

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



**DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN LÍQUIDOS
CONCENTRADOS DE HEMODIÁLISIS POR
ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Juan Miguel de la Rubia Comos

Bajo la dirección del Doctor:

Rafael Lozano Fernández

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2040-4



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

**DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN LÍQUIDOS
CONCENTRADOS DE HEMODIÁLISIS POR
ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA**

Juan Miguel de la Rubia Comos



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

**DETERMINACIÓN DE ALUMINIO EN LÍQUIDOS
CONCENTRADOS DE HEMODIÁLISIS POR
ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA**

Memoria que para optar al Grado de Doctor en Farmacia presenta

Juan Miguel de la Rubia Comos

Madrid, Octubre 2.001



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

Química Inorgánica y Bioinorgánica

Rafael Lozano Fernández

Telef. 913.94.16.45 Fax 913.94.17.05

E-mail: rafa@farm.ucm.es

28040 - Madrid

Rafael Lozano Fernández, Profesor Titular del Departamento de Química Inorgánica y Bioinorgánica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA: que el presente Trabajo titulado "Determinación de Aluminio en líquidos concentrados de hemodiálisis por espectrofotometría de Absorción Atómica", llevado a cabo por D. JUAN MIGUEL DE LA RUBIA COMOS ha sido realizado bajo mi dirección.

El mencionado trabajo reúne las condiciones y características necesarias para ser defendido ante el Tribunal oportuno para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente certificado en Madrid a veinte de Febrero de dos mil dos.

Fdo.: EL TUTOR
Dr. D. José Luis Lastres García

Fdo.: EL DIRECTOR
Dr. D. Rafael Lozano Fernández

A Isabel, mis hijos y mis padres

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Dr. D. Rafael Lozano por su orientación y consejos para la realización de este trabajo sin los cuales no hubiera podido terminarlo. Él me animó a comenzar y me ayudó a superar todos los obstáculos que se me presentaron. Sus conocimientos y experiencia en el campo de la Química Bioinorgánica y de la Química Analítica han sido fundamentales para la correcta terminación de esta tesis.

Al profesor Dr. D. José Luis Lastres, director del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, por todas las facilidades otorgadas para la presentación de esta tesis doctoral.

A mi mujer Isabel por haberme apoyado en toda mi vida profesional y por haber sabido renunciar a su tiempo para dedicarlo a nuestra familia y a que yo pudiera concluir satisfactoriamente este trabajo.

A mis hijos por ser un estímulo para mi vida.

A mis padres porque su ejemplo de trabajo abnegado ha supuesto para mí un modelo a seguir.

A mis amigos por contar con su amistad.

A mis compañeros del Parque Central de Farmacia, tanto facultativos como personal auxiliar, porque gracias a su colaboración pude realizar adecuadamente todos los ensayos de la fase experimental de mi tesis.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El aluminio es un elemento muy abundante en la naturaleza y como tal presente en grandes cantidades en la tierra, el aire, el agua, los alimentos, etc.

Hasta la década de los 70 no se empezó a considerar el riesgo que para la salud de los pacientes sometidos a diálisis podía suponer la presencia de cantidades importantes de aluminio en estos preparados.

A raíz de los estudios que indicaban diversas patologías producidas por el aluminio en estos enfermos, se empezó a tomar conciencia de la necesidad de controlar adecuadamente la presencia de este elemento en los líquidos de hemodiálisis.

Diversos autores han propuesto diferentes métodos encaminados a la identificación y cuantificación del aluminio en estos preparados farmacéuticos. Todos ellos son satisfactorios cuando se analizan los líquidos de hemodiálisis diluidos para inyectar al paciente.

Sin embargo, la determinación y cuantificación del aluminio en los líquidos concentrados de hemodiálisis presenta una dificultad añadida como consecuencia de la elevada concentración de sales presentes en él lo que origina un elevado ruido de fondo.

Las farmacopeas europea y española, exigen la cuantificación del aluminio en estos preparados y sitúan su concentración máxima permitida en 100 µg/L o ppbs.

La técnica de espectrofotometría de absorción atómica es muy empleada en la determinación de elementos en cantidades traza aun en matrices muy complejas.

Por ello se ha desarrollado un método que a la vez que sencillo en su realización tenga una precisión y exactitud aceptables.

El gran ruido de fondo producido por la matriz del concentrado de hemodiálisis se resolvió diluyendo la muestra 10 veces en agua calidad absorción atómica, lo que produjo una disminución de la señal de fondo hasta niveles aceptables así como también una disminución de la señal correspondiente al aluminio.

La facilidad de contaminación de las muestras por la abundancia de aluminio presente en el ambiente se solucionó con una elevada limpieza de los materiales empleados en el ensayo.

La carencia de soluciones patrón de líquidos de hemodiálisis con concentraciones conocidas de aluminio se resolvió, durante el desarrollo del método, añadiendo cantidades conocidas del elemento a las muestras a estudiar.

Finalmente, la cuantificación del aluminio se realizó sobre un lote de líquido concentrado de hemodiálisis.

PARTE GENERAL

PARTE GENERAL

I.-EL ALUMINIO Y LOS LÍQUIDOS DE HEMODIÁLISIS

I.1.- INTRODUCCIÓN

Aunque la toxicidad neurológica del aluminio ya se conocía desde antiguo, pues Kopeloff y cols. en 1.942¹ obtuvieron un síndrome epileptiforme al aplicar directamente hidróxido de aluminio en tejido cerebral y Klatzo y cols. desarrollaron en 1.965² de forma progresiva una encefalopatía por inyección repetida subaracnoidea de sales de aluminio, no es hasta 1.976³ cuando se empieza a relacionar la presencia de una demencia en dializados con la existencia de acumulación de aluminio en el sistema nervioso central.

En efecto, fue Alfrey y cols. quienes sugieren la hipótesis del origen de esta demencia a partir de unos estudios previos realizados por estos mismos autores en 1.972⁴ y por Berlyne y cols. dos años antes⁵. Alfrey y cols. publicaron por primera vez en 1.972 casos de demencia en dializados que fueron relacionados con los estudios de Berlyne sobre niveles séricos anormalmente elevados de pacientes que presentaban insuficiencia renal crónica y que de forma regular tomaban geles de aluminio para disminuir la hiperfosfatemia presente en estos enfermos. Igualmente y como un nuevo aporte a todos estos estudios Yates y cols. en 1976 publicaron un estudio sobre degeneración neurofibrilar por cloruro de aluminio⁶.

Así pues, en pacientes que presentan fallo renal crónico y que por tanto deben sufrir un tratamiento con hemodiálisis se observan niveles anormalmente elevados de aluminio en sangre y tejidos debido a que dichos pacientes están sometidos a un importante nivel de exposición a este metal principalmente debido a la ingestión de antiácidos que contienen aluminio con el fin de disminuir la absorción de fosfatos en el intestino y por ende la hiperfosfatemia,

así como y de forma importante en los últimos años, la presencia de niveles de aluminio en el agua para hemodiálisis.

Las tres alteraciones que hoy en día aparecen asociadas íntimamente a la toxicidad por aluminio en pacientes sometidos a hemodiálisis son demencia por diálisis, degeneración ósea y anemia^{7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17}.

La primera de ellas es la “Demencia por diálisis” también llamada “Encefalopatía por Diálisis”¹⁸ los pacientes que mueren por esta causa presentan con frecuencia niveles elevados de aluminio en tejido y cerebro.

La segunda es una progresiva degeneración ósea conocida como “Enfermedad del Hueso”¹⁹.

Finalmente la tercera lesión observada más recientemente afecta a los glóbulos rojos y es una anemia microcítica que se observa en estos pacientes en presencia de cantidades adecuadas de hierro¹⁹.

I.2.-TOXICIDAD POR ALUMINIO EN HEMODIALIZADOS

I.2.A.- DEMENCIA POR DIÁLISIS

La demencia por diálisis o también encefalopatía por diálisis, es una alteración progresiva y normalmente mortal^{4,20} del Sistema Nervioso Central que se presenta en personas dializadas generalmente un mínimo de 2 años antes de aparecer los primeros síntomas^{21,22} y que se caracteriza por trastornos en el hablar, trastornos del conocimiento y del movimiento⁸.

Aparece disartria que inicialmente puede mejorarse con inyecciones de diazepam aunque más tarde se vuelve rebelde también a este fármaco⁸. También aparecen cambios de la personalidad entre los que se incluyen psicosis que terminan en demencia, mioclonía y ataque focales.⁸

El trastorno del habla se caracteriza por unos síntomas característicos como balbuceo y tartamudeo que aparecen relativamente pronto y se intensifican en el curso de la enfermedad²³.

La enfermedad suele ser fatal entre los 6 y 9 meses después de aparecer los primeros síntomas^{7,23}.

Según Dennis L. Andress y Donald J. Sherrard en estudios realizados en pacientes con este tipo de demencia, el 90% de ellos sufrió de trastornos del habla, en el 80% apareció demencia, trastornos motores en el 75% y convulsiones entre el 60 y 90%⁷.

El electroencefalograma muestra brotes multifocales de actividad delta con ondas de elevada amplitud en espiga, más prominentes en los lóbulos frontales^{23,24,25}.

Se producen cambios en la personalidad hasta que los pacientes terminan mudos e incapaces de realizar movimientos voluntarios²³.

I.2.A.1.-Etiología de la demencia

En la actualidad parece bastante probado el origen del aluminio como causa de ciertas demencias. Se han observado niveles elevados de este metal en pacientes que presentaban diferentes patologías como encefalopatía hepática, enfermedad de Alzheimer, cáncer con diversas metástasis y demencia por diálisis^{10,26}.

Merece la pena destacar aquí la confusión que en ocasiones se ha producido entre la demencia por diálisis y el mal de Alzheimer o dicho de otra manera, como si la encefalopatía provocada por exceso de aluminio en pacientes dializados produjera mal de Alzheimer.

