



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional
del Litoral, para la obtención del grado académico de:

DOCTOR EN QUÍMICA

Título de la Tesis:

**Métodos multivariados para la cuantificación
de sistemas cinéticos utilizando metodologías de
inyección en flujo con modo detenido y
detección espectrofotométrica**

Autor: Lic. Diana Magni

Director: Dr. Alejandro Olivieri

Co-Director: Dr. Adrian Bonivardi

Jurados: Dr. Teodoro Kaufman

Dr. Luis Dante Martinez

Dr. Eduardo Miró

Departamento de Química- Área Química Analítica
Facultad de Ingeniería Química

2009

A quienes caminaron conmigo.....

AGRADECIMIENTOS

A mi Director. Alejandro Olivieri, por su apoyo en todo momento.

A mi Co-Director, Adrian Bonivardi, por su disposición en la búsqueda de soluciones.

A Nora Pratta y Antonio Negro, por su colaboración y confianza, siempre.

A mis compañeras y amigas, Juana Pedro y Myriam Calvo, por tantas buenas horas transcurridas juntas.

A Carlos Querini y Mirtha Maximino, por su generosidad al brindarme sus conocimientos.

A Paola Quaino, Adriana Pérez, Marta Bosco, Silvina Addona, Silvia Montoro, Sebastián Collins, Alejandro Cappadoro, Juan Carlos Uñates, Gustavo Belletti, por los gratos momentos compartidos.

A mis amigas y amigos de todos los días desde hace mucho tiempo y para siempre.

A mis padres que me enseñaron a valorar lo importante y me educaron en el esfuerzo y el trabajo.

A mi única hermana, Silvia, mi hermana amiga.

A mis sobrinos, Virgi, Mauri y Belén.

A mi esposo, Luis, porque logramos juntos la felicidad de nuestra familia.

A mis hijos, Vero, Naty y Nacho, que son mi vida, mi orgullo y mi alegría.

RESUMEN

En esta tesis se estudian distintas alternativas de resolución multivariada de un sistema cinético no lineal para la determinación de iones metálicos que actúan como catalizadores en una de las etapas de este sistema.

Específicamente se utilizó la reacción de reducción de resazurina por sulfuro de sodio en medio alcalino, donde las especies catalíticas seleccionadas fueron los iones Cu(II) y Ni(II).

Para la obtención de los resultados experimentales se diseñó un sistema de inyección en flujo con modo detenido. Se optimizaron las variables inherentes a este sistema y las variables fisicoquímicas relacionadas con la reacción utilizada.

En una primera etapa se analizaron situaciones en las cuales los analitos se encontraban en forma separada. Se utilizaron métodos multivariados determinísticos (*hard modeling*) con los cuales, en base a la bibliografía y a las observaciones experimentales, se propusieron y analizaron diferentes modelos cinéticos. Se obtuvieron los estimadores de los parámetros cinéticos para todos los casos planteados y se analizaron sus relaciones con la concentración de los analitos. Se concluyó que un modelo cinético autocatalítico muestra un alto grado de ajuste a los datos experimentales y permite la cuantificación confiable de las especies catalíticas.

Estas mismas situaciones fueron analizadas a través de los métodos quimiométricos de calibración multivariada (*soft modeling*). Se utilizaron los modelos de regresión por componentes principales (PCR) y regresión por cuadrados mínimos parciales (PLS) como métodos lineales de calibración. En los dos casos, y para ambos cationes, la no linealidad del sistema se manifestó

a través de los elevados errores asociados a la predicción. Además, se utilizó un modelo no lineal, redes neuronales artificiales (ANNs), como método de calibración. Los estudios de exactitud y precisión permitieron concluir que los modelos ANNs aplicados a sistemas de naturaleza no lineal producen resultados tan confiables y reproducibles como el modelo autocatalítico.

En la segunda etapa, cuando se trabajó con mezclas de los analitos, se observó la presencia de un efecto sinérgico en la acción catalítica. Los métodos multivariados determinísticos no permitieron una cuantificación confiable en este caso. Si bien el modelo autocatalítico describió los datos experimentales con un buen grado de ajuste, se obtuvieron errores elevados en la predicción de las concentraciones de los analitos para muestras de validación. Esto se atribuyó a la incertidumbre asociada a un mayor número de constantes que debieron ser modeladas en presencia del efecto sinérgico.

La aplicación del método PLS, en el caso de mezclas, condujo a modelos con altos errores de predicción, inadecuados para la cuantificación. Con ANNs, en cambio, se obtuvieron modelos que produjeron resultados confiables en la determinación simultánea de los analitos cuando se aplicaron a muestras sintéticas. Con los modelos ANNs se cuantificaron los analitos en muestras acuosas reales y se obtuvieron resultados estadísticamente comparables a los obtenidos con un método de referencia.

De esta manera se comprobó la habilidad de los modelos ANNs para describir datos de naturaleza no lineal tanto en situaciones en las cuales los métodos determinísticos fallan en su aplicabilidad como aquellas donde estos últimos también producen resultados satisfactorios.

ÍNDICE

Introducción	
Calibración multivariada	1
Métodos cinéticos de análisis	9
Métodos catalíticos. Metodologías clásicas de cuantificación	14
Metodologías multivariadas de cuantificación en mediciones cinéticas. Métodos quimiométricos y métodos paramétricos	20
Sistemas de inyección en flujo. Una necesidad para la aplicación de métodos cinéticos	23
Objetivos	27
Capítulo 1: Diseño y optimización de la metodología experimental	
1.1 Reacción indicadora: reducción de resazurina con sulfuro de sodio en medio alcalino	29
1.2 Seguimiento de la reacción indicadora	30
1.3 Configuración del sistema de inyección en flujo con modo detenido utilizado para la determinación de Cu(II) y Ni(II)	31
1.4 Reactivos	33
1.5 Procedimiento	34
1.6 Optimización de las variables de configuración del sistema de inyección en flujo con modo detenido	35
1.6.1 Fundamentos	35
1.6.2 Geometría del reactor de mezcla	39
1.6.3 Dimensiones del reactor de mezcla	40
1.6.4 Velocidad de flujo	41

1.6.5	Volumen del lazo de muestra	41
1.7	Optimización de las variables fisicoquímicas	45
1.7.1	Selección de los factores experimentales y de la variable respuesta	45
1.7.2	Selección de los límites del dominio experimental	46
1.7.2.1	Efecto de la concentración de hidróxido de sodio	46
1.7.2.2	Efecto de la concentración de sulfuro de sodio	48
1.7.2.3	Efecto de la concentración de resazurina	50
1.7.3	Diseño ortogonal factorial parcial	51
1.7.3.1	Construcción del diseño experimental	51
1.7.3.2	Resultados del diseño experimental	52
1.8	Conclusiones	57

Capítulo 2: Cuantificación cinética de una especie catalítica en la reducción de resazurina por sulfuro. Aplicación de métodos cinéticos clásicos y multivariados paramétricos

2.1	Métodos cinéticos gráficos de cuantificación	60
2.1.1	Fundamentos	60
2.1.2	Resultados	63
2.1.2.1	Método Integral de tiempo fijo	63
2.1.2.2	Método Integral de tiempo variable	65
2.2	Métodos de cuantificación basados en el ajuste no lineal de las mediciones multivariadas	67
2.2.1	Fundamentos	67
2.2.2	Resultados	69

2.2.2.1	Modelo basado en cinética de pseudo primer orden	69
2.2.2.2	Modelo Cat-Sulfuro	72
2.2.2.3	Modelo polisulfuros	75
2.2.2.4	Modelo autocatalítico	78
2.2.3	Predicciones sobre muestras reales utilizando el modelo cinético autocatalítico	85
2.3	Conclusiones	85

Capítulo 3: Aplicación de métodos quimiométricos multivariados a la determinación catalítica de Cu(II) y Ni(II)

3.1	Introducción	88
3.2	Proceso de calibración multivariada	89
3.3	Métodos de calibración multivariada de primer orden	91
3.3.1	Regresión por cuadrados mínimos clásica	91
3.3.2	Regresión por cuadrados mínimos inversa	92
3.3.3	Métodos lineales de calibración multivariada de primer orden basados en la reducción de variables	95
3.3.3.1	Regresión por componentes principales	96
3.3.3.2	Regresión por cuadrados mínimos parciales	99
3.3.4	Métodos no lineales: Redes Neuronales artificiales	101
3.3.4.1	Generalidades	101
3.3.4.2	Principios de funcionamiento de ANNs multicapas con retropropagación de los errores	103
3.3.4.3	Desarrollo del modelo de calibración	107
3.3.4.3.1	Muestras de calibración	107

3.3.4.3.2	Compresión de variables	107
3.3.4.3.3	Determinación de la topología de la red	108
3.3.4.3.4	Entrenamiento de la red. Evaluación de la capacidad del modelo	110
3.4	Resolución multivariada del sistema cinético para la determinación de Cu(II) y Ni(II)	111
3.4.1	Trabajo experimental	111
3.4.2	Métodos lineales de calibración basados en la reducción de variables	114
3.4.2.1	Análisis del modelo PCR para Cu(II)	114
3.4.2.1.1	Selección del número óptimo de factores	114
3.4.2.1.2	Estudio de regiones del perfil cinético	116
3.4.2.1.3	Modelo de calibración	117
3.4.2.1.4	Etapa de predicción	118
3.4.2.2	Análisis del modelo PLS para Cu(II)	119
3.4.2.3	Análisis del modelo PCR para Ni(II)	120
3.4.2.3.1	Selección del número óptimo de factores	120
3.4.2.3.2	Estudio de regiones del perfil cinético	121
3.4.2.3.3	Modelo de calibración	122
3.4.2.3.4	Etapa de predicción	123
3.4.2.4	Análisis del modelo PLS para Ni(II)	124
3.4.2.4.1	Selección del número óptimo de factores	124
3.4.2.4.2	Estudio de regiones del perfil cinético	125
3.4.2.4.3	Modelo de calibración	126
3.4.2.4.4	Etapa de predicción	126

3.4.2.5	Discusión de los resultados de la calibración con modelos lineales	128
3.4.3	Método de calibración no lineal: Redes Neuronales Artificiales	129
3.4.3.1	Compresión de variables	129
3.4.3.2	Descripción de las redes utilizadas	129
3.4.3.3	Entrenamiento de las redes	130
3.4.3.4	Validación de los modelos ANNs	137
3.4.3.4.1	Estudios de exactitud	137
3.4.3.4.2	Estudios de precisión: repetitividad y reproducibilidad	138
3.4.3.4.3	Frecuencia Analítica	142
3.4.3.5	Predicciones sobre muestras reales con los modelos ANNs	143
3.5	Conclusiones	144

CAPÍTULO 4: Determinación cinética espectrofotométrica de Cu(II) y Ni(II) en mezclas

4.1	Introducción	146
4.2	Optimización de condiciones experimentales	146
4.2.1	Variables inherentes al sistema FIA	146
4.2.2	Variables Fisicoquímicas	147
4.2.2.1	Criterio de optimización	147
4.2.2.2	Diseño Central Compuesto	147
4.3	Diseño de muestras de calibración	149
4.4	Resultados y discusión	150
4.4.1	Método paramétrico de cuantificación	150

4.4.1.1	Estimación de los parámetros cinéticos	150
4.4.1.2	Predicciones basadas en el método paramétrico de cuantificación	157
4.4.2	Métodos multivariados quimiométricos de cuantificación	160
4.4.2.1	Modelos de regresión por cuadrados mínimos parciales	161
4.4.2.1.1	Construcción de los modelos PLS	161
4.4.2.1.1.1	Diseño aleatorio normalizado	161
4.4.2.1.1.2	Diseño totalmente aleatorio	168
4.4.2.1.1.3	Diseño factorial	174
4.4.2.1.2	Discusión de los resultados de la calibración con el modelo PLS	179
4.4.2.2	Método de calibración no lineal: Redes Neuronales Artificiales	181
4.4.2.2.1	Estrategia de optimización de los modelos de calibración	181
4.4.2.2.2	Modelos ANNs optimizados para los distintos diseños de mezclas	183
4.4.2.2.3	Estrategia de optimización de la metodología ANNs para el diseño de mezclas aleatorio normalizado	184
4.4.2.2.4	Predicción sobre las muestras de validación	188
4.4.2.2.5	Aplicación a muestras reales	189
4.5	Conclusiones	191
CAPÍTULO 5: Conclusiones		193
Bibliografía		196

INTRODUCCIÓN

Calibración multivariada

La calibración multivariada se refiere al proceso de relacionar, correlacionar o modelar la concentración del analito o el valor de una propiedad química o física a una respuesta multidimensional [1].

Los métodos de calibración multivariada son el área de mayor desarrollo en quimiometría, lo cual se evidencia por el gran número de trabajos publicados en los últimos años [1-3].

Las situaciones en las cuales se aplican los métodos de calibración multivariada en química analítica difieren en su naturaleza [4]. El caso más simple es la calibración para una única especie usando más de una respuesta, como es el caso del uso de más de una longitud de onda en calibraciones espectrofotométricas. Una situación más compleja es una mezcla multicomponente donde se dispone de todos los compuestos puros; así, se puede utilizar un conjunto diseñado de mezclas para la calibración. El ejemplo más general es la obtención de espectros de las mezclas para ser relacionados con las concentraciones de las especies individuales. En otros casos, cuando no es posible diseñar un conjunto de mezclas conteniendo todos los potenciales componentes de las muestras; se recurre a métodos que permiten la predicción de los componentes de interés aún en presencia de especies no conocidas y por lo tanto no modeladas.

La calibración multivariada está estrechamente relacionada con la forma de clasificación de los instrumentos analíticos, que son los que proporcionan los datos que el químico analítico debe estudiar para cuantificar el o los compuestos de interés en una muestra. El tipo de datos obtenidos es el que condiciona el tipo de calibración que puede realizarse. Dentro de este contexto, los instrumentos se clasifican según su orden, del siguiente modo [5, 6]:

1) Instrumentos de orden cero: generan un único dato por muestra. La terminología orden cero se utiliza por analogía con la noción matemática de que un único número es un tensor de orden cero. Este tipo de datos se analiza mediante la calibración univariada.

2) Instrumentos de orden uno: proveen un tensor de orden uno, o sea un vector de datos por cada muestra. Este tipo de datos se analiza mediante los métodos de calibración de primer orden.

3) Instrumentos de orden dos: generan una matriz (tensor de orden dos) para cada muestra. Para el análisis de este tipo de datos se utilizan las técnicas de calibración de segundo orden.

No existe límite máximo teórico para el orden de un instrumento. Pueden desarrollarse técnicas que provean cubos y hasta hipercubos de datos por muestra. Así, es común el uso de notación matricial para visualizar la estructura de los datos multivariados.

En la Figura 1 se muestra la forma de representación de los datos obtenidos para una muestra utilizando dos tipos de instrumentos. En el primer caso (Figura 1a) se representa una matriz de una única columna de datos de absorbancia (Y) a diferentes tiempos obtenidos con un instrumento de primer orden y en la Figura 1b una matriz de absorbancias a diferentes tiempos obtenidos con un instrumento de segundo orden.

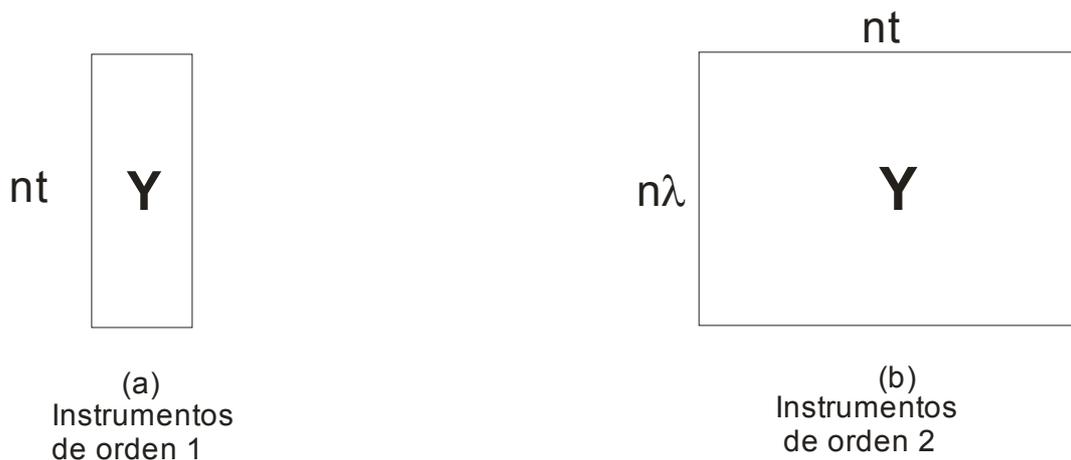


Figura 1: Representación matricial de datos de (a) primer orden y (b) segundo orden

Dentro de los métodos de calibración multivariada de primer orden (MVC1), los más populares para la resolución de sistemas lineales son: regresión lineal múltiple (MLR), regresión por componentes principales (PCR) y regresión por cuadrados mínimos parciales (PLS) [3, 7-10]. La atracción de MLR radica en la fácil interpretación del modelo ya que los parámetros estimados relacionan linealmente la propiedad de interés con un conjunto de variables originales. PCR y PLS son llamados métodos de espectro completo, basados en el análisis de factores o combinaciones lineales de las variables originales [11]. La diferencia fundamental entre ambos radica en la información que se utiliza para obtener dichos factores; PCR extrae la información principal presente en las variables predictoras, mientras que PLS utiliza simultáneamente las variables respuesta y las variables predictoras de una manera más compleja. Los principios teóricos relativos a cada uno de los métodos serán descritos en el Capítulo 3. PCR y PLS se utilizan cada vez más debido a la calidad de los modelos de regresión que producen y a la facilidad de implementación por la gran cantidad de programas disponibles para su ejecución [1].

El área de mayor aplicación de los métodos PLS y PCR en química analítica es el análisis espectrofotométrico de mezclas.

La espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) es una técnica analítica bien establecida que permite el análisis de muestras multicomponentes en una manera rápida y no destructiva. Su combinación con el análisis multivariado, en particular PLS y PCR, ha sido muy difundida para el análisis de diferentes matrices complejas tales como fármacos [12], naftas [13], biodiesel [14,15], alimentos [16-23], pesticidas [24].

Las determinaciones espectrofotométricas de sistemas multicomponentes en la región ultravioleta (UV) y visible (Vis) se basan en general en el análisis de los espectros de las mezclas de los componentes o de los espectros de complejos de los constituyentes de dichas mezclas. En muchas situaciones el alto solapamiento impide una cuantificación utilizando los métodos tradicionales de calibración de orden cero y se requiere la aplicación de los métodos de calibración multivariada de primer orden.

En el caso de la combinación de las técnicas de espectrofotometría visible y calibración multivariada se encontró una gran aplicación especialmente en el análisis de mezclas de iones metálicos. En esta línea de trabajo se cuantificaron mezclas de Cu(II), Co(II), Zn(II), Ni(II), con una variedad de reactivos complejantes, siendo los más comúnmente utilizados el 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) y el dietilditiocarbamato (DDTC) [25-32]. Un compuesto derivado de la tiocarbonohidrazida se utilizó como reactivo complejante en la determinación de iones divalentes de Fe, Co, Ni y Cu usando PCR y PLS [33]. Para la determinación simultánea de Fe(III), Al(III) y Cu(II) se utilizó PLS sobre los espectros de sus complejos con rojo de alizarina S [34]. Sb(III) y Sb(V) se determinaron simultáneamente aplicando el método PLS sobre los espectros de sus complejos con rojo de pirogalol [35]. El método PLS se aplicó para determinar Cr(VI) en presencia de interferencias de Mo(VI),

Fe(III) y Mn(VII) usando difenilcarbazida como complejante [36]. El mismo método se aplicó para la cuantificación de mezclas de especies inorgánicas, tales como Al(III) y Fe(III) [37], mezclas de lantánidos [38], especiación de antimonio [39], entre otras. El efecto de interferencia de iones sulfato en la determinación de fluoruro en agua basada en la decoloración de una laca con ion Zr(IV) se eliminó con la aplicación de PLS [40].

Al igual que en la región visible, las técnicas de espectrofotometría UV-Vis aplicadas a la resolución de sistemas con un gran número de componentes, con el consecuente solapamiento espectral, resultan inadecuadas en muchos casos. Los métodos multivariados se presentan como la mejor solución para la resolución de distintos tipos de muestras complejas. Así, PLS y PCR se aplicaron para el análisis espectrofotométrico de principios activos en formulaciones farmacéuticas [41-45], análisis de residuos de medicamentos en plasma [46] y análisis de formulaciones multivitamínicas [47,48]. La combinación de las metodologías UV-Vis y calibración multivariada (MLR, PCR y PLS) también se difundió en el campo de cuantificación de mezclas de otros tipos de compuestos orgánicos [49-52].

Por su parte, los métodos de calibración multivariada son una herramienta muy útil para aumentar la selectividad de las técnicas de espectrofluorimetría molecular. Si bien estas técnicas poseen una reconocida sensibilidad, por lo que han sido ampliamente empleadas para la determinación de trazas de compuestos orgánicos e inorgánicos, formulaciones farmacéuticas y sustancias bioactivas, se presentan problemas de selectividad debido a que los analitos exhiben anchas bandas espectrales con su consecuente solapamiento cuando las muestras contienen varios componentes. Así, la combinación de espectrofluorimetría con métodos de calibración multivariados, particularmente

PLS, es una interesante alternativa de análisis de mezclas de multicomponentes en diferentes matrices biológicas [53-55], farmacéuticas [56-58] y ambientales [59-62].

Más recientemente, la calibración multivariada se aplicó en combinación con técnicas electroanalíticas. Aunque las posibilidades de esta combinación fueron poco exploradas debido a respuestas complejas en comparación con las espectroscopías, en muchos casos las técnicas multivariadas demostraron su eficiencia en el modelado de este tipo de sistemas. La mayoría de las aplicaciones cuantitativas descritas en la literatura utilizan los modelos PLS para los datos generados a partir del uso de diferentes variantes de métodos voltamperométricos [63-66].

Ahora bien, los métodos MLR, PCR y PLS requieren para su aplicación la presencia de una relación lineal entre la respuesta y las variables descriptoras. En presencia de no linealidades los modelos pueden linealizarse usando transformaciones apropiadas de las variables originales. Sin embargo, en la mayoría de las situaciones, la forma de la relación no lineal es desconocida y, si bien es posible acomodar esa no linealidad usando componentes de mayor orden, existe el riesgo de introducir en el modelo una cantidad significativa de información irrelevante [11]. Las variantes no lineales de PCR y PLS (PCR y PLS cuadrático y polinomial) [67-70] se basan en la suposición de relaciones simples entre los componentes y la respuesta modelada (por ejemplo cuadráticas), las cuales generalmente son violadas ya que los componentes son combinaciones lineales de las variables originales. El método de regresión pesada localmente (LWR) se basa en la descomposición de un modelo no lineal global en una serie de modelos PLS o PCR lineales locales, lo que genera el riesgo de que los parámetros del modelo local sean menos estables

que aquellos del modelo global ya que son estimados con un conjunto reducido de objetos [11,71,72]. También se desarrollaron otros métodos de regresión no lineal no paramétricos [73] los cuales funcionan muy bien sobre datos no lineales pero son muy complejos computacionalmente.

Otra alternativa para resolver el problema de la no linealidad, es el empleo de Redes Neuronales Artificiales (ANNs), una técnica de calibración no paramétrica, intrínsecamente no lineal, que generó una gran aceptabilidad en numerosas áreas de la química [11,72,74-76]. Los modelos de redes neuronales se diseñaron para imitar los métodos de adquisición de conocimiento y de procesamiento de la información del cerebro humano, tales como la habilidad para aprender mecanismos generales a partir de la presentación de un conjunto de ejemplos reducidos o para generar información correcta a partir de datos de entrada distorsionados. Las ANNs son consideradas como una caja negra que transforma una entrada de m variables en una salida de n variables.

Las redes neuronales de mayor aplicación en los problemas de modelado no lineal en química analítica son las redes multicapa de alimentación hacia delante (MLP), combinadas con el método de retropropagación de los errores como regla de aprendizaje (BP-ANN) [11]. Los principios de funcionamiento de este tipo de redes se detallarán en el Capítulo 3.

La ventaja de los modelos de redes neuronales es que no requieren un conocimiento de la función matemática: la no linealidad de cada unidad de transformación y el gran número de variables ajustables aseguran la suficiente "libertad" para adaptar la red neuronal a cualquier tipo de relación entre datos de entrada y datos de salida [74].

Por esto, su aplicabilidad se extiende no sólo a situaciones en las cuales se conoce a priori la no linealidad en la relación entre respuesta y descriptores sino también para resolver sistemas en los cuales se desconoce la naturaleza de la relación a modelar. Son numerosas las publicaciones en las cuales la metodología ANNs permitió la resolución de mezclas en sistemas no lineales. En la determinación de mezclas de cationes metálicos, a través del análisis de los espectros de sus complejos, se comprobó en varios estudios la capacidad de ANNs en el modelado de no linealidades [77-81]. En el área del análisis de medicamentos, ANNs se utilizó en combinación con técnicas NIR [82-84] y UV [85,86] para cuantificar los diferentes principios activos de formulaciones farmacéuticas. Los métodos de calibración basados en ANNs y PLS se aplicaron sobre espectros NIR en el seguimiento de procesos biotecnológicos, demostrándose la superioridad de ANNs no sólo en el modelado de no linealidades sino también en la resolución de señales complejas y solapadas [87]. Las mediciones de quimiluminiscencia de residuos de pesticidas organofosforados procesadas por ANNs mostraron resultados muy satisfactorios cuando se cuantificaron mezclas de pesticidas en vegetales [88]. La calibración con ANNs también se utiliza, aunque en menor medida, en combinación con diferentes métodos electrométricos para la resolución de mezclas de especies inorgánicas [89-91] y orgánicas [92,93].

Por último, y en particular, es importante mencionar que las técnicas de calibración multivariada encuentran una creciente aplicación en la cuantificación de datos provenientes de métodos cinéticos. Las metodologías basadas en mediciones cinéticas [94] constituyen un área interesante en química analítica. Los datos multivariados provenientes de estas metodologías pueden ser modelados a fin de estimar los parámetros cinéticos tales como

órdenes y coeficientes de velocidad, los cuales se utilizan para obtener información analítica. Los métodos quimiométricos basados en análisis de factores (PCR y PLS) y en inteligencia artificial (ANNs), en cambio, no requieren del conocimiento de parámetros cinéticos para su aplicabilidad en la resolución multivariada de determinaciones basadas en cinética. En particular ANNs, es un método muy atractivo para este tipo de sistemas cuando se presentan no linealidades tales como órdenes de reacción diferentes de cero y uno, efecto sinérgico, procesos multipaso o cualquier otro tipo de efecto no lineal desconocido.

Métodos cinéticos de análisis

Los métodos cinéticos de análisis presentan un gran número de ventajas con respecto a los denominados métodos termodinámicos o de equilibrio, las cuales se comentarán más adelante.

Todos los procedimientos analíticos en los cuales la etapa de medición es influenciada por un proceso transiente (cinético), se clasifican como métodos cinéticos y la mayoría de los métodos analíticos modernos son cinéticos en su naturaleza [95].

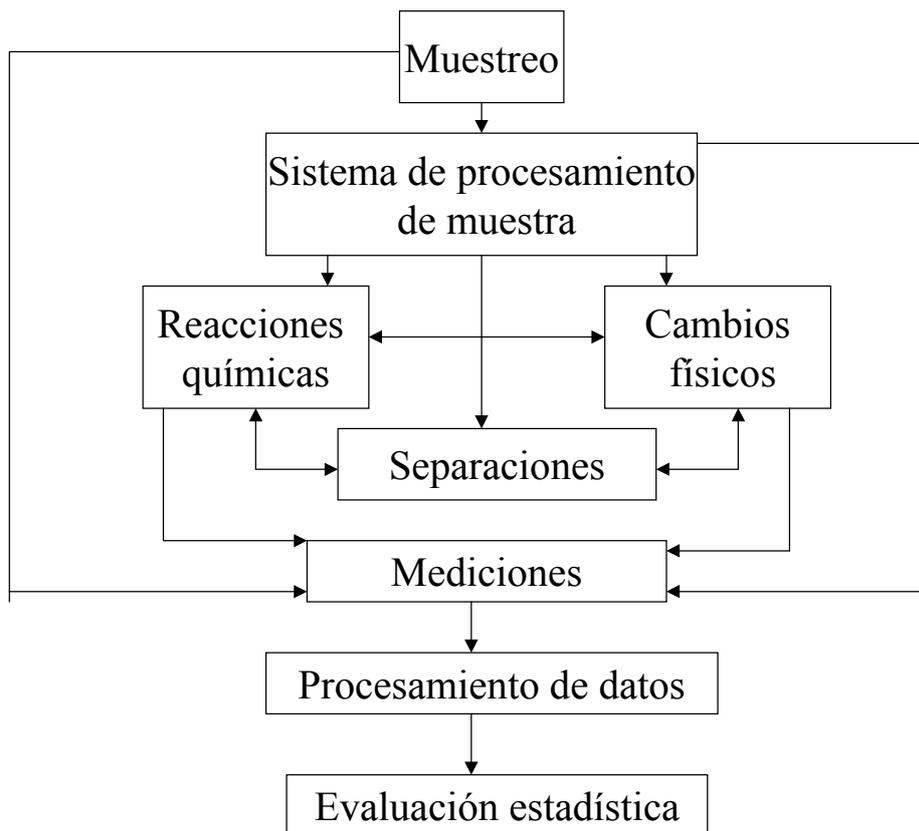


Figura 2: Operaciones funcionales en las determinaciones químicas

En la Figura 2 se resumen las operaciones funcionales involucradas en una determinación cuantitativa. Algunas determinaciones incluyen todas las operaciones de la Figura 2, mientras que otras pueden incluir sólo parte de ellas. Sin embargo, todas las determinaciones deben incluir una etapa de medición en la cual es medido el llamado objeto de medición, relacionado con la concentración o con otra propiedad de interés. Este objeto de medición puede ser la señal de un detector o cualquier otra variable tal como la masa, volumen de titulante, tiempo de electrólisis, tiempo de reacción, tiempo de retardo de fluorescencia, etc.

En cualquier caso uno elige entre dos posibilidades la forma de medir el objeto de medición: ya sea después de que todos los procesos que lo afectan alcanzaron el equilibrio o mientras uno o más de dichos procesos se

encuentran todavía en una fase transiente. Si se trabaja con la primera opción, el procedimiento se clasifica como método de equilibrio; si se utiliza la segunda opción, el procedimiento se clasifica como determinación cinética.

La distinción entre los dos tipos de métodos se ilustra en la Figura 3 en la que se muestra la evolución de la siguiente reacción con el tiempo:



donde A es el analito, R es el reactivo y P es el producto. Los métodos termodinámicos operan en la región que está más allá del tiempo t_e cuando las concentraciones de los reactivos y productos se han hecho constantes y el sistema está en equilibrio; así, la cantidad de P producida se relaciona con la concentración inicial de A.

Por el contrario, los métodos cinéticos emplean la información generada en el intervalo de $0-t_e$ en el que las concentraciones de reactivos y productos cambian constantemente. Esta zona se denomina región cinética. La velocidad de formación del producto o de desaparición de A es la velocidad de reacción, v , y puede usarse como una medida de la concentración inicial de A.

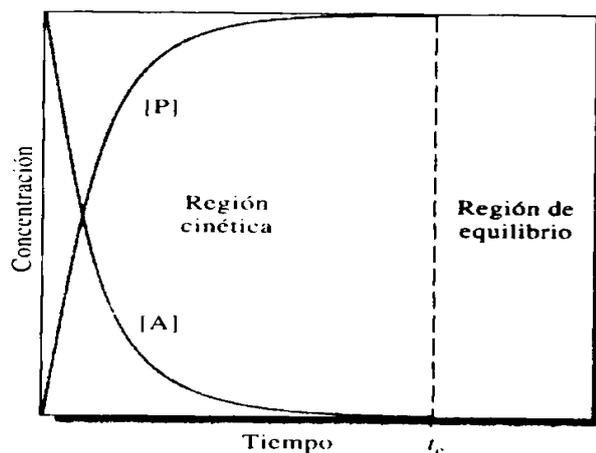


Figura 3: Cambio de la concentración del analito A y producto P en función del tiempo (ref. [95])

Los métodos cinéticos presentan ventajas respecto a los métodos basados en el equilibrio, a saber:

- a) Pueden ser más rápidos. Si las medidas son realizadas en la región cinética no es necesario esperar a que se llegue al equilibrio.
- b) Son medidas relativas y libres de interferencias de fondo. Los métodos cinéticos son inherentemente relativos y no dependen de las concentraciones absolutas, sino de los cambios de concentración.
- c) Pueden ser más selectivos. Esto es así si las especies interferentes reaccionan con el reactivo R con un mecanismo o una velocidad diferente que el analito de interés.
- d) Las diferencias mencionadas en el inciso previo pueden ser aprovechadas para desarrollar determinaciones cinéticas de multicomponentes.
- e) Los métodos cinéticos amplían el número de reacciones químicas que se pueden emplear con fines analíticos, ya que permiten usar reacciones que son demasiado lentas o incompletas como para ser empleadas en procedimientos termodinámicos.

- f) Los métodos cinéticos permiten la determinación de especies que actúan como catalizadores, las cuales no pueden ser determinadas por métodos basados en el equilibrio.

Sin embargo, los métodos cinéticos presentan también una serie de desventajas:

- a) Tienen menor precisión que los métodos basados en el equilibrio debido a que las mediciones se basan en pequeños cambios en la señal, a diferencia al cambio total medido cuando se llega al equilibrio.
- b) Son generalmente mas dependientes de las variables experimentales tales como pH, temperatura, fuerza iónica, presencia de inhibidores, etc.
- c) Requieren sistemas sensibles de medida para detectar pequeños cambios de concentración.
- d) Las velocidades de reacción no deben ser mayores a las velocidades de mezcla.

Debido a estas limitaciones, principalmente por la gran dependencia con las variables experimentales, la aplicación de los métodos cinéticos fue muy discutida en el pasado y aún los precursores de estos métodos sugirieron que no deberían usarse si se dispone de una metodología alternativa [94,95]. Actualmente, los métodos automatizados permiten reproducir las condiciones experimentales y mezclar cantidades exactas de muestra y reactivos en forma rápida y reproducible. Además, se utilizan conjuntamente con los métodos de calibración multivariada ya mencionados, permitiendo el procesamiento de la totalidad de la información cinética obtenida mediante los denominados métodos de primer orden, con una precisión mayor que aquellos basados en condiciones de equilibrio.

Existen diferentes criterios de clasificación de los métodos cinéticos. Uno de ellos, propuesto por Pardue [95], que se focaliza en las opciones de medición/tratamiento de datos, divide a los métodos cinéticos en dos grandes grupos:

- a) Métodos desarrollados para la determinación de un único componente en ausencia de interferencias cinéticas.
- b) Métodos desarrollados para uno o mas componentes en mezclas de especies que producen reacciones similares.

Otros esquemas de clasificación se basan en otras características como las fases en las que se desarrolla la reacción (homogéneas o heterogéneas), la química de las reacciones utilizadas (reacciones rédox, reacciones de intercambio de ligandos, etc.) o en el tipo de determinación, por ejemplo, catalíticas y no catalíticas [94].

Métodos catalíticos. Metodologías clásicas de cuantificación

Existe un gran número de métodos analíticos cinéticos basados en el empleo de reacciones catalizadas. Las determinaciones catalíticas en general se utilizan para la determinación de una única especie. En algunos casos, el analito es el catalizador y se determina a partir de su efecto sobre una reacción que incluye reactivos y productos fácilmente medibles. En otros casos, el catalizador se introduce para acelerar la reacción del analito con el reactivo.

Las ventajas más reconocidas de las determinaciones catalíticas son bajos límites de detección y alta sensibilidad. El uso de monitoreo fotométrico y la gran disponibilidad de reacciones indicadoras indudablemente contribuyeron a

su popularidad [94]. Las reacciones indicadoras proporcionan la información o señal química que se relaciona con la concentración de los analitos.

Los métodos catalíticos pueden dividirse en dos categorías fundamentales:

- a) Uso directo de efectos catalíticos primarios (determinación directa del catalizador)
- b) Uso de velocidades catalíticas modificadas (determinación indirecta del modificador), donde se incluyen la inhibición o la activación.

Las reacciones más empleadas como reacciones indicadoras en métodos catalíticos de naturaleza no enzimática son las reacciones rédox, y son muchos los sistemas químicos orgánicos e inorgánicos disponibles para el análisis de especies que actúan como catalizadores típicos en dichos sistemas [96-99].

Ahora bien, los métodos clásicos de tratamiento de los datos provenientes de determinaciones catalíticas pueden dividirse en dos categorías principales: métodos integrales y métodos diferenciales. Ambos pueden ser subdivididos como sigue [94]:

Métodos diferenciales: Medición de la velocidad inicial

Medición de la pendiente

Métodos integrales:

Mediciones a tiempo fijo

Mediciones a tiempo variable

Método de las tangentes

Los métodos diferenciales de medición de la velocidad inicial involucran la medición de la pendiente de la curva de señal vs. tiempo para un tiempo cercano a cero. Las velocidades iniciales se relacionan linealmente (bajo una serie de simplificaciones y para cinéticas simples) con las concentraciones de

catalizador. La principal ventaja atribuida al uso de estos métodos es que no hay contribución apreciable de la reacción inversa y de reacciones laterales por trabajarse en tiempos cercanos a cero. Otra ventaja es que la velocidad de reacción puede ser considerada de orden cero con respecto a los reactivos ya que sus concentraciones no cambian apreciablemente. El éxito de las mediciones de velocidad inicial depende fuertemente de la disponibilidad de un sistema de detección lo suficientemente sensible y reproducible para monitorear pequeños cambios de concentración de reactivos o productos al comienzo de la reacción.

Los métodos de medición de la pendiente involucran la evaluación de la pendiente a un tiempo dado durante la reacción. Son de uso muy poco frecuente, salvo en asociación con evaluación de velocidad multipunto en el perfil de reacción.

Los métodos integrales se basan, como su nombre lo indica, en la integración de la expresión de velocidad de reacción sobre un intervalo de tiempo finito, constante, pero no necesariamente intervalos de tiempo pequeños. Para un tiempo fijo y considerando cinéticas de primer orden o pseudo primer orden, la variación de la respuesta es directamente proporcional a la concentración inicial de catalizador, $[C]_0$, y de esta forma es posible la construcción de una curva de calibrado de cambio de respuesta versus $[C]_0$ para distintas concentraciones del analito. El uso del método de tiempo fijo para la cuantificación cinética clásica de especies metálicas está muy difundido. En el caso del Cu(II) diferentes reacciones redox [100-102] y ácido-base [103] se utilizaron para su determinación catalítica aplicando este método. El Cu(II) se determinó simultáneamente con el Fe(II) en aguas naturales utilizando ligandos

enmascarantes para eliminar alternativamente el efecto catalítico de cada uno de ellos sobre la reacción de acoplamiento oxidativo entre p-anisidina y N,N-dimetilanilina [104]. La medida del cambio de absorbancia a un tiempo fijo se utilizó como señal en cada caso. Con este método se determinó Al(III) en base su acción catalítica sobre la reacción de oxidación de galocianina con peróxido de hidrógeno [105]. Reacciones de oxidación por permanganato sobre especies reductoras catalizadas por As(III) también se evaluaron con el método de tiempo fijo para la determinación de As(III) en muestras ambientales [106,107]. Se determinó Se(IV) en presencia de Se(VI) en base a su efecto catalítico en la reacción de reducción de tionina con sulfuro, aplicando el mismo método [108].

Los métodos integrales de tiempo variable o de absorbancia fija (para el caso en que la detección sea fotométrica) se basan en las mediciones de los tiempos de reacción necesarios para producir un cambio prefijado en la señal monitoreada (para el reactivo o el producto). Para cinéticas simplificadas, una gráfica de la inversa de tiempo vs. $[C]_0$ debe ser lineal y provee la calibración para esta metodología de cuantificación. La reacción de reducción de resazurina con sulfuro se utilizó para la determinación catalítica de Se(IV) [109] y de Pb(II) [110] aplicando en ambos casos el método a tiempo variable.

Ambos métodos, de tiempo fijo y de absorbancia fija, los utilizaron Arikan y col. para la determinación de Se(IV) basada en su efecto catalítico en la reducción de azul de metileno por sulfuro [111].

El método de las tangentes es un método integral basado en “gráficos cinéticos”. La dependencia del orden de reacción respecto a la especie monitoreada determina el tipo de gráfico a utilizar. La mayoría de las

determinaciones catalíticas se realizan bajo condiciones para las cuales tal dependencia es de primer orden. Para dependencia de primer orden, los gráficos de logaritmo de concentración de la especie monitoreada (producto o reactivo) en función del tiempo conduce a una familia de líneas rectas cuyas pendientes (generalmente designadas constantes de pseudo primer orden) están linealmente relacionadas con la concentración de catalizador. La representación de estas pendientes en función de la concentración de catalizador provee la calibración para el método de las tangentes. El método de las tangentes se utilizó para el tratamiento de los resultados cinéticos obtenidos para la reacción del azul de metileno con peroxo disulfato de amonio catalizada por Au(III) [112]. Otros autores aplicaron el método de las tangentes para la determinación de Fe(III) basada en su efecto catalítico sobre la reacción rédox entre el pirogalol-5-sulfonato y el peróxido de hidrógeno [113]. Estudios de especiación de hierro se realizaron utilizando el método de las tangentes en la reacción de oxidación de α -fenilendiamina con peróxido de hidrógeno catalizada por Fe(II) [114].

Las tres variantes de los métodos integrales se evaluaron cuando se aplicaron para la determinación catalítica de Fe(III) con la reacción entre hidroquinona y cromato, donde los mejores resultados se obtuvieron para el caso de mediciones a tiempo variable [115].

Los métodos de cuantificación comúnmente utilizados para determinaciones basadas en un efecto catalítico del analito se extendieron a situaciones en las que los analitos presentan un efecto inhibitorio sobre la reacción indicadora. En este hecho se basó el trabajo de Kompany-Zareh y col.

[116] en el que cuantificaron Hg(II) en base a su efecto inhibitorio en la reacción de adición entre el verde de metilo y sulfito utilizando el método de tiempo fijo.

Otro método no tan frecuentemente utilizado en determinaciones catalíticas se basa en la medición de la longitud del período de inducción en reacciones en que se observa un tiempo de retardo entre el mezclado de los reactivos y la aparición de cambios en la composición química del sistema. En la mayoría de los casos la longitud del período de inducción se relaciona de manera inversa con la concentración del catalizador. Tavallali y Massoumi [117] utilizaron la medida del tiempo de inducción en la reacción de oxidación de índigo carmín con bromato, originada por la presencia de Fe(III); simultáneamente se determinó V(V) a través del efecto que éste ejerce sobre la velocidad de la reacción. La determinación de As(III), basada en el efecto inhibitorio del analito sobre la reacción redox entre bromato y ácido clorhídrico [118] se llevó a cabo utilizando la medida del tiempo de inducción originado por la presencia de As(III). En este caso el analito produce un tiempo de retardo, que se relaciona directamente con la concentración de As(III).

El uso de los métodos de determinación catalítica no se limita al análisis de especies metálicas y semimetálicas. Se aplicaron para la determinación de otro tipo de especies catalíticas tales como iones bromuro [119,120], iones yoduro [121], formaldehído [122], entre otros.

Es importante notar que los métodos clásicos de cuantificación descritos para determinaciones catalíticas, tanto diferenciales como integrales, están limitados en general para el análisis de una única especie catalítica con cinéticas simples y conocidas. Sin embargo, no son aplicables para resolver mezclas de analitos ya que, salvo en el caso de reacciones enzimáticas, no son

métodos selectivos. Una alternativa para aumentar la selectividad es el uso de inhibidores, los cuales reaccionan diferencialmente con los analitos, permitiendo así la determinación de dos o más catalizadores en forma simultánea [123]. Otra forma de cuantificación simultánea de catalizadores fue propuesta por Zhu y col. [124] a través de ecuaciones simplificadas basadas en un completo conocimiento de la cinética del sistema y en la presencia de pequeñas diferencias en el comportamiento cinético de los analitos.

Metodologías multivariadas de cuantificación en mediciones cinéticas. Métodos quimiométricos y métodos paramétricos

Las limitaciones analíticas de los métodos cinéticos clásicos pueden mejorarse considerablemente con la aplicación de técnicas multivariadas [4-6,125,126]. En el caso particular de métodos basados en reacciones catalíticas, los cuales ofrecen muy buena sensibilidad, el problema más frecuente es la baja selectividad. Esto es debido a que el comportamiento catalítico está determinado por el tamaño, estructura, carga y esfera de coordinación del catalizador, lo cual resulta en efectos catalíticos similares para especies químicas similares. Sumado a esto, la aplicación de los métodos clásicos de cuantificación descriptos para estas determinaciones catalíticas requieren el conocimiento del mecanismo cinético del sistema químico o reacción indicadora utilizada. Estos problemas pueden solucionarse a partir del análisis de información multidimensional usando los métodos quimiométricos de calibración multivariada. El gran contenido de información presente en los datos multivariados aumenta la calidad de los resultados analíticos y por otra parte puede utilizarse ventajosamente tanto para solucionar la presencia de

interferencias como para la resolución de sistemas multicomponentes. En este campo los datos disponibles a partir del desarrollo de una reacción química permiten su aplicación analítica cuantitativa tanto con los métodos de calibración multivariada de primer orden, utilizando perfiles cinéticos o espectrales, como con métodos de calibración multivariada de segundo orden utilizando, en este caso, perfiles cinéticos a longitudes de onda múltiples [127].

La aplicación de los diferentes métodos de calibración multivariada al análisis de datos cinéticos constituyen los métodos denominados *soft modeling*, los cuales no requieren conocer o asumir un modelo cinético determinado ni los parámetros asociados a dicho modelo, tales como órdenes de reacción o valores de constantes de velocidad de reacción.

Los datos de las mediciones cinéticas se procesan por estos métodos para desarrollar modelos de calibración. Para cada muestra puede obtenerse un vector dato registrando la respuesta o señal instrumental adquirida durante un período de tiempo; por otra parte, el correspondiente espectro a un tiempo de reacción preseleccionado constituye otro tipo de vector dato que provee información analítica relevante. Cualesquiera de estos vectores dato obtenidos para varios estándares o muestras desconocidas, dispuestos en un arreglo matricial, pueden correlacionarse con la concentración de los analitos usando métodos de calibración de primer orden [5]. Los métodos de calibración multivariada de primer orden más aplicados en determinaciones cinéticas son la regresión lineal múltiple clásica (MLR), regresión inversa y los métodos basados en la reducción de variables como regresión por componentes principales (PCR) y regresión por cuadrados mínimos parciales (PLS). Las aplicaciones de los métodos multivariados de primer orden se extienden a la

determinación cinética de una única especie o de mezclas de especies metálicas [128-130] y no metálicas [131-134].

En los métodos de calibración de segundo orden se generan matrices de datos registrando el espectro completo a pasos regulares de tiempo durante el proceso de medición (medidas de absorbancia-longitud de onda-tiempo). La ventaja que ofrecen estos métodos de segundo orden es que la calibración es posible aún en presencia de múltiples interferencias, sin que se requiera su inclusión en el modelo. De esta manera, la cuantificación del analito puede ser realizada utilizando estándares puros para la construcción del modelo. Los más utilizados en determinaciones cinéticas son análisis paralelo de factores (PARAFAC), PLS multidimensional (N-PLS), descomposición trilineal (TLD) y cuadrados mínimos alternantes (ALS) [127,135,136].

Las redes neuronales artificiales (ANNs) constituyen una metodología de calibración multivariada atractiva para resolución de sistemas cinéticos complejos debido a su habilidad para modelar sistemas no lineales [11,74,137]. Se utilizaron exitosamente para la determinación cinética de catalizadores V(II) y Fe(II) [138], mezclas de complejos de Fe(III), Co(II) y Zn(II) [139], Se(IV) y Te(IV) [140], Co(II) y V(IV) [141]. Su aplicación se extiende a la resolución cinética de mezclas de compuestos orgánicos como clorofenoles [137], mezclas de compuestos de azufre [142,143], drogas de uso farmacéutico [144-146], azúcares reductores [147], antioxidantes de alimentos [148], aminoácidos [149], etanol y metanol [150], entre otros casos.

La información multivariada proveniente de las mediciones basadas en cinética puede utilizarse con propósitos analíticos a través del uso de los métodos paramétricos que se basan en el modelado cinético del sistema y la

determinación de los parámetros del modelo tales como órdenes de reacción y coeficientes de velocidad. Estos también se conocen como métodos *hard modeling*. La postulación de los modelos cinéticos se realiza a partir del conocimiento del sistema y de observaciones experimentales [151-155]. Los datos experimentales de señal medida en función del tiempo (vectores o matrices) se ajustan a las expresiones cinéticas propuestas, utilizando algoritmos iterativos. Se obtiene el conjunto de parámetros que describe el modelo a través de un procedimiento de optimización que ajusta los valores de dichos parámetros minimizando la suma de los cuadrados de los residuos. A partir del conocimiento de los parámetros cinéticos para las etapas involucradas en el modelo analizado, es posible establecer relaciones que permiten obtener información cuantitativa de los analitos que intervienen en la reacción ya sea como reactivos o como catalizadores.

Sistemas de inyección en flujo. Una necesidad para la aplicación de métodos cinéticos

Como ya se mencionó, uno de los requisitos para la utilización efectiva de los métodos cinéticos es el estricto control de las condiciones experimentales. Es de prever que todas las etapas que puedan ser automatizadas mejorarán la reproducibilidad y repetitividad de los métodos cinéticos y los harán más competitivos frente a los de equilibrio.

El mayor crecimiento en la aplicación de los métodos cinéticos, evidenciado por el aumento del número de publicaciones en el área, se manifestó a partir de los años 80 en coincidencia con el inicio del uso de sistemas de flujo continuo en química analítica [94].

