

I.2. RESOLUCIÓ DE MESCLES PER MÈTODES CINÈTICS D'ANÀLISI

Els mètodes cinètics d'anàlisi es basen en mesures dels canvis que tenen lloc en el transcurs d'una reacció química, o procés físic, per aconseguir informació analítica.

En aquest capítol, només es tractarà la cinètica de reaccions químiques i el seu interès en química analítica, però s'ha de tenir en compte que els mètodes cinètics són més generals i que es poden aplicar a molts fenòmens físics dependents del temps, com els fenòmens de difusió, migració, etc.

Els mètodes cinètics d'anàlisi han evolucionat molt des del seu inici per a convertir-se en una eina poderosa per a resoldre una gran varietat de problemes analítics, i han esdevingut d'aquesta manera una bona alternativa als mètodes basats en l'equilibri en aquells sistemes on la seva aplicació és la opció més adient. De forma ràpida i resumida es pot dir que en moltes ocasions milloren els resultats analítics en termes de sensibilitat, selectivitat i rapidesa. S'ha de destacar d'aquests mètodes l'enorme capacitat en la quantificació de mesclures de varis analits (determinació de multicomponents).

Hi ha un grup molt important de mètodes cinètics anomenats mètodes cinètics diferencials (*differential reaction-rate methods*), que es basen en la diferent velocitat de reacció de mesclures d'analits amb un reactiu comú, els quals permeten la determinació simultània de compostos molt semblants quan les constants de velocitat són el suficientment diferents. Aquests mètodes també

poden fer ús de les diferències espectrals dels productes de reacció formats per tal d'obtenir més informació discriminant del sistema.

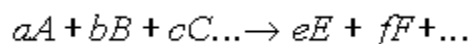
Malgrat les avantatges potencial dels mètodes cinètics, aquests no han estat utilitzats de forma important, com a conseqüència d'algunes de les seves limitacions. Entre elles ressaltar que són mètodes molt dependents de les condicions experimentals de reacció (temperatura, pH, força iònica, presència d'impureses en mostres i reactius, naturalesa dels dissolvents etc.) i que si es volen obtenir mesures reproduïbles és necessari controlar rigurosament tots els factors que poden influir sobre la velocitat de reacció. És precisament la dificultat d'aquest control el que ha fet que en el passat la precisió i l'exactitud dels resultats obtinguts fos pitjor que la dels mètodes basats en l'equilibri. L'altra gran limitació que presenten els mètodes cinètics és la dificultat de tractar eficaçment les mesures obtingudes, ja siguin d'absorbància, fluorescència, etc., per tal d'aconseguir resultats exactes i precisos.

Però actualment molts d'aquests problemes poden ser superats ja que existeixen mètodes automatitzats que permeten reproduir les condicions experimentals i barrejar quantitats exactes de mostra i reactius en el sistema de mescla de forma molt ràpida i reproduïble. Així mateix, és possible registrar l'evolució del sistema de reacció en fraccions de segon mitjançant l'utilització de detectors d'ús habitual en els actuals laboratoris d'anàlisi, com són els detectors de díodes en línia, i per últim, s'estan desenvolupant i aplicant mètodes de càlcul molt potents que permeten processar tota la informació obtinguda de forma molt precisa.

I.2.1 CONCEPTES BÀSICS

Les reaccions cinètiques poden ser en fase homogènia o heterogènia. En aquesta memòria, les reaccions emprades es caracteritzen per tenir lloc en dissolució, i per tant, únicament farem referència als aspectes relacionats amb reaccions en fase homogènia.

Considerem la reacció:



on a, b, \dots, e, f, \dots són els coeficients estequiomètrics i A, B, \dots, E, F, \dots les espècies químiques.

La velocitat de reacció es defineix com el canvi de la composició de la mescla reaccionant amb el temps. La velocitat de desaparició dels reactius i la velocitat de formació dels productes és proporcional al seu coeficient estequiomètric. Per la reacció anterior tenim:

$$velocitat = v = -\frac{1}{a} \frac{d[A]}{dt} = -\frac{1}{b} \frac{d[B]}{dt} = \dots = \frac{1}{e} \frac{d[E]}{dt} = \frac{1}{f} \frac{d[F]}{dt} = \dots \quad (34)$$

Per moltes reaccions, encara que no totes, la velocitat v trobada experimentalment depèn de la concentració d'un o més reactiu, i es pot expressar mitjançant l'equació

$$v = k[A]^{\alpha} [B]^{\beta} \dots \quad (35)$$

on els exponents α, β, \dots són, en general, enters o semienters. La constant de proporcionalitat k , anomenada constant de cinètica/de velocitat o coeficient de velocitat, la qual és numèricament igual a la velocitat quan les concentracions són la unitat, depèn de la temperatura i, en menor grau, de la pressió.

La determinació d'una espècie mitjançant un mètode cinètic es basa en la mesura directa o indirecta de la velocitat de reacció. Per això, s'han de mesurar els canvis de concentració dels reaccionants o productes en funció del temps. Aquestes concentracions poden ser substituïdes per alguna magnitud de mesura que sigui directament proporcional a les mateixes, normalment, a alguna propietat física de la dissolució: absorbància, fluorescència, potencial, temperatura, conductivitat, etc. La corba del senyal obtinguda en funció del temps és de tipus exponencial, positiva o negativa, segons es monitoritzi la formació del producte o la desaparició d'algun reactiu (figura 1.8).