Sin embargo en la actualidad esto parece estar descartado teniendo en cuenta que si bien en la enfermedad de Alzheimer parece haber niveles

elevados de aluminio en el sistema nervioso central^{23,27}, los cambios neurofibrilares y las alteraciones bioquímicas son diferentes lo que indicaría una distinta metabolización del aluminio en las dos enfermedades. Igualmente las placas degenerativas que son comunes en la enfermedad de Alzheimer no se han observado en intoxicaciones experimentales de aluminio^{23,27}.

El examen por microanálisis con rayos X de los cerebros de pacientes que fallecieron de encefalopatía por diálisis reveló concentraciones muy elevadas en los lisosomas, cosa que se encontró también en los cerebros de ratas inyectadas sistémicamente con cloruro de aluminio^{28,29}.

Esto podría ser debido a que en esta enfermedad se vería dificultado el acceso del aluminio al núcleo celular o bien que este metal sería secuestrado rápidamente en compartimentos celulares como los lisosomas nombrados anteriormente, antes de que pudiera alcanzar el núcleo³⁰.

Por otra parte, diferentes estudios han demostrado que el contenido en aluminio de las fracciones nucleares y de cromatina de pacientes con enfermedad de Alzheimer eran mayores que los fallecidos por otros desórdenes incluyendo encefalopatía por diálisis^{31,32}.

Además hay que indicar que el contenido de aluminio en el cerebro de personas muertas por demencia por diálisis es superior al contenido observado en enfermos de Alzheimer, si bien en este último caso el metal no se localiza principalmente en las neuronas sino más bien en las células gliales y en las paredes de los vasos sanguíneos^{7,33}.

En resumen, el aluminio debe ser considerado neurotóxico para los mamíferos, se acumula en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer y con demencia por diálisis aunque su localización parece ser diferente. Además el contenido en aluminio de pacientes con demencia por diálisis parece ser superior a la de los enfermos de Alzheimer.

En general niveles por encima de $15\mu\text{g} / \text{kg}$ de peso de tejido cerebral seco suelen ser asociados con la encefalopatía por diálisis mientras que niveles por debajo de $5\mu\text{g} / \text{kg}$ no⁷.

I.2.A.2.-Posibles mecanismo responsables de la demencia por diálisis

Hoy en día no parece existir ya dudas sobre la responsabilidad de la intoxicación alumínica en este tipo de demencia³⁴.

Se han postulado diversos mecanismos como causa de la toxicidad del aluminio en el sistema nervioso central. Ya Alfrey en 1.980 publicó en una revisión de diversos trabajos de investigación que iones tales como el Mg^{2+} , Cu^{2+} o Ca^{2+} eran desplazados por el Al^{3+} de diversos enzimas y de otras proteínas para la función cerebral y que quedaban así inactivadas³⁵.

Otra causa ya sugerida por Alfrey y colaboradores en 1.980 y descrita por Altmann y colaboradores en 1.987 es la inhibición por parte del aluminio del enzima dihidropteridina reductasa^{36,37}. Esta es una enzima necesaria para el funcionamiento del cerebro debido a que es la responsable de que se alcancen en él las concentraciones adecuadas de tetrahydrobiopterina, sustancia necesaria para la síntesis de neurotransmisores como la tirosina y la acetilcolina.

Altman y cols. encontraron que en pacientes sometidos a tratamiento de hemodiálisis los niveles de actividad de la dihidropteridina reductasa en eritrocitos eran menores que los valores esperados correlacionándolos con los niveles de aluminio en plasma.

Aunque los niveles de actividad de la enzima en el cerebro no fueron estudiados, se sugirió que los altos niveles de aluminio en el cerebro deberían conducir a una disminución de la disponibilidad del enzima en dicho órgano. Sin embargo esto todavía se encuentra en discusión.

En cuanto al mecanismo de entrada del aluminio en el cerebro, éste no se conoce todavía.

Autores como López-Hilker y cols. sugieren más recientemente que en el plasma de paciente dializados el aluminio se encuentra unido a proteínas de alto peso molecular así como a una proteína de bajo peso molecular que podría ser la responsable de la neurotoxicidad³⁸.

Otros autores como Farrar y cols. indican que incluso a niveles elevados de aluminio en sangre, la mayor parte del aluminio se encontraría unido a la transferrina³⁹. Sin embargo es posible que pacientes con demencia por diálisis tengan menos capacidad de enlazar el metal con la proteína o bien menos transferrina o una mayor densidad de receptores de transferrina. Con todo, hasta la fecha estas cuestiones todavía no se han estudiado suficientemente y constituyen líneas de investigación futura muy interesantes.

Otros autores como Matsimoto y Joshida sugieren que el paso al sistema nervioso central se haría no sólo a través de la transferrina sino también por medio de los macrófagos para terminar en el líquido cefalorraquídeo.

1.2.A.3.-Tipos de demencia por diálisis

A pesar de todo lo dicho y de todos los estudios realizados hasta la fecha, el conocimiento último de la aparición de este síndrome así como los motivos bioquímicos y fisiopatológicos responsables del mismo permanecen bastante oscuros.

Si bien los informes iniciales publicados sobre la demencia por diálisis fueron todos de pacientes que habían sido sometidos a hemodiálisis crónica durante más de 2 años antes de la aparición de los síntomas, a partir de finales de los 80 se descubrió una forma aguda de neurotoxicidad en pacientes urémicos^{10,11,40,41}.

Este proceso ocurre bajo 3 diferentes condiciones:

-Diálisis realizadas con dializados altamente contaminados con aluminio⁴⁰.

-Administración oral de citratos en asociación con compuestos de aluminio⁴¹.

-Marcada elevación de los niveles de aluminio en plasma como incluso tras la terapia con deferroxamina⁴².

También se ha observado demencia en niños que no han sufrido diálisis pero que por presentar insuficiencia renal precisaron de tratamiento intravenoso y hospitalización. Tales niños sometidos a este tratamiento pudieron haber adquirido la enfermedad de productos intravenosos contaminados con niveles elevados de sales de aluminio^{28,43}. Esto explicaría la existencia de este síndrome en niños no dializados.

También se ha observado un síndrome similar en niños y adultos con niveles elevados de uremia tratados con medicamentos orales a base de citrato y aluminio^{28,40,41,44}.

En resumen, la demencia por diálisis probablemente represente el punto final de un proceso de etiología múltiple, aunque cada vez está más confirmado el papel fundamental del aluminio en estos procesos.

La introducción de tratamientos adecuados del agua y la sustitución parcial del aluminio por sales de calcio, si bien han disminuido notablemente este tipo de síndromes, todavía existe un importante número de individuos con sobrecarga alumínica, como lo demuestra el que durante 1.994 fueron diagnosticados de este problema 209 pacientes en España⁴⁵.

Este problema es importante porque todavía hoy no existe un tratamiento satisfactorio en pacientes con intoxicación alumínica por diálisis. El uso de deferroxamina (DFO) que en un comienzo se pensó podría ser una importante solución⁴⁶, está hoy en entredicho como lo demuestra una reciente encuesta en

nuestro país relacionada con este asunto⁴⁵, en el que sólo un 45% de los pacientes diagnosticados de intoxicación alumínica reciben tratamiento con DFO. El otro 55% no se tratan con este quelante sino que prefieren emplear soluciones con una muy baja concentración de aluminio.

Además un 11% de los centros que en España emplean DFO informaron haber suspendido en algún momento este tratamiento debido a la aparición de efectos indeseables⁴⁵.

Por último, en los últimos años se está estudiando el empleo de la deferiprona L1 como sustitución de la DFO^{46,47}, ya que aquella muestra una mayor capacidad de desplazar al aluminio de las proteínas séricas (80%) frente a la DFO (60%) a concentraciones equivalentes.

I.2.B.-OSTEODISTROFIA RENAL O ENFERMEDAD DEL HUESO POR INTOXICACIÓN ALUMÍNICA

Además de la neuropatía producida por el aluminio en pacientes dializados existe otra patología de interés como es la osteodistrofia renal, problema existente en enfermos sometidos a diálisis periódicas, consecuencia de las alteraciones del metabolismo del calcio-fósforo derivados del fallo renal y del tratamiento con sales de aluminio, precisamente para evitar calcificaciones metastásicas derivadas del uso de sales de calcio como acomplejante del fósforo⁸.

La toxicidad en el esqueleto producida por el aluminio se caracteriza por osteomalacia resistente a la vitamina D, disminución o ausencia de formación del hueso y bajos niveles de hormona paratiroidea (PTH)⁴⁸

Las primeras evidencias de que el aluminio causaba enfermedad ósea en pacientes urémicos dializados surgieron de estudios epidemiológicos en los que se pudo comprobar la asociación de la encefalopatía por diálisis y osteomalacias producidas en pacientes urémicos sometidos a diálisis en los que se empleaba agua con niveles elevados de aluminio^{49,50,51}.

Igualmente está documentada la relación existente entre estas alteraciones y la absorción oral de aluminio^{52,53}, por lo que actualmente se tiende a disminuir la dosis oral de compuestos de este metal asociándolos con otros ligantes del fósforo como son los derivados del calcio^{54,55,56,57,58}.

Además de los datos epidemiológicos, se ha podido comprobar experimentalmente en ratas, perros y cerdos^{59,60} cómo la toxicidad ósea del aluminio proviene de un elevado aumento de los niveles de este metal en los huesos, frente a otras osteodistrofias renales de diferente origen⁶¹. Danton y McClure encontraron cantidades de 8,2 mg/kg de hueso fresco que llegaban hasta los 51 mg/kg si había osteomalacia⁶².