El concepto de análisis por inyección en flujo (FIA) introducido por Ruzicka y Hansen [156] marcó una etapa de importancia fundamental en química analítica. Después de quince años de desarrollo, FIA emergió como una nueva forma de manipulación de soluciones en el laboratorio analítico. Aparte de las reacciones químicas, muchos otros procesos pueden ser implementados y automatizados en sistemas de flujo. Entre ellos, intercambio iónico, preconcentración, clean-up, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, precipitación, etc. Otra característica atractiva es la posibilidad de usar reactivos inestables que se descomponen cuando se utilizan procedimientos convencionales [127]. La posibilidad de acoplarlos a diferentes detectores (absorción molecular, absorción atómica, fluorescencia molecular, etc.) extiende esta capacidad al análisis de trazas, aportando no sólo la posibilidad de automatización sino también la eliminación de las desventajas de la alternativa off-line en niveles bajos de concentración (consumo de tiempo, contaminación, pérdida de analito, etc.).

El análisis por inyección en flujo continuo se definió originalmente como la inyección de una muestra líquida en una corriente continua no segmentada de una solución apropiada. La muestra inyectada se transporta a un detector el cual registra un parámetro físico-químico característico que cambia cuando la muestra "pasa" [156].

Los principios básicos del FIA pueden resumirse en:

- Las muestras son inyectadas directamente en una zona bien definida de una corriente de solución transportadora.
- La dispersión del analito en esta zona es controlada por la geometría y las características hidrodinámicas del sistema de flujo.

- Los tiempos de circulación de los fluidos son altamente reproducibles.

Particularmente para métodos basados en determinaciones cinéticas, el análisis por inyección en flujo es muy adecuado debido a que la adición de reactivos y el tiempo de reacción pueden ser fácil y exactamente controlados ya que el control estricto de los caudales y los tiempos precisos de inyección son características distintivas del FIA. De esta manera los métodos cinéticos por inyección en flujo ofrecen mayor exactitud, precisión y velocidad de operación en comparación con la alternativa discontinua. Además de hacer los procedimientos más robustos, la automatización aumenta significativamente la frecuencia de análisis.

La cuantificación, cuando se utilizan estos sistemas, generalmente se basa en métodos de calibración de orden cero en los cuales las alturas o áreas de pico son utilizadas como respuesta para correlacionarlas con la cantidad de analito presente. El uso de estos métodos de calibración para reacciones catalíticas llevadas a cabo con sistemas de inyección en flujo y detección espectrofotométrica [157-170] ha sido extensamente aplicado a la determinación de especies metálicas.

Por otra parte, a partir del empleo de sistemas FIA, se genera muy fácilmente información multidimensional, con la cual la cuantificación puede realizarse empleando los ya mencionados métodos multivariados de calibración de primero y segundo orden [127,171-175].

La definición de FIA se modificó con el transcurso del tiempo llegándose a una expresión más general: la obtención de información de un gradiente de concentración formado por una zona bien definida de un fluido que es

dispersado en la corriente continua de una solución transportadora no segmentada. Esta nueva definición incluye dentro de la técnica nuevas estrategias como: flujo detenido, zonas de mezcla, zonas de muestreo y otras técnicas de gradiente [176]. Estas estrategias se utilizan para la determinación simultánea de especies a través de diferentes métodos tales como doble inyección de muestra [177-179], detección multisitio [180-183], generación de gradientes de pH [184]. Los métodos de flujo detenido presentan la ventaja de mejorar la sensibilidad de las determinaciones cinéticas al aumentar el tiempo de residencia, minimizando además la dispersión y reduciendo el consumo de reactivos y su uso se extiende a la determinación de especies orgánicas e inorgánicas [185-190]. Los sistemas de inyección en flujo con modo detenido también se utilizaron en combinación con métodos de calibración multivariada para la determinación cinética simultánea de diferentes especies en mezclas. Blanco y col. usaron las reacciones de intercambio entre los complejos del EGTA (etilenglicol-bis(2-aminoetil eter)-N,N,N',N'-ácido tetraacético) de Fe(III), Co(II) y Zn(II) con PAR (4-(2-piridilazo)-resorcinol para evaluar la adecuabilidad del método de regresión por cuadrados mínimos parciales para calibrar las mediciones cinéticas de mezclas de estos iones metálicos usando un sistema de inyección en flujo con modo detenido [191]. Muñoz de la Peña y col. usaron un sistema de flujo detenido para comparar los resultados obtenidos a partir de diferentes métodos de calibración multivariada para la determinación de mezclas binarias de amoxicilina y ácido clavulánico [192].

En los casos en que la sensibilidad de los métodos cinéticos no es la adecuada, esta puede mejorarse incorporando una etapa de preconcentración, la cual es fácilmente implementada en un sistema FIA, utilizando distintos sistemas de preconcentración. Estos sistemas pueden clasificarse según el tipo

de fases entre las cuales ocurre la transferencia de masa. La extracción líquido-sólido (intercambio iónico, adsorción, precipitación, etc.) es la más utilizada en determinaciones cinéticas [193-195] y se considera una de las técnicas más confiables y de sencilla aplicación.

Objetivos

El objetivo general de este trabajo fue evaluar los alcances y limitaciones de diferentes estrategias de cuantificación multivariada aplicables al procesamiento de datos analíticos de naturaleza no lineal.

En el marco de este objetivo general se seleccionó una reacción química catalítica multipasos como sistema de análisis y como método de medición una técnica espectrofotométrica que permita obtener información linealmente dependiente de las concentraciones individuales de especies involucradas en la reacción química monitoreada.

Los analitos seleccionados para el análisis fueron los cationes divalentes del Cu y del Ni, metales muy utilizados para el mejoramiento de las propiedades del acero y otros materiales. Específicamente en la industria de electroplatinado los iones metálicos Cu(II) y Ni(II), entre otros tales como Co(II), Fe(III) y Cr(III), son comúnmente usados para lograr en sus productos propiedades determinadas de acabado, como color, brillo, resistencia a agentes químicos, etc. Por esta razón, el control de estos metales en los baños de electroplatinado es fundamental para la obtención del producto deseado. Además, y debido a la toxicidad que estos elementos presentan a partir de determinados valores de concentraciones, su control en los efluentes de este tipo de industrias es muy importante desde el punto de vista medioambiental.

De esta manera el objetivo particular de este trabajo de tesis fue la comparación de métodos quimiométricos de calibración multivariada y métodos paramétricos aplicados a la cuantificación simultánea de Cu(II) y Ni(II) con una metodología cinética espectrofotométrica utilizando un sistema de inyección en flujo con modo detenido.

Capítulo 1

Diseño y optimización de la metodología experimental

1.1 Reacción indicadora: reducción de resazurina con sulfuro de sodio en medio alcalino

La resazurina, 10-óxido de 7-hidroxi-3hidro-fenoxacin-3-ona, es un colorante de fórmula molecular $C_{12}H_7NO_4$, no tóxico, soluble en agua, que cambia de color azul oscuro a rosado cuando es reducido a resorufina. La reducción de resazurina con sulfuro de sodio en medio alcalino se utilizó como reacción indicadora para la determinación de iones metálicos que actúan como catalizadores. Afkhami y col. [110] determinaron Pb(II) utilizando un sistema discontinuo, Li y Pacey [185] emplearon un sistema FIA con modo detenido para el mismo propósito y Safavi y col. [109] determinaron Se(IV) con esta reacción. Los estudios de interferencias presentados en estos trabajos indican que las especies Cu(II) y Ni(II) ejercen un alto efecto catalítico sobre la reacción de reducción. Debido a ello, esta reacción de reducción se seleccionó como una reacción indicadora adecuada para la cuantificación de los analitos objeto de este trabajo.

Se conoce que la reacción de reducción de resazurina con sulfuro en medio alcalino procede lentamente sin agregado de catalizador [109, 110, 185]. Es también conocido que la velocidad de reducción se incrementa significativamente en presencia de cantidades traza de ciertos iones metálicos. Se ha propuesto que la reacción tiene lugar en dos pasos sucesivos, los cuales se muestran en la Figura 1.1. El primer paso, cuyo producto es la resorufina, se supone como irreversible. El segundo, reducción de resorufina a dihidroresorufina, se supone como reversible y rápido. Los autores también propusieron que sólo la primera etapa es catalizada por el Se(IV) y los iones metálicos. Utilizaron una aproximación a cinética de pseudo primer orden para la cuantificación de los catalizadores utilizando métodos clásicos integrales.

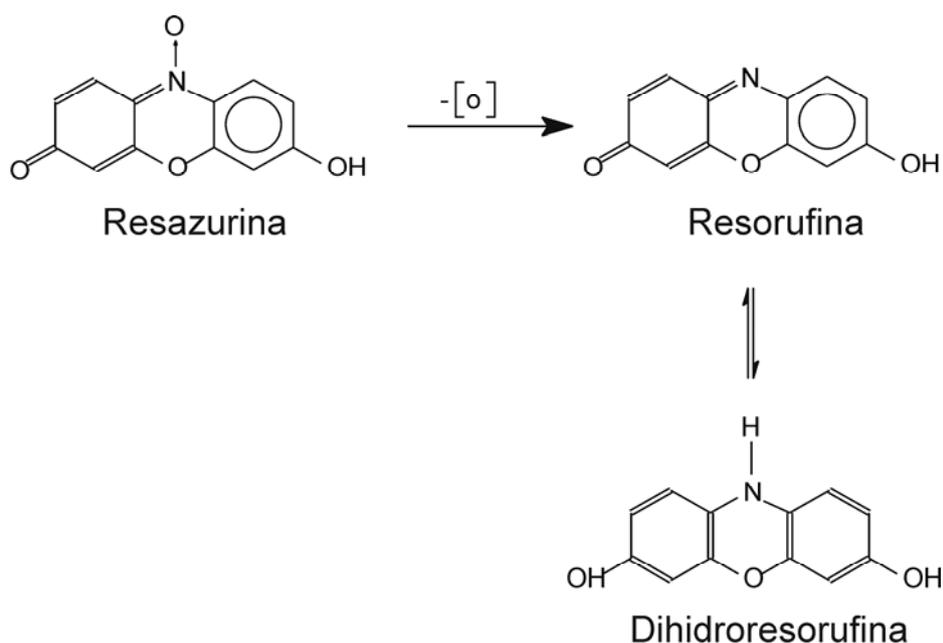


Figura 1.1: Reacción de reducción de resazurina

1.2 Seguimiento de la reacción indicadora

Los espectros de absorción para soluciones de resazurina (10 mg l^{-1}) y de resorufina (8 mg l^{-1}) se registraron en un rango entre 250 y 650 nm (Figura 1.2).

A partir de su análisis se seleccionó una longitud de onda igual a 605 nm para el seguimiento de la reacción, ya que en ese punto se encuentra el máximo de absorción para la resazurina y la absorción de la resorufina es despreciable. Por su parte, el sulfuro de sodio, el hidróxido de sodio y la dihidroresorufina no absorben en esta región espectral. Las soluciones de los cationes metálicos Cu(II) y Ni(II) muestran absorción despreciable a esta longitud de onda, a los bajos niveles de concentraciones utilizados. Se comprobó la linealidad entre absorbancia y concentración para el rango de trabajo de concentraciones de resazurina. De esta manera, la absorbancia a 605 nm se relaciona linealmente con la concentración de resazurina y fue la señal química que se utilizó para el seguimiento de la reacción indicadora.

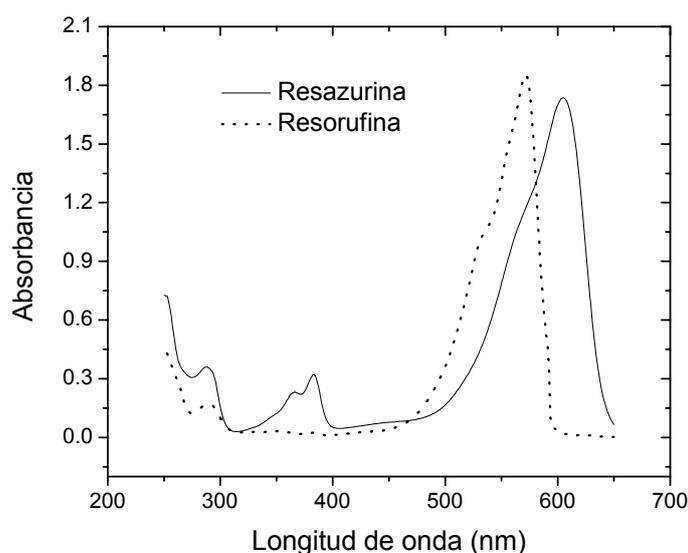


Figura 1.2: Espectros de absorción molecular de resazurina y resorufina

1.3 Configuración del sistema de inyección en flujo con modo detenido utilizado para la determinación de Cu(II) y Ni(II)

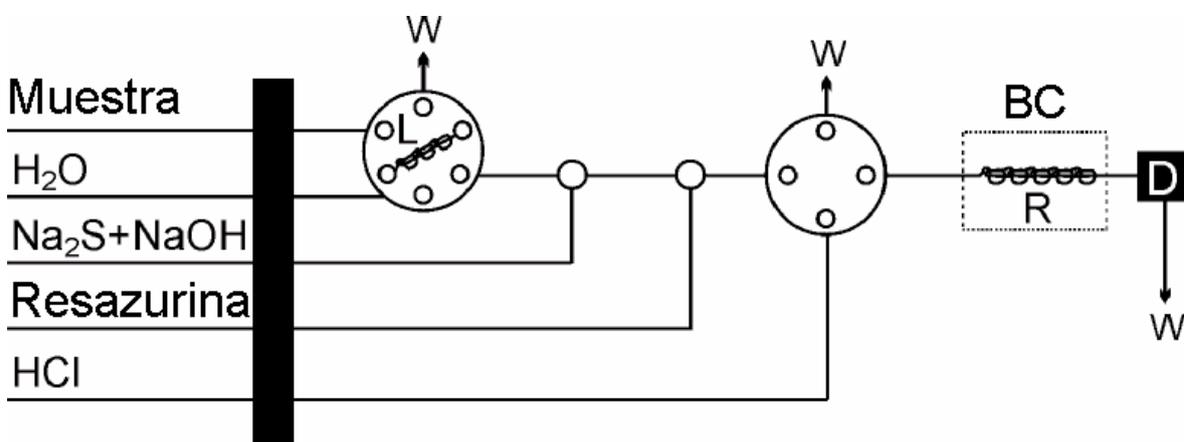
Las ventajas principales que ofrece el uso de sistemas de análisis por inyección en flujo para determinaciones cinéticas ya se mencionaron.

La versatilidad de FIA permite que el método sea adaptable a diferentes sistemas de detección utilizando numerosas configuraciones de *manifold*.

Para diseñar un sistema FIA apropiadamente debe considerarse el objetivo o función para la cual dicho sistema es configurado. Para mediciones de pH, o en conductimetría, o para absorción atómica simple, cuando va a ser medida la composición original de la muestra, ésta debe ser transportada a través del canal FIA hasta la celda de flujo en una forma no diluida y de una manera altamente reproducible. Para otros tipos de metodologías tales como espectrofotometría, fluorescencia o quimiluminiscencia, generalmente la determinación se basa en el desarrollo de una reacción química para lo cual se

requiere que durante el transporte a través del canal FIA la zona de muestra se mezcle con los reactivos con un tiempo de residencia que permita un mezclado eficiente y en la mayoría de los casos la generación del producto deseado en una cantidad detectable. Por otra parte, cuando se utiliza la metodología de flujo detenido, es deseable que la reacción química se lleve a cabo en el punto de detección, durante la detención de flujo, y debe minimizarse su desarrollo en el canal FIA.

El *manifold* usado a lo largo de este trabajo se muestra en la Figura 1.3.



L: loop de muestra, BC: baño termostático, R: reactor de mezcla, D: detector, W: salida de deshechos.

Figura 1.3: Manifold para la determinación espectrofotométrica de Cu(II) y Ni(II).

Se utilizó una bomba peristáltica Ismatec-IPC (ISMATEC-IPC, Suiza) de 8 canales provista con tubos Tygon® para bombear todas las soluciones y para proveer el modo de flujo detenido. La inyección de la muestra en la corriente de portador (agua) se realizó por medio de una válvula de inyección de 6 puertos Vici-Cheminert C22Z (VALCO, USA). Se usó una válvula de inyección de 4 puertos Vici-Cheminert (VALCO, USA) para efectuar las operaciones de limpieza del sistema. La tubería de todo el *manifold* se fabricó con PTFE (0.5 mm i.d.). Se utilizó un reactor anudado como reactor de mezcla a fin de asegurar que las soluciones lleguen al punto de detección en condiciones de

mezclado eficiente. Para mantener el reactor anudado a una temperatura constante, éste se alojó en un baño de termostático convencional. El detector utilizado para las mediciones UV-Vis fue un espectrofotómetro Perkin Elmer UV Lamda 20 equipado con una celda de flujo de cuarzo de 32 μ l provista por Wilmad.

1.4 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y las soluciones se prepararon utilizando agua destilada y deionizada (DD).

Se preparó una solución *stock* de resazurina disolviendo 0.11 g de resazurina (Sigma, pureza 90%) en 100 ml de agua en un matraz volumétrico. Las soluciones de trabajo se prepararon por dilución apropiada de esta solución *stock*, la cual fue estable por varios meses.

Las soluciones de trabajo de sulfuro de sodio se prepararon disolviendo cantidades apropiadas de sulfuro de sodio hidratado (Merck, 35% Na_2S) en agua. Estas soluciones debieron prepararse diariamente.

La solución *stock* de hidróxido de sodio se preparó disolviendo 40 g de hidróxido de sodio (Merck, pureza 99%) en 100 ml de agua. Se agregaron volúmenes apropiados de esta solución a las soluciones de trabajo de sulfuro de sodio.

Las soluciones *stock* de cobre y de níquel se prepararon a partir de sus sales sulfato de cobre pentahidratado (Merck, pureza 99%) y sulfato de níquel heptahidratado (Merck, pureza 99%). Las soluciones de trabajo de ambos cationes se prepararon por dilución apropiada de las soluciones *stock*.

El material de vidrio utilizado en el trabajo se lavó con detergente, y se enjuagó con agua de canilla y agua DD. Se conservó varias horas en solución de ácido nítrico (15%, v/v) y cuidadosamente se enjuagó con agua DD antes de su uso.

1.5 Procedimiento

Antes de la introducción de los reactivos en el sistema de inyección en flujo, éste se lavó con una solución de ácido clorhídrico 1 mol l^{-1} durante 30 min y con agua DD durante otros 30 min adicionales a un caudal de 0.5 ml min^{-1} .

El agua utilizada como portador (*carrier*) y las soluciones de los reactivos sulfuro de sodio (en medio hidróxido de sodio) y resazurina fueron transportados a través de sus canales respectivos a la misma velocidad de flujo hasta el punto de confluencia. Inmediatamente ingresaron al reactor anudado (250 cm de longitud y 0.5 mm de diámetro interno) alojado en el baño de agua calefaccionado lo que permitió que la solución emergente alcance la celda de detección completamente mezclada y a una temperatura uniforme. Los reactivos se bombearon a través del *manifold* hasta que la absorbancia de la resazurina se mantuvo en un valor máximo estable. Cuando esta condición se alcanzó se inyectó en la corriente de *carrier* 250 μl de la solución de la muestra conteniendo Cu(II) o Ni(II) o mezcla de ambos. Después de 60 s. de la inyección el flujo se detuvo durante 120 s. Durante ese tiempo la reacción tuvo lugar en la celda de flujo y la conversión de la resazurina se monitoreó espectrofotométricamente a 605 nm (ancho de slit = 2 nm). Los valores de absorbancia se adquirieron a una velocidad de 1 s por punto. La ventana de reacción de 120 s se eligió como un compromiso entre una alta señal

instrumental y una frecuencia analítica adecuada. Transcurrido ese tiempo se activó la bomba y se realizaron las operaciones de limpieza con una solución de HCl 1 mol l⁻¹ y con agua DD Este paso de limpieza fue imprescindible para remover iones metálicos de la celda de cuarzo. Finalmente, el sistema se encontraba listo para una nueva inyección de muestra.

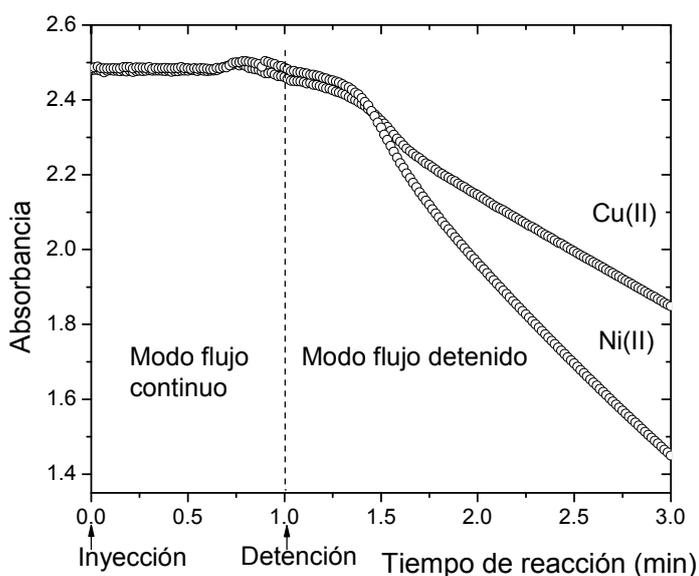


Figura 1.4: Perfiles de absorbancia vs. tiempo para soluciones estándares de 1.0 mg l⁻¹ de Cu(II) y 5.0 mg l⁻¹ de Ni(II)

En la Figura 1.4 se muestran los perfiles característicos (Absorbancia vs. tiempo de reacción) obtenidos para cada uno de los analitos.

1.6 Optimización de las variables de configuración del sistema de inyección en flujo con modo detenido

1.6.1 Fundamentos

Si una solución de muestra de concentración C^0 , contenida en el lazo (*loop*) de la válvula de muestreo, se inyecta en una corriente de *carrier*, podría esperarse que la señal registrada por un detector sea cuadrada. Sin embargo, cuando se inyecta la muestra en un sistema FIA, esta es arrastrada por la

corriente de *carrier* generando una zona de dispersión, la cual depende de la geometría del canal y de la velocidad de flujo [156,176].

Así, la curva de respuesta tiene la forma de un pico reflejando un continuo de concentraciones (Fig. 1.5, derecha), formando un gradiente de concentración, dentro del cual ningún elemento de fluido tiene la misma concentración de muestra que otro cercano a él.

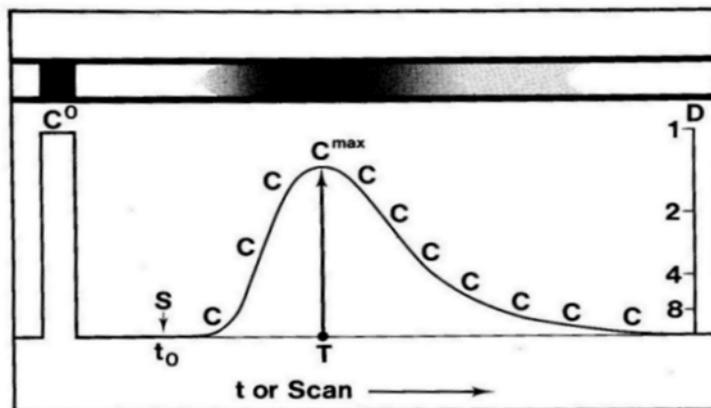


Figura 1.5: Perfil de dispersión de una zona de muestra originalmente homogénea durante su movimiento en un reactor tubular (ref. [156])

Es útil, sin embargo, ver este continuo de concentraciones como un conjunto de elementos individuales de fluido, cada uno de ellos con una cierta concentración C de muestra, donde cada uno de estos elementos es una potencial fuente de lectura.

A fin de diseñar un sistema FIA racionalmente, es importante conocer (a) cuánto de la solución original de la muestra se diluye en su camino al detector y (b) cuánto tiempo transcurre entre la inyección de la muestra y la lectura.

Para este propósito se definió un coeficiente de dispersión D como la relación de concentraciones de la muestra antes y después que el proceso de

dispersión ha tenido lugar en el elemento de fluido que produce la lectura analítica:

$$D = C^0/C \quad (1.1)$$

El valor de D se relaciona con un cierto tiempo, el cual es el período que transcurre desde el momento de la inyección de la muestra, t_0 , hasta el momento t, cuando el elemento de muestra dispersado pasa a través del campo de observación del detector. Así, para el máximo, D^{\max} , se relaciona con t^{\max} .

Las técnicas de gradiente explotan el hecho de que cualquier elemento de fluido a lo largo de la zona de gradiente corresponde a un valor de dispersión bien definido y reproducible y cada uno de estos elementos pueden relacionarse con un tiempo de retardo bien definido a partir del momento de la inyección. Los métodos que utilizan la metodología de flujo detenido se incluyen dentro de este tipo de técnicas. La selección del tiempo de retardo (t_1), después del cual el flujo es detenido, es de fundamental importancia. Es importante determinar cual es el valor requerido de dispersión de la muestra en el punto de detección en el momento de detención del flujo [196]. En el caso de que se busque la máxima sensibilidad se debe realizar la detención del flujo en un tiempo (t^{\max}) en que la dispersión sea mínima en la zona de detección. Sin embargo, como regla práctica el tiempo de detención se elige correspondiendo a un punto de la porción descendente de la curva o pico FIA ($t_1 < t^{\max}$), es decir el flujo se detiene después de que se llega al máximo de pico. Esto es así debido a que la pendiente en esa zona es menor que en la parte ascendente,

donde pequeñas variaciones en el tiempo de retardo pueden significativamente alterar la señal.

Una característica especial de las técnicas de gradiente por inyección en flujo con modo detenido es que puede realizarse un ajuste de la relación de reactivos a muestra seleccionando el tiempo de retardo para realizar la detención del flujo [156, 176].

La aplicación de la metodología FIA con modo detenido para determinaciones basadas en cinética hace uso de la posibilidad de manipular precisa y exactamente el flujo no segmentado en espacio y tiempo, de tal manera que una dada sección de la zona de muestra dispersada puede ser conducida al detector y detenida de una manera reproducible [156]. Si la zona de muestra se detiene dentro de la celda de flujo, es posible registrar el cambio de señal causado por la reacción entre los componentes de la muestra y los reactivos.

Ruzicka y col. [156] mencionaron una serie de ventajas que ofrece la metodología FIA con modo detenido respecto a los métodos FIA convencionales [90]:

- (a) Reproducibilidad. Como en el modo de flujo detenido la determinación está basada en una colección de señales y no en un solo pico (altura de pico) como en los métodos convencionales, los resultados tienen mayor precisión.
- (b) Sensibilidad. La manipulación de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema FIA, sumadas a las diferentes posibilidades de tiempos de detención y arranque, permiten establecer condiciones de

trabajo óptimas a fin de lograr niveles de sensibilidad mayores que los conseguidos por métodos FIA convencionales.

- (c) Exactitud. Los métodos con flujo detenido ofrecen un mayor nivel de confianza que los métodos FIA comunes, ya que estos últimos son más sensibles a perturbaciones que generen desviaciones de linealidad.
- (d) Selectividad. Generalmente, los métodos cinéticos están menos sujetos a interferencias que los métodos analíticos comunes. Una de las ventajas más claras de los métodos con flujo detenido es la eliminación de señales de background por efecto de blanco o de matriz, ya que están basados en mediciones de cambio de señal durante el período de detención.
- (e) Información. Estos métodos proveen mayor información analítica que su contraparte convencional. Además es más fácil optimizar la relación analito-reactivos a fin de obtener respuestas lineales con mayor sensibilidad.

Además de todas estas ventajas el sistema FIA con flujo detenido es fácil de construir, y se requiere un menor consumo de reactivos que en el de flujo continuo. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que si la velocidad de dispersión en la zona de muestra es menor que la velocidad de la reacción química (es decir, el proceso de mezclado de muestra y reactivos es la etapa limitante), las mediciones serán distorsionadas; por lo tanto este método no es adecuado para reacciones con velocidades extremadamente altas.

1.6.2 Geometría del reactor de mezcla

Existe una gran variedad de geometrías que pueden usarse para el diseño de reactores en los sistemas FIA, tales como tubos rectos, tubos espiralados, cámara de mezcla, reactores 3-D o anudados, y otros [176].

La función de estos reactores es incrementar la intensidad de mezclado radial, con lo cual el perfil de velocidad en la dirección axial, formado cuando la zona de muestra es inyectada en la corriente de carrier con flujo laminar, se reduce.

Los reactores desorientados tridimensionalmente (reactor 3-D) o reactores anudados se realizan anudando irregular y herméticamente una adecuada longitud de tubo recto. El movimiento caótico de la corriente de carrier a través de un paso espacialmente desorientado promueve la dispersión radial.

La geometría del reactor de mezcla seleccionada para este trabajo fue la de tubo anudado ya que se consideró adecuada a los fines de tener un mezclado eficiente de muestra y reactivos en la menor longitud de tubo posible.

1.6.3 Dimensiones del reactor de mezcla

Para garantizar el efectivo funcionamiento del reactor de mezcla se varió su longitud entre 50 y 500 cm utilizando tubos de 0.5 mm de diámetro interno y en las condiciones de mayor velocidad de flujo total dentro del rango de velocidades evaluados en 1.6.4. El reactor de menor longitud que permitió la mezcla completa de los reactivos para una velocidad de flujo de 3.4 ml min^{-1} fue el de 250 cm. Para menores longitudes se produjo una operación de mezclado deficiente la cual se manifestó por la presencia de señales ruidosas e irreproducibles. Mayores longitudes generaron mayores tiempos de residencia de la mezcla reaccionante dentro del reactor lo cual generó pérdida de información en la etapa de adquisición de datos en el modo de flujo detenido y una disminución de la frecuencia analítica.

1.6.4 Velocidad de flujo

Para evaluar el efecto de la velocidad de flujo se realizaron experiencias a velocidades totales entre 0.8 y 3.4 ml min⁻¹.

La velocidad de flujo en cada una de las líneas del sistema fue la misma ya que en la bomba peristáltica se utilizaron tubos de Tygon[®] del mismo diámetro interno (1.30 mm).

Se seleccionó una velocidad de flujo total de 1.1 ml min⁻¹ (0.37 ml min⁻¹ en cada línea). Para esa velocidad se obtuvieron señales estables y el grado de avance de la reacción a la llegada al punto de detección fue bajo. Para velocidades de flujo mayores el ruido del sistema aumentó. Para velocidades menores se observó un mayor avance de la reacción dentro del reactor de mezcla, con la consecuente pérdida de información en la etapa de adquisición de datos.

1.6.5 Volumen del lazo de muestra

El efecto del aumento del volumen de muestra inyectada en un sistema FIA es un aumento en la altura de los picos obtenidos, hasta llegar a una situación límite en la cual se alcanza una meseta correspondiente al estado estacionario con un valor de dispersión $D = 1$ [176].

La influencia del volumen del lazo (*loop*) de muestra se estudió utilizando el sistema FIA descrito en 1.3 con el reactor de mezcla seleccionado en 1.6.3, anulando las líneas de ingreso de los reactivos sulfuro de sodio y resazurina. De esta manera se evaluó la dispersión de la muestra en la corriente de *carrier* sin considerar la dilución debida a los reactivos que se produce en el sistema

multilínea. La condición de mezclado eficiente de reactivos y muestra en el punto de detección fue alcanzada utilizando un reactor anudado de 250 cm de longitud.

Se utilizaron diferentes volúmenes de *loop* en un rango de 100 a 500 μl . Se trabajó con una solución de tartracina de una concentración de 30 mg l^{-1} . La longitud de onda fue la correspondiente al máximo de absorción de la tartracina (428 nm). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.6.

La señal constante de un valor de absorbancia de 1.31 (curva a) se obtuvo cuando la solución de tartracina circuló *por el canal de carrier*. Las curvas b, c, d y e se obtuvieron cuando *en la corriente de carrier* la solución de tartracina fue sustituida por agua y se inyectaron volúmenes de la solución de tartracina de 100, 250, 350 y 500 μl , respectivamente operando a una velocidad de flujo de 1.1 ml min^{-1} . Para un volumen de inyección de 100 μl se obtuvo un coeficiente de dispersión mínimo de 1.43. Para un volumen de muestra de 250 μl se observó un período de 10 s durante los cuales la variación del coeficiente de dispersión es mínima ($1.05 \leq D \leq 1.08$). Para volúmenes de muestra mayores se observó una disminución en la dispersión ($1.01 \leq D \leq 1.03$ y $1.004 \leq D \leq 1.005$ para 350 y 500 μl , respectivamente) para períodos de tiempo de 15 s. Sin embargo, en estos últimos, el tiempo necesario para el llenado del *loop* es demasiado largo, lo cual no es recomendado a los fines de mejorar la frecuencia analítica.

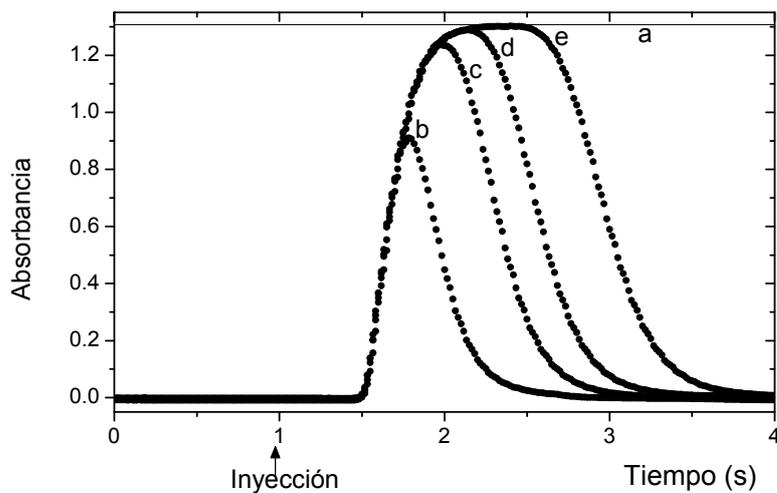


Figura 1.6: Efecto del tamaño del loop de muestra sobre la señal del sistema FIA: Colorante en la corriente de carrier (a), 100 µl (b), 250 µl (c), 350 µl (d), 500 µl (e)

Se seleccionó el loop de 250 µl para el cual se obtuvo una señal máxima lo suficientemente ancha que permitió minimizar los errores debido a imprecisiones en el tiempo de detención del flujo. Esto no ocurrió cuando se utilizó un loop de menor volumen donde el pico que se obtuvo fue muy estrecho y la variación del coeficiente de dispersión fue muy grande.

Para el loop seleccionado, el tiempo de detención correspondiente a la señal máxima se estableció en base a la Figura 1.6,

En esta figura se observa que dicho tiempo fue cercano a 60 s (t_1) a partir de la inyección de la muestra (t_0) para una velocidad de flujo total de 1.1 ml min^{-1} .

Estas observaciones se verificaron utilizando el sistema completo mostrado en la Figura 1.3 y con el procedimiento descrito en la sección 1.5. Cada uno de los reactivos, en los valores de concentración optimizados como se describirá más adelante (sección 1.7), circuló por su canal correspondiente. Se

inyectó en el sistema una solución de Ni(II) de una concentración de 2 mg l^{-1} . Se evaluó el cambio de absorbancia (ΔA) para 120 s de reacción, para distintos tiempos de detención del flujo. En este sistema de múltiple línea el exceso de reactivos estuvo garantizado en la zona de mínima dispersión con el uso del reactor de mezcla seleccionado. Los resultados se observan en la Figura 1.7.

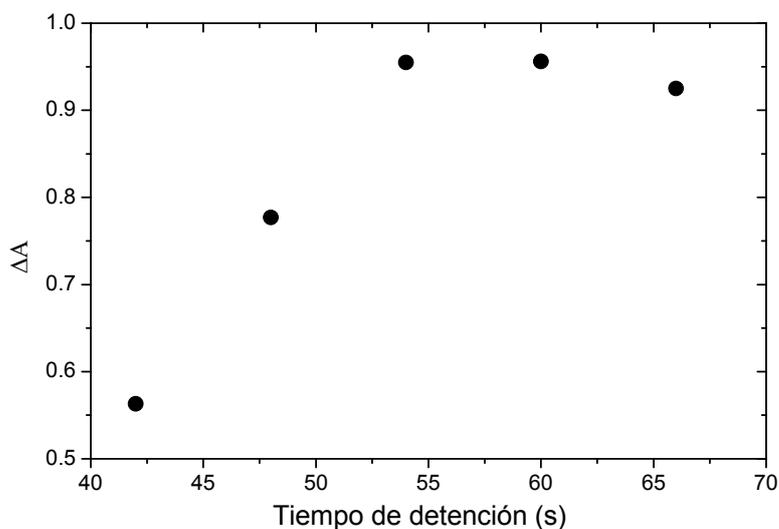


Figura 1.7: Efecto del tiempo de detención del flujo sobre la señal analítica. $[\text{Ni(II)}]: 2 \text{ mg l}^{-1}$; $[\text{Resazurina}]: 45 \text{ mg l}^{-1}$, $[\text{Na}_2\text{S}]: 1\% \text{ (m/v)}$, $[\text{NaOH}]: 0.2 \text{ mol l}^{-1}$

La máxima sensibilidad se obtuvo para los tiempos de detención del flujo cercanos a 60 s, coincidentes con los valores mínimos de dispersión de muestra.

En la Tabla 1.1 se resumen las condiciones óptimas de operación del sistema de inyección en flujo con modo detenido adoptadas para todo el trabajo:

Tabla 1.1: Condiciones optimizadas para el funcionamiento del sistema FIA con modo detenido

Variable	Condición Óptima
Geometría del reactor de mezcla	Reactor anudado
Longitud del reactor de mezcla (cm)	250
Diámetro interno de tubos (mm)	0.5
Velocidad total de flujo (ml min^{-1})	1.1
Volumen de muestra (μl)	250
Tiempo de detención del flujo (s)	60

1.7 Optimización de las variables fisicoquímicas

La influencia de las variables fisicoquímicas se evaluó mediante el uso de un diseño experimental. La aplicación de un diseño experimental permitió interpretar el efecto de los factores estudiados y obtener una relación entre la respuesta y cada uno de los factores y sus interacciones de una manera eficiente, es decir con el mínimo número de experimentos. De esta manera se determinaron los valores de combinación de los factores que condujeron a una respuesta óptima para cada uno de los cationes estudiados. Se describen a continuación las distintas etapas involucradas para llevar a cabo la optimización.

1.7.1 Selección de los factores experimentales y de la variable respuesta

La selección de los factores a ser investigados fue el primer paso del diseño experimental.

Se seleccionaron como factores químicos las concentraciones de los reactivos involucrados en la reacción de reducción de resazurina (concentración de hidróxido de sodio, concentración de sulfuro de sodio y

concentración de resazurina) y como factor físico la temperatura del baño calefactor del reactor de mezcla. La respuesta medida en este análisis fue la diferencia entre la absorbancia de la resazurina a tiempo 0 y a los 180 s de la inyección de la muestra (ΔA) La señal del blanco también se evaluó para cada una de las condiciones analizadas.

1.7.2 Selección de los límites del dominio experimental

Para llevar a cabo un diseño de experimentos debe realizarse en primer lugar una correcta definición de los límites y niveles a utilizar para cada factor. Los efectos de la concentración de los reactivos sobre la señal analítica se evaluaron a través de un procedimiento univariado. Los valores óptimos buscados para los factores químicos y físicos seleccionados fueron aquellos que maximizaron la variable respuesta (ΔA). Los límites experimentales se determinaron separadamente para los cationes Cu(II) y Ni(II). Los estudios se realizaron sobre soluciones de 6 mg l^{-1} de Cu(II) y 30 mg l^{-1} de Ni(II). El factor temperatura del baño calefactor no se incluyó en esta etapa del análisis y se fijó en un valor de $44 \text{ }^{\circ}\text{C}$; su efecto fue estudiado directamente en el diseño experimental (Sección 1.7.3). Las condiciones de operación del sistema FIA con flujo detenido fueron las ya discutidas en las secciones anteriores.

1.7.2.1 Efecto de la concentración de hidróxido de sodio

La concentración de resazurina se fijó en 45 mg l^{-1} para los dos cationes, Cu(II) y Ni(II). La concentración de sulfuro de sodio se fijó en 0.4% (m/v) para Cu(II) y 1% m/v para Ni(II) lo que permitió obtener resultados cuantificables en

todo el rango de concentraciones de NaOH, que se seleccionó entre 0 y 3 mol l⁻¹.

En la Figura 1.8 se observa la variación de la señal en función de la concentración de NaOH para ambos cationes.

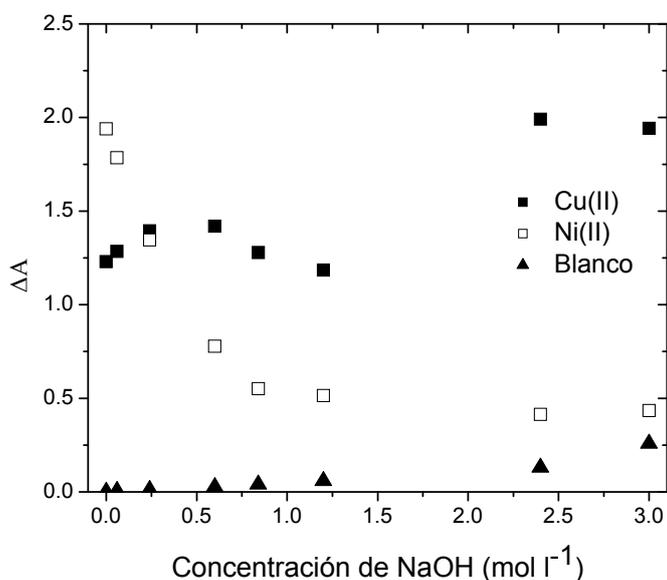


Figura 1.8: Efecto de la concentración de NaOH sobre la señal analítica. [Cu(II)] 6 mg l⁻¹; [Ni(II)] 30 mg l⁻¹

Para el caso del Cu(II) la señal aumentó para altas concentraciones de NaOH. Sin embargo, para concentraciones de NaOH mayores a 2 mol l⁻¹, el sistema se comportó en forma inestable y mostró poca reproducibilidad. Para el Ni(II) en cambio la señal decreció con el aumento de NaOH, obteniéndose el máximo valor de señal en ausencia de hidróxido de sodio en la solución de sulfuro de sodio. Este comportamiento fue atribuido al bajo producto de solubilidad del Ni(OH)₂ y la consecuente remoción de iones Ni(II) del medio de

reacción. La señal del blanco, por su parte, aumentó ligeramente con el incremento de NaOH. En base a estos resultados el dominio experimental seleccionado para la variable concentración de NaOH fue de 0 a 1.2 mol l⁻¹ para Cu(II) y de 0 a 0.8 mol l⁻¹ para Ni(II).

1.7.2.2 Efecto de la concentración de sulfuro de sodio

La temperatura del baño calefactor se fijó en 44 °C y la concentración de resazurina en 45 mg l⁻¹ para los dos cationes, Cu(II) y Ni(II). Las concentraciones de sulfuro de sodio variaron en un rango de 0.2 a 2.5 % (m/v) y fueron preparadas con hidróxido de sodio 0.1 mol l⁻¹. Los efectos de la variable pueden observarse en la Figura 1.9.

En los valores más bajos de concentraciones investigados se observó, para ambos cationes, un aumento de la señal con el incremento de la concentración de Na₂S. Para mayores concentraciones de Na₂S, 1.5 % (m/v) para Cu(II) y 1.0 % (m/v) para Ni(II) la señal mostró una variación muy baja.

Para el blanco, la señal fue prácticamente nula hasta el 1% (m/v) de Na₂S, luego de lo cual se incrementó progresivamente con el aumento de este reactivo.

El límite superior de esta variable en el diseño para Cu(II) se fijó en 2.6 % (m/v). Para concentraciones de Na₂S mayores a 1% se observó para el caso del Ni(II) la presencia de un precipitado en el sistema por lo cual el límite superior para esa variable en el diseño para Ni(II) fue fijado en 1%.

Es interesante resaltar las diferencias en el comportamiento entre ambos cationes frente los efectos de los factores concentración de NaOH y de Na₂S.

En el caso de Ni(II) se observó la formación de precipitados a altas concentraciones de los dos reactivos, lo que no ocurrió en el caso del Cu(II).

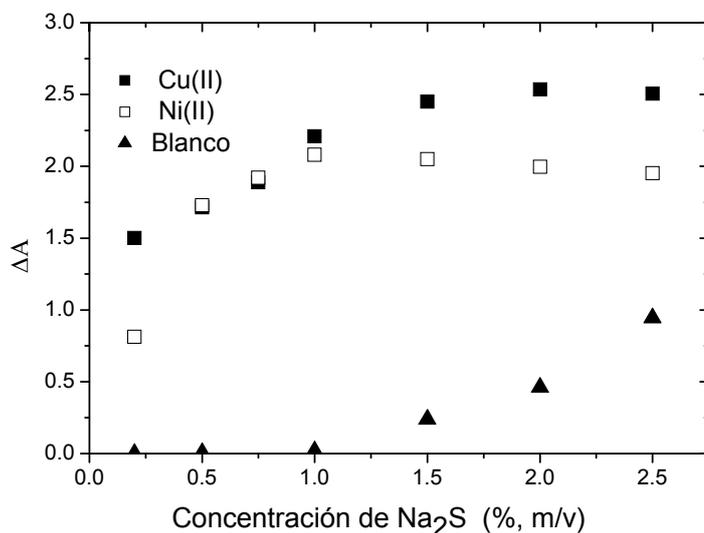


Figura 1.9: Efecto de la concentración de Na_2S sobre la señal analítica. $[\text{Cu(II)}]$ 6 mg l^{-1} ; $[\text{Ni(II)}]$ 30 mg l^{-1}

Esto es difícil de explicar considerando solamente los aspectos termodinámicos relacionados con los valores de productos de solubilidad de Ni(OH)_2 , Cu(OH)_2 , NiS y CuS . De acuerdo a esto, en el caso del Cu(II) sería esperable la formación de precipitados a menores valores de concentraciones de NaOH y de Na_2S que para el Ni(II). Una posible explicación de nuestros resultados experimentales es la formación de otras especies de Cu(II) más solubles en medio alcalino, compitiendo esto cinéticamente con la formación de las especies menos solubles [197].

1.7.2.3 Efecto de la concentración de resazurina

La temperatura del baño calefactor se fijó en 44 °C y se utilizó una solución de Na₂S 1% (m/v) sin agregado de NaOH. La concentración de resazurina se evaluó en un rango de 25 a 45 mg l⁻¹. En la Figura 1.10 se observa un comportamiento análogo para ambos cationes.

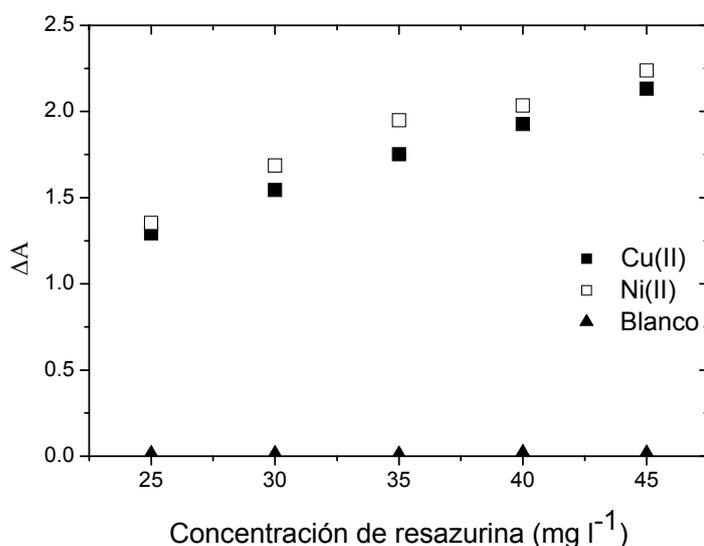


Figura 1.10: Efecto de la concentración de resazurina sobre la señal analítica. [Cu(II)] 6 mg l⁻¹; [Ni(II)] 30 mg l⁻¹

La señal analítica aumentó con un incremento en la concentración del reactivo resazurina, mientras que la señal para el blanco fue independiente del nivel de este factor. Sin embargo, se tomó un valor superior en el diseño de 45 mg l⁻¹ debido a que a mayores concentraciones se produjo un incremento del ruido de la señal en el detector debido a un decrecimiento en la capacidad de detección del tubo fotomultiplicador para valores de absorbancia elevados.

1.7.3 Diseño ortogonal factorial parcial

1.7.3.1 Construcción del diseño experimental

A partir de los dominios experimentales seleccionados para los factores químicos (Sección 1.7.2), e incorporando la temperatura del baño del reactor de mezcla como factor físico, se utilizó un diseño ortogonal (diseño factorial parcial de 5 niveles) [4] para evaluar las condiciones óptimas de cada uno de los factores considerados utilizando el análisis de superficie de respuesta como procedimiento de optimización. La respuesta seleccionada para evaluar los resultados del diseño fue la diferencia en el cambio de absorbancia entre la muestra y el blanco para un tiempo fijo de reacción de 120 s (ΔA).

Tabla 1.2: Niveles de los factores en el diseño factorial parcial para Cu(II) (6 mg l^{-1}) y para Ni(II) (15 mg l^{-1})

Factores	Analito	Niveles				
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Cu(II)	34	36.5	39	41.5	44
	Ni(II)	34	36.5	39	41.5	44
Resazurina (mg l^{-1})	Cu(II)	25	30	35	40	45
	Ni(II)	25	30	35	40	45
Na_2S (% m/v)	Cu(II)	0.2	0.8	1.4	2.0	2.6
	Ni(II)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
NaOH (mol l^{-1})	Cu(II)	0	0.3	0.6	0.9	1.2
	Ni(II)	0	0.2	0.4	0.6	0.8

El diseño constó de 25 puntos experimentales y los niveles seleccionados para cada uno de los factores en los diseños para Cu(II) y para Ni(II) se muestran en la Tabla 1.2.

1.7.3.2 Resultados del diseño experimental

Los resultados obtenidos a partir de los diseños experimentales realizados para los dos analitos se ilustran a través del análisis de los diagramas de Pareto (Figuras 1.11 y 1.12) y de las superficies de respuesta estimadas (Figuras 1.13 y 1.14).

El análisis del diseño para Cu(II) mostró que los factores concentración de resazurina y temperatura tienen un efecto significativo al 95% de nivel de confianza; también es significativo el efecto cuadrático de la concentración de sulfuro. El efecto del factor concentración de NaOH y todas las interacciones entre los factores no resultaron significativas (Figura 1.11). Este modelo explicó el 88% de la variabilidad total y no se encontró correlación entre las variables.

El aumento de la señal analítica con el aumento de la concentración de resazurina que se observa en la superficie de respuesta (Figura 1.13) es esperado para reacciones catalíticas de pseudo primer orden. Sin embargo, como fue puntualizado en 1.7.2.3, el límite superior para esta variable es impuesto por el aumento de la señal del ruido debido a un decrecimiento en la capacidad de detección del tubo fotomultiplicador para altos valores de absorbancia.

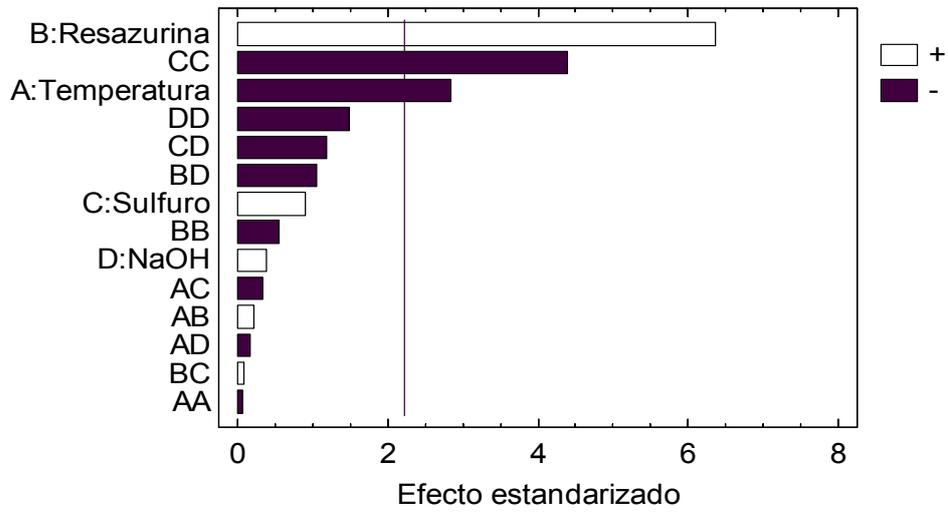


Figura 1.11: Diagrama de Pareto. [Cu(II)]: 6 mg l⁻¹

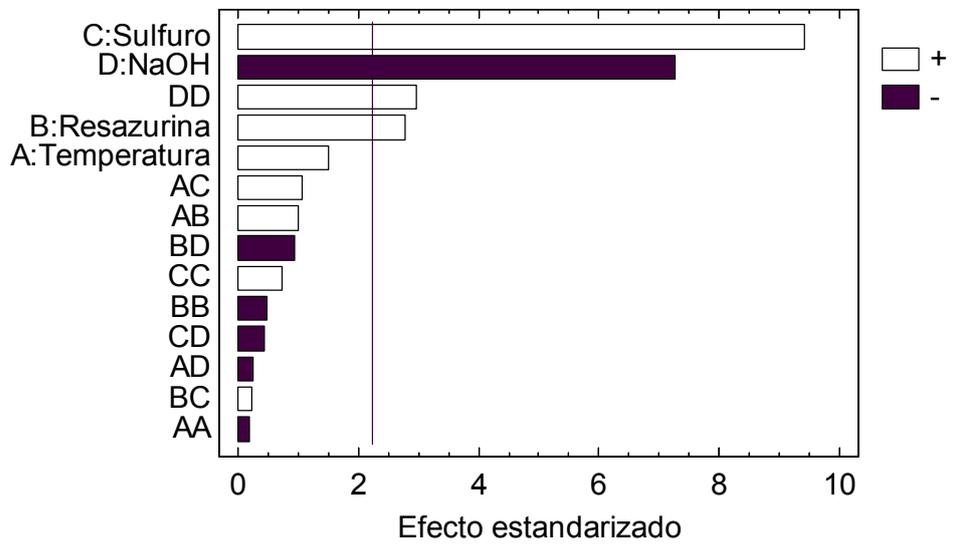


Figura 1.12: Diagrama de Pareto. [Ni(II)]: 15 mg l⁻¹

Consecuentemente, una concentración de resazurina de 45 mg l⁻¹ fue seleccionada como valor óptimo

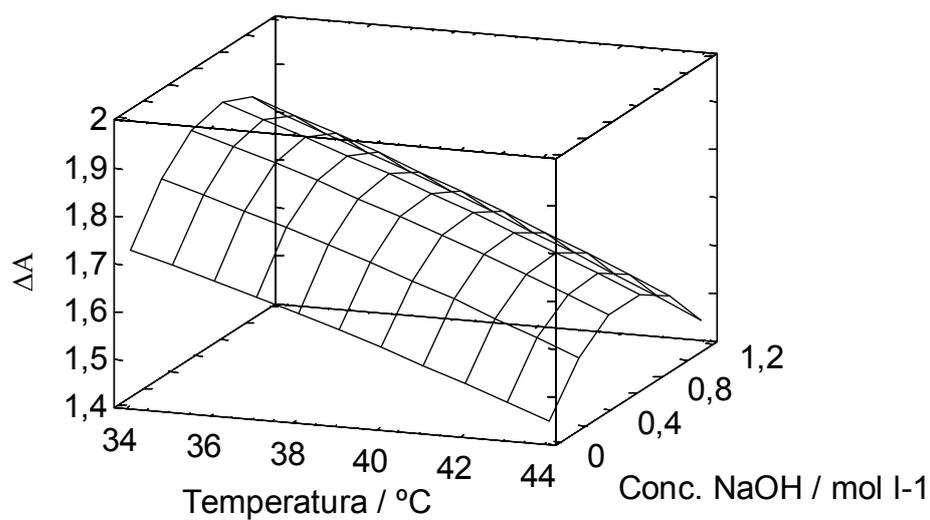
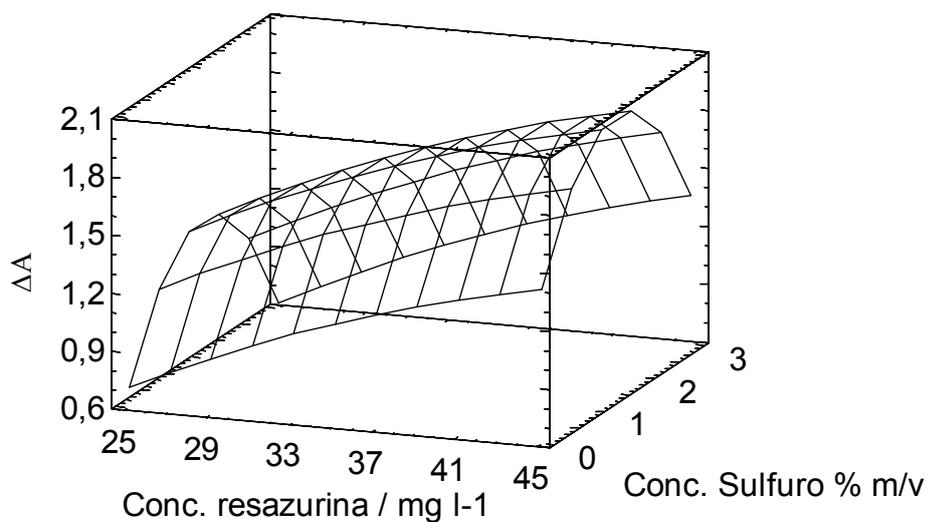


Figura 1.13: Superficies de respuesta estimadas para Cu(II)

En la superficie de respuesta de la Figura 1.13, se observó un efecto negativo del factor temperatura. Si bien se conoce que la temperatura tiene un efecto positivo en determinaciones basadas en cinética, estos resultados pueden ser explicados a partir de la coexistencia de reacciones laterales

desconocidas favoreciendo el consumo del analito. El valor óptimo para el factor temperatura fue el mínimo nivel investigado (34 °C).

El factor concentración de sulfuro tiene un efecto simple positivo no significativo y un efecto cuadrático negativo significativo sobre la señal analítica. El valor óptimo para este factor fue 1.4 % (m/v).

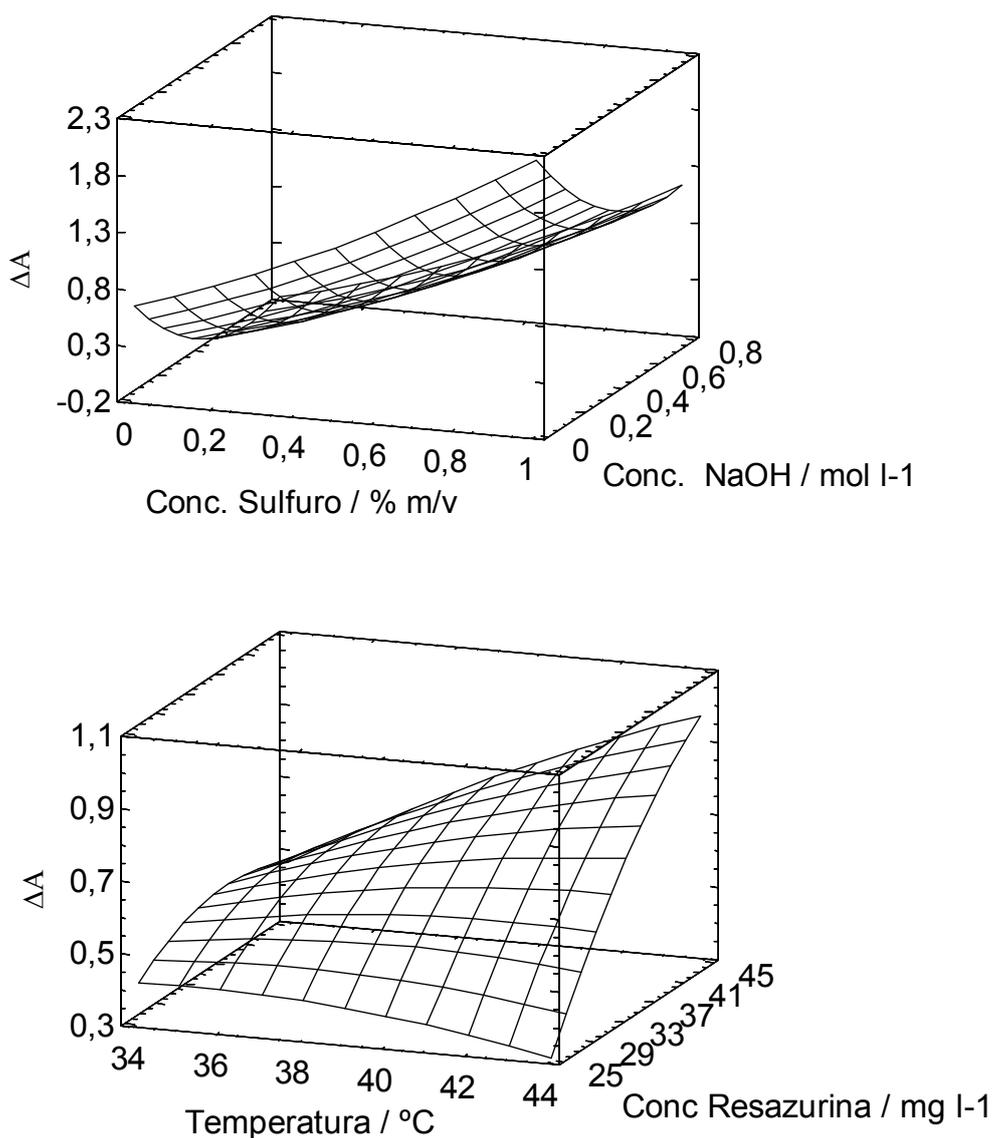


Figura 1.14: Superficies de respuesta estimadas para Ni(II)

Para el factor concentración de NaOH, tanto el efecto simple positivo como el efecto cuadrático negativo resultaron no significativos. Sin embargo el

análisis de la superficie de respuesta estimada (Figura 1.13) mostró un valor óptimo de 0.4 mol l^{-1} para este factor.

El análisis del diseño realizado para Ni(II) mostró que tres factores son significativos sobre la señal analítica: concentración de resazurina, concentración de sulfuro de sodio y concentración de NaOH (Figura 1.12) para el mismo nivel de confianza. El modelo explicó el 94 % de la variabilidad total y no se encontró correlación entre las variables. El efecto de la concentración de resazurina es similar al encontrado para Cu(II), permitiéndonos arribar a las mismas conclusiones. La señal analítica aumenta con un aumento de la concentración de sulfuro de sodio (Figura 1.14), pero un límite superior es impuesto por la indeseable precipitación en línea de NiS, por lo cual el óptimo para esta variable fue 1% (m/v). Para el factor concentración de NaOH se observa un efecto negativo simple significativo y un efecto positivo cuadrático no significativo sobre la señal. La mayor respuesta se encontró en ausencia de NaOH, pero se adoptó una concentración de 0.1 mol l^{-1} de NaOH que garantizó la estabilidad de la solución de Na_2S . El factor temperatura no fue significativo pero mostró un efecto positivo sobre la señal analítica por lo que un valor de 44°C fue el óptimo.

En la Tabla 1.3 se resumen las condiciones óptimas para los factores evaluados en el diseño para ambos cationes:

Tabla 1.3: Valores óptimos para las variables fisicoquímicas analizados por el diseño factorial parcial [Cu(II)] = 6 mg l⁻¹. [Ni(II)] = 15 mg l⁻¹

Variable	Analito	Valor óptimo
Temperatura (°C)	Cu(II)	34
	Ni(II)	44
Resazurina (mg l ⁻¹)	Cu(II)	45
	Ni(II)	45
Na ₂ S (% m/v)	Cu(II)	1.4
	Ni(II)	1.0
NaOH (mol l ⁻¹)	Cu(II)	0.4
	Ni(II)	0

1.8 Conclusiones

Se determinó la adecuabilidad de la reacción de reducción de resazurina por sulfuro en medio alcalino catalizada por iones metálicos para la cuantificación de los cationes Cu(II) y Ni(II).

Se diseñó un sistema de inyección en flujo multilínea con modo detenido para el desarrollo experimental del trabajo y se optimizaron en forma univariada las variables de configuración.

A través de estudios univariados se investigó el efecto de las variables químicas y físicas inherentes a la reacción indicadora sobre la señal analítica. Los óptimos para estas variables fueron obtenidos para cada uno de los analitos a través del empleo de un diseño de experimentos.

Capítulo 2

Cuantificación cinética de una especie catalítica en la reducción de resazurina por sulfuro. Aplicación de métodos cinéticos clásicos y multivariados paramétricos

La reacción de reducción de resazurina con sulfuro en medio básico que se utilizó en este trabajo como reacción indicadora para la determinación de Cu(II) y Ni(II) ya fue descrita en el Capítulo 1. Como se señaló en ese capítulo esta reacción se usó para la determinación de Pb(II) [110, 185] y de Se(IV) como catalizadores [109]. Afkhami y col. [110] utilizaron como método de cuantificación el método integral de tiempo variable con una cinética supuesta de pseudo primer orden. Li y Pacey [185] utilizaron una metodología de inyección en flujo y determinaron áreas de pico que relacionaron con cinéticas de orden cero, primero y segundo orden para la cuantificación de Pb(II), concluyendo que cinéticas de orden cero y primer orden mostraron un buen ajuste a los datos experimentales. Safavi y col. [109] utilizaron el método integral de tiempo variable para la determinación cinética de Se(IV) como catalizador de la reacción.

La Figura 2.1 muestra los perfiles experimentales de absorbancia de resazurina vs. tiempo de reacción para cada uno de los dos catalizadores. Estos perfiles fueron adquiridos registrando la absorbancia de la resazurina en el tiempo con el sistema y procedimiento descritos en el Capítulo 1.

Cuando se trabajó en modo continuo, desde la inyección de la muestra hasta la detención del flujo, la señal registrada no mostró variación en el tiempo. En el modo de flujo detenido, es decir después de 60 s de la inyección de la muestra, el valor de la absorbancia se mantuvo casi constante por un tiempo corto y luego la señal comenzó a disminuir marcadamente. Este período de "inducción" inicial es típico de las reacciones autocatalíticas donde la reacción global es catalizada por un producto de la reacción: al comienzo la velocidad de descomposición del reactivo es baja, pero a medida que se forma el producto la descomposición del reactivo se acelera [198].

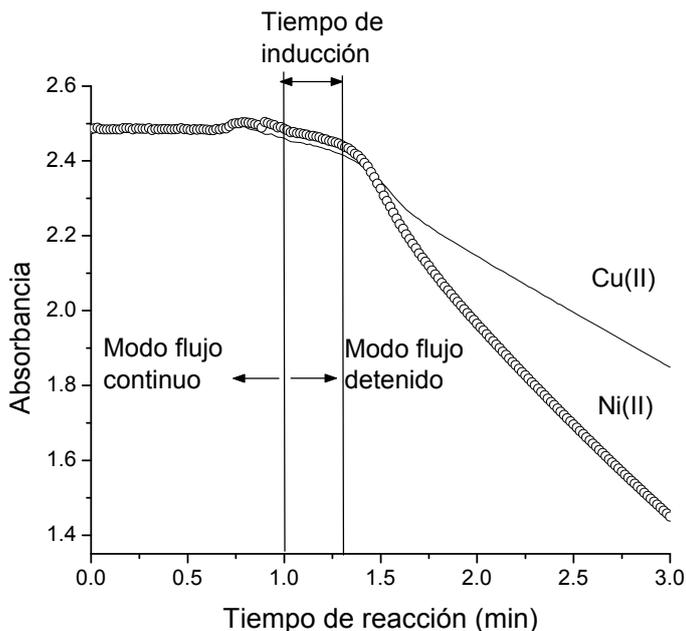


Figura 2.1: Perfiles de Absorbancia en función del tiempo para soluciones estándar de 1 mg l^{-1} de Cu(II) y 5.0 mg l^{-1} de Ni(II)

Otra posibilidad, diferente a una cinética autocatalítica, es que el catión metálico sea primero reducido al estado elemental y se combine con iones sulfuro produciendo metalo-sulfuros, los cuales posteriormente reducirían la resazurina [109, 199]. Un efecto similar podría atribuirse a la formación de compuestos de coordinación de azufre elemental con iones sulfuro (polisulfuros) [199]. Cualquiera sea el caso, asumir una cinética de pseudo primer orden o de orden cero es una aproximación válida sólo para altos valores de concentración de los analitos, es decir, los catalizadores.

En este capítulo se describen diferentes alternativas de cuantificación de los cationes Cu(II) y Ni(II) basadas en métodos gráficos aplicables a modelos cinéticos simples y en métodos de ajuste no lineal de curvas experimentales aplicables a modelos teóricos de mayor complejidad. Para la formulación de los modelos propuestos se tuvieron en cuenta las observaciones anteriormente enunciadas. El estudio se realizó sobre perfiles de absorbancia de resazurina a 605 nm en función del tiempo para diferentes concentraciones de cada uno de

los analitos. El rango de concentraciones analizado fue 0.5 - 3 mg l⁻¹ para Cu(II) y 2.5 - 9 mg l⁻¹ para Ni(II). Los perfiles fueron adquiridos por duplicado, empleando el sistema FIA antes descrito (Figura 1.3) y bajo las condiciones óptimas para cada catión que se describieron en el Capítulo 1.

2.1 Métodos cinéticos gráficos de cuantificación

2.1.1 Fundamentos

Para el desarrollo de modelos matemáticos válidos en las determinaciones catalíticas deben considerarse los dos aspectos siguientes:

- a) La reacción no catalizada procede simultáneamente con la reacción catalizada.
- b) La velocidad de la reacción catalizada es directamente proporcional a la concentración del catalizador.

La primera consideración es generalmente de pequeña significancia en las aplicaciones analíticas, debido a que la reacción catalizada es mucho más rápida que la no catalizada. El segundo aspecto, sin embargo, es muy importante ya que es la base de las determinaciones catalíticas [94].

Una cuestión práctica a tener en cuenta es que para obtener la relación directa entre concentración de catalizador y velocidad de reacción ciertas condiciones deben alcanzarse, tales como mantener en niveles constantes todas las variables que normalmente afectan la velocidad de las reacciones químicas, como temperatura, fuerza iónica, entre otras. Además, un requerimiento necesario para las aplicaciones de determinaciones clásicas basadas en efectos catalíticos primarios, es que las concentraciones de los reactivos (con excepción del catalizador y de la especie cuyo cambio en

concentración es monitoreado) deben tener un efecto de pseudo orden cero sobre la velocidad de reacción. La especie cuyo cambio en concentración está siendo monitoreado, es ajustada a una dependencia de primer orden. Cuando todos estos requerimientos son considerados y para el caso generalizado:



donde R y B son los reactivos (R es la especie monitoreada), P y Y son los productos, y C es el catalizador, se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{-d[R]}{dt} = k_u[R] + k_c[R][C]_0 = [R](k_u + k_c[C]_0) \quad (2.1)$$

donde k_u es el coeficiente de velocidad para la reacción no catalizada, k_c es el coeficiente de velocidad para la reacción catalizada y $[C]_0$ es la concentración inicial de catalizador en el sistema. Tanto k_u como k_c incluyen términos de concentración de especies para las cuales la dependencia de pseudo orden cero ha sido establecida.

Los métodos integrales se basan en la integración de las expresiones de velocidad de reacción sobre un intervalo de tiempo finito.

La integración de la ecuación (2.1) entre t_1 y t_2 y $[R]_1$ y $[R]_2$ conduce a:

$$\ln \frac{[R]_1}{[R]_2} = \Delta t(k_u + k_c[C]_0) \quad (2.2)$$

donde $\Delta t = t_2 - t_1$, es el intervalo de tiempo considerado en la integración y $[R_1]$ y $[R_2]$ son las concentraciones de la especie monitoreada para los límites del intervalo.

Si Δt es constante, para el método integral de tiempo fijo, el logaritmo del cociente de concentraciones es directamente proporcional a la concentración inicial de catalizador $[C]_0$, base para la construcción de una curva de calibración. Para rangos de concentración limitados, es válido reemplazar el logaritmo del cociente de concentraciones por la diferencia de concentraciones (ΔR) y, de esta manera, la representación de ΔR versus $[C]_0$ provee también curvas de calibración lineales como se muestra en la ecuación (2.3).

$$\Delta R = \Delta t(k_u + k_c[C]_0) \quad (2.3)$$

Si se denomina K^* al logaritmo de la relación de concentraciones y se lo considera constante se tiene:

$$\frac{1}{\Delta t} = \frac{k_c}{K^*}[C]_0 + \frac{k_u}{K^*} \quad (2.4)$$

lo cual indica que el gráfico de $1/\Delta t$ versus $[C]_0$ es lineal. La ecuación (2.4) es la base para la aproximación del método integral de tiempo variable.

Para este caso es posible, en el rango de concentraciones usado para los analitos, utilizar las aproximaciones de los métodos de integración de tiempo fijo y de tiempo variable. Como ya se expuso en el capítulo anterior, la especie

resazurina presenta un máximo de absorción a 605 nm. Las otras especies presentes en el sistema no absorben a esa longitud de onda por lo tanto los cambios de absorbancia a 605 nm se relacionan linealmente con los cambios de concentración de la resazurina. De esta manera la señal analítica, [R], seleccionada para las mediciones fue la absorbancia a 605 nm.

2.1.2 Resultados

2.1.2.1 Método Integral de tiempo fijo

Se utilizó la aproximación para rangos limitados de concentración de la ecuación (2.3). Reemplazando concentraciones de resazurina por absorbancias, la ecuación (2.3) queda:

$$\Delta A = a_{\lambda} \Delta t k_u + a_{\lambda} \Delta t k_c [C]_0 \quad (2.5)$$

donde ΔA es la diferencia entre los valores de absorbancia de la resazurina para un tiempo de reacción fijo.

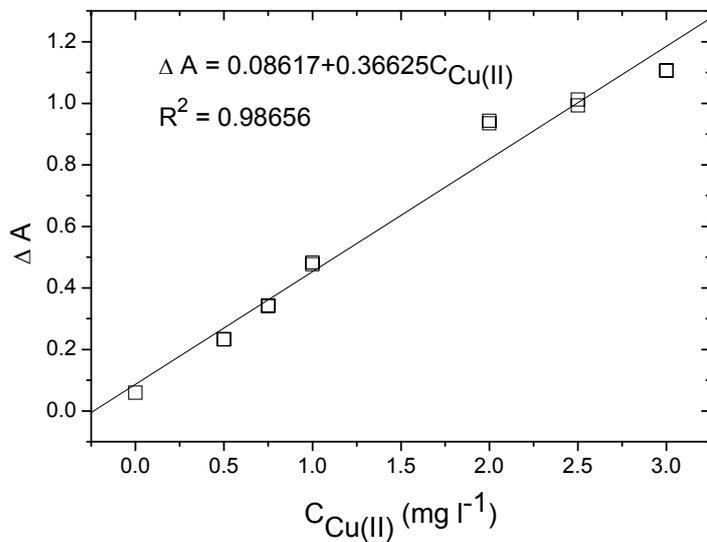


Figura 2.2: Gráfico de calibración para Cu(II) utilizando el método integral de tiempo fijo (simplificado para concentraciones bajas)

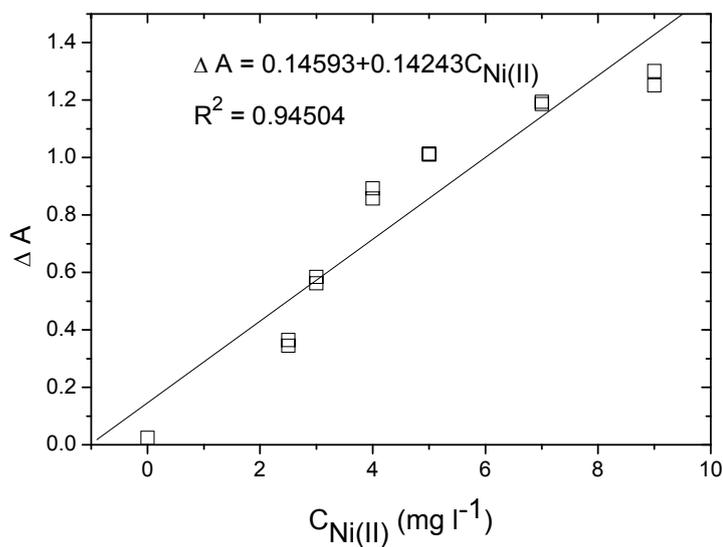


Figura 2.3: Gráfico de calibración para Ni(II) utilizando el método integral de tiempo fijo (simplificado para concentraciones bajas)

Los gráficos de calibración de cambios de absorbancia para 120 s de reacción versus concentración de catalizador para cada analito se muestran en las Figuras 2.2 y 2.3.

Como se observa en ambos casos, los ajustes no fueron satisfactorios. En el caso del Ni(II), para el cual el coeficiente de correlación fue menor, se graficó el logaritmo natural de la relación de absorbancias utilizando la ecuación 2.2 y reemplazando concentraciones por absorbancias (Figura 2.4), pero no se obtuvo una mejora significativa en los resultados.

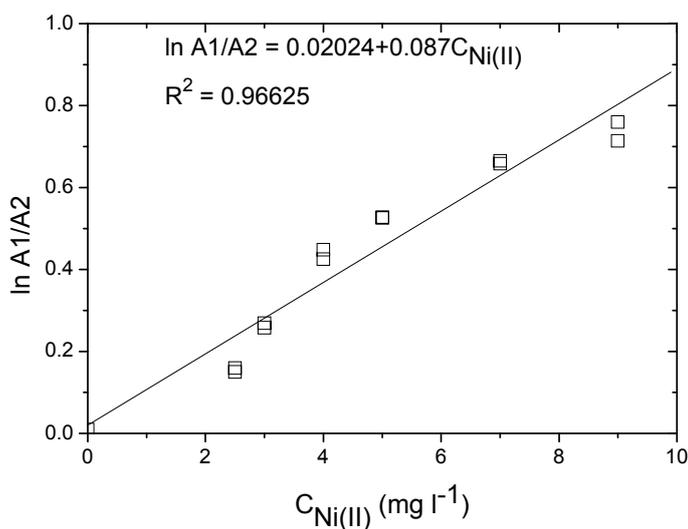


Figura 2.4: Gráfico de calibración para Ni(II) utilizando aproximaciones logarítmicas con el método integral de tiempo fijo

2.1.2.2 Método Integral de tiempo variable

Para la aplicación de este método se midió el tiempo necesario para obtener un cambio de absorbancias determinado. La inversa del tiempo transcurrido para obtenerlo se relacionó directamente con la concentración del

catalizador a través de la ecuación (2.4) donde K^* es ahora el logaritmo de la relación de absorbancias considerado.

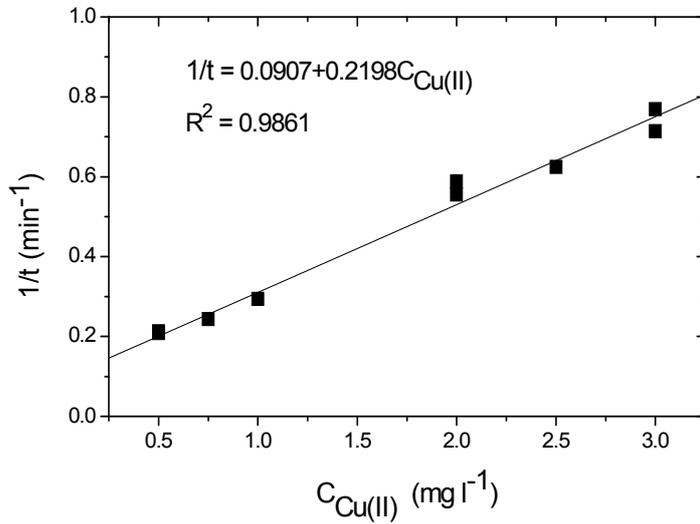


Figura 2.5: Gráfico de calibración para Cu(II) utilizando el método integral de tiempo variable

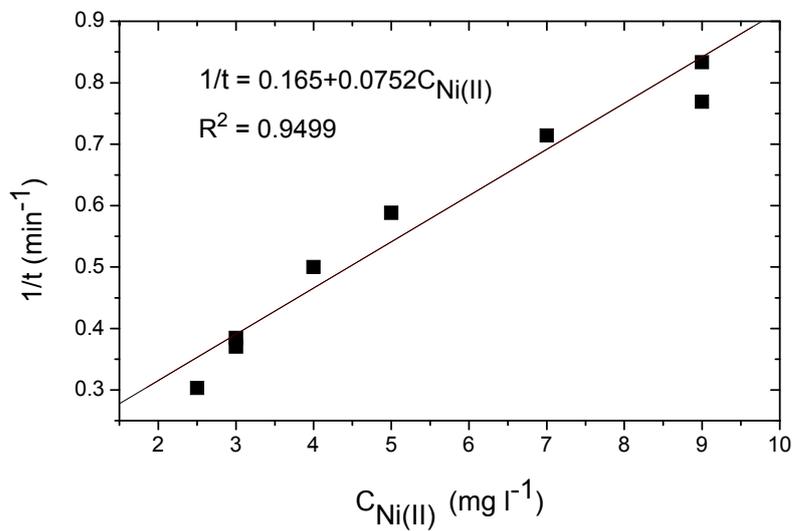


Figura 2.6: Gráfico de calibración para Ni(II) utilizando el método integral de tiempo variable

Se seleccionó como cambio de absorbancias un valor de 0.8 y la variable dependiente fue la inversa del tiempo transcurrido en min para alcanzar dicho

cambio. Los resultados obtenidos con esta metodología de calibración se observan en las Figuras 2.5 y 2.6.

Al igual que con el método de tiempo fijo, los resultados indican que no existe una buena correlación cuando se utilizan este tipo de aproximaciones basadas en una cinética de pseudo primer orden.

2.2 Métodos de cuantificación basados en el ajuste no lineal de las mediciones multivariadas

2.2.1 Fundamentos

Estos métodos se basan en la postulación de un mecanismo de reacción, la obtención de los parámetros cinéticos asociados a dicho modelo a través de un método de ajuste no lineal de los datos experimentales y la obtención de relaciones entre estos parámetros y las concentraciones de los analitos de interés.

Para lograr este objetivo se propusieron y evaluaron diferentes mecanismos para la reducción catalítica de la resazurina con sulfuro.

Los parámetros cinéticos aparentes correspondientes a los diferentes modelos fueron estimados empleando una rutina elaborada en MatLab[®] v 7.0, la cual utiliza las subrutinas NLINFIT y ODE 45, basadas en los métodos de Gauss-Newton y Runge-Kutta, respectivamente. La calidad de la estimación se representa por un vector de residuos denominado **R**, obtenido para cada una de las muestras utilizadas en el modelado:

$$R = A_E - A_T \tag{2.6}$$

donde \mathbf{A}_E es el vector de las absorbancias experimentales, con una longitud n_t igual al número de tiempos considerados para el modelado y \mathbf{A}_T es el vector de absorbancias predicho con los parámetros estimados por el modelo para los mismos tiempos que \mathbf{A}_E .

Durante el modelado la suma de los cuadrados de los elementos del vector \mathbf{R} es estadísticamente la “mejor” medida a minimizar:

$$\text{ssq} = \sum_{i=1}^{n_t} r_i^2 \quad (2.7)$$

El ajuste por cuadrados mínimos se obtiene minimizando la suma de los cuadrados, ssq , como una función de las mediciones, A_E , el modelo químico y los parámetros, es decir, las constantes de velocidad estimadas.

$$\text{ssq} = f(A_E, \text{modelo}, \text{parámetros}) \quad (2.8)$$

Durante el ajuste el modelo no se varía, sólo se determinan los mejores parámetros para un dado modelo. Para la determinación del modelo correcto la metodología más común es el ajuste de los distintos posibles modelos y la selección del mejor definida por un criterio estadístico. En este trabajo se aplicó el test F de bondad de ajuste. El error experimental puro fue calculado a partir de mediciones replicadas de perfiles de reacción. Las concentraciones de los cationes metálicos utilizadas para las mediciones replicadas fueron de 2.75 mg l⁻¹ y 3.50 mg l⁻¹ para Cu(II) y Ni(II), respectivamente, y se obtuvieron cinco mediciones replicadas para cada caso. El valor F para cada modelo fue obtenido como la relación entre el cuadrado medio de la falta de ajuste

(MSLOF) y el cuadrado medio del error experimental puro (MSPE), los cuales se calcularon como sigue:

$$\text{MSLOF} = \frac{\sum_{i=1}^{i=nt} (A_{Ti} - A_{Ei})^2}{(jn) - p} \quad (2.9)$$

$$\text{MSPE} = \frac{\sum_{i=1}^{i=m} (A_{Ri} - A_M)^2}{(jm) - j} \quad (2.10)$$

donde A_{Ti} y A_{Ei} son los elementos del vector de absorbancia teórico predicho (calculado) y del vector de absorbancia experimental, respectivamente, para la muestra i ésima de calibración; A_{Ri} son los elementos del vector de absorbancia experimental para la réplica i ésima; A_M son los elementos del vector de absorbancias medias para las m mediciones replicadas; j es el número de puntos de datos para cada muestra; n es el número de muestras de calibración y p es el número de constantes cinéticas estimadas.

En los modelos propuestos se asumió que la concentración de sulfuro se mantiene constante a lo largo del tiempo de reacción ya que esta fue 30 veces más alta que el valor estequiométrico con respecto a la concentración de resazurina. El factor de dilución (1/3) para la concentración de resazurina no fue considerado explícitamente. De esta manera, las constantes cinéticas aparentes estimadas incluyeron la concentración de sulfuro y el factor de dilución.

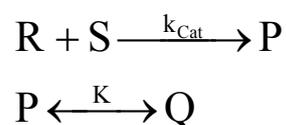
2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Modelo basado en cinética de pseudo primer orden

Se propuso un modelo de pseudo primer orden, en base a lo planteado anteriormente por otros autores para otras especies con efecto catalítico sobre la misma reacción [110].

Se asumió el mecanismo global reportado por Afkhami y col. [110], que fue presentado en la Figura 1.1.

Las reacciones planteadas correspondientes a este modelo son:



donde R, S, P y Q son las especies resazurina, sulfuro, resorufina y dihidroresorufina, respectivamente; k_{cat} es la constante cinética de la etapa catalítica (proporcional a la concentración del catalizador) y K es la constante de equilibrio de la segunda reacción:

$$K = \frac{k_d}{k_i} \quad (2.11)$$

donde k_d es la constante de velocidad para la reacción directa y k_i es la constante

de velocidad para la reacción inversa.

Asumiendo un exceso de la especie sulfuro de sodio las ecuaciones diferenciales para este mecanismo son:

$$\frac{dC_R}{dt} = -k_{\text{Cat}} C_R \quad (2.12)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = k_{\text{Cat}} C_R - k_d C_P + k_i C_Q \quad (2.13)$$

La concentración de resazurina se relaciona con la absorbancia a través de la ley de Beer:

$$C_R = \frac{A_R}{\epsilon_R} \quad (2.14)$$

donde ϵ_R es la absortividad molar de R a 605 nm ($\epsilon_R = 41.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

El balance de masa para las especies es:

$$C_Q = C_{R_0} - C_R - C_P \quad (2.15)$$

donde C_{R_0} es la concentración de resazurina al tiempo de reacción inicial.

Sustituyendo las ecuaciones (2.14) y (2.15) en (2.12) y (2.13) se tiene:

$$\frac{dA_R}{dt} = -k_{\text{Cat}} A_R \quad (2.16)$$

$$\frac{d(\varepsilon_R C_P)}{dt} = k_{\text{Cat}} A_R - k_d (\varepsilon_R C_P) + k_i (A_{R_0} - A_R - \varepsilon_R C_P) \quad (2.17)$$

donde A_{R_0} es la absorbancia de la resazurina para la concentración C_{R_0} .

La información experimental provista por la señal analítica medida, la absorbancia de la resazurina vs. el tiempo de reacción, no permitió predecir los valores k_d y k_i en este modelo, y sólo el valor de k_{cat} pudo ser calculado a partir del vector de absorbancia.

El grado de ajuste obtenido para este modelo, evaluado a través del test de bondad de ajuste, no fue satisfactorio (Tabla 2.1). Los valores F claramente sugieren que este modelo no es adecuado para describir los datos experimentales. Se observó que los valores calculados para k_{cat} aumentaron con el aumento en la concentración de cada uno de los analitos. En el caso del Cu(II) se obtuvo una relación lineal entre ambas variables ($R^2 = 0.986$). En el caso del Ni(II) se observó una desviación de la linealidad al graficar la misma relación ($R^2 = 0.946$), esto es atribuible a que la falta de ajuste en este caso fue más crítica. En las Figuras 2.7 y 2.8 se resumen los resultados obtenidos en ambos casos.

2.2.2.2 Modelo Cat-Sulfuro

Safavi y col. [109] estudiaron la determinación de Se(IV) utilizando la reacción de reducción de resazurina con sulfuro y sugirieron que la primera etapa puntualizada en el mecanismo anterior puede ser asumida como una combinación de dos reacciones consecutivas, donde el catalizador (Cat) es primero reducido y combinado con los iones sulfuro (Cat-S). Luego, el

intermediario Cat-S reacciona con la resazurina, dando resorufina como producto.

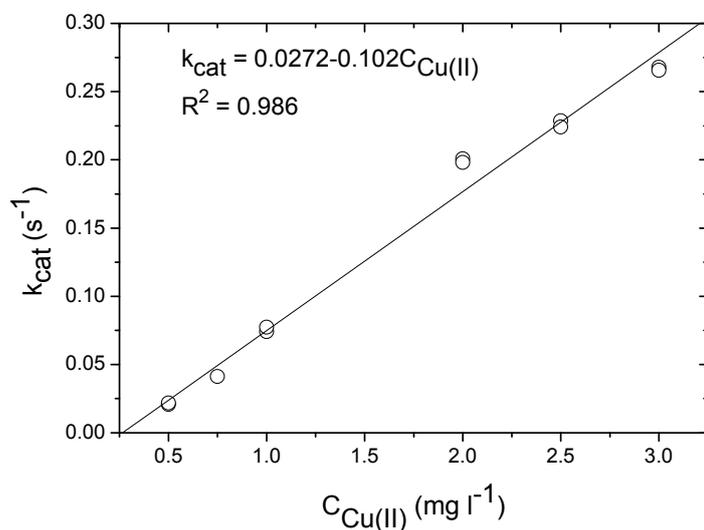


Figura 2.7: Constante global de velocidad para la etapa catalítica (k_{Cat}) versus $C_{Cu(II)}$

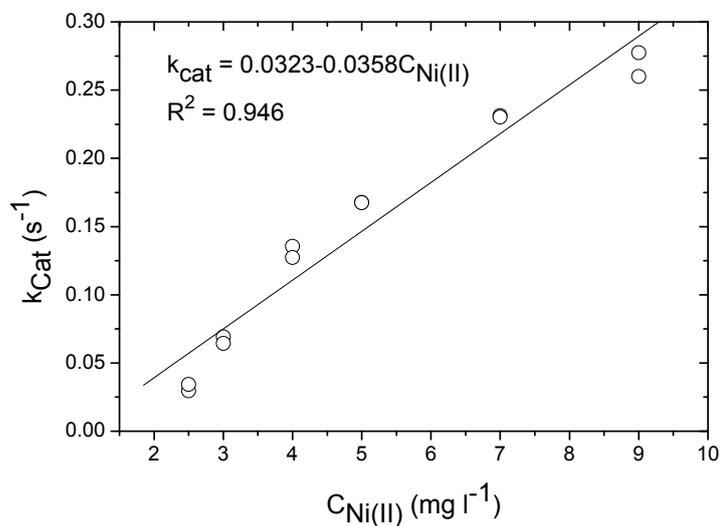
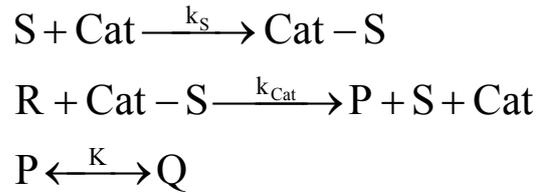


Figura 2.8: Constante global de velocidad para la etapa catalítica (k_{Cat}) versus $C_{Ni(II)}$

Las reacciones planteadas basadas en este modelo son:



donde Cat es el catalizador Cu(II) o Ni(II), Cat-S es el complejo entre Cat y sulfuro (S), y k_S es la constante de velocidad para la formación de Cat-S.

Asumiendo nuevamente un exceso de la especie sulfuro y considerando la concentración de catalizador constante, para este mecanismo se planteó:

$$\frac{dC_R}{dt} = -k_{\text{Cat}} C_R C_{\text{Cat-S}} \quad (2.18)$$

$$\frac{dC_{\text{Cat-S}}}{dt} = k_S - k_{\text{Cat}} C_R C_{\text{Cat-S}} \quad (2.19)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = k_{\text{Cat}} C_R C_{\text{Cat-S}} - k_d C_P + k_i C_Q \quad (2.20)$$

Reemplazando las ecuaciones (2.14) y (2.15) en (2.18), (2.19) y (2.20) se tiene:

$$\frac{dA_R}{dt} = -k_{\text{Cat}} A_R C_{\text{Cat-S}} \quad (2.21)$$

$$\frac{dC_{\text{Cat-S}}}{dt} = k_S - \frac{k_{\text{Cat}}}{\epsilon_R} A_R C_{\text{Cat-S}} \quad (2.22)$$

$$\frac{d(\varepsilon_R C_P)}{dt} = k_{Cat} A_R C_{Cat-S} - k_d (\varepsilon_R C_P) + k_i \cdot (A_{R_0} - A_R - \varepsilon_R \cdot C_P) \quad (2.23)$$

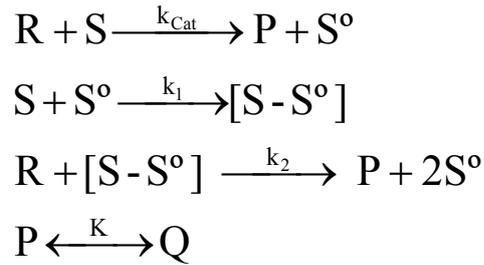
Nuevamente, el vector de absorbancia medido permitió estimar las constantes de velocidad k_S y k_{Cat} pero no k_d ni k_i .

Los valores calculados para k_S aumentaron con el incremento de la concentración del catalizador Cu(II), pero no se evidenció una relación lineal entre k_S y la concentración de Cu(II) o sus transformaciones logarítmicas. Adicionalmente, los valores predichos para k_{Cat} no permanecieron constantes con los cambios en la concentración de Cu(II), en contraposición con este modelo planteado. En el caso del Ni(II), tanto los valores de k_S como los de k_{Cat} mostraron fluctuaciones con el incremento de la concentración de catalizador, y no pudo obtenerse ningún tipo de relación analítica. En adición a esto, los valores calculados de F en el test de bondad de ajuste (Tabla 2.1) mostraron que las aproximaciones asumidas en este modelo no permiten explicar las observaciones experimentales para la reacción de reducción de resazurina con sulfuro en medio acuoso empleando Cu(II) o Ni(II) como catalizadores.

2.2.2.3 Modelo polisulfuros

Feigl y col. [199] investigaron el efecto catalítico del selenio elemental en la reacción de decoloración de azul de metileno con sulfuro de sodio en medio acuoso. Ellos propusieron un mecanismo similar al de Safavi y col. [109] basado en la formación de iones seleno-sulfuros, los cuales son los responsables del comportamiento catalítico. Los primeros autores también

sugirieron que el azufre elemental producido en la reducción del azul de metileno podría combinarse con los iones sulfuro presentes en el medio de reacción generando iones polisulfuro que acelerarían la reacción de reducción. En base a estas consideraciones se propuso un modelo, modelo polisulfuros, basado en las siguientes etapas:



k_{Cat} es nuevamente la constante de velocidad correspondiente a la etapa del mecanismo catalizada por los iones metálicos. Las ecuaciones diferenciales correspondientes, considerando un exceso de sulfuro, son:

$$\frac{dC_R}{dt} = -k_{\text{Cat}} C_R - k_2 C_R C_{[S-S]} \quad (2.24)$$

$$\frac{dC_{[S^{\circ}]}}{dt} = k_{\text{Cat}} C_R - k_1 C_{[S^{\circ}]} + 2 k_2 C_R C_{[S-S]} \quad (2.25)$$

$$\frac{dC_{[S-S]}}{dt} = k_1 C_{[S^{\circ}]} - k_2 C_{[S^{\circ}]} C_{[S-S]} \quad (2.26)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = k_{\text{Cat}} C_R + k_2 C_R C_{[S-S]} - k_d C_P + k_i C_Q \quad (2.27)$$

Reemplazando las ecuaciones (2.14) y (2.15) en (2.24), (2.25), (2.26) y (2.27) se tiene:

$$\frac{dA_R}{dt} = -k_{Cat} A_R - k_2 A_R C_{[S-S]} \quad (2.28)$$

$$\frac{d(\varepsilon_R C_{[S^0]})}{dt} = k_{Cat} A_R - k_1 (\varepsilon_R C_{[S^0]}) + 2 k_2 A_R C_{[S-S]} \quad (2.29)$$

$$\frac{dC_{[S-S]}}{dt} = k_1 C_{[S^0]} - k_2 C_{[S^0]} C_{[S-S]} \quad (2.30)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(\varepsilon_R C_P)}{dt} = & k_{Cat} A_R + k_2 A_R C_{[S-S]} - k_d (\varepsilon_R C_P) + \\ & + k_i (A_{R_0} - A_R - \varepsilon_R \cdot C_P) \end{aligned} \quad (2.31)$$

La información experimental provista por la señal analítica medida permitió predecir los valores k_{Cat} , k_1 y k_2 en este modelo. El grado de ajuste evaluado a través del test de bondad de ajuste permitió establecer que este modelo no es adecuado para describir los datos experimentales. Sin embargo, se pudieron establecer relaciones entre la constante k_{cat} y la concentración de cada catalizador. En las Figuras 2.9 y 2.10 se visualizan los resultados obtenidos:

Con respecto a las demás constantes calculadas para el modelo polisulfuros, k_1 no mostró una variación significativa con la concentración y tipo de catalizador; k_2 , en cambio disminuyó con el incremento de la concentración de catalizador para ambos casos, lo cual no es lo esperado para este modelo.

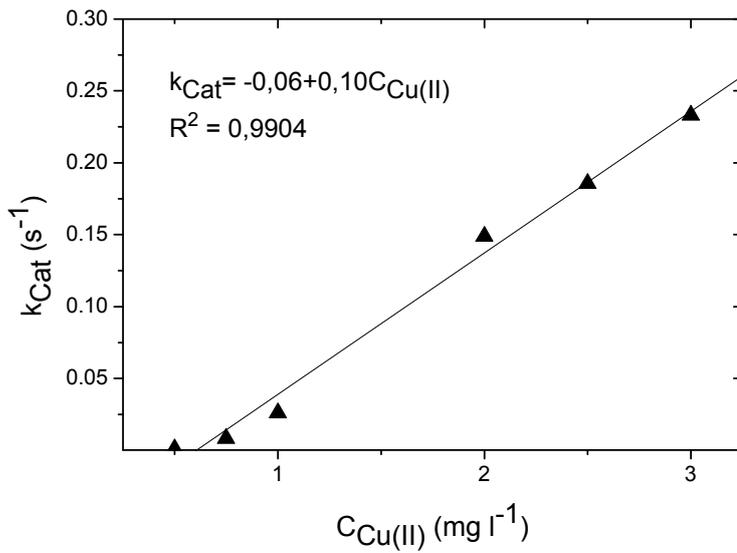


Figura 2.9: Constante global de velocidad para la etapa catalítica (k_{Cat}) versus $C_{Cu(II)}$

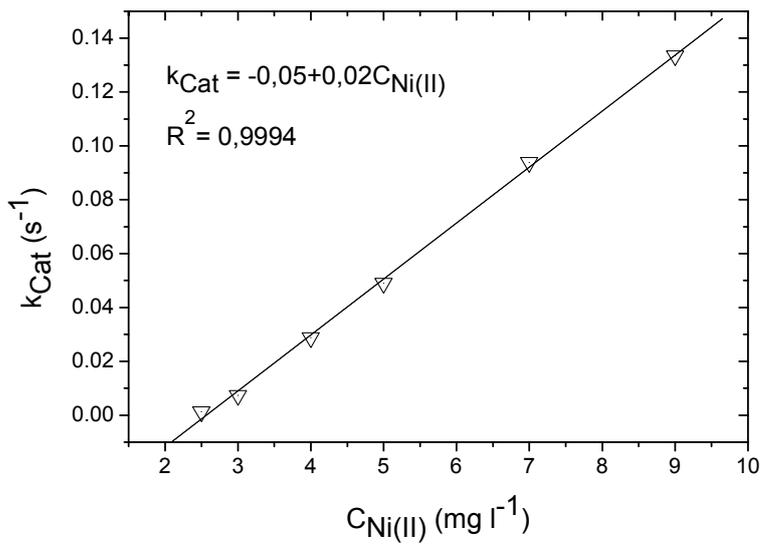


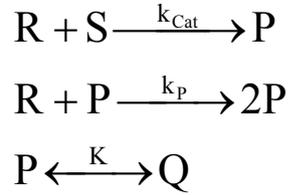
Figura 2.10: Constante global de velocidad para la etapa catalítica (k_{Cat}) versus $C_{Ni(II)}$

2.2.2.4 Modelo autocatalítico

Debido a la clara presencia de un período de inducción inicial en los perfiles experimentales de absorbancia en función del tiempo de reacción (Fig 2.1), se evaluó un modelo autocatalítico o catalizado por producto [198]. Así,

se incluyó como segunda etapa de este modelo una reacción entre la resazurina y la resorufina.

Las reacciones correspondientes a este modelo son:



La segunda etapa de este mecanismo es la que se postula como reacción autocatalítica, donde el producto formado P actúa como catalizador de la reacción y donde k_p es la constante de velocidad para esa etapa autocatalítica.

Considerando un exceso del reactivo sulfuro, se plantearon las ecuaciones cinéticas correspondientes a este modelo:

$$\frac{dC_R}{dt} = -k_{\text{Cat}} C_R - k_p C_R C_P \quad (2.32)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = k_{\text{Cat}} C_R + k_p C_R C_P - k_d C_P + k_i C_Q \quad (2.33)$$

Reemplazando (2.14) y (2.15) en (2.32) y (2.33):

$$\frac{dA_R}{dt} = -k_{\text{Cat}} A_R - \frac{k_p}{\varepsilon_R} A_R (\varepsilon_R C_P) \quad (2.34)$$

$$\begin{aligned} \frac{d(\varepsilon_R C_P)}{dt} &= k_{\text{Cat}} A_R + \frac{k_p}{\varepsilon_R} A_R (\varepsilon_R C_P) - \\ &\quad - k_d (\varepsilon_R C_P) + k_i (A_{R^0} - A_R - \varepsilon_R C_P) \end{aligned} \quad (2.35)$$

En este caso todos los valores de las constantes de velocidad pudieron ser estimados a partir de la señal analítica.

En el caso de k_{Cat} se obtuvieron relaciones lineales entre las transformaciones logarítmicas de los valores calculados de dichas constantes y las concentraciones de cada catalizador. Estas relaciones se visualizan en las Figura 2.11a y 2.11b.

El orden de reacción aparente respecto al catalizador metálico para cada especie fue estimado a partir de la pendiente de cada curva, y resultó aproximadamente 4 en ambos casos. Aunque fue difícil encontrar una explicación directa para los altos valores obtenidos de los órdenes de reacción, resulta lógico asumir que los cationes Cu(II) o Ni(II) se encuentran parcialmente complejados con iones HO^- y con iones sulfuro en medio alcalino.

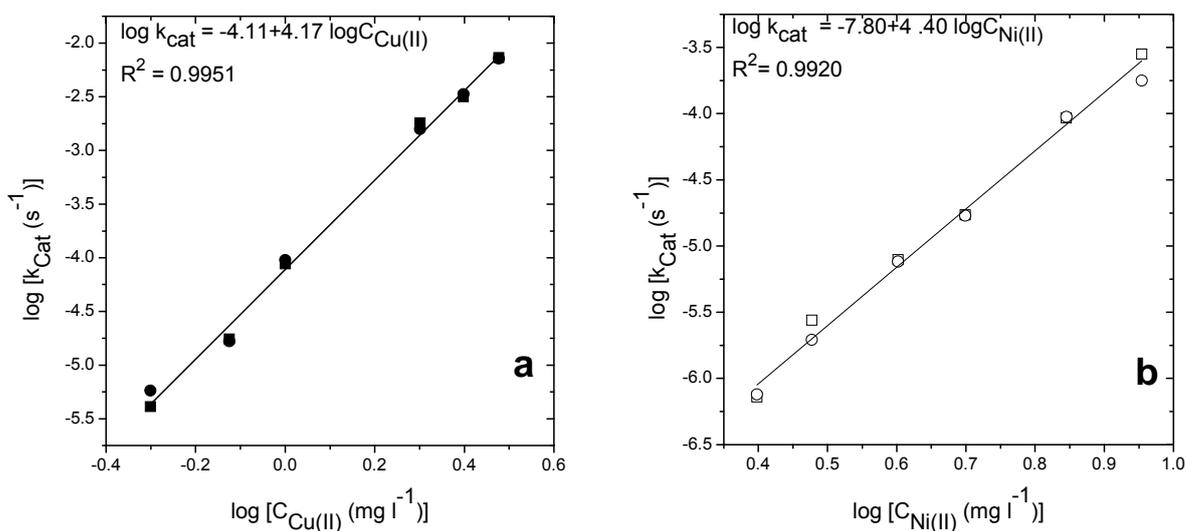


Figura 2.11: Constantes globales de velocidad para la etapa catalítica (k_{cat}) como una función de la concentración del catalizador (a) Cu(II) y (b) Ni(II)

Es posible que la formación de una pequeña cantidad de especies polinucleares, similares a $\text{Ni}_4(\text{HO})_4^{4+}$ y/o sus combinaciones con iones sulfuro,

podría explicar estos órdenes de reacción para ambos cationes [197]. Las especies mononucleares Cu(II) o Ni(II) estarían en equilibrio con las especies polinucleares. A partir de los valores de las intercepciones con el eje de ordenadas de ambos gráficos se calcularon las constantes de pseudo primer orden para la etapa catalítica, los cuales resultaron $1.2 \times 10^{-6} \text{ mM}^{-5} \text{ s}^{-1}$ y $3.7 \times 10^{-10} \text{ mM}^{-5} \text{ s}^{-1}$ para Cu(II) y Ni(II), respectivamente.

En la Figura 2.12 se presentan los valores calculados para k_p y k_d . Estos no muestran una variación significativa con el tipo o la concentración de catalizador, lo cual es consistente con la no participación de estos iones en esas etapas de la reacción. Los valores promedio obtenidos para estas constantes fueron $k_p = 2.5 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $k_d = 1.5 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$.

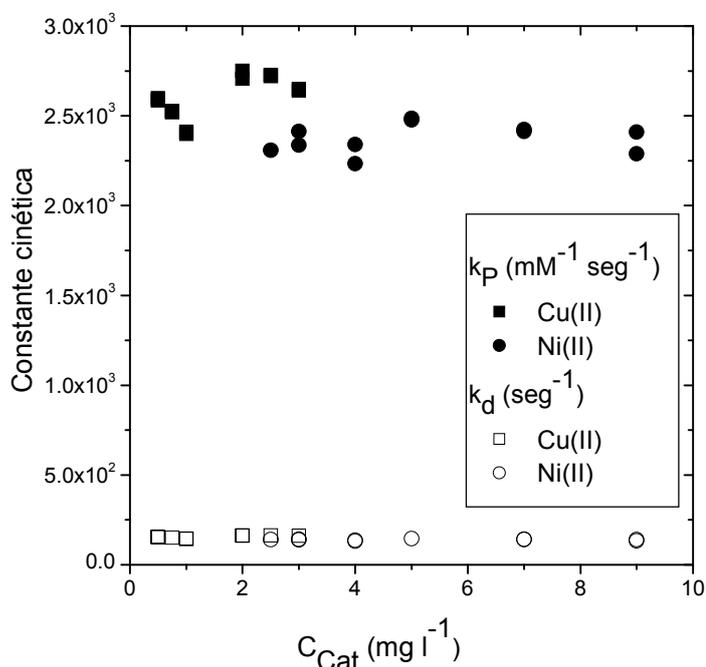


Figura 2.12: Valores calculados para las constantes de velocidad k_p y k_d versus la concentración de catalizador

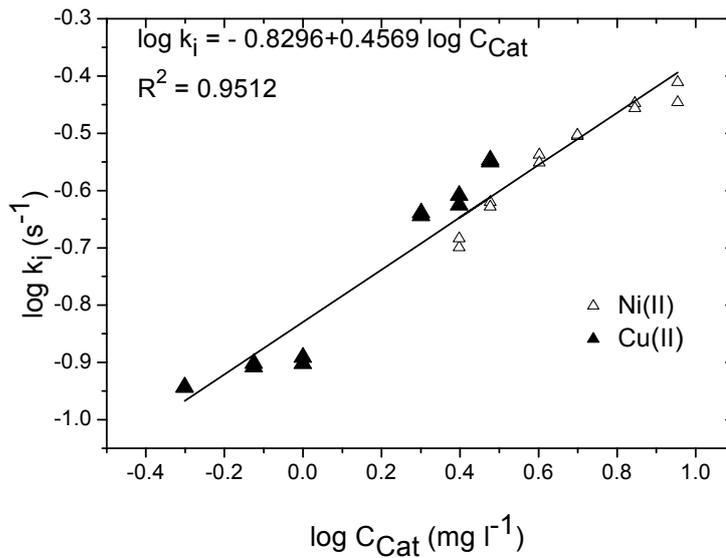


Figura 2.13: Valores calculados para la constante de velocidad k_i versus la concentración de catalizador

Finalmente, los valores predichos para k_i aumentaron con el incremento de la concentración de catalizador. En la Figura 2.13 se muestra que las transformaciones logarítmicas de los valores de k_i versus la concentración de los catalizadores están linealmente correlacionadas, independientemente de la naturaleza del catalizador.

El orden de reacción aparente para los catalizadores derivado de k_i fue aproximadamente igual a 0.5, y la constante intrínseca calculada resultó igual a $0.148 \text{ mM}^{-0.5} \text{ s}^{-1}$. Si bien el cambio observado de esta constante cinética k_i con la concentración del catalizador no es importante, este comportamiento no pudo ser explicado fisicoquímicamente hasta el momento. Así, esta relación no parece ser adecuada para la cuantificación de estos analitos.

Las buenas correlaciones obtenidas entre los datos calculados y experimentales para ambos catalizadores fueron corroboradas a partir del test

de bondad de ajuste. Los valores F se presentan en la Tabla 2.1 junto con aquellos calculados para los demás modelos investigados.

Tabla 2.1: Valores F obtenidos para los diferentes mecanismos cinéticos^a

Catalizador	Modelo			
	Pseudo primer orden 1	Cat-Sulfuro	Polisulfuros	Reacción autocatalizada
Cu(II)	22.03	28.43	3.66	0.59
Ni(II)	177.39	34.85	25.05	0.88

^a Valor teórico para el 10% de nivel de confianza = 1.13.

A manera de ejemplo, la gráfica de paridad que se presenta en la Figura 2.14 muestra el buen ajuste entre el modelo autocatalítico generalizado propuesto y los resultados experimentales para Cu(II). En este caso, los valores calculados de absorbancia ($A_{calculada}$) fueron obtenidos usando: (i) reacción de cuarto orden (con respecto a la concentración de catalizador) para la etapa de reducción de la resazurina, y reacción de orden 0.5 (con respecto a la concentración de catalizador) en la etapa de reducción de la dihidroresorufina a resorufina, (ii) los valores promedios obtenidos para k_P y k_d para ambos cationes Cu(II) y Ni(II) y (iii) los valores de k_{Cat} y k_i calculados a partir de los valores intrínsecos obtenidos por la regresión lineal (Figuras 2.11a y 2.13, respectivamente). Para el caso del Ni(II) se obtuvo un gráfico de paridad similar.

De esta manera, los resultados obtenidos sugieren que de los cuatro modelos propuestos, el autocatalítico es el más adecuado para describir el comportamiento cinético para ambos cationes.

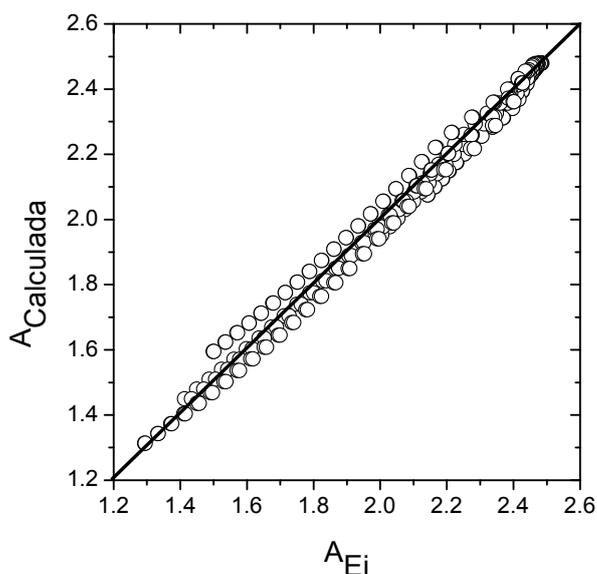


Figura 2.14: Gráfico de paridad de la absorbancia de la resazurina a 605 nm después del uso de iones Cu(II) como catalizador. Para mayor claridad sólo se grafican 24 puntos de los 12 vectores de absorbancia.

Además, se sugiere que si la concentración de los catalizadores o la temperatura de la reacción aumentan (aumentando así la velocidad de la reacción), el modelo autocatalítico puede ser reducido al modelo más simple de pseudo primer orden 1 [198]. Así, podemos explicar parcialmente los resultados obtenidos por Li y Pacey para la determinación de Pb(II) asumiendo un mecanismo de pseudo primer orden para la reacción de reducción de la resazurina [185].

Por lo tanto se puede concluir que el modelo autocatalítico es confiable para la determinación de Cu(II) y Ni(II) a partir de los gráficos de calibración mostrados en la Figura 2.12.

2.2.3 Predicciones sobre muestras reales utilizando el modelo cinético autocatalítico

El modelo cinético autocatalítico fue aplicado al el análisis de soluciones de baños de electroplatinado conteniendo iones Cu(II) o Ni(II) suministradas por una industria local. Para el análisis fue necesario realizar una dilución de las muestras originales. A fin de determinar los porcentajes de recuperación del método también fueron analizadas las muestras diluidas adicionadas a 1.5 mg l^{-1} para Cu(II) y a 2.5 mg l^{-1} para Ni(II). Los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos utilizando espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS) como metodología de referencia.

En la Tabla 2.2 se muestran los resultados obtenidos con ambas metodologías analíticas. Los valores t indican que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones determinadas por el método cinético y la técnica de referencia, a un nivel de significancia del 5%.

2.3 Conclusiones

En el estudio de la reacción catalizada de resazurina por sulfuro en medio alcalino se propusieron diferentes mecanismos cinéticos que se evaluaron con aproximaciones clásicas y métodos de modelado basados en el ajuste no lineal de curvas experimentales. Los modelos basados en una cinética de pseudo primer orden, formación de un intermediario del catalizador con el sulfuro y el modelo polisulfuro permitieron, en algunos casos, obtener relaciones entre constantes de velocidad de reacción y concentraciones de catalizadores; sin embargo en el rango de concentraciones de analitos investigado y para la temperatura de trabajo utilizada en nuestras experiencias los resultados basados en esta aproximación sugerida por otros autores no fueron confiables

debido a la falta de ajuste de los resultados experimentales. El modelo autocatalítico, en cambio, describió adecuadamente nuestros resultados experimentales tanto para Cu(II) como para Ni(II) como catalizadores de la primera etapa de reducción. Se determinaron los parámetros cinéticos del modelo, tales como los órdenes aparentes de reacción con respecto al catalizador para las etapas planteadas y los valores de las constantes de velocidad de reacción involucrados.

Tabla 2.2: Determinación de Cu(II) y Ni(II) en muestras de baños de electroplatinado.

Analito	Muestra ^a	FAAS		Modelo cinético autocatalítico		t
		(n = 4)		(n = 4)		
		Media	RSD (%)	Media	RSD (%)	
		(mg l ⁻¹)		(mg l ⁻¹)		
Cu(II)	Muestra diluída ^b	0.700	1.60	0.685	1.09	2.25
	Muestra diluída adicionada ^c	2.19	0.27	2.23	2.15	1.64
	Recuperación (%)	99.3		103		
Ni(II)	Muestra diluída ^b	2.71	3.02	2.67	4.20	0.621
	Muestra diluída adicionada ^c	5.21	1.04	5.32	3.39	1.12
	Recuperación (%)	100		106		

^a Provista por la Compañía Cromados S.A., Santa Fe, Argentina.

^b Factor de dilución igual a 1:40000 y 1:20000 para Cu(II) y Ni(II), respectivamente.

^c Muestra adicionada a 1.5 mg l⁻¹ y 2.5 mg l⁻¹ para Cu(II) y Ni(II), respectivamente.

Se obtuvieron relaciones entre las transformaciones logarítmicas de los valores de constantes de velocidad de reacción y de las concentraciones de catalizador que permitieron la cuantificación de Cu(II) y Ni(II) en muestras reales acuosas de una manera confiable.

Capítulo 3

**Aplicación de métodos quimiométricos
multivariados a la determinación catalítica
de Cu(II) y Ni(II)**

3.1 Introducción

Las capacidades analíticas de los sistemas cinéticos, tanto para la determinación de especies individuales o para la resolución de mezclas, pueden mejorarse considerablemente con la aplicación de técnicas quimiométricas multivariadas. La quimiometría es una disciplina ampliamente utilizada en el área de la química, nacida al final de los años 70, que se utiliza en diversos campos, especialmente en química analítica [4-6,125,126]. Quimiometría es, en un sentido general, el arte de procesar datos con diferentes técnicas numéricas a fin de extraer información útil. El rápido desarrollo de la quimiometría en química analítica se debe fundamentalmente a la utilización masiva de ordenadores acoplados a la moderna instrumentación. Se reemplazó el uso de medidas puntuales por la adquisición de medidas multivariantes para las cuales los métodos tradicionales de procesamiento de información resultan ineficientes.

Como se ha dicho en la introducción de este trabajo, la calibración multivariada está estrechamente relacionada con la forma de clasificación de los instrumentos analíticos, que son los que proporcionan los datos que el químico analítico debe estudiar para cuantificar el o los componentes de interés en una muestra. Es el tipo de datos obtenidos el que condiciona el tipo de calibración que debe realizarse [5,6].

En el caso particular de este trabajo, en el cual la información que se maneja es información de primer orden (vectores de absorbancia a distintos tiempos), se utilizaron métodos de calibración de primer orden, que serán descritos más adelante.

3.2 Proceso de calibración multivariada

El objetivo de los métodos de calibración multivariada es establecer modelos de calibración que sean capaces de predecir el valor de la propiedad estudiada para nuevas muestras, a partir del registro de la señal analítica. Para que esto sea posible y las predicciones confiables, deben obtenerse modelos robustos siguiendo una serie de etapas:

- Obtención de los datos de calibración: Este es el paso más dificultoso ya que la calibración debe realizarse utilizando datos de la mejor calidad posible. Esto implica una serie de consideraciones inherentes a las muestras de calibración, el registro de la información analítica y el pretratamiento de los datos:
- Definición del conjunto de calibración o de entrenamiento: debe ser representativo de las muestras sobre las cuales la calibración será utilizada. En términos prácticos esto significa que el conjunto de entrenamiento debe contener todos los componentes esperados, en el rango de concentraciones esperadas y en las condiciones de interés. Se deben considerar tanto las fuentes de variación química como las físicas, las cuales pueden afectar la señal analítica registrada.
- Registro de la información analítica: la calidad de la información depende del buen funcionamiento del equipo de medición y del conocimiento y control de todos los factores que afectan las mediciones.
- Pretratamiento de los datos: el objetivo de las diferentes técnicas de pretratamiento es minimizar las contribuciones no deseadas presentes en la señal analítica que desfavorecen la utilidad de la información extraída. El preprocesamiento de la señal reduce el ruido introducido por efectos tales como señal de fondo, mediciones en unidades diferentes, diferencias en las

variancias de las variables, etc. Las operaciones clásicas de pretratamiento incluyen centrado, pesado y uso de transformaciones. El centrado es la substracción del valor promedio a cada variable. El pesado o escalado es el ajuste de los datos a una variancia equivalente, lo cual es necesario en el caso de variables con unidades diferentes o de distintos tipos. Las transformaciones se utilizan cuando se requiere tener una distribución de variables más adecuada para el análisis que la distribución original. Las transformaciones más comunes son la transformación logarítmica, el suavizado, la normalización, etc.

- Selección y construcción del modelo de calibración: es generalmente la etapa más simple del proceso debido a la disponibilidad de computadoras poderosas y *software* de alta capacidad. Sin embargo, debe analizarse la adecuabilidad de los diferentes modelos de calibración multivariada a cada situación en particular, lo que significa un conocimiento de los principios en los que se basan dichos modelos y la evaluación crítica de los resultados obtenidos.
- Validación del modelo: implica la aplicación del modelo de calibración desarrollado a un conjunto de muestras que no fueron utilizadas para su construcción, denominadas muestras de validación. Las diferencias entre concentraciones predichas y concentraciones reales o esperadas son indicativos de los errores esperados en el uso del modelo para la predicción de muestras desconocidas. De esta forma se verifica si el modelo construido constituye una correcta descripción del sistema en estudio.

3.3 Métodos de calibración multivariada de primer orden

3.3.1 Regresión por cuadrados mínimos clásica

La regresión por cuadrados mínimos clásica (CLS) es el tratamiento multivariable más sencillo. Calcula la relación lineal entre la señal analítica y la concentración aplicando el método de cuadrados mínimos [4-9,126].

Para realizar la calibración utilizando CLS se requiere un conjunto de muestras de calibración (matriz de concentraciones: **C**) y las señales analíticas para cada una de estas muestra de concentraciones conocidas evaluadas con un número determinado de sensores (matriz de respuestas: **A**). La ecuación que relaciona respuestas con concentraciones se representa de una manera matricial:

$$A = K C^T \quad (3.1)$$

donde el superíndice T indica la transpuesta para la matriz de concentraciones y donde cada columna en la matriz **K** representa los coeficientes para cada sensor de cada uno de los componentes puros, los cuales deben ser calculados durante el proceso de calibración. No existe en general una solución exacta para **K**, se debe encontrar la mejor solución por cuadrados mínimos, o sea se debe encontrar una matriz K tal que se minimice la suma de cuadrados de los errores. Los errores son las diferencias entre las respuestas medidas y las calculadas multiplicando K y C y también se representan en forma matricial:

$$E = K C^T - A \quad (3.2)$$

Los valores de la matriz **K** son estimados por mínimos cuadrados por medio de la ecuación (3.3):

$$\mathbf{K} = \mathbf{A}\mathbf{C} (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \quad (3.3)$$

Las predicciones sobre una muestra desconocida se realizan utilizando la ecuación (3.4):

$$\mathbf{c} = (\mathbf{K}^T \mathbf{K})^{-1} \mathbf{K}^T \mathbf{a} \quad (3.4)$$

siendo \mathbf{a} en este caso el vector de señales o respuestas registrada para la muestra y \mathbf{c} el vector de concentraciones estimadas de los componentes de la muestra.

Las condiciones para la aplicabilidad de CLS son que el número de muestras y el número de sensores empleados en la calibración deben ser al menos iguales al número de componentes a determinar. La limitación más importante en este método es que todos los compuestos interferentes deben ser conocidos e incluidos en la calibración. Sin embargo, como es considerado un método de espectro completo, produce un aumento en la precisión respecto a los métodos restringidos a un menor número de sensores, que son descritos más adelante.

3.3.2 Regresión por cuadrados mínimos inversa

Aunque la calibración clásica es un método ampliamente difundido, no siempre es el mejor método en química analítica, por diferentes razones. En primer lugar, todos los componentes presentes en las muestras necesitan ser conocidos e incluidos en el modelo CLS de calibración. Por otro lado, el objetivo en una calibración es usualmente predecir concentraciones a partir de señales analíticas y no la inversa. Otra cuestión se relaciona con las distribuciones de errores. Los errores en la respuesta generalmente son

debidos a las características del instrumento. A través de los años los instrumentos se perfeccionaron aceleradamente y paralelamente aumentó su confiabilidad. La variable independiente (concentración) se determina usualmente por pesada, diluciones, etc. y es, generalmente, la mayor fuente de error. La calidad del material utilizado (matraces, pipetas, etc.) no aumentó de la misma forma que la calidad de los instrumentos de medición. CLS utiliza un modelo en el que todos los errores se originan en la respuesta, cuando en realidad, con instrumentos de alta *performance*, una asunción más apropiada es que los errores se originan principalmente en las incertidumbres asociadas a las concentraciones de las muestras de calibración. La calibración por cuadrados mínimos inversa (ILS) asume que la concentración es una función de la respuesta o señal química. De esta manera, se obtiene una ecuación donde la concentración actúa como variable dependiente, mientras que las señales químicas registradas para diferentes sensores son las variables independientes. Este modelo inverso se representa matricialmente de la siguiente manera:

$$C = A^T I + E \quad (3.5)$$

donde A^T es la matriz transpuesta de señales, I es la matriz de los coeficientes desconocidos de la calibración inversa y E es la matriz de los errores de concentración no ajustados por el modelo.

La matriz de los coeficientes se calcula a través de la inversa generalizada de la matriz de respuestas A (ecuación 3.6), la cual en ILS puede obtenerse restringiendo el número de sensores a un número menor al de las muestras de calibración.

$$I = (A A^T)^{-1} A C \quad (3.6)$$

Al igual que en CLS se tiene una etapa de calibración en la que se calcula la matriz de coeficientes estimados (3.7) y la etapa de predicción de muestras desconocidas (3.8). Como cada columna de **I** se obtiene por el producto de una fila de $(A^T A)^{-1} A$ por una columna de **C** (es decir los datos de concentración de un componente dado en las mezclas de calibración), se puede plantear el modelo simplificado, en el que no es necesario conocer la concentración de los restantes componentes:

$$i_k = (A A^T)^{-1} A c_k \quad (3.7)$$

donde el subíndice se refiere a un único componente, k, siendo i_k los coeficientes de calibración inversa obtenidos para el componente k y c_k sus concentraciones en las muestras de calibración.

Para la etapa de predicción de una muestra desconocida se tiene:

$$c_k = a^T i_k \quad (3.8)$$

donde a^T es el vector transpuesto de las señales químicas de la muestra desconocida.

La representación inversa tiene la ventaja de que el análisis basado en este modelo es invariante con respecto al número de componentes químicos incluidos en el modelo. Pueden estar presentes componentes no incluidos en el modelo que son implícitamente modelados durante la calibración. Esto significa

que el análisis cuantitativo puede realizarse aún cuando la concentración de un único componente es conocida en las muestras de calibración.

Una desventaja de ILS es que el análisis tiene que restringirse a un número reducido de sensores, ya que este debe ser menor al número de muestras de calibración. Las ventajas de espectro completo que presenta CLS respecto a una mayor precisión no son posibles en ILS. Además seleccionar los sensores que deben incluirse en el análisis no es un problema trivial.

3.3.3 Métodos lineales de calibración multivariada de primer orden basados en la reducción de variables

El método CLS, como ya ha sido establecido presenta la desventaja de que todos los componentes presentes en las muestras de calibración deben ser conocidos e incluidos en el modelado. Con la aplicación de ILS este problema se soluciona pero este método presenta como desventaja la necesidad de la selección de sensores o variables a utilizar en la calibración. Las técnicas de reducción de variables o de análisis de factores conservan las ventajas de espectro completo de CLS y retienen la ventaja de ILS de realizar el análisis sobre un componente por vez evitando el problema de selección de variables. Los métodos de reducción de variables no son en general aplicados directamente a los datos originales, sino que estos son centrados y/o autoescalados a fin de transformarlos a la forma más adecuada para la obtención del modelo de calibración. Los métodos lineales de reducción de variables de uso más difundido son regresión por componentes principales (PCR) y regresión por cuadrados mínimos parciales (PLS), los cuales son brevemente descritos a continuación.

3.3.3.1 Regresión por componentes principales

La regresión por componentes principales (PCR) [3-9,125,126,151] se basa en un análisis de descomposición espectral por componentes principales (PCA) seguida por una etapa de regresión.

En la técnica de PCA un número elevado de variables son transformadas a un número inferior de variables ortogonales (combinación lineal de las originales y no correlacionadas) y que contienen la información principal del sistema, eliminando la información redundante o reduciendo la contribución del ruido.

PCA descompone la matriz de respuestas **A** en dos matrices de dimensiones menores, una de *escores* (**T**) y una de *loadings* o cargas (**P**) como sigue:

$$\mathbf{A} = \mathbf{P} \mathbf{T}^T \quad (3.9)$$

La matriz de *escores* se obtiene despejando:

$$\mathbf{T}^T = \mathbf{P}^T \mathbf{A} \quad (3.10)$$

Transponiendo [10]:

$$\mathbf{T} = \mathbf{A}^T \mathbf{P} \quad (3.11)$$

La matriz de *loadings* **P**, es la matriz de los autovectores de la matriz de variancia-covariancia de **A**. El primer autovector, correspondiente al mayor autovalor es, por definición, la dirección en el espacio definido por las columnas de la matriz **A** que describe la máxima cantidad de variación en las muestras. El segundo autovector es el vector perpendicular (ortogonal) al primero que

describe la máxima cantidad de la variabilidad residual (no descripta por el primero) y así sucesivamente. Los autovectores tienen asociados autovalores que dan idea de la importancia que cada autovector tiene respecto de las variaciones espectrales contenidas en **A**.

Los *scores* son las puntuaciones de cada muestra en el espacio definido por un nuevo sistema de coordenadas. La matriz de *scores* puede considerarse como la proyección de la matriz de datos **A** en el espacio definido por los autovectores seleccionados que forman la matriz **P**. Da una idea de la contribución relativa de cada factor espectral a la matriz de datos.

Geoméricamente, PCA es un cambio en la dirección y dimensionalidad de los ejes donde se buscan las direcciones ortogonales que explican la máxima variabilidad de la matriz **A** y las utiliza como nuevos ejes de coordenadas denominados componentes principales (PCs). Los diferentes componentes principales no contienen la misma cantidad de información sobre el sistema, ya que la más importante está contenida en los primeros, y los últimos sólo describen variaciones debidas al ruido. Esto permite una reducción importante en el número de variables. La correcta elección del número de factores a utilizar en la etapa de calibración permite modelar el sistema con la óptima cantidad de información sin producir sobreajuste. Existen métodos estadísticos para seleccionar el número óptimo de factores; el más popular de estos métodos es el método de validación interna o cruzada [4,6,9]. Consiste en calibrar utilizando todas las muestras de calibración excepto una, predecir la concentración de la muestra dejada de lado, y calcular el error cometido en función del número de factores utilizado. Este último varía desde cero hasta un cierto máximo que es alrededor de la mitad de las muestras utilizadas. Luego se repite el procedimiento hasta que todas las muestras hayan sido dejadas de

lado una vez. Para cada número de factores, se calcula la varianza de validación, que es igual a la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores de concentración reales y los calculados por PCR. Esa varianza de validación se conoce como PRESS. Luego se comparan mediante un método estadístico las varianzas obtenidas para distintos número de factores.

Existen diferentes algoritmos de cálculo para obtener las matrices **T** y **P** y sus fundamentos matemáticos se describen en numerosa bibliografía (5-7,9).

Los coeficientes de regresión (**b**) en este modelo inverso para el componente 1 se calculan a través de la matriz inversa generalizada de **A** como sigue:

$$b_1^T = c_1^T A^+ = c_1^T (T^T)^+ P^T \quad (3.12)$$

donde $(T^T)^+$ es la matriz inversa generalizada de la matriz de *escores* **T**, que se calcula como:

$$(T^T)^+ = T (T^T T)^{-1} \quad (3.13)$$

Trasponiendo (3.12):

$$b_1 = P T^+ c_1 \quad (3.14)$$

Una vez obtenidos los coeficientes de regresión **b**₁, se puede calcular la concentración del analito 1 a partir del espectro de una muestra desconocida (**a**) utilizando la ecuación (3.15):

$$c_{1,i} = \mathbf{b}_1^T \mathbf{a} \quad (3.15)$$

3.3.3.2 Regresión por cuadrados mínimos parciales

El método de regresión por cuadrados mínimos parciales, PLS [4,6-9, 126,151] pretende mejorar la técnica PCR antes descrita utilizando factores dependientes del componente de interés. Para ello introduce los valores de las concentraciones de calibración contenidos en la matriz **C** en el cálculo de los factores, creando por lo tanto factores dependientes de la concentración. Durante la etapa de calibración PLS utiliza simultáneamente la información contenida en la matriz de datos, **A**, y la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar, **C**, obteniéndose variables auxiliares, denominadas variables latentes, factores o componentes que tienen una interpretación similar a los componentes principales de PCA. Existen dos tipos de métodos PLS: uno denominada PLS-1, que realiza la calibración sobre un único analito por vez y otro llamado PLS-2, que permite calibrar y predecir las concentraciones de varios analitos simultáneamente. Esto último puede parecer una ventaja, ya que PLS-1 debe repetirse para cada analito de interés, pero en realidad representa una desventaja, ya que PLS-1 permite optimizar las condiciones para cada analito independientemente.

El procedimiento utilizado en PLS es muy similar al de PCA, excepto que los factores son elegidos para describir simultáneamente las variables en **C** y en **A**.

Se utilizan las columnas de **C** para estimar los loadings de **A**. Al mismo tiempo las columnas de **A** se utilizan para estimar los loadings de **C**. Los modelos resultantes aplicando un algoritmo cíclico para PLS [6,9] son:

$$\mathbf{A} = \mathbf{P} \mathbf{T}^T \quad (3.16)$$

$$c_k = \mathbf{T} \mathbf{v} \quad (3.17)$$

Al igual que en PCR, pero aquí la matriz \mathbf{P} está compuesta por factores que no son ortogonales entre sí. Los factores no son, como en PCA, los óptimos para describir la variabilidad en \mathbf{A} , sino que son rotados para describir simultáneamente la variabilidad en \mathbf{C} . En una situación ideal, las fuentes de variación en \mathbf{A} son exactamente iguales a las fuentes de variación en \mathbf{C} , y los factores para ambas son idénticos.

Los coeficientes de la regresión inversa se calculan como en ILS y PCR independientemente para el analito k , a partir de la ecuación (3.18):

$$\mathbf{b}_k^T = \mathbf{c}_k^T \mathbf{A}^+ \quad (3.18)$$

De la ecuación (3.16) la pseudoinversa para \mathbf{A} es:

$$\mathbf{A}^+ = (\mathbf{T}^T)^+ \mathbf{P}^+ \quad (3.19)$$

Como en PLS las columnas de \mathbf{P} no son ortogonales, \mathbf{P}^+ no es igual a \mathbf{P}^T . por lo cual para invertir la matriz \mathbf{A} debe obtenerse recurriendo a una matriz \mathbf{W} (factores de carga pesados) obtenida en el algoritmo de cálculo PLS [6,9]:

$$\mathbf{A}^+ = (\mathbf{T}^T)^+ (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \quad (3.20)$$

Por lo cual los coeficientes de la regresión se calculan como:

$$\mathbf{b}_k = \mathbf{W} (\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1} \mathbf{T}^+ \mathbf{c}_k \quad (3.21)$$

La concentración del analito en una muestra incógnita se calcula de acuerdo a la ecuación (3.22):

$$c_{k,i} = \mathbf{r}^T \mathbf{b}_k = \mathbf{r}^T \mathbf{W} (\mathbf{P}^T \mathbf{W})^{-1} \mathbf{T}^+ \mathbf{c}_k \quad (3.22)$$

3.3.4 Métodos no lineales: Redes Neuronales Artificiales

3.3.4.1 Generalidades

Las redes neuronales artificiales (ANNs) surgen como una metodología de calibración particularmente atractiva para el modelado de sistemas no lineales sin la necesidad de la asunción de un modelo determinado. Han ganado aceptabilidad en numerosas áreas de la química y su potencial como herramienta de modelado para calibración multivariada está muy bien establecido [11,74]. Los modelos de redes neuronales se diseñaron para imitar los métodos de adquisición de conocimiento y de procesamiento de la información del cerebro humano, tales como la habilidad para aprender mecanismos generales a partir de la presentación de un conjunto de ejemplos reducidos o para generar información correcta a partir de datos de entrada distorsionados. Sin embargo, las ANNs corrientemente aplicadas en el campo científico tienen poco en común con sus contrapartes humanas y el alcance de

sus aplicaciones es más restringido. Pueden definirse de una manera pragmática como estimadores de regresión no lineales y no paramétricos. Los métodos no paramétricos son aquellos que no se basan en la asunción de un modelo específico. ANNs permiten la estimación de relaciones entre una o varias variables de entrada llamadas variables independientes o descriptores y una o varias variables de salida llamadas variables dependientes o respuestas. Son consideradas como una caja negra que transforma una entrada de m variables en una salida de n variables. Las variables de entrada y de respuesta pueden ser números reales, números binarios o números bipolares. El número de variables de entrada y salida está limitado por la disponibilidad del hardware y del tiempo de computación.

Los problemas manipulados por ANNs pueden ser de variada naturaleza.

En una forma general pueden distinguirse cuatro tipos básicos:

- asociación (auto o hetero)
- clasificación
- transformación
- modelado

El modelado es la búsqueda de un modelo o función analítica que dará una salida de n variables especificada para cualquier entrada de m variables. Las técnicas de modelado estándar requieren el conocimiento de la función matemática que relaciona las variables de salida con las variables de entrada; durante el procedimiento de ajuste los parámetros de esta función son determinados sobre las bases del mejor acuerdo entre los datos experimentales (entrada) y los calculados (salida). La ventaja del modelo de red neuronal es que no requiere el conocimiento de la función matemática: la

no linealidad de una única unidad de transformación y un número de parámetros ajustables (pesos) suficientemente grande aseguran los grados de libertad necesarios para adaptar la red a cualquier tipo de relación entre datos de entrada y de salida.

3.3.4.2 Principios de funcionamiento de ANNs multicapas con retropropagación de los errores

Las redes neuronales de mayor aplicación en los problemas de modelado no lineal en química analítica son las redes multicapa de alimentación hacia delante combinadas con el método de retropropagación de los errores como regla de aprendizaje (BP-ANN). Una representación de una red multicapa se muestra en la Figura 3.1.

En la Figura 3.2 se muestra el funcionamiento de una red multicapa con alimentación hacia delante y con retropropagación de errores.

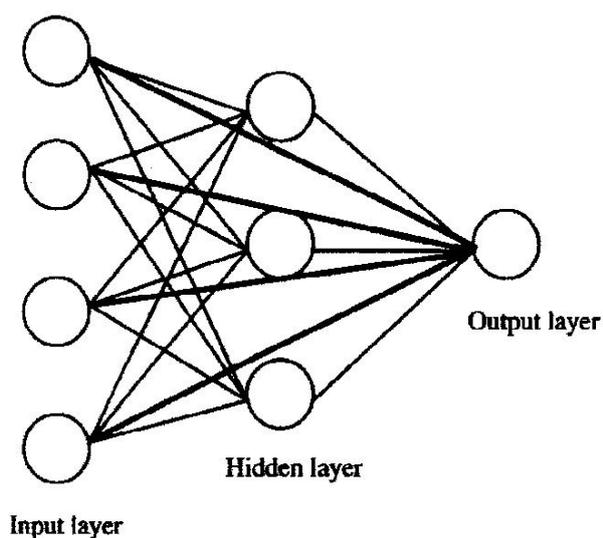


Figura 3.1: Representación típica de una red multicapa (ref. [11])

Los descriptores o variables de entrada se simbolizan como x_i y las respuestas se simbolizan como y_o . En el modelo de calibración inverso las

variables x_i son los elementos de la matriz \mathbf{X} de las mediciones realizadas sobre una serie de n muestras e y_o son los elementos de la matriz \mathbf{Y} de concentraciones de las muestras.

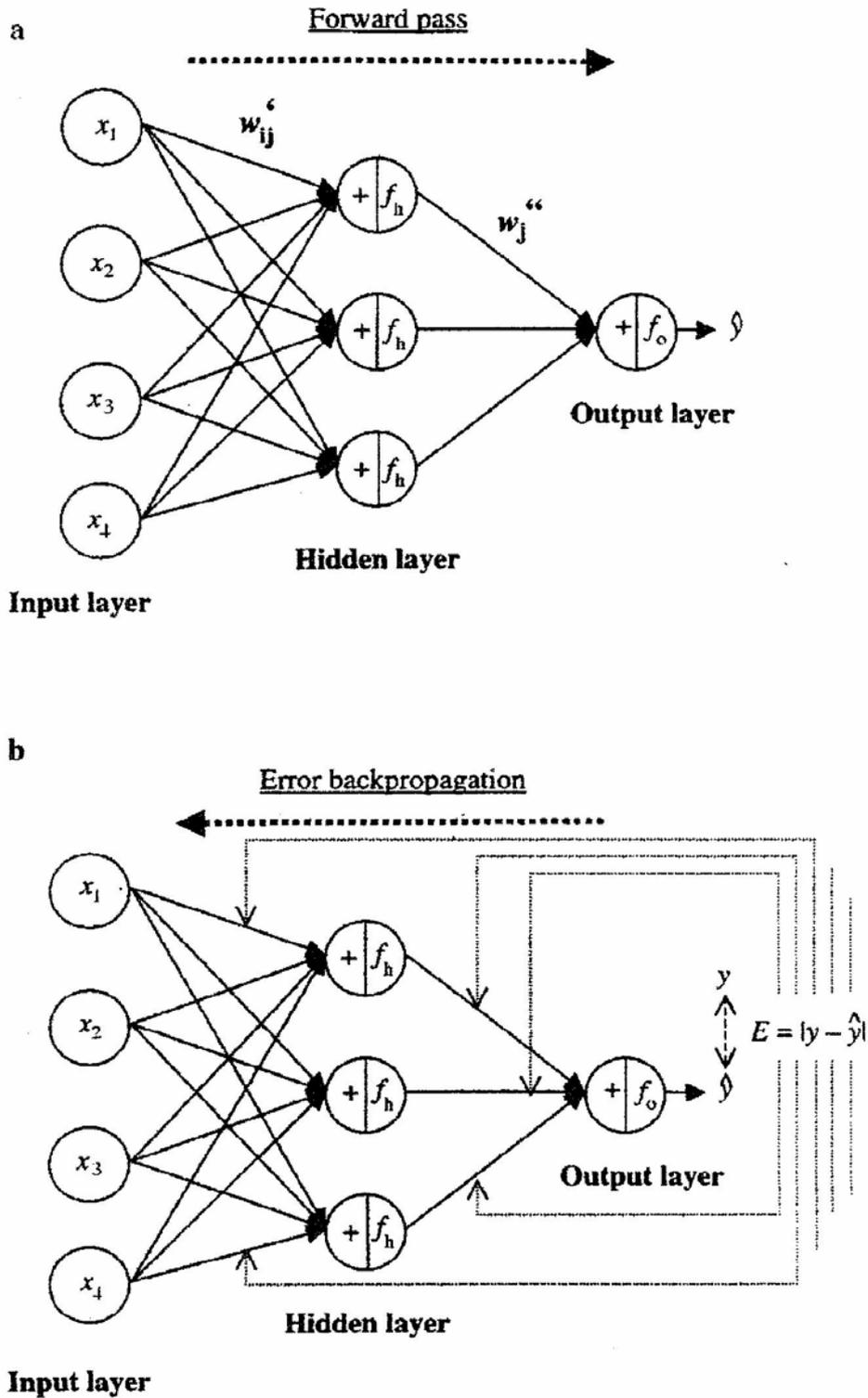


Figura 3.2: Funcionamiento de una red BP-ANN (a) paso directo (b) paso de retropropagación

(ref. [11])

Los descriptores son presentados a la red en la capa de entrada y luego son pesados por las conexiones w'_{ij} entre las capas de entrada y la oculta.

Los nodos de la capa oculta reciben simultáneamente las señales pesadas a partir de los nodos de entrada y realizan dos operaciones: la sumatoria de las señales de entrada pesadas seguida por una proyección de esta sumatoria sobre una función de transferencia f_h para producir una activación.

Las señales procesadas de esta manera en la capa oculta son pesadas por las conexiones w''_j entre esta capa y la de salida y pasan hacia los nodos de la capa de salida. Similarmente a los nodos ocultos, los nodos de salida realizan la sumatoria de las señales pesadas entrantes y proyectan esta sumatoria en su función de transferencia específica f_o .

En la Figura 3.2 se modela una única respuesta y , por lo que la capa de salida sólo contiene un nodo. La salida para este nodo es la respuesta estimada y' que puede ser expresada como:

$$y' = f_o \left[\theta'' + \sum_{j=1}^{n_h} w''_j f_h \left(\sum_{i=1}^{n_d} w'_{ij} x_i + \theta' \right) \right] \quad (3.23)$$

donde n_d y n_h son el número de variables de entrada y nodos ocultos, respectivamente.

Aunque ANNs pueden ser consideradas herramientas no paramétricas, los modelos a los que conducen están definidos por un conjunto de parámetros ajustables determinados por un algoritmo. Estos parámetros ajustables son los pesos w'_{ij} , w''_j y los sesgos θ' y θ'' . Los últimos actúan como términos de compensación desplazando las funciones de transferencia horizontalmente. Los parámetros ajustables son determinados en un proceso iterativo llamado entrenamiento o aprendizaje. En el comienzo de la etapa de entrenamiento se

le asignan valores aleatorios a los parámetros y luego el entrenamiento procede en dos etapas. Primero se desarrolla un paso directo a través de la red con un conjunto de muestras de entrenamiento con respuestas experimentales conocidas (Figura 3.2(a)). Al final de este paso se calcula la magnitud del error entre respuestas experimentales y predichas, la cual es usada para ajustar todos los pesos de la red, en un paso de retropropagación (Figura 3.2 (b)). Estos dos pasos constituyen una época o iteración. Con los parámetros optimizados y las muestras de entrenamiento se vuelve a realizar un paso directo. El procedimiento completo se repite hasta que se alcanza convergencia. Esto significa que se alcance un nivel de error bajo aceptable o predeterminado. Este tipo de redes se denominan supervisadas, ya que los valores de las variables de salida para las muestras de calibración y de monitoreo son proporcionados a la red.

El entrenamiento de una red es un problema de optimización donde se busca el mínimo de una superficie de error en un espacio multidimensional definido por los parámetros ajustables. Tales superficies se caracterizan por la presencia de varios mínimos locales. En muchos casos ANN probablemente no encontrará el mínimo absoluto, pero si un mínimo local relativamente cercano y aceptable para el problema considerado. El algoritmo más popular para el ajuste de pesos durante la etapa de entrenamiento es el algoritmo del gradiente descendente basado en la estimación de la primera derivada del error respecto a cada peso. La característica más importante de ANNs aplicadas a la regresión es que son aproximadores universales: pueden ajustar cualquier función continua definida sobre un dominio compacto a un grado de exactitud arbitrariamente predefinido.

3.3.4.3 Desarrollo del modelo de calibración

3.3.4.3.1 Muestras de calibración

Un paso importante en el desarrollo de cualquier modelo de calibración es la división de los datos disponibles en dos subgrupos o conjuntos de datos: un conjunto de entrenamiento, utilizado para estimar los parámetros del modelo y un conjunto de validación, usado para verificar la habilidad del modelo sobre nuevas muestras. Para ANNs el problema es aún más complejo ya que se requiere un conjunto adicional, denominado conjunto de monitoreo que permite decidir la finalización de la etapa de entrenamiento de la red a fin de evitar el sobreentrenamiento o sobreajuste que se obtiene cuando las sucesivas correcciones que se realizan sobre los parámetros ajustables de la red para disminuir el error en la calibración llevan a un consecuente aumento en el error en la predicción. Idealmente, para un número n de muestras de entrenamiento, el conjunto de monitoreo debe contener entre $n/2$ y n muestras. El conjunto de monitoreo debe ser independiente del conjunto de entrenamiento y esto se logra mediante una selección aleatoria de las muestras para cada grupo.

3.3.4.3.2 Compresión de variables

Otra cuestión importante a considerar en la calibración con ANNs es que la relación entre el número de muestras de entrenamiento y el número de parámetros ajustables de la red debe ser tan grande como sea posible. Una forma de lograrlo es comprimir los datos o variables de entrada, especialmente cuando consisten de valores de absorbancias a un gran número de longitudes de onda o a un gran número de tiempos. Además de reducir el tamaño de las variables de entrada, la compresión permite eliminar información irrelevante como ruido o redundancia presentes en la matriz de entrada. Una compresión

de datos adecuada resulta en un incremento en la velocidad de entrenamiento, una mejor habilidad de generalización del modelo, un aumento en la robustez respecto al ruido de las mediciones y una representación más simple del modelo. El método más popular para la compresión de datos en análisis cuantitativo con datos espectrales es el análisis por componentes principales, que permite resumir casi toda la variabilidad de la matriz \mathbf{X} en unos pocos ejes ortogonales.

3.3.4.3.3 Determinación de la topología de la red

La topología de una red neuronal está determinada por su arquitectura y por la naturaleza de las funciones de transferencia.

La arquitectura de la red está a su vez determinada por el número de capas y el número de nodos en cada una de ellas.

Las redes utilizadas para modelado generalmente consisten en tres tipos de capas: una capa de entrada, una o más capas ocultas y una capa de salida.

La capa de entrada es la que colecta las variables de entrada y algunos autores la consideran como un simple *buffer*. El número de nodos para esta capa es igual al número de variables que se ingresan a la red, que pueden ser las variables originalmente medidas o los *scores* resultantes de la etapa de compresión.

En general se utiliza una capa oculta ya que diferentes autores concluyen a partir de sus resultados prácticos que no se obtuvieron mejores resultados en problemas de calibración usando dos capas ocultas en lugar de una. Se recomienda el uso de una sola capa oculta en calibración multivariada, salvo en situaciones en donde la relación en la que se basa el modelo sugiera

discontinuidades. Solo en estas situaciones es necesario el uso de una capa oculta adicional.

En la Figura 3.1 se muestra una arquitectura típica utilizando una única capa oculta. Es posible agregar conexiones directas entre las capas de entrada y de salida. Esto es útil particularmente en los casos en que las variables de entrada presenten contribuciones lineales y no lineales a la respuesta. Las conexiones directas manipulan la parte lineal y las conexiones clásicas construyen la parte no lineal del modelo. En teoría una red sin conexiones directas tiene la misma capacidad predictiva que una red con conexiones directas, por lo cual se prefiere el uso de las primeras a fin de reducir el número de parámetros ajustables.

El número de nodos de la capa de salida se recomienda que sea igual a uno; de esta manera se modela una sola respuesta por vez, con lo que se logra una mejor optimización para cada una de las respuestas buscadas.

Para definir el número de neuronas en la capa de entrada, puede elegirse una de las dos metodologías posibles: el método de adición o el método de eliminación. La primera opción se basa en comenzar el entrenamiento con un número bajo de neuronas de entrada e ir agregando sucesivamente un nodo por vez, hasta que la *performance* de la red no mejore significativamente. En el segundo caso, se comienza con un número alto de nodos de entrada y se remueven gradualmente hasta que la *performance* de la red no aumente. Ambos métodos son igualmente recomendados. Si se utiliza PCA para la compresión de variables, los *scores* de los componentes correspondientes a los mayores autovalores son los que se utilizan como variables de entrada.

En la selección del número de nodos de la capa oculta se recomienda reducirlo al mínimo posible. La estrategia de prueba y error es la que define

finalmente el número óptimo de nodos ocultos, mediante la comparación de los errores obtenidos con los distintos modelos probados.

Para cada arquitectura deben definirse dos parámetros adicionales: la constante de velocidad de aprendizaje, η , y la constante momento, μ . El primero determina la velocidad a la cual cambian los pesos durante el entrenamiento de la red y su elección surge de un compromiso entre un entrenamiento rápido y la convergencia al mínimo absoluto. La constante momento otorga al proceso de entrenamiento una cierta capacidad de inercia, capacitando a la red para evitar mínimos locales.

Las funciones de transferencia generalmente utilizadas son las funciones sigmoidea e hiperbólica, ya que ambas pueden modelar un gran número de no linealidades.

3.3.4.3.4 Entrenamiento de la red. Evaluación de la capacidad del modelo

Como fue mencionado anteriormente, es necesario disponer de un conjunto de muestras de monitoreo a fin de reducir la tendencia a un sobreentrenamiento de la red neuronal. Debe hacerse un seguimiento de los errores de calibración y de monitoreo durante el entrenamiento de la red y la dimensión de estos errores permite determinar el conjunto óptimo de parámetros ajustables en la red. Existen distintos criterios que se aplican para retener el conjunto óptimo de parámetros ajustables: entrenar la red durante un gran número predefinido de épocas o interacciones y retener el conjunto de parámetros correspondientes al mínimo de la curva de error de monitoreo; detener el entrenamiento cuando se llega a un valor de error de monitoreo por debajo de un umbral preespecificado; detener el entrenamiento cuando la

diferencia entre dos errores de monitoreo sucesivos esté por debajo de un valor predeterminado. Para todos los casos debe verificarse a la vez un error de calibración razonablemente bajo.

El error que se utiliza para seguir el proceso de entrenamiento de una ANN supervisada es el RMSE (errores cuadráticos medios):

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{p(n-1)} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^p (y_{ij} - y'_{ij})^2} \quad (3.24)$$

donde n es el número de muestras en el conjunto considerado, p es el número de neuronas en la capa de salida, y el valor de referencia de la respuesta e y' la respuesta calculada por la red

3.4 Resolución multivariada del sistema cinético para la determinación de Cu(II) y Ni(II)

3.4.1 Trabajo experimental

El estudio se realizó sobre perfiles de absorbancia de resazurina en función del tiempo a 605 nm para diferentes concentraciones de los cationes metálicos. Los perfiles fueron adquiridos siguiendo el procedimiento ya descrito en el Capítulo 1 y en las condiciones experimentales óptimas determinadas para cada caso. Como método de pretratamiento se utilizó el centrado de las variables independientes para todas las técnicas de calibración investigadas.

Se utilizaron 11 muestras de calibración para cada analito en el rango de concentraciones entre 0.5 y 6 mg l⁻¹ para Cu(II) y entre 1 y 15 mg l⁻¹ para Ni(II). Cada uno de estos conjuntos de calibración fue dividido aleatoriamente en un

conjunto de entrenamiento (70% de las muestras) y un conjunto de monitoreo (30% de las muestras) para la aplicación de ANNs. En el caso de los métodos PCR y PLS el conjunto de monitoreo seleccionado aleatoriamente en ANNs fue utilizado como conjunto de validación para los modelos de calibración obtenidos.

Tabla 3.1: Concentraciones correspondientes a los conjuntos de entrenamiento y de monitoreo para Cu(II) y Ni(II)

Concentraciones de las muestras de calibración (mg l ⁻¹)	
Cu(II)	Ni(II)
0.75	1.00
1.50	1.50
2.00	2.00
2.50	4.00
3.00	7.00
3.50	9.00
4.00	11.00
6.00	15.00
Concentraciones de las muestras de validación (mg l ⁻¹)	
Cu(II)	Ni(II)
0.50	2.50
1.00	3.00
5.00	5.00

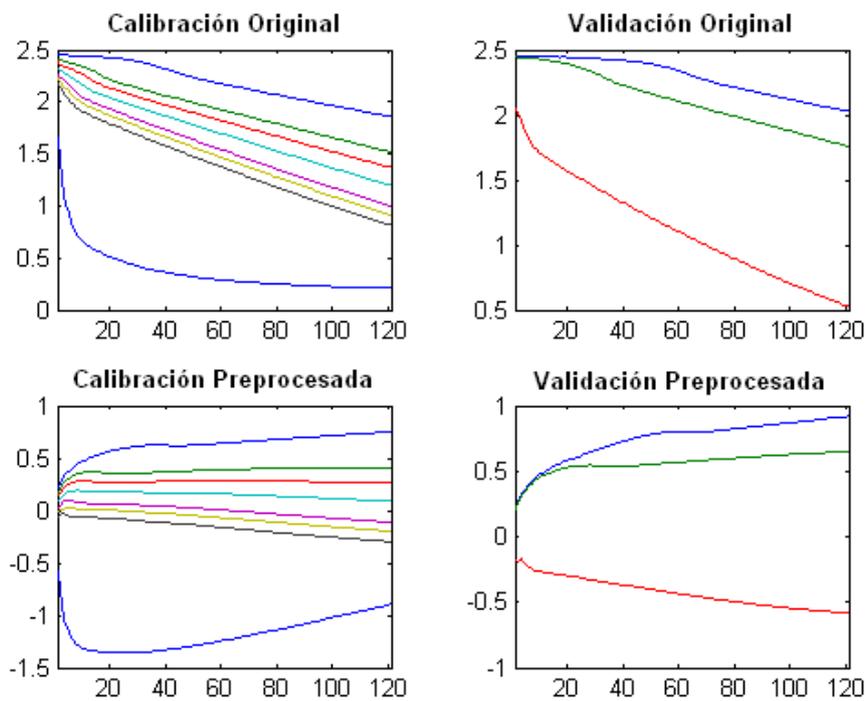


Figura 3.3: Perfiles originales y centrados de las muestras de Cu(II)

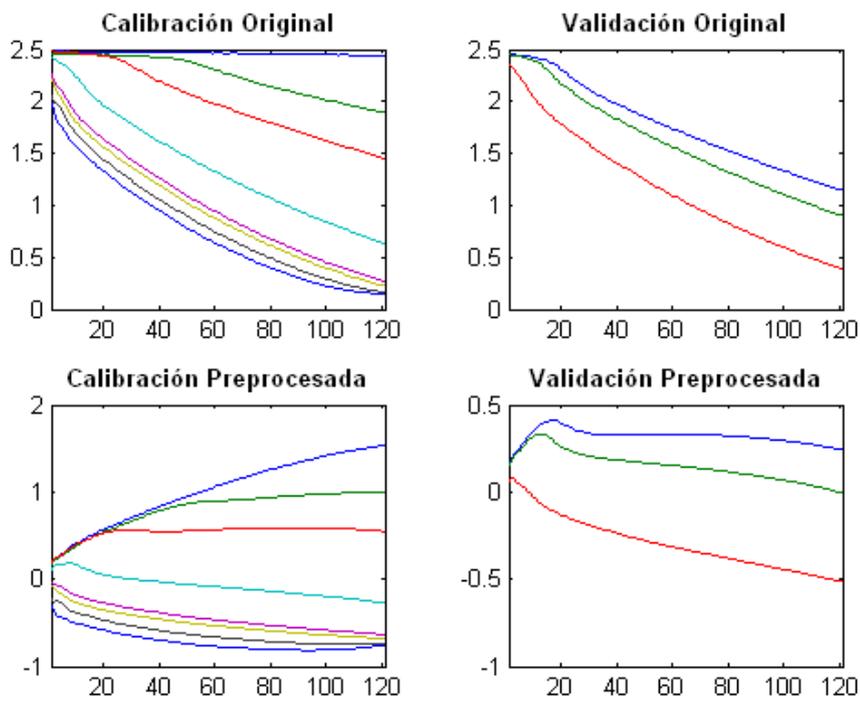


Figura 3.4: Perfiles originales y centrados de las muestras de Ni(II)

En la Tabla 3.1 se muestran los valores de concentraciones utilizados en cada conjunto de muestras. Para cada muestra se obtuvo como señal analítica

el perfil de absorbancia de la resazurina durante 120 s de reacción, por lo cual la variable respuesta obtenida fue una matriz de 120 filas y un número de columnas igual al número de muestras consideradas en la calibración.

En las Figuras 3.3 y 3.4 se muestran los perfiles crudos obtenidos para las muestras de entrenamiento como de validación y los correspondientes perfiles luego del pretratamiento de centrado, para el Cu(II) y el Ni(II), respectivamente.

3.4.2 Métodos lineales de calibración basados en la reducción de variables

Para la construcción de los modelos PCR y PLS se utilizó un programa para calibración multivariada de primer orden, MVC1, desarrollado en MatLab 7.0 [200].

Se consideraron en primer lugar los perfiles cinéticos completos de las muestras de calibración a partir de los cuales se seleccionó el número óptimo de factores y posteriormente se aplicó la estrategia de la ventana móvil para seleccionar la región que conduce al mejor modelo de calibración.

3.4.2.1 Análisis del modelo PCR para Cu(II)

3.4.2.1.1 Selección del número óptimo de factores

Los resultados de la aplicación del método de validación cruzada [9] (Tabla 3.2) indican que para el Cu(II) sólo es necesario utilizar el primer componente principal para describir el modelo PCR cuando se utiliza el perfil cinético completo (120 puntos de datos).

Tabla 3.2: Resultados de la calibración con el método de validación cruzada

Componente	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
1	3.57	1.00	0.5	0.67	22.97	0.81
2	14.33	0	0	1.34	46.06	0.24
3	53.62	0	0	2.59	89.08	-1.86
4	114.53	0	0	3.78	130.19	-5.11
5	87.04	0	0	3.30	113.50	-3.64

donde PRESS es la suma de los cuadrados de los errores de predicción, F es la relación estadística F, p es la probabilidad de F, SEP es el error estándar de predicción (ecuación 3.25), REP% es el error relativo de predicción (ecuación 3.26), calculados durante la aplicación del método de validación cruzada y R² es el coeficiente cuadrático de correlación.

$$SEP = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y - y')^2} \quad (3.25)$$

donde n es el número de muestras en el conjunto de calibración, y el valor de concentración en cada una de las muestras e y' la concentración estimada para la muestra iésima dejada de lado durante la validación cruzada.

$$REP \% = \frac{SEP}{\bar{y}} \times 100 \quad (3.26)$$

donde \bar{y} es la concentración media para las muestras de calibración.

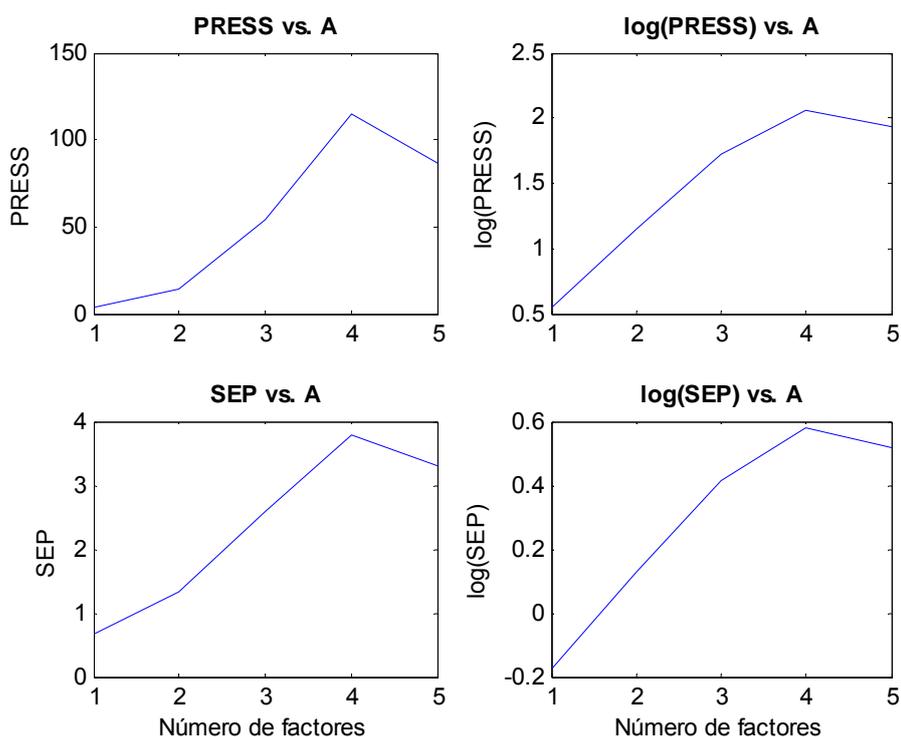


Figura 3.5: Valores PRESS y SEP vs. Número de factores

En la Figura 3.5 se representa la variación de los valores de PRESS y SEP y sus logaritmos con el número de factores simbolizados como A.

3.4.2.1.2 Estudio de regiones del perfil cinético

Se utilizó la estrategia de la ventana móvil para seleccionar la región de trabajo óptima. Como se observa en la Figura 3.6 el valor de PRESS mínimo se obtuvo para una región comprendida entre los sensores 91 a 120

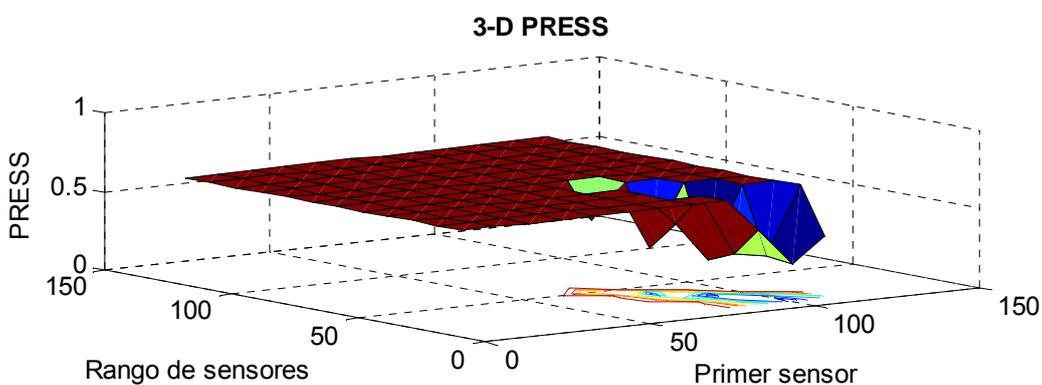


Figura 3.6: Valores PRESS vs. regiones de sensores considerados

3.4.2.1.3 Modelo de calibración

Los resultados de la calibración en el rango de sensores 91 a 120 y para un único componente se muestran en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Resultados de la calibración con el método de validación cruzada

Componente	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
1	0.23	1.00	0.50	0.17	5.79	0.99

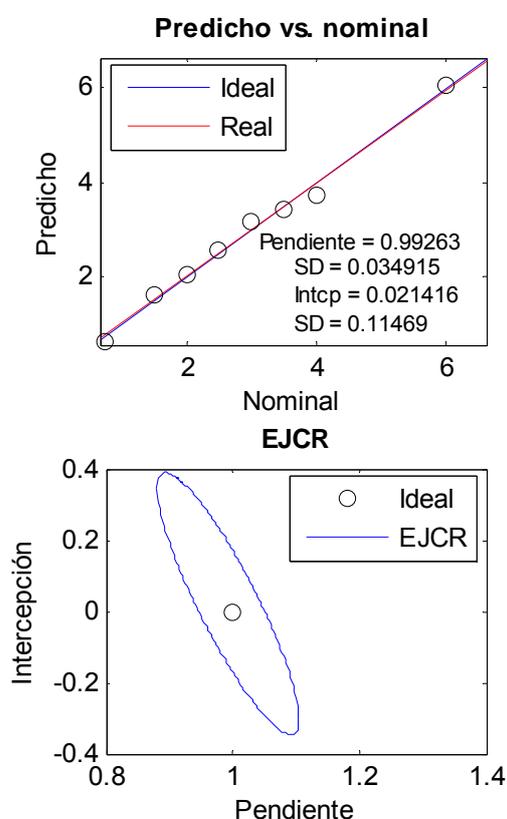


Figura 3.7: Valores predichos por el modelo PCR vs valores nominales de concentración y región de confianza conjunta para muestras de calibración

En la Figura 3.7 se muestran los valores predichos por el modelo para las muestras de calibración vs. la concentración nominal de dichas muestras y la elipse de región de confianza conjunta para estas muestras de calibración.

Los valores de pendiente y de intercepción y sus correspondientes desviaciones fueron utilizados para construir los intervalos de confianza para la pendiente y la intercepción verdaderas (β y α). Estos intervalos deben contener

los valores 1 y 0, respectivamente, para decidir que no existen errores proporcionales o sistemáticos en el método estudiado.

Una manera conveniente de establecer la presencia o ausencia de errores en la determinación es construir la elipse para la región de confianza conjunta (EJCR) para la pendiente (β) y la intersección (α) verdaderas [201].

La ecuación utilizada para la aplicación de este método fue:

$$n(a - \alpha)^2 + 2\left(\sum x_i\right)(a - \alpha)(b - \beta) + \left(\sum x_i^2\right)(b - \beta)^2 = 2s^2F_{2,\gamma} \quad (3.27)$$

donde n es el número de puntos, s^2 la variancia de la regresión y $F_{2,v}$ el valor crítico del estadístico Snedecor-Fisher con 2 y $v = n-2$ grados de libertad a un nivel de confianza porcentual usualmente de 95%.

El centro de la elipse es (b,a). Cualquier punto (β,α) que cae dentro de la elipse de la región de confianza conjunta es compatible con los datos al nivel de confianza elegido. A fin de evaluar la existencia de errores constantes o proporcionales, los valores $\beta= 1$ y $\alpha =0$ son comparados con los estimadores b y a usando la EJCR. Si el punto (1,0) cae dentro de la elipse, no se evidencia la presencia de estos errores, lo cual claramente se observa en la Figura 3.7.

3.4.2.1.4 Etapa de predicción

El modelo seleccionado se aplicó para la predicción de las muestras de validación.

En la Tabla 3.4 y la Figura 3.8 se muestran los resultados para la etapa de predicción. Los errores cuadráticos medios de predicción calculados de acuerdo a la ecuación 3.28 y los errores relativos porcentuales de predicción (ecuación 3.29) son incluidos en la tabla.

$$RMSEP = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (y - y')^2} \quad (3.28)$$

donde n es el número de muestras de predicción, y la concentración nominal de dichas muestras e y' la concentración estimada por el modelo.

$$REP\% = \frac{RMSEP}{\bar{y}} \times 100 \quad (3.29)$$

donde \bar{y} es la concentración nominal media de las muestras de predicción.

3.4.2.2 Análisis del modelo PLS para Cu(II)

La aplicación del método PLS para calibración y predicción condujo a los mismos resultados que el modelo PCR, por lo cual no se desarrolla su análisis y resultados

Tabla 3.4: Predicciones para el conjunto de muestras de validación

Concentración nominal (mg l ⁻¹)	Concentración predicha (mg l ⁻¹)	Desviación estándar (mg l ⁻¹)	Límite de confianza (mg l ⁻¹)
0.50	0.11	0.10	0.24
1.00	0.90	0.08	0.20
5.00	4.66	0.08	0.18
RMSEP (mg l ⁻¹)	0.37		
REP%	17.2		

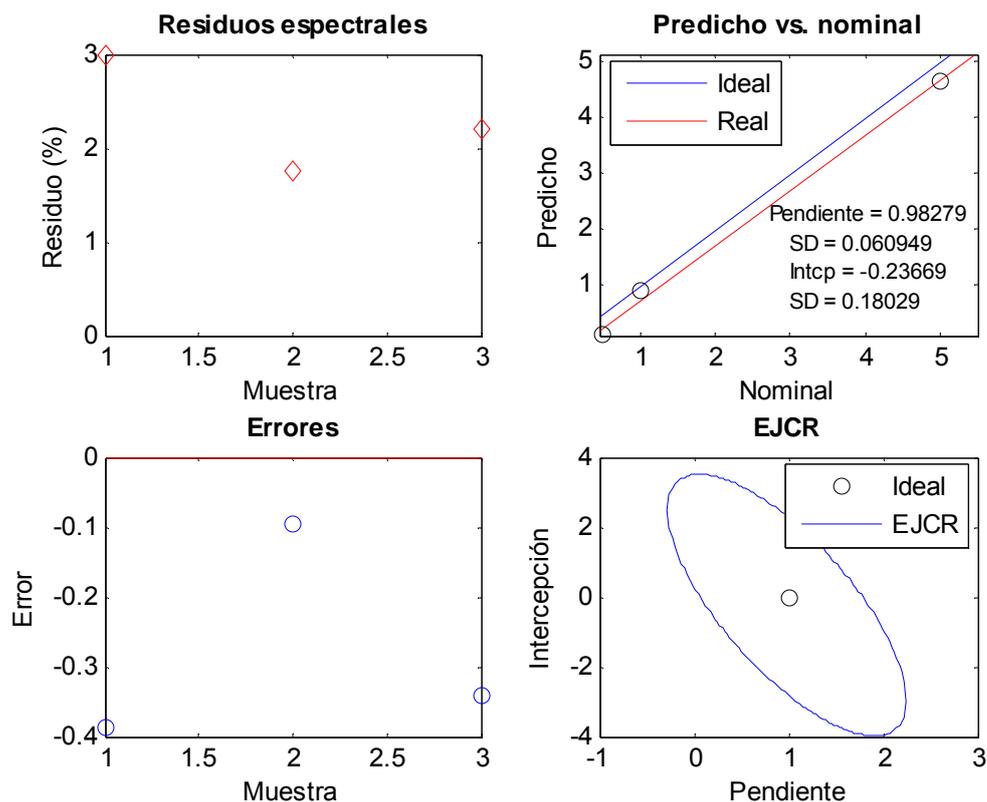


Figura 3.8: Residuos espectrales, errores, valores predichos por el modelo PCR vs valores nominales de concentración y región de confianza conjunta para muestras de validación

3.4.2.3 Análisis del modelo PCR para Ni(II)

3.4.2.3.1 Selección del número óptimo de factores

Los resultados de la aplicación del método de validación cruzada (Tabla 3.5) indican que para el Ni(II) es necesario utilizar dos componentes principales para describir el modelo PCR cuando se utiliza el perfil cinético completo (120 puntos de datos).

En la Figura 3.9 se representa la variación de los valores de PRESS y SEP y sus logaritmos con el número de factores.

Tabla 3.5: Resultados de la calibración con el método de validación cruzada

Componente	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
1	62.06	1.89	0.81	2.79	44.12	0.66
2	40.25	1.22	0.61	2.24	35.54	0.78
3	32.90	1.00	0.50	2.03	32.12	0.82
4	85.15	0	0	3.26	51.68	0.53
5	125.22	0	0	3.96	62.67	0.31

3.4.2.3.2 Estudio de regiones del perfil cinético

Se utilizó la estrategia de la ventana móvil para seleccionar la región de trabajo óptima. Como se observa en la Figura 3.10 el valor de PRESS mínimo se obtuvo para una región comprendida entre los sensores 1 a 40

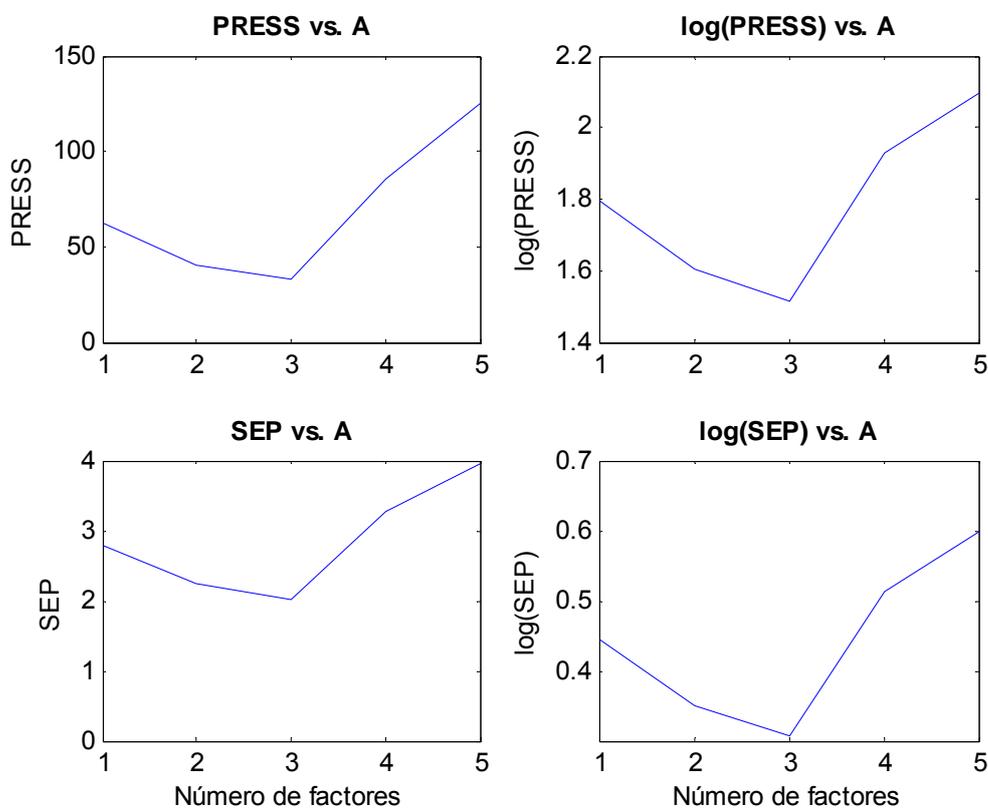


Figura 3.9: Valores PRESS y SEP vs. Número de factores

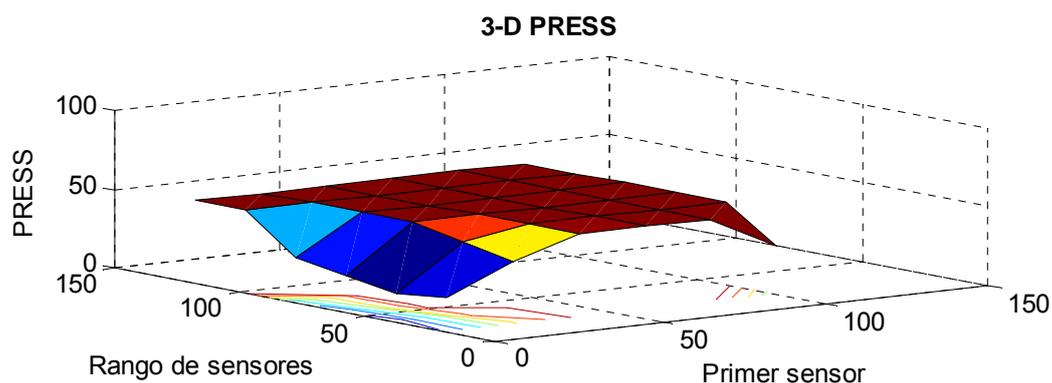


Figura 3.10: Valores PRESS vs. regiones de sensores considerados

3.4.2.3.3 Modelo de calibración

Los resultados de la calibración en el rango de sensores 1 a 40 y para 2 componentes se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6: Resultados de la calibración con el método de validación cruzada

Componente	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
1	32.54	1.88	0.80	2.02	31.95	0.82
2	17.32	1.00	0.50	1.47	23.31	0.90

En la Figura 3.11 se muestran los valores predichos por el modelo vs la concentración nominal para las muestras de calibración.

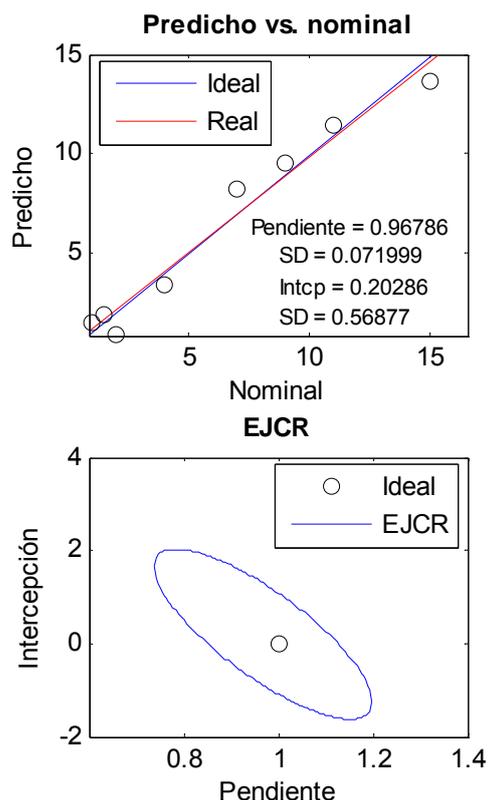


Figura 3.11: Valores predichos por el modelo PCR vs valores nominales de concentración y región de confianza conjunta para muestras de calibración

3.4.2.3.4 Etapa de predicción

El modelo seleccionado se aplicó para la predicción de las muestras de validación. En la Tabla 3.7 y en la Figura 3.12 se muestran los resultados

Tabla 3.7: Predicciones para el conjunto de muestras de validación

Concentración nominal (mg l ⁻¹)	Concentración predicha (mg l ⁻¹)	Desviación estándar (mg l ⁻¹)	Límite de confianza (mg l ⁻¹)
2.50	1.12	0.66	1.53
3.00	1.50	0.77	1.78
5.00	5.81	0.59	1.40
RMSEP (mg l ⁻¹)	1.55		
REP%	44.3		

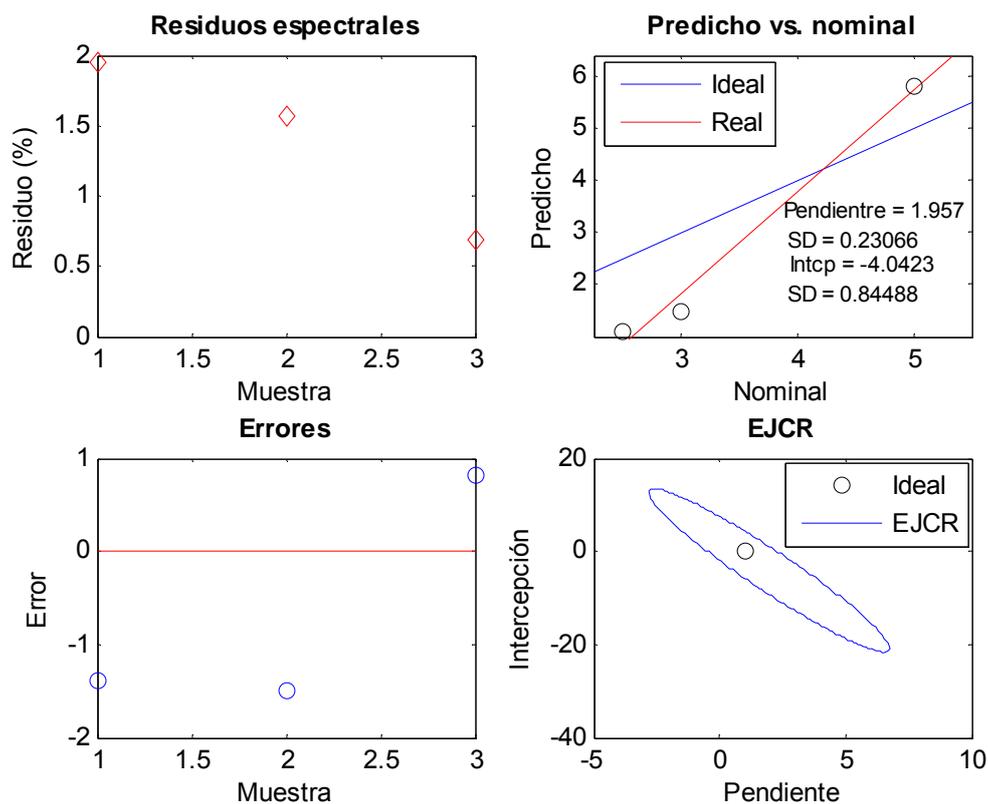


Figura 3.12: Residuos espectrales, errores, valores predichos por el modelo PCR vs valores nominales de concentración y región de confianza conjunta para muestras de validación

3.4.2.4 Análisis del modelo PLS para Ni(II)

3.4.2.4.1 Selección del número óptimo de factores

Los resultados de la aplicación del método de validación cruzada (Tabla 3.8) indican que para el Ni(II) es necesario utilizar un único componente para describir el modelo PLS cuando se utiliza el perfil cinético completo (120 puntos de datos).

En la Figura 3.13 se representa la variación de los valores de PRESS y SEP (y sus logaritmos) con el número de factores.

Tabla 3.8: Resultados de la calibración con el método de validación cruzada

Componente	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
1	61.35	1.54	0.72	2.77	43.87	0.66
2	39.94	1.00	0.50	2.23	35.40	0.78
3	44.39	0	0	2.36	37.32	0.75
4	98.61	0	0	3.51	55.62	0.45
5	156.74	0	0	4.43	70.12	0.13

3.4.2.4.2 Estudio de regiones del perfil cinético

Se utilizó la estrategia de la ventana móvil para seleccionar la región de trabajo óptima. Como se observa en la Figura 3.14 el valor de PRESS mínimo se obtuvo para una región comprendida entre los sensores 1 a 40. Para esta región el número óptimo de factores resultó igual a 2.

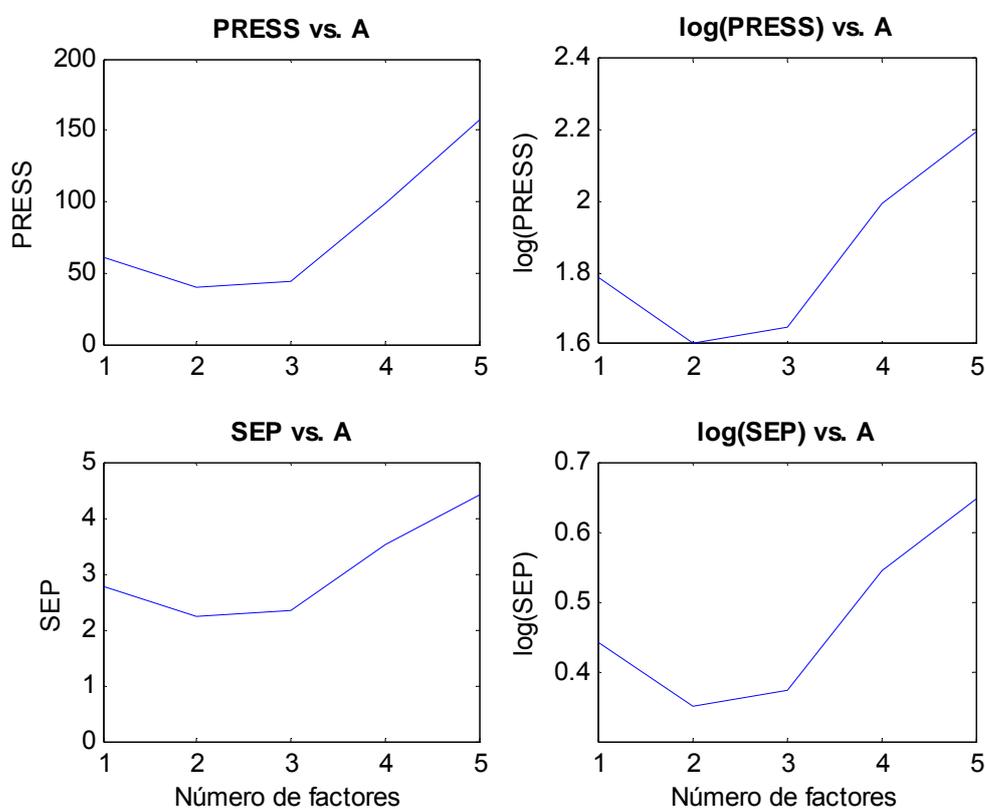


Figura 3.13: Valores PRESS y SEP vs. Número de factores

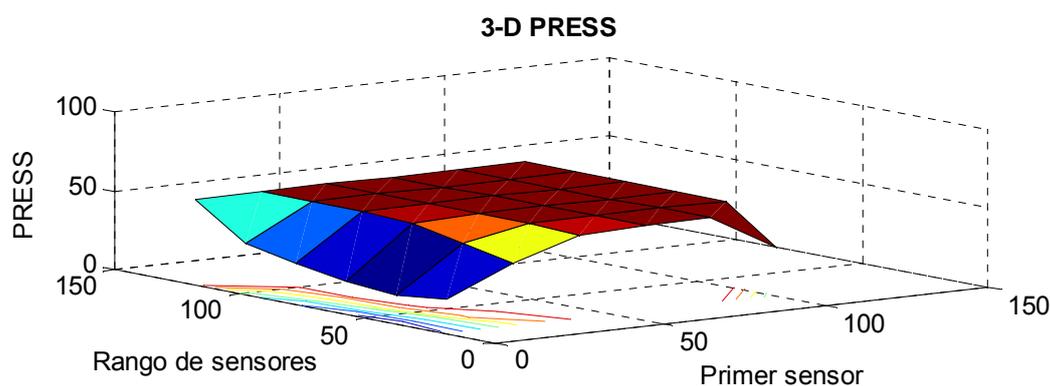


Figura 3.14: Valores PRESS vs. regiones de sensores considerados

3.4.2.4.3 Modelo de calibración

Los resultados de la calibración en el rango de sensores 1 a 40 y para 2 componentes se muestran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9: Resultados de la calibración con el método de validación cruzada

Componente	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
1	32.32	1.80	0.79	2.01	31.84	0.82
2	17.91	1.00	0.50	1.50	23.71	0.90

En la Figura 3.15 se muestran los valores predichos por el modelo para las muestras de calibración vs la concentración nominal de dichas muestras y el gráfico de la elipse de región de confianza conjunta.

3.4.2.4.4 Etapa de predicción

El modelo seleccionado se aplicó para la predicción de las muestras de validación. En la Tabla 3.10 y en la Figura 3.16 se muestran los resultados.

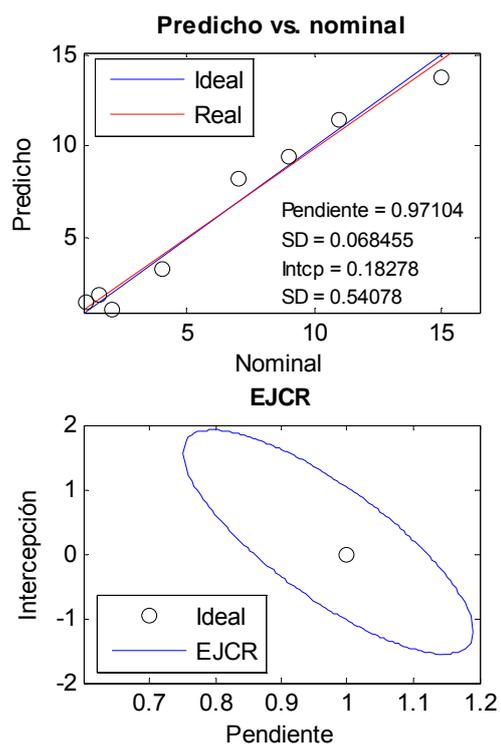


Figura 3.15: Valores predichos por el modelo PLS vs valores nominales de concentración y región de confianza conjunta para muestras de calibración

Tabla 3.10: Predicciones para el conjunto de muestras de validación

Concentración nominal (mg l^{-1})	Concentración predicha (mg l^{-1})	Desviación estándar (mg l^{-1})	Límite de confianza (mg l^{-1})
2.50	1.22	0.61	1.37
3.00	1.54	0.71	1.65
5.00	5.71	0.57	1.36
RMSEP (mg l^{-1})	1.46		
REP%	41.8		

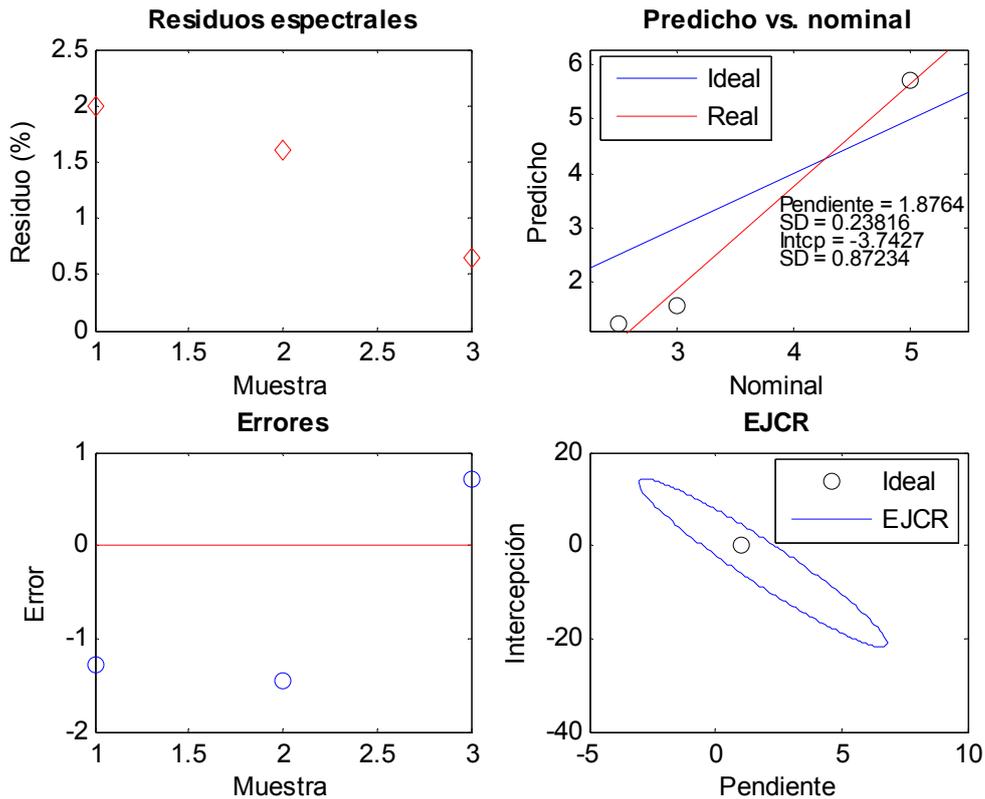


Figura 3.16: Residuos espectrales, errores, valores predichos por el modelo PLS vs valores nominales de concentración y región de confianza conjunta para muestras de validación

3.4.2.5 Discusión de los resultados de la calibración con modelos lineales

Los modelos PCR y PLS obtenidos demostraron que los métodos lineales de calibración multivariada no son adecuados para la resolución de este sistema. Si bien los coeficientes cuadráticos de correlación (R^2) fueron de 0.99 y 0.90 para el Cu(II) y Ni(II), respectivamente, los errores asociados a la predicción fueron elevados en ambos casos (REP% mayor a 17 para Cu(II) y mayores a 40 para Ni(II)). El bajo poder predictivo se atribuyó a la no linealidad inherente de los datos cinéticos considerados en la calibración, por lo cual se requiere de métodos no lineales para su tratamiento.

3.4.3 Método de calibración no lineal: Redes Neuronales Artificiales

3.4.3.1 Compresión de variables

Las matrices de datos de los perfiles cinéticos fueron sometidas a un pretratamiento de centrado y comprimidas mediante un procesamiento por componentes principales. Cada columna de la matriz de entrada consistió de 120 puntos de datos para cada perfil correspondiente a los datos de absorbancia adquiridos durante un período de reacción de 120 s. De esta manera se obtuvieron matrices de 8 columnas y 120 filas para el entrenamiento y de 3 columnas y 120 filas para el monitoreo, las cuales luego de la compresión por componentes principales originaron matrices de 8 y 3 columnas, respectivamente, y un número de filas igual al número de componentes utilizados en la red, el cual define el número de neuronas de entrada. Las variables de entrada fueron por lo tanto los scores de las muestras de entrenamiento y de monitoreo para los componentes principales considerados.

3.4.3.2 Descripción de las redes utilizadas

Se utilizaron redes multicapas de alimentación hacia adelante. Las redes utilizadas consistían de tres capas, una capa de entrada, una oculta y una de salida. La función de transferencia seleccionada para las capas oculta y de salida fue una función tipo sigmoidea, ya que esta es una función muy versátil y apropiada para sistemas no lineales. Como regla de aprendizaje supervisado se seleccionó el método de retropropagación de los errores y para el ajuste de pesos se utilizó el método del gradiente descendente. El programa utilizado para la construcción de los modelos ANNs fue una rutina elaborada en MatLab 7.0.

3.4.3.3 Entrenamiento de las redes

Los parámetros utilizados para construir los modelos ANN se optimizaron utilizando una estrategia de tipo prueba y error a través de la evaluación de los valores de errores cuadráticos medios de calibración, RMSEC (sobre las muestras de entrenamiento) y los de predicción, RMSEP (sobre las muestras de monitoreo) obtenidos de acuerdo a la ecuación [24]. Las variables consideradas durante la optimización fueron la arquitectura de la red (número de neuronas de la capa de entrada y de la capa oculta), los valores de los parámetros η y μ y el rango de sensores. La capa de salida consistió en una única neurona correspondiente al valor de concentración del analito considerado en cada caso.

Se evaluaron diferentes combinaciones de los parámetros velocidad de aprendizaje y momento en un rango entre 0.4 y 0.6, para cada arquitectura investigada. Para definir el número de nodos en las capas de entrada y oculta se entrenaron redes con diferentes arquitecturas. Para cada arquitectura se entrenaron al menos cinco redes partiendo de diferentes pesos iniciales y de diferentes combinaciones de los parámetros μ y η y se seleccionó en cada caso la que produjo un mínimo valor de RMSEP.

La estrategia utilizada fue variar en primer lugar el número de neuronas de la capa de entrada para un número de nodos ocultos igual a dos. Para el número de nodos de entrada que produjo el menor RMSEP se varió el número de nodos de la capa oculta, comparando los valores RMSEC y RMSEP.

Cabe aclarar que el número de neuronas de la capa de entrada puede ser definido a partir del análisis por componentes principales de la matriz de mediciones obtenida para todo el conjunto de muestras de calibración.

Tabla 3.11: Resultados del análisis por componentes principales para Cu(II)

PC	% de Var. Explicada	Sfit	SfitCV	Press/SSE
1	99.36	0.150	0.16	NaN
2	99.95	0.042	0.02	0.01
3	100.0	0.011	0.02	0.12
4	100.0	0.008	0.01	0.68
5	100.0	0.003	0.01	1.52
6	100.0	0.003	0.01	8.02
7	100.0	0.002	0.01	14.14
8	100.0	0.001	0.02	32.14

Este estudio se realizó utilizando una rutina de PCA en MatLab 7.0 y los resultados tanto para el Cu(II) (Tabla 3.11) como para el Ni(II) (Tabla 3.12) fueron compatibles con lo obtenido para la estrategia descrita previamente.

Se observan en las tablas una serie de parámetros, variancia explicada, desviación estándar del ajuste, desviación estándar de la validación cruzada y en la última columna se observa la razón entre dos PRESS, el de la validación cruzada y el de la autopredicción. Cuando este valor supera la unidad, el número de componentes empieza a modelar ruido. El criterio en este análisis es elegir el mayor número de PCs para el que la razón es inferior a 1. En este caso, el número óptimo de componentes a utilizar resultó igual a 4 para el Cu(II) e igual a 3 para el Ni(II).

Tabla 3.12: Resultados del análisis por componentes principales para Ni(II)

PC	% de Var. Explicada	Sfit	SfitCV	Press/SSE
1	92.95	0.57	0.68	NaN
2	96.37	0.44	0.64	0.86
3	98.26	0.32	0.52	0.96
4	98.94	0.27	0.56	1.88
5	99.41	0.22	0.62	2.94
6	99.81	0.14	0.66	4.47
7	99.95	0.10	0.79	12.00
8	100.0	0.07	1.07	30.30

En la Tabla 3.13 se muestran los menores valores de errores de calibración y predicción obtenidos para las diferentes arquitecturas investigadas para el Cu(II), incluyendo diferentes números de neuronas de entrada.

El mínimo error para la predicción se obtuvo con una arquitectura 4:2:1 para la cual el error de calibración también resultó mínimo, por lo cual fue la arquitectura seleccionada. El esquema de la arquitectura óptima para Cu(II) se muestra en la Figura 3.17. Los valores de los parámetros μ y η óptimos para este caso resultaron 0.5 y 0.5, para el rango completo de sensores. Para la selección del mejor número de interacciones o épocas de entrenamiento se construyeron las curvas de valores RMSE en función del número de épocas para la arquitectura seleccionada (Figura 3.18) El mínimo RMSEP fue detectado a 4184 épocas para las cuales el error relativo de predicción porcentual, REP%, fue de 1.06.

Tabla 3.13: Valores RMSEC y RMSEP para diferentes arquitecturas para Cu(II)

Arquitectura	RMSEC	RMSEP
2:2:1	0.09	0.07
3:2:1	0.11	0.03
4:2:1	0.04	0.02
5:2:1	0.11	0.03
6:2:1	0.07	0.08
4:3:1	0.12	0.06
4:4:1	0.12	0.07
4:5:1	0.09	0.04
4:6:1	0.19	0.09

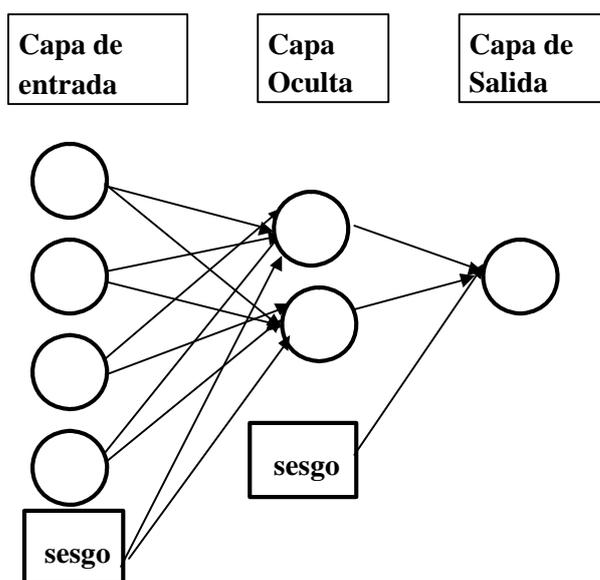


Figura 3.17: Arquitectura de la red de calibración para Cu(II)

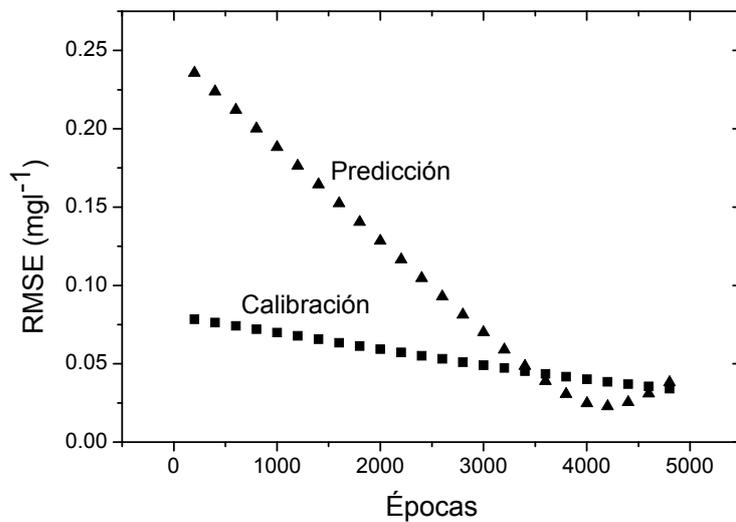


Figura 3.18: Evolución de los valores RMSEC y RMSEP

En la Tabla 3.14 se muestran los menores valores de errores obtenidos para diferentes arquitecturas investigadas para el Ni(II) siguiendo la misma estrategia de optimización.

Tabla 3.14: Valores RMSEC y RMSEP para diferentes arquitecturas para Ni(II)

Arquitectura	RMSEC	RMSEP
2.2.1	0.39	0.27
3:2:1	0.35	0.04
4:2:1	0.48	0.07
5:2:1	0.25	0.58
6:2:1	0.94	0.91
3:3:1	0.23	0.23
3:4:1	0.25	0.14
3:5:1	0.21	0.38
3:6:1	0.24	0.28

El mínimo error para la predicción se obtuvo con una arquitectura 3:2:1 para la cual el error de calibración que se obtuvo fue cercano al mínimo, por lo cual fue la arquitectura seleccionada. En este caso los valores de los parámetros μ y η fueron de 0.6 y 0.4, respectivamente, para el rango completo de sensores. El error mínimo en la predicción se obtuvo para 455 épocas (Figura 3.19), con un error relativo de predicción porcentual de 1.26. Para ambos casos, Cu(II) y Ni(II) se evaluaron también todas las posibles combinaciones de números de nodos de ambas capas, pero no se logró obtener valores menores de RMSEP y de RMSEC.

En la Tabla 3.15 se resumen los óptimos para los parámetros utilizados para la construcción de los modelos ANNs.

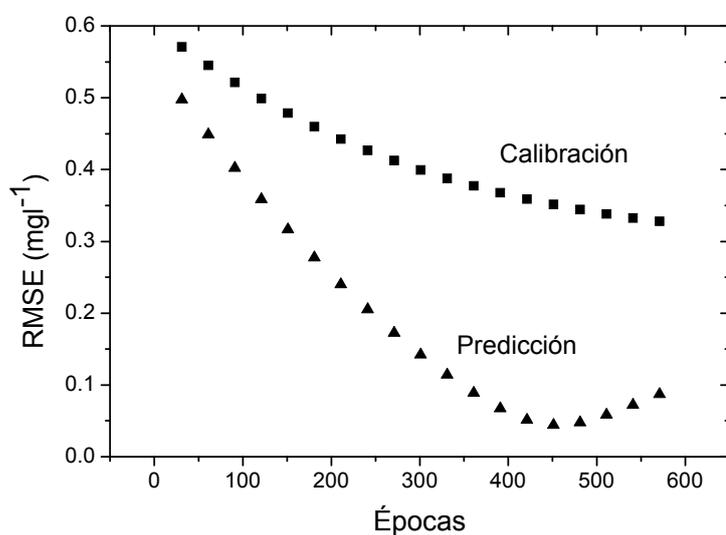


Figura 3.19: Evolución de los valores RMSEC y RMSEP

Tabla 3.15: Parámetros optimizados para la construcción de los modelos ANNs

Parámetros	Analito	
	Cu(II)	Ni(II)
Nodos en capa de entrada	4	3
Nodos en capa oculta	2	2
Nodos en capa de salida	1	1
Velocidad de aprendizaje	0.5	0.4
Momento	0.5	0.6
Función de transferencia en la capa de entrada	Lineal	Lineal
Función de transferencia en las capas oculta y de salida	Sigmoidea	Sigmoidea
Número de épocas	4184	455

La Figura 3.20(a) y 3.20(b) resumen las concentraciones predichas por las redes optimizadas vs. las concentraciones nominales para los conjuntos de muestras de entrenamiento y de monitoreo.

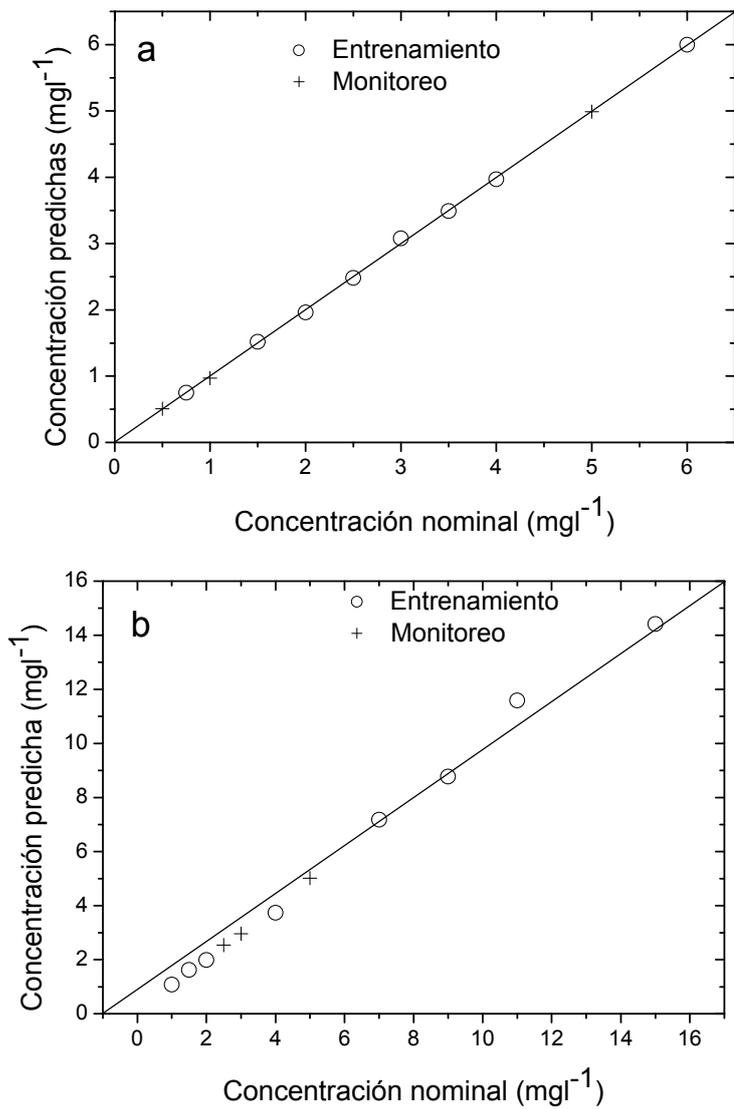


Figura 3.20: Concentraciones predichas por los modelos ANNs optimizados vs. concentraciones nominales para (a) Cu(II) y (b) Ni(II)

3.4.3.4 Validación de los modelos ANNs

3.4.3.4.1 Estudios de exactitud

Los modelos ANNs optimizados para cada analito se aplicaron para la predicción de las concentraciones de los componentes en muestras de validación sintéticas. Para este propósito, se realizaron determinaciones por triplicado sobre cada muestra utilizando el método en estudio. A los fines de

comparar los resultados con un método de referencia se realizaron tres determinaciones para cada muestra utilizando la técnica de espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3.16. Como se describió en 3.4.2.1.3, la manera más conveniente de establecer la presencia o ausencia de errores en la determinación es construir la elipse para la región de confianza conjunta (EJCR) para la pendiente (β) y la intersección (α) verdaderas de acuerdo a la ecuación (3.27). El método EJCR fue aplicado a los resultados de la Tabla 3.16, y se concluyó que el método cinético-ANNs no evidencia presencia de errores al ser comparado con FAAS cuando es aplicado para la determinación de los dos cationes, ya que ambas elipses contienen el valor (1,0) (Figura 3.21).

3.4.3.4.2 Estudios de precisión: repetitividad y reproducibilidad

Usualmente se distinguen dos tipos extremos de precisión, llamados repetitividad y reproducibilidad [202]. La repetitividad es la precisión obtenida en las mejores circunstancias posibles: con el mismo analista, mediciones en el mismo día, con el mismo instrumento. La reproducibilidad es la precisión obtenida en las circunstancias más adversas, es decir, con laboratorios, analistas, instrumentos diferentes. Ocurren también situaciones intermedias.

En un estudio colaborativo auspiciado por la Internacional Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) [203] se definen los estimadores preliminares de precisión. Entre ellos, se define la desviación estándar total dentro del laboratorio.

Tabla 3.16: Valores de concentración de Cu(II) y Ni(II) determinados con los métodos cinético-ANNs y FAAS para los conjuntos de validación

Analito	FAAS ^a		Método cinético-ANNs	
	(mg l ⁻¹)		(mg l ⁻¹)	
	Concentración	Desviación	Concentración	Desviación
	promedio	estándar	promedio	estándar
	(C _{pred,FAAS})		(C _{pred,FAAS})	
Cu(II)	0.53	0.016	0.59	0.020
	1.34	0.002	1.26	0.024
	2.20	0.012	2.22	0.018
	2.74	0.014	2.64	0.036
	4.63	0.014	4.44	0.051
Ni(II)	1.20	0.006	1.10	0.012
	1.70	0.013	1.52	0.014
	2.05	0.020	2.33	0.027
	2.70	0.038	2.79	0.042
	3.63	0.025	3.56	0.038
	4.51	0.045	4.53	0.108

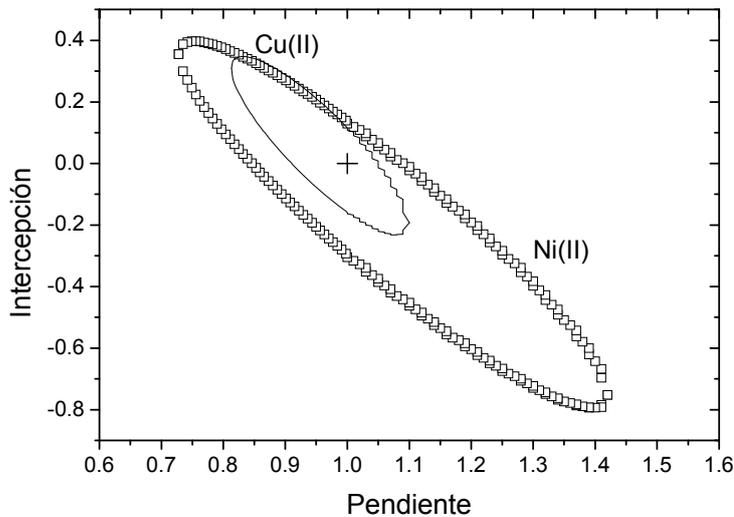


Figura 3.21: Región de confianza conjunta elíptica para la pendiente y la intersección de la regresión de concentraciones predichas vs. concentraciones de referencia. La cruz indica el punto teórico (1,0).

Esta desviación incluye dos tipos de variaciones: la variación dentro de la corrida (repetitividad) y la variación entre corridas. Esta última se refiere a mediciones realizadas en días diferentes y preferiblemente utilizando diferentes curvas de calibración. La desviación estándar total dentro del laboratorio puede considerarse como una reproducibilidad intra-laboratorio. Estos estimadores son preliminares dentro de un contexto de estudio interlaboratorial de características de *performance* de un método. La Internacional Organization for Standardization (ISO) [204] también da definiciones en este contexto. Considera que un laboratorio no puede determinar reproducibilidad como tal, porque esto debe realizarse con experimentos interlaboratoriales, pero si puede determinar una precisión intermedia (intermedia entre repetitividad y reproducibilidad).

Para la determinación de los estimadores de repetitividad y precisión intermedia del método en estudio el experimento básico consistió en la medición de cinco réplicas durante tres días consecutivos de una solución estándar del analito. Se utilizaron soluciones estándar de concentraciones de 2.75 y 3.5 mg l⁻¹ para Cu(II) y Ni(II), respectivamente.

Los resultados obtenidos a partir de este experimento fueron analizados mediante un Análisis de Variancia (ANOVA). En la Tabla 3.17.se muestran los valores de cuadrados totales, cuadrados medios y valores F provenientes de ANOVA para ambos cationes.

El valor del cuadrado medio residual (llamado en la tabla cuadrado medio dentro de los días) estima la variancia residual bajo condiciones de repetitividad (s_r^2). Para determinar la variancia debida al efecto entre días se aplica la ecuación ((3.30)

$$s_{entre}^2 = (MS_{entre} - MS_{dentro}) / n_j \quad (3.30)$$

La reproducibilidad intra-laboratorio (s_{WR}^2) se estima a partir de la ecuación (3.31)

$$s_{WR}^2 = s_r^2 + s_{entre}^2 \quad (3.31)$$

Los estimadores de los parámetros de precisión para el método cinético-ANNs para ambos cationes, que se obtuvieron a partir de los resultados de ANOVA y la aplicación de las ecuaciones (3.30) y (3.31) se resumen en la Tabla 3.18

Tabla 3.17: Tabla ANOVA para estudios de repetitividad y reproducibilidad intra-laboratorio

Analito	Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	gl	Cuadrado Medio (MS)	Relación F	Valor p
Cu(II)	Entre días	0.008	2	0.004	2.73	0.105
	Dentro de los días	0.019	12	0.002		
	Total	0.027	14			
Ni(II)	Entre días	0.010	2	0.005	2.61	0.115
	Dentro de los días	0.023	12	0.002		
	Total	0.033	14			

Tabla 3.18: Estimaciones de repetitividad y reproducibilidad intermedia

	Cu(II)	Ni(II)
Desviación estándar de repetitividad (mg l ⁻¹)	0.039	0.044
Desviación estándar de reproducibilidad intermedia (mg l ⁻¹)	0.046	0.051

3.4.3.4.3 Frecuencia Analítica

En la metodología de flujo detenido empleada en este trabajo, la muestra permanece en la celda de flujo un período lo suficientemente largo para producir contaminación de las paredes internas de la celda de cuarzo. Es bien conocido que los iones metálicos pueden ser fácil y rápidamente adsorbidos sobre grupos superficiales de silanoles deprotonados (es decir bajo condiciones básicas) [205]. Estos cationes [por ejemplo Cu(II) y Ni(II)] pueden acumularse a lo largo de sucesivas corridas, y fueron los responsables de un corrimiento de la señal analítica detectada en este trabajo cuando no se aplicó

un proceso de limpieza de la celda. Debido a esto, es necesario después de cada determinación la aplicación de un paso de limpieza involucrando una solución ácida capaz de regenerar los grupos silanoles, a fin de remover los cationes adsorbidos sobre la superficie interna de la pared de la celda de cuarzo. Este proceso de limpieza es el que determina la frecuencia analítica del método. A través de diferentes experiencias encontramos que una solución de HCL (1:1) fue capaz de remover efectivamente los cationes Cu(II) y Ni(II) en un tiempo de 1.5 y 4.5 min, respectivamente. Luego de estas etapas de limpieza, se incorporó un período de enjuague de la celda de 1 min. De esta manera, las frecuencias analíticas para Cu(II) y Ni(II) resultaron de 8 y 6 muestras h^{-1} , respectivamente.

3.4.3.5 Predicciones sobre muestras reales con los modelos ANNs

La metodología propuesta fue aplicada a dos soluciones de electroplatinado provenientes de una industria local conteniendo Cu(II) o Ni(II). Se realizó un pretratamiento de dilución sobre ambas muestras a fin de que las concentraciones de los analitos se encuentren en el rango de calibración estudiado. También fueron analizadas muestras diluídas adicionadas para realizar estudios de recuperación.

Los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos usando la técnica FAAS como método de referencia. La Tabla 3.19 muestra los resultados y los valores t indican que en ningún caso existen diferencias significativas entre los valores de concentraciones determinados por ambas metodologías, a un nivel de significancia del 5%.

Tabla 3.19: Determinación de Cu(II) y Ni(II) en muestras de baños de electroplatinado

Analito	Muestra ^a	FAAS (n = 4)		Método cinético- ANNs (n = 4)		t
		Media (mg l ⁻¹)	RSD (%)	Media (mg l ⁻¹)	RSD (%)	
Cu(II)	Muestra diluida ^b	0.700	1.60	0.686	2.90	1.23
	Muestra diluida adicionada ^c	2.19	0.27	2.24	2.40	1.84
	Recuperación (%)	99.3		103		
Ni(II)	Muestra diluida ^b	2.71	3.02	2.76	6.09	0.536
	Muestra diluida adicionada ^c	5.21	1.04	5.24	2.06	0.493
	Recuperación (%)	100		99.2		

^a Provista por la Compañía Cromados S.A., Santa Fe, Argentina.

^b Factor de dilución de 1:40,000 para Cu(II) y 1:20,000 para Ni(II).

^c Muestra adicionada a 1.5 mg l⁻¹ para Cu(II) y a 2.5 mg l⁻¹ para Ni(II).

3.5 Conclusiones

Los datos multivariados correspondientes a los vectores de absorbancia en el tiempo obtenidos experimentalmente fueron analizados mediante diferentes métodos de calibración multivariada. En la tabla 3.20 se compara la habilidad predictiva de estos métodos a través de los valores RMSEP y REP% obtenidos para los conjuntos de muestras seleccionadas como muestras de monitoreo.

Para ambos cationes, estos valores fueron considerablemente menores cuando se utilizó ANNs como técnica de calibración. Los modelos ANNs

construidos fueron validados en términos de exactitud y precisión y se utilizaron para la determinación de Cu(II) y Ni(II) en muestras reales acuosas obteniéndose resultados comparables con los obtenidos utilizando el método de referencia.

Tabla 3.20: Errores cuadráticos medios y errores relativos % de los modelos multivariados

Analito	PCR		PLS-1		ANNs	
	RMSEP	REP%	RMSEP	REP%	RMSEP	REP%
	(mg l ⁻¹)		(mg l ⁻¹)		(mg l ⁻¹)	
Cu(II)	0.37	17.2	0.37	17.2	0.02	1.06
Ni(II)	1.55	44.3	1.46	41.8	0.04	1.26

En comparación con el estudio desarrollado en el Capítulo 2, se concluyó que tanto el método determinístico basado en un modelo autocatalítico, como el método quimiométrico basado en la calibración con ANNs, resultaron igualmente confiables para la determinación de ambos analitos en muestras acuosas.

Capítulo 4

Determinación cinética espectrofotométrica de Cu(II) y Ni(II) en mezclas

4.1 Introducción

Cuando los analitos Cu(II) y Ni(II) se encuentran presentes en mezclas, ambos actúan como catalizadores de la misma reacción, con reactivos y productos comunes, por lo cual no es factible su cuantificación simultánea con métodos basados en el equilibrio. La determinación simultánea se basa entonces en las diferencias de los perfiles cinéticos característicos para cada catalizador. Estas diferencias pueden ser visualizadas en la Figura 2.1.

Como ya fuera mencionado en capítulos anteriores, los métodos de cuantificación utilizados para la determinación cinética espectrofotométrica de mezclas pueden ser divididos en dos grandes grupos: métodos determinísticos o paramétricos, también denominados *hard-modeling*, y métodos quimiométricos, o *soft-modeling*.

Ambos métodos se describieron en los capítulos 2 y 3 y se aplicaron para la determinación de las especies catalíticas Cu(II) y Ni(II) en soluciones acuosas conteniendo alternativamente uno de los dos analitos.

En este capítulo el estudio se enfoca a la determinación cinética espectrofotométrica simultánea de los analitos Cu(II) y Ni(II). El sistema químico en el que se basa la determinación es la reducción catalítica de resazurina con sulfuro de sodio en medio alcalino ya descrita en los capítulos anteriores.

4.2 Optimización de condiciones experimentales

4.2.1 Variables inherentes al sistema FIA

La configuración del sistema de inyección en flujo con modo detenido y las variables experimentales relativas a su funcionamiento fueron las utilizadas

para la determinación de una única especie, las cuales se optimizaron de acuerdo a los criterios ya descritos en el capítulo 1.

4.2.2 Variables Fisicoquímicas

4.2.2.1 Criterio de optimización

Las variables fisicoquímicas se optimizaron utilizando el criterio de máxima selectividad. Este criterio se seleccionó con el objeto de trabajar en las condiciones en las cuales se presentan las máximas diferencias en los perfiles de respuesta de ambos cationes en las mezclas. Para seleccionar las condiciones que cumplan con esta característica se midió el grado de solapamiento de los perfiles experimentales de cada analito a cada una de las condiciones experimentales determinadas a partir de un diseño de experimentos. El grado de solapamiento se obtuvo a partir de la medida del ángulo entre los perfiles de ambos analitos en cada caso. El coseno del ángulo entre ambos perfiles se obtuvo aplicando la ecuación (4.1).

$$\cos\theta = \frac{\text{Cu} \times \text{Ni}}{\sqrt{\text{Cu} \times \text{Cu}} \sqrt{\text{Ni} \times \text{Ni}}} \quad (4.1)$$

4.2.2.2 Diseño Central Compuesto

Se seleccionaron como variables de optimización las concentraciones de los reactivos, sulfuro de sodio y resazurina, y la temperatura del baño del reactor de mezcla. Para evitar problemas de precipitación en el sistema FIA debidos a la coexistencia de los analitos, evitando la necesidad de establecer un rango de concentraciones muy estrecho, se propuso la no adición de hidróxido de sodio a la solución de sulfuro. Se verificó previamente que la reacción indicadora ocurra en ausencia de hidróxido, la cual procedió

normalmente ya que las condiciones de alcalinidad en el medio de reacción fueron provistas por la solución de sulfuro de sodio.

Los límites seleccionados en el diseño para cada variable se muestran en la Tabla 4.1.

En la Tabla 4.2 se presenta el diseño central compuesto inscripto rotatable utilizado para la optimización de las tres variables seleccionadas. La variable respuesta a maximizar (incluida en la Tabla 4.2) fue el ángulo entre los perfiles cinéticos de ambos cationes para cada condición emergente del diseño de experimentos. Las concentraciones utilizadas en estas experiencias para los cationes Cu(II) y Ni(II) fueron 6 mg l^{-1} y 5 mg l^{-1} , respectivamente.

Tabla 4.1: Límites operativos del diseño

Variable	Límite Inferior	Límite Superior
Na ₂ S	0.4% (m/v)	1% (m/v)
Resazurina	30 mg l ⁻¹	45 mg l ⁻¹
Temperatura reactor de mezcla	34°C	44°C

Las condiciones de mínimo solapamiento: 1% (m/v) de sulfuro, 37.5 mg l^{-1} de resazurina y 39 °C de temperatura, se seleccionaron para la determinación simultánea de los cationes Cu(II) y Ni(II).

Tabla 4.2: Diseño Central Compuesto rotatable inscripto para las tres variables seleccionadas

Concentración Sulfuro (% m/v)	Concentración Resazurina (mg l ⁻¹)	Temperatura (°C)	Ángulo entre los dos perfiles (°)
0.4	37.5	39	3.47
1	37.5	39	15.24
0.7	30.0	39	12.41
0.7	45.0	39	7.53
0.7	37.5	34	10.98
0.7	37.5	44	11.29
0.52	33.0	36	5.20
0.88	33.0	36	13.37
0.52	42.0	36	3.88
0.88	42.0	36	11.53
0.52	33.0	42	5.31
0.88	33.0	42	4.88
0.52	42.0	42	2.81
0.88	42.0	42	13.74
0.7	37.5	39	10.79
0.7	37.5	39	11.15

4.3 Diseño de muestras de calibración

Se prepararon tres conjuntos de mezclas de calibración basados en diferentes criterios de diseño. En todos los casos se incluyó un conjunto de mezclas de validación. Las características de cada uno de los diseños de mezclas utilizados se describen en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Diseños utilizados para preparación de las mezclas de calibración y validación

Tipo de Diseño	Límites de concentración (mg l ⁻¹)		Número de mezclas de calibración	Número de mezclas de validación
	Cu(II)	Ni(II)		
Aleatorio	0.1-8.0	0.5-8.0	25	5
Normalizado				
Totalmente aleatorio	0.5-5.0	0.5-6.0	40	5
Diseño factorial	0-2.25	0-2.5	35	5

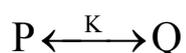
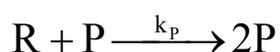
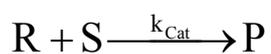
4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Método paramétrico de cuantificación

4.4.1.1 Estimación de los parámetros cinéticos

De acuerdo a los resultados obtenidos para el estudio cinético presentado en el Capítulo 2 para cada una de las especies catalizadoras en forma individual, el modelo seleccionado para la reacción de reducción de resazurina fue el modelo autocatalítico y sobre él se basó el estudio para las mezclas de catalizadores.

Las reacciones correspondientes a este modelo son:



donde cada una de las constantes involucradas fueron definidas y calculadas de la manera descrita en el Capítulo 2.

Para el caso específico de mezclas de catalizadores, la constante de velocidad para la primera reacción del mecanismo propuesto engloba la contribución de cada uno de los catalizadores y debe considerarse además la presencia de un efecto sinérgico, el cual se evidencia en la Figura 4.1

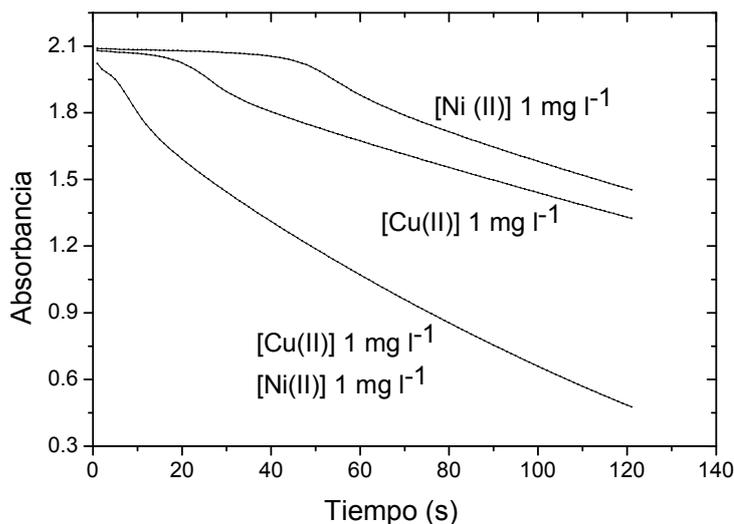


Figura 4.1: Efecto sinérgico sobre la velocidad de reacción de reducción debido a la coexistencia de los catalizadores Cu(II) y Ni(II) en la mezcla

[

De esta manera, la constante k_{cat} obtenida fue expresada con el siguiente modelo aditivo, no lineal:

$$k_{Cat} = k_{Cu} [Cu]^{n_1} + k_{Ni} [Ni]^{n_2} + k_s ([Cu][Ni])^{n_s} \quad (4.2)$$

donde k_{Cu} y k_{Ni} son las constantes aparentes de velocidad catalítica debidas al Cu(II) y al Ni(II), respectivamente, k_s es la constante aparente de velocidad debida al efecto sinérgico, n_1 , n_2 , y n_s son los órdenes correspondientes a cada término.

El modelo autocatalítico se aplicó sobre los tres diseños de mezclas descritos en la Tabla 4.3 y los valores obtenidos para k_{cat} se modelaron de acuerdo a la ecuación (4.2). Los mejores resultados se obtuvieron para el diseño factorial y son los que se discuten a continuación.

Las concentraciones de los analitos en las mezclas de calibración utilizadas en este estudio se detallan en la Tabla 4.4.

Al igual que en el caso estudiado en el Capítulo 2, con los analitos participando individualmente en la reacción, los valores predichos para las constantes k_p y k_d no mostraron variación entre las diferentes mezclas, confirmando que los cationes no actúan como catalizadores en estos pasos de reacción.

En la Figura 4.2 se muestran los valores de las constantes k_p y k_d predichos para las muestras de calibración. El valor promedio obtenido para k_p fue $2.8 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y para k_d $1.5 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$, muy similares a los obtenidos en el Capítulo 2 ($2.5 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $1.5 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente).

Los valores obtenidos para k_{cat} mostraron variaciones con las muestras de calibración utilizadas. Dichos valores se modelaron de acuerdo a la ecuación (4.2) aplicando una rutina de regresión no lineal para múltiples factores del paquete estadístico Statgraphics que utiliza un algoritmo basado en el método de Marquardt.

Los valores de k_{Cu} , k_{Ni} , n_1 y n_2 utilizados en el modelado fueron los obtenidos para las especies individuales (Capítulo 2).

Tabla 4.4: Concentraciones de las mezclas de calibración utilizadas para la estimación de los parámetros cinéticos

Número de Mezcla	Concentración de Cu(II) (mg l^{-1})	Concentración de Ni(II) (mg l^{-1})
1	1,75	0
2	2.25	0
3	0	2.00
4	0	2.50
5	0.25	0.50
6	0.25	1.00
7	0.25	1.50
8	0.25	2.00
9	0.25	2.50
10	0.75	0.50
11	0.75	1.00
12	0.75	1.50
13	0.75	2.00
14	0.75	2.50
15	1.25	0.50
16	1.25	1.00
17	1.25	1.50
18	1.25	2.50
19	1.75	0.50
20	1.75	1.00
21	1.75	1.50
22	1.75	2.00
23	1.75	2.50
24	2.25	0.50
25	2.25	1.00
26	2.25	1.50
27	2.25	2.00
28	2.25	2.50

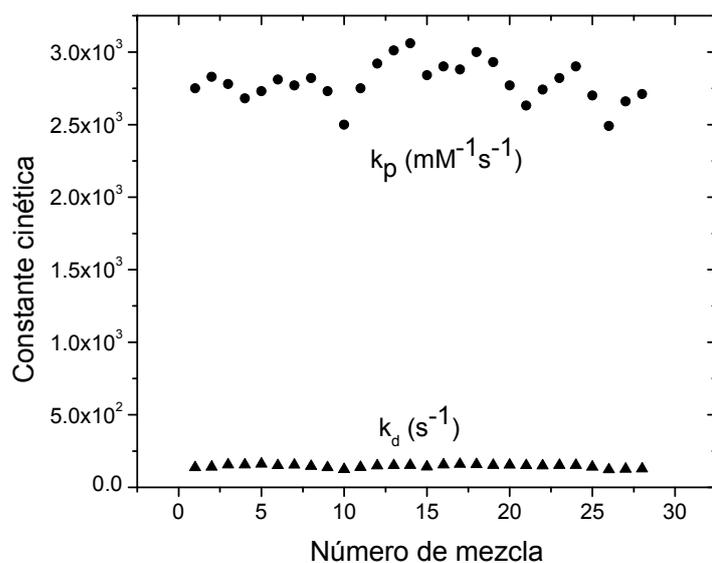


Figura 4.2: Constantes cinéticas k_p y k_d predichas para las mezclas de calibración

Los estimadores iniciales de los parámetros para el modelado de k_{Cat}

fueron:

$$k_s = 0.001$$

$$n_s = 1.5$$

Se requirieron 5 iteraciones para alcanzar el error tolerable predefinido en la rutina. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.5 y 4.6:

Tabla 4.5: Valores resultantes de la estimación

Parámetro estimado	Estimador	Error estándar	Intervalo de confianza para el 95%	
			Inferior	Superior
k_s ($\text{mM}^{-0.5} \text{s}^{-1}$)	0.0020	0.0003	0.0014	0.0025
n_s	1.76	0.09	1.58	1.94

El coeficiente de correlación, R^2 ajustado para los grados de libertad, resultó 96.95% y los valores que se muestran en la Tabla 4.6 son indicadores de la significancia del modelo.

Tabla 4.6: Análisis de Variancia

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio
Modelo	0.00440	2	0.002200
Residual	0.00008	26	0.000003
Total	0.00448	28	
Total (Corregido)	0.00300	27	

De esta manera la constante cinética k_{cat} resultante para el modelo autocatalítico presentó una dependencia con la concentración de los analitos que se expresa de acuerdo a la ecuación 4.2, donde los valores k_{Cu} , k_{Ni} , n_1 , y n_2 estimados en el Capítulo 2 son $1.2 \times 10^{-6} \text{ mM}^{-5} \text{ s}^{-1}$, $3.7 \times 10^{-10} \text{ mM}^{-5} \text{ s}^{-1}$, 4 y 4, respectivamente, y los valores k_s y n_s son los de los estimadores que se muestran en la Tabla 4.5.

En la Figura 4.3 se visualiza el alto grado de concordancia entre los valores de k_{cat} observados y aquellos obtenidos con el modelo obtenido.

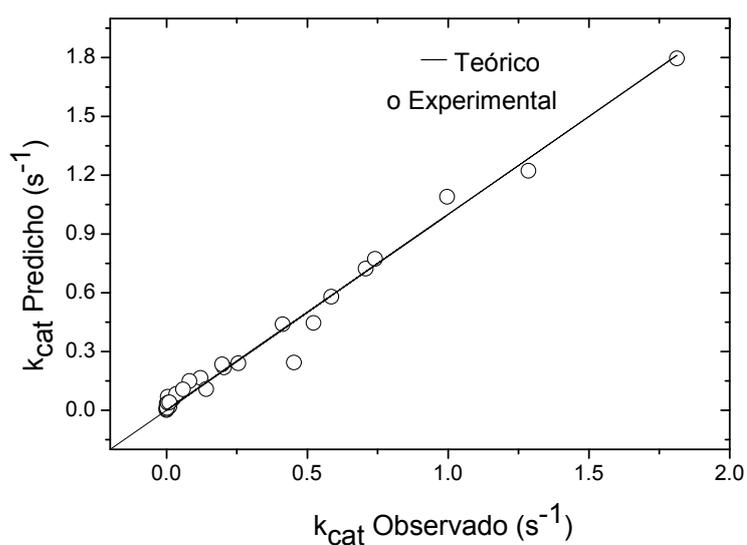


Figura 4.3: Valores de k_{cat} predichos por el modelo en función del valor de k_{cat} observado

Los valores obtenidos para k_i también mostraron variación para las distintas muestras de calibración y se modelaron de acuerdo a la ecuación (4.3):

$$k_i = 0.148 ([Cu] + [Ni])^{0.5} + k_{is} ([Cu][Ni])^{n_{is}} \quad (4.3)$$

donde el valor 0.148 corresponde a la constante intrínseca calculada en el Capítulo 2 con unidades $\text{mM}^{-5} \text{s}^{-1}$, para los cationes actuando individualmente, con un orden de reacción igual a 0.5.

Para obtener los estimadores de los parámetros k_{is} y n_{is} se utilizó la misma rutina de regresión no lineal para múltiples factores del paquete estadístico Statgraphics.

Los estimadores iniciales de los parámetros fueron:

$$k_{is} = 0.1$$

$$n_{is} = 0.5$$

Los resultados obtenidos con 7 iteraciones para alcanzar el error tolerable predefinido en la rutina se muestran en las Tablas 4.7 y 4.8:

Tabla 4.7: Valores resultantes de la estimación

Parámetro estimado	Estimador	Error estándar	Intervalo de confianza para el 95%	
			Inferior	Superior
$k_{is} (\text{mM}^{-1.8} \text{s}^{-1})$	1.0737	0.0769	0.9115	1.2359
n_{is}	0.91	0.11	0.69	1.13

Los valores que se muestran en la Tabla 4.8 son indicadores de la significancia del modelo. El coeficiente de correlación, R^2 ajustado para los grados de libertad, resultó 90.9%.

Tabla 4.8: Análisis de Variancia

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado Medio
Modelo	30.4650	2	15.2320
Residual	1.0202	17	0.0600
Total	31.4850	19	
Total (Corregido)	11.9310	18	

De esta manera la constante cinética k_i resultante para el modelo autocatalítico presentó una dependencia con la concentración de los analitos que se expresa de acuerdo a la ecuación 4.3, donde los valores k_{is} y n_{is} son los de los estimadores que se muestran en la Tabla 4.7.

En la Figura 4.4 se visualiza la concordancia entre los valores de k_i observados y aquellos obtenidos con el modelo.

4.4.1.2 Predicciones basadas en el método paramétrico de cuantificación

Para la cuantificación simultánea de los dos analitos en mezclas, utilizando las ecuaciones (4.2) y (4.3) obtenidas previamente, se plantearon dos posibilidades.

En ambos casos fue necesaria la resolución de dos ecuaciones simultáneas mediante un programa de cálculo.

La primera metodología consistió en utilizar los valores de las dos constantes dependientes de la concentración de los analitos (k_{cat} y k_i) obtenidos durante el modelado de la muestra a predecir.

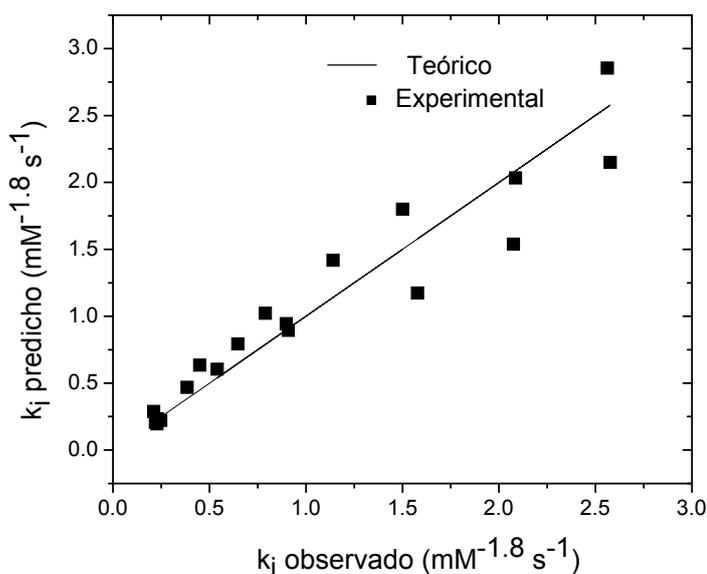


Figura 4.4: Valores de k_i predichos por el modelo en función del valor de k_i observado

La otra alternativa fue plantear dos ecuaciones simultáneas con los valores de las constantes k_{cat} resultantes del modelado de la solución a predecir y de la misma solución adicionada con una concentración conocida de ambos cationes.

Para el primer caso las ecuaciones simultáneas utilizadas fueron:

$$k_{Cat} = 1.2 \times 10^{-6} [Cu]^4 + 3.710^{-10} [Ni]^4 + 2 \times 10^{-3} ([Cu][Ni])^{1.76} \quad (4.4)$$

$$k_i = 0.148 ([Cu] + [Ni])^{0.5} + 1.0737 ([Cu][Ni])^{0.91} \quad (4.5)$$

que son las ecuaciones (4.2) y (4.3) con los valores de las constantes obtenidas en el modelado. En la Tabla 4.9 se muestran los resultados

obtenidos en la predicción de la concentración de los analitos en tres mezclas sintéticas y los errores porcentuales relativos de concentración resultantes.

Tabla 4.9: Concentraciones predichas para las muestras de predicción utilizando las constantes k_{Cat} y k_i

[Cu(II)] real (mg l ⁻¹)	[Cu(II)] predicha (mg l ⁻¹)	[Ni(II)] real (mg l ⁻¹)	[Ni(II)] predicha (mg l ⁻¹)
1.00	1.70	0.75	0.32
1.50	1.44	1.75	1.81
1.00	1.50	2.25	0.72
REP% = 42.7		REP% = 58.0	

Para el segundo caso las ecuaciones simultáneas utilizadas fueron:

$$k_{\text{Cat}} = 1.2 \times 10^{-6} [\text{Cu}]^4 + 3.7 \times 10^{-10} [\text{Ni}]^4 + 2 \times 10^{-3} ([\text{Cu}][\text{Ni}])^{1.76} \quad (4.6)$$

$$k_{\text{Cat}} = 1.2 \times 10^{-6} [\text{Cu} + \text{Cu}_{\text{ad}}]^4 + 3.7 \times 10^{-10} [\text{Ni} + \text{Ni}_{\text{ad}}]^4 + 2 \times 10^{-3} ([\text{Cu} + \text{Cu}_{\text{ad}}][\text{Ni} + \text{Ni}_{\text{ad}}])^{1.76} \quad (4.7)$$

donde se reemplazaron en la ecuación (4.2) los valores de las constantes obtenidas en el modelado y Cu_{ad} y Ni_{ad} son las concentraciones de los cationes utilizadas en la adición.

En la Tabla 4.10 se muestran los resultados obtenidos en la predicción de la concentración de los analitos en tres mezclas sintéticas y los errores porcentuales relativos de concentración resultantes.

Tabla 4.10: Concentraciones predichas para las muestras de predicción utilizando muestras adicionadas

[Cu(II)] real (mg l ⁻¹)	[Cu(II)] predicha (mg l ⁻¹)	[Ni(II)] real (mg l ⁻¹)	[Ni(II)] predicha (mg l ⁻¹)
1.00	1.22	0.75	0.23
1.50	2.19	1.75	0.86
1.00	1.49	2.25	1.49
REP% = 43.3		REP% = 46.7	

Como se observa en las Tablas 4.9 y 4.10, las dos alternativas utilizadas para la predicción produjeron errores relativos porcentuales elevados. Si bien el método determinístico basado en el cálculo de constantes cinéticas resultó confiable para la cuantificación de los analitos separadamente, como se discutió en el Capítulo 2, se observa aquí que las imprecisiones que surgen en el cálculo de estas constantes para sistemas conteniendo ambos analitos se traducen en elevados errores de predicción, lo cual hace que este método no resulte adecuado para estos casos.

4.4.2 Métodos multivariados quimiométricos de cuantificación

Sobre los resultados provenientes de los tres diseños de mezclas de calibración y validación para Cu(II) y Ni(II) descritos en la Tabla 4.3 se construyeron modelos de regresión multivariada con los métodos PLS-1 y ANNs.

La respuesta utilizada para cada muestra en la calibración fue el perfil cinético (absorbancia de la resazurina vs. tiempo) obtenido durante un tiempo de reacción de 120 s.

4.4.2.1 Modelos de regresión por cuadrados mínimos parciales

4.4.2.1.1 Construcción de los modelos PLS

Para la construcción de los modelos PLS se utilizó la rutina MVC1 desarrollada en MatLab 7.0 [200]. Se aplicó el siguiente procedimiento:

Se utilizaron los perfiles cinéticos completos a partir de los cuales se seleccionó el número óptimo de factores. Dicha selección se basó en el uso del método de validación cruzada [9].

Se eliminaron de la calibración aquellas muestras denominadas *outliers* [9].

Se aplicó la estrategia de la ventana móvil para seleccionar la región que condujo al mejor modelo de calibración [200].

Se obtuvo el modelo final de calibración

El modelo obtenido se aplicó para la predicción de la concentración de los analitos en las muestras de validación.

4.4.2.1.1.1 Diseño aleatorio normalizado

Se aplicó el modelo PLS sobre las 25 muestras asignadas a la calibración.

Los perfiles preprocesados para las muestras de calibración y de validación se muestran en la Figura 4.5.

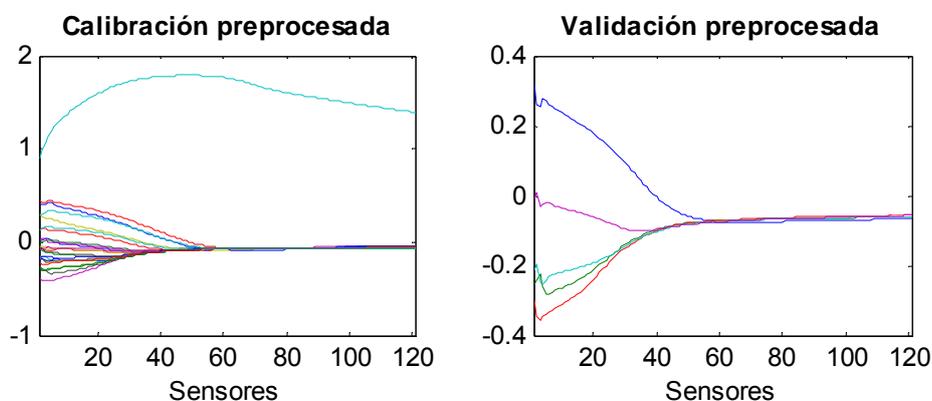


Figura 4.5: Perfiles centrados de las muestras de calibración y validación

Los resultados de validación cruzada con el método PLS que se muestran en la Tabla 4.11 indican que el mejor ajuste se obtuvo para dos factores en el caso del Cu(II) y para el Ni(II) se observa una falta de ajuste para todos los casos.

Se evaluó que muestras son consideradas *outliers* para dos componentes para el modelo PLS del Cu(II) y para un único componente en el caso del Ni(II).

En la Figura 4.6 se grafican las relaciones F que son las relaciones entre el error cuadrático de predicción para la muestra eliminada de la calibración y el error cuadrático de predicción promedio. En la figura también se grafican los residuos para cada una de las muestras de calibración.

Tabla 4.11: Resultados de la calibración con el método de validación cruzada

Componente	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
Cu(II)						
1	71.27	5.27	0.99	1.69	41.06	-1.77
2	13.52	1.00	0.50	0.77	17.89	0.47
3	194.18	0	0	8.81	214.33	-74.52
4	764.95	0	0	17.49	425.40	-296.48
5	293.52	0	0	10.84	263.51	-113.15
Ni(II)						
1	44.76	1.00	0.50	1.34	31.33	-0.15
2	496.58	0	0	4.46	104.35	-11.73
3	1701.30	0	0	26.09	610.76	-43.532
4	7655.20	0	0	55.34	1295.60	-196.23
5	12127.00	0	0	69.65	1630.60	-310.92

Como se ve en la Figura 4.6, las muestras 4, 5 y 6 son consideradas *outliers* para el modelo PLS para Cu(II). Para el Ni(II) las muestras a excluir en la calibración son las 4,6 y 22, y se requirieron 3 factores.

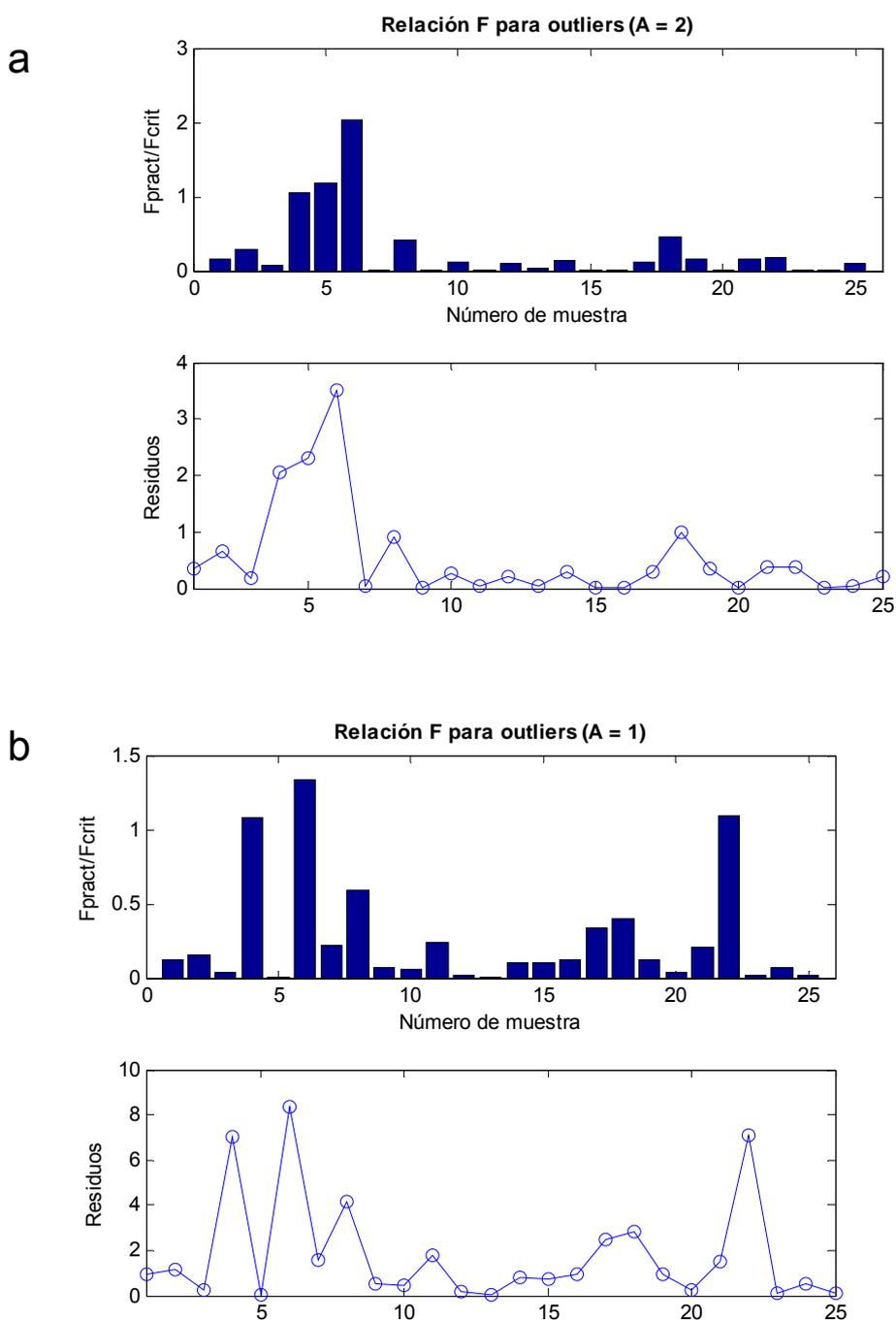


Figura 4.6: Relación F y residuos espectrales de las muestras de calibración para el modelo PLS. Cu(II) (a) Cu(II), (b) Ni(II)

Excluyendo las muestras correspondientes a cada modelo se evaluó la zona de mínimo error para cada caso. Esta resultó entre 21 y 120 (Figura 4.7) para el Cu(II). En el caso del Ni(II) no se logró una disminución de los errores con la reducción de la zona de trabajo por lo cual se trabajó con el perfil completo.

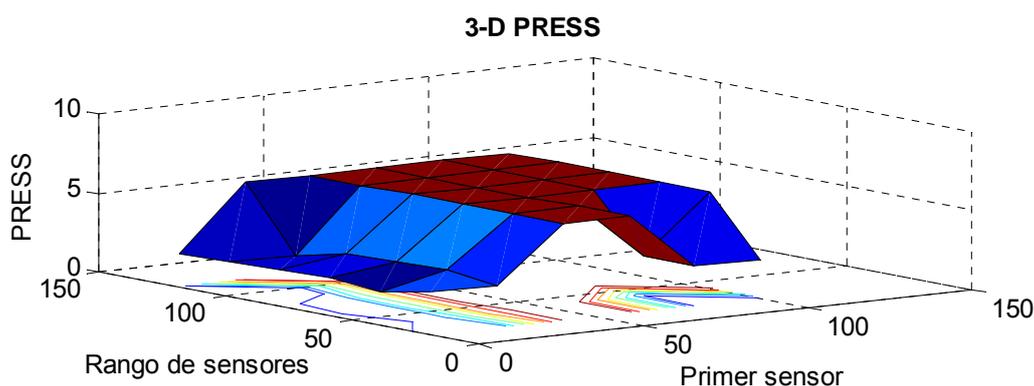


Figura 4.7: Valores PRESS vs. regiones de sensores considerados para Cu(II)

Modelo de calibración

Los resultados de la calibración para las condiciones optimizadas se muestran en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12: Modelos de calibración para el diseño de mezclas aleatorio normalizado

Factores	Muestras	Región de excluidas calibración	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
Cu(II)								
2	4, 5, 6	21-120	2.72	1.00	0.50	0.35	8.84	0.85
Ni(II)								
3	4, 6, 22	1-120	8.25	1.00	0.50	0.61	14.08	0.61

En la Figura 4.8 se muestran los valores predichos por el modelo para las muestras de calibración vs. la concentración nominal de dichas muestras y el gráfico de la elipse de región de confianza conjunta.

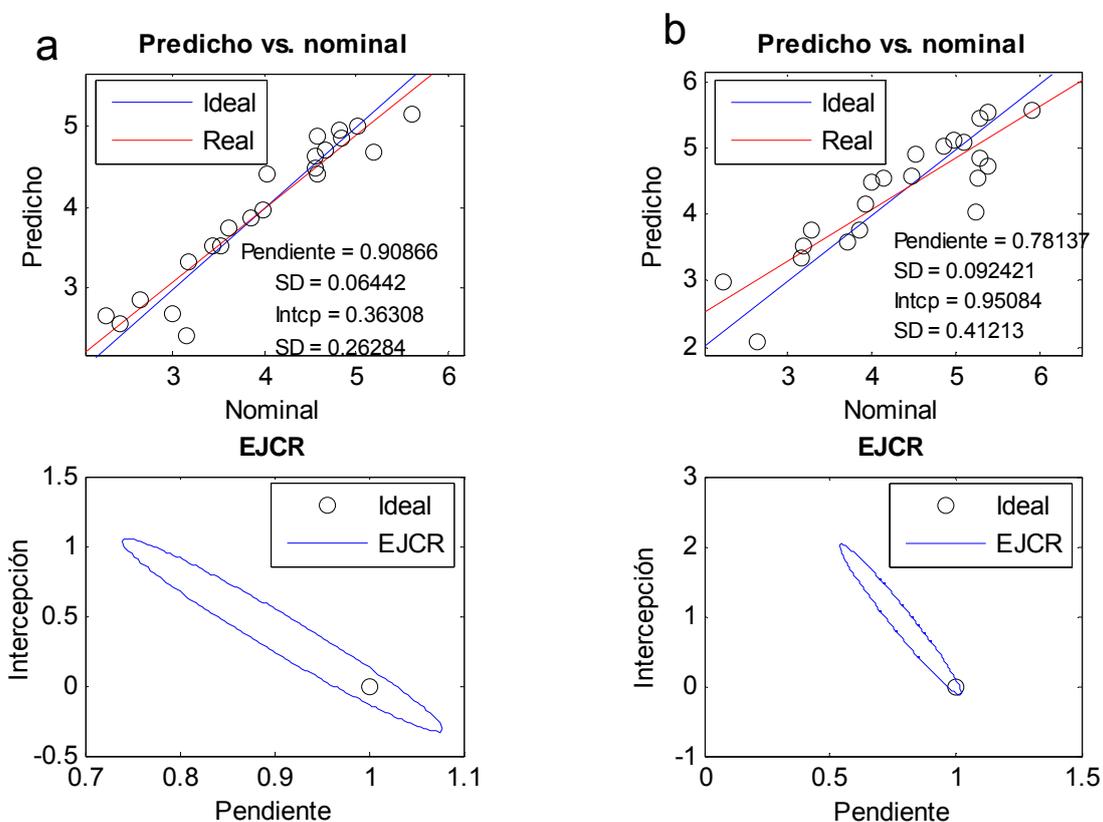


Figura 4.8: Valores predichos por el modelo PLS vs. valores nominales de concentración y región de confianza conjunta para muestras de calibración: (a) Cu(II), (b) Ni(II)

Etapa de predicción

Los modelos seleccionados se aplicaron para la predicción de las muestras de validación.

En la Tabla 4.13 se observa que los errores obtenidos para las predicciones fueron elevados, lo cual está asociado al bajo ajuste observado en la Tabla 4.12 para los dos modelos PLS. Los errores cuadráticos medios de predicción calculados de acuerdo a la ecuación (3.28) y los errores relativos

porcentuales obtenidos de acuerdo a la ecuación (3.29)) son incluidos en la tabla.

Tabla 4.13: Predicciones para el conjunto de muestras de validación

Concentración nominal (mg l ⁻¹)	Concentración predicha (mg l ⁻¹)	Desviación estándar (mg l ⁻¹)	Límite de confianza (mg l ⁻¹)
Cu(II)			
3.71	2.71	0.11	0.23
5.25	4.99	0.10	0.21
5.08	5.11	0.11	0.22
4.85	4.77	0.08	0.17
3.60	3.59	0.09	0.18
RMSEP (mg l ⁻¹) 0.52			
REP% 11.50			
Ni(II)			
2.80	3.37	0.16	0.34
3.57	3.90	0.09	0.18
4.50	4.61	0.09	0.19
3.85	4.33	0.08	0.18
4.80	4.77	0.08	0.17
RMSEP (mg l ⁻¹) 0.41			
REP% 10.54			

En la Figura 4.9 se muestran los resultados de la predicción a través de los residuos espectrales, los errores para cada una de las muestras consideradas y el gráfico de concentraciones predichas vs. concentraciones nominales, junto con la elipse de la región de confianza conjunta en ambos casos.

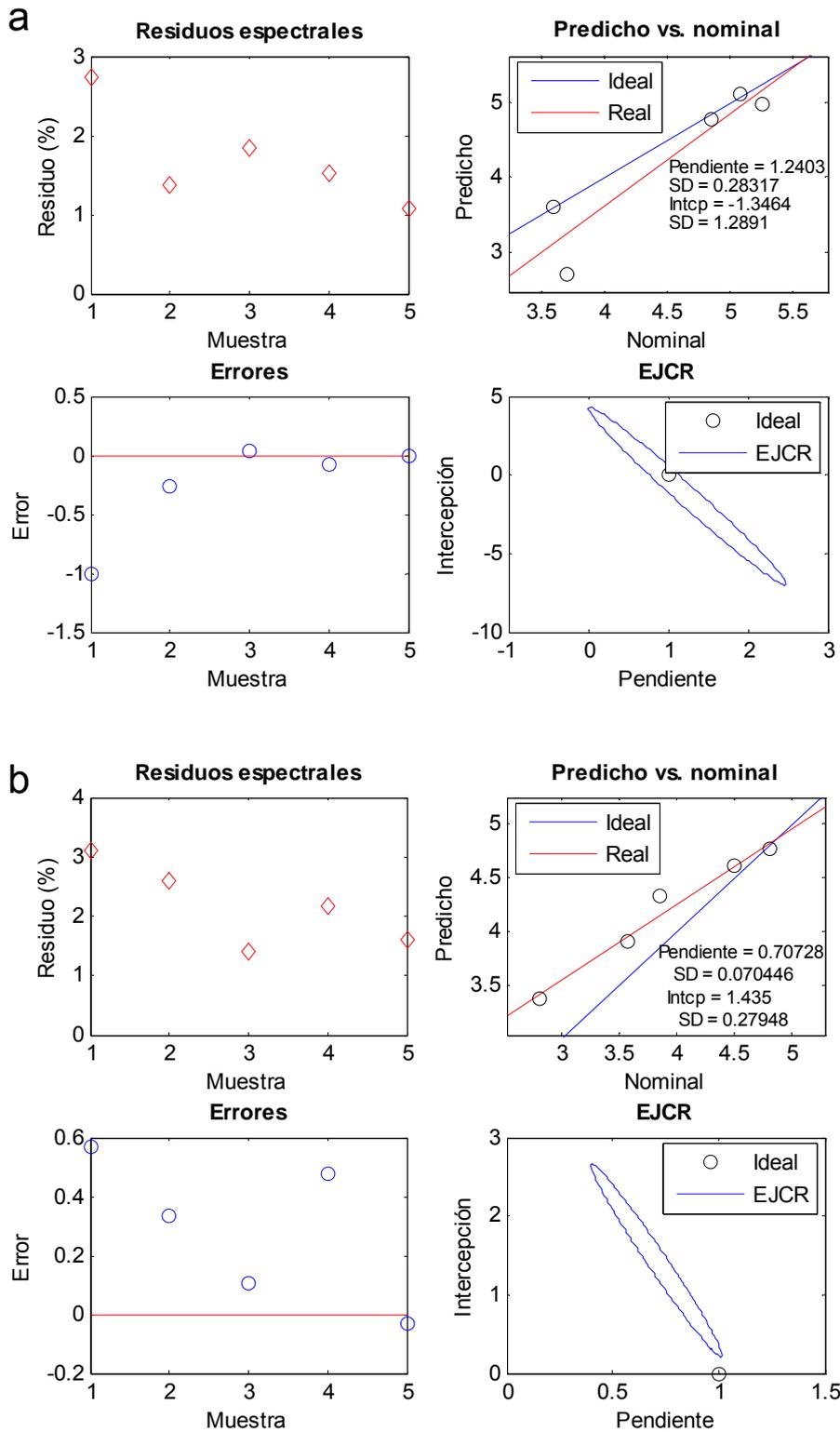


Figura 4.9: Resultados para las muestras de validación: (a) Cu(II), (b) Ni(II)

4.4.2.1.1.2 Diseño totalmente aleatorio

Se aplicó el modelo PLS sobre las 40 muestras asignadas a la calibración. Los perfiles preprocesados para las muestras de calibración y para las cinco muestras de validación se muestran en la Figura 4.10.

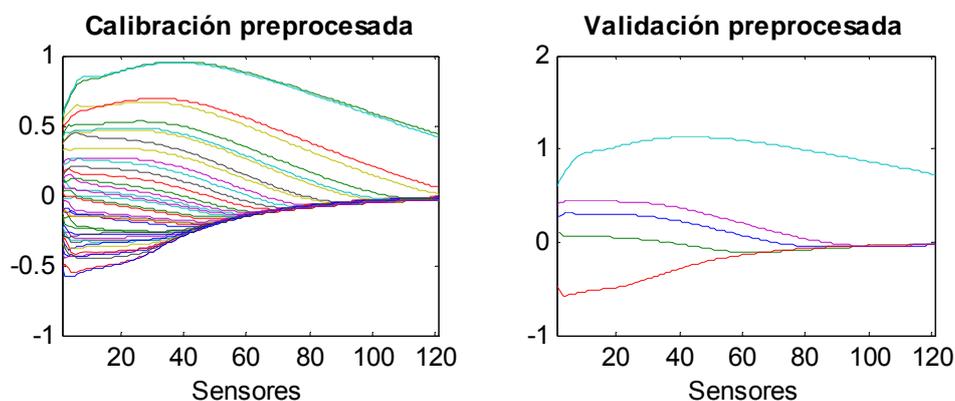


Figura 4.10: Perfiles centrados de las muestras de calibración y validación

Tabla 4.14: Resultados de la calibración con el método de validación cruzada

Componente	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
Cu(II)						
1	29.60	1.07	0.59	0.86	30.46	0.45
2	27.79	1.01	0.51	0.83	29.52	0.49
3	27.57	1.00	0.50	0.83	29.40	0.49
4	36.83	0	0	0.96	33.98	0.32
5	31.62	0	0	0.89	31.48	0.42
Ni(II)						
1	60.18	1.24	0.75	1.23	39.11	0.38
2	60.04	1.24	0.75	1.23	39.06	0.38
3	71.06	1.46	0.88	1.33	42.50	0.27
4	54.81	1.13	0.65	1.17	37.33	0.44
5	48.54	1.00	0.50	1.10	35.12	0.50

Los resultados de la validación cruzada con el método PLS se muestran en la Tabla 4.14.

Un único factor fue suficiente para el modelo PLS para Cu(II) y para Ni(II) se seleccionaron dos factores. Se evaluó que muestras son consideradas *outliers* para uno y dos componentes para cada modelo, respectivamente (Figura 4.11).

Cuatro muestras fueron consideradas *outliers* para el modelo PLS del Cu(II): 2, 5, 14 y 38 y para el Ni(II) debió excluirse la muestra 14.

Excluyendo las muestras se evaluó la zona de mínimo error. Esta resultó entre 1 y 20 (Figura 4.12) para los dos casos y debió utilizarse un único componente.

Modelo de calibración

Los resultados de la calibración en el rango de sensores 1 a 20 y para un componente se muestran en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15: Modelos de calibración

Factores	Muestras excluidas	Región de calibración	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
Cu(II)								
1	2,5,14	1-20	11.73	1.00	0.50	0.57	20.54	0.73
Ni(II)								
1	38	1-20	47.67	1.00	0.50	1.11	35.96	0.48

En la Figura 4.13 se muestran los valores predichos por el modelo para las muestras de calibración vs. la concentración nominal de dichas muestras y el gráfico de la elipse de región de confianza conjunta.

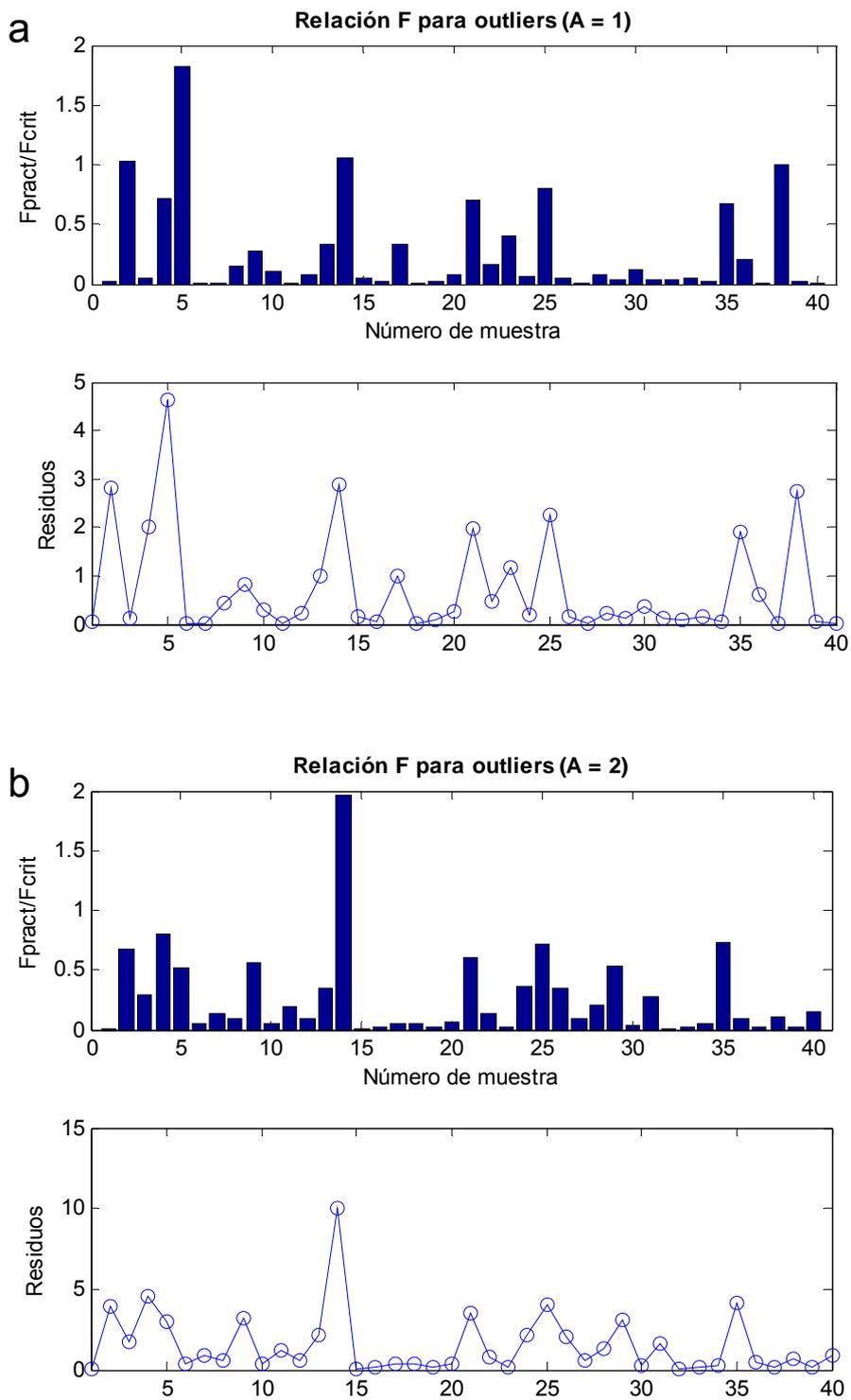


Figura 4.11: Relación F y residuos espectrales de las muestras de calibración para el modelo PLS1: (a) Cu(II), (b) Ni(II)

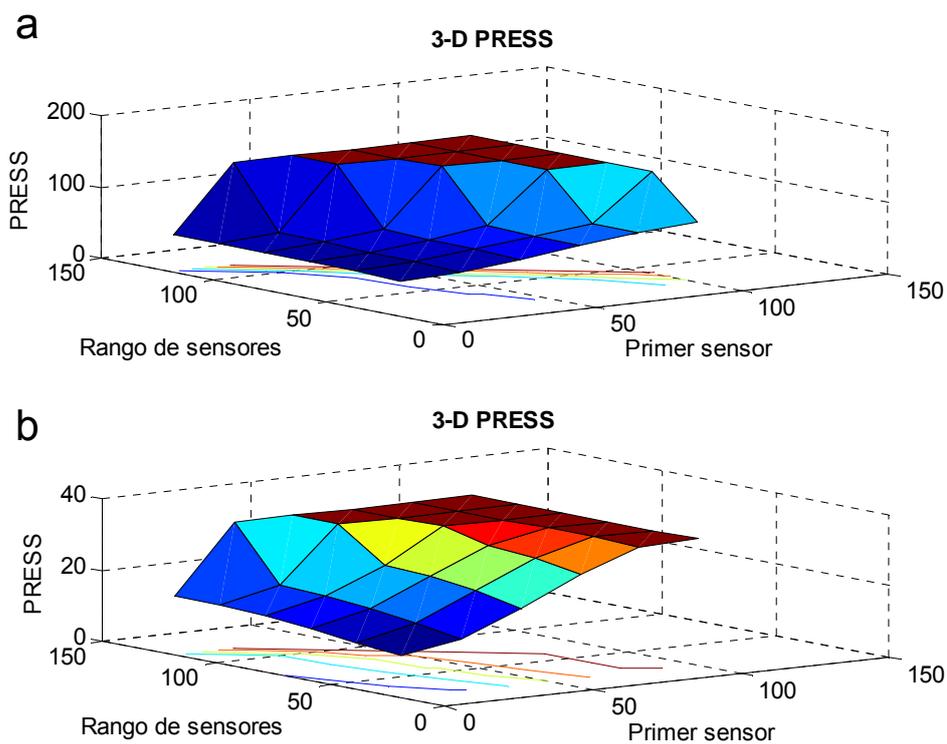


Figura 4.12: Valores PRESS vs. regiones de sensores considerados: (a) Cu(II), (b) Ni(II)

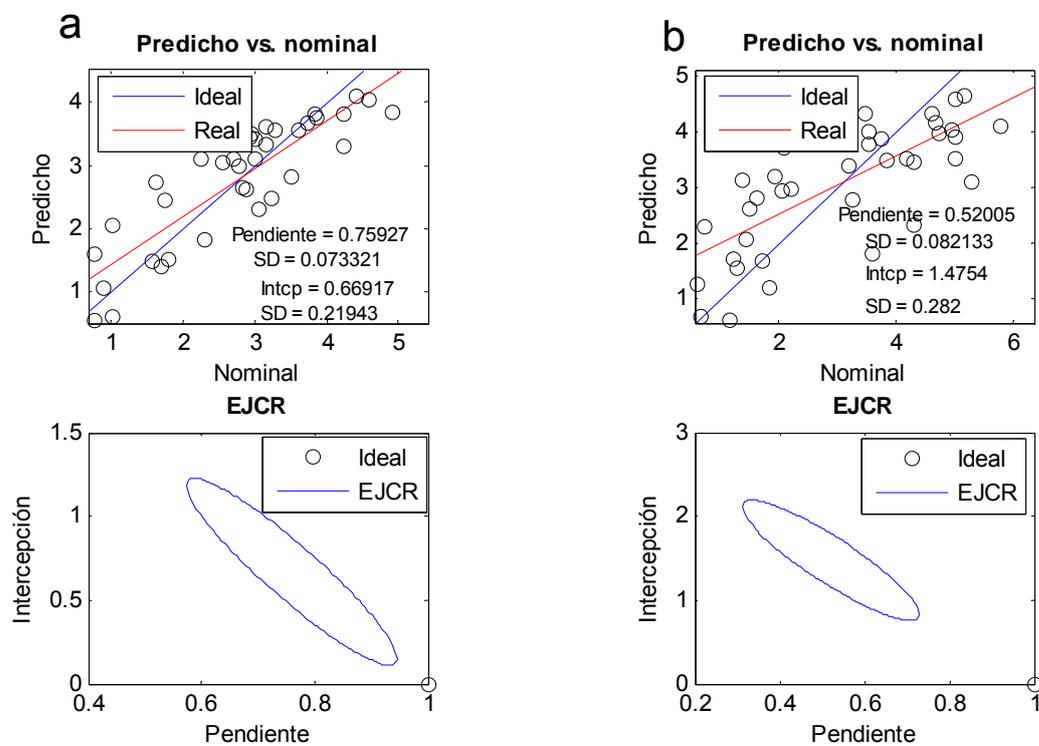


Figura 4.13: Valores predichos por el modelo PLS vs. valores nominales de concentración y región de confianza conjunta para muestras de calibración: (a) Cu(II), (b) Ni(II)

Etapa de predicción

Los modelos seleccionados se aplicaron para la predicción de las muestras de validación. En la Tabla 4.16 y la Figura 4.14 se muestran los resultados para la etapa de predicción.

Como se observa en la tabla los errores en este caso fueron muy elevados, mayores al 30% para ambos cationes, superiores a los obtenidos cuando se utilizó el diseño aleatorio normalizado para las mezclas de calibración y que se muestran en la Tabla 4.13

Tabla 4.16: Predicciones para el conjunto de muestras de validación

Concentración nominal (mg l ⁻¹)	Concentración predicha (mg l ⁻¹)	Desviación estándar (mg l ⁻¹)	Límite de confianza (mg l ⁻¹)
Cu(II)			
1.30	1.92	0.12	0.25
2.90	2.54	0.09	0.19
4.77	4.08	0.16	0.32
1.90	0.33	0.26	0.52
1.59	1.56	0.15	0.30
RMSEP (mg l ⁻¹) 0.93			
REP% 37.30			
Ni(II)			
1.50	2.17	0.22	0.45
2.41	2.88	0.17	0.35
5.01	4.63	0.30	0.60
1.61	0.37	0.46	0.93
1.91	1.76	0.27	0.54
RMSEP (mg l ⁻¹) 0.77			
REP% 30.97			

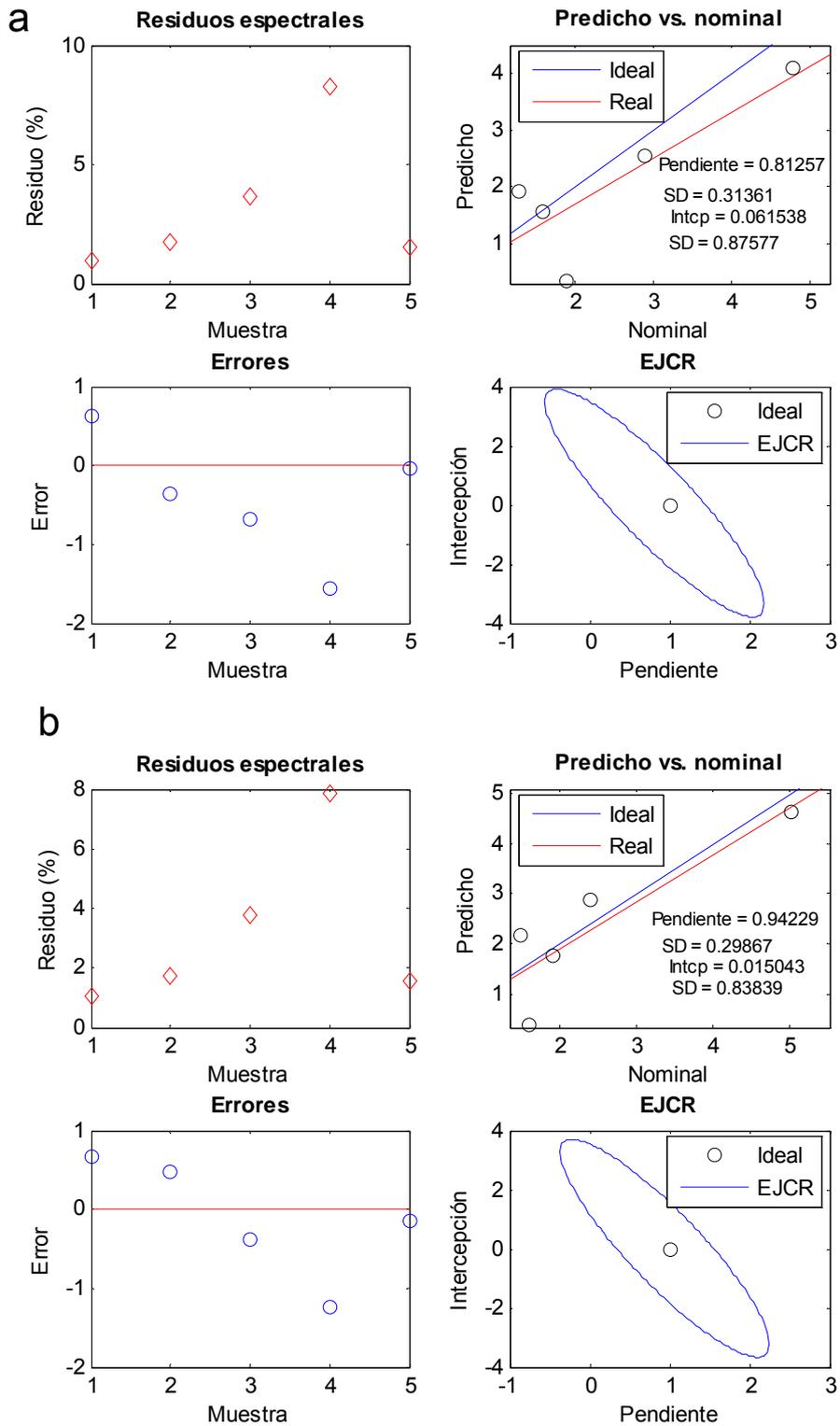


Figura 4.14: Resultados para las muestras de validación: (a) Cu(II), (b) Ni(II)

4.4.2.1.1.3 Diseño factorial

Se aplicó el modelo PLS sobre las 35 muestras asignadas a la calibración.

Los perfiles preprocesados para las muestras de calibración y para las cinco muestras de validación se muestran en la Figura 4.15.

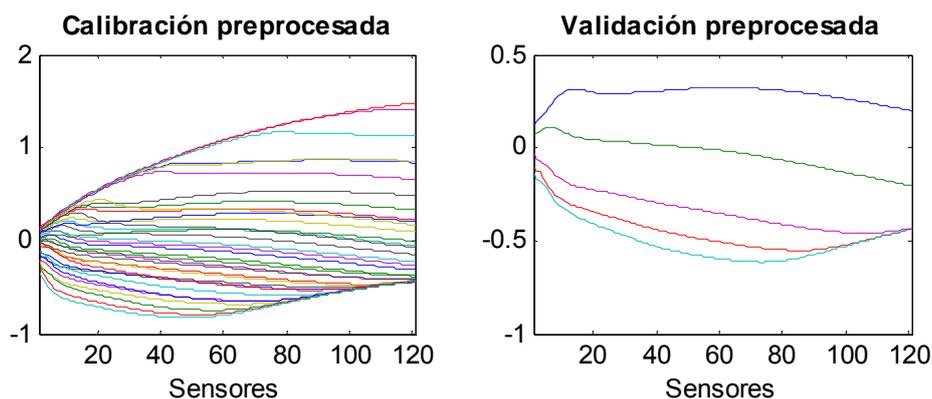


Figura 4.15: Perfiles centrados de las muestras de calibración y validación

Los resultados de la validación cruzada con el método PLS se muestran en la Tabla 4.17.

Se investigó la presencia de *outliers* utilizando un factor (Figura 4.16). La muestra número 30 fue la única considerada fuera del conjunto de calibración para el modelo PLS para Cu(II) mientras que para Ni(II) no debieron excluirse muestras de calibración. Excluyendo la muestra número 30 se evaluó la zona de mínimo error para Cu(II), que resultó entre 1 y 20 (Figura 4.17(a)) para la cual debió utilizarse un único componente. Para el Ni(II) la zona de mínimo error resultó entre 41 y 100 (Figura 4.17 (b)) para la cual debió utilizarse un único componente.

Modelo de calibración

Los resultados de la calibración en las condiciones óptimas se muestran en la Tabla 4.18.

Se observa un ajuste insuficiente para estos modelos PLS, sobre todo en el caso del modelo para el Ni(II), para el cual el coeficiente de correlación cuadrático resultó igual al 23%. Para el Cu(II) este coeficiente resultó del 67%, el cual también es indicador de una falta de ajuste. De todas maneras estos modelos fueron utilizados para la predicción de las muestras de validación a fin de compararlo con los demás modelos en términos de los errores cuadráticos porcentuales de predicción (REP%) como se describirá mas adelante.

Tabla 4.17: Resultados de la calibración con el método de validación cruzada

Componente	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
Cu(II)						
1	11.06	1.21	0.71	0.56	52.48	0.49
2	9.12	1.00	0.50	0.51	47.64	0.58
3	9.86	0	0	0.53	49.53	0.55
4	12.36	0	0	0.59	55.46	0.43
5	11.40	0	0	0.57	53.26	0.47
Ni(II)						
1	18.93	1.00	0.50	0.74	57.21	0.23
2	21.34	0	0	0.78	60.73	0.13
3	24.28	0	0	0.83	64.79	0.015
4	23.60	0	0	0.82	63.87	0.04
5	23.28	0	0	0.82	63.43	0.06

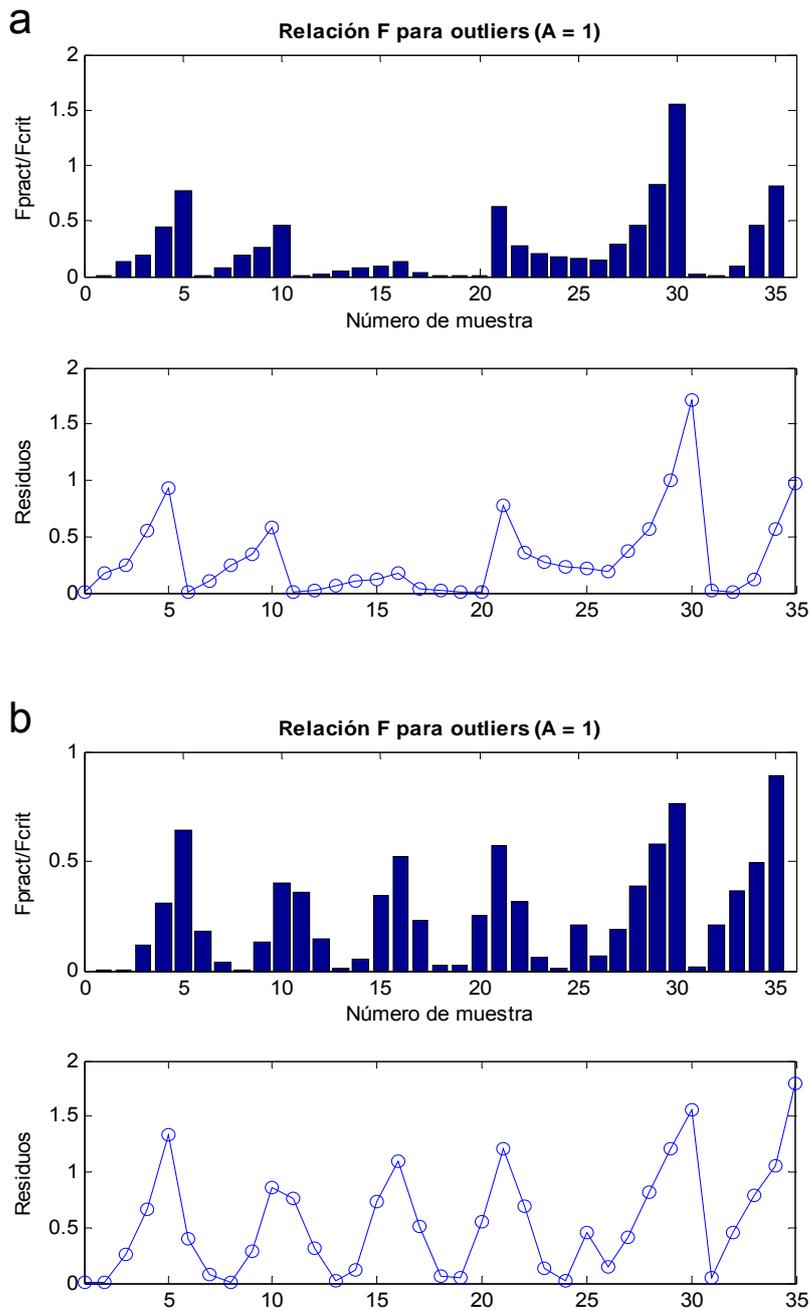


Figura 4.16: Relación F y residuos espectrales de las muestras de calibración para el modelo PLS: (a) Cu(II), (b) Ni(II)

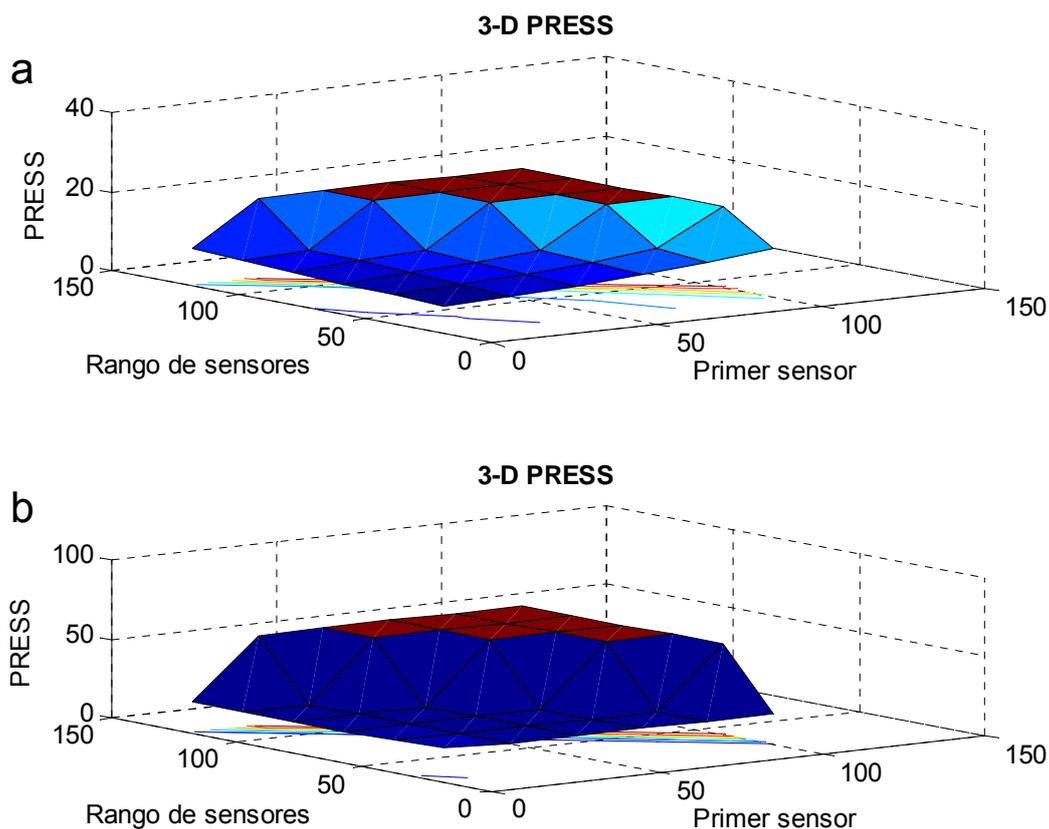


Figura 4.17: Valores PRESS vs. regiones de sensores considerados: (a) Cu(II), (b) Ni(II)

Tabla 4.18: Modelos de calibración

Factores	Muestras	Región de excluidas calibración	PRESS	Valor F	Valor p	SEP	REP%	R ²
Cu(II)								
1	30	1-20	6.74	1.00	0.50	0.45	42.95	0.67
Ni(II)								
1	38	1-20	18.90	1.00	0.50	0.73	57.16	0.23

En la Figura 4.18 se muestran los valores predichos por los modelos para las muestras de calibración vs. la concentración nominal de dichas muestras y los gráficos de la elipse de región de confianza conjunta.

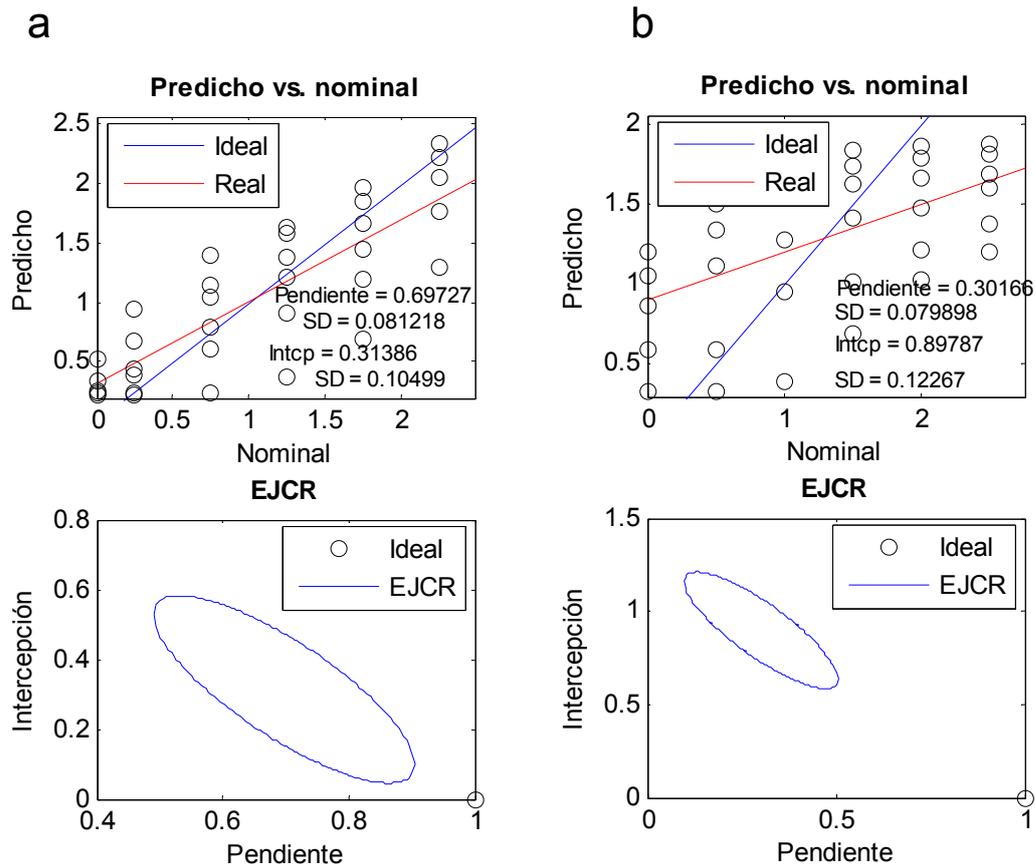


Figura 4.18: Valores predichos por el modelo PLS vs. valores nominales de concentración y región de confianza conjunta para muestras de calibración: (a) Cu(II), (b) Ni(II)

Etapas de predicción

Los modelos seleccionados se aplicaron para la predicción de las muestras de validación.

En la Tabla 4.19 y la Figura 4.19 se muestran los resultados para la etapa de predicción.

En la tabla se observa que, al igual que para los diseños de mezclas previamente analizados, con estos modelos de calibración los errores en la predicción resultaron elevados.

Tabla 4.19: Predicciones para el conjunto de muestras de validación

Concentración nominal (mg l ⁻¹)	Concentración predicha (mg l ⁻¹)	Desviación Estándar (mg l ⁻¹)	Límite de confianza (mg l ⁻¹)
Cu(II)			
0.50	0.47	0.10	0.20
1.00	0.88	0.08	0.16
1.50	1.61	0.10	0.20
2.00	1.71	0.11	0.22
1.00	1.39	0.08	0.17
RMSEP (mg l ⁻¹)	0.26		
REP%	21.39		
Ni(II)			
0.75	1.03	0.14	0.28
0.75	1.32	0.12	0.25
1.75	1.71	0.16	0.33
1.25	1.77	0.17	0.35
2.25	1.60	0.15	0.30
RMSEP (mg l ⁻¹)	0.52		
REP%	38.81		

4.4.2.1.2 Discusión de los resultados de la calibración con el modelo

PLS

En la Tabla 4.20 se resumen los resultados obtenidos para el modelo PLS para los tres diseños de mezclas de calibración utilizados.

Para los tres diseños de mezclas los errores de predicción fueron elevados, superando para todos los casos el 10%. Además, los modelos PLS utilizados para las predicciones no mostraron un ajuste suficiente, lo que se manifestó por los bajos coeficientes de correlación obtenidos en todos los casos, lo que pone de manifiesto que el sistema químico en estudio presenta una alta no linealidad

y no puede ser resuelto con metodologías multivariadas basadas en la linealidad.

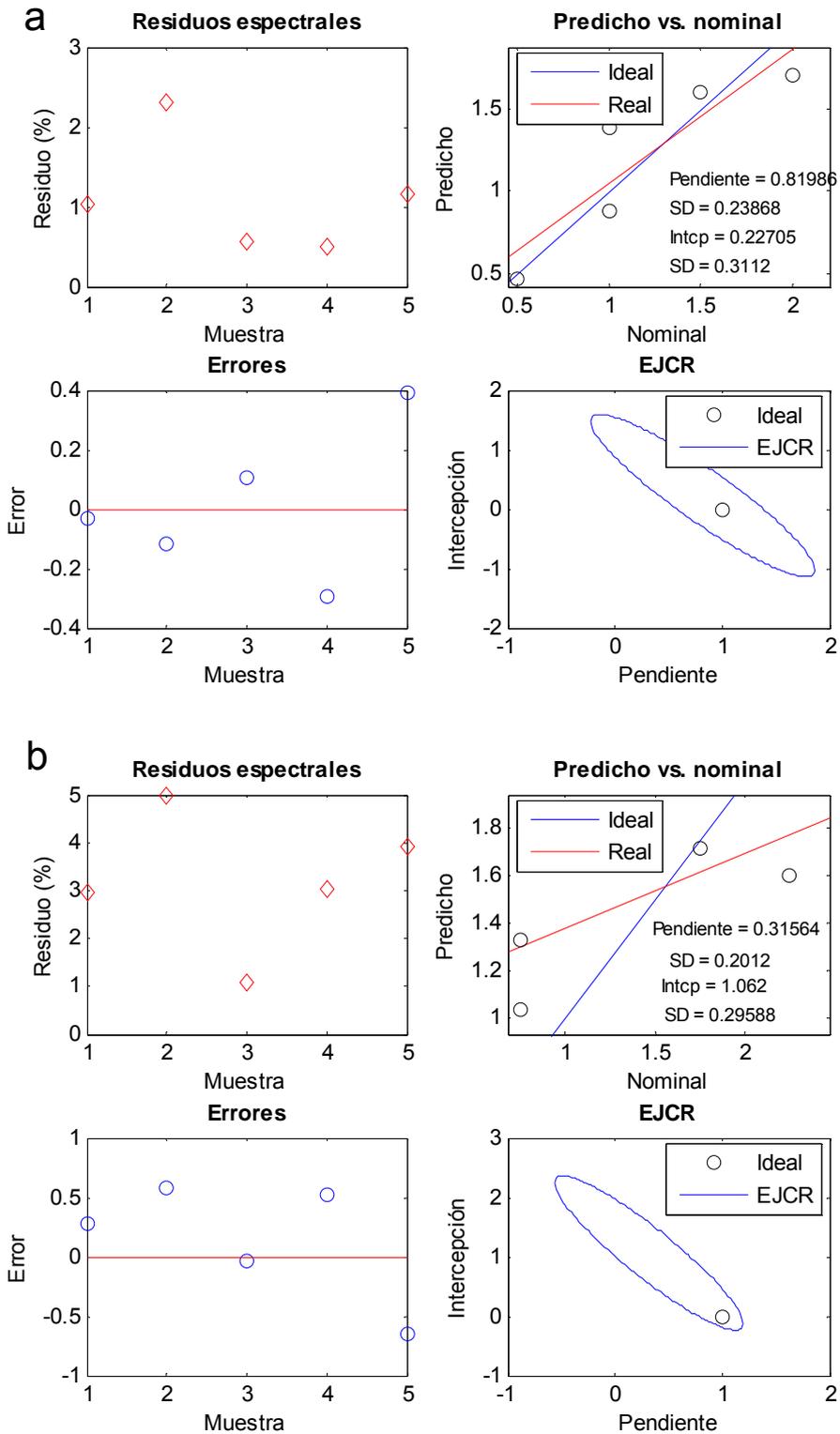


Figura 4.19: Resultados para las muestras de validación: (a) Cu(II), (b) Ni(II)

Tabla 4.20: Estimadores del ajuste de los modelos PLS y su capacidad predictiva

		R ²	REP%
Diseño aleatorio	Cu(II)	0.85	11.50
normalizado	Ni(II)	0.61	10.54
Diseño totalmente	Cu(II)	0.73	37.30
aleatorio	Ni(II)	0.48	30.97
Diseño factorial	Cu(II)	0.67	21.39
completo	Ni(II)	0.23	38.81

4.4.2.2 Método de calibración no lineal: Redes Neuronales Artificiales

Para la construcción de los modelos ANNs se utilizó una rutina confeccionada en el entorno de MatLab 7.0 que permitió el entrenamiento de redes multicapas de alimentación hacia delante y su posterior uso para etapas de predicción. Las redes consistieron de tres capas, una capa de entrada, una oculta y una de salida. La función de transferencia seleccionada para las capas oculta y de salida fue una función tipo sigmoidea. Como regla de aprendizaje supervisado se seleccionó el método de retropropagación de los errores y para el ajuste de pesos se utilizó el método del gradiente descendente. Durante el entrenamiento las muestras utilizadas fueron divididas aleatoriamente en un conjunto de calibración y un conjunto de monitoreo.

4.4.2.2.1 Estrategia de optimización de los modelos de calibración

Para los tres diseños de mezclas se aplicó el siguiente procedimiento:

Compresión de variables: Las matrices de datos de los perfiles cinéticos fueron sometidas a un pretratamiento de centrado y comprimidas mediante un procesamiento por componentes principales. Cada columna de la matriz de entrada consistió de 120 puntos de datos para cada perfil correspondiente a los

datos de absorbancia adquiridos durante un período de reacción de 120 s. De esta manera se obtuvieron matrices de un número de columnas igual al número de muestras utilizadas para la calibración y 120 filas, las cuales luego de la compresión por componentes principales originaron matrices con un número de filas igual al número de componentes utilizados en la red, el cual define el número de neuronas de entrada. Las variables de entrada fueron por lo tanto los scores de las muestras de entrenamiento para los componentes principales considerados.

Entrenamiento de la red: Los parámetros utilizados para construir los modelos ANN fueron optimizados utilizando una estrategia de prueba y error a través de la evaluación de los valores de errores cuadráticos medios de calibración, RMSEC (sobre las muestras de calibración) y los de predicción, RMSEP (sobre las muestras de monitoreo). La división de todas las muestras de entrenamiento en muestras de calibración y muestras de monitoreo se realizó durante el entrenamiento aleatoriamente. Las variables consideradas durante la optimización fueron la arquitectura de la red (número de neuronas de la capa de entrada y de la capa oculta) y los valores de los parámetros η y μ . La capa de salida consistió en una única neurona correspondiente al valor de concentración del analito considerado o en dos neuronas cuando la calibración fue realizada simultáneamente para ambas especies. Para definir el número de nodos en las capas de entrada y oculta se entrenaron redes con diferentes arquitecturas. Para cada arquitectura se entrenaron al menos cinco redes partiendo de diferentes pesos iniciales y se seleccionó en cada caso la que produjo un mínimo valor de RMSEP calculado a partir de los resultados para las muestras de monitoreo. La estrategia utilizada fue variar en primer lugar el número de neuronas de la capa de entrada para un número de nodos ocultos

igual a dos. Para el número de nodos de entrada que produjo el menor RMSEP se varió el número de nodos de la capa oculta, comparando los valores RMSEC y RMSEP. Todo el procedimiento se realizó para una y dos neuronas de salida. Fueron evaluadas diferentes combinaciones de los parámetros velocidad de aprendizaje y momento en un rango entre 0.3 y 0.6, para cada arquitectura investigada.

Eliminación de muestras en la calibración: en la primera etapa (variación del número de nodos de entrada) se entrenaron redes excluyendo muestras del conjunto de muestras de calibración. Dicha exclusión se realizó en base a los resultados obtenidos para los modelos PLS.

Efecto de la variación del número de sensores: en base a los resultados obtenidos con el modelo PLS se evaluaron redes entrenadas en zonas reducidas de sensores.

4.4.2.2 Modelos ANNs optimizados para los distintos diseños de mezclas

Siguiendo la estrategia descrita se obtuvieron los modelos ANNs para los tres diseños de mezclas. Los resultados de los mejores modelos obtenidos en cada caso se resumen en la Tabla 4.21

Los mayores errores se obtuvieron a partir del diseño factorial de cinco niveles. Esto se explica debido a que es un número de niveles de concentraciones limitado para la calibración en un sistema no lineal. Los errores para el diseño completamente aleatorio se incrementaron en comparación con el diseño aleatorio normalizado. Esto se atribuye a la presencia de muestras de concentraciones extremas dentro del rango de trabajo para el primer caso. Estas muestras tienen un peso comparativamente

menor durante el entrenamiento con la metodología ANN. En base a esto sólo se detallan las etapas requeridas para arribar al modelo ANNs seleccionado para el diseño aleatorio normalizado.

Tabla 4.21: Resultados de los modelos ANNs para los distintos diseños de mezclas

	Errores relativos porcentuales de calibración	Errores relativos porcentuales de monitoreo	Errores relativos porcentuales de predicción
Diseño aleatorio normalizado	Cu(II): 2.64 Ni(II): 3.13	Cu(II): 3.87 Ni(II): 2.80	Cu(II): 2.97 Ni(II): 4.95
Diseño completamente aleatorio	Cu(II): 5.68 Ni(II): 9.84	Cu(II): 12.31 Ni(II): 11.21	Cu(II): 12.64 Ni(II): 16.50
Diseño factorial	Cu(II): 23.44 Ni(II): 19.20	Cu(II): 16.54 Ni(II): 33.63	Cu(II): 13.13 Ni(II): 18.59

4.4.2.2.3 Estrategia de optimización de la metodología ANNs para el diseño de mezclas aleatorio normalizado

En primer lugar se muestra en las Figuras 4.20 y 4.21 la evolución de los errores cuadráticos medios de calibración y predicción obtenidos con la aplicación de la estrategia de optimización de la arquitectura de la red descrita en 4.4.2.2.1

Como se observa en estas figuras, los errores para las calibraciones de las especies en forma simultánea (dos neuronas de salida) fueron, en la mayor parte de los casos, mayores a los obtenidos cuando las calibraciones se realizaron para cada especie en forma individual (una neurona de salida). En pocos casos los errores de calibración para las redes de dos salidas resultaron menores que los de las redes de una salida, pero los altos errores de monitoreo asociados al primer caso sugieren un sobreentrenamiento de esas redes.

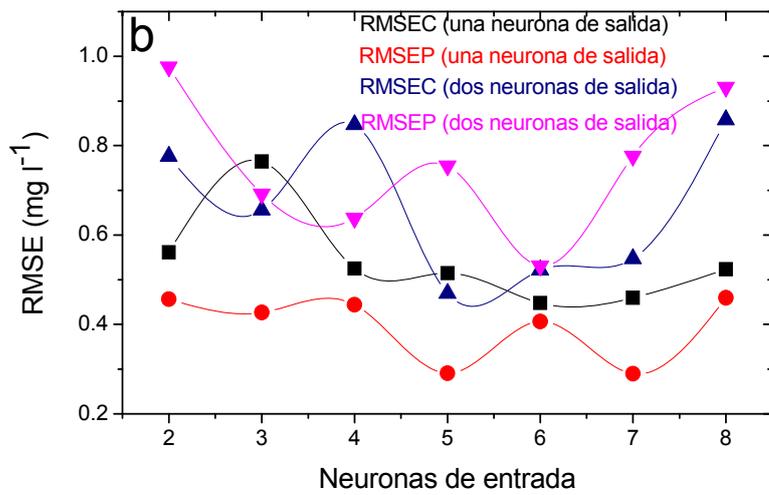
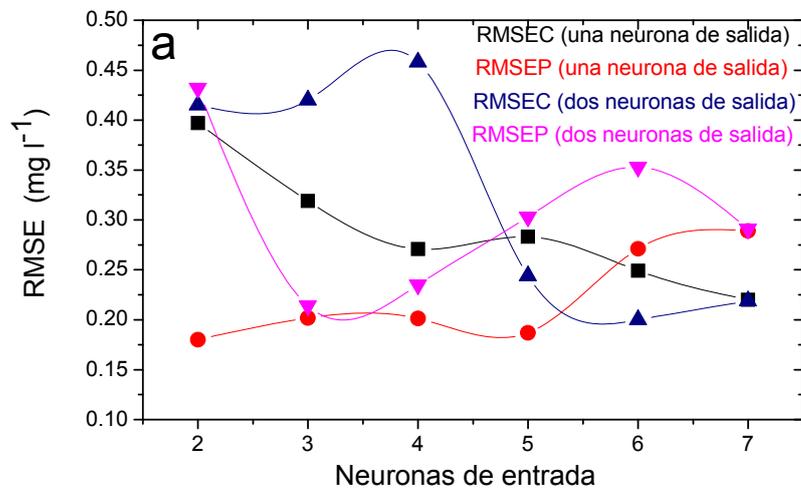


Figura 4.20: Estrategia de optimización de la arquitectura de la red: Errores cuadráticos medios vs. número de neuronas de entrada [(a) Cu(II) y (b) Ni(II)] para 2 neuronas ocultas (η y μ iguales a 0.5)

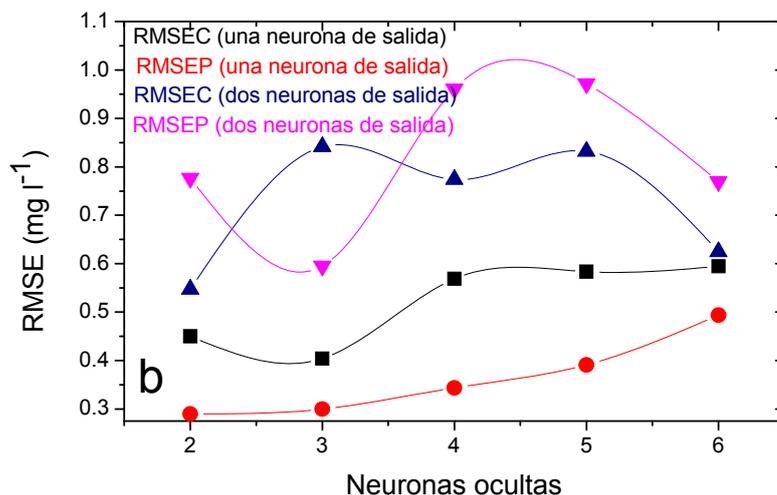
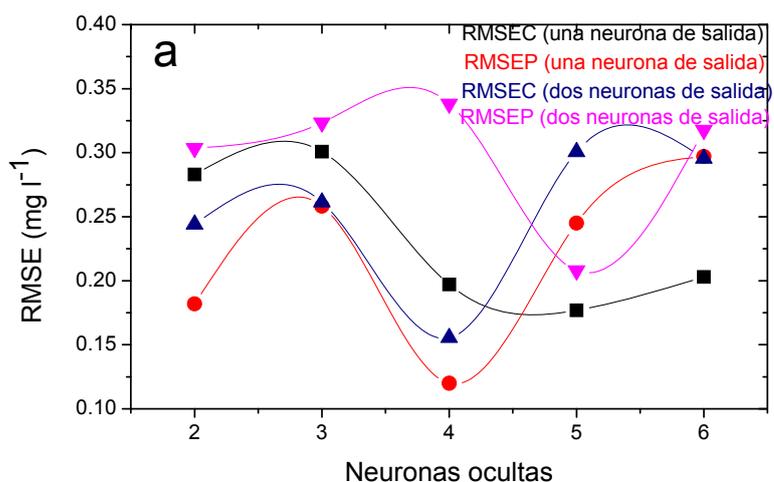


Figura 4.21: Estrategia de optimización de la arquitectura de la red: errores cuadráticos medios vs. número de neuronas ocultas [(a) Cu(II), 5 neuronas de entrada y (b) Ni(II), 7 neuronas de entrada] (η y μ iguales a 0.5)

Las arquitecturas de las redes que produjeron los menores errores fueron 5:4:1 para el Cu(II) y 7:3:1 para el Ni(II). Para el caso del Ni(II), donde los errores fueron mayores, fue necesario realizar una calibración usando un menor rango de sensores (1-60). Para el Cu(II), en cambio, los errores aumentaron al disminuir el rango de sensores utilizados.

Para las arquitecturas seleccionadas en la región de sensores de mínimo error y con las condiciones optimizadas en cada caso (Tabla 4.22) se obtuvieron errores cuadráticos medios de calibración de 0.11 mg l⁻¹ y 0.14 mg l⁻¹ para Cu(II) y Ni(II), respectivamente y errores cuadráticos medios de predicción de 0.15 mg l⁻¹ y 0.12 mg l⁻¹ para Cu(II) y Ni(II), respectivamente.

Tabla 4.22: Parámetros optimizados para la construcción de los modelos ANNs

Parámetros	Analito	
	Cu(II)	Ni(II)
Nodos en capa de entrada	5	7
Nodos en capa oculta	4	3
Nodos en capa de salida	1	1
Velocidad de aprendizaje	0.6	0.3
Momento	0.3	0.6
Función de transferencia en la capa de entrada	Lineal	Lineal
Función de transferencia en la capa oculta	Sigmoidea	Sigmoidea
Función de transferencia en la capa de salida	Sigmoidea	Sigmoidea
Número de épocas	12778	4633
Región	1-120	1-60
Muestras excluidas	4, 5, 6	4

En la Tabla 4.22 se resumen los óptimos para los parámetros utilizados para la construcción de los modelos ANNs.

4.4.2.2.4 Predicción sobre las muestras de validación

Las redes optimizadas se utilizaron para la predicción de las concentraciones de los analitos en las muestras de validación. En la Tabla 4.23 se presentan los resultados.

Tabla 4.23: Predicciones sobre muestras de validación con modelos ANNs optimizados

Concentración nominal (mg l^{-1})	Concentración predicha (mg l^{-1})
Cu(II)	
3.71	3.95
5.25	5.32
5.08	5.16
4.85	4.90
3.60	3.61
RMSEP (mg l^{-1})	0.13
REP%	2.97
Ni(II)	
2.80	2.62
3.57	3.25
4.50	4.61
3.85	3.81
4.80	4.77
RMSEP (mg l^{-1})	0.19
REP%	4.95

En la Figura 4.22 se muestran los valores de concentración predichos vs. nominales para las muestras de calibración y monitoreo utilizadas durante la optimización del modelo y los valores de concentración predichos vs. nominales para las muestras de validación usadas en la predicción.

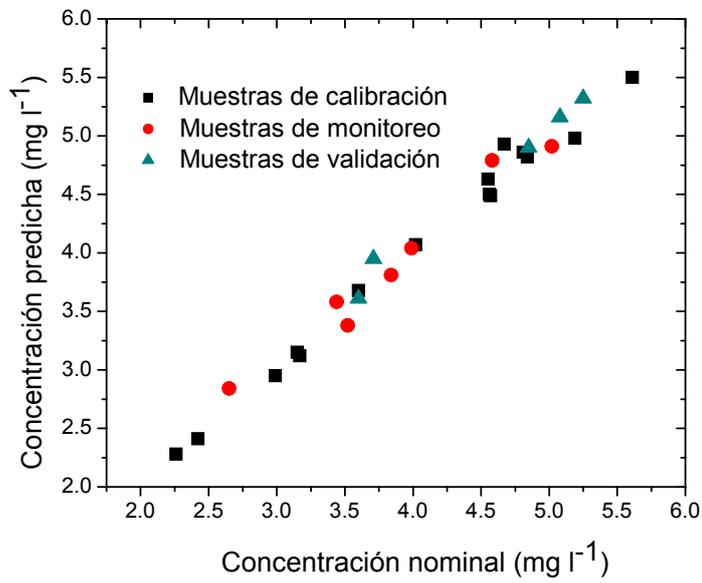
Los modelos ANNs obtenidos resultaron altamente confiables para la cuantificación simultánea de los analitos en mezclas, con errores de predicción

menores al 5% cuando se utilizó el diseño de muestras de calibración aleatorio normalizado (Tabla 4.21), significativamente inferiores a los obtenidos utilizando modelos lineales, con errores superiores al 10% (Tabla 4.20), y modelos paramétricos para los cuales los errores de predicción resultaron inadmisibles, mayores al 40% (Tablas 4.9 y 4.10).

4.4.2.2.5 Aplicación a muestras reales

Los modelos optimizados de calibración con ANNs fueron utilizados para la cuantificación de Cu(II) y Ni(II) en una solución de lavado proveniente de una industria de electroplatinado. Se requirió un paso previo de dilución (1:10) de las muestras para su tratamiento utilizando el método cinético ya descrito. A fin de determinar el porcentaje de recuperación la muestra diluida fue adicionada a 1 mg l^{-1} para los dos cationes y posteriormente analizada. La muestra diluida y la muestra diluida adicionada fueron analizadas utilizando la técnica FAAS como método de referencia. En la Tabla 4.24 se presentan los resultados obtenidos a partir de ambas metodologías.

a



b

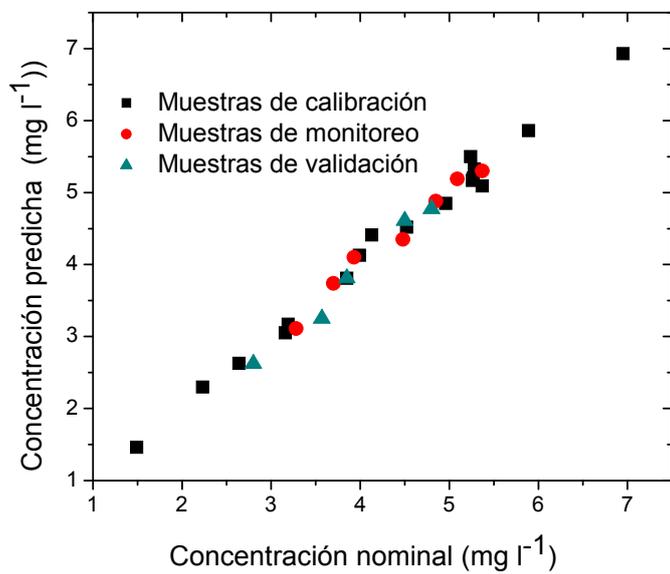


Figura 4.22: Concentraciones predichas por los modelos ANNs versus concentraciones nominales para muestras de calibración, monitoreo y predicción para (a) Cu(II) y (b) Ni(II)

Tabla 4.24: Determinación simultánea de Cu(II) y Ni(II) en una muestra de industria de electroplatinado

	Muestra ^a	FAAS (n=4)		ANNs-método cinético (n=4)		Valor t
		Promedio (mg l ⁻¹)	R.S.D. (%)	Promedio (mg l ⁻¹)	R.S.D. (%)	
Cu(II)	Muestra diluída	3.42	0.53	3.38	1.03	2.03
	Muestra diluída adicionada	4.54	0.40	4.51	0.67	1.71
	Recuperación (%)	112		113		
Ni(II)	Muestra diluída	4.08	0.39	4.13	0.92	2.43
	Muestra diluída adicionada	5.14	0.35	5.19	0.73	2.38
	Recuperación (%)	106		106		

^a Proveniente de una solución de lavado provista por la industria Cromados S. A.

Los valores del estadístico t indican que los resultados obtenidos no presentan diferencias a un 5% de nivel de significancia. Los % de recuperación muestran que el método cinético desarrollado es aplicable para la determinación de los analitos en este tipo de muestras cuando se utiliza ANNs como metodología de calibración.

4.5 Conclusiones

En los capítulos anteriores se comprobó la confiabilidad en la aplicación de los métodos determinísticos y quimiométricos no lineales sobre los resultados

cinéticos para la determinación de los dos analitos investigados individualmente.

En este capítulo, donde se trabajó con mezclas de ambas especies, el método determinístico resultó inadecuado para la predicción. Con los modelos quimiométricos basados en la linealidad del sistema se obtuvieron malos ajustes para las calibraciones y errores de predicción inadmisibles. La metodología de calibración ANNs, en cambio, permitió la cuantificación confiable de los analitos en muestras sintéticas. Los resultados obtenidos en el análisis de muestras reales fueron estadísticamente comparables con aquellos obtenidos a partir de un método de referencia.

Capítulo 5

Conclusiones

Este trabajo se focalizó en el análisis de la potencialidad y las limitaciones de diferentes metodologías de calibración y cuantificación aplicables a los datos provenientes de un sistema cinético con características intrínsecas de no linealidad.

El sistema cinético utilizado en este estudio fue la reducción de resazurina con sulfuro en medio alcalino catalizada por cationes metálicos. Las especies metálicas seleccionadas para el análisis fueron los cationes divalentes Cu(II) y Ni(II). En el procedimiento experimental se utilizó una metodología de análisis de inyección en flujo con modo detenido y se optimizaron las variables inherentes a este sistema y las variables fisicoquímicas que afectan esta reacción.

Para la cuantificación se exploró el uso de métodos determinísticos (*hard modeling*) que conducen a la obtención de los parámetros involucrados en los modelos planteados tales como constantes de velocidad y órdenes de reacción. También fueron evaluados métodos quimiométricos de calibración multivariada (*soft modeling*) de naturaleza lineal, como PCR y PLS, y no lineal como ANNs.

Si bien ciertos sistemas cinéticos considerados lineales pueden ser resueltos con métodos cinéticos clásicos, estos están limitados a sistemas muy simples con cinéticas de orden cero o de pseudo orden cero. Para otros casos, cuando se está en presencia de una cinética más compleja, se debe recurrir a otro tipo de metodologías. El sistema cinético utilizado en este trabajo fue aplicado previamente por otros autores para la determinación de especies diferentes utilizando las metodologías basadas en la cuantificación clásica, sujeta a una serie de simplificaciones. Sin embargo, para los analitos aquí considerados, estas simplificaciones no resultaron adecuadas.

Se plantearon diferentes modelos para la resolución determinística del sistema y se concluyó que el modelo autocatalítico describió adecuadamente los datos experimentales. Se evidenció una alta capacidad de predicción para este modelo cuando fue aplicado para la cuantificación de muestras reales utilizando el método de absorción atómica como método de referencia. Sin embargo, su aplicabilidad se limitó a situaciones en las cuales las especies investigadas están presentes individualmente. En presencia de mezclas de ambos analitos el mismo modelo presentó un buen ajuste a los datos experimentales pero su capacidad de predicción disminuyó considerablemente, siendo inadmisibles su aplicación en este último caso. Esto fue atribuido a la alta sensibilidad de la metodología respecto de las incertidumbres asociadas al cálculo de un mayor número de parámetros cinéticos.

Los métodos quimiométricos de calibración multivariada lineales como PLS y PCR frecuentemente funcionan en presencia de desviaciones a la linealidad. Sin embargo, en este caso, la alta no linealidad presente en el sistema no pudo ser resuelta con la aplicación de estos métodos, obteniéndose modelos inadecuados y altos errores en la predicción tanto para la cuantificación individual como para la cuantificación en mezclas de los analitos.

El método de calibración multivariada no lineal con Redes Neuronales Artificiales, en cambio, permitió obtener resultados confiables cuando fue aplicado tanto a la determinación de un único analito como a la mezcla de ambos. Se comprobó la eficacia de los modelos ANNs a través de estudios de exactitud basados en la comparación de los resultados de esta metodología con aquellos obtenidos con la técnica de Absorción Atómica. La precisión del método fue demostrada a través de estudios de repetitividad y reproducibilidad

intermedia. También se comprobó la importancia del diseño de las mezclas de calibración para la obtención de este tipo de modelo.

Por último, es interesante notar que se está continuando con esta línea de investigación donde se estudian las potencialidades de estas herramientas cuando son aplicadas a sistemas cinéticos con bajas desviaciones a la linealidad. Un ejemplo de esto es la reacción de decoloración del anaranjado de metilo por halógenos generados "in situ". Esta reacción es inhibida en presencia de la especie As(III), lo que permite su cuantificación. En este caso, la metodología cinética clásica basada en la medida de los tiempos de inducción proporcionales a la concentración de As(III) resulta una herramienta confiable para su determinación. Utilizando sistemas de inyección en flujo e incorporando una etapa de preconcentración se obtienen límites de detección muy próximos a los exigidos por las organizaciones de control. Sin embargo, con la aplicación de metodologías multivariadas como PLS, la precisión mejora considerablemente con la consecuente disminución del límite de detección. También se ha comprobado que la aplicación de ANNs no genera ventajas frente a PLS debido a que este último es suficientemente satisfactorio para modelar sistemas con pequeñas desviaciones a la linealidad como el mencionado precedentemente.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] B. Lavine, J. Workman, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4137-4145.
- [2] B. K. Lavine, *Anal. Chem.* 72 (2000) 91R-97R.
- [3] P. K. Hopke, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 365-377.
- [4] R. Brereton, *Analyst* 125 (2000) 2125-2154.
- [5] K. Booksh, B. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782 A- 791 A.
- [6] A. C. Olivieri, *Calibración Multivariada – Introducción a la programación con MATLAB*, Ediciones Científicas Argentinas. Buenos Aires 2001.
- [7] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Great Britain, 1989.
- [8] K. R. Beebe, B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1007-1017.
- [9] D. M. Haaland, E. V. Thomas, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193-1202.
- [10] S. Wold, M. Sjostrom, L. Eriksson, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58 (2001) 109-130.
- [11] F. Despagne, D. Massart, *Analyst* 123 (1998) 157R.
- [12] M. S. Collado, V. E. Mantovani, H. C. Goicoechea, A. C. Olivieri, *Talanta* 52 (2000) 909-920.
- [13] M. A. Al-Ghouti, Y. S. Al-Degs, M. Amer, *Talanta* 76 (2008) 1105-1112.
- [14] P. Felizardo, P. Baptista, J. C. Menezes, M. J. Neiva Correia, *Anal. Chim. Acta* 595 (2007) 107-113.
- [15] P. Baptista, P. Felizardo, J. C. Menezes, *Anal. Chim. Acta* 607 (2008) 153-159.
- [16] L. Alessandrini, S. Romani, G. Pinnavaia, M. Dalla Rosa, *Anal. Chim. Acta* 625 (2008) 95-102.
- [17] J. Luypaert, M. H. Zhang, D. L. Massart, *Anal. Chim. Acta* 478 (2003) 303-312.
- [18] F. J. Rambla, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 41-53.
- [19] Q. Chen, J. Zhao, H. Zhang, X. Wang, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 77-84.
- [20] L. Xu, J. Jiang, W. Lin, Y. Zhou, H. Wu, G. Shen, R. Yu, *Talanta* 71 (2007) 561-566.
- [21] J. Moros, I. Llorca, M. L. Cervera, A. Pastor, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 196-206.
- [22] L. Sauvage, D. Frank, J. Stearne, M. B. Millikan, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 223-230.

- [23] M. Cocchi, C. Durante, G. Foca, A. Marchetti, L. Tassi, A. Ulrici, *Talanta* 68 (2006) 1505-1511.
- [24] J. Moros, S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, *Talanta* 72 (2007) 72-79.
- [25] M. Kompany-Zareh, A. Massoumi, H. Tavallali, *Microchemical Journal* 63 (1999) 257-265.
- [26] J. Ghasemi, A. Niazi, *Microchemical Journal* 68 (2001) 1-11.
- [27] T. Saldanha, M. De Araújo, B. Neto, H. Chame, *Anal. Letters* 33 (2000) 1187-1202.
- [28] L. Yuanqian, H. Jingmei, Y. Jingguo, Z. Bo, H. Yuanqing, *Anal. Chim. Acta* 461 (2002) 181-188.
- [29] T. Khayamian, A. Ensafi, B. Hemmateenejad, *Talanta* 49 (1999) 587-596.
- [30] L. Hejazi, D. Mohammadi, Y. Yamini, R. Brereton, *Talanta* 62 (2004) 185-191.
- [31] J. Ghasemi, N. Shahabadi, H. Seraji, *Anal. Chim. Acta* 510 (2004) 121-126.
- [32] J. Ghasemi, Sh. Ahmadi, K. Torkestani, *Anal. Chim. Acta* 487 (2003) 181-188.
- [33] A. M. García Rodríguez, A. García de Torres, J. M. Cano Pavon, C. Bosch Ojeda, *Talanta* 47 (1998) 463-470.
- [34] A. Safavi, H. Abdollahi, R. Mirzajani, *Spectrochim. Acta A* 63 (2006) 196-199.
- [35] A. Abbaspour, M. Najafi, *Talanta* 60 (2003) 1079-1084.
- [36] B. D. Real, M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, *Talanta* 71 (2007) 1599-1609.
- [37] P. C. Nascimento, C. L. Jost, M. V. Guterres, L. D. Del'Fabro, L. De Carvalho, D. Bohrer, *Talanta* 70 (2006) 540-545.
- [38] P. Peralta-Zamora, L. Cornejo-Ponce, N. Nagata, R. J. Poppi, *Talanta* 44 (1997) 1815-1822.
- [39] M. J. Gómez González, O. Domínguez Renedo, M. J. Arcos Martínez, *Talanta* 68 (2005) 67-71.
- [40] J. A. Arancibia, A. Rullo, A. C. Olivieri, S. Di Nezio, M. Pistonesi, A. Lista, B. S. Fernández Band, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 157-163.
- [41] A. Espinosa-Mansilla, M. I. Acedo Valenzuela, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, F. Cañada Cañada, *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 129-136.
- [42] J. M. Lemus Gallego, J. Pérez Arroyo, *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 85-97.

- [43] G. Ragno, G. Ioele, A. Risoli, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 173-180.
- [44] M. R. Khoshayand, H. Abdollahi, M. Shariatpanahi, A. Saadatfard, A. Mohammadi, *Spectrochim. Acta A* 70 (2008) 491-499.
- [45] H. C. Goicoechea, A. C. Olivieri, *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 289-300.
- [46] Z. Rezaei, B. Hemmateenejad, S. Khabnadideh, M. Gorgin, *Talanta* 65 (2005) 21-28.
- [47] H. Abdollahi, L. Bagheri, *Anal. Chim. Acta* 514 (2004) 211-218.
- [48] A. Samadi-Maybodi, S. K. Hassani Nejad Darzi, *Spectrochim. Acta A* 70 (2008) 1167-1172.
- [49] Y. S. Al-Degs, A. H. El-Sheikh, M. A. Al-Ghouti, B. Hemmateenejad, G. M. Walter, *Talanta* 75 (2008) 904-915.
- [50] J. A. Arancibia, G. Martínez Delfa, C. E. Boschetti, G. M. Escandar, A. C. Olivieri, *Anal. Chim. Acta* 553 (2005) 141-147.
- [51] J. J. Berzas Nevado, J. Rodríguez Flores, M. J. Villaseñor Llerena, N. Rodríguez Fariñas, *Talanta* 48 (1999) 895-903.
- [52] B. Hemmateenejad, A. Abbaspour, H. Maghami, R. Miri, M. Reza Panjehshahin, *Anal. Chim. Acta* 575 (2006) 290-299.
- [53] P. C. Damián, M. D. Borraccetti, A. C. Olivieri, *Anal. Chim. Acta* 471 (2002) 87-99.
- [54] K. Wilberg, A. Sterner-Molin, S. P. Jacobsson, *Talanta* 62 (2004) 567-574.
- [55] A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, D. González Gómez, *Talanta* 62 (2004) 853-860.
- [56] A. B. Moreira, I. L. T. Dias, G. O. Neto, E. A. G. Zagatto, M. M. C. Ferreira, L. T. Kubota, *Talanta* 67 (2005) 65-69.
- [57] M. L. Luis, J. M. G. Fraga, A. I. Jiménez, F. Jiménez, O. Hernández, J. J. Arias, *Talanta* 62 (2004) 307-316.
- [58] L. F. Capitán-Vallvey, N. Navas, M. del Olmo, V. Consonni, R. Todeschini, *Talanta* 52 (2000) 1069-1079.
- [59] M. Aghamohammadi, J. Hashemi, G. Asadi Kram, N. Alizadeh, *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 288-294.
- [60] I. Durán Merás, T. Galeano Díaz, M. A. Franco, *Talanta* 65 (2005) 7-14.
- [61] S. Ortega-Algar, N. Ramos-Martos, A. Molina-Díaz, *Talanta* 60 (2003) 313-323.
- [62] Z. Wang, L. Shi, G. Chen, K. L. Cheng, *Talanta* 51 (2000) 315-326.

- [63] M. S. Moneeb, *Talanta* 70 (2006) 1035-1043.
- [64] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, E. Fàbregas, S. Alegret, *Anal. Chim. Acta* 405 (2000) 153-160.
- [65] O. Domínguez, M. J. Arcos, *Anal. Chim. Acta* 470 (2002) 241-252.
- [66] T. Galeano Diaz, I. Durán Merás, A. Guiberteau Cabanillas, M. F. A. Franco, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 231-238.
- [67] S. Wold, N. Kettaneh-Wold, B. Skagerberg, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 65 (1993) 3081.
- [68] L. A. Tortajada-Genaro, P. Campíns-Falcó, *Talanta* 72 (2007) 1004-1012.
- [69] L. Moreno, A. Merkoci, S. Alegret, S. Hernández-Cassou, J. Saurina, *Anal. Chim. Acta* 507 (2004) 247-253.
- [70] J. Saurina, E. López-Aviles, A. Le Moal, S. Hernández-Cassou, *Anal. Chim. Acta* 464 (2002) 89-98.
- [71] F. Despagne, D. L. Massart, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1657-1665.
- [72] D. Pérez-Marín, A. Garrido-Varo, J. E. Guerrero, *Talanta* 72 (2007) 28-42.
- [73] I. E. Frank, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 27 (1995) 1-9.
- [74] J. Zupan, J. Gasteiger, *Neural Networks in Chemistry and Drug Design*, Wiley, New York, 1999.
- [75] A. Verikas, M. Bacauskiene, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 67 (2003) 187-191.
- [76] F. Estienne, L. Pasti, V. Centner, B. Walczak, F. Despagne, D. J. Rimbaud, O. E. de Noord, D. L. Massart, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 58 (2001) 195-211.
- [77] C. He, Y. Sun, G. Wu, R. Chen, *Spectroscopy and Spectral Analysis* 21 (2001) 721-722.
- [78] Y. Ni, Sh. Chen, S. Kokot, *Anal. Chim. Acta* 463 (2002) 305-316.
- [79] Y. Akhlaghi, M. Kompany-Zareh, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 331-338.
- [80] A. Afkhami, M. Abbasi-Tarighat, H. Khanmohammadi, *Talanta* 77 (1998) 995-1001.
- [81] M. Kompany-Zareh, A. Massoumi, Sh. Pezeshk-Zadeh, *Talanta* 48 (1999) 283-292.
- [82] Y. Dou, Y. Sun, Y. Ren, Y. Ren, *Anal. Chim. Acta* 528 (2005) 55-61.
- [83] Y. Dou, T. Zou, T. Liu, N. Qu, Y. Ren, *Spectrochim. Acta A* 68 (2007) 1201-1206.

- [84] P. Chalus, S. Walter, M. Ulmschneider, *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 219-224
- [85] A. Goicoechea, M. Collado, M. Satuf, A. Olivieri, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 460-465.
- [86] B. Hemmateenejad, M. A. Safarpour, A. M. Mehranpour, *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 275-285.
- [87] V. G. Franco, J. C. Perín, V. E. Mantovani, H. C. Goicoechea, *Talanta* 68 (2006) 1005-1012.
- [88] B. Li, Y. He, Ch. Xu, *Talanta* 72 (2007) 223-230.
- [89] M. Baret, D. L. Massart, P. Fabry, F. Conesa, C. Eichner, C. Menardo, *Talanta* 51 (2000) 863-877.
- [90] A. A. Ensafi, T. Khayamian, M. Atabati, *Talanta* 57 (2002) 785-793.
- [91] A. A. Ensafi, T. Khayamian, A. Benvidi, E. Mirmomtaz, *Anal. Chim. Acta* 561 (2006) 225-232.
- [92] A. Guiberteau, T. Galeano Díaz, M. I. Rodríguez Cáceres, J. M. Ortiz Burguillos, I. Durán Merás, F. Salinas López, *Talanta* 62 (2004) 357-365.
- [93] G. Bocaz-Beneventi, R. Latorre, M. Farková, J. Havel, *Anal. Chim. Acta* 452 (2002) 47-63.
- [94] H. Mottola, *Kinetic Aspects of Analytical Chemistry*, Wiley, New York (1988).
- [95] H. Pardue, *Anal. Chim. Acta* 216 (1989) 69-107.
- [96] H. Mottola, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 68 (1996) 257-290.
- [97] S. Crouch, A. Scheeline, E. Kirkor, *Anal. Chem.* 72 (2000) 53R-70R.
- [98] T. Kawashima, S. Nakano, M. Tabata, M. Tanaka, *Trends in Analytical Chemistry* 16 (1997) 132-139.
- [99] S. Crouch, T. Cullen, A. Scheeline, E. Kirkor, *Anal. Chem.* 70 (1998) 53R-106R.
- [100] T. Tomiyasu, S. Aikou, K. Anazawa, H. Sakamoto, *Anal. Sciences* 21 (2005) 917-922.
- [101] A. Safavi, N. Maleki, F. Farjami, *Talanta* 54 (2001) 397-402.
- [102] G. Crespo, F. Andrade, F. Iñón, M. Tudino, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 317-325.
- [103] S. Prasad, *Anal. Chim. Acta* 540 (2005) 173-180.
- [104] S. Ohno, N. Teshima, H. Zhang, T. Sakai, *Talanta* 60 (2003) 1177-1185.

- [105] R. He, J. Wang, *Anal. Chim. Acta* 412 (2000) 241-245.
- [106] A. Igov, R. Simonovic, R. Igov, *J. Serb. Chem. Soc.* 68 (2003) 131-135.
- [107] S. Rancic, R. Pigov, T. Pecev, *J. Serb. Chem. Soc.* 68 (2003) 765-769.
- [108] M. Mousavi, R. Jahanshahi, *Analytical Letters* 32 (1999) 2871-2885.
- [109] A. Safavi, A. Afkhami, A. Massoumi, *Anal. Chim. Acta* 232 (1990) 351-356.
- [110] A. Afkhami, A. Safavi, A. Massoumi, *Anal. Letters* 24 (1991) 1643-1655.
- [111] B. Arikan, M. Tuncay, R. Apak, *Anal. Chim. Acta* 335 (1996) 155-167.
- [112] Rancic, S., Nikolic-Mandic, S., Mandic, L., *Anal. Chim. Acta* 547 (2005) 144-149.
- [113] S. Mitic, G. Miletic, M. Obradovic, *Talanta* 42 (1995) 1273-1278.
- [114] S. Kawakubo, Y. Hagihara, Y. Honda, M. Iwatsuki, *Anal. Chim. Acta* 388 (1999) 35-43.
- [115] D. Mihaid, A. Rustoiu-Csavdari, I. Baldea, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381 (2005) 1362-1366.
- [116] M. Kompany-Zareh, H. Tavallali, M. Sajjad, *Anal. Chim. Acta* 469 (2002) 303-310.
- [117] H. Tavallali, A. Massoumi, *Talanta* 47 (1998) 479-485.
- [118] A. Afkhami, T. Madrakian, A. Assl, *Talanta* 55 (2001) 55-60.
- [119] K. Uraisin, T. Takayanagi, M. Oshima, D. Nacapricha, S. Motomizu, *Talanta* 68 (2006) 951-956.
- [120] T. Tomiyasu, Y. Taga, H. Sakamoto, N. Yonehara, *Anal. Chim. Acta* 319 (1996) 199-204.
- [121] T. Tomiyasu, H. Sakamoto, N. Yonehara, *Anal. Chim. Acta* 320 (1996) 217-227.
- [122] X. Cui, G. Fang, L. Jiang, S. Wang, *Anal. Chim. Acta* 590 (2007) 253-259.
- [123] C. Fitzpatrick, H. Pardue, *Anal. Chem.* 61 (1989) 2551-2556.
- [124] Z. Zhu, Z. Gu, X. Wang, *Talanta* 40 (1993) 1013-1017.
- [125] D. Massart, B. Vandeginste, S. Deming, Y. Michotte, L. Kaufman, *Chemometric: a textbook*, Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo 1988.
- [126] R. Kramer, *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis*, Marcel Dekker, New York 1998.
- [127] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 335-352.

- [128] M. Karayannis, I. Pettas, *Anal. Chim. Acta* 423 (2000) 277-286.
- [129] L. Pettas, M. Karayannis, *Anal. Chim. Acta* 491 (2003) 219-229.
- [130] H. Khajehsharifi, M. Mousavi, J. Ghasemi, M. Shamsipur, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 369-373.
- [131] G. López-Cueto, J. Lizarreta, M. Ostra, C. Ubide, *Talanta* 58 (2002) 569-578.
- [132] J. Ghasemi, D. Mohammadi, *Microchemical Journal* 71 (2002) 1-8.
- [133] J. Ghasemi, S. Saaidpour, A. A. Ensafi, *Anal. Chim. Acta* 508 (2004) 119-126.
- [134] A. Niazi, B. Jafarian, J. Ghasemi, *Spectrochim. Acta A* 71 (2008) 841-846.
- [135] S. Crouch, J. Coello, S. MasPOCH, M. Porcel, *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 115-126.
- [136] F. Fernández, M. Tudino, O. Troccoli, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 119-134.
- [137] S. Ventura, M. Silva, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4458-4461.
- [138] A. Safavi, G. Absalan, S. Maesum, *Anal. Chim. Acta* 432 (2001) 229-233.
- [139] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, M. Redón, *Anal. Chem.* 67 (1995) 4477-4483.
- [140] G. Absalan, A. Safavi, S. Maesum, *Talanta* 55 (2001) 1227-1233.
- [141] A. Safavi, H. Abdollahi, M. Hormozi Nezhad, *Talanta* 59 (2003) 515-523.
- [142] A. Safavi, O. Moradlou, S. Maesum, *Talanta* 62 (2004) 51-56.
- [143] A. A. Ensafi, T. Khayamian, R. Tabaraki, *Talanta* 71 (2007) 2021-2028.
- [144] Y. Ni, C. Liu, S. Kokot, *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 185-196.
- [145] M. Chamsaz, A. Safavi, J. Fadaee, *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 140-146.
- [146] Y. Ni, Y. Wang, S. Kokot, *Spectrochim. Acta A* 70 (2008) 1049-1059.
- [147] Y. Ni, C. Huang, S. Kokot, *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 53-65.
- [148] Y. Ni, C. Liu, *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 221-230.
- [149] R. Jiménez-Prieto, M. Silva, *Anal. Chim. Acta* 389 (1999) 131-139.
- [150] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH, M. Porcel, *Anal. Chim. Acta* 398 (1999) 83-92.
- [151] P. Gemperline, *Practical Guide to Chemometrics*, Taylor and Francis, New York, 2006.

- [152] J. Saurina, S. Hernández-Cassou, R. Tauler, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2329-2336.
- [153] S. Bijlsma, A. Smilde, *Anal. Chim. Acta* 396 (1999) 231-240.
- [154] M. Blanco, A. C. Peinado, J. Mas, *Anal. Chim. Acta* 556 (2006) 364-373.
- [155] A. R. De Carvalho, M. Del Nogal Sánchez, J. Wattoom, R. G. Breton, *Talanta* 68 (2006) 1190-1200.
- [156] J. Ruzicka, E. H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, John Wiley & Sons, New York, (1981).
- [157] S. Nakano, K. Nakaso, K. Noguchi, T. Kawashima, *Talanta* 44 (1997) 765-770.
- [158] S. Cao, J. Zhong, K. Hasebe, W. Hu, *Anal. Chim. Acta* 331 (1996) 257-262.
- [159] T. Yamane, K. Koshino, *Talanta* 43 (1996) 963-969.
- [160] A. Ensafi, M. Arab Chamjangali, H. Rrahimi Mansour, *Talanta* 55 (2001) 715-720.
- [161] Yi-Bo Zeng, Hong-Ping Xu, Hui-Tao Liu, Ke-Tai Wang, Xing-Guo Chen, Zhi-De Hu, Bo-tao Fan, *Talanta* 54 (2001) 603-609.
- [162] T. Fujimoto, N. Teshima, M. Kurihara, S. Nakano, T. Kawashima, *Talanta* 49 (1999) 1091-1098.
- [163] Z. Yu, N. Teshima, S. Nakano, T. Kawashima, *Talanta* 43 (1996) 1519-1525.
- [164] E. Pereira-Filho, C. Mello, P. Costa Filho, M. Arruda, R. Poppi, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 111-117.
- [165] S. Nakano, K. Tsujii, T. Kawashima, *Talanta* 42 (1995) 1051-1056.
- [166] S. Lunvongsa, M. Oshima, S. Motomizu, *Talanta* 68 (2006) 969-973.
- [167] J. Tolotti Carneiro, A. Basile Dias, E. Guidetti Zagatto, R. Saldanha Honorato, *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 327-333.
- [168] M. Kaneko, M. Kurihara, S. Nakano, T. Kawashima, *Anal. Chim. Acta* 474 (2002) 167-176.
- [169] S. Lunvongsa, T. Takayanagi, M. Oshima, S. Motomizu, *Anal. Chim. Acta* 576 (2006) 261-269.
- [170] S. Gang, Ch. Xingguo, Z. Yunkun, L. Mancang, H. Zhide, *Anal. Chim. Acta* 420 (2000) 123-131.
- [171] B. Li, D. Wang, J. Lv, Z. Zhang, *Talanta* 69 (2006) 160-165.
- [172] P. Fortes, S. Meneses, E. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 316-320.

- [173] M Reis, S. Gurden, A. Smilde, M. Ferreira, *Anal. Chim. Acta* 422 (2000) 21-36.
- [174] K. Schongarth, B. Hitzmann, *Anal. Chim. Acta* 363 (1998) 183-189.
- [175] B. Karlberg, R. Torgrip, *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 299-306.
- [176] J. Ruzicka, E. Hansen, *Flow Injection Analysis*, John Wiley & Sons, New York, (1988).
- [177] L. Shpigun, Y. Shushenachev, P. Kamilova, *Anal. Chim. Acta* 573-574 (2006) 360-365.
- [178] Z. Zhi-Qi, G. Lou-Jun, Z. Han-Ying, L. Qian-Guang, *Anal. Chim. Acta* 370 (1998) 59-63.
- [179] R. Taljaard, J. van Staden, *Anal. Chim. Acta* 366 (1998) 177-186.
- [180] D. Vendramini, V. Grassi, E. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 570 (2006) 124-128.
- [181] Y. Li, Y. Muo, H. Xie, *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 315-325.
- [182] Y. Ye, H. Mao, Y. Chen, *Talanta* 45 (1998) 1123-1129.
- [183] K. Grudpan, P. Ampan, Y. Udnan, S. Jayasvati, S. Lapanantnoppakhun, J. Jakmunee, G. Christian, J. Ruzicka, *Talanta* 58 (2002) 1319-1326.
- [184] N. R. Marsili, A. Lista, B. S. Fernandez Band, H. C. Goicoechea, A. C. Olivieri, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 2479-2484.
- [185] M. Li, G. Pacey, *Talanta* 42 (1995) 1857-1865.
- [186] J. Murillo Pulgarín, L. García Bermejo, J. Garrido Lara, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 249-259.
- [187] L. Su, J. Li, H. Ma, G. Tao, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 281-288.
- [188] N. Choengchan, K. Lukkanakul, N. Ratanawimarnwong, W. Waiyawat, P. Wilairat, D. Nacapricha, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 115-122.
- [189] I. Duran Merás, A. Muñoz de la Peña, M. Acedo-Valenzuela, A. Jiménez Girón, *Talanta* 69 (2006) 397-402.
- [190] A. Muñoz de la Peña, M. I. Acedo-Valenzuela, A. Espinosa-Mansilla, R. Sánchez-Maqueda, *Talanta* 56 (2002) 635-642.
- [191] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. Maspoch, J. Riba, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2905-2911.
- [192] A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, M. Acedo Valenzuela, H. Goicoechea, A. Olivieri, *Anal. Chim. Acta* 463 (2002) 75-88.
- [193] D. Weeks, K. Bruland, *Anal. Chim. Acta* 453 (2002) 21-32.

- [194] B. Tang, H. Zhang, Y. Wang, *Anal. Chim. Acta* 525 (2004) 305-311.
- [195] E. Novikov, L. Shpigun, Y. Zolotov, *Anal. Chim. Acta* 230 (1990) 157-162.
- [196] M. Valcarcel, M. D. Luque de Castro, *Flow-Injection Análisis*, John Wiley & Sons, New York, (1987).
- [197] F. Baes, R. E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Krieger, Malabar, Florida, 1986, pp. 244-245.
- [198] M. Boudart, *Kinetics of Chemical Processes*, Prentice-Hall, Engle-wood, 1968.
- [199] C F. Feigl, P. West, *Anal Chem.* 19 (1947), 351-353.
- [200] A Olivieri, H. Goicoechea, F Iñón, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 73 (2004) 189-197.
- [201] A. Gustavo González, M. Angeles Herrador, Agustín G. Asuero, *Talanta* 48 (1999) 729-736.
- [202] D. Massart, B. Vandeginste, L. Buydens, S. De Jong, P. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A: Data Handling in Science and Technology*, vol 20A, Elsevier, Amsterdam, 1998.
- [203] W. Horwitz, Protocol for the design, conduct and interpretation of collaborative studies. *Pure Appl. Chem.*, 60 (1988) 855-864.
- [204] ISO standard 5725. 1 to 6 (1994), Accuracy (trueness and precision) of measurements methods and results.
- [205] A. L. Bonivardi, M. A. Baltanás, *J. Catal.* 125 (1990) 243-259.