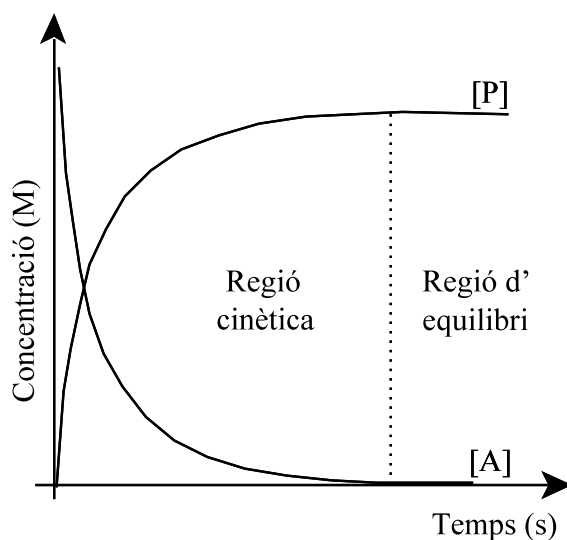


Figura 1.8. Canvis de la [A] i [P] amb el temps.

Per l'anàlisi cinètic de la reacció, el tram clàssicament més interessant és el primer, quan la reacció tant sols s'ha desenvolupat en un 1-3 %, gràcies al fet que aquest és lineal, essent la seva pendent proporcional a la concentració de l'espècie determinada. El seguiment de la velocitat de reacció al tram inicial, velocitat inicial de reacció, ens permet calcular d'una forma molt simple els diferents paràmetres de l'equació de velocitat, com per exemple la constant de velocitat o l'energia d'activació de la reacció.

Per l'anàlisi de mescles de compostos químics mitjançant mètodes cinètics diferencials aquest aspecte és molt important, ja que permet realitzar un estudi preliminar de les espècies pures a determinar, i conèixer d'aquesta manera i de forma orientativa quina és la similitud entre les seves constants de velocitat. Convé destacar també, que per mitjà de l'estudi de les velocitats inicials de reacció quan es modifiquen les condicions experimentals del medi de reacció, temperatura, pH, etc..., es pot determinar la influència d'aquestes variables sobre les constants de reacció de les diferents espècies, i així seleccionar aquells paràmetres que més convinguin per la solució satisfactòria del problema plantejat.

I.2.1.1. CÀLCUL DE LES CONSTANTS DE VELOCITAT

Si suposem el cas de dos reactius, A i B, que reaccionen per a donar un únic producte P, i es manté en gran excés la concentració d'un dels reactius (B, p.ex.), llavors es pot suposar que la seva concentració allarg de la reacció no es modifica, i es pot incloure el valor [B] en la constant k . Es diu llavors que la reacció és de pseudoprimer ordre respecte a [A], essent k_{ap} una constant aparent, que a més de la temperatura depèn de la [B].

$$v = k_{ap}[A] \quad (36)$$

Aleshores, si es segueix alguna propietat física S , que sigui directament proporcional a la concentració de A (p.ex. el seguiment en continu de la absorbància a diferents temps en la mateixa cel·la de reacció), essent S_0 el senyal al començament de la reacció i S_t el senyal a un temps t , la integració de l'equació diferencial de velocitat ens condueix a les següents expressions :

$$\ln(S_t - S_0) = \ln(S_\infty - S_0) - kt \quad (37)$$

$$(S_t - S_0) = (S_\infty - S_0)e^{-kt} \quad (38)$$

És a dir, la concentració de A disminueix exponencialment amb el temps i la representació gràfica de $\ln(S_t - S_0)$ en funció del temps, s'ajusta a una recta de pendent $-k$, cosa que ens permet conèixer el valor de k .

Si el que mesurem és una propietat directament proporcional al producte format S' , fent un plantejament similar s'obtenen equacions totalment anàlogues a les anteriors.

Per les reaccions d'ordre superior a 1 s'arriba a altres expressions [Pérez-Bendito, 1984], on no entrarem en detall en aquesta memòria.

I.2.1.2. CÀLCUL D'ORDRES PARCIALS DE REACCIÓ

La cinètica pot ser també una eina per l'elucidació del mecanisme de reacció. Per a proposar una equació de velocitat d'una reacció química és necessari tant el càlcul previ dels ordres parcials de reacció respecte a les diferents espècies que intervenen en l'equilibri, com de la constant de velocitat (apartat anterior). El càlcul dels ordres parcials de reacció es realitza variant convenientment la concentració de l'espècie en qüestió, mantenint constant i en excés la resta de les concentracions [Pérez-Bendito, 1984]. D'aquesta manera, la velocitat de reacció únicament es veu afectada per l'espècie la concentració de la qual es troba en defècte.

Aleshores, si es parteix de les corbes $S(t)$ obtingudes per a cada concentració de l'espècie el ordre de la qual volem obtenir, i es calculen les seves velocitats inicials (tangent del perfil cinètic a temps inicials), tenim

$$\text{velocitat inicial} = v_0 = k_{ap}[C]^n \quad (39)$$

on n és l'ordre en qüestió i k_{ap} la constant de velocitat aparent, que engloba les concentracions de les altres espècies. D'aquesta manera es pot definir una recta en funció del $\ln C$ el pendent de la qual és n

$$\ln v_0 = \ln k_{ap} + n \ln C \quad (40)$$

Així mateix es faria amb la resta de reactius fins a establir l'equació cinètica.