Parece ser que la hormona PTH juega un papel protector de la osteomalacia producida por aluminio. Así, se ha podido comprobar que pacientes con hiperparatiroidismo no desarrollaban osteomalacia incluso cuando eran dializados con productos conteniendo niveles elevados del metal⁶³. Además, se ha observado cómo en enfermos dializados a los que se les extirpó el paratiroides por presentar hiperparatiroidismo secundario a lesiones óseas, desarrollaron osteomalacia⁶⁴.

Inversamente, se ha sugerido que un paciente podría desarrollar hiperparatiroidismo tras la terapia de quelación del aluminio en enfermos con osteomalacia.

Sin embargo, en lo que se refiere a la acumulación del aluminio en el cerebro parece ser que un exceso de PTH, junto a la administración oral de este metal conduciría a un mayor aumento de su presencia en la corteza cerebral incluso en ausencia de fallo renal. como parece probado en el caso de ratas a las que se administró exceso de PTH y sales de aluminio^{65,66}.

El diagnóstico de esta complicación de la diálisis se hace en base a una serie de síntomas característicos como dolor de huesos y fracturas principalmente de costillas y cuello del fémur²³.

Esta enfermedad se confirma tras los análisis óseos donde se pueden apreciar niveles elevados de aluminio especialmente en las zonas de unión entre los osteoblastos y el hueso mineralizado⁸, además los niveles de aluminio en plasma están igualmente elevados.

Los mecanismos por los cuales el aluminio causa daño al hueso todavía no están totalmente aclarados, aunque sí se conocen varias causas de daño óseo por parte de este metal. Así por ejemplo, el aluminio se ha utilizado en la industria de cueros por favorecer las uniones entre la fibras de colágeno y en enfermos dializados con lesiones óseas por aluminio se ha visto cómo este metal actuaba precisamente en este sentido⁶⁷.

Por otra parte y puesto que el aluminio se encuentra presente entre las zonas calcificadas y no calcificadas del hueso, esto podría explicar por qué el hueso no se calcifica a pesar de los niveles adecuados de vitamina D y de un elevado producto calcio-fósforo.

Además también se ha demostrado que el aluminio es un potente inhibidor de las fosfatasas⁶⁸ y es capaz de depositarse en las mitocondrias de los osteoblastos⁶⁹ lo que podría igualmente impedir la formación del hueso.

I.2.C.-TOXICIDAD HEMATOLÓGICA

El aluminio también es tóxico para el sistema eritropoyético. En los seres humanos produce una anemia microcítica e hipocrómica que suele ser reversible tras la eliminación del aluminio^{70,71,72}. Más recientemente se ha podido comprobar cómo el aluminio es capaz de bloquear la respuesta a la eritropoyetina⁷³.

La acción tóxica del aluminio sobre las células rojas se ha podido evidenciar porque la anemia mejora notablemente tras la supresión del aluminio o su eliminación por quelación^{71,72}.

No obstante todos estos datos, debemos decir que los mecanismos específicos de la anemia asociada al aluminio no están todavía suficientemente aclarados. Lo que sí parece, es que el metabolismo del hierro y del aluminio están muy relacionados, pues como el hierro, el aluminio probablemente también es transportado por la transferrina, lo que indicaría que la inducción de anemia por el aluminio sería debida a la descarga de este metal en aquellos lugares biológicos donde debería depositarse el hierro. Por último, el aluminio también actúa inhibiendo las actividades de la ferroxidasa y la ceruloplasmina, con lo que se ve afectado el metabolismo del hierro en el organismo⁷⁴.

I.3.-PREVENCIÓN DE LA INTOXICACIÓN ALUMÍNICA EN PACIENTES DIALIZADOS

Desde que en 1976 Alfrey y colaboradores hablaron del aluminio como posible agente tóxico en personas sometidas a diálisis³, las técnicas de control de todo el proceso así como los equipos empleados han mejorado notablemente, consiguiéndose de esta forma una mayor seguridad, rapidez y comodidad en el tratamiento^{75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85}. Y todo ello a pesar del tratamiento extracorpóreo de la sangre y de las manipulaciones propias de esta técnica tanto del personal sanitario, como de los propios enfermos. Según recientes estudios la muerte accidental durante la hemodiálisis es un hecho que ocurre en una proporción de 1 frente a 76.138 dializados¹⁹.

Las principales causas de intoxicación accidental de los pacientes durante la hemodiálisis se produce por sobrecalentamiento del dializado o bien por contaminación química con ácidos, hipoclorito sódico⁸⁶ o formaldehído (usado para la limpieza de los dializadores) y cloraminas empleadas para la purificación del agua⁸⁷.

También se han descrito intoxicaciones debidas a sustancias hasta ahora desconocidas procedentes principalmente de los tubos de plástico de los dializadores. Tal es el caso de plastificantes como el dietilhexilftalato que se añade a los tubos de polivinilcloruro para aumentar su flexibilidad a bajas

temperaturas y que podrían ir a los líquidos circulantes durante la hemodiálisis. Todos estos plastificantes son altamente tóxicos, pudiendo producir vasculitis cutánea necrotizante e incluso hepatitis¹⁹.

De forma muy ocasional se han podido producir accidentes debidos a supresión por error de los sistemas de alarma de los equipos con las consiguientes consecuencias de subidas o bajadas importantes de la temperatura del dializado o de la exposición de la sangre a líquidos de hemodiálisis de muy baja o muy alta concentración¹⁹.

Muy rara es también la pérdida de sangre del paciente por malas condiciones de los tubos del dializador¹⁹.

Sin embargo de todos estos casos merece destacarse de forma muy importante la contaminación procedente del agua y de los líquidos de hemodiálisis.

I.3.A.-IMPORTANCIA DE LA CANTIDAD DE LÍQUIDO DE HEMODIÁLISIS EN CONTACTO CON EL ENFERMO DIALIZADO

El agua es un vehículo de transporte de numerosos productos que en cantidades anormalmente elevadas pueden dar lugar a importantes intoxicaciones. Tales elementos incluyen moléculas inorgánicas como los fluoruros que se añaden al agua de bebida para prevenir la aparición de caries pero que podrían producir problemas óseos en pacientes dializados sometidos a elevadas cantidades¹⁹.

Los sulfatos y nitratos son contaminantes procedentes de la combustión y los abonos. Las bacterias pueden convertir los nitratos en nitritos que producirán nitrosaminas cancerígenas al contacto con moléculas conteniendo grupos amino tales como el amoniaco o las proteínas.

Las sustancias orgánicas nitrogenadas pueden también combinarse con el cloro añadido para desinfectar el agua, formando cloraminas capaces de producir hemólisis al entrar en contacto con la sangre⁸⁸.

Componentes habitualmente presentes en importantes cantidades en el organismo como el calcio y magnesio pueden producir, en altas concentraciones en el líquido de hemodiálisis el síndrome del agua dura¹⁹, caracterizado por náuseas, vómitos e hipertensión seguido de letargia, debilidad muscular y síntomas agudos relacionados con el sistema nervioso central que recuerdan a la demencia por diálisis⁸⁹.

Sin embargo tiene especial interés destacar aquí la presencia en el agua de elementos en cantidades trazas habitualmente procedentes de la contaminación industrial y que son potencialmente tóxicos especialmente si se somete al paciente a tratamientos prolongados y por tanto a una elevada exposición.

Entre tales elementos se incluyen el cadmio, mercurio, arsénico, cromo, plomo, plata, níquel, boro, talio, estaño, manganeso, estroncio, vanadio y aluminio⁹⁰.

Algunos de estos elementos han sido ya investigados en órganos esenciales como el cerebro (Fig. 1), mientras que otros todavía no lo han sido: Tal es el caso del cadmio, mercurio, níquel, talio, vanadio o boro¹⁹.

Como se observa en la Figura 1 la línea continua (100% de los valores control) representa el valor control para cada elemento. Además del aluminio se encontraron otros ocho elementos traza anormalmente presentes en el tejido cerebral de pacientes con demencia por diálisis.

La medida de la importancia del riesgo potencial del líquido de hemodiálisis en producir intoxicación al paciente, puede suponerse teniendo en cuenta que la diálisis consta de 3,5 a 4 horas de duración por sesión. Actualmente este tratamiento es muy empleado en los centros sanitarios y

presenta una velocidad de flujo del dializado de 500 a 800 mL/minuto⁷⁵. Esto significa que la sangre del paciente “ve” entre 120 y 190 litros de líquido de hemodiálisis durante una sesión estándar de 4 horas, lo que supone casi 100 veces la ingestión diaria media de agua por individuo¹⁹.

De esta manera, un contaminante presente en este líquido a una concentración de 10 µg/L daría lugar a un total de 1.200 a 1.800 µg(ó 1,2-1,8 mg) del tóxico en contacto con la sangre por cada sesión. Suponiendo un total de 12 a 18 horas semanales de diálisis y 52 semanas al año, tendremos que la sangre estaría anualmente en contacto con 187,2 a 280,8 mg del producto susceptible de incorporarse al organismo (tejido óseo, cerebro, etc.), pudiendo eventualmente causar toxicidad con el consiguiente aumento del riesgo de muerte o deterioro orgánico del enfermo.

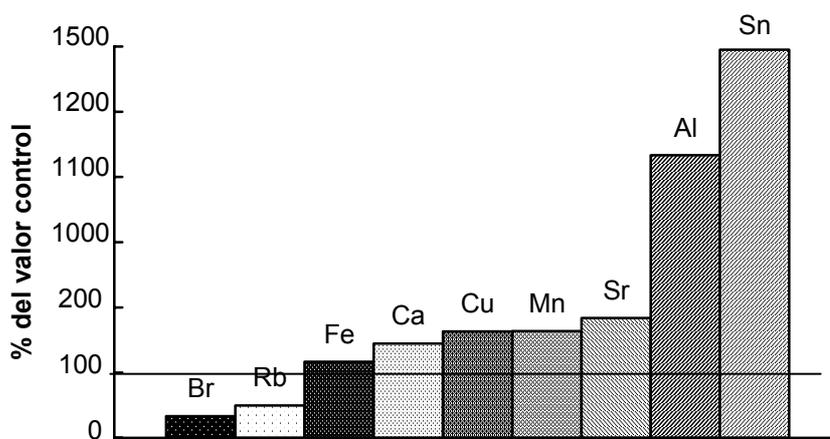


FIGURA 1

Contenido de la corteza cerebral de 9 elementos traza en pacientes con demencia por diálisis.

Tomado de A.I. Arieff, Neurological Complications of Uremia. In Diseases of the Kidney, 5th Edition.

Así pues, en el caso del aluminio, el contenido medio en el cerebro humano es de 230 μg por kg de órgano fresco⁹¹, mientras que en pacientes hemodializados con encefalopatía por diálisis, diversos autores como Platts⁹² y Elliot⁹³ hablan de 12 veces esa cantidad. Sin embargo posteriormente Arieff publicó un estudio realizado sobre 22 pacientes con demencia por diálisis en el que el contenido medio de aluminio fue de 22 mg por kg de peso seco. Teniendo en cuenta que el peso normal del cerebro humano es de 1500 g y de que un 80% es agua, el peso seco es de unos 300 g, por lo que el contenido en aluminio por kg de órgano fresco fue de unos 7 mg⁹⁴, aproximadamente dos veces y media lo estudiado por Platts y Elliot.

No obstante también hay que indicar que el origen de este exceso de aluminio en cerebro no está totalmente claro, pues algo de aluminio también parece que se absorbe tras la administración oral de antiácidos conteniendo sales de este metal^{95,96}.

Además, la retención de aluminio después de la administración oral de sus sales es mayor en pacientes con fallo renal que en sujetos sanos donde la absorción parece ser mínima^{65,95,96,97,98}.

De todos modos estas cantidades aparentemente tan elevadas se cubren de sobra con la ingesta diaria media que viene a ser de 10 a 100 mg de este metal⁹⁹.

I.3.B.-SISTEMAS DE TRATAMIENTO DEL AGUA POR HEMODIÁLISIS

De todas las sustancias en contacto con la sangre del paciente durante la diálisis, es el agua la que se encuentra presente en mayor cantidad, pues los líquidos concentrados de hemodiálisis se diluyen unas 35 veces en agua lo que supone por sesión y paciente un total de 117-185 litros del líquido elemento en contacto con el enfermo.

Es por tanto el agua un factor importante de riesgo de intoxicaciones en enfermos dializados. Por ello, se precisa un adecuado tratamiento del agua que evite problemas que podrían ser graves.

El sistema de tratamiento de aguas de los dializadores puede dividirse en dos partes^{100,101}.

- Pretratamiento por filtros sedimentarios, carbón activo y ablandador
- Tratamiento por ósmosis inversa y/o desionizadores.

I.3.B.1.-Filtros de sedimentación

Compuestos por arena, carbonilla, antracita y canto rodado, retiene partículas superiores a 5 micras de diámetro. Su vida útil es prácticamente ilimitada ya que puede limpiarse periódicamente introduciendo agua en sentido inverso al de uso.

No es necesaria su esterilización pues el agua que le entra es clorada procedente de la red. Se aconseja cada seis meses o un año añadir bisulfito sódico como bactericida y algicida. Puede resultar útil incorporarle un filtro que fije el hierro, cuando la concentración de dicho metal excede de 0,3 mg/L .

I.3.B.2.-Filtros de carbón activo

Su misión es retener el cloro libre del agua procedente de la red, las cloraminas, las sustancias orgánicas y las bacterias. Se basan en el principio de adsorción merced al cual los productos contaminantes quedan fijados en la superficie de las partículas del carbón. La velocidad de adsorción es función del peso molecular de las partículas y moléculas a retener.

Estos filtros constituyen una protección de las membranas de ósmosis inversa. Su vida útil suele ser de dos años por lo que deben ser controladas periódicamente para ver su estado. Puede producirse en ellos contaminación bacteriana que se elimina por la adición de formaldehído y/o bisulfito de sodio

aunque la presencia de estas sustancias pueden disminuir sus propiedades adsorptivas.

I.3.B.3.-Ablandadores

También llamados desendurecedores o descalcificadores. Están constituidos por resinas catiónicas que intercambian los iones calcio y magnesio por iones sodio según el siguiente esquema:



De esta forma el agua tratada se ve enriquecida con unos 5 mEq/L de sodio cuando la concentración inicial de calcio es de unos 100 mg/L .

Los ablandadores también pueden captar hierro, manganeso y aluminio por lo que son muy útiles en la prevención de la intoxicación aluminica.

Estas resinas son muy útiles en la diálisis domiciliaria como solución para ablandar el agua de la red.

Si están bastante tiempo sin usarse los ablandadores pueden contaminarse con bacterias o algas por lo que deberán desinfectarse previamente con formaldehído, hipoclorito de calcio o clorometamina.

I.3.B.4.-Desionizantes

Su principio de funcionamiento es similar al de los ablandadores, ya que también emplean resinas por las que se intercambian cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+) por iones H^+ y aniones (SO_4^- , Cl^- y NO_3^-) por iones HO^- .

Hay de dos tipos: de lechos separados o mixtos.

Los primeros emplean dos depósitos diferentes, en uno de los cuales se eliminan los cationes y en el otro los aniones. Son menos eficientes.

Los segundos utilizan un depósito único y en ellos se obtiene una mejor calidad de agua.

Su principal inconveniente es que debido a la porosidad de las resinas, sufren con frecuencia contaminación bacteriana al quedar retenidos los gérmenes en los pequeños orificios que constituyen los poros de aquéllas, siendo por esto difíciles de purificar.

Actualmente algunas unidades de diálisis los utilizan a continuación de la ósmosis inversa para eliminar los iones fluoruros o nitratos.

I.3.B.5.-Ósmosis inversa

La ósmosis inversa es un procedimiento físico de desmineralización del agua basado en la ultrafiltración del agua contra un gradiente osmótico a presión elevada^{102,103}.

En efecto, cuando se separan dos líquidos uno constituido por una disolución y otro por el disolvente puro mediante una membrana semipermeable, se produce inicialmente un paso de moléculas del disolvente puro hacia la disolución de forma espontánea, hasta que se alcance un punto de equilibrio a partir del cual cesará el flujo neto del disolvente. La presión necesaria que impide una nueva entrada de moléculas de disolvente hacia la disolución se denomina presión osmótica, parámetro que es función directa de la concentración de soluto en la disolución¹⁰³.

Si aplicamos una presión superior a la osmótica sobre el compartimento que contiene la disolución, forzaremos un proceso contrario al anterior en el que el disolvente de la solución es permeado a través de la membrana filtrante, en dirección al compartimento puro, quedando la mayor parte del soluto retenido sobre la superficie de la membrana. A este proceso se le denomina ósmosis inversa¹⁰³.

Este fenómeno de purificación del agua se empezó a emplear en la hemodiálisis a fines de los años 60⁷⁵.

Son diversos los materiales empleados entre los que pueden citarse membranas de acetato de celulosa⁷⁵, o de poliamida TFC ("Composite" en capa fina) de Millipore¹⁰³. Ambas llevan incorporados radicales acetilo.

Pueden emplearse fibras huecas o espiraladas, siendo estas últimas las más empleadas por ser las más eficaces^{75,104}, debido a que la presencia de flujos turbulentos en su interior, impiden el fenómeno Sherwood¹⁰⁵ consistente en la aparición de una segunda membrana formada por la acumulación de los solutos del fluido sobre la del filtro como consecuencia del enlentecimiento del flujo⁷⁵.

El problema que se presenta en estas membranas es que aguas con un pH superior a 7,8 actúan desacetilando a ambos tipos de membrana por lo que pierden su eficacia y por otra parte pueden quedar incrustados en ellas iones de hierro y manganeso. Debido a esto último deben lavarse periódicamente con soluciones de ácido cítrico, bisulfito de sodio y formaldehído para esterilizar⁷⁵.

Son capaces de retener según los fabricantes, más del 95% para iones polivalentes y más del 99% para partículas, bacterias, pirógenos y materia orgánica¹⁰⁶.

Además debemos indicar que tanto los tanques de reserva y las cañerías amén del resto de los accesorios, deberán estar fabricados de material inerte con el fin de que no cedan iones al agua, pues como es sabido, el agua desionizada es muy agresiva al tener una elevada avidéz hacia los electrolitos por lo que los capta con enorme facilidad pudiendo producir intoxicaciones.

Por ello, el material aconsejado para las cañerías es polipropileno atóxico (Solion mv) que deberá ser opaco para evitar la proliferación de algas y los tanques, en la medida de lo posible, se construirán de fibra de vidrio.

No se aconseja mantener en reserva grandes cantidades de agua para evitar su contaminación y si fuera posible pueden instalarse lámparas de luz U.V. que aunque no destruyan totalmente a las bacterias y virus, al menos sí impidan su proliferación.

Finalmente, todo el sistema deberá esterilizarse periódicamente con formaldehído e hipoclorito de sodio con el fin de evitar el crecimiento bacteriano, debiendo enjuagarse todo el circuito durante tiempo prolongado y controlando la posible presencia de estos agentes químicos que podrían ocasionar intoxicación al paciente.

I.4.-NIVELES MÁXIMOS DE ALUMINIO ADMITIDOS EN LOS LÍQUIDOS CONCENTRADO DE HEMODIÁLISIS Y EN EL AGUA PARA DILUIRLOS

Como hemos visto hasta ahora, el aluminio en pacientes dializados es un factor de riesgo importante capaz de producir diferentes lesiones en el sistema nervioso central, huesos y sangre principalmente.

Por este motivo, las autoridades sanitarias, los organismos internacionales y las farmacopeas más importantes, empiezan a establecer niveles máximos admitidos de diversos elementos trazas tanto en los líquidos concentrados de hemodiálisis como en el agua que debe emplearse para diluir dichos concentrados.

Seguidamente se relacionan los límites oficiales habitualmente más empleados:

I.4.A.-NIVELES DE LA ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION (AAMI-USA)^{73,107}.

Los niveles máximos propuestos por esta asociación americana para el agua utilizada en hemodiálisis son:

TABLA 1

Contaminantes	mg/L	μmol/L
Aluminio	0,010	0,37
Arsénico	0,050	0,70
Bario	0,100	0,70
Cadmio	0,010	0,09
Calcio	10,000	250,00
Cloraminas	0,100	2,00
Cloro	0,500	7,00
Cobre	0,100	1,60
Cromo	0,050	1,00
Flúor	0,200	11,00
Magnesio	4,000	167,00
Mercurio	0,002	0,01
Nitratos	2,000	32,00
Plata	0,050	0,46
Plomo	0,050	0,24
Potasio	8,000	205,00
Selenio	0,010	0,13
Sodio	70,000	3.043,00
Sulfato	100,000	1.042,00
Zinc	0,100	1,50

El aluminio se resalta en negrita, con un nivel máximo admitido de 0,010 mg/L (10 μg/L o ppbs).

I.4.B.-FARMACOPEA AMERICANA 1990 (USP XXII)¹⁰⁸

En la edición de esta farmacopea no figura la monografía del líquido concentrado de hemodiálisis ni el agua para diluirlo.

I.4.C.-FARMACOPEA AMERICANA 2000 (USP XXIV)¹⁰⁹

En esta edición si que figura una monografía del aluminio dentro del capítulo “Caracteres Generales, donde hace referencia a la determinación del metal por espectroscopía de absorción atómica en aquellas “sustancias destinadas a usarse en hemodiálisis”. No fija los límites e indica que las concentraciones de las disoluciones empleadas deberán ser las adecuadas para que sean adaptables al rango lineal o de trabajo del instrumento”.

I.4.D.-FARMACOPEA BRITÁNICA. EDICIÓN 1988¹¹⁰

En esta edición de la Farmacopea Británica aparece la monografía de Soluciones Concentradas de Hemodiálisis donde no se cita nivel alguno de metales en cantidades trazas.

Además figura un Anexo¹¹¹ bajo el título “Water for diluting concentrated haemodialysis solutions” donde aunque se indica que se debe prestar particular atención a la posible presencia en el agua de residuos y elementos en cantidades trazas, no aparece ningún nivel máximo admitido. Entre estos elementos se citan especialmente el aluminio, mercurio, estaño, zinc, fluoruros, fosfatos y sulfatos. Igualmente se especifica que será también deseable que el agua esté libre de cloro y ozono.

Sin embargo, se admite que en el caso de que no se disponga de agua recientemente destilada o purificada, podrá utilizarse agua potable en la que se prestará especial atención a los posibles elementos presentes en cantidades trazas.

Merece la pena destacar este aspecto, pues los niveles máximos admitidos para aquellos elementos habitualmente presentes en muy pequeñas cantidades como pueda ser el aluminio, aunque para el consumo de bebida habitual no presentan ningún peligro, son muy elevados frente a las características de calidad que se exigen hoy en día para los concentrados de hemodiálisis y para el agua empleada en su dilución.

En efecto, en la legislación española¹¹² se especifica como Nivel Guía para el aluminio en aguas potables de consumo público 50 ppbs y como concentración máxima admisible 200 ppbs. Es decir, 5 y 20 veces respectivamente la cantidad máxima que actualmente se admite como contenido máximo de aluminio en el agua para diluir soluciones concentradas de hemodiálisis y cuyo valor máximo admitido es de 10 ppbs.

I.4.E.-FARMACOPEA BRITÁNICA. EDICIÓN 1.993^{113,114}

En esta edición ya se refleja el problema de la intoxicación alumínica por diálisis pues en las monografías de ese año acerca de las soluciones concentradas de hemodiálisis y del agua precisa para su dilución, se recogen niveles máximos admisibles.

Así pues, la cantidad máxima de aluminio admitida en los concentrados de hemodiálisis es de 100 ppbs, mientras que en el agua para diluir estos concentrados se especifican 10 ppbs, cosa lógica teniendo en cuenta que la proporción de este agua en los tratamientos de hemodiálisis es muy superior a la del concentrado.

En el addendum de 1.995^{115,116}, aparecen nuevas monografías para los líquidos concentrados y para el agua para hemodiálisis, pero en ambas los niveles máximos admitidos son los mismos que en 1.993.

I.4.F.-FARMACOPEA FRANCESA 10ª EDICIÓN

La última monografía referente al líquido para hemodiálisis es de 1.989 y en ella se fijan los niveles máximos de aluminio en estos preparados, que no deberán exceder de 100 ppbs¹¹⁷.

En el caso del agua para diluir soluciones concentradas de hemodiálisis, debemos decir que hasta el suplemento de enero de 1.989, los niveles máximos fijados de aluminio eran de 30 ppbs¹¹⁸, sin embargo en la revisión de enero de 1.993 los niveles se reducen a 10 ppbs¹¹⁹ igualándose al resto de las farmacopeas que estamos comentando.

I.4.G.-FARMACOPEA EUROPEA 2ª EDICIÓN

Esta farmacopea incluye tanto en su edición de 1988¹²⁰ como en su revisión de 1.991¹²¹ una monografía de “Soluciones Ad Haemodialysum” en donde se hace referencia a que el agua para diluir las disoluciones concentradas deberá ser “agua de calidad apropiada”.

Sin embargo, al describir las características que deben reunir las disoluciones concentradas para hemodiálisis, no figura el aluminio ni ningún otro metal traza y por tanto no designa niveles máximos admitidos de este elemento en estas preparaciones.

Por el contrario, en la monografía de “Agua para diluir disoluciones concentradas para hemodiálisis” aparecida en esta farmacopea en su revisión de 1.992, sí se fija ya un nivel máximo de aluminio y de otros metales y no metales que pudieran estar presentes en este agua, así como ensayos específicos para todos ellos.

En el caso del aluminio, esta cantidad máxima admitida es de 10 ppbs¹²² que es el nivel que actualmente se exige en el agua empleada tanto para preparar los concentrados como para diluirlos.

I.4.H.-FARMACOPEA EUROPEA 3ª EDICIÓN

En la Farmacopea Europea 3ª Edición (1.997), aparece una modificación de la monografía “Soluciones Ad Haemodialysum” de 1.992, donde ya se indica que el nivel máximo de aluminio admitido para estas disoluciones concentradas es de 100 ppbs¹²³. La monografía correspondiente al Agua Para Diluir Líquidos Concentrados De Hemodiálisis, fija los mismos límites (10 ppbs)¹²⁴ que en la 2ª Edición.

Finalmente indicar que en la monografía “Soluciones para Hemofiltración” presente en la BP 93 y en la Farmacopea Europea 3ª Edición (1.997), el límite máximo admitido de aluminio es de 10 ppbs.^{125 126 127 128}

I.4.I.-REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA 1997

En esta Farmacopea, la monografía 0128 (pag. 1.064) Disoluciones Concentradas para Hemodiálisis, fija un nivel máximo de 100 ppbs (100µg/mL) y en la monografía 1167 (pag. 375) Agua para Dilución de Disoluciones Concentradas para Hemodiálisis, el nivel máximo admitido de aluminio es de 10 ppbs.

En el Suplemento 2000 de esta Farmacopea, el nivel máximo fijado para el aluminio en las revisiones de ambas monografías es el mismo, 100 ppbs para las Disoluciones Concentradas para Hemodiálisis (pag. 2.051 del Suplemento) y 10 ppbs para el Agua para Dilución de Disoluciones Concentradas para Hemodiálisis (pag. 1.896 del Suplemento)

II-TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE ALUMINIO

El aluminio es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, puede encontrarse en disolución en las aguas naturales especialmente en forma de catión hexahidratado de fórmula $[\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$, aunque por su carácter anfótero es posible también disolverlo en medio básico formando aluminatos $[\text{Al}(\text{OH})_4]^{-129}$. Además las sales solubles de aluminio como el sulfato aluminico se emplean como coagulantes en el tratamiento de las aguas potables de consumo público¹³⁰.

Por todo ello, han surgido una gran cantidad de técnicas analíticas encaminadas a identificar y valorar este metal en disolución. En este trabajo se comentarán algunas de las más importantes, aunque sin intención de agotarlas todas, clasificándolas según su fundamento físico-químico en:

- Técnicas de absorción molecular
- Técnicas por voltamperometría
- Técnicas por fluorimetría
- Técnicas de espectrometría atómica

II.1.-TÉCNICAS DE ABSORCIÓN MOLECULAR

Estas técnicas están ampliamente usadas especialmente en el campo del análisis de metales trazas en aguas.

Se basan en la absorción de la radiación ultravioleta-visible por especies moleculares que normalmente se forman por complejos entre el analito y diversos ligandos orgánicos e inorgánicos.

Es posible la cuantificación debido a que a ciertas concentraciones, existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de la sustancia que absorbe las radiaciones.

Esto puede expresarse matemáticamente como:

$$A = \varepsilon bc = \log \frac{P_0}{P}$$

donde A representa la absorbancia, ε la absorptividad, b la anchura de la cubeta, c la concentración, P_0 es la radiación incidente y P la transmitida¹³¹.

Dentro de estas técnicas podemos citar:

II.1.A.-MÉTODO DEL VIOLETA DE PIROCATECOL

Este método fue introducido en el análisis del aluminio en agua a partir de un trabajo experimental llevado a cabo por Dugan y Wilson en el centro de Investigación del Agua de los Laboratorios Medmenham entre 1.973 y 1.974^{132,133}.

Se basa en la medida espectrofotométrica a 585 nm de un complejo de color azul formado por la reacción entre el aluminio y el violeta de pirocatecol en una solución tampón a pH 6,1 de hexamina y etanolamina. Suele añadirse una solución de fenantrolina y cloruro amónico con el fin de formar un quelato estable de hierro (II) que evite la interferencia de este catión.

II.1.B.-MÉTODO DE LA ERIOCROMOCIANINA

Este método fue puesto a punto para la determinación de aluminio por Shull y Ghutan en 1.967¹³⁴.

La reacción entre el colorante y soluciones de aluminio tamponadas a pH 6,0 producen un complejo rojo que exhibe máximos a 535 nm.

La interferencia del hierro y el manganeso puede eliminarse por la adición de ácido ascórbico.

II.1.C.-MÉTODO DEL ALUMINÓN

El aluminón (tricarboxilato de oro y amonio) fue durante bastante tiempo un reactivo muy popular para la detección y estimación del aluminio en la industria del agua en el Reino Unido^{135,136,137}. Fue puesto a punto a mediados de la década de los 50. El procedimiento empleado actualmente está basado en los trabajos de Packman en 1.958¹³⁸. Este método fue documentado y aprobado en el Reino Unido^{139,140}.

Se basa en que el aluminio a pH 4,4 produce una coloración rojiza con el agente acomplejante en medio tampón de acetato amónico, determinándose colorimetricamente a 550 nm. Al medio se le añade ácido tioglicólico para inhibir la interferencia debida al hierro y goma acacia para estabilizar el color producido. El ensayo se efectúa a 20°C.

Previamente el agua debe ser tratada con ácido clorhídrico 6N hirviéndose la mezcla durante 30 minutos para prevenir la separación de hidróxido aluminico. Una vez enfriada la solución a 20°C, se neutraliza con NH₄OH 5 N hasta pH 4,4.

Todos estos métodos son adecuados para análisis de aluminio en aguas de bebida, como lo demuestra un reciente y muy completo estudio comparativo entre ellas y otro de absorción atómica, realizado por A.W.S. Mok del Departamento de Aguas Potables de Hong Kong¹⁴¹.

En el cuadro siguiente se observa la precisión de todos ellos para las muestras de agua analizadas.

	Absorción Atómica	Violeta de Pirocatecol	Eriocromocianina	Aluminón
% RSD	2	3	6	3
% Rec	99	99	82	91

Sin embargo, los métodos que emplean absorción molecular tienen como inconvenientes junto a mayores problemas de interferencia, límites de detección más elevados y curvas de calibración lineales a partir de 200ppbs, con la excepción del violeta de pirocatecol que es lineal entre 50 y 200 ppbs^{141,142}.

Además, los cambios en la intensidad de color de la solución final son frecuentes con el tiempo, por lo que si no se controla esta variable los resultados pueden oscilar mucho¹⁴¹.

II.2.-TÉCNICAS POR VOLTAMPEROMETRÍA

Otra técnica empleada para determinar trazas de aluminio en aguas, soluciones de diálisis, soluciones de cloruro sódico y liofilizados^{143,144,145,146,147,148} es la voltamperometría de absorción por diferencial de pulsos y un electrodo de gotas de mercurio.

El método consiste en la adsorción de compuestos orgánicos formados previamente entre el Al^{3+} y ciertas sustancias acomplejantes como la alizarina¹⁴⁹ o el negro de eriocromo¹⁴³ en la superficie del electrodo al aplicar un potencial algo más positivo que el propio de la sustancia electroactiva, registrando la intensidad de corriente al barrer potenciales catódicos (más negativos)¹⁵⁰.

En este método es preciso guardar ciertas precauciones como que la temperatura deberá ser constante en torno a 60°C ¹⁴³ y el medio de la reacción deberá ser tamponado a pH de $7,1 \pm 0,1$ para el método de la alizarina¹⁵⁰, o de $4,5 \pm 0,1$ para el método del negro de eriocromo¹⁴³. Para ello se emplearán soluciones tampón como el BES (solución al 20% de ácido sulfónico N'-bis-(2-hidroxietil)-2 aminoetano en amoniaco 0,5 M o hidróxido sódico 0,5M)¹⁵⁰ o ácido acético/acetato sódico¹⁴³.

Además, el medio de la reacción deberá estar desoxigenado previamente con nitrógeno (unos 3 minutos) para evitar oxidaciones^{143,150}.

En determinaciones de ppbs de aluminio, un exceso de hierro (III) de hasta 10 veces la concentración del metal no produce interferencias¹⁴³.

La interferencia del zinc puede eliminarse con la adición de EDTA 0,1M¹⁵⁰.

El límite de detección de este método para determinaciones de ppbs de aluminio como es el caso de los líquidos de hemodiálisis es de aproximadamente 5 µg/L (5 ppbs)¹⁴³.

Las muestras deberán conservarse en medio ácido (HCl mejor que HNO₃)¹⁵⁰.

II.3.-TÉCNICAS POR FLUORIMETRÍA

La espectrofotometría de fluorescencia molecular es una técnica basada en que ciertas sustancias bajo la acción de radiaciones electromagnéticas de considerable energía como son las correspondientes a las longitudes de onda U.V.-Visible (de 250 a 780 nm aproximadamente) son capaces de presentar el fenómeno de fluorescencia, por el que los electrones más externos de los átomos o moléculas son capaces sin cambiar su spín de pasar a orbitales de más energía. La emisión posterior de luminiscencia en un tiempo menor de 10⁻⁵ s, como consecuencia de la vuelta de los electrones a su estado fundamental, ocasiona el mencionado proceso de fluorescencia.

Esta técnica es oficial en la Farmacopea Europea 2ª y 3ª Edición^{151,152}, en la BP 98¹⁵³ y en la Real Farmacopea Española de 1.997¹⁵⁴.

El aluminio como Al³⁺ es extraído de la muestra (líquido concentrado de hemodiálisis) mediante diversas cantidades de una solución al 0,5% de 8-

hidroxiquinolina en cloroformo, para seguidamente ajustar el pH a 6,0 con HCl^{155,156,157}. Se determina midiendo la fluorescencia producida por la solución problema y otra patrón preparada a base de 1 mL de solución estándar de aluminio (de 2 ppm), 10 mL de solución buffer de acetato de pH 6,0 y 9 mL de agua exenta del metal^{155,156,157}.

En cada caso se deberá poner el instrumento a cero mediante una solución blanco. La longitud de onda de excitación es de 392 nm y la de emisión fluorescente corresponderá a 518 nm.

La fluorescencia (I_1-I_3) de la disolución a examinar no deberá ser superior a la del patrón (I_2-I_3), siendo I_1 la fluorescencia de la disolución a examinar, I_2 la del patrón e I_3 la del ensayo en blanco¹⁵⁷.

También pueden emplearse otros agentes acomplejantes como el rojo de alizarina R, utilizando como longitud de onda de excitación 470 nm y de fluorescencia 500 nm¹⁵⁸.

Con esta técnica se pueden producir interferencias con diversos cationes y aniones siendo su sensibilidad del orden de 0,007 μ g/mL¹⁵⁸.

II.4.-TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA ATÓMICA

La espectroscopía atómica está basada en la absorción, emisión o fluorescencia de átomos en estado elemental.

Existen entre las regiones del espectro electromagnético dos zonas que dan información atómica: la ultravioleta-visible y la de rayos X¹⁵⁹.

Los espectros atómicos de las regiones ultravioleta y visible se obtiene mediante un tratamiento térmico que convierte los componentes de una muestra en átomos o iones elementales gaseosos.

Estas partículas elementales pueden producir emisión, absorción o fluorescencia en las regiones espectrales ya mencionadas y estos procesos servirán para la determinación cuali o cuantitativa de los elementos presentes en la muestra.

Al proceso mediante el cual los componentes de la misma se transforman en vapor atómico se conoce como atomización. Esta etapa es fundamental pues de ella depende en gran medida la precisión y exactitud de esta técnica de análisis^{159,160}.

Todos estos métodos se han aplicado con éxito a más de 70 elementos diferentes pudiéndose apreciar desde partes por millón (ppms) hasta partes por billón (ppbs), con la ventaja adicional de encontrarse entre los procedimientos analíticos más selectivos y rápidos¹⁵⁹. Aun cuando el aluminio puede determinarse también por técnicas de emisión atómica, en el presente estudio nos centraremos en la espectroscopía de absorción atómica que es la técnica analítica empleada en el trabajo experimental.

En la Tabla 2 se relacionan los diferentes métodos de atomización.

TABLA 2

Método de atomización	Temperatura de atomización característica (°C)	Fundamento del método	Denominación común del método
Llama	1.700-3.150	Absorción Emisión Fluorescencia	Espectroscopía de absorción atómica Fotometría de llama Espectroscopía de fluorescencia atómica

Plasma de argón acoplado inductivamente	4.000-6.000	Emisión Fluorescencia	Espectroscopía de plasma acoplado inductivamente Espectroscopía de fluorescencia de plasma acoplado inductivamente
Plasma de argón de corriente continua	4.000-6.000	Emisión	Espectroscopía de plasma de argón de corriente continua
Electrotérmica	1.200-3.000	Absorción Fluorescencia	Espectroscopía de absorción atómica electrotérmica Espectroscopía de fluorescencia atómica electrotérmica
Arco eléctrico	4.000-5.000	Emisión	Espectroscopía de emisión de fuente de arco
Chispa eléctrica	40.000?	Emisión	Espectroscopía de emisión de fuente de chispa

III-ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

III.1.-INTRODUCCIÓN

La técnica de espectroscopía de absorción atómica (EAA) empieza a tener auténtica aplicación práctica a partir de 1.955 gracias a los trabajos desarrollados entre 1.952 y 1.954 por Alan Walsh en el Instituto de Física de Melbourne (Australia) y Alkemade en Holanda^{161,162}

Las ventajas que ofrece esta técnica para la determinación de metales son resumidamente:

-Elevado número de metales a analizar¹⁶³

-Posibilidad de determinación de ppbs del elemento¹⁶³

-Coeficientes de variación bajos (inferiores al 1% en llama y algo más elevados en atomización electrotérmica)¹⁶³

-Relativa rapidez y sencillez de manejo¹⁶³

III.2.-FUNDAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS

El fundamento del proceso de absorción atómica consiste en que cuando los átomos de un elemento en su estado fundamental E_0 son excitados por una radiación suficientemente monocromática y de energía:

$$E=h\nu$$

éstos absorben radiación pasando a un estado excitado E_1 .

Posteriormente, los átomos volverán a su estado fundamental emitiendo esta energía que absorbieron inicialmente, de forma que

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu$$

Esta ecuación es la de Planck y viene a decir que la energía no se absorbe ni se emite de manera continua sino en forma de “cuantos” de luz de energía $E=h\nu$.

La frecuencia ν de absorción y emisión es característica de cada elemento y constituye su espectro de excitación y emisión.

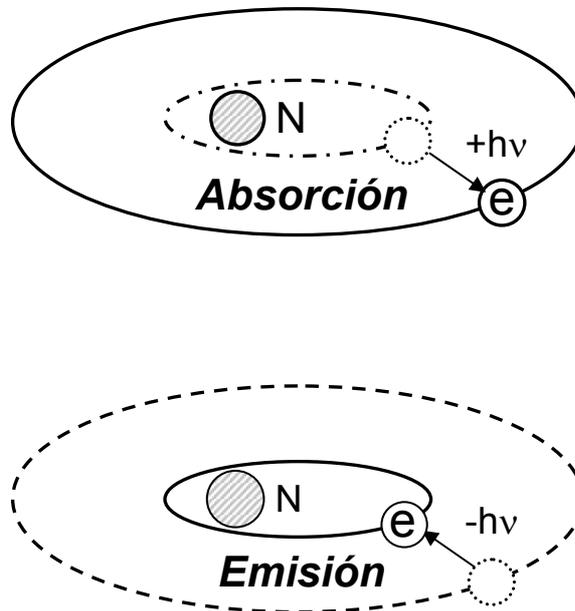
Estudiando los espectros de los diferentes elementos de la tabla periódica se observa que éstos presentan máximos a diferentes longitudes de onda características de cada uno. Así por ejemplo, el calcio absorbe a 2 longitudes de onda diferentes, 239,9 nm y 422,7 nm mientras que el aluminio puede absorber a 237,3, 256,8, 257,4, 309,3 y 396,2 nm.

Como se deduce de lo aquí expuesto el proceso de absorción-emisión es un proceso reversible, de forma que cuando a los átomos se les suministran cantidades elevadas de energía éstos se encontrarán en estado excitado de manera que al volver a su estado fundamental emitirán a una longitud de onda característica, constituyendo la base de la espectroscopía de emisión.

Por otra parte, y como ya se mencionó anteriormente, si sobre un número determinado de átomos de un elemento en estado fundamental se hace llegar una radiación de una longitud de onda determinada y característica de cada elemento, esta radiación puede ser absorbida por el elemento produciéndose una disminución de la intensidad de la radiación que emerge de esta nube atómica que será proporcional a la concentración de esos átomos (cantidad de átomos por unidad de volumen).

Ambos procesos vienen esquematizados en la figura 2

FIGURA 2



Como ya se ha dicho, existe una proporcionalidad entre la concentración atómica y la energía absorbida que viene determinada por la ecuación de Einstein:

$$E_{\text{abs}} = B_{jk} N S_{\nu} h \nu_{jk}$$

en la que B_{jk} es el coeficiente de proporcionalidad de absorción de Einstein para la transición $j \rightarrow k$.

El producto $B_{jk} N S_{\nu}$ indica la fracción de átomos en estado fundamental que son capaces de absorber un fotón de energía $h\nu$ característica por unidad de tiempo. S_{ν} es la intensidad de la radiación espectral de frecuencia ν .

De todo lo anterior se establece que la energía absorbida por los átomos dependerá:

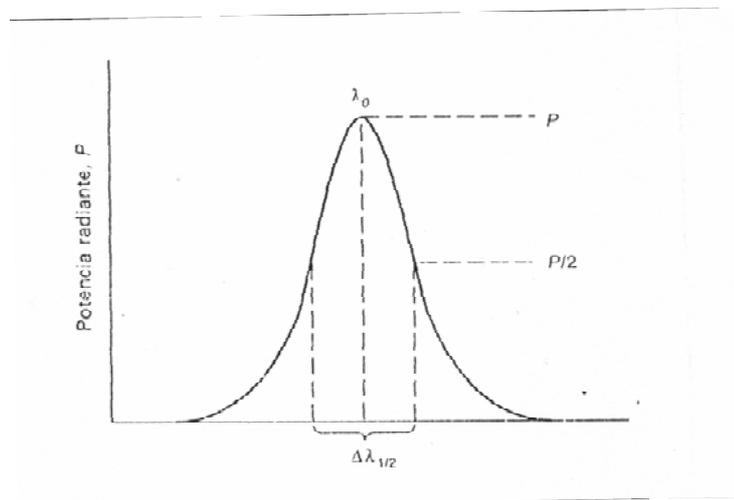
-De la frecuencia de la línea de resonancia ν_{jk}

-De la intensidad de radiación de dicha línea

Sin embargo, aun cuando se pudiera pensar por lo dicho anteriormente que una línea atómica no tiene más que una longitud de onda única, ocurre realmente que diversos fenómenos producen un aumento en la anchura de la línea que lleva a que las líneas atómicas tengan una anchura finita. Dicho de otro modo, aun cuando se pudiera pensar que la anchura de la línea de resonancia de un átomo debiera ser cero, diversos fenómenos como el efecto de incertidumbre, el efecto Doppler, los efectos de presión debidos a las colisiones entre átomos del mismo tipo y con átomos extraños y los efectos del campo magnético y eléctrico, hacen que estas líneas tengan una anchura determinada o anchura de línea efectiva $\Delta\lambda_{1/2}$ (fig.3)^{164,165,166,167,168}.

FIGURA 3

Perfil de una línea atómica mostrando la anchura de línea efectiva $\Delta\lambda_{1/2}$



De todas formas, estos anchos de línea no dejan de ser considerablemente estrechos pues suelen tener unos valores entre 0,002 y 0,005 nm. Esto produce una limitación en la instrumentación ya que no es

posible con lámparas de espectro continuo separar zonas de 0,005 nm. Por ello se han de emplear lámparas especiales que emiten a longitudes de onda con anchos de bandas muy reducidos.

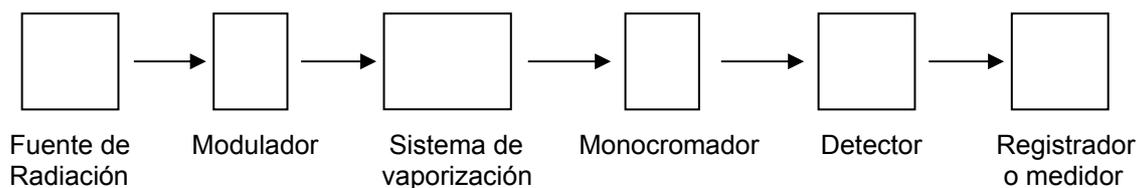
Además como ya se ha visto, la absorción de la radiación electromagnética es proporcional a la concentración de los átomos presentes en la muestra, por lo que esta técnica seguirá la ley de Lambert-Beer, según la ecuación¹⁶⁹:

$$A = \epsilon bc$$

III.3.-INTRUMENTACIÓN

La composición esquemática^{169,170} de los equipos de absorción atómica se muestra en la figura 4.

FIGURA 4



III.3.A.-FUENTES DE RADIACIÓN

Debido a que las líneas de absorción atómica son muy estrechas (entre 0,002 y 0,005 nm)¹⁷¹, no pueden emplearse las lámparas de espectro continuo propias de la espectrofotometría molecular UV o Visible, porque para poderse emplear estas lámparas se precisarían monocromadores que fueran capaces

de seleccionar un intervalo de longitudes de onda (λ, s) muy estrecho, para que la diferencia entre las λ, s de emisión y las de absorción fuera apreciable.

Sin embargo incluso los monocromadores mejores seleccionan intervalos de λ mucho mayores que los de la absorción atómica. Esto lleva a que si se emplearan equipos diseñados para absorción molecular con fines de absorción atómica, se obtendrían curvas de calibración no lineales.

Por ello, se han empleado básicamente dos tipos de fuentes de radiación:

III.3.A.1.- Lámparas de cátodo hueco

Actualmente son las fuentes de absorción atómica más comunes^{171,172}.

Se caracterizan porque el cátodo está fabricado del elemento a analizar con lo que se obtienen líneas de emisión muy estrechas y de las λ, s que van a ser absorbidas por el elemento.

Constan de un cilindro de cristal que en su interior lleva un ánodo y un cátodo con un gas como neón o argón a baja presión (1 a 5 torr). No llevan xenón o hidrógeno porque éstos emiten en un espectro continuo.

El ánodo está fabricado de tungsteno o níquel.

El cátodo es hueco y cilíndrico lo que facilita que la radiación se concentre en una determinada zona del tubo y además facilita que los átomos que vuelven a su estado elemental tras ser excitados se depositen de nuevo en él.

Cuando se produce entre ambos electrodos una diferencia de potencial en torno a 300 V y una intensidad de corriente entre 5 y 20 mA, se ioniza el gas del interior generándose una corriente de iones positivos que golpearán la superficie del cátodo produciendo una nube atómica, fenómeno conocido como chisporroteo¹⁷³. Esto hace que parte de los átomos se exciten para

posteriormente volver a su estado elemental emitiendo una radiación de λ característica de cada elemento.

Presentan el inconveniente de que si bien los potenciales altos y las intensidades de corriente elevadas originan incrementos en la intensidad de radiación, esto da lugar al calentamiento del gas ionizable, lo que provoca por el efecto Doppler un aumento del ensanchamiento de la línea espectral emitida y por tanto una disminución de la sensibilidad de la lámpara. Sin embargo son las más empleadas.

Existen lámparas de un sólo elemento o las multielementos (que constan de varios elementos) lo que permite poder hacer análisis de los mismos con una sola lámpara.

Actualmente son muy utilizados equipos que llevan un revólver con varias lámparas lo que permite realizar estos análisis automáticamente sin desmontarlas y ofrece la ventaja respecto a las multielementos de que no se gasta más que la lámpara del elemento que se está analizando.

III.3.A.2.-Lámparas de descarga sin electrodos

Presentan la ventaja de que producen intensidades de emisión de hasta varios cientos de veces respecto a las lámparas de cátodo hueco¹⁷⁴ y presentan un ancho menor de línea espectral.

Constan de un tubo cilíndrico de cuarzo en cuyo interior está el elemento que va a emitir o su sal correspondiente y un gas como el argón a pocos torr de presión.

En este caso no hay electrodos y el gas inerte se ioniza mediante un generador de alta frecuencia (27 Mhz) lo que origina que los iones del gas actúen sobre los átomos del elemento excitándolos y haciendo que emitan a su λ correspondiente.

Sin embargo presentan como inconvenientes su vida relativamente corta y el que requieren calentarse durante un largo periodo de tiempo. Se usan para elementos como el As, Cs o Rb¹⁷⁵.

III.3.B.-MODULACIÓN DE LA FUENTE

Cuando el sistema de vaporización empleado es la llama, se producen interferencias debidas a la emisión continua de radiación producida por la propia llama. Si bien esta emisión es suprimida en su mayor parte por el monocromador, éste no puede eliminar la correspondiente a la λ del elemento a analizar por lo que se sumaría a la señal propia del elemento que llega al detector.

Por ello, para evitar este problema, los equipos de atomización con llama llevan incorporados a la salida de la lámpara dispositivos que modulan la señal luminosa.

El detector se sintoniza a la misma frecuencia que el modulador para que éste solo registre la radiación modulada y no la que de manera continua emiten los elementos excitados de la llama.

III.3.C.-ATOMIZADORES

La espectroscopía de absorción atómica precisa como su nombre indica, de una atomización de la muestra o dicho de otra manera, de reducir la muestra al estado atómico, para tras una excitación provocada por una lámpara adecuada, leer la absorción producida por los átomos a la longitud de onda preseleccionada.

Por tanto, esta técnica precisa de sistemas capaces de pasar la muestra al estado atómico: son los atomizadores o sistemas de atomización.

Todo proceso de atomización, implica una serie de pasos que pueden resumirse a partir de la muestra líquida, según el esquema de la figura 5.

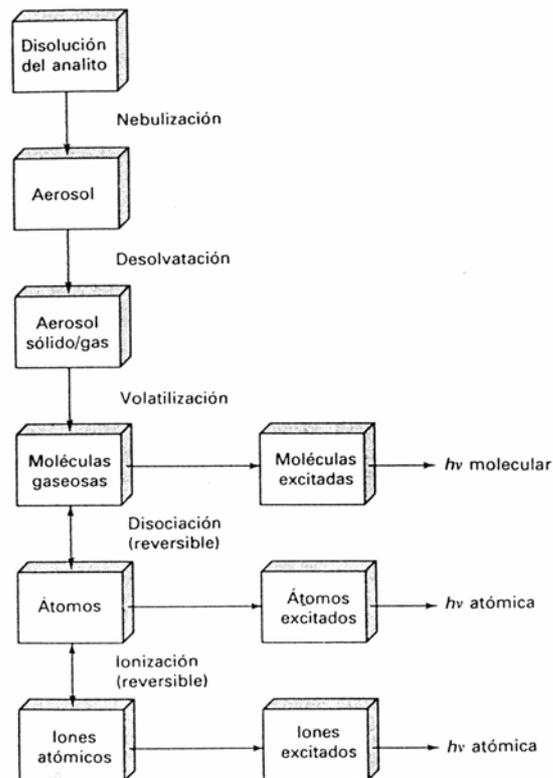
En todo este proceso es fundamental conseguir la mejor atomización de la muestra en orden a aumentar la sensibilidad del análisis.

Los sistemas de producción de vapor atómico son principalmente cuatro:

- Atomización por llama
- Atomización por horno de grafito
- Atomización por generación de hidruros
- Atomización por vapor frío.

FIGURA 5

ESQUEMA DE PROCESOS QUE OCURREN DURANTE LA ATOMIZACIÓN.



III.3.C.1.-Atomización por llama

Esta técnica fue la primera que se empleó en absorción atómica y aún hoy sigue siendo de gran importancia en la espectroscopía de absorción atómica.

La atomización se produce al quemarse en el quemador la mezcla del líquido a analizar en fase vapor con el oxidante y el combustible. Es por tanto importante el quemador que se emplee y la llama que se genere. Estudiaremos ambos brevemente.

III.3.C.1.1-Quemador

Se compone de:

-Sistema de nebulización:

La muestra en estado líquido es transformada mediante un nebulizador al estado de vapor. El tamaño de las gotas debe ser muy pequeño con el fin de que se puedan mezclar íntimamente con el oxidante y el combustible antes de alcanzar la llama. La muestra es aspirada por efecto Venturi gracias al gas que circula a alta velocidad alrededor del capilar. En la mayoría de los casos el gas que circula a alta presión es el oxidante.

El tamaño de la gota juega un papel muy importante. Así pues, gotas de pequeño tamaño son las más recomendables porque además de que se disminuye el tiempo de vaporización, se evita la formación de residuos sólidos tras la vaporización del solvente, lo que puede originar el efecto de "scattering" o dispersión de la luz cuando incida la radiación procedente de la lámpara.

El tiempo de vaporización queda definido por la relación: $t = \frac{d^2}{k}$, donde d es el diámetro de la gota y k es una constante que depende de la temperatura de la llama y de la naturaleza del solvente¹⁷⁶.

En general en estos equipos, el líquido a analizar se mezcla con el oxidante formándose un aerosol que se mezcla posteriormente con el oxidante.

-Cámara de premezcla:

Es un dispositivo donde se separa la fase de vapor que se va a analizar de la fase líquida que se elimina a través de un drenaje.

Para separar ambas fases se emplean deflectores que eliminan las gotitas de líquido.

Otro de los dispositivos es la llamada bola de impacto.

La mayoría de las cámaras de premezcla están fabricadas de polipropileno que es muy inerte y resistente a los disolventes orgánicos.

-Mechero:

El aerosol, combustible y oxidante en forma de vapor pasan a continuación a un mechero donde se queman.

Los quemadores más comunes suelen estar provistos de una ranura de 5 a 10 cm de longitud por donde sale la llama.

Suelen estar fabricados de titanio muy resistente a altas temperaturas y con un adecuado coeficiente de dilatación lineal¹⁷⁷.

Entre los mecheros más utilizados están los de óxido nitroso cuyo camino óptico es de 5 cm de largo y el de aire-acetileno de 10 cm.

III.3.C.1.2.-Llama

En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de mezclas de combustible y oxidante con las temperaturas que se van a generar.

TABLA 3

Combustible	Oxidante	Temperatura (°C)	Velocidad de combustión (cm.s⁻¹)
Gas natural	Aire	1.700-1.900	39-43
Gas natural	Oxígeno	2.700-2.800	370-390
Hidrógeno	Aire	2.000-2.100	300-440
Hidrógeno	Oxígeno	2.550-2.700	900-1.400
Acetileno	Aire	2.100-2.400	158-266
Acetileno	Oxígeno	3.050-3.150	1.100-2.480
Acetileno	Óxido nitroso	2.600-2.800	285

Para trabajar entre 190 y 850 nm (intervalo de longitudes de onda más frecuente en metales), las mezclas más empleadas suelen ser las que llevan oxígeno u óxido nitroso como oxidante pues generan temperaturas muy elevadas (de 2.500 a 3.100°C) con combustibles corrientes como el gas natural, hidrógeno o acetileno. Este tipo de llama es útil para elementos que precisan temperaturas elevadas de atomización como el silicio, molibdeno, vanadio, cromo, titanio o aluminio.

Por el contrario, cuando lo que se emplea como oxidante es el aire y como combustible el acetileno, las temperaturas no alcanzan valores superiores a 2.400°C y sólo se emplean para excitar metales alcalinos y alcalino-térreos (mezclas muy empleadas en la fotometría de llama).

En la generación de la llama son muy importantes la velocidad de combustión y el caudal combustible/oxidante empleado. Si éste fuese demasiado bajo la llama se propagaría hacia dentro provocando un fognazo en el interior de la cámara de premezcla (por esto existen en los atomizadores de llama dispositivos de seguridad para prevenir esta posible incidencia) y si

por el contrario, el caudal fuera demasiado alto, la llama subiría hasta separarse del quemador. Por tanto el caudal es un factor muy importante y debe controlarse rigurosamente.

La llama presenta tres zonas diferenciadas.

-Zona de combustión primaria

-Región interconal

-Cono externo

Todas ellas tienen diferentes temperaturas aunque la zona más empleada es la región interconal por ser en la que se desarrolla más calor. En esta zona es donde se encuentran más átomos en estado fundamental.

III.3.C.2.-Atomización por horno de grafito o electrotérmica

La técnica de espectroscopía de absorción atómica por llama presenta dos limitaciones fundamentales como son, por un lado el volumen de muestra relativamente elevado que se precisa (de 1 a 2 mL por elemento) y por otro el límite de detección (ppms) por lo que no es posible cuantificar cantidades inferiores a los nanogramos (10^{-9} g).

Con el fin de mejorar estas condiciones se idearon otros sistemas capaