llegándose a la conclusión de que, en efecto, cuanto más pequeñas son las concentraciones de trabajo, mayor es el riesgo de obtener resultados inferiores en calidad cuando se opera con celdas de plástico. A continuación y a modo de ejemplo (Tabla III.3.1.1.1.) se resumen los resultados obtenidos cuando se opera con concentraciones próximas a 1 ppb ; se observa que en estas condiciones la calidad del resultado (recuperación y r) son mejores al operar con celda de cuarzo, si bien todavía no se observan grandes diferencias. Consecuentemente con lo dicho, en todo el trabajo posterior se utilizaron celdas de cuarzo.

TABLA III.3.1.1.1.
ENSAYOS PREVIOS

	Celda Cuarzo	Celda plástico
Señal (s/V)	65.667	77.667
Recuper (A/B, ng Cu²⁺)	10.07	10.64
r	0.9998	0.9989

III.3.1.2.- Influencia de los tiempos de acumulación a diferentes intensidades

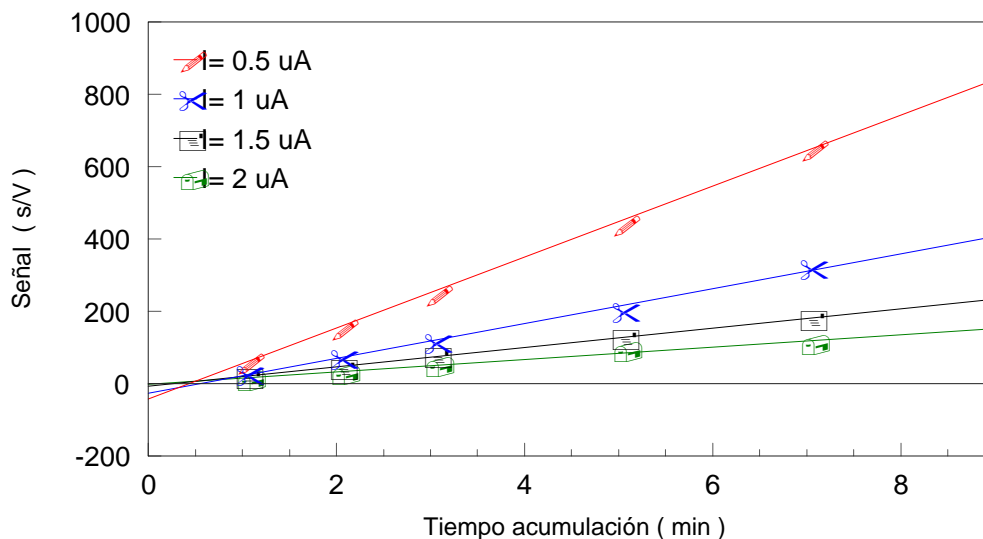
Se estudiaron, en diferentes experimentos, la evolución de las señales proporcionadas para una cierta cantidad de cobre con el tiempo de acumulación y con la intensidad presente como agente oxidante. Para ello se realizaron diversas series de experimentos empleando celdas que contenían 8 ml agua, 10 μl Hg^{2+} de 8000 mg/l, sin eliminar el oxígeno, y añadiendo 300 μl EN 0.15 M. Se trabajó a un potencial de acondicionamiento del electrodo de - 900 mV, y se depositó a -1200 mV, durante diferentes tiempos. Para cada caso se impusieron diferentes intensidades anódicas que contribuyen en la segunda etapa a la redisolución (oxidación) del cobre amalgamado. La cantidad de cobre empleada en todos los experimentos fue la misma, suficiente para que su contenido fuera **1 ppb**. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III.3.1.2.1. y en la Gráfica III.3.1.2.1 .

TABLA III.3.1.2.1

INFLUENCIA DEL T_{ac} Y DE LA I EN LA MAGNITUD DE LAS SEÑALES

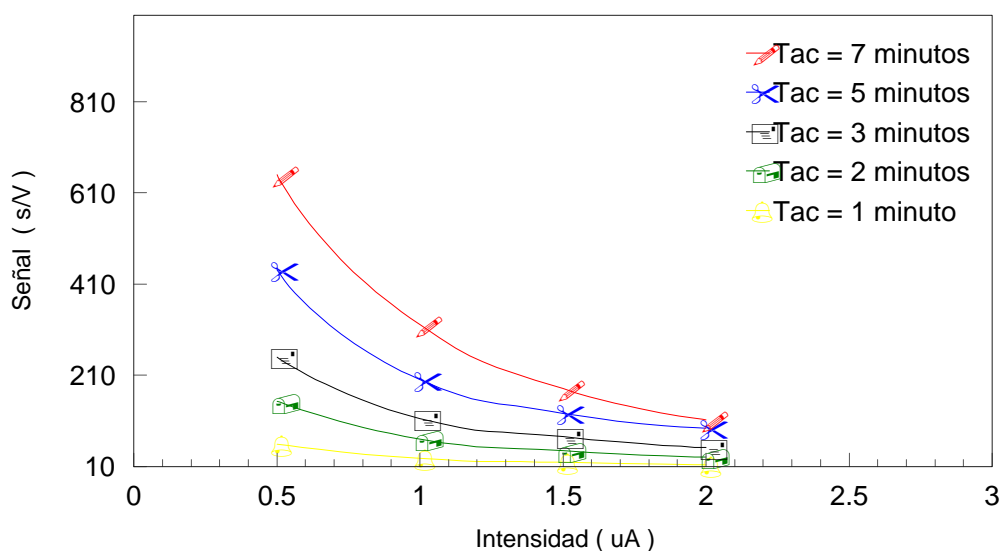
Señal (s/V)				
T ac (min)	I = 0.5 μA	I= 1 μA	I = 1.5 μA	I = 2 μA
1	58.7	27.3	19.1	13.6
2	153.1	70.1	44.3	30.1
3	249.2	115.0	75.0	50.9
5	440.8	200.4	126.7	93.4
7	650.3	320.7	180.1	112.2

GRÁFICA III.3.1.2.1 (Ver Tabla III.3.1.2.1)



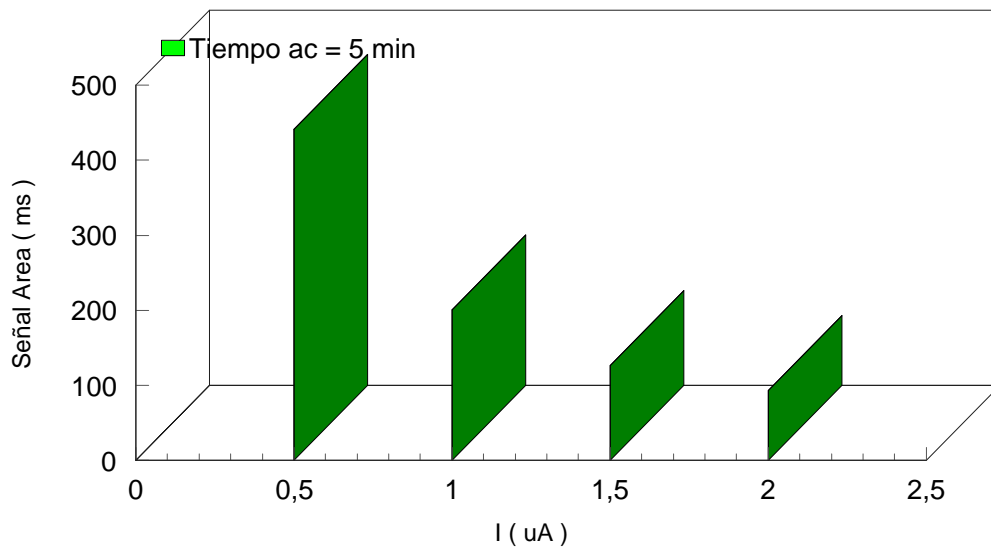
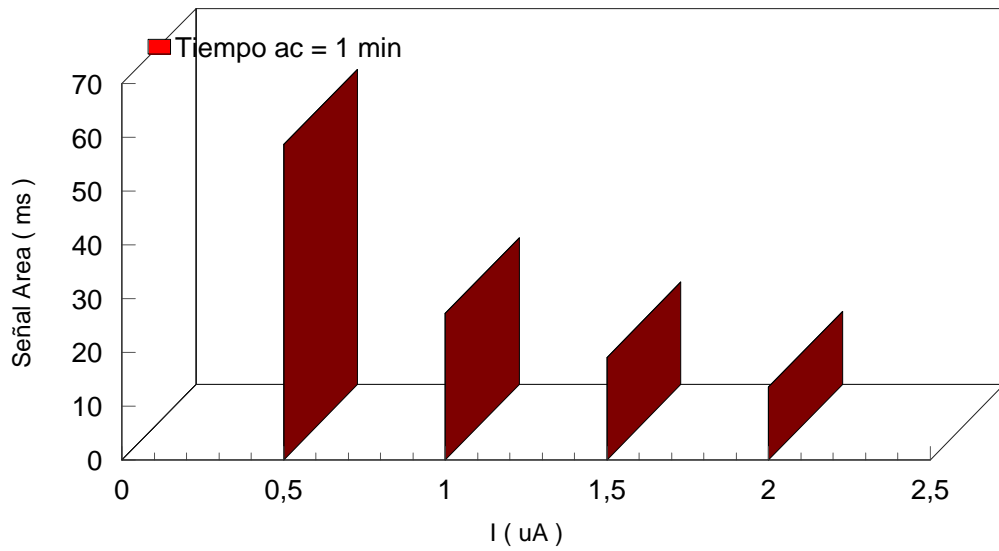
En todos estos resultados se observa en primer lugar una evolución lógica de la magnitud de la señal ; es decir, la señal aumenta linealmente con el tiempo de acumulación, a la vez que disminuye conforme aumenta la intensidad de redisolución impuesta al electrodo, si bien en esta ocasión no lo hace linealmente (ver Gráfica III.3.1.2.2). A partir de las intersecciones con el eje de abscisas (Gráfica III.3.1.2.1.) y de la evolución de la señal con la intensidad impuesta (Gráfica III.3.1.2.1.) puede concluirse que en las condiciones de trabajo , la velocidad de redisolución química (a través del Hg^{2+} y del O_2 presentes en la disolución) equivale aproximadamente a $1 \mu\text{A}$ de intensidad impuesta.

GRÁFICA III.3.1.2.2 (Ver Tabla III.3.1.2.1)



En la Gráfica III.3.1.2.3. se presentan , a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para tiempos de acumulación de 1 y 5 minutos respectivamente, pero representados de manera que se aprecia bien la diferencia entre las señales proporcionadas a las diferentes intensidades y las diferencias de magnitud entre ellas.

GRÁFICA III.3.1.2.3 (Ver Tabla III.3.1.2.1)



III.3.1.3.-Influencia de la concentración de cobre a diferentes tiempos de acumulación

Se realizaron estudios con diferentes concentraciones de cobre presentes en la celda. En un principio se operó con un tiempo de acumulación de 1 minuto y se prescindió de la corriente de redisolución, ya que la influencia de esta variable ya se había estudiado en el apartado anterior y, al menos en teoría, su supresión debe mejorar la sensibilidad del método. En cada experimento se ha calculado la cantidad de cobre puesta inicialmente en la muestra (es decir, evaluando la cantidad de cobre recuperado, como si se tratara de una disolución problema), para lo cual se han efectuado tres adiciones de disolución patrón.

III.3.1.3.a.- Estudios para Tac = 1 minuto

Las condiciones experimentales bajo las cuales se realizaron los estudios fueron las siguientes :

- * Oxidantes : Oxígeno y mercurico (10 μ l de Hg^{2+} de 8000 mg/l). Sin intensidad impuesta.
- * Tiempo de reposo : 30 s
- * E dep = - 1200 mV
- * Límites de barrido : -1300 a 0.0 mV
- * Disolución fondo : 8 ml de H_2O + 10 μ l de Hg^{2+}

Los resultados se han recogido en la Tabla III.3.1.3.a.1, poniéndose de manifiesto que, a primera vista y al menos en las condiciones experimentales empleadas, la técnica ofrece resultados de elevada calidad.

TABLA III.3.1.3.a.1.
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE COBRE (Tac = 1 minuto)

Cu²⁺ en celda (ng)	Resultados (ng)
50ng (≈6 ppb)	A/B = 49.30 r = 0.9999
	A/B = 50.03 r = 0.9998
	A/B = 48.89 r = 0.9989
10 ng (≈ 1.2 ppb)	A/B = 10.03 r = 0.9988
	A/B = 9.85 r = 0.9998
	A/B = 9.90 r = 0.9999

III.3.1.3.b.- Estudios para Tac = 2 , 3 y 5 minutos

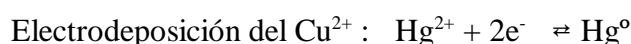
A la vista de los resultados obtenidos con tiempo de acumulación de 1 minuto y conociendo por el estudio realizado en III.3.1.2. la buena respuesta proporcionada por la variable tiempo de acumulación, se decidió recurrir a ella aplicando el mismo procedimiento a cantidades menores de cobre. En la Tabla III.3.1.3.b.1. se resumen los resultados obtenidos en cada una de las series realizadas, donde se observa su elevada calidad analítica, corroborándose con ello las posibilidades de trabajar con concentraciones de cobre inferiores a 1 ppb .

TABLA III.3.1.3.b.1
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE COBRE (Tac = 2, 3 y 5 min)

Resultados (ng)			
Cu²⁺ en celda (ng)	2 minutos	3 minutos	5 minutos
10ng (≈ 1.2 ppb)	A/B = 9.94 r = 0.9995	A/B = 9.97 r = 0.9988	A/B = 10.85 r = 0.9997
	A/B = 10.05 r = 0.9991	A/B = 9.99 r = 0.9996	A/B = 9.99 r = 0.9996
	A/B = 10.08 r = 0.9998	A/B = 10.2 r = 0.9997	A/B = 10.04 r = 0.9988
5 ng (≈ 0.6 ppb)	A/B = 5.08 r = 0.9966	A/B = 4.93 r = 0.9987	A/B = 5.10 r = 0.9997
	A/B = 5.66 r = 0.9997	A/B = 5.15 r = 0.9996	A/B = 5.02 r = 0.9989
	A/B = 5.13 r = 0.9989	A/B = 5.13 r = 0.9998	A/B = 4.96 r = 0.9980

III.3.1.4.- Estudio de la presencia de diferentes agentes oxidantes

Por lo que respecta a los posibles agentes o reactivos oxidantes empleados para la redisolución del Cu amalgamado, son tres los utilizados hasta la fecha en el entorno científico mundial : aire (concretamente su O_2), iones mercurícos (Hg^{2+}) y corriente eléctrica anódica. Cada uno de ellos presenta ventajas e inconvenientes. Así, entre las primeras, el aire introduce la ventaja de la simplicidad en el trabajo, sobre todo si se considera que buena parte de las técnicas electroanalíticas requieren trabajar en ausencia de oxígeno, mientras que ésta en principio no. La presencia de iones Hg^{2+} en la disolución de la muestra contribuye entre otras cosas, a consolidar el film, toda vez que durante el proceso de electrodeposición del analito metálico también se deposita (incluso más fácilmente) Hg y otro tanto ocurre durante el proceso de redisolución:



Por su parte, la corriente eléctrica ofrece las ventajas de su mejor control y medida, su versatilidad y el no alterar la matriz, ni cuali ni cuantitativamente. Además y por razones obvias, es preferible al mercuríco para análisis “in situ “.

Cuando uno de los objetivos del trabajo (como ocurre en este caso) es ampliar el conocimiento teórico del comportamiento electroquímico de la técnica a través del estudio de los procesos electródicos en diferentes medios complejantes, la presencia de iones Hg^{2+} dificulta en buena medida dicho estudio pues por norma general los diferentes reactivos presentan comportamientos químicos bastante similares para el Cu^{2+} y el Hg^{2+} . La consecuencia es que el distanciamiento entre los potenciales redox de los sistemas participantes en los procesos (Cu^{2+}/Cu^0 y Hg^{2+}/Hg^0) es siempre muy parecido y, por lo tanto, no tiene ningún efecto. Por esto, se ha verificado previamente un estudio comparativo entre disoluciones en cada una de las

Capítulo III. Estudios potenciométricos con preconcentración. EN y derivados.

cuales se trabaja con diferente concentración de Hg^{2+} . Se han repetido los experimentos y en todos los casos los resultados están muy próximos en calidad analítica. Por lo que respecta a la cuantía de las señales, lo previsto por la teoría es que la señal analítica (al fin y al cabo se trata de un tipo de valoración) disminuya a medida que aumenta el ritmo de adición (la concentración en el caso del Hg^{2+}) de agente valorante : Esto es lo que se observa como tendencia general en todos los estudios. Y en todos los estudios también se observa una excepción con la primera dosis de Hg^{2+} añadido, lo cual puede explicarse como si fuera con esta primera presencia de Hg^{2+} en la disolución cuando se consolida el film de Hg (ver apartado III.4.2.) .

Se realizaron estudios con diferentes modalidades en cuanto a agentes oxidantes en el medio de análisis. Para ello se aplicó el procedimiento general descrito y operando en las condiciones que se especifican a continuación : muestras con 5 ng Cu(II) y 4 ng Cu(II) respectivamente, tiempo de acumulación de 5 minutos, con 30 segundos de reposo. Disoluciones en celda : 8 ml agua, con y sin 10 μl Hg^{2+} de 8000 mg/l y 300 μl EN 0.15 M.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes :

$$\underline{I = 1 \mu\text{A}}, \quad \underline{\text{Hg}^{2+} (10 \mu\text{l de } 8000 \text{ mg/l })}$$

$$\textit{Experiencias con } 5 \text{ ng Cu(II) : } 0.5 \text{ ppb} \Rightarrow \text{A/B} = 5.01 \text{ ng, } r = 0.9999$$

$$\text{A/B} = 5.12 \text{ ng, } r = 0.9998$$

$$\textit{Experiencias con } 4 \text{ ng Cu(II) : } 0.4 \text{ ppb} \Rightarrow \text{A/B} = 4.03 \text{ ng, } r = 0.9999$$

$$\text{A/B} = 4.3 \text{ ng, } r = 0.9989$$

I = 1 μ A,

Sin Hg²⁺

Experiencias con 5 ng Cu(II) : 0.5 ppb \Rightarrow A/B = 5.23 ng , r = 0.9987

A/B = 5.21 ng , r = 0.9998

Experiencias con 4 ng Cu(II) : 0.4 ppb \Rightarrow A/B = 3.85 ng , r = 0.9988

A/B = 3.97 ng , r = 0.9987

Hg²⁺ (10 μ l de 8000 mg/l)

Sin I,

Experiencias con 5 ng Cu(II) : 0.5 ppb \Rightarrow A/B = 4.75 ng , r = 0.9999

A/B = 4.95 ng , r = 0.9998

Experiencias con 4 ng Cu(II) : 0.4 ppb \Rightarrow A/B = 3.80 ng , r = 0.9989

A/B = 3.75 ng , r = 0.9987

A la luz de los resultados obtenidos se concluyó, en primer lugar, que cualquiera de las tres modalidades ensayadas genera resultados de elevada calidad. Y, en segundo lugar, que la diversidad de agentes oxidantes parece garantizar en mayor grado la pureza del proceso de redisolución, ya que las cantidades recuperadas de cobre y los valores de r así lo indican. Consecuentemente, se decidió trabajar con $I = 1 \mu\text{A}$ y en presencia de Hg^{2+} , puesto que, además, la presencia de éste en la celda desde el comienzo (antes de añadir la EN) de cada experimento parece ayudar a estabilizar la película de mercurio. Aunque no se haya hecho ningún comentario al respecto, debe recordarse que en todo momento se ha operado con la disolución en contacto

Capítulo III. Estudios potenciométricos con preconcentración. EN y derivados.

con la atmósfera, de manera que el oxígeno disuelto también ha contribuido a configurar el “agente oxidante” del cobre amalgamado ; por lo tanto y siguiendo con la conclusión señalada poco antes, también este oxígeno debe contribuir a dar mayor calidad a los resultados.

Aparte de lo dicho, lo innecesario de desairear las disoluciones constituye un aspecto importantísimo dentro de los objetivos generales del presente trabajo, encaminado como ya se sabe a diseñar procedimientos de análisis rápidos y directos con posibilidades de aplicación “in situ”.

III.4.- ESTUDIOS CON DERIVADOS DE LA ETILENDIAMINA.

Como ya se ha indicado en diferentes oportunidades, el empleo de modificadores del medio puede resultar trascendental en los estudios programados . Así, el empleo de etilendiamina (EN) ha supuesto una mejora importante en la sensibilidad del método, ello independientemente de otras ventajas también significativas desde el punto de vista operativo, como son la preparación de electrodos de película de mercurio, el desarrollo y configuración de las señales electroanalíticas, etc . También interesa manifestar que según el comportamiento diferencial de cada uno de estos agentes con el Cu^{2+} y el Hg^{2+} , la calidad analítica (cuantía, pureza y potencial de ubicación) de la señal puede ser mayor o menor. También debe indicarse que se ha continuado la búsqueda de nuevos reactivos modificadores, pero los ensayados no aportan en general conclusiones satisfactorias. Por tal motivo se amplió el estudio a otros reactivos químicamente próximos a la EN. Dichos reactivos han sido los mismos que los empleados con ocasión de los estudios voltamperométricos, es decir , la Dietilenetriamina (DENTRI) y la N-Metil-Etilendiamina (N-MET-EN).

Desde el punto de vista experimental, se han realizado numerosos estudios, empleando para ello los diferentes factores o variables usadas en los apartados precedentes. Se han comparado los resultados obtenidos con los correspondientes al utilizar EN y de todos ellos se han seleccionado aquéllos que se ha estimado tienen suficiente interés para aparecer en esta Memoria.

III.4.1.- Influencia de la Intensidad de redisolución

Se han realizado diferentes estudios, utilizando para ello series de disoluciones con diferentes concentraciones de cobre, pero operando en todo caso con los parámetros instrumentales ya establecidos para anteriores estudios. Se ha mantenido en todo momento constancia en los otros dos posibles agentes oxidantes (oxígeno y mercurico), con la intención de que las posibles diferencias observadas sólo fueran achacables a la intensidad impuesta o a la naturaleza del modificador; es decir, siempre se operó con la disolución en contacto con el aire y se añadió a la celda 10µl de disolución de Hg^{2+} (8000 mg Hg^{2+}/l).

En la Tabla III.4.1.1. aparecen, a modo de ejemplo, los resultados medios de 10 experimentos efectuados en cada situación (los resultados de cada serie de 10 son, a su vez, muy compactos). En primer lugar se observa el cumplimiento lógico y general de que a medida que aumenta la intensidad impuesta disminuye la magnitud de la señal; en este caso, además, la dependencia de ambas variables es bastante lineal, fenómeno probablemente debido a que la concentración de cobre es bastante pequeña. Desde el punto de vista diferencial entre los reactivos estudiados, debe señalarse que la magnitud de la señal adopta valores relativamente parecidos, si bien cuando se opera con N- MET- EN es cuando los valores son máximos y cuando se opera con DENTRI los valores son mínimos. Aunque se incidirá más tarde en este tema, cabe adelantar aquí que, al menos aparentemente, la única explicación de esta fenomenología se basa en que de los sistemas electroquímicos que intervienen en el proceso, el que proporciona la N- MET- EN es ligeramente más reversible que los otros dos, tal como se concluía en los estudios voltamperométricos paralelos.

TABLA III.4.1.1.
INFLUENCIA DE LA INTENSIDAD DE REDISOLUCIÓN
([Cu²⁺] ≈ 5 ppb , Tac = 1 minuto)

Señal (s/V)			
Medio	I = 0.5 μA	I = 1 μA	I = 2 μA
EN	279	147	80
N-MET-EN	410	209	101
DENTRI	256	140	73

III.4.2.- Influencia de la concentración de Hg²⁺

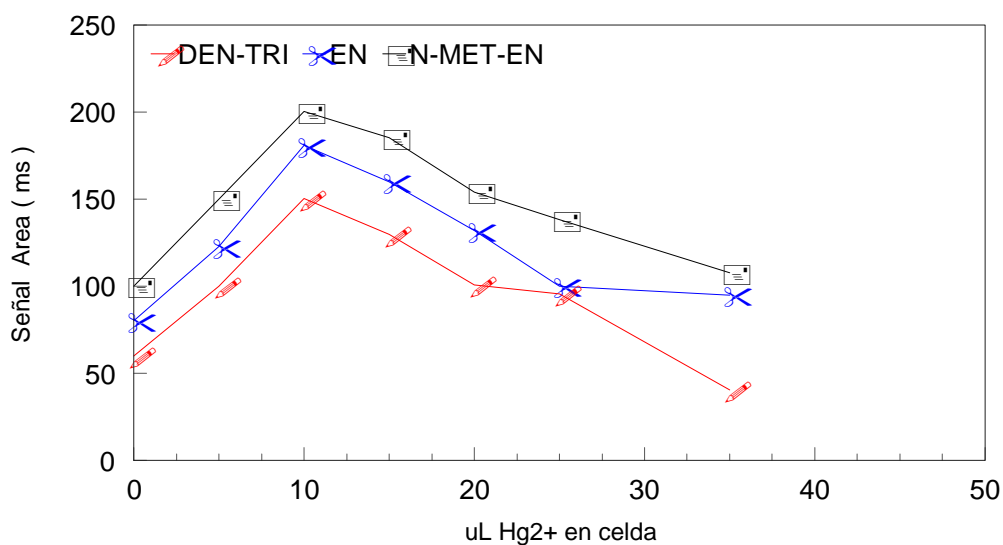
Los ensayos efectuados en este apartado se dirigieron a evaluar la eficacia de la mayor o menor presencia del Hg²⁺ como agente oxidante en el proceso de redisolución, comparando posteriormente los resultados obtenidos con cada reactivo modificador. Las condiciones experimentales de trabajo fueron las usuales. Para cada reactivo se operó con series (10 disoluciones en cada caso) en los que se fue variando la cantidad de Hg²⁺ puesto. En la Tabla III.4.2.1. se han resumido los resultados obtenidos, mientras que en la Gráfica III.4.2.1. aparece su representación con objeto de visualizar mejor la evolución de las señales.

Al igual que ocurre en el subapartado anterior, el medio N- MET- EN es el que propicia la aparición de señales de mayor magnitud, mientras que la DENTRI sigue siendo el modificador que genera señales más pequeñas. Sin embargo, hay otro fenómeno (repetido en todos los experimentos y para los tres medios) que consiste en que las señales evolucionan contrariamente a lo esperado con ocasión de las dos primeras adiciones de Hg²⁺: Cuando se opera con mayor cantidad de oxidante la señal debería ser menor, pero en este caso la experimentación dice lo contrario. Debe admitirse que este fenómeno no tiene justificación fácil y que la bibliografía tampoco aporta luces al respecto; en todo caso cabe decir que, aún con la máxima cautela, probablemente se deba a algo relacionado con la estabilización de la película de Hg del electrodo. Desde un punto de vista práctico, se concluye que, para las condiciones de trabajo establecidas, la presencia de 10 µg de Hg²⁺ de disolución de 8000 mg / l en la celda proporciona las señales más desarrolladas; por lo tanto y mientras no se especifique en contrario, ésta será la cantidad de Hg²⁺ utilizada en posteriores estudios.

TABLA III.4.2.1.
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE Hg²⁺
([Cu²⁺] ≈ 5 ppb)

Señal (s/V)			
μl Hg²⁺	N-MET-EN	EN	DENTRI
0	100.0	80.1	60.1
5	150.3	123.0	100.3
10	200.6	180.9	150.6
15	185.3	160.1	130.0
20	154.1	132.1	100.8
25	138.5	100.3	95.5
35	107.7	95.0	40.5

GRÁFICA III.4.2.1.



III.4.3.- Estudio comparativo de los tres reactivos

A partir de los conocimientos aportados en los estudios precedentes se procedió a realizar un estudio de conjunto con los tres agentes oxidantes tomados en consideración. En la Tabla III.4.3.1. aparecen los resultados medios de 10 medidas efectuadas en cada caso, advirtiéndose una vez más (como ya se indicó en III.4.1.) que para cada experimento las diez medidas son significativamente compactas, incluso un poco más cuando se opera simultáneamente con los tres oxidantes.

Por lo que respecta a las señales, desde una perspectiva cualitativa se observa en cada uno de los tres casos estudiados que la N- MET- EN es el modificador que proporciona señales mayores y que, en conjunto, la magnitud de éstas es bastante similar, si bien las señales mayores se obtienen en ausencia de intensidad. Esto último aconseja que, en caso de prescindir de algún oxidante en beneficio de la sensibilidad, el sacrificio debería ser la intensidad.

Por lo que respecta a los potenciales de pico, como era de esperar al tratarse de mezclas de al menos dos oxidantes, se observan valores muy parecidos en conjunto y, sobre todo, si se consideran los valores correspondientes a cada modificador. Cuando se observan los valores entre diferentes modificadores, también aparece un fenómeno repetitivo : la DENTRI condiciona los potenciales de pico más negativos, mientras que a la N- MET- EN corresponden los menos negativos. Sobre la base de que sea el modificador el único controlante de las formas de Cu^{2+} y de Hg^{2+} predominantes en la celda y suponiendo que la intensidad (cuando actúa) no ejerza influencia en este aspecto, los valores de estos potenciales dependerían de las constantes de los complejos de Cu^{2+} y Hg^{2+} con cada uno de los tres reactivos en estudio, así como del grado de reversibilidad electroquímica de cada uno de los procesos electródicos involucrados; es decir, que el problema es lo suficientemente complicado y la similitud entre potenciales también suficiente, como para no haber entrado en estudios o interpretaciones más profundas sobre el tema.

TABLA III.4.3.1.
ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS TRES REACTIVOS.
([Cu²⁺] ≈ 10 ppb)

Oxidantes	Señal obtenida (s/V)	E pico (mV)
O ₂ I Hg ²⁺	EN :..... 356	-0.458
	N-MET-EN :.....429	-0.434
	DENTRI :.....320	-0.482
O ₂ I	EN :.....320	-0.470
	N-MET-EN :.....400	-0.442
	DENTRI :.....301	-0.496
O ₂ Hg ²⁺	EN :.....509	-0.460
	N-MET-EN :.....540	-0.442
	DENTRI :.....476	-0.491

III.4.4.- Influencia de la concentración de cobre

El último estudio del presente bloque se realizó en las condiciones experimentales óptimas deducidas anteriormente, es decir $T_{ac} = 1$ minuto, $E_{dep} = -1200$ mV, $I = 1 \mu A$; $10 \mu l$ Hg^{2+} (8000 mg/l) y en contacto con el aire. Se hizo un calibrado para concentraciones de cobre comprendidas entre 1 y 10 ppb aproximadamente, utilizando cada vez un modificador diferente. En la Tabla III.4.4.1. se resumen los resultados obtenidos, mientras que en las Gráficas III.4.4.1. y III.4.4.2. aparecen las correspondientes representaciones al objeto de facilitar su apreciación.

Puede concluirse para los tres casos una aceptable linealidad de las señales para el tramo de concentraciones estudiado, así como la ya repetida ligeramente mayor sensibilidad cuando se opera con N- MET- EN .

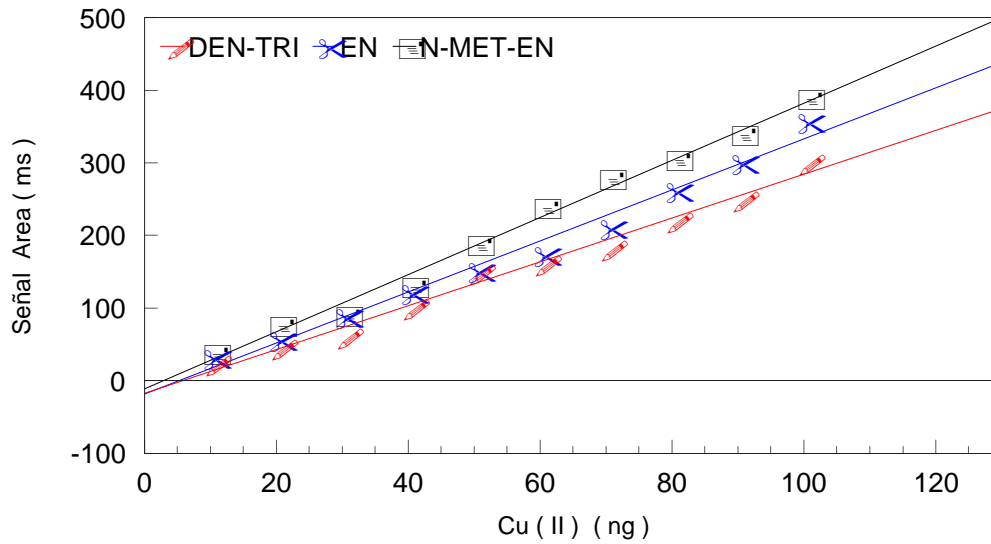
TABLA III.4.4.1.
INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE COBRE

Señal (s/V)			
ng Cu(II)	EN	N-MET-EN	DENTRI
10	30.6	38.3	23.0
20	56.1	77.3	45.1
30	88.9	90.2	60.3
40	120.5	130.5	100.0
50	150.5	188.1	148.1
60	173.7	240.8	160.6
70	210.0	280.3	180.7
80	260.9	305.0	220.5
90	300.1	340.0	250.5
100	356.3	390.4	300.1

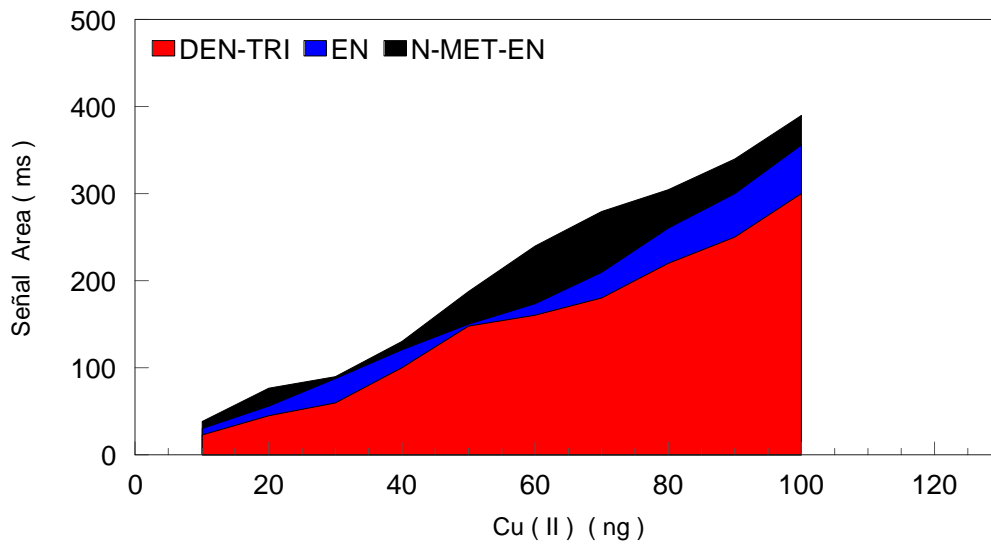
$r = 0.9928$	$r = 0.9954$	$r = 0.9937$
--------------	--------------	--------------

Nota : 10 ng \Rightarrow 1 ppb de Cu aproximadamente.

GRÁFICA III.4.4.1. (Ver Tabla III.4.4.1.)



GRÁFICA III.4.4.2. (Ver Tabla III.4.4.1.)



Capítulo III. Estudios potenciométricos con preconcentración. EN y derivados.

A modo de resumen general puede establecerse el siguiente cuadro comparativo :

* Etiléndiamina (EN) a
* N-Metil-Etiléndiamina b
* Dietielentriamina c
Estabilidad complejos con Cu (II) c > a > b
Estabilidad complejos con Hg (II) c > a > b
Potencial de pico b > a > c
Reversibilidad electroquímica b > a > c
Sensibilidad del método b > a > c

De todo lo cual se concluye que, en principio, la N-MET-EN proporciona los mejores resultados analíticos (los de mayor sensibilidad), si bien en muestras reales parece más recomendable la DENTRI ya que presenta mayor capacidad complejante y, por lo tanto, liberadora del cobre ligado a la materia orgánica de la matriz. En cualquiera de esas dos funciones asignadas al reactivo modificador del medio (química primero y electroquímica después) la EN se mantiene en una posición intermedia, lo cual le proporciona buenas propiedades para convertirla en el reactivo preferido de los tres estudiados, toda vez que tampoco se han observado grandes diferencias entre los mismos.

CAPÍTULO IV.

***APLICACIONES ANALÍTICAS
A FLUIDOS BIOLÓGICOS (LCR)***

IV.1.- VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA

IV.1.1.- Planteamiento general para muestras reales.

Una vez puesto a punto el método para la determinación de cobre (a nivel de trazas) tal y como se ha descrito anteriormente, se procedió a su aplicación en muestras reales.

Tanto por su interés biomédico como por el vacío bibliográfico existente (no se han encontrado trabajos al respecto en las búsquedas realizadas), se inició el estudio de la presencia de cobre en el líquido cefalorraquídeo (en adelante LCR) de origen animal (perro, cerdo, caballo,...) en muestras proporcionadas por el Departamento de Medicina y Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de nuestra Universidad; todo ello como una etapa más de una programación más amplia y cuyo último objetivo es, si fuera posible, determinar dicho metal en muestras humanas. La técnica analítica utilizada fue la redisolución anódica en su modalidad Voltamperometría de Onda Cuadrada, dadas las ventajas que ofrece frente a otras técnicas.

IV.1.2.- Ensayos con LCR de perro

IV.1.2.1.- Primeros ensayos

El procedimiento a seguir fue el que a continuación se indica :

Fondo : 6 ml agua, 10 μ l HCl suprap. 30 % y 1200 μ l EN 0.15 M

Se desaireó la disolución durante 5 minutos (solamente se hace en esta primera ocasión) mediante el paso de corriente de N₂.

Condiciones experimentales:

Eacondic. = -0.1 V

Edep. = -1.000 V

Tequilibrio.= 5 s

Tacondic. = 15 s

Tdep. = 1 min

Tpurga = 5 s (después de cada adición)

El registro se realizó a través de un barrido de potenciales desde -0.600 V hasta +0.100 V y con una frecuencia de 50 Hz.

Una vez preparado y registrado el blanco y al objeto de comprobar la magnitud de la señal del cobre y el potencial al que aparece, se adicionaron por dos veces consecutivas los μ l necesarios de disolución de Cu²⁺ de 0.1 ppm para que en la celda resulten concentraciones de aproximadamente 1 y 2 ppb . En concreto, se añade en cada ocasión 60 μ l de disolución de Cu²⁺, lo que llevado a un volumen final de 7.32 ml supone 0.83 ppb y 1.66 ppb de Cu²⁺ respectivamente (disoluciones 1,2 y 3 de la Tabla IV.1.2.1).

A continuación y a tenor de los datos de que se dispone, en cuanto a contenidos de cobre en LCR de perro, se calculó la cantidad de muestra que se debe añadir a la disolución, para que presumiblemente el incremento de Cu²⁺ en celda sea aproximadamente 1 ppb (resultó ser 250 μ l).

Cuando se añaden 250 μl de LCR a la celda y se registra (disolución 4 de la Tabla), siempre se aprecia una disminución importante de la señal, así como una evolución de los potenciales hacia valores más positivos.

Entre los posibles argumentos explicativos del fenómeno, el más verosímil en principio es el que lleva a pensar que el pH del medio no es el adecuado y que posiblemente fuera necesario adicionar más EN. Así, considerando el pH del LCR (≈ 7.34) y que este fluido reúne un buen número de sistemas reguladores del mismo, su adición a la celda conlleva un descenso del pH y con ello, una disminución importante de la concentración de EN en la forma que compleja al Cu^{2+} . Suponiendo correctos estos argumentos, la adición de nuevas cantidades de EN debería corregir la disminución de pH y de EN con capacidad complejante motivada por la adición de LCR.

Haciendo adiciones sucesivas de EN (200, 100, 100, 100, 100, y 200 μl) se observó que, progresivamente, la señal de redisolución del Cu^{2+} aumenta y que el valor del potencial se acerca más al que presenta la disolución de Cu^{2+} cuando se parte de medio acuoso (disoluciones 4 a 10 de la Tabla). Estos resultados no solo corroboran los comentarios anteriores sino que constituyen un doble buen indicio , pues por un lado se confirma la presencia de cobre en el LCR y por otro, que la materia orgánica existente en dicho fluido no parece bloquear decisivamente la superficie del electrodo, extremo este último de especial interés y que será objeto de mayor atención más adelante.

Tabla IV.1.2.1 .- LCR de perro (Primeros ensayos)

Disolución	Celda	Realización medida	-E (V)	I (nA)
1	Fondo	Inmediata	0.395	1.03
2	+60µl Cu ²⁺ 0.1 ppm (≈ 0.83 ppb)	Inmediata	0.385	17.5
3	+60µl Cu ²⁺ 0.1 ppm (≈ 1.66 ppb)	Inmediata	0.385	35.0
4	+250 µl LCR _{perro}	Inmediata	0.317	3.7
		A los 4 min	0.317	9.25
		A los 10 min	0.317	7.71
5	+ 200 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.346	38.0
		A los 4 min	0.346	40.1
		A los 10 min	0.346	41.1
6	+ 100 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.346	43.5
		A los 4 min	0.346	45.6
		A los 10 min	0.346	47.5
7	+ 100 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.356	50.5
		A los 4 min	0.356	52.4
		A los 10 min	0.356	52.0
8	+ 100 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.356	56.8
		A los 4 min	0.356	55.8
		A los 10 min	0.356	56.5
9	+ 100 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.366	59.4
		A los 4 min	0.366	60.4
		A los 10 min	0.366	60.2
10	+ 200 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.366	61.7
		A los 4 min	0.366	63.6
		A los 10 min	0.366	62.8

En la citada Tabla IV.1.2.1. se ha plasmado, tanto el desarrollo del experimento descrito, como los resultados del mismo. Cabe decir que en los repetidos ensayos efectuados se han observado los mismos fenómenos. Así, cuando se añade el LCR, el pH desciende a valores comprendidos entre 7 y 8; estos valores ascienden conforme se añade EN y superan la barrera del pH = 9 después de añadir del orden de 500 μ l de EN 0.15 M. Los valores de E y de I experimentan similar evolución: descenso brusco al añadir LCR y recuperación progresiva con la adición de EN, hasta valores próximos a los iniciales (caso de E) o razonablemente superiores (caso de I).

Este comportamiento es muy parecido al recogido en un trabajo anteriormente citado (1), con la salvedad de que en esta ocasión la cantidad necesaria de EN es significativamente mayor, como corresponde a una matriz (LCR) cuyo contenido en materia orgánica que interactúa con el cobre presente es también mucho mayor que en el caso del trabajo citado (agua de mar); todo lo cual da validez a los argumentos expuestos hasta ahora.

El experimento que se resume en la Tabla IV.1.2.1. , también ha pretendido evaluar el grado de interferencia que supone la adsorción de materia orgánica en la superficie de la gota de mercurio en función del tiempo de contacto entre la gota y la matriz. Para ello, después de cada adición de EN, se ha procedido al análisis inmediatamente y después de diferentes tiempos de contacto gota-matriz (en concreto, en la Tabla aparecen tiempos de 4 y 10 minutos). Se observa que los resultados son prácticamente los mismos, pudiéndose concluir al respecto que, al menos en las condiciones de trabajo empleadas, el tiempo de contacto electrodo-matriz no modifica significativamente los resultados y, por otra parte, que los equilibrios químicos después de cada adición de EN se alcanzan de forma prácticamente inmediata.

IV.1.2.2.- Influencia del tiempo de acumulación

Ya se ha indicado la extraordinaria importancia que se concede a la sensibilidad del método; de otra parte, uno de los parámetros instrumentales a los que se suele acudir para aumentar dicha sensibilidad es el tiempo de acumulación, toda vez que en condiciones normales, la magnitud de la señal es proporcional a dicho tiempo. Al objeto de corroborar este aspecto se efectuó repetidas veces un estudio a diferentes tiempos de acumulación; en todas las ocasiones los resultados fueron los mismos y en la Tabla IV.1.2.2. se resumen los correspondientes a una de estas series; las condiciones experimentales son las mismas que las descritas en el apartado anterior, ya que las disoluciones empleadas son algunas de las residuales del citado apartado.

Tabla IV.1.2.2. Influencia del tiempo de acumulación
(Composición de la disolución y parámetros experimentales iguales a los de la disolución 10 contemplada en la Tabla IV.1.2.1)

T acumulac (min)	-E (V)	I (nA)	I / Tac
1	0.366	63.5	63.5
2	0.375	76.4	38.2
3	0.385	84.8	28.3
5 (repetición)	0.395	107	21.4
	0.395	108	21.6

A la luz de los resultados pueden deducirse varias conclusiones.

En primer lugar que la magnitud de la señal aumenta con el tiempo de acumulación, pero en una proporción muy inferior a la lineal; este fenómeno debe interpretarse sobre la base de que la superficie activa de la gota de mercurio disminuye progresivamente, probablemente debido a que la materia orgánica se adsorbe progresivamente sobre el electrodo.

En definitiva puede concluirse que el fenómeno adsortivo tan indeseado no tiene lugar con el simple contacto mercurio-matriz , pero sí ocurre cuando se impone el estímulo de un potencial reductor. Dicho de otra forma, la “ contaminación ” del electrodo con la materia orgánica es simultánea a la electrodeposición del cobre. El pequeño pero constante aumento del potencial de redisolución del cobre, podría también interpretarse considerando que la presencia de materia orgánica en la superficie del electrodo “ facilita ” el regreso del cobre hacia la disolución.

Por último se observa que los resultados (tanto E como I) se repiten con elevada precisión, lo que confirma una vez más que el proceso de adsorción en estudio es un fenómeno que tiene lugar solo durante la etapa de preconcentración y que no genera resultados erráticos.

IV.1.2.3.- Influencia de la materia orgánica en la sensibilidad del método

Una vez constatada la presencia de fenómenos de adsorción sobre el electrodo (sin duda provocados por la M.O. aportada por la matriz) , se procedió a estudiar la cuantía de su influencia en las señales de redisolución. Para ello se compararon las pendientes de sendos calibrados de cobre, uno en ausencia y otro en presencia de LCR; para el primero se aprovechó la primera parte (disoluciones 1, 2 y 3) de los experimentos resumidos en la Tabla IV.1.2.1; para realizar el calibrado en presencia de materia orgánica se partió de la disolución 10 recogida en la citada Tabla IV.1.2.1. , a la que se incorporaron sucesivamente cinco adiciones de cobre. Los resultados se expresan en la Tabla IV.1.2.3.; al objeto de hacer comparables los dos calibrados, la última columna incluye los valores de I corregidos suponiendo que el volumen total de la disolución hubiera sido el volumen existente en la disolución 3 de la Tabla IV.1.2.1. (7.33 ml) .

Tabla IV.1.2.3.

Influencia de la materia orgánica en la sensibilidad del método.

Disolución	-E (V)	I (nA)	I corregida (nA)
1 de Tabla IV.1.2.1	0.395	1.03	1.01
2 de Tabla IV.1.2.1	0.385	17.5	17.4
3 de Tabla IV.1.2.1	0.385	35.0	35.0
10 de Tabla IV.1.2.1	0.366	61.7	70.5
+ 60µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.366	70.8	81.5
+ 60 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.366	80.3	93.1
+ 60 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.375	90.7	105.4
+ 60 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.375	103	121.1
+ 60 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.375	115	136.2

Capítulo IV . Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR .

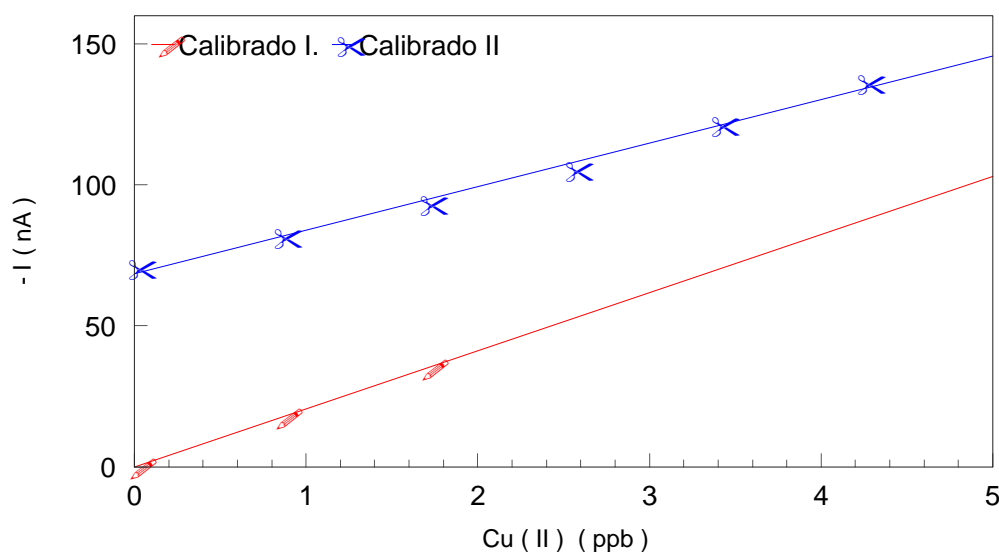
En la Tabla IV.1.2.3. se observa en primer lugar que el potencial al que aparece la señal de redisolución es prácticamente constante.

También se observa que cada uno de los dos calibrados ofrece una linealidad más que aceptable (desviaciones medias de 3.5 % y 13.7 % , respectivamente) en atención al objeto del estudio planteado, es decir, la comparación de las pendientes de ambos calibrados.

En las condiciones de trabajo las pendientes para ambos tramos son respectivamente 20.7 y 16.0 nA / ppb de cobre , lo que significa que la materia orgánica (se insiste, en las condiciones de trabajo) rebaja la sensibilidad del método (relación señal / concentración de cobre) hasta un coeficiente interpendientes de 0.77 en relación con las disoluciones exentas de materia orgánica. En la Gráfica IV.1.2.1 se han representado ambos tramos: El primero podría considerarse como una recta de calibrado, mientras que el segundo debe interpretarse como una modalidad de adición estándar. Este último puede servir para determinar el contenido de cobre en el LCR, dado que la composición química de la disolución es en todos los casos la misma; pero no ocurre lo mismo con la hipotética recta de calibrado del primer tramo, toda vez que al añadir la muestra se incorpora por primera vez materia orgánica y con ello se modifica la disolución.

GRAFICA IV.1.2.1.

(Calibrados referidos a un volumen constante : 7.330 ml)



IV.1.2.4.- Determinación del contenido de cobre en LCR de perro

A la luz de los resultados obtenidos en los apartados anteriores se pueden diseñar diferentes metodologías para la determinación del cobre presente en LCR.

a) Empleando el primer tramo o calibrado I, el procedimiento consistiría en preparar la disolución blanco, registrar la señal de redisolución correspondiente, añadir varias veces cantidades conocidas de cobre y registrar las respectivas señales ; posteriormente, se añade una cantidad adecuada de LCR y se registra la señal o intensidad de redisolución. Para poder introducir este último valor en la recta de calibrado construida con los valores primeros es necesario corregirlo conforme al cambio de sensibilidad experimentado al incorporar materia orgánica a la celda , o bien estar seguro de que la cantidad de materia orgánica incorporada es insuficiente para cambiar significativamente las condiciones de la disolución ; es decir, según la terminología aplicada en el apartado anterior , se necesita conocer el valor del coeficiente interpendientes o estar seguro de que dicho coeficiente vale prácticamente 1.

b) Empleando el segundo tramo o calibrado II, el procedimiento sería añadir a la celda una determinada cantidad de LCR, acondicionar la disolución hasta el volumen y la concentración de EN idóneos y registrar la señal de redisolución ; posteriormente, adicionar varias veces la cantidad de cobre apropiada y en cada ocasión registrar la señal correspondiente. Con ello debe obtenerse una recta, a la que se le aplica el tratamiento matemático oportuno para calcular el cobre en la muestra. Para que este procedimiento sea correcto, las adiciones de cobre tienen que suponer un incremento de volumen en la celda suficientemente pequeño como para que la dilución de la materia orgánica no sea significativa.

c) Cuando se trata de análisis aislados o que requieran un resultado con mayor calidad analítica, parece recomendable acudir a un procedimiento híbrido entre los dos anteriores. Consistiría en seguir la variante a) y después, sin cambiar la disolución, desarrollar la variante b) ; de esta forma, se podrían comparar los resultados obtenidos y corroborar in situ el coeficiente interpendientes a utilizar.

Capítulo IV . Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR .

Aplicando esta metodología a la muestra de LCR de perro en estudio, se han obtenido los siguientes resultados :

Incremento de concentración de Cu^{2+} en la disolución con motivo de la adición de $250\mu\text{l}$ de LCR : 2.75 ppb .

Concentración de Cu^{2+} presente en el LCR : $7.33 \times 10^3 \times 2.77 / 250 = 81$ ppb.

Valor que entra dentro del rango de normalidad para el contenido de cobre en LCR.

IV.1.3.- Ensayos con LCR de cerdo

Ya se ha indicado que el objetivo final del presente trabajo iba dirigido hacia el LCR de humanos. Las probabilidades de que su composición química, en conjunto , sea próxima a la del LCR de otros mamíferos son elevadas. No obstante, considerando las dificultades para conseguir muestras de humanos, se consideró pertinente insistir con muestra de LCR de otro tipo de animal, que en el presente caso fue cerdo. Se supuso en principio que de esta forma se podrían corroborar las conclusiones obtenidas con el LCR de perro y conocer las diferencias que hubiera entre ambas matrices; en todo caso, se recogería una información muy valiosa de cara a cuando llegara el momento de experimentar con muestras humanas.

En líneas generales se ha repetido el estudio efectuado con las muestras de perro. La única diferencia procedimental introducida ha consistido en el indicador utilizado para decidir cuándo la cantidad de EN añadida era suficiente ; ahora se detiene la adición de EN cuando el E de la señal coincide con el valor correspondiente que se obtiene antes de añadir LCR , mientras que en el caso anterior se suspendía la adición de EN cuando tras dos adiciones de EN los valores de E no variaban significativamente.

IV.1.3.1.- Primeros ensayos

Las condiciones experimentales e instrumentales fueron las mismas que en el apartado anterior. La secuencia procedimental de los ensayos también fue la misma. En la Tabla IV.1.3.1. se han resumido los primeros resultados obtenidos. Se observa en primer término que tanto el fondo como las dos adiciones de cobre proporcionan resultados coherentes con los contemplados en la Tabla IV.1.2.1. Sin embargo, tras la adición del LCR , ahora no se registra señal alguna, a la par que el pH de la disolución es bastante inferior a 9. Con los argumentos dados hasta ahora, el fenómeno descrito puede interpretarse sobre la base de que la muestra de cerdo debe ser algo más rica en materia orgánica que la del perro.

Las sucesivas adiciones de EN generan un comportamiento muy similar al observado anteriormente y que se resume en lo siguiente : Progresivo aumento del pH, progresivo aumento de la señal de redisolución del cobre y progresivo desplazamiento del potencial hacia valores más negativos ; consecuentemente , la discusión presentada en los apartados IV.1.2.1 y IV.1.2.2 y sus conclusiones siguen siendo igualmente válidas.

La disolución número 10 se consigue ahora tras añadir 1.70 ml de EN (prácticamente el doble que en el caso anterior) , lo cual obedece probablemente a dos motivos; el primero, que ahora hay más materia orgánica que neutralizar desde el punto de vista ácido-base ; el segundo, que ahora se ha alcanzado un E de redisolución (igual al obtenido sin LCR) que es algo más negativo que antes . En todo caso debe insistirse en que la fenomenología es significativamente la misma.

Tabla IV.1.3.1.- LCR de cerdo (Primeros ensayos)

Disolución	Celda	Realización medida	-E (V)	I (nA)
1	Fondo	Inmediata	-	-
2	+60µl Cu ²⁺ 0.1 ppm (≈0.83 ppb)	Inmediata	0.385	20.6
3	+60µl Cu ²⁺ 0.1 ppm (≈1.66 ppb)	Inmediata	0.385	40.1
4	+ 250 µl LCR _{cerdo}	Inmediata	-	-
		A los 4 min	-	-
5	+ 200 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.346	10.6
		A los 4 min	0.356	26.7
		A los 10 min	0.356	26.9
6	+ 200 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.356	33.2
		A los 4 min	0.356	33.9
		A los 10 min	0.356	34.3
7	+ 300 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.366	43.8
		A los 4 min	0.366	44.8
		A los 10 min	0.366	45.2
8	+ 300 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.366	50.8
		A los 4 min	0.366	49.8
		A los 10 min	0.366	51.8
9	+300 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.375	54.9
		A los 4 min	0.375	55.1
		A los 10 min	0.375	55.1
10	+ 400 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.375	61.7
		A los 4 min	0.385	63.7
		A los 10 min	0.385	65.2

IV.1.3.2.- Influencia del tiempo de acumulación

Se ha repetido en las mismas condiciones el estudio realizado con el LCR procedente de perro, llegándose exactamente a las mismas conclusiones, es decir, que la incorporación de materia orgánica a la superficie del electrodo de mercurio solamente tiene lugar durante el proceso de preconcentración del analito. Por esta circunstancia, esta variable experimental no constituye un buen recurso analítico para aumentar la sensibilidad del método, contrariamente a lo que suele ocurrir en las técnicas de redisolución.

IV.1.3.3.- Influencia de la materia orgánica en la sensibilidad del método

También en este subapartado se siguió un procedimiento similar a cuando la matriz correspondía a perro. En la Tabla IV.1.3.2. , se resume la secuencia del mismo así como los resultados obtenidos.

Por lo que respecta a los valores de E, se vuelve a constatar la invariabilidad de los mismos a lo largo de todo el experimento. En cuanto a los valores de la señal de redisolución, se ratifica que en cada uno de los dos tramos en que se subdivide el estudio se mantiene una linealidad más que aceptable (desviaciones medias de 2.7 % y 8.2 %, respectivamente) si se considera el objeto fundamental que se persigue, es decir, la comparación de las dos pendientes. Como en el caso anterior y al objeto de comparar más ajustadamente los dos tramos, en la última columna de la Tabla se incluyen los valores de I corregidas suponiendo que el volumen total de la disolución se hubiera mantenido constante e igual al existente en el caso de la disolución 3 de la Tabla IV.1.3.1 . En estas condiciones, los respectivos valores de las pendientes encontradas para ambos tramos son 24.5 % y 15.4 % nA / ppb de cobre añadido (coeficiente interpendientes : 0.63) . En relación con el LCR de perro, se advierte cualitativamente el mismo fenómeno : Cuando se incorpora LCR a la celda, la sensibilidad disminuye, lo cual es achacable a la presencia de materia orgánica en la disolución que puede frenar la difusividad de la especie electroactiva y, muy especialmente, al bloqueo de parte de la superficie del electrodo de trabajo.

Pero también se constatan dos pequeñas pero significativas diferencias. Así, mientras que las pendientes del primer tramo son prácticamente iguales para los casos LCR de perro y de cerdo, en este segundo estudio se observa una mayor disminución de la pendiente en el segundo tramo ; de hecho el coeficiente interpendientes ha pasado de 0.77 a 0.63, fenómeno que indica que la presencia de materia orgánica en el segundo experimento ha tenido mayor actividad, lo que puede interpretarse sobre la base de que en la muestra de cerdo hay algo más de materia orgánica que en la muestra de perro, lo cual corrobora una de las primeras conclusiones obtenidas en este apartado (la alternativa de que las composiciones cualitativas de ambos LCR sean diferentes es mucho menos verosímil que la que basa la diferencia de los resultados en una pequeña divergencia entre las composiciones cuantitativas).

Tabla IV.1.3.2.

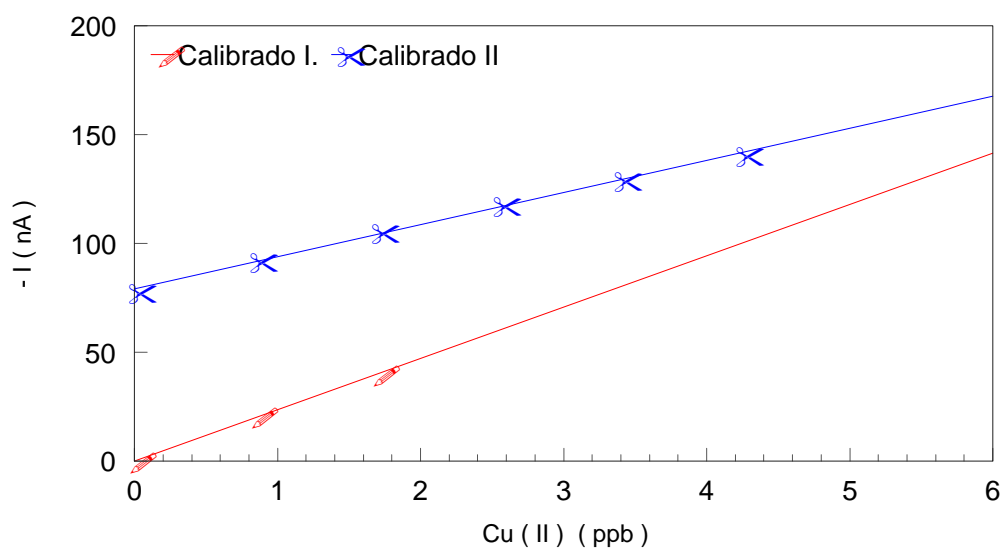
Influencia de la materia orgánica en la sensibilidad del método

Disolución	- E (V)	I (nA)	I corregida (nA)
1 de Tabla IV.1.3.1	-	-	-
2 de Tabla IV.1.3.1	0.385	20.6	20.4
3 de Tabla IV.1.3.1	0.385	40.1	40.1
10 de Tabla IV.1.3.1	0.375	61.7	78.1
+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.385	72.3	92.1
+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.385	82.1	105.3
+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.385	91.1	117.6
+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.385	99.5	129.2
+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.385	108	141.1

En la Gráfica IV.1.3.1. se han representado los dos tramos (calibrados I y II) en los que se aprecia nítidamente el elevado grado de linealidad en ambos, así como la diferencia entre sus pendientes .

GRAFICA IV.1.3.1

(Calibrados referidos a un volumen constante : 7.330 ml)



IV.1.3.4.- Determinación del contenido de cobre en LCR de cerdo

También en este subpartado se ha seguido la misma metodología que en el homólogo anterior. Aplicando la matemática ya indicada a cualquiera de los calibrados I o II, se deduce :

- En la disolución 10 de la Tabla IV.1.3.1. hay una concentración de cobre de 5.06 ppb.
- La adición de 250 μ l de LCR a 7.33 ml de disolución supone un aumento en la concentración de cobre en dicha disolución de : $5.06 - (2 \times 0.82) = 3.42$ ppb.
- La concentración de cobre en el LCR del cerdo es : $3.42 \times 7330 / 250 = 100.3$ ppb, es decir, conforme a los contenidos encontrados en la bibliografía.

IV.1.4.- Ensayos con LCR humano

IV.1.4.1.- Primeros ensayos

Una vez completados los experimentos diseñados con muestras procedentes de animales y a la vista de los esperanzadores resultados obtenidos, se decidió completar este estudio sobre muestras reales (sin tratar previamente, sin mineralizar, etc.) con un tercer bloque dedicado a LCR humano. Para ello, en principio, se ha seguido una sistemática de trabajo semejante a las anteriores. En la Tabla IV.1.4.1. se han resumido los primeros ensayos efectuados, así como los resultados de los mismos.

Tabla IV.1.4.1.- LCR humano (Primeros ensayos)

Disolución	Celda	Realización medida	-E (V)	I (nA)
1	Fondo	Inmediata	0.414	1.84
2	+60µl Cu ²⁺ 0.1 ppm (≈0.83 ppb)	Inmediata	0.405	17.2
3	+60µl Cu ²⁺ 0.1 ppm (≈1.66 ppb)	Inmediata	0.405	37.8
4	+ 250 µl LCR _{humano}	Inmediata	0.356	94.2
		A los 4 min	0.356	98.0
		A los 10 min	0.356	99.2
5	+ 300 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.366	105
		A los 4 min	0.366	105
		A los 10 min	0.366	106
6	+ 300 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.375	103
		A los 4 min	0.375	101
		A los 10 min	0.375	103
7	+ 400 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.385	100
		A los 4 min	0.385	103
		A los 10 min	0.385	103
8	+ 400 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.395	91.4
		A los 4 min	0.395	93.0
		A los 10 min	0.395	91.0
9	+ 400 µl EN 0.15 M	Inmediata	0.395	86.8
		A los 4 min	0.395	87.3
		A los 10 min	0.395	86.9

Capítulo IV . Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR .

En primer lugar debe destacarse que la fenomenología , en lo que se refiere a potenciales, es una repetición de la descrita para las muestras procedentes de animales y que básicamente se resume en los siguientes aspectos :

- Cuando se incorpora el LCR a la celda el potencial de la señal se desplaza hacia valores menos negativos.

- A medida que se añade EN, dicho potencial evoluciona hasta alcanzar valores próximos a los originales.

Sin embargo, la magnitud de la señal no ofrece el mismo comportamiento. Así, al añadir el LCR, I aumenta significativamente (antes disminuía e incluso desaparecía) y sigue aumentando conforme se adiciona EN ; pero este aumento es claramente de menor cuantía que en los estudios precedentes. De otra parte, cuando la cantidad añadida de EN es suficientemente elevada, incluso se observa una ligera disminución de I , fenómeno también observado por los autores que estudiaron el comportamiento electroanalítico del agua de mar (**1**) . Por aplicación sencilla de las hipótesis elaboradas en los anteriores apartados, todos estos fenómenos tienen una explicación inmediata : El LCR humano (al menos el disponible para estos experimentos) aporta una cantidad de materia orgánica sustancialmente más pequeña que el LCR procedente de animales , lo cual facilita aún más las cosas a la hora de establecer un procedimiento para la determinación de cobre en matrices humanas. Estas conclusiones quedan aún más corroboradas si se observa la evolución del pH y la necesidad de algo menos de cantidad de EN para alcanzar situaciones similares : 2.9 ml (1.2+1.7) de EN para alcanzar un $E = -0.385$ V (disolución 10 de la Tabla IV.1.3.1 : LCR de cerdo) frente a 2.2 ml (1.2+1.0) de EN para alcanzar el mismo potencial (disolución 7 de la Tabla IV.1.4.1. : LCR humano) .

En este caso se observa también que el tiempo de contacto entre el electrodo y la disolución con LCR no afecta para nada a los resultados, los cuales, por otra parte y en primera aproximación, tienen un buen grado de repetitividad.

IV.1.4.2.- Influencia del tiempo de acumulación

Se ha tomado para este estudio la disolución 7 de la Tabla IV.1.4.1. , dado que en esta disolución se puede suponer que hay suficiente EN como para que la práctica totalidad del cobre presente en la celda esté bajo el control de dicho reactivo. Los detalles del estudio , así como los resultados más sobresalientes, aparecen en la Tabla IV.1.4.2.

Tabla IV.1.4.2. Influencia del tiempo de acumulación.
(Composición de la disolución y parámetros experimentales iguales a los de la disolución 7 contemplada en la Tabla IV.1.4.1.)

T acumulac (min)	-E (V)	I (nA)	I / Tac
1	0.385	100	100
2	0.385	143	71.5
3	0.385	171	57
5	0.405	209	42
(repetición)	0.405	211	42

A primera vista se llega a las mismas conclusiones que en los estudios anteriores :

- Los resultados se repiten.

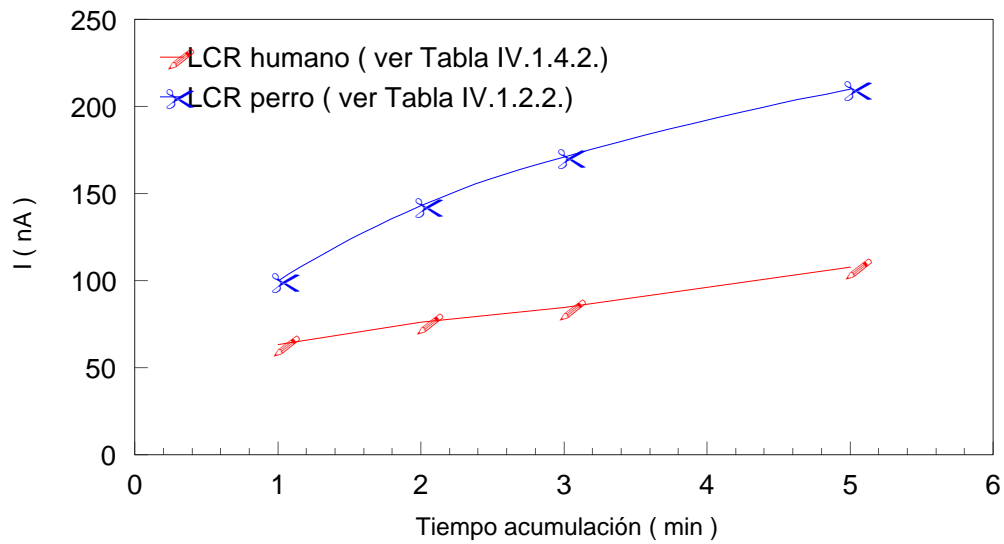
- Trabajando al potencial de deposición de -1.000 V , la materia orgánica procedente del LCR bloquea progresivamente la superficie eficaz del electrodo de mercurio, como se deduce de que la relación entre intensidad de señal y tiempo de deposición no se mantiene constante sino que disminuye y esta disminución es tanto mayor cuanto mayor es el tiempo de acumulación.

Pero si desde una perspectiva cualitativa el fenómeno es el mismo cuando se opera con matrices animales que con humanas, hay una diferencia de matiz cuantitativo que interesa destacar . Cuando se representan gráficamente los datos contenidos en las Tablas IV1.2.2. y IV.1.4.2. (Gráfica IV.1.4.1.), se observan diferentes evoluciones ; éstas, referidas a fenómenos de superficie (como los adsorptivos) ponen de manifiesto que en el primer caso (LCR de perro) la superficie de la gota ha alcanzado un grado de saturación muy superior al observado para el segundo caso (LCR humano) . De todo lo cual se deduce, una vez más, que la presencia de materia orgánica en el LCR humano con el que se está trabajando tiene menor transcendencia electroanalítica que en el caso del LCR de perro del que se ha dispuesto.

Y otro corolario : La menor saturación del electrodo abre la posibilidad de acudir al tiempo de preconcentración como recurso instrumental colaborador en el aumento de la sensibilidad del método analítico. Esta reflexión ha inspirado la realización del experimento que se expone a continuación, en el que se evalúan simultáneamente los aspectos positivos del tiempo de acumulación y los aspectos negativos de la materia orgánica en relación con la sensibilidad del método.

GRAFICA IV.1.4.1.

Comparación del comportamiento LCR humano y de perro con el Tac.



IV.1.4.3.- Influencia simultánea del tiempo de acumulación y de la materia orgánica en la sensibilidad del método

Ya se ha indicado la posibilidad de acudir al tiempo de acumulación como factor estimulante de la sensibilidad cuando la cantidad de materia orgánica lo permite, requisito que parece cumplirse con la matriz en estudio. Con las matrices de origen animal ya se ha evaluado la diferencia entre trabajar en ausencia o en presencia de materia orgánica, habiéndose introducido la importancia y la aplicación del término “ coeficiente interpendientes ”. En este caso, con el LCR humano, se repitió el experimento pero a dos tiempos de acumulación diferentes : 1 y 2 minutos. Los resultados más significativos se han resumido en la Tabla IV.1.4.3.

Tabla IV.1.4.3. Influencia del tiempo de acumulación y de la materia orgánica en la sensibilidad del método.

Disolución	- E (V)	T ac = 1 minuto		T ac = 2 minutos	
		I (nA)	I corregida (nA)	I (nA)	I corregida (nA)
1 de Tabla IV.1.4.1	0.414	1.84	1.81	-	-
2 de Tabla IV.1.4.1	0.405	17.2	17.06	-	-
3 de Tabla IV.1.4.1	0.405	37.8	37.8	-	-
9 de Tabla IV.1.4.1	0.395	86.8	111.08	141	180.43
+60 µl Cu ²⁺ 0.1ppm	0.395	103	132.65	167	215.07
+60 µl Cu ²⁺ 0.1ppm	0.395	115	149.05	184	238.47
+120 µl Cu ²⁺ 0.1ppm	0.395	144	188.99	222	291.36
+120 µl Cu ²⁺ 0.1ppm	0.395	165	219.25	262	348.14

La nota más destacada (utilizando tiempo de acumulación 1 minuto) es que las pendientes de los calibrados I y II toman el mismo valor : 22.0 nA / ppb . Esto quiere decir que, cuando se opera con esta muestra de LCR humano , no sólo el contenido en materia orgánica es significativamente más pequeño que en las matrices de animales, sino que la concentración puesta de EN ha condicionado que la disminución de superficie eficaz del electrodo de trabajo no sea significativa. Por otra parte, las desviaciones medias de los calibrados I y II son también muy parecidas (15.0 % y 14.8 % respectivamente).

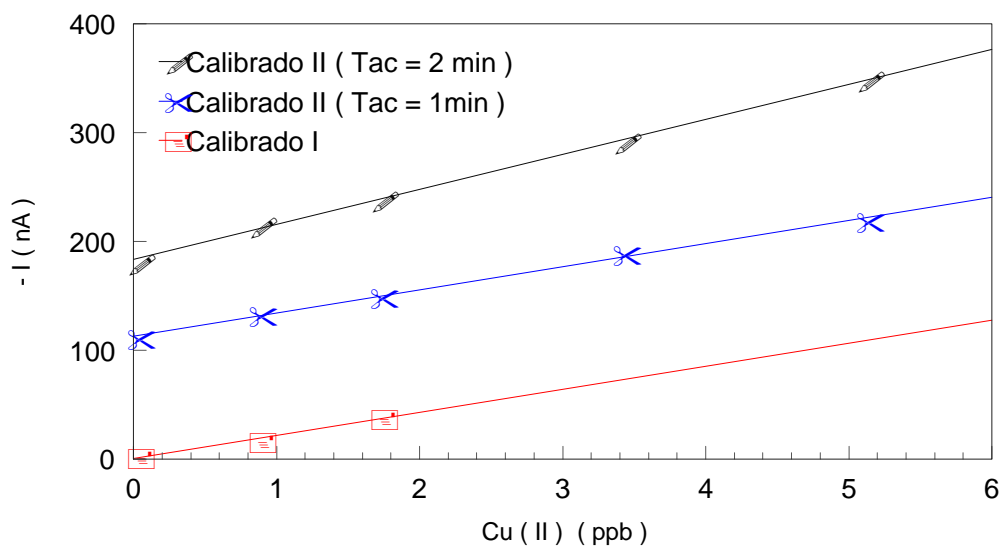
Cuando se opera con tiempo de acumulación igual a dos minutos, sólo se han recogido datos correspondientes al calibrado II , pero en todo caso son suficientes para deducir las conclusiones pretendidas en el estudio. Se observa que la pendiente aumenta hasta 32.9 nA / ppb (del orden del 50 %) , así como que la desviación media del calibrado disminuye hasta un 9.9%, es decir, mejora sensiblemente .

En la Gráfica IV.1.4.2. se reflejan los calibrados I y II para $T_{ac} = 1$ min y el calibrado II para $T_{ac} = 2$ min. De todo lo cual se deduce, tal y como se predijo anteriormente, que la sensibilidad del método se mejora aumentando el tiempo de acumulación y que la calidad del resultado también; en resumen, que en las circunstancias bajo las cuales se ha planteado la determinación del cobre presente en LCR humano , es recomendable aumentar el tiempo de acumulación de 1 hasta 2 minutos.

GRAFICA IV.1.4.2.

Influencia del tiempo de acumulación y de la materia orgánica en la sensibilidad del método

(ver Tabla IV.1.4.3)



IV.1.4.4.- Determinación del contenido de cobre en el LCR humano

Siguiendo la misma metodología que en los apartados anteriores y aplicando la matemática ya indicada, se han obtenido los resultados siguientes :

Para tiempo de acumulación 1 minuto :

- En la disolución 9 de la Tabla IV.1.4.1. hay una concentración de cobre de 5.0 ppb.
- La adición de 250 μ l de LCR a 7.33 ml de disolución supone un aumento en la concentración de cobre en dicha disolución de : $5.00 - (2 \times 0.82) = 3.36$ ppb.
- La concentración de cobre en el LCR humano es : $3.36 \times 7330 / 250 = 98.5$ ppb.

Para tiempo de acumulación 2 minutos :

- En la disolución 9 de la Tabla IV.1.4.1. hay una concentración de cobre de 5.47 ppb.
- La adición de 250 μ l de LCR a 7.33 ml de disolución supone un aumento en la concentración de cobre en dicha disolución de : $5.47 - (2 \times 0.82) = 3.83$ ppb.
- La concentración de cobre en el LCR humano es : $3.83 \times 7330 / 250 = 112$ ppb.

Ambos resultados quedan incluidos en el intervalo de normalidad encontrado en la bibliografía.

IV.1.4.5.- Optimización del procedimiento para analizar LCR humano

Los experimentos realizados hasta el presente momento con LCR han permitido, en resumen, varias conclusiones de elevado interés analítico, por ejemplo :

- Es posible determinar cobre en muestras “crudas” (sin pretratamiento) de LCR.
- Parece que el LCR humano tiene menor contenido en materia orgánica que el procedente de perro y cerdo.
- Se necesita controlar la concentración de EN presente en la celda.
- Cuanto menor es la concentración de materia orgánica , mayor es la posibilidad de acudir al tiempo de preconcentración como factor estimulante de la sensibilidad del método.

Inspirados en estas primeras conclusiones se ha diseñado el siguiente experimento, encaminado a confirmar y evaluar las posibilidades analíticas de los factores procedimentales:

- a) Concentración de LCR en celda, es decir, concentración de M.O.
- b) Tiempo de acumulación empleado.

En la Tabla IV.1.4.4. aparece el primer ensayo en el que se mantiene el procedimiento general, pero se emplean cantidades menores de las habituales de LCR, de volumen de cobre estándar para cada adición y, como ya se ha indicado, de EN. Debe indicarse en primer término que el experimento ha discurrido de manera similar a los anteriores, en cuanto a evolución de pH, potenciales e intensidades.

Otro tanto puede decirse de la segunda parte del experimento, cuyos detalles fundamentales y resultados experimentales más inmediatos aparecen en la Tabla IV.1.4.5. y quedan representados en la Gráfica IV.1.4.3. Del procesado de estos resultados se han obtenido valores de las pendientes de los calibrados I y II, de sus desviaciones medias, del coeficiente interpendientes y del contenido de cobre en el LCR conforme a los esperados.

Tabla IV.1.4.4.

Disolución	Celda	Realización medida	-E (V)	I (nA)
1	Fondo	Inmediata	0.385	1.69
2	+30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm (\approx 0.41 ppb)	Inmediata	0.405	12.7
3	+30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm (\approx 0.82 ppb)	Inmediata	0.405	22.3
4	+ 100 μ l LCR _{humano}	Inmediata	0.366	50.4
		A los 4 min	0.366	47.3
		A los 10 min	0.366	45.2
5	+ 100 μ l EN 0.15 M	Inmediata	0.375	44.9
		A los 4 min	0.375	43.3
		A los 10 min	0.375	43.6
6	+ 100 μ l EN 0.15 M	Inmediata	0.375	42.2
		A los 4 min	0.375	40.6
		A los 10 min	0.375	41.3

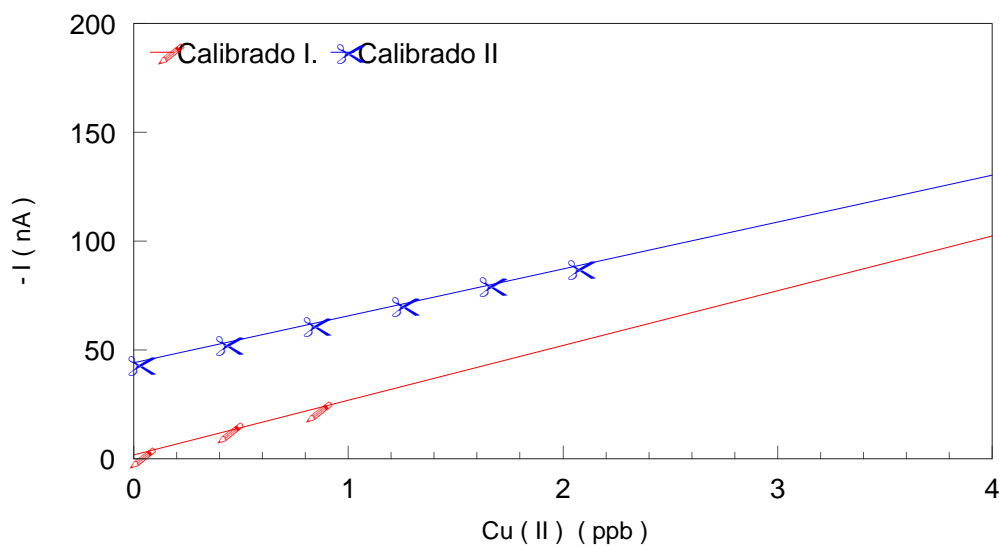
Tabla IV.1.4.5. Influencia de la materia orgánica en la sensibilidad del método.

Disolución	-E (V)	I (nA)	I corregida (nA)
1 de Tabla IV.1.4.4	0.385	1.69	1.68
2 de tabla IV.1.4.4	0.405	12.7	12.65
3 de Tabla IV.1.4.4	0.405	22.3	22.3
6 de Tabla IV.1.4.4	0.375	42.2	43.9
+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.375	50.7	53.0
+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.375	59.0	61.9
+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.375	67.4	71.0
+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.385	75.3	79.7
+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.385	82.9	88.0

GRÁFICA IV.1.4.3

Influencia de la M.O. en la sensibilidad del método

(Ver Tabla IV.1.4.5)



Por último, y según las previsiones, la cantidad de EN necesaria para conseguir la concentración óptima ha disminuido sustancialmente, como consecuencia de que las concentraciones de los dos materiales que interactúan con ella (cobre y, sobre todo, materia orgánica) también han disminuído.

A continuación se desarrolló un nuevo experimento, rebajando todavía más la cantidad de LCR empleado. En las Tablas IV.1.4.6. y IV.1.4.7. se resumen los resultados experimentales del mismo, los cuales merecen comentarios en todo semejantes a los efectuados en el caso anterior y que serán en su conjunto objeto de una discusión posterior.

Sobre estas mismas disoluciones se ha ensayado el operar con tiempos de acumulación superiores a 1 minuto, al objeto de buscar la confirmación de que dicha variable instrumental también en este caso puede tener utilidad analítica. Para ello, se ha repetido cada medida del experimento empleando 2 y 5 minutos como tiempos de acumulación. En ningún momento se ha observado fenómeno o comportamiento diferentes a los descritos en los estudios precedentes. Los resultados experimentales aparecen en la Tabla IV.1.4.8. y Gráfica IV.1.4.4. En ambas pueden constatarse las previsiones ya adelantadas y que en conjunto se comentan a continuación.

Tabla IV.1.4.6

Disolución	Celda	Realización medida	-E (V)	I (nA)
1	Fondo	Inmediata	0.385	3.62
2	+20 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm (\approx 0.28 ppb)	Inmediata	0.395	10.5
3	+20 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm (\approx 0.57 ppb)	Inmediata	0.395	19.2
4	+ 50 μ l LCR _{humano}	Inmediata	0.366	31.5
5	+ 100 μ l EN 0.15 M	Inmediata	0.375	26.3
6	+ 100 μ l EN 0.15 M	Inmediata	0.375	25.9
7	+ 100 μ l EN 0.15 M	Inmediata	0.385	25.0

Tabla IV.1.4.7. Influencia de la materia orgánica en la sensibilidad del método.

Disolución	-E (V)	I (nA)	I corregida (nA)
1 de Tabla IV.1.4.6	0.385	3.62	3.60
2 de Tabla IV.1.4.6	0.395	10.5	10.5
3 de Tabla IV.1.4.6	0.395	19.2	19.2
7 de Tabla IV.1.4.6	0.385	25.0	26.2
+ 20 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.385	31.2	32.8
+ 20 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.395	37.7	39.8
+ 20 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.395	43.9	46.4
+ 20 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.395	50.9	54.0

Tabla IV.1.4.8. Influencia del tiempo de acumulación y de la materia orgánica en la sensibilidad del método.

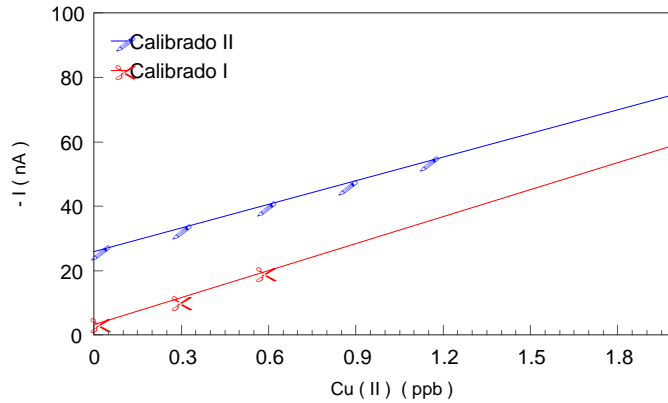
Disolución	- E (V)	T ac = 1 minuto		T ac = 2 minutos		T ac = 5 minutos	
		I (nA)	I corregida (nA)	I (nA)	I corregida (nA)	I (nA)	I corregida (nA)
1 de Tabla IV.1.4.6	0.385	3.62	3.60	7.42	7.38	23.9	23.8
2 de Tabla IV.1.4.6	0.395	10.5	10.5	22.6	22.5	60.5	60.3
3 de Tabla IV.1.4.6	0.395	19.2	19.2	39.1	39.1	96.1	96.1
7 de Tabla IV.1.4.6	0.385	25.0	26.2	45.8	48.1	120	125.9
+20 µl Cu ²⁺ 0.1ppm	0.385	31.2	32.8	57.7	60.7	145	152.6
+20 µl Cu ²⁺ 0.1ppm	0.395	37.7	39.8	69.1	72.9	174	183.6
+20 µl Cu ²⁺ 0.1ppm	0.395	43.9	46.4	79.8	84.4	202	213.7
+20 µl Cu ²⁺ 0.1ppm	0.395	50.9	54.0	94.9*	100.7	232	246.1

(*) : Este dato se ha desechado toda vez que su desviación es superior a 10 veces la desviación media de los restantes datos de la serie.

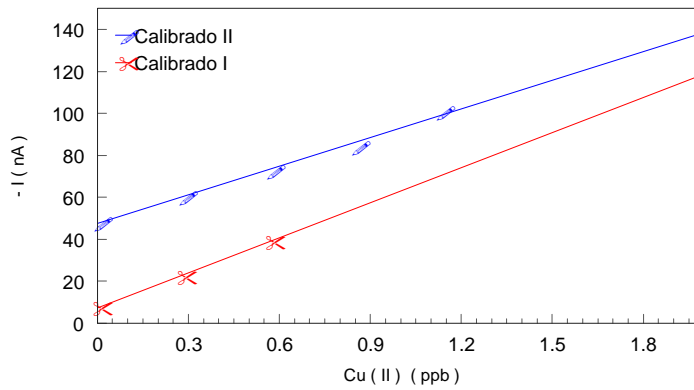
GRAFICA IV.1.4.4

Influencia del tiempo de acumulación y de la materia orgánica en la sensibilidad del método (Ver Tabla IV.1.4.8)

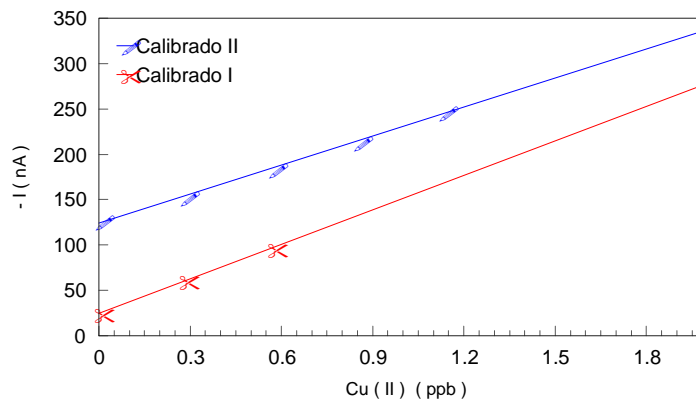
a : 1 minuto acumulación



b : 2 minutos acumulación



c : 5 minutos acumulación



Capítulo IV . Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR .

En la Tabla IV.1.4.9. se ha tratado de incluir todos aquellos datos relevantes de los ensayos efectuados con LCR humano, así como los resultados más significativos de los mismos. A la luz de todo ello y en absoluta concordancia con las hipótesis elaboradas hasta ahora, se puede sacar en conclusión lo siguiente:

1 . - Es fundamental controlar la cantidad de EN a emplear. De manera que cantidades superiores o inferiores de EN no proporcionan señales de redisolución de calidad analítica : valores de I inferiores en cuantía y en estabilidad. En todo caso, el rango óptimo de cantidad de EN es suficientemente amplio como para conseguirlo fácilmente ; en primer término, está en proporción con la cantidad de materia orgánica presente en la celda, que a su vez depende de la cantidad y procedencia del LCR objeto de análisis. Los indicadores procedimentales más prácticos para alcanzar la concentración idónea de EN son :

- + Valores de pH próximos a 9.3 .
- + Valores de E de redisolución próximos al obtenido en ausencia de LCR.
- + Coeficiente interpendientes entre calibrados I y II próximo a 0.8 .

2 . - El procedimiento descrito permite analizar cobre en LCR humano siendo suficiente para ello cantidades de 50 μ l de LCR e incluso inferiores.

3 . - Operando con estas magnitudes de muestra , el método permite tiempos de acumulación de cobre de 5 minutos o superiores.

4 . - Combinando los puntos 2 y 3 , es seguro que se pueda determinar cobre en LCR a partir de muestras no superiores a 10 μ l. Pero llegados a este punto debe incorporarse una nueva variable, que no es otra que la etapa de muestreo. Efectivamente, la dificultad práctica de extraer tan pequeñas cantidades de LCR , así como la probabilidad creciente de contaminar dichas cantidades, sugieren un estudio especial que espera llevarse a cabo inmediatamente después de este trabajo. En todo caso, lo que sí constituye el procedimiento aquí diseñado es una puerta abierta al análisis “in situ” de cobre en LCR.

5 . - A pesar de que los experimentos efectuados han sido un tanto dispersos en cuanto a cantidades, tiempos, etc. , los resultados de los llevados a cabo en condiciones más precarias de muestra disponible (100 y 50 μ l de LCR) proporcionan un contenido medio de 83 ppb de cobre en muestra y una DM de 9.4 % .

6 . - El empleo de mayores tiempos de acumulación no introduce mejoras de precisión en los resultados. Sin embargo, empleando tiempos de 5 minutos la magnitud de las señales se multiplica aproximadamente por cuatro en relación a la obtenida con tiempo de acumulación 1 minuto, lo cual permite con toda seguridad rebajar aún más el volumen de muestra , si ello fuera necesario.

Tabla IV.1.4.9 . Resumen de los resultados obtenidos al operar con LCR humano.

Ensayo	1	2	3		
Características más importantes	250 µl de LCR 3.0 ml de EN 60 µl Cu ²⁺ por adición	100 µl de LCR 1.4 ml de EN 30 µl Cu ²⁺ por adición	50 µl de LCR 1.3 ml de EN 20 µl Cu ²⁺ por adición		
T acumulación.	1 min.	1 min.	1 min.	2 min.	5 min
Calibrado I	Pendiente ^a : 18.0 Pendiente ^b : 3.0 DM : 15 %	Pendiente ^a : 10.3 Pendiente ^b : 3.4 DM : 5.8 %	Pendiente ^a : 7.8 Pendiente ^b : 3.9 DM : 11.5 %	Pendiente ^a : 15.8 Pendiente ^b : 7.9 DM : 4.7 %	Pendiente ^a : 36.1 Pendiente ^b : 18.1 DM : 1.4 %
Calibrado II	Pendiente ^a : 18.0 Pendiente ^b : 3.0 DM : 14.8 %	Pendiente ^a : 8.82 Pendiente ^b : 2.9 DM : 2.9 %	Pendiente ^a : 6.95 Pendiente ^b : 3.5 DM : 4.3 %	Pendiente ^a : 12.1 Pendiente ^b : 6.1 DM : 3.3 %	Pendiente ^a : 28.0 Pendiente ^b : 14.0 DM : 5.4 %
Coefficiente interpendientes	1.00	0.86	0.89	0.76	0.78
Cu en LCR (ppb)	98.4	89.4	70.8	79.2	91.6

Pendiente ^a : nA / adición . Pendiente ^b : nA / 10 µl de Cu²⁺ de 100 ppb ≈ nA / 0.14 ppb de Cu²⁺ en celda.

La disolución de Cu²⁺ empleada para las adiciones es de 100 ppb.

IV.1.5.- Calidad analítica de los resultados

IV.1.5.1.- Evaluación de la precisión del método

Al objeto de evaluar la precisión del método desarrollado, se estudió la reproducibilidad de los resultados. Para ello se tomaron 5 muestras de LCR de perro, de 25 μ l cada una, aplicando a todas ellas el procedimiento descrito en apartados precedentes, es decir : blanco, dos adiciones de cobre patrón, incorporación de la muestra, ajuste de la EN necesaria y tres adiciones más de cobre patrón . Los resultados se muestran en la Tabla IV.1.5.1. , en la que puede comprobarse que el método seguido ofrece una elevada calidad en cada una de las medidas (elevados valores de r) y , por otra parte, que la precisión obtenida para las cinco determinaciones presenta igualmente un valor elevado (desviación media relativa : 1.9 %) .

Tabla IV.1.5.1. : LCR de perro (sin tratamiento previo)

V total (ml)	Señal LCR	Recuper. (ppb)	r
8.685	8.4	116	0.9993
8.685	9.2	112	0.9997
8.585	8.2	110	0.9995
7.985	9.2	116	0.9998
8.595	8.7	113	0.9999

Valor Medio : 113.4 ppb

IV.1.5.2.- Evaluación de la exactitud del método

El presente apartado constituye sólo un intento de evaluación de la exactitud del método analítico desarrollado, toda vez que no se ha dispuesto de muestras patrón de LCR en las que se conozca su contenido en cobre . En sustitución de las mismas se ha procedido a la determinación del cobre en LCR previa mineralización del mismo con un sistema de tratamiento ácido en alta presión ; paralelamente se ha confirmado la ausencia de cobre en los reactivos (HNO_3 y HCl concentrados) empleados . Se han mineralizado porciones de 500 μl de LCR de perro a las que se añadía 1.5 ml de HNO_3 concentrado ; después del tratamiento a alta presión, se han llevado las disoluciones a sequedad y posteriormente se han recogido con una mezcla de 2 ml de agua y 20 μl de HCl concentrado . Para cada análisis se han utilizado alícuotas de 100 μl , cuyo contenido en cobre corresponde a 25 μl de LCR sin tratar . Paralelamente se han efectuado otros dos análisis empleando LCR sin tratar . En la Tabla IV.1.5.2. se han resumido los resultados obtenidos a partir de los cuatro análisis efectuados , de los cuales se concluye que el procedimiento desarrollado para el análisis directo (sin tratamiento previo alguno) de cobre en LCR de perro reúne elevadas garantías analíticas .

Tabla IV.1.5.2 : LCR de perro

Muestra	Análisis	r	Cu en LCR (ppb)	Media
25 μl disolución LCR de perro sin mineralizar	1	0.9995	107	108
	2	0.9999	109	
100 μl disolución LCR de perro mineralizado	1	0.9993	105	106
	2	0.9998	107	

En las Figuras IV.1.1.D.1. y IV.1.1.D.2. se han recogido, como curiosidad los datos y gráficos proporcionados por el aparato empleado, correspondientes a los análisis de número 2 de las muestras sin mineralizar y mineralizada respectivamente.

FIGURA IV.1.1.D.1.

MUESTRA SIN MINERALIZAR. LCR de PERRO.

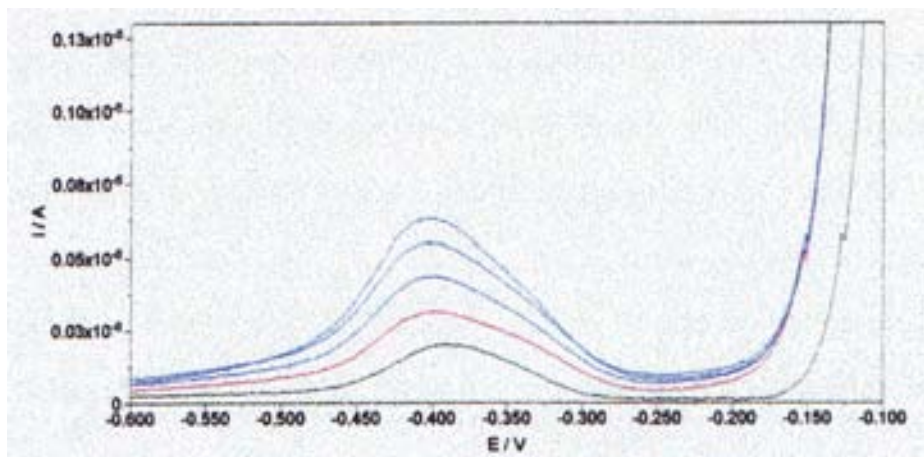
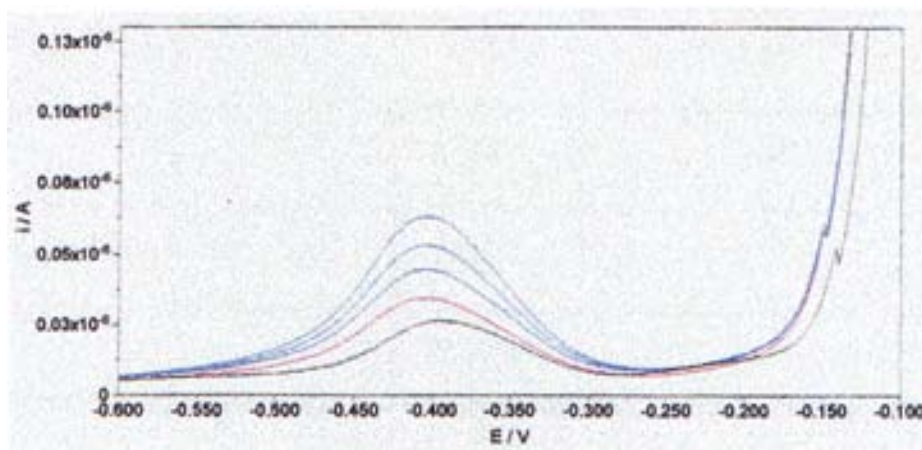


FIGURA IV.1.1.D.2 .

MUESTRA MINERALIZADA . LCR de PERRO.



En la segunda parte de este subapartado se utilizó LCR humano . No debe olvidarse que el último propósito de esta Memoria no era sino desarrollar un nuevo procedimiento analítico que proporcionara ventajas de tipo práctico frente a los por ahora conocidos y aplicados. De ahí que los últimos ensayos se hayan realizado con LCR humano, pese a las grandes dificultades para disponer de muestra. Obviamente, tampoco se dispone de muestras estándar de LCR humano cuyo contenido en cobre se conozca, de tal manera que, como aproximación, se ha recurrido a la muestra disponible, mineralizando una parte y sometiendo a análisis directo la otra parte. El procedimiento seguido ha sido exactamente el ya descrito para el LCR de perro, con la diferencia de que en esta ocasión se ha partido de una porción de 200 μ l para mineralizar (en vez de 500 μ l) de LCR , recogiendo el mineralizado con 800 μ l de agua y 10 μ l de HCl concentrado.

Los resultados se exponen en la Tabla IV.1.5.3., donde se pueden repetir los mismos comentarios que para el caso del LCR de perro y confirmar las conclusiones indicadas en dicho caso.

Tabla IV.1.5.3 : LCR humano.

Muestra	Análisis	r	Cu en LCR (ppb)	Media
25 μ l disolución LCR humano sin mineralizar	1	0.9996	118	115
	2	0.9998	112	
100 μ l disolución LCR humano mineralizado	1	0.9997	112	110
	2	0.9996	108	

En las Figuras IV.1.5.3. y IV.1.5.4. se han recogido, como curiosidad, los datos y gráficos proporcionados por el aparato empleado, correspondientes a los análisis de número 2 de las muestras sin mineralizar y mineralizada respectivamente.

FIGURA IV.1.5.3.
MUESTRA SIN MINERALIZAR. LCR HUMANO.

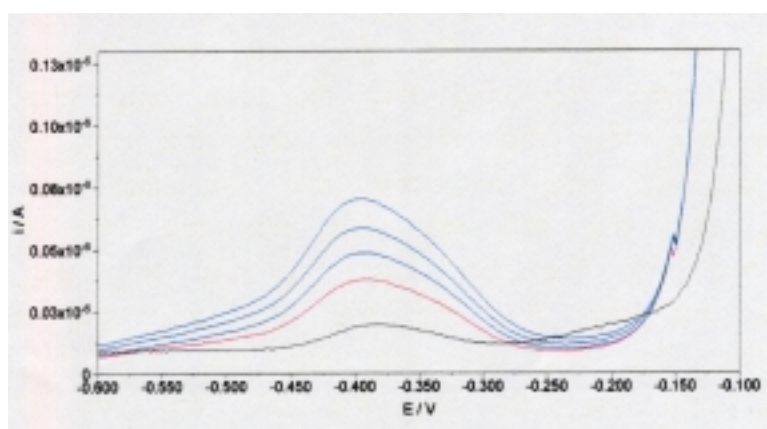
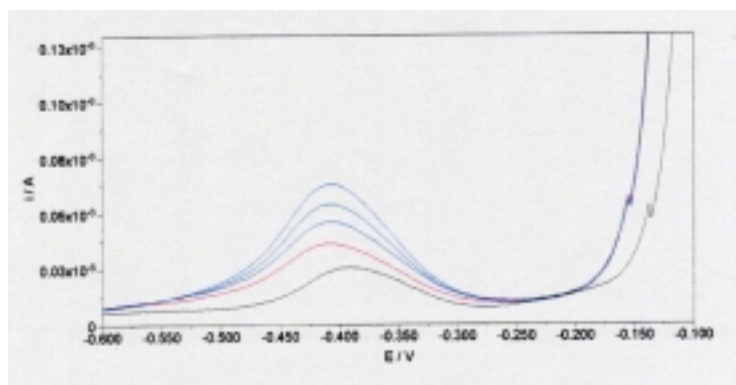


FIGURA IV.1.5.4.
MUESTRA MINERALIZADA. LCR HUMANO.



IV.1.6.- Ensayos con derivados de la EN

El capítulo III de la presente Memoria se dedicó al estudio y evaluación de la potencialidad analítica de algunos derivados de la EN como agentes modificadores del medio para determinar cobre en muestras reales. Como continuación del citado estudio y atendiendo a las buenas perspectivas deducidas en él, en el presente apartado se realiza una evaluación de las posibilidades analíticas de los derivados N- MET- EN y DENTRI.

Para ambos reactivos se ha aplicado el procedimiento general indicado al utilizar EN en la primera parte de este capítulo. Las matrices empleadas para este estudio han sido de dos procedencias (LCR de cerdo y LCR humano) y en ambos casos se ha podido disponer de cantidad suficiente para efectuar determinaciones paralelas con muestras mineralizadas y sin mineralizar. Con la intención de suministrar el máximo interés práctico a estos ensayos se ha recurrido a la técnica analítica más rápida (SWV) y más sencilla (sin paso de N_2). Los resultados, por duplicado, se muestran en la Tabla IV.1.6.1. mientras que en las Figuras IV.1.6.1. y IV.1.6.2. se han incorporado, a modo de ejemplo ilustrativo, los voltamperogramas registrados en dos determinaciones de cobre en LCR de cerdo empleando N- MET- EN.

De todo ello se concluye que ambos reactivos son aptos para determinar cobre en LCR, como se desprende de las cantidades de cobre recuperadas y los coeficientes de regresión resultantes. No obstante y en principio, estos resultados no permiten establecer diferencias sustanciales en cuanto al empleo de uno u otro reactivo, ni siquiera cuando se los compara con los resultados obtenidos empleando EN.

TABLA IV.1.6.1.

**CALIDAD ANALÍTICA DE LOS RESULTADOS UTILIZANDO
N-MET-EN y DENTRI (LCR de cerdo y humano)**

Reactivo	Tipo de muestra	V total (ml)	Señal LCR	Recuper.(ppb)	r
N-MET-EN	LCR cerdo (sin mineralizar)	8.785	10.2	111.7	0.9998
	LCR cerdo (mineralizado)	8.460	9.7	111.7	0.9988
DENTRI	LCR cerdo (sin mineralizar)	8.485	7.4	110.3	0.9989
	LCR cerdo (mineralizado)	8.360	7.0	105.7	0.9997

Reactivo	Tipo de muestra	V total (ml)	Señal LCR	Recuper.(ppb)	r
N-MET-EN	LCR humano (sin mineralizar)	8.685	10.7	127.5	0.9999
	LCR humano (mineralizado)	8.360	10.1	114.1	0.9997
DENTRI	LCR humano (sin mineralizar)	8.485	8.1	128.9	0.9993
	LCR humano (mineralizado)	8.360	7.5	121.1	0.9997

FIGURA IV.1.6.1
MUESTRA SIN MINERALIZAR . LCR DE CERDO.
(N-MET-EN)

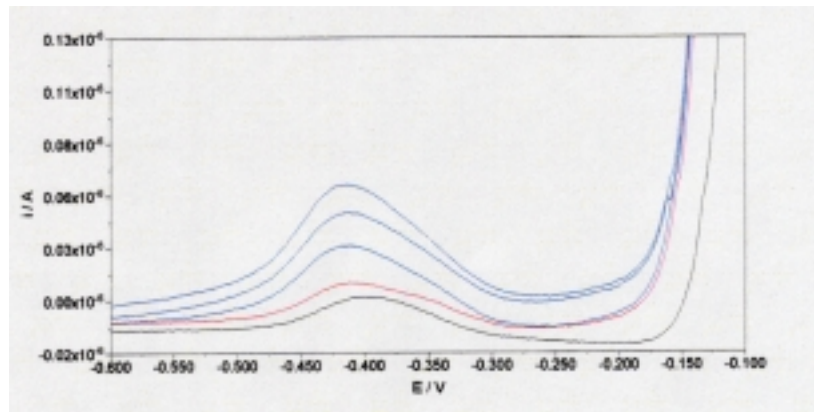
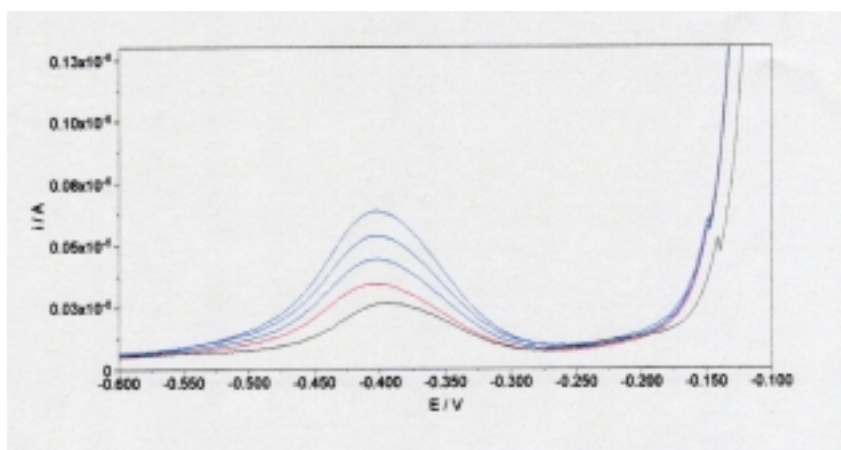


FIGURA IV.1.6.2
MUESTRA MINERALIZADA . LCR DE CERDO.
(N-MET-EN)



IV.2.- POTENCIOMETRIA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA

IV.2.1.- Planteamiento general

En el presente subcapítulo se ha llevado a cabo un estudio acerca de las posibilidades de la potenciometría de redisolución para la determinación del cobre presente en muestras reales de LCR . Al objeto de establecer comparaciones posteriores y siempre que ello ha sido posible, se han utilizado las mismas muestras que las empleadas para los estudios voltamperométricos; en concreto, se ha operado con LCR procedente de animales (perro y cerdo) y humano. La sistemática del estudio también ha sido muy parecida a la seguida en la primera mitad de este capítulo referido a voltamperometrías, salvo en aquellas facetas en que, por la propia naturaleza de ambas técnicas, ha sido necesario actuar de forma diferente. Todos los datos relativos a la cuantía de la señal van expresados con un número excesivo de cifras significativas ; ello se debe a que el instrumental empleado así los proporciona, pero debe quedar claro que en ningún caso dicho número de cifras puede interpretarse en términos de precisión de dichos datos.

IV.2.2.- Ensayos con LCR de perro

IV.2.2.1.- Primeros ensayos

En conjunto , la infraestructura experimental coincide con la expuesta en el apartado dedicado a la puesta a punto de la técnica (capítulo III de esta Memoria) ; es decir, se usó el sistema Trace Lab (Radiometer), la misma electródica, sistema de agitación, producción y procesado de señales, tratamiento estadístico, etc . Los parámetros experimentales con los que se trabajó y salvo modificaciones puntuales que se indican oportunamente , fueron los siguientes:

Eacondic. = -0.9 V	Edep. = -1.200 V	Tequilibrio.= 30 s
Tacondic. = 20 s	Tdep. = 1 min	I = 1 μ A
Stir (rpm) = posición 5		

El registro se realizó a través de un barrido de potenciales desde -1.300 V hasta -0.200 V .

Los volúmenes en celda, en general, fueron del mismo orden que los empleados en los estudios voltamperométricos. No así las cantidades de LCR usadas para cada análisis ya que , en consideración a la mayor sensibilidad que proporciona el electrodo de trabajo (película frente a gota), en esta ocasión fueron un poco menores : 100, 50 y 25 μ l ; esto ha permitido, en principio, disminuir un poco más los efectos de matriz motivados por la materia orgánica presente en la misma, si bien y como se constatará más adelante, dichos efectos son menores en esta técnica.

Capítulo IV. Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR.

En un principio se intentó seguir exactamente el protocolo usado en el estudio voltamperométrico, es decir, que las disoluciones blanco utilizadas estuvieran preparadas con agua, HCl y EN, pero se comprobó que de manera imprevista se obtenían señales erráticas y de difícil justificación. Por tal motivo se decidió aplicar el protocolo empleado en la puesta a punto de la técnica potenciométrica, que conlleva no incorporar EN desde el primer momento, sino hacerlo posteriormente después de la primera adición de Cu^{2+} . De otra parte, se sustituyó la adición de HCl por una disolución clorhídrica de Hg^{2+} ; esta disolución ya lleva el HCl deseado y, además, contribuye a afianzar la película de mercurio y con ello garantiza la estabilidad del electrodo de trabajo. Concretamente, se parte de 6.0 ml de agua y 10 μl de una disolución de Hg^{2+} que contiene 8000 mg de mercurio / l.

Como es previsible, cuando se somete a análisis esta disolución el registro correspondiente no da señal alguna. Posteriormente se añade una cantidad conveniente de disolución de Cu^{2+} de 100 ppb (para que suponga aproximadamente 1 ppb de cobre); cuando todo discurre con normalidad, esta disolución tampoco proporciona señal en el registro. A continuación se añaden sucesivas cantidades de EN, suficiente para que la señal que ahora se obtiene se estabilice en cuantía y se desarrolle a potenciales propios de la misma (en torno a -500 mV). Por último, se repite la adición de cobre al objeto de corroborar que todo el sistema analítico (aparato, electrodos, disolución) opera normalmente.

En la primera parte de la Tabla IV.2.2.1. puede observarse un ejemplo del proceso descrito hasta ahora; la disolución 5 confirma que la cantidad de EN añadida es la adecuada, puesto que la adición de 100 μl no introduce modificaciones significativas ni en la señal ni en el potencial. A continuación se añade la cantidad de LCR prevista para el análisis y se procede al definitivo acondicionamiento de la disolución, previo a las sucesivas adiciones de cobre patrón, todo lo cual configurará lo que ha venido llamándose Calibrado II.

Tabla IV.2.2.1 .- Primeros ensayos

Disolución	Celda	- E (V)	Señal (s/V)	Señal corregida
1	6ml agua, 10 μ l Hg ²⁺ 8000 mg/l	-	-	-
2	+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	-	-	-
3	800 μ l EN 0.15 M	0.490	27.400	-
4	+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.490	51.700	-
5	+ 100 μ l EN 0.15 M	0.494	50.233	-
6	+ 100 μ l LCR perro	0.494	44.267	-
7	+1500 μ l EN 0.15 M	0.514	91.933	-
8	+ 100 μ l EN 0.15 M	0.514	92.100	92.100
9	+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.514	113.500	114.80
10	+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.514	137.767	139.70
11	+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.514	159.300	162.60

Como puede apreciarse, el denominado calibrado I de los estudios voltamperométricos ahora ya no existe como tal, sino que se ha transformado en una serie de operaciones garantizadas de que el calibrado II tendrá lugar conforme a lo deseado. Es bien sabido que, aunque el electrodo de película de Hg tiene la ventaja de su mayor sensibilidad frente al de gotas, debe tenerse en cuenta que éste supera a aquél en cuanto a estabilidad de la respuesta ; por otro lado y en definitiva, cuando se ha trabajado en voltamperometría de redisolución , los cálculos del contenido en cobre de la muestra se han apoyado fundamentalmente en el calibrado II ; por todo ello, en el presente estudio potenciométrico se ha modificado el protocolo de la primera parte de los análisis, enfocando dicha parte más hacia asegurarse el correcto comportamiento del conjunto disolución-electrodo que a obtener unos datos (los del calibrado I) que en realidad no son estrictamente necesarios .

En la citada Tabla IV.2.2.1 se observa que la adición del LCR da lugar a una disminución de la señal correspondiente al cobre , fenómeno ya observado en voltamperometría y previsible, pues obedece a los mismos motivos y justificaciones que los dados en aquella ocasión. Las sucesivas adiciones de EN generan también fenómenos (evolución de potenciales y señales) idénticos a los ya descritos, llegando un momento (también cuando la EN total añadida es la esperada) en que los parámetros de la señal se estabilizan ; en el ejemplo de la Tabla IV.2.2.1. esto ocurre en la disolución 7 y, como se observa, la adición de más EN (disolución 8) no modifica los resultados de manera significativa . Una vez conseguida una señal estable y de desarrollo máximo , el experimento termina con sucesivas adiciones de cobre patrón y la constatación del aumento lógico de la señal.

Respetando el orden seguido en los estudios voltamperométricos, a continuación se procedió a evaluar la influencia del tiempo de contacto entre la disolución (con LCR ya incorporado) y la película de Hg. En la Tabla IV.2.2.2. se recoge uno de los experimentos realizados, donde se observan resultados que no hacen sino corroborar los estudios paralelos realizados por voltamperometría, sus justificaciones y sus conclusiones : La materia orgánica que aporta el LCR , al menos en las condiciones de trabajo seleccionadas, no condiciona apreciablemente la superficie eficaz del electrodo .

Tabla IV.2.2.2 .

Influencia del tiempo de contacto disolución-electrodo
(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.2.1.)

Tiempo de contacto	- E (V)	Señal (s/V)
1 minuto	0.514	159.300
3 minutos	0.514	158.200
5 minutos	0.514	161.200
10 minutos	0.514	162.200
15 minutos	0.514	161.633

IV.2.2.2.- Influencia del tiempo de acumulación.

En los estudios voltamperométricos se constató que es concretamente en la etapa de acumulación del cobre en el electrodo cuando tiene lugar casi exclusivamente el proceso de disminución de la superficie eficaz del electrodo, probablemente debido a un fenómeno adsorptivo de la materia orgánica que contiene el LCR, fenómeno al parecer estimulado en buena medida por el potencial de electrodeposición impuesto al electrodo.

Los detalles y resultados del experimento se han recogido en la Tabla IV.2.2.3., donde se aprecia, precisamente, el fenómeno contrario al observado en el estudio voltamperométrico: en esta ocasión la magnitud de la señal aumenta a un ritmo superior al del aumento del tiempo de acumulación. Este comportamiento, que a primera vista resulta contradictorio e invalida todos los argumentos dados hasta ahora en torno a cómo deben ocurrir las cosas, no hace sino confirmar todo lo establecido en relación con el fenómeno objeto de estudio.

Tabla IV.2.2.3.

Influencia del tiempo de acumulación.

T acumulac (min)	- E (V)	Señal (s/V)	Señal/Tac
1	0.514	159.300	100.0
2	0.518	417.600	208.8
3	0.520	697.967	232.6
5	0.520	1260.033	252.0

La explicación se encuentra al considerar los fundamentos de la potenciometría de redisolución y compararlos con los correspondientes a la técnicas voltamperométricas ; así, en ambos casos la etapa de preconcentración es idéntica ; un proceso en que el analito se mueve desde la disolución al electrodo y cuya cuantía está en función de la superficie eficaz de dicho electrodo ; de manera que si hay un fenómeno adsortivo, que en definitiva lo que hace es disminuir progresivamente la superficie electródica, es lógico que la cantidad de analito depositada aumente a menor ritmo que el tiempo de acumulación . Pero la diferencia entre ambas técnicas surge en la etapa de redisolución ; en las voltamperometrías la magnitud de la señal de redisolución está controlada directa y fundamentalmente por dos variables : la concentración del metal en el electrodo y la superficie de éste ; acaba de comentarse que cuando existe un fenómeno de adsorción, la primera variable disminuye progresivamente ; en cuanto a la segunda, también alcanza valores mínimos en el momento de la redisolución ; luego todo apunta a que la señal de redisolución evolucione a menor ritmo que el tiempo de acumulación (esto es exactamente lo observado en la primera parte de este capítulo).

Pero, por el contrario, la magnitud de la señal de redisolución (variable cuantitativa) en las técnicas potenciométricas no depende de las mismas variables ; más concretamente , la señal es función directa de la cantidad (no de la concentración, como antes) de metal depositado en el electrodo , pero como dicha cantidad depende de la superficie eficaz del electrodo, la incidencia de este factor en la señal de redisolución es tan negativa como la primera variable en el caso de las voltamperometrías. Sin embargo, el segundo factor que controla la magnitud de la señal en las potenciometrías es la velocidad de llegada de los agentes oxidantes (O_2 y Hg^{2+})

Capítulo IV. Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR.

desde la disolución hasta el electrodo : a menor superficie, menor ritmo de llegada de los oxidantes y mayor señal (aquí la dependencia es inversamente proporcional). En definitiva es cierto que durante la primera etapa el Cu^{2+} va encontrándose un electrodo con una superficie eficaz cada vez menor y por eso se deposita menos de lo esperado, pero no es menos cierto que los reactivos responsables de la redisolución (O_2 y Hg^{2+}) se encuentran en todo momento un electrodo cuya superficie activa es mínima. De esta forma, el tiempo de redisolución, que es la variable cuantitativa, aumenta a mayor ritmo que el tiempo de acumulación.

No es fácil predecir y mucho menos establecer una relación cuantitativa entre tiempo de acumulación y tiempo de redisolución ; en primer lugar porque en las condiciones de trabajo empleadas hay un tercer agente que interviene en la redisolución, la I anódica impuesta (esto será objeto de un estudio posterior) , y en segundo lugar porque nada se sabe de cómo evoluciona la superficie eficaz del electrodo durante la redisolución, aunque parezca probable que tenga lugar un fenómeno lento de desorción. En todo caso, los experimentos presentados y la coherente justificación de los fenómenos descritos abren un amplio campo de trabajo, tras del cual, muy probablemente, haya grandes perspectivas de interés analítico. Es decir , en este caso también se cumple el viejo axioma que dice : Todo inconveniente, dificultad, interferencia, etc. presente en un proceso analítico lleva incorporado el fundamento de nuevas aplicaciones analíticas.

IV.2.2.3.- Determinación del contenido de cobre en LCR de perro

Siguiendo la misma sistemática de cálculo que en los estudios voltamperométricos y por aplicación a los datos de la Tabla IV.2.2.1., se obtienen los resultados siguientes :

- Volumen de referencia (el de la disolución 8) : 8.73 ml.
- Pendiente ^a : 23.5 s /V / adición.
- Pendiente ^b : 3.92 s/V / 10 μl Cu^{2+} \rightarrow 3.92 s/V / 0.115 ppb Cu^{2+} \rightarrow 34.2 s/V / ppb Cu^{2+} .
- DM = 3.6 % . $r = 0.9997$.
- Concentración de Cu^{2+} presente en LCR : 115.2 ppb.

IV.2.2.4.- Influencia de la cantidad de muestra utilizada

A la luz de los buenos resultados obtenidos cuando se opera con alícuotas de 100 μl de LCR , se realizaron estudios similares a los anteriores pero con menor cantidad de muestra ; en primer lugar se operó con 50 μl de LCR y, consecuentemente, la cantidad necesaria de EN también fue menor y las adiciones estándar de cobre también fueron menores.

Las Tablas IV.2.2.4., IV.2.2.5. y IV.2.2.6. compendian los pormenores de los experimentos realizados, así como los resultados más significativos. Puede observarse que el comportamiento analítico de las disoluciones es semejante al descrito en los apartados anteriores, así : evolución de las señales ante la adición de LCR, estancamiento de las mismas al añadir LCR, desarrollo posterior con la adición de la suficiente EN e incremento lineal con las adiciones estándar de Cu^{2+} .

Tabla IV.2.2.4.

Disolución	Celda	- E (V)	Señal (s/V)	Señal corregida
1	6ml agua, 10 μ l Hg ²⁺ 8000 mg/l	-	-	-
2	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	-	-	-
3	1000 μ l EN 0.15 M	0.482	12.900	-
4	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.486	19.167	-
5	+ 300 μ l EN 0.15 M	0.486	25.233	-
6	+ 50 μ l LCR perro	0.482	26.033	-
7	+ 700 μ l EN 0.15 M	0.496	45.967	-
8	+ 100 μ l EN 0.15 M	0.496	47.000	47.000
9	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.494	58.367	58.600
10	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.494	67.533	68.000
11	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.498	77.833	78.700

Tabla IV.2.2.5.

Influencia del tiempo de contacto disolución-electrodo

(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.2.4)

Tiempo de contacto	- E (V)	Señal (s/V)
1 minuto	0.498	77.833
3 minutos	0.496	80.200
5 minutos	0.496	79.900
10 minutos	0.496	79.991
15 minutos	0.496	80.000

Tabla IV.2.2.6 .

Influencia del tiempo de acumulación.

(Disolución utilizada : 11 de la Tabla IV.2.2.4)

T acumulac (min)	- E (V)	Señal (s/V)	Señal / Tac
1	0.498	77.833	77.833
2	0.500	235.300	117.650
3	0.502	382.967	127.656
5	0.506	778.300	155.660

En la Tabla IV.2.2.5. también se constata el mismo fenómeno que en el estudio homólogo anterior : la magnitud de la señal de redisolución no se ve influenciada por el tiempo de contacto disolución-electrodo cuando el circuito permanece abierto.

Cuando se estudia la influencia del tiempo de acumulación la fenomenología observada sigue repitiéndose , es decir, la magnitud de la señal de redisolución aumenta a mayor ritmo del que lo hace el tiempo de acumulación ; por lo tanto, siguen siendo válidos los argumentos justificativos ya expresados, a la vez que sigue comprometido para más adelante un estudio en profundidad de este comportamiento.

Aplicando los cálculos habituales a los datos recogidos en la Tabla IV.2.2.4. , se obtienen los resultados siguientes :

- Volumen de referencia (el de la disolución 8) : 8.22 ml.
- Pendiente ^a : 10.6 s /V / adición.
- Pendiente ^b : 3.53 s/V / 10 µl Cu²⁺ → 3.53 s/V / 0.1217 ppb Cu²⁺ → 29.0 s/V/ ppb Cu²⁺ .
- DM = 7.2 % . r = 0.9992.
- Concentración de Cu²⁺ presente en LCR : 145.8 ppb.

En el tercer bloque de experimentos de esta serie se emplearon 25 μl de LCR, adiciones estándar de Cu^{2+} de 30 μl y la cantidad necesaria de EN fue obviamente menor, 1.70 ml. En las Tablas IV.2.2.7., IV.2.2.8. y IV.2.2.9. se resumen las condiciones y resultados correspondientes, donde se pueden observar, una vez más, los mismos fenómenos, por lo que se omite aquí su repetición, así como los pertinentes comentarios.

Tabla IV.2.2.7.

Disolución	Celda	- E (V)	Señal (s/V)	Señal corregida
1	6ml agua.10 μl Hg^{2+} 8000 mg/l	-	-	-
2	+ 30 μl Cu^{2+} 0.1 ppm	-	-	-
3	+ 1000 μl EN 0.15 M	0.468	13.733	-
4	+ 30 μl Cu^{2+} 0.1 ppm	0.468	23.433	-
5	+25 μl LCR perro	0.460	24.000	-
6	+ 600 μl EN 0.15 M	0.470	32.700	-
7	+ 100 μl EN 0.15 M	0.474	32.800	32.800
8	+ 30 μl Cu^{2+} 0.1 ppm	0.474	43.067	43.233
9	+ 30 μl Cu^{2+} 0.1 ppm	0.474	54.167	54.584
10	+ 30 μl Cu^{2+} 0.1 ppm	0.476	64.400	65.144

Tabla IV.2.2.8 .

Influencia del tiempo de contacto disolución-electrodo

(Disolución usada : 10 de la Tabla IV.2.2.7.)

Tiempo de contacto	- E (V)	Señal (s/V)
1 minuto	0.476	64.400
3 minutos	0.474	58.767
5 minutos	0.474	57.567
10 minutos	0.474	56.167
15 minutos	0.472	52.933

Tabla IV.2.2.9.

Influencia del tiempo de acumulación.

(Disolución usada : 10 de la Tabla IV.2.2.7)

T acumulac (min)	- E (V)	Señal (s/V)	Señal / Tac
1	0.476	64.400	64.400
2	0.478	156.433	78.217
3	0.480	275.667	91.889
5	0.484	524.300	104.860

Capítulo IV. Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR.

Aplicando los cálculos habituales a los datos recogidos en la Tabla IV.2.2.7., se obtienen los resultados siguientes :

- Volumen de referencia (el de la disolución 7) : 7.795 ml.
- Pendiente ^a : 10.8 s /V / adición.
- Pendiente ^b : 3.60 s/V / 10 μ l Cu^{2+} \rightarrow 3.60 s/V / 0.128 ppb Cu^{2+} \rightarrow 28.1 s/V / ppb Cu^{2+} .
- DM = 4 % . $r = 0.9999$.
- Concentración de Cu^{2+} presente en LCR : 124.9 ppb.

En la Tabla IV.2.2.10. se han resumido los resultados de esta serie de experimentos con LCR de perro. Con independencia de otros aspectos de interés analítico que aparecerán en una discusión posterior, puede indicarse aquí que, en general, la técnica potenciométrica empleada aporta unos resultados de elevada calidad analítica, tal y como se desprende de los valores de DM y r ; los valores de las pendientes (indicadores de la sensibilidad del método) se mantienen prácticamente independientes de la cantidad de muestra utilizada ; la cuantía de las señales garantiza que se puede operar con cantidades de muestra bastante menores de 25 μ l , especialmente si se considera que la variable tiempo de acumulación ha sido infrautilizada en los experimentos realizados. Con relación a la aparente disparidad de resultados (su desviación media relativa es del 9 %), debe indicarse que puede disminuirse significativamente cuando las cantidades de cobre que se pongan inicialmente en la celda sean menores, toda vez que el procedimiento suministra un resultado que es la suma del cobre puesto más el cobre presente en el LCR y que este último se obtiene por diferencia ; simplemente tomando la cautela señalada, la desviación indicada disminuirá más de la mitad.

Tabla IV.2.2.10 .

Determinación de cobre en LCR de perro. (Resumen de resultados)

Volumen de muestra (μl)	100	50	25
Pendiente (s/V / ppb Cu²⁺)	34.1	29.0	28.1
r	0.9997	0.9992	0.9999
Cobre en LCR (ppb)	115.2	145.8	124.9

IV.2.3.- Ensayos con LCR de cerdo

Se han repetido los experimentos realizados en los apartados anteriores , pero en esta ocasión la matriz procedía de un cerdo. Al objeto de establecer comparaciones con los estudios potenciométricos anteriores y los voltamperométricos ya descritos en los correspondientes apartados, la sistemática seguida ha sido en lo posible similar; concretamente se ha partido de muestras de 100, 50 y 25 μl de LCR, todas las adiciones de cobre patrón han sido de 30 μl y siempre se ha procurado ajustar la cantidad de EN según los criterios ya expuestos, que están basados en la evolución del pH, del potencial de pico y de la cuantía de la señal. Para cada cantidad de muestra en estudio se han realizado tres series de medidas, coincidentes con el ordenamiento impuesto hasta ahora: Descripción y resultados de un análisis, influencia del tiempo de contacto disolución-electrodo e influencia del tiempo de acumulación.

En las Tablas IV.2.3.1. a IV.2.3.9. se especifican los pormenores de cada disolución, así como los resultados más relevantes en cada caso.

Tabla IV.2.3.1.

(Cantidad de muestra empleada : 100 μ l de LCR)

Disolución	Celda	- E (V)	Señal (s/V)	Señal corregida
1	6ml agua, 10 μ l Hg ²⁺ 8000 mg/l	-	-	-
2	+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	-	-	-
3	+700 μ l EN 0.15 M	0.478	25.433	-
4	+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.478	39.667	-
5	+ 200 μ l EN 0.15 M	0.482	40.533	-
6	+ 100 μ l LCR cerdo	0.484	49.600	-
7	+ 2000 μ l EN 0.15 M	0.512	66.567	-
8	+ 200 μ l EN 0.15 M	0.514	63.900	63.900
9	+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.512	73.467	73.939
10	+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.512	83.600	84.675
11	+ 60 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.514	95.467	97.309

Tabla IV.2.3.2.

Influencia del tiempo de contacto disolución-electrodo

(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.3.1.)

Tiempo de contacto	- E (V)	Señal (s/V)
1 minuto	0.514	95.467
3 minutos	0.514	89.433
5 minutos	0.514	91.067
10 minutos	0.512	90.267
15 minutos	0.512	87.500

Tabla IV.2.3.3.

Influencia del tiempo de acumulación.
 (Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.3.1)

T acumulac (min)	- E (V)	Señal (s/V)	Señal / Tac
1	0.514	95.467	95.467
2	0.516	254.233	127.117
3	0.516	418.800	139.600
5	0.518	756.433	151.287

Tabla IV.2.3.4.

(Cantidad de muestra empleada : 50 µl de LCR)

Disolución	Celda	-E (V)	Señal (s/V)	Señal corregida
1	6ml agua, 10µl Hg ²⁺ 8000 mg/l	-	-	-
2	+ 30 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	-	-	-
3	+700 µl EN 0.15 M	0.446	13.367	-
4	+ 30 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.446	22.167	-
5	+ 200 µl EN 0.15 M	0.456	24.833	-
6	+ 50 µl LCR cerdo	0.452	18.567	-
7	+ 900 µl EN 0.15 M	0.476	43.933	-
8	+ 100 µl EN 0.15 M	0.476	44.100	44.100
9	+ 30 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.476	53.600	53.805
10	+ 30 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.476	64.933	65.419
11	+ 30 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.478	73.633	74.459

Tabla IV.2.3.5.

Influencia del tiempo de contacto disolución-electrodo
(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.3.4.)

Tiempo de contacto	- E (V)	Señal (s/V)
1 minuto	0.478	73.633
3 minutos	0.478	70.633
5 minutos	0.478	73.633
10 minutos	0.478	71.300
15 minutos	0.476	70.833

Tabla IV.2.3.6 .

Influencia del tiempo de acumulación.
(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.3.4)

T acumulac (min)	- E (V)	Señal (s/V)	Señal / Tac
1	0.478	73.633	73.633
2	0.484	199.400	99.700
3	0.486	337.100	112.700
5	0.490	616.667	123.333

Tabla IV.2.3.7.

(Cantidad de muestra empleada : 25 µl de LCR)

Disolución	Celda	- E (V)	Señal (s/V)	Señal corregida
1	Bco:6ml agua,10µl Hg ²⁺ 8000 mg/l	-	-	-
2	+ 30 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	-	-	-
3	+600 µl EN 0.15 M	0.446	12.307	-
4	+ 30 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.448	22.893	-
5	+ 100 µl EN 0.15 M	0.450	24.100	-
6	+ 25 µl LCR cerdo	0.452	17.533	-
7	+ 700 µl EN 0.15 M	0.486	34.590	-
8	+ 100 µl EN 0.15 M	0.486	35.300	35.300
9	+ 30 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.484	48.433	48.624
10	+ 30 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.488	61.067	61.549
11	+ 30 µl Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.486	71.833	72.684

Tabla IV.2.3.8.

Influencia del tiempo de contacto disolución-electrodo

(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.3.7.)

Tiempo de contacto	- E (V)	Señal (s/V)
1 minuto	0.486	71.833
3 minutos	0.484	71.800
5 minutos	0.486	70.900
10 minutos	0.484	72.700
15 minutos	0.484	71.300

Tabla IV.2.3.9.

Influencia del tiempo de acumulación.
(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.3.7)

T acumulac (min)	- E (V)	Señal (s/V)	Señal / Tac
1	0.486	71.833	71.833
2	0.492	227.900	113.950
3	0.494	402.333	134.111
5	0.498	777.367	155.503

De su observación puede deducirse lo siguiente:

1.- Como pauta general, la cantidad de EN necesaria en cada caso es algo mayor que las homólogas referidas a LCR de perro, lo que concuerda con lo observado en los estudios voltamperométricos para ambos tipos de matrices.

2.- Conforme se parte de muestras más pequeñas, la cantidad de EN necesaria es menor, lo que corrobora la hipótesis de que la materia orgánica del LCR es responsable de parte de la EN requerida.

3.- La evolución de los potenciales y de las señales de redisolución sigue siendo la misma que la descrita en estudios precedentes, tanto voltamperométricos como potenciométricos.

4.- El tiempo de contacto matriz-electrodo a circuito abierto no afecta significativamente los resultados.

5.- Por el contrario, el tiempo de electrodeposición sí lo hace en cuanto a la magnitud de la señal, observándose que la proporción señal/tiempo de deposición es superior a la unidad. También puede observarse que estos valores relativos permanecen aproximadamente constantes de unas series a otras, lo que aumenta las probabilidades de encontrar una justificación más detallada cuando más adelante se aborde el correspondiente estudio de este fenómeno.

6.- Los valores encontrados para las pendientes guardan coherencia con los correspondientes a LCR de perro y, en valor absoluto, confirman la mayor sensibilidad de la técnica potenciométrica, incluso operando con tiempos de deposición poco ventajosos para la misma, como es 1 minuto.

7.- Tanto los valores de r como los de DM indican que el procedimiento seguido y el conjunto de medidas puntuales de cada determinación aportan calidad analítica más que suficiente para los objetivos de los estudios realizados. Por otra parte y como era de esperar, la calidad analítica expresada a través de estos parámetros es creciente a medida que la cantidad de muestra es menor, toda vez que la cantidad de materia orgánica también lo es.

8.- Los contenidos encontrados para el cobre presente en las muestras están dentro de los límites de normalidad, pero en todo caso cabe hacer la misma consideración que en el caso del LCR de perro : A medida que la cantidad de muestra empleada es menor, su participación en el contenido de cobre encontrado (Cu procedente de LCR más Cu añadido) también es cada vez menor y , por lo tanto, el riesgo de apartarse del contenido real será progresivamente mayor. Este fenómeno queda aquí mejor expresado y demostrado , ya que a tal efecto se decidió emplear en las tres series las mismas cantidades de cobre añadido : siempre porciones de 30 μ l; de tal manera que la cantidad de Cu añadida (motivo de la desviación de los resultados) fue en términos relativos progresivamente mayor.

Por último en la Tabla IV.2.3.10. se ha tratado de compendiar los datos de mayor interés obtenidos con este tipo de matrices, donde se pone de manifiesto el último comentario.

Tabla IV.2.3.10.

Determinación de cobre en LCR de cerdo (Resumen de resultados)

Volumen de muestra (μl)	100	50	25
Pendiente (s/V / ppb Cu^{2+})	34.4	27.0	31.6
r	0.9984	0.9988	0.9990
Cobre en LCR (ppb)	113	142	169

IV.2.4.- Ensayos con LCR humano

Siguiendo la estructura experimental aplicada en los estudios voltamperométricos, los apartados dedicados a estudios potenciométricos continuaron con matrices de procedencia humana ; no obstante, en esta oportunidad y considerando la aún mayor dificultad para disponer de muestra se emplearon alícuotas de sólo 50 y 25 μl , lo cual tampoco constituye una especial complicación si se tiene en cuenta la mayor sensibilidad de la técnica.

En todo caso se ha mantenido para cada cantidad de matriz usada la misma sistemática y los mismos estudios que en los casos precedentes. En las Tablas IV.2.4.1. a IV.2.4.6. se especifican los pormenores procedimentales , así como los resultados más relevantes en cada oportunidad .

Tabla IV.2.4.1.

(Cantidad de muestra empleada : 50 μ l de LCR)

Disolución	Celda	- E (V)	Señal (s/V)	Señal corregida
1	6ml agua, 10 μ l Hg ²⁺ 8000 mg/l	-	-	-
2	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	-	-	-
3	+600 μ l EN 0.15 M	0.452	12.467	-
4	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.452	21.467	-
5	+ 300 μ l EN 0.15 M	0.460	25.500	-
6	+ 50 μ l LCR humano	0.460	26.467	-
7	+ 800 μ l EN 0.15 M	0.480	41.933	-
8	+ 100 μ l EN 0.15 M	0.480	41.833	41.833
9	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.484	49.533	49.721
10	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.484	57.200	57.633
11	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.482	70.007	70.802

Tabla IV.2.4.2.

Influencia del tiempo de contacto disolución-electrodo
(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.4.1.)

Tiempo de contacto	- E (V)	Señal (s/V)
1 minuto	0.482	70.007
3 minutos	0.482	70.367
5 minutos	0.484	71.233
10 minutos	0.482	69.500
15 minutos	0.482	70.800

Tabla IV.2.4.3.

Influencia del tiempo de acumulación.
(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.4.1)

T acumulac (min)	- E (V)	Señal (s/V)	Señal / Tac
1	0.482	70.007	70.007
2	0.488	197.233	98.617
3	0.488	323.867	107.956
5	0.492	567.667	113.533

Tabla IV.2.4.4.
 (Cantidad de muestra empleada : 25 μ l de LCR)

Disolución	Celda	- E (V)	Señal (s/V)	Señal corregida
1	6ml agua, 10 μ l Hg ²⁺ 8000 mg/l	-	-	-
2	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	-	-	-
3	+ 400 μ l EN 0.15 M	0.462	13.500	-
4	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.466	25.567	-
5	+ 100 μ l EN 0.15 M	0.468	25.333	-
6	+ 25 μ l LCR humano	0.462	16.283	-
7	+ 1100 μ l EN 0.15 M	0.488	40.067	-
8	+ 100 μ l EN 0.15 M	0.490	38.967	38.967
9	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.492	52.200	52.400
10	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.492	70.004	70.541
11	+ 30 μ l Cu ²⁺ 0.1 ppm	0.488	85.000	85.978

Tabla IV.2.4.5.

Influencia del tiempo de contacto disolución-electrodo.

(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.4.4.)

Tiempo de contacto	- E (V)	Señal(s/V)
1 minuto	0.488	85.000
3 minutos	0.490	87.967
5 minutos	0.490	89.433
10 minutos	0.490	93.967
15 minutos	0.490	92.933

Tabla IV.2.4.6.

Influencia del tiempo de acumulación.

(Disolución usada : 11 de la Tabla IV.2.4.4)

T acumulac (min)	- E (V)	Señal(s/V)	Señal / Tac
1	0.488	85.000	85.000
2	0.496	268.533	124.267
3	0.500	474.867	158.289
5	0.502	900.067	180.013

Capítulo IV. Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR.

Las conclusiones de tipo general son las mismas que cuando se analiza LCR de animales.

De otra parte, la menor necesidad de EN pone de manifiesto que la muestra de LCR humano aporta menor contenido en materia orgánica, conclusión que corrobora la obtenida en los estudios voltamperométricos.

En los comentarios efectuados cuando se trabajó con LCR de perro (apartado IV.2.2) y de cerdo (apartado IV.2.3) , se indicaba que el resultado definitivo (contenido de cobre en LCR) se calculaba restando de una cantidad obtenida experimentalmente otra cantidad que correspondía a la de cobre añadido ; consecuencia inmediata es que la calidad del resultado es inferior a la calidad de la medida experimental y que el deterioro de aquél era tanto mayor cuanto menor fuera la cantidad de muestra utilizada para el análisis. También ha quedado constancia de que la influencia de la materia orgánica en la sensibilidad (en las pendientes estudiadas) , aparte de disminuir en gran medida cuando la muestra de LCR es pequeña , aún es menor cuando se utiliza la técnica potenciométrica de redisolución . Consecuentemente con estas dos consideraciones, al operar con LCR humano se ha introducido un pequeño cambio en los cálculos posteriores ; consiste en emplear como señal fondo la suministrada inmediatamente antes de la adición de la muestra, deducir este valor de las medidas posteriores y aplicar a éstas el tratamiento propio del método de la adición estándar. Según lo expuesto, los datos extraídos de las Tablas IV.2.4.1. y IV.2.4.4. quedan resumidos en la Tabla IV.2.4.7. , en los que puede comprobarse que los resultados han perdido la gran dispersión que presentaban anteriormente.

Tabla IV.2.4.7.
LCR humano (resumen de resultados)

	Datos de Tabla IV.2.4.1		Datos de Tabla IV.2.4.4	
	Señal	Diferencia	Señal	Diferencia
Disolución 5 (Fondo)	25.500	-	25.333	-
Disolución 8	41.833	16.333	38.967	13.634
Disolución 9	49.533	24.033	52.200	26.867
Disolución 10	57.200	31.700	70.004	44.671
Disolución 11	70.007	44.507	85.000	59.667
Volumen de referencia	7920 μ l		7795 μ l	
r	0.9903		0.9986	
Cu en LCRhumano (ppb)	104.0		106.0	

IV.2.5.- Calidad analítica de los resultados

IV.2.5.1.- Evaluación de la precisión del método

Una vez realizados todos los experimentos programados, con diferentes cantidades de LCR de diferentes procedencias, se realizó un estudio de repetitividad con objeto de evaluar la calidad analítica de los resultados ; es decir , la reproducibilidad de las señales y la cantidad de cobre presente en la muestra. Para ello se ha seleccionado el LCR de perro, se ha efectuado el análisis diez veces y en cada ocasión se han utilizado 25 μ l de la muestra. Los resultados se han resumido en la Tabla IV.2.5.1., donde se observa un aceptable grado de repetitividad, con una desviación media relativa inferior al 3 % , lo que confiere al método empleado una precisión más que suficiente si se considera el tipo de análisis y las cualidades exigidas a los resultados desde la perspectiva de su utilidad práctica.

A título de curiosidad, en la Figura IV.2.5.1 se han recogido las señales proporcionadas por el potenciómetro en una de las determinaciones (en concreto, la número 4 de la Tabla IV.2.5.1.) realizadas en el presente estudio.

Tabla IV.2.5.1.
(Precisión del método)
(LCR de perro)

V total (ml)	Señal LCR	Cu en LCR (ppb)	r
7.685	11.200	113.7	0.9990
7.985	11.304	111.8	0.9998
7.985	11.466	111.8	0.9998
8.085	11.633	122.9	0.9999
8.325	11.034	116.6	0.9997
8.125	11.833	117.0	0.9999
8.325	11.133	113.2	0.9999
7.985	11.566	124.5	0.9997
8.085	11.677	116.4	0.9999
8.325	11.333	119.9	0.9997

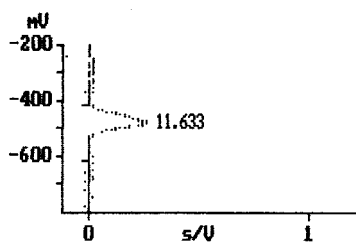
Valor medio : 116.8 ppb

DM : 2.9 %

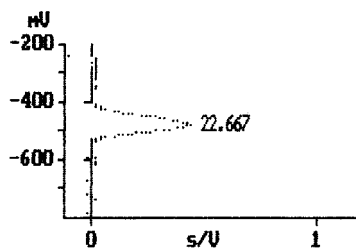
Figura IV.2.5.1. : DETERMINACIÓN DE Cu EN LCR DE PERRO

(Corresponde a la muestra n° 4 de la Tabla IV.2.5.1.)

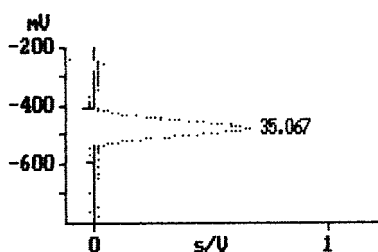
Señal para LCR



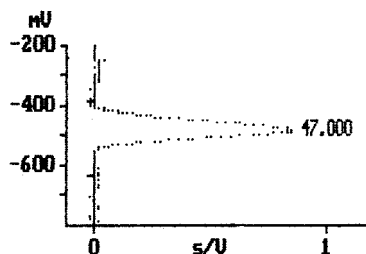
1ª adición estándar



2ª adición estándar



3ª adición estándar



V total = 8.085 ml

Incremento de señal para el LCR : 11.633 s/V

Pendiente : 28.97 s/V por ppb de Cu

Cu en LCR : 122.9 ppb

r = 0.9999

IV.2.5.2.- Evaluación de la exactitud del método

Los últimos ensayos efectuados se encaminaron hacia un intento de evaluar la exactitud del método desarrollado. Es obvio que evaluar la exactitud resulta a todas luces imposible, ya que no se ha dispuesto de patrones de LCR idóneos para ello, de ahí que la última pretensión de este apartado fuera un intento de aproximación a dicho cálculo. A tal fin, se partió de alícuotas de 500 μ l de la misma matriz (LCR de perro) ; una de ellas se sometió a mineralización ácida (con 1.5 ml de HNO_3) a alta presión, se llevó a sequedad y se recogió con 2 ml de agua destilada y 20 μ l de HCl concentrado ; tomando alícuotas de 100 μ l de esta disolución. se repitieron los análisis según el procedimiento diseñado anteriormente, obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla IV.2.5.2 . Estos resultados no sólo dan validez a los obtenidos cuando se opera directamente con LCR (116.8 ppb de Cu) , sino que también demuestran que la cantidad de EN seleccionada es capaz de poner a todo el cobre presente en condiciones de electrolizarse, lo cual constituye el primer punto de apoyo para ulteriores estudios de especiación.

Tabla IV.2.5.2.

Exactitud del método : Mineralizados de LCR de perro

V total (ml)	Señal LCR	Cu en LCR (ppb)	r
8.160	11.70	111.0	0.9994
8.660	13.2	113.8	0.9991

Capítulo IV. Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR.

A título de curiosidad, en la Figura IV.2.5.2 se han recogido las señales proporcionadas por el potenciómetro en una de las determinaciones (en concreto, la número 1 de la Tabla IV.2.5.2.) realizadas en el presente estudio. Representaciones que corresponden a los datos de la determinación de cobre en 100 μl de disolución de LCR de perro mineralizado equivalente a 25 μl de LCR, con :

V total = 8.160 ml

Incremento de señal al añadir el LCR : 11.70 s/V

Pendiente : 30.36 s/V por ppb de Cu

Cu en LCR : 111.0 ppb

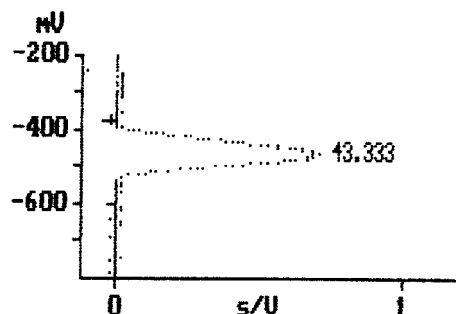
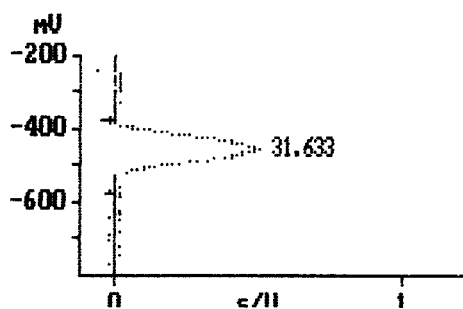
r = 0.9994

Figura IV.2.5.2. :DETERMINACIÓN DE Cu EN LCR DE PERRO MINERALIZADO

(Corresponde a la muestra nº 1 de la Tabla Resumen IV.2.5.2.)

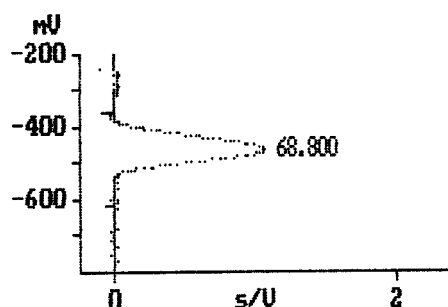
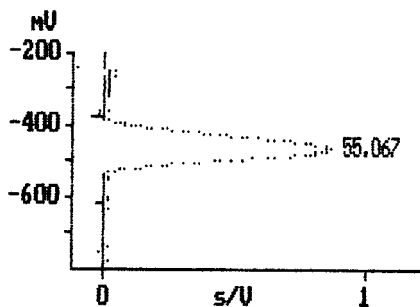
Señal para 60 μl Cu^{2+} 0.1 ppm

100 μl LCR perro min sobre la anterior

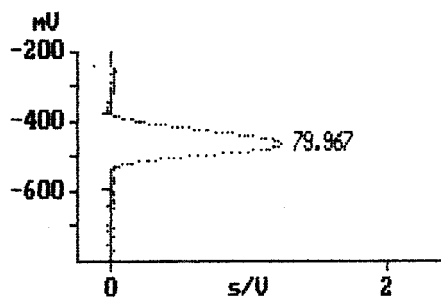


1ª adición estándar

2ª adición estándar



3ª adición estándar



Capítulo IV. Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR.

El segundo grupo de experimentos del presente apartado se centró en LCR humano. En esta ocasión se mineralizaron 75 μl de LCR humano según el procedimiento habitual y el mineralizado se llevó a un volumen final de 300 μl , empleándose para cada análisis alícuotas de 100 μl , equivalentes por tanto a 25 μl de LCR sin mineralizar . En la Tabla IV.2.5.3. se han resumido los resultados obtenidos a partir de los cuatro análisis efectuados, donde se pone de manifiesto, una vez más, que el procedimiento desarrollado para el análisis directo (sin mineralización o cualquier otro tratamiento previo) de cobre en LCR humano reúne suficientes garantías analíticas.

Tabla IV.2.5.3.

Muestra	Análisis	r	Cu en LCR (ppb)	Media
25 μl disolución LCR humano sin mineralizar	1	0.9990	124	110
	2	0.9978	96	
100 μl disolución LCR humano mineralizado	1	0.9988	125	120
	2	0.9997	115	

IV.2.6.- Ensayos con derivados de la EN

A la vista de los buenos resultados obtenidos en los estudios voltamperométricos realizados con los agentes modificadores del medio derivados de la Etilendiamina se procedió a realizar idéntico estudio mediante potenciometría de redisolución anódica, con el objeto, si fuera posible, de sacar las conclusiones oportunas. La matriz empleada para este estudio fue LCR humano, realizando determinaciones paralelas con muestras mineralizadas y sin mineralizar. Las condiciones de trabajo fueron las mismas que en los estudios precedentes. Se puede concluir que ambos reactivos permiten determinar cobre en LCR tal y como se desprende de los resultados obtenidos, que aparecen en la Tabla IV.2.6.1.

Tabla IV.2.6.1
CALIDAD ANALÍTICA DE LOS RESULTADOS UTILIZANDO
N-MET-EN y DENTRI (LCR humano)

Reactivo	Tipo de muestra	V total (ml)	Señal LCR	Recuper.(ppb)	r
N-MET- EN	LCR humano (sin mineralizar)	8.360	16.434	113.7	0.9998
	LCR humano (mineralizado)	8.485	15.033	112.0	0.9999
DENTRI	LCR humano (sin mineralizar)	8.485	9.533	115.4	0.9989
	LCR humano (mineralizado)	8.660	8.833	103.9	0.9988

Capítulo IV. Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR.

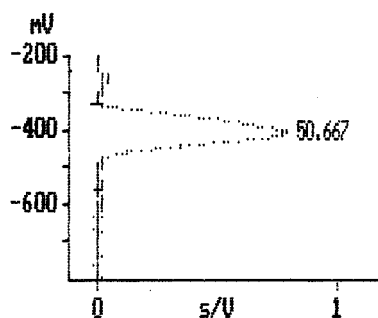
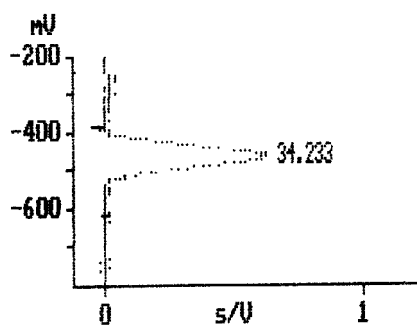
En la Figura IV.2.6.1 se han recogido a modo de ejemplo las señales proporcionadas por el potenciómetro con ocasión de una de las determinaciones llevadas a cabo , concretamente la primera que aparece en la Tabla anterior.

Figura IV.2.6.1. :DETERMINACIÓN DE Cu EN LCR HUMANO SIN MINERALIZAR

(Corresponde a la muestra nº 1 de la Tabla IV.2.6.1.)

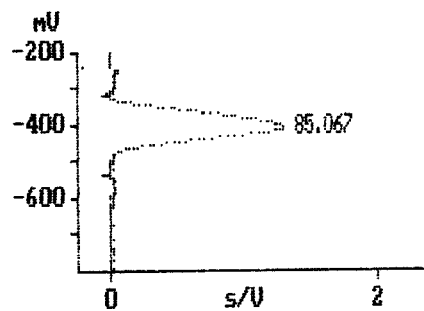
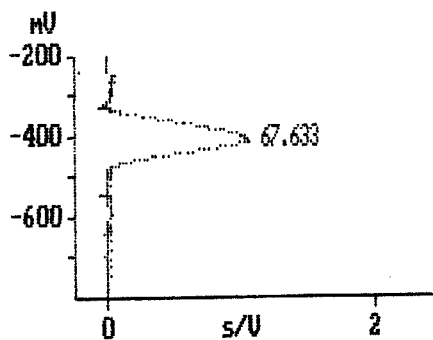
Señal para 60 μl Cu^{2+} 0.1 ppm

25 μl LCR humano sobre la anterior

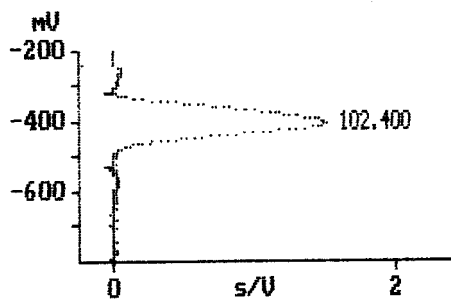


1ª adición estándar

2ª adición estándar



3ª adición estándar



Capítulo IV. Aplicaciones analíticas a fluidos biológicos : LCR.

A partir de estas representaciones y aplicando el tratamiento matemático adecuado al procedimiento de la adición patrón, se obtienen los resultados siguientes :

$$\mathbf{V \text{ total} = 8.360 \text{ ml}}$$

$$\mathbf{\text{Incremento de señal para } 25 \mu\text{l LCR humano} : 16.434 \text{ s/V}}$$

$$\mathbf{\text{Pendiente} : 42.03 \text{ s/V por ppb de Cu}}$$

$$\mathbf{\text{Cu en LCR} : 113.7 \text{ ppb}}$$

$$\mathbf{r = 0.9998}$$

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

Los trabajos incluidos en la presente Memoria han tratado de desarrollar nuevos métodos y estrategias analíticas encaminados, de una parte, a la puesta a punto de procedimientos electroanalíticos para la determinación de cobre en LCR que presenten ventajas concretas frente a los métodos de análisis hasta ahora aplicados y reconocidos oficialmente. Y, de otra, pretenden aportar conocimientos al problema analítico más general de determinación de trazas metálicas en fluidos biológicos. De todos estos estudios, pueden destacarse las siguientes CONCLUSIONES:

1.- Se han puesto a punto métodos de análisis de trazas de Cu en muestras sintéticas (exentas de materia orgánica), evaluando y optimizando tanto variables instrumentales como condiciones de operación. Todos estos métodos comprenden una etapa de preconcentración basada en una electrodeposición catódica y otra de redisolución anódica. Las técnicas utilizadas fueron voltamperométricas (en sus modalidades DPV y SWV) y potenciométrica (PSA).

2.- Se ha recurrido al empleo de modificadores del medio, concretamente la EN y sus derivados N- MET- EN y DENTRI, cuyos principales papeles son los de complejar el Cu(II), hacer electroquímicamente reversibles los procesos y aumentar la sensibilidad de las técnicas, lo que permite garantizar métodos de análisis para concentraciones de Cu del orden o inferiores a 0.1 ppb.

3.- Se proponen nuevos métodos voltamperométricos de redisolución (DPV y SWV) para la determinación de Cu (II) en presencia de N- MET- EN o de DENTRI.

4.- Se proponen nuevos métodos utilizando la potencimetría de redisolución para la determinación de Cu (II) en presencia de EN, optimizándose los parámetros instrumentales así como las condiciones de la disolución.

Conclusiones

5.- Se proponen nuevos métodos potenciométricos para la determinación de Cu (II) en presencia de N- MET- EN o de DENTRI.

6.- Se propone un nuevo método por voltamperometría de onda cuadrada para la determinación de Cu en LCR procedente de perro, cerdo o humano.

7.- Se propone un nuevo método por potencimetría de redisolución para la determinación de Cu en LCR procedente de perro, cerdo o humano.

8.- Los dos métodos anteriores tienen en común y se fundamentan en diluir suficientemente las muestras y operar en un medio donde esté presente EN o algún otro de sus derivados, recomendándose a su vez el método de la adición estándar.

9.- Los métodos citados en las conclusiones números 6 y 7 no necesitan operar en atmósfera inerte , lo cual simplifica sustancialmente los análisis.

10.- Los dos métodos propuestos (conclusiones 6 y 7) utilizan LCR directamente ; es decir, sin necesidad de operaciones previas de mineralización o similares, lo cual también simplifica sustancialmente los análisis.

11.- El tiempo de preconcentración no es una variable recomendable para aumentar la sensibilidad en el método voltamperométrico, mientras que sí lo es en el potenciométrico.

12.- Se ha evaluado la incidencia de la presencia de la materia orgánica en el comportamiento de los electrodos de mercurio (gota y película) utilizados, concluyéndose en primer lugar que dicha incidencia sólo tiene lugar durante la etapa de preconcentración y, en cuanto a su presumible faceta negativa, que en las condiciones de trabajo propuestas no tiene ningún efecto pernicioso.

13.- Los estudios realizados abren un nuevo camino de investigación analítica, según el cual se puede utilizar la presencia de materia orgánica (propia de la matriz objeto del análisis o añadida voluntariamente) para aumentar de forma significativa la sensibilidad de la técnica potenciométrica de redisolución.

14.- Los métodos propuestos para el análisis de Cu en LCR reúnen características de orden práctico que les hace competir en gran ventaja con los empleados en la actualidad. Así, los métodos contemplados en las conclusiones 6 y 7:

- * Requieren tiempos inferiores a 15 minutos para el análisis de una muestra.
- * Requieren cantidades de ésta del orden o inferiores a 50 μ l.
- * Requieren equipamientos cuyo costo es inferior a 4 millones de pesetas.
- * Dichos equipamientos son fácilmente transportables.
- * Dichos equipamientos necesitan una fuente de energía eléctrica habitual en cualquier hogar.
- * La calidad de los resultados garantiza niveles de confianza al menos tan elevados como los métodos alternativos y, en todo caso, mucho más que suficientes para usos médicos (control, diagnóstico, etc.).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- (1).- Sánchez Misiego , A. ; García-Moncó Carra , R.M. and Zirino, A.; *Electroanalysis*, 8 (1996) 534-538.
- (2).- García-Moncó Carra, R.M. ; Sánchez Misiego, A. and Zirino , A.; *Anal. Chem.*, 67 (1995) 4484-4486.
- (3).- García-Moncó Carra, Rosa M^a .; Comunicación privada.
- (4).- Santidrián Alegre, Santiago.; N. Munro, Hasmin.; “ Nutrición. Aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos ”, pág. 189-192, 206-212, Edit. EUNSA, (1988).
- (5).- Danks, D.M.; Chapter Biological Roles of Copper . Ciba Foundation Symposium 79 (new series). Excerpta Medica. Amsterdam (1980).
- (6).- Underwood, E.J.; Chapter in Trace Elements in Humans and Animals´4th edition , Academic Press, New York (1977).
- (7).- O´Dell, B.L. et al.; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* , 108 (1961) 402-408.
- (8).- Newberne, P.M. et al.; *Br. J. Pathol.* , 49 (1968) 448-457.
- (9).- Klevay, L.M.; Trace Elements in Man and Animals. Proc. TEMA-5, Aberdeen (1984).
- (10).- Wiener, G. and Field, A.C.; *J. Comp. Path.* , 79 (1969) 7-14.
- (11).- Suttle, N. F.; *Agric. Sci.* , 84 (1975) 255-261.
- (12).- Simpson, A. M.; Mills, C.F. and McDonald, I. ; “ Influence of dietary molybdenum and sulphur upon the utilisation of copper by cattle ”, (Rowest Res. Inst.) Project 276, INCRA, New York (1981).
- (13).- Linder, M.C. ; Moor, J. R. and Wright, K. M.; *J. Natl. Cancer Inst.* , 67 (1981) 623.
- (14).- National Resarch Council Food and Nutrition Board . Recommended Dietary Allowances 9th edition. Washington, D.C. (1980).
- (15).- Rees, E.L. ; “ Trace Elements in Health ”, Chapter in Rose, J. Ed. Butterworths. London (1983).

- (16).- Harris, E.D.; “Trace Elements in Health”, Chapter in Rose, J. Ed. Butterworths. London (1983).
- (17).- Danks, D.M.; Chapter in CSIRO Symposium on the Importance of Copper in Biology and Medicine, CSIRO Canberra, Australia (1980).
- (18).- Owen, C.A. Jr.; Copper Deficiency and Toxicity, Acquired and Inherited in “ Plants, Animals and Men ”. Noyes Publications. New Jersey (1981).
- (19).-Csintalan, R. P. and Senozan, N.M.; California State University, Long Beach, CA 90840.
- (20).- Suquía Múgica, M^a Begoña.; Tesis Doctoral, Salamanca (1980).
- (21).- Kasperek, K.; Schicha, H.; Siller, V.; Feinendegen, L. E. and Hoeck, A. ; Proc. Nucl. Activation Techniques in the Life Sciences, IAEA, Vienna (1978) 517.
- (22).- Garbarino, J. R. and Taylor, M. E.; Applied Spectrosc. , 33 (1979) 220-225.
- (23).- U.S. Environmental Protection Agency, Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectrometric Method for Trace Element Analysis of Water and Wastes, Washington, DC (1971).
- (24).- DIN 38 406, Bestimmung der 24 Elemente Ag, Al, B, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Sb, Sr, Ti, Zn und Zr durch Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP- AES) (E 22), Beuthe Verlag, Berlin (1987).
- (25).- Miyazaki, A.; Kimura, A.; Bansho, K. and Umezaki, Y.; Anal. Chim. Acta, 144 (1982) 213- 221.
- (26).- Broekaert, J. A. C.; Leis, F. and Laqua, K.; Talanta, 28 (1981) 745- 752.
- (27).- Hiraide, M.; Ito, T.; Baba, M.; Kawaguchi, H. and Mizuike, A.; Anal. Chem. , 52 (1980) 804- 807.
- (28).- Burba, P.; Cebulc, M. and Broekaert, J. A. C.; Fresenius Z. Anal. Chem. , 318 (1984) 1- 11.
- (29).- Aziz, A.; Broekaert, J. A. C. and Leis, F.; Spectrochim. Acta, 36 B (1981) 251- 260.

- (30).- Houk, R. S.; Fassel, V. A.; Flesh, G. D.; Svec, H. J.; Gray, A. L. and Taylor, C. E.; Anal. Chem. , 52 (1980) 2283- 2289.
- (31).- Lyon, T. D. B.; Fell, G. S.; Hutton, R. C. and Eaton, A. N.; J. Anal. Atom. Spectrom., 3 (1988) 265- 272.
- (32).- Delves, H. T. and Campbell, M. J.; J. Anal. Spectrom. , 3 (1988) 343- 348.
- (33).- Grimm, W.; Spectrochim. Acta, 23 B (1968) 443- 454.
- (34).- Beauchemin, D.; McLaren, J. W.; Mykytiuk, A. P. and Berman, S. S.; J. Anal. Atom. Spectrom. , 3 (1988) 305- 308.
- (35).- Beauchemin, D.; McLaren, J. W.; Mykytiuk, A. P. and Berman, S. S.; Anal. Chem. , 59 (1987) 778- 783.
- (36).- Chatt, A.; Dang, H. S.; Fong, B. B.; Jayawiekreme, C. K.; Mc Dowell, L. S. and Pegg, D. L.; J. Radioanal. Nucl. Chem. , 124 (1988) 65.
- (37).- Zeisler, R.; Greenberg, R. R. and Stone, S. F.; J. Radioanal. Nucl. Chem. , 124 (1988) 47.
- (38).- Yinsong, W.; Guisun, Z.; Mingguang, T.; Min , Z. and Yuandi, C.; J. Radioanal. Nucl. Chem. , 151 (1991) 301.
- (39).- Desad, H.B.; Kayasth, R.R.; Parthasarathy, R. and Das, M.S.; J. Radioanal. Nucl. Chem. , 84 (1984) 123.
- (40).- Kingston, H. M. and Jassie, L. B.; Anal. Chem. , 58 (1986) 2534.
- (41).- Dybczynski, R.; Maleszewska, H. and Wasek, M.; J. Radioanal. Nucl. Chem. , 96 (1985) 187.
- (42).- Rajadhyaksha, M. and Turrel, Z. R.; J. Radioanal. Nucl. Chem. , 106 (1986) 99.
- (43).- Whitley, J. E.; Stack , T.; Miller, C.; Aggett, P. J. and Lloyd, D. J.; J. Radioanal. Nucl. Chem. , 113 (1987) 527.
- (44).- Cortes, E.; Gras, N.; Muñoz, L. and Cassorla, V.; J. Radioanal. Chem. , 69 (1982) 401.

- (45).- Heyrovsky, J.; Trans. Faraday Soc. , 19 (1924) 785.
- (46).-Skoog, D.A. y Leary, J.J. ; “ Análisis Instrumental ” , 4ª ed. McGraw-Hill, Interamericana de España, S.A. , Madrid (1994).
- (47).- Ebdon, L.; Hill, S. and Ward, R. W.; Analyst , 111 (1986) 1113- 1133.
- (48).- Fraley, D. M.; Yates, D. and Manahan, S. E.; Anal. Chem. , 51 (1979) 2225- 2229.
- (49).- Mazzucotelli, A.; Viarengo, A.; Canesi, L.; Ponzano, E. and Rivaro, P.; Analyst, 116 (1991) 605- 608.
- (50).- Iyengar, G. V.; “Elemental Analysis of Biological Systems”, Vol. 1, CRC Press, Boca Raton, FL (1989).
- (51).- Krenkel, P. A. ; “ Heavy Metals in the Aquatic Environment ” , (Ed.) Pergamon Press, Oxford (1974).
- (52).- Brown, S. S.; “Clinical Chemistry and Chemical Toxicology of Metals ”, (Ed.) Elsevier, Amsterdam (1978).
- (53).- Förstner, U. and Wittmann, G. T.; “ Metal Pollution in the Aquatic Environment ”, Springer - Verlag, Berlin (1979).
- (54).- Underwood, E. J.; “Trace Elements in Human and Animal Nutrition ”, 4th ed., Academic Press, New York (1977).
- (55).- Brätter, P. and Schramel, P.; “ Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology ” ,(Eds.) W. de Gruyter, Berlin (1980).
- (56).- Maenhaut, W.; Anal. Chim. Acta, 136 (1982) 301.
- (57).- Girardi, F.; Marafante, E.; Pietra, R.; Sabbioni, E. and Marchesini, A.; J. Radioanal. Chem. , 37 (1977) 427.
- (58).- Iyengar, G.V.; Kollmer, W. E. and Bowen, H. J. M.; “ The Elemental Composition of Human Tissues and Body fluids ” , Verlag Chemie, Weinheim (1978).
- (59).- Krivan, V. and Geiger, H.; Fresenius´Z. Anal. Chem. , 305 (1981) 339.

- (60).- Versieck, J.; Hoste, J.; Barbier, F.; Michels, H. and DeRudder, J.; Clin. Chem. , 23 (1977) 1301.
- (61).- Brätter, P. and Schramel, P. ; “ Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology ” , (Eds.) W. de Gruyter, Berlin (1980).
- (62).- Cornelis, R.; “ Neutron activation analysis of trace elements in humans ”, Thesis, Ghent, (1980)
- (63).- Iyengar, G. V.; Tanner, J. T.; Wolf, W. R. and Zeisler, R.; Science Total Environ , 61 (1987) 235.
- (64).- Popken, J. L.; Brooks, R. A. and Foy, R. B.; Amer. J. Med. Technol. , 40 (1974) 260.
- (65).- Cornelis, R.; Versieck, J.; Mees, L.; Hoste, J. and Barbier, F.; J. Radioanal. Chem. , 55 (1980) 35.
- (66).- Dawson, J. B.; Bahreyni-Toosi, M. H.; Ellis, J. D. and Hodgkinson, A.; Analyst, 106 (1981) 153.
- (67).- Gardiner, P. E.; Ottaway, J. M.; Fell, G. S. and Burns, R. R.; Anal. Chim. Acta, 124 (1981) 281.
- (68).- Foote, J. W. and Delves, H. T.; Analyst, 107 (1982) 121.
- (69).- Evans, D. J. R. and Fritze, K.; Anal. Chim. Acta, 44 (1969) 1.
- (70).- Sabbioni, E.; Marafante, E.; Pietra, R.; Goetz, L.; Girardi, F. and Orvini, E.; Proc. Symp. Nucl. Activation in the Life Sciences, IAEA, Vienna (1979) 179.
- (71).- Samsahl, K.; Anal. Chem. , 39 (1967) 1480.
- (72).- Iyengar, G. V.; J. Radioanal. Nucl. Chem. , 110 (1987) 503.
- (73).- Greenberg, R. R.; Anal. Chem. , 58 (1986) 2511.
- (74).- Byrne, A. R.; Fresenius'Z. Anal. Chem. , 326 (1987) 733.
- (75).- Woittiez, J. R. W. and Iyengar, G. V.; Clinical Chemistry, 34 (1988) 474.
- (76).- Florence, T. M.; Talanta, 29 (1982) 345.
- (77).- Lion, L. W. and Lechie, J. O.; Environ. Geol. , 3 (1981) 293.

- (78).- Cantrell, K. J. and Byrne, R. H.; *Geochim. Cosmochim. Acta*, 51 (1987) 597.
- (79).- Byrne, R. H.; *Appl. Geochem.* , 3 (1988) 85.
- (80).- Ball, J. W.; Nordstrom, D. K. and Jenne, E. A.; U. S. Geol. Survey, Water Res. Div., (1980) report.
- (81).- *Chemical modeling in aqueous systems*, ACS Symposium Series 93, Washington, DC, (1979).
- (82).- Turner, D. R.; Whitfield, M. and Dickson, A. G.; *Geochim. Cosmochim. Acta*, 45 (1981) 855.
- (83).- Millero, F. J. and Schreiber, D. R.; *Amer. J. Sci.*, 282 (1982) 1508.
- (84).- Stumm, W. and Morgan, J. J.; *Aqueous Chemistry*, Wiley, New York (1981).
- (85).- Martell, A. E. and Smith, R. M.; *Critical Stability Constants*, Plenum Press, New York (1977).
- (86).- Florence, T. M.; *Analyst*, 111 (1986) 489.
- (87).- Nelson, A.; *Anal. Chim. Acta*, 169 (1985) 273.
- (88).- Kramer, C. J. M.; Guo-Hui, Y. and Duinker, J. C.; *Fresenius'Z. Anal. Chem.* , 317 (1984) 383.
- (89).- Lewis, V. D.; Nam, S. H. and Urasa, I. T.; *J. Chromatogr. Sci.* , 27 (1989) 468.