I.2.2 MÈTODES CINÈTICS DIFERENCIALS D'ANÀLISI

Els mètodes cinètics diferencials es basen en la resolució de mescles d'espècies afins segons la seva diferent velocitat de reacció amb un reactiu comú.

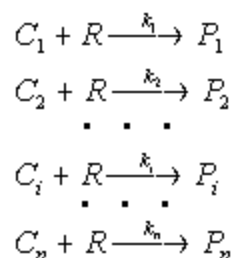
Els mètodes cinètics han estat utilitzats des de fa molt de temps per la resolució de mescles i, durant la passada dècada, van ser publicades varies revisions de les principals aplicacions [Cullen, 1997; Pérez-Bendito, 1996 i 1990; Quencer, 1993; Crouch, 1993; Otto, 1990; Love, 1994 a i b].

Normalment, les reaccions que serveixen de base a aquests mètodes són no catalitzades, encara que s'han aplicat també a la determinació de mescles d'espècies que catalitzen diferencialment una mateixa reacció.

Comparats amb els mètodes de determinació directa, els mètodes cinètics diferencials, no són, en general tan sensibles, però permeten l'anàlisi simultani.

Les reaccions emprades poden ser de naturalesa molt diversa i aplicades tant a l'anàlisi orgànic com inorgànic.

Si considerem varis analits C_i que reaccionen amb un reactiu comú R per a donar el mateix o diferents productes de reacció P_i :



k_i és la constant de velocitat per l'espècie reaccionant C_i . L'equació de velocitat pel component i pot ser escrita com

$$\frac{d[P_i]}{dt} = -\frac{d[C_i]}{dt} = k_i [C_i][R] \quad (41)$$

o si és un producte comú l'equació de velocitat global pels diferents components de la mescla:

$$-\frac{d[P]}{dt} = k_1[C_1][R] + k_2[C_2][R] + \dots + k_i[C_i][R] + \dots + k_n[C_n][R] \quad (42)$$

I.2.2.1. MÈTODES CINÈTICS DIFERENCIALS CLÀSSICS

Marck i Rehnitz [Mark, 1968] l'any 1968, van proposar una classificació dels mètodes cinètics diferencials d'anàlisi basada en l'ordre de reacció, que pot ser considerada com una relació dels mètodes cinètics que avui considerem com a mètodes cinètics clàssics (taula 1.1).

Taula 1.1. Classificació dels mètodes cinètics diferencials clàssics en funció de l'ordre de reacció per un sistema de multicomponents.

ORDRE DE REACCIÓ	CONCENTRACIÓ INICIAL DE LES ESPÈCIES	MÈTODE (numèric o gràfic)
Pseudoprimer ordre respecte els analits	$[R]_0 \gg [C_i]$	Extrapolació logarítmica Punt únic Tangents Equacions proporcionals
	$[R]_0 \gg [C_i]$	Extrapolació logarítmica
	$[R]_0 = [C_i]$	Punt únic
	$[R]_0 \ll [C_i]$	Extrapolació lineal
Pseudoprimer ordre respecte el reactiu	$[R]_0 \ll [C_i]$	Punt únic (Roberts i Regan) Equacions proporcionals

Tal i com queda reflexat a la taula, la aplicabilitat dels mètodes cinètics d'anàlisi a la resolució de mescles, és funció de les característiques del sistema en qüestió com són l'ordre de reacció, la relació de concentracions dels reactius, etc., i que no existeix un mètode que pugui ser aplicat en qualsevol cas de forma general.

Els mètodes que han estat més emprats són els mètodes gràfics d'extrapolació logarítmica i lineal, i dels numèrics, el de les equacions proporcionals. A la bibliografia [Mottola, 1988] es descriuen cada un d'aquests mètodes en detall i es citen diferents sistemes experimentals als que han estat aplicats.

Tots aquests mètodes tenen com a principal limitació la utilització de només unes poques mesures per dur a terme els càlculs, desaprofitant una gran quantitat d'informació discriminant que pot oferir el seguiment de l'evolució d'una reacció en què varies espècies competeixen per un mateix reactiu. Per a donar un exemple, el mètode de les equacions proporcionals, es basa únicament amb el senyal mesurat a dos temps diferents t_1 i t_2 per resoldre un sistema format per dues equacions i dues incògnites com són les concentracions de les espècies d'una mescla binària. La raó d'utilitzar una escassa informació és conseqüència de la instrumentació i sistema de processat de l'època en què van ser desenvolupats aquests mètodes.

Com a resultat de l'ús de poques mesures en els càlculs, cal reproduir molt exactament les condicions experimentals per obtenir resultats precisos, i a més, la qualitat d'aquests resultats es troba estretament condicionada pels valors relatius de les constants de velocitat de les diferents espècies, situació molt desfavorable quan s'aproximen a la unitat ja que representa un augment de l'error en el càlcul de les concentracions, així com per la relació de concentracions dels components de la mescla i en general per la complexitat de la reacció (nº d'espècies). La utilització d'un o altre mètode dependrà doncs de tots aquests factors.

Un anàlisi dels efectes de la relació de les constants de velocitat, i de la composició de la mescla, sobre els errors en els paràmetres mesurats, en els mètodes clàssics més utilitzats, es dona en el llibre de Mark i Rehnitz [Mark, 1968].

També és una limitació important dels mètodes cinètics clàssics, el requisit de conèixer per avançat el model cinètic que segueix el sistema, i que en molts casos sigui necessari conèixer també alguns dels paràmetres de la reacció, com són les constants de velocitat i els ordres de reacció per les diferents espècies. Aquests paràmetres es troben a partir dels components purs on s'assumeix sempre que les velocitats dels analits són independents unes de les altres, és a dir, que la presència d'un analit no modifica el comportament dels altres, i per tant, molts d'aquests mètodes no poden ser utilitzats en presència d'efectes sinèrgics/ interaccions. Aquest efecte no és molt comú, però pot ser una font d'error molt important. Per altra banda, en mostres reals pot ser

que la presència de substàncies no conegudes influeixin en la velocitat de la reacció i que tampoc facin extrapolables aquells valors calculats per a substàncies en estat pur.

En aquests casos només els mètodes que no necessiten el coneixement previ de les constants de velocitat, com és l'extrapolació logarítmica de segon ordre, o bé altres mètodes específics, poden ser aplicats.

Després d'enumerar els desavantatges dels mètodes clàssics, cal remarcar el fet que els diferents mètodes cinètics clàssics van ser desenvolupats per a resoldre situacions concretes i no situacions generals, fent que la aplicació d'aquests en el tractament de les dades de sistemes experimentals només sigui correcta quan es compleixen les condicions que els mètodes requereixen. Això comporta una gran complexitat quan amb aquests mètodes es vol abordar sistemes cinètics reals, i en la majoria de les ocasions s'intenta obtenir aquelles condicions experimentals que permetin tenir reaccions de pseudoprimer ordre respecte als analits, situació que podríem etiquetar com "ideal". Ara bé, no sempre és possible assolir aquestes condicions de pseudoprimer ordre, i això, juntament amb la limitació de què es requereixen grans diferències en les velocitats de reacció per obtenir resultats acceptables, fa que aquests mètodes no hagin estat utilitzats de forma important a la resolució de sistemes reals de multicomponents i que s'hagin restringit a l'estudi teòric/acadèmic.

A mode d'exemple a continuació es mostren les equacions que descriuen les reaccions de pseudoprimer ordre respecte als analits, ja que han estat la base pel desenvolupament de molts dels mètodes cinètics clàssics.

I.2.2.1.1. Reaccions de pseudoprimer ordre respecte als analits

Considerem dos analits A i B que reaccionen amb un reactiu comú R per a donar el mateix o diferents productes, P₁ i P₂.

Quan la concentració de reactiu inicial es troba en un gran excés respecte la suma de les concentracions inicials dels analits, és a dir $[R]_0 \gg [A]_0 + [B]_0$, es diu que la reacció que té lloc segueix una cinètica de pseudoprimer ordre respecte als analits. La concentració de reactiu es pot considerar constant i es té un sistema d'equacions diferencials com el següent:

$$\frac{d[P_1]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = k'_A [A] \quad (43)$$

$$\frac{d[P_2]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = k'_B [B] \quad (44)$$

o si les reaccions donen lloc al mateix producte:

$$\frac{d[P]}{dt} = k'_A [A] + k'_B [B] \quad (45)$$

on $k'_A = k_A [A]_0$ i $k'_B = k_B [B]_0$ són les constants aparents de pseudoprimer ordre respecte a A i B respectivament. Les solucions integrals d'aquestes equacions són:

$$[A]_t = [A]_0 e^{-k'_A t} \quad (46)$$

$$[B]_t = [B]_0 e^{-k'_B t} \quad (47)$$

o si es mesura la concentració dels productes P_1 i P_2 (o una propietat proporcional a ella):

$$[P_1]_t = [A]_0 (1 - e^{-k'_A t}) \quad (48)$$

$$[P_2]_t = [B]_0 (1 - e^{-k'_B t}) \quad (49)$$

Si el producte de reacció és el mateix, P , també es pot escriure en funció de la concentració inicial dels analits segons l'equació següent:

$$[P]_t = [A]_0 (1 - e^{-k'_A t}) + [B]_0 (1 - e^{-k'_B t}) \quad (50)$$

que es pot simplificar per a cada temps com:

$$[P]_t = k'_{A,t} [A]_0 + k'_{B,t} [B]_0 \quad (51)$$

Segons aquestes equacions, podem observar que, tant si es segueix amb el temps la concentració dels analits, com la dels productes, o la d'un producte comú, aquesta és proporcional a la concentració inicial dels analits.

I.2.2.2. MÈTODES CINÈTICS DIFERENCIALS D'ANÀLISI MODERNS

A principis dels anys 80, els mètodes cinètics diferencials d'anàlisi de multicomponents milloren de manera important com a conseqüència del creixement en la utilització de la instrumentació multidimensional. L'ús dels ordinadors juga un paper cada cop més important, tant en l'automatització de la recollida de les dades cinètiques com en el tractament d'aquestes.

A partir d'aquest moment, es porta a terme el registre espectral a varies longituds d'ona a múltiples temps, obtenint-se així molta més informació discriminant, i s'aborda el sistema sobredeterminat per mínims quadrats, tant lineal com no-lineal, millorant molt la qualitat dels resultats [Crouch, 1993; Otto, 1990]. Els nous mètodes de càlcul, juntament amb la instrumentació automatitzada, fa que aquests mètodes cinètics moderns siguin més selectius, i independents de les condicions experimentals, essent d'aquesta manera més competitius amb els procediments basats en l'equilibri.

Una de les tècniques més aplicades ha estat el filtre de Kalman [Brown, 1986], del qual hi ha diferents versions; l'algoritme lineal [Wentzell, 1989] i l'estès [Rutan, 1985; Quencer, 1993].

Però, tot i aquesta millora en els resultats, aquests mètodes continuen presentant algunes de les grans limitacions dels mètodes cinètics clàssics. Tots ells es basen en la postulació inicial d'un determinat model químic físic i es tracta de trobar el model i els paràmetres químicofísics que millor expliquen les dades experimentals mesurades. Normalment es fa una estimació inicial del paràmetre de velocitat els quals s'obtenen a partir dels components purs. El model proposat, bé es coneix amb antelació, o bé es postula i es comprova durant l'ajustament mínimoquadràtic. Moltes vegades resulta difícil la descripció acurada de la reacció o el procés, i es recorre a models locals o a models només vàlids sota condicions restringides. La quantitat de paràmetres a estimar i la qualitat intrínseca de les dades determinen els resultats assolits i poden malmetre'n considerablement la validesa.

Per tant, tampoc aquests mètodes serveixen per un cas general on no es conegui exactament el model ni les constants de velocitat ni s'han descrit aplicacions en casos de presència

d'efectes sinèrgics. De fet, quasi tots aquests mètodes s'han aplicat només a reaccions de pseudoprimer ordre respecte als analits.

A partir dels anys 90, té lloc un salt qualitatiu molt important. Es comencen a aplicar tècniques de calibració multivariables flexibles, les quals no necessiten del coneixement del model cinètic i, per tant, són molt útils en sistemes cinètics complexos.

Una tesi doctoral realitzada per un membre del grup de recerca [Miguel Redón, 1996] estudia l'aplicació de PCR, PLS i ANN en diferents situacions per tal de comprovar la seva aplicabilitat pràctica com a mètodes generals de calibració en sistemes cinètics. Els resultats derivats d'aquest treball són molt satisfactoris. A la bibliografia, Cullen i Crouch [Cullen, 1997], utilitzen la classificació de la calibració en funció de la dimensió de les dades analítiques proposada en [Booksh, 1994] i fan referència a les simulacions com una eina per l'estudi del comportament dels diferents mètodes de calibració front als paràmetres i característiques més importants que afecten a un sistema cinètic (soroll instrumental, fluctuacions de les constants de velocitat, solapament espectral i cinètic, etc.). Per últim, per a cada tipus de calibració exposen les aplicacions existents per a la resolució de mescles. Recentment, a la tesi doctoral d'un altre membre del grup de recerca [Marta Porcel, 2001] es fa una revisió de les aplicacions sorgides recentment dels mètodes de calibració multivariables aplicats a la resolució de mescles.

En el tractament de dades de primer ordre (p.ex. el perfil cinètic a una única longitud d'ona) com d'ordre superior (p.ex. els perfils cinètics a múltiples longituds d'ona), les tècniques més utilitzades fins al moment són PCR, PLS i ANN, essent el PLS la més estesa, ja sigui pel seu alt grau de desenvolupament o per la seva simplicitat.

El PCR i el PLS permeten assolir bons resultats en la majoria de situacions, malgrat tot, són mètodes lineals, i això comporta certes limitacions en situacions clarament no-lineals. En aquests casos les ANN proporcionen millors resultats, però tenen l'inconvenient de què és necessària d'un nombre elevat de mostres per tal de tenir una calibració robusta, i d'un temps elevat a fi d'optimitzar els diferents paràmetres de la xarxa. La compressió de les dades mitjançant un PCA és l'alternativa més emprada per superar aquests problemes.

Més recentment, s'han aplicat tècniques multidimensionals com el PARAFAC i el nPLS [Pettersson, 1997; Azubel, 1999; Esteves, 1999; Saurina, 1997], directament sobre la matriu de dades d'estructura tridimensional. Ambdós mètodes destaquen per la capacitat d'obtenir informació qualitativa del sistema estudiat. Encara que la tècnica PARAFAC ha estat utilitzada

per la quantificació, la seva major aplicació es basa en obtenir els perfils espectrals i temporals de les espècies que reaccionen. Ara bé, les condicions per a poder ser aplicat correctament són molt estrictes, essent la principal restricció la trilinealitat de les dades. El nPLS sembla més prometedor, però no s'han trobat encara situacions que millori els resultats de quantificació respecte la tècnica PLS bilineal, i inclús en ocasions els empitjora [Pettersson, 1997; Azubel, 1999].

I.3. EXPERIMENTAL

El procés de mesura o seguiment del senyal analític en un sistema cinètic es pot dividir en tres etapes essencials susceptibles d'ésser automatitzades:

- (a) preparació, transport i mescla de les espècies involucrades en la reacció,
- (b) mesura i transducció de la variació del senyal analític amb el temps, i
- (c) processat de la gran quantitat de dades mitjançant ordinadors.

En aquesta memòria, el seguiment dels canvis químics (monitorització del progrés de la reacció) es porta a terme, mitjançant mètodes espectrofotomètrics.

A pesar de què en cada un dels nivells d'automatització mencionats hi ha molts aspectes a tractar, en aquest apartat únicament es farà referència a aquells aspectes més pràctics per l'entesa del treball realitzat en aquesta memòria.

I.3.1 SISTEMA DE MESCLA

En aquesta memòria s'ha utilitzat en tots els treballs el sistema de mescla manual per mitjà de l'ús de micropipetes monocanal de volum variable, i agitació magnètica. La agitació es porta a terme mitjançant un mòdul d'agitació intern HP 89055A que disposa l'instrument de mesura, el qual es troba termostatitzat a través d'un bany d'aigua termostàtic Frigiterm S-382. Es tracta d'un sistema molt simple, però que ha permès assolir bons resultats, a l'ésser mètodes cinètics d'anàlisi basats en reaccions relativament lentes.

De les dissolucions a mesclar, s'introdueixen primer a la cubeta de mesura aquelles que són utilitzades per la correcció de la línia base i es manté la cubeta termostatitzada i agitada durant uns minuts, mitjançant l'ús d'un imant de tefló i del pas d'un corrent d'aire a través del dispositiu. Posteriorment, es realitza la correcció del blanc i, mantenint l'agitació i termostatització, s'afegeixen la resta de dissolucions. És convenient que el volum relatiu de les dissolucions afegides sigui petit i que es trobin a la mateixa temperatura que aquella a la que es vulgui realitzar la reacció. Sempre s'afegeix en últim lloc la dissolució que inicia la reacció. El temps necessari per tal d'homogeneitzar la mescla de reactius és diferent del procediment utilitzat en cada cas, i aquest aspecte determina el temps zero o inicial per començar l'adquisició de les mesures. Aquest temps es pot deduir a partir de l'addició d'una dissolució de cromat potàssic a una solució de KOH 0,05 M continguda a la cubeta. El temps de homogenització va ser sempre inferior a 5 s.

És important que durant tot el temps de registre, l'agitació i la temperatura restin constants. L'agitació evita la formació de precipitats i manté homogeni el sistema.

I.3.2 SEGUIMENT DE LA REACCIÓ

En aquesta memòria el seguiment cinètic dels diferents processos s'ha portat a terme mitjançant mesures d'absorbància a la regió UV-visible, utilitzant 3 espectrofotòmetres de díodes en línia: Hewlett-Packard model HP8451A (A), Hewlett-Packard model HP8452A (B) i Hewlett-Packard model HP8453 (C). Els espectrofotòmetres A i B tenen una resolució de 2 nm, mentre que pel C és de 1 nm.

En el cas de l'acetat d'hidrocortisona, per tal d'evitar la fotodescomposició en el transcurs de la reacció, es va incorporar a la cel·la de mesura un filtre de tall (190-300nm).

Tots els espectres d'absorbància es registren amb una cubetes de quars d'1 cm de camí òptic.

L'espectrofotòmetre A és governat per un ordinador HP-85 que posseeix com a perifèrics: una lectora de disquets flexibles model HP 9121D, una ampliació de memòria de 128 Kbytes i un teclat alfanumèric HP 89057A. També es disposa d'un traçador gràfic model HP 7470A com accessori. El software de l'equip incorpora programes pel control de l'instrument, registre dels espectres UV-Visible i posterior manipulació. Ara bé, totes les dades experimentals obtingudes es transfereixen a l'entorn MS-DOS d'un PC compatible, ja que proporciona una major potència i versatilitat en el càlcul matemàtic, així com una millor manipulació per tractar-les. La transferència es fa mitjançant una interfase sèrie RS232C/ HP-829339A que disposen ambdós ordinadors i els corresponents programes de transferència realitzats per membres d'aquest mateix grup de recerca.

Els espectrofotòmetres B i C estan governats per ordinadors personals compatibles a través d'una interfície HP-IB. El software dels equips, HP89530 MS-DOS UV-Vis i ChemStation, respectivament, incorpora mòduls pel control de l'instrument, i pel tractament dels espectres.

I.3.3. PROCESSAT I TRACTAMENT DEL SENYAL

L'aspecte teòric referent al tractament de les dades obtingudes en l'anàlisi de mescles, ja ha estat tractat abans en aquest capítol i no s'entrarà en més detalls, però si en alguns aspectes més pràctics de com s'han dut a terme els càlculs en aquesta memòria.

I.3.3.1. SOFTWARE

Els diferents models de calibració s'han construït utilitzant els algorismes PCR i PLS que es troben incorporats en el programa UNSCRAMBLER (CAMO A/S, Trondheim, Norway) versions 6,1 i 7,5, l'algoritme nPLS desenvolupat per Bro [Bro, 1998] el qual funciona des del Matlab (MathWorks, Sherbon, MA, USA) i que es trobava disponible a través de l'adreça Web <http://newton.foodsci.kvl.dk/foodtech>, i finalment les xarxes neuronals artificials (ANNs) incorporades en el programa Neural-Connection.v. 2.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

Els espectres de primera derivada han estat obtinguts per mitjà de la utilització de l'algoritme de Savitsky-Golay amb un polinomi de segon grau, amb una dimensió de finestra diferent segons el sistema abordat.

I.3.3.2. DISSENY I SELECCIÓ DE LES MOSTRES DE CALIBRACIÓ

En tots els treballs s'ha aplicat un disseny experimental factorial, per la selecció de les mostres de calibració representatives del sistema. L'objectiu és maximitzar i facilitar l'extracció d'informació significativa de les dades generades.

Per altra banda, també s'han aplicat dissenys per estudiar l'efecte de les diferents variables experimentals sobre els diferents sistemes cinètics. En aquest dissenys, l'estratègia adoptada en la majoria d'ocasions ha estat la seqüencial, on s'estableix cada nou experiment després de l'avaluació dels resultats dels experiments anteriors. En aquests cas, l'objectiu és trobar una màxima discriminació entre els senyals de les diferents espècies contingudes en les mescles.

I.3.4. INSTRUMENTACIÓ i APARELLS

Per la determinació cromatogràfica en tots els treballs a excepció de la determinació de levodopa i benserazida, s'utilitza un sistema format per unes bombes LC-10AD Shimadzu (Kyoto, Japan) amb un detector de díodes en línia UV-vis Hewlett-Packard model 1040A HPLC i una *data station* 9153 Hewlett-Packard.

En el cas de la levodopa i benserazida, s'utilitza un sistema de bombes Kontron model HPLC System 600 .

La columna utilitzada en totes les determinacions és una C₁₈ Spherisorb ODS-2 de 5 m, 15 de longitud × 0,46 cm de diàmetre intern o equivalent.

El bany termostàtic SELECTA, model Frigiterm S-382, que s'acobra als espectrofotòmetres UV-Visible durant el seguiment de les reaccions químiques, manté constant la temperatura de la cel·la de mesura amb una precisió de ±0,1°C mitjançant la recirculació d'aigua a través d'aquesta cel·la.

Per les mesures de pH s'utilitza un pH-metre d'alta resolució micropH 2002 Crison.

I.4. REFERÈNCIES

Azubel, M.; Fernández, F. M.; Tudino, M. B.; Troccoli, O. E., *Anal. Chim. Acta*, **398**, 93, 1999.

Beede, K.R.; Kowalski, B.R., *Anal. Chem.*, **59**, 1007A, 1987.

Blanco, M.; Boqué, R.; Cela, R.; Coello, J.; Maspoch, S.; Ortiz, M.C.; Riba, J.; Rius, X.; Ruiz, A.; Sarabia, L.A.; Thomás, X., *Avances en Quimiometría Práctica*, Universidad de Santiago de Compostela, 1994.

Booksh, K.S.; Kowalski, B.R., *Anal. Chem.*, **66**, 782A, 1994.

Bos, M.; Bos, A.; Van del Linden, W.E., *Analyst*, **118**, 323, 1993.

Bro, R., "The N-Way on-line course on PARAFAC and PLS", <http://www.models.kvl.dk/courses/>; 1998.

Bro, R., *J. Chemometrics*, **10**, 47 1996.

CAMO AS, *The Unscrambler, User's Guide*, 1996.

Carlson, R., *Design and Optimization in Organic Synthesis*, Elsevier, Amsterdam, 1992.

Crouch, S.R., *Anal. Chim. Acta*, **283**, 453, 1993.

Cullen, T. F.; Crouch, S. R., *Mikrochim. Acta*, **126**, 1, 1997.

Christ, C.F., *Econometric Models and Methods*, Wiley, New York, 1966.

De Jong, S., *J. Chemometrics*, **12**, 77, 1998.

Despaigne, F.; Massart, D.L., *Analyst*, **123**, 157R, 1998.

Esteves de Silva, G. C. J.; Oliveira, S. J. C., *Talanta*, **49**, 889, 1999.

Finnoff, W., *Neural Computation*, **6**, 285, 1994.

Geladi, P.; Kowalski, B.R., *Anal. Chim. Acta.*, **185**, 1, 1986a.

Geladi, P.; Kowalski, B.R., *Anal. Chim. Acta.*, **185**, 19, 1986b.

Haaland, D. M.; Thomas, E.V., *Anal. Chem.*, **60**, 1193, 1988b.

Haaland, D. M.; Thomas, E.V., *Anal. Chem.*, **60**, 1202, 1988a.

Harsham, R.A.; Lundy, M.E., *Data preprocessing and extended PARAFAC model*, en: Law, H.G.; Snyder, C.W.; Hattie, J.A.; McDonald, R.P., Eds. *Research methods for multimode data analysis*, Praeger, New York, 1984.

Horlick, G., *Anal. Chem.*, **44**, 943, 1972.

International Standard, *Accuracy (trueness and precision) of measurements methods and results, Part 1. General principles and definitions*, ISO 5725-1:1994 (E).

International Conference on Harmonization (ICH). *Validation of Analytical Procedures Methodology*, 1996.

Jackson, J.E., *User's guide to Principal Components*, Wiley, New York, 1991.

Joliffe, I.T., *Appl. Stat.*, **31**, 300, 1982.

Kowalski, B.R.; Brown, R.; Vandegiste, B.G.M., *J. Chemometrics*, **1**, 1, 1987.

Kowalski, B.R., *Chem. Inform. & Comp. Sci.*, **15**, 201, 1975.

Kresta, J.K.; McGregor, J.F.; Merlin, Th.E., *Can. J. Chem. Eng.*, **69**, 35, 1991.

Kroonenberg, P.M., *Three-mode principal component analysis*, DSWO Press, Leiden, 1983.

Kruskal, J.B.; Harshman, R.A.; Lundy, M.E., *Multway data analysis*, in R. Coppi, S. Bolasco (Eds.), Elsevier Science Pub., North-Holland, 1989.

Kruskal, J.B., *Proc. Symp. Appl. Math.*, **28**, 75, 1983.

Long, J.R.; Gregoriou, V.G.; Gemperline, P.J., *Anal. Chem.*, **62**, 1791, 1990.

López-Fandiño, V.M., *Análisis de componentes no-lineales mediante redes neuronales artificiales de propagación hacia atrás: aplicaciones del modelo de Kramer*. Tesis doctoral, Universidad Ramon Llull, Barcelona, 1997.

Love, M.D.; Pardue, H.L., *Anal. Chim. Acta*, **299**, 209, 1994b.

Brown, S.D., *Anal. Chim. Acta*, **181**, 1, 1986.

Love, M.D.; Pardue, H.L., *Anal. Chim. Acta*, **299**, 195, 1994a.

Malinowsky, E.R., *Factor Analysis in Chemistry*, 2a ed., Wiley, New York, 1991.

Mark, H. B.; Rehnitz, G. A., *Kinetic in Analytical Chemistry*, Interscience Publishers, New York, 1968.

- Martens, H.; Naes, T., *Multivariate Calibration*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
- Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, S.N.; Michotte, Y.; Kaufmann, L., *Chemometrics: A textbook*, Elsevier, Amsterdam, 1988.
- McCarrick, C.W.; Ohmer, D.T.; Gilliland, L.A.; Edwards, P.A.; Mayfield, H.T., *Anal. Chem.*, **63**, 1256, 1991.
- Miller, J.C.; Miller, J.N., *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood Limited Publishers, Londres, 1988.
- Mottola, H. A., *Some Kinetic Aspects of Analytical Chemistry*, Ed. John Wiley & Sons, New York, 1988.
- Osten, D.W., *J. Chemometrics*, **2**, 39, 1988
- Otto, M, *Analyst*, **115**, 685, 1990.
- Pérez- Bendo, M. D.; Varcarel, M., Eds., “Metodos Cinéticos de Análisis”, Publicaciones del Monte Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba y Universidad de Córdoba, 1984.
- Pérez-Bendo, M. D.; Silva, M., *Trends in Anal. Chem.*, **15**, 232, 1996.
- Pérez-Bendo, M. D., *Analyst*, **115**, 689, 1990.
- Porcel, M., *Aplicación de técnicas quimiométricas para el desarrollo de nuevos métodos cinético-espectrofotométricos de análisis*, Tesis doctoral, Universidad Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2001.
- Pettersson, A.K.; Karlberg, B., *Anal. Chim. Acta*, **354**, 241, 1997.
- Quencer B.M.; Crouch, S.R., *Analyst*, **118**, 695, 1993.
- Quencer, B.M.; Crouch, S.R., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **24**, 243, 1993.
- Redón, M., *Calibración Multivariable. Aplicación a la Resolución de Mezclas por Métodos Cinéticos*, Tesis doctoral, Universidad Autònoma de Barcelona, Barcelona, 1996.
- Rutan, S.C., Brown, S.D., *Anal. Chim. Acta.*, **167**, 23, 1985.
- Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Tauler, R., *Anal. Chem.* **69**, 2329, 1997.
- Savitzky, A.; Golay, M.J.E., *Anal. Chem.*, **36**, 1627, 1964.
- Sekulink, S.; Seasholtz, M.B.; Wang, Z.; Kowalski, B.R., *Anal. Chem.*, **65**, 835A, 1993.

- Sharaf, M.A.; Illman, D.L; Kowalski, B.R., *Chemometrics*, Wiley, New York, 1986.
- Smilde, A.K., *J. Chemometrics*, **11**, 367, 1997.
- Sutter, J.M.; Kalivas, J.H.; Lang, P.M., *J. Chemometrics*, **6**, 217, 1992.
- Ten Berge, J.M.F., *Convergence of PARAFAC preprocessing procedures and the Deming-Stephan method of iterative proportional fitting*, en: Coppi, R.; Bolasco, S., Eds., Elsevier Science Pub., North-Holland, 1989.
- Vandeginste, B.G.M., *Multivariate Prediction and Calibration, en Scuola Europea di Chemiometria. Garnano*, Vol. 2, Ed. Forina M., Univeritá di Genova, 1990.
- Wentzell, P.D; Karayannis, M.I.; Crouch, S.R, *Anal. Chim. Acta*, **224**, 263, 1989.
- Wise, L.J.; Ricker, L.; Kowalski, B.R., *Pro. Contr. Qual.*, **1**, 41, 1990.
- Wold, S., *Svensk Naturventenskap*, 1974.
- Wold, S., *Kemisk Tidkrif*, **34**, 1972.
- Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., *Chemom. Int. Lab. Syst.*, **2**, 37, 1987.
- Wold, S., *Technometrics*, **20**, 397, 1978.
- Wold, H., *Multivariate analysis*, ed. P.R. Krishnaiah, Academic Press, New York, 1966.
- Wold, H., *Soft Modeling by Latent Variables; the Non-linear Iterative Partial Least Squares Approach, en Perspectives in Probability and Statistics*, Papers in Honour of M.S. Bartlett, ed. J. Gani, Academic Press, London, 1975.
- Wythoff, B.J., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, **18**, 115, 1993.
- Zupan, J. ; Gasteiger, J., *Anal. Chim. Acta*, **248**, 1, 1991.
- Zupan, J.; Gasteiger, J., *Neural Networks for Chemist: An Introduction*, VCH, Weinheim, Germany, 1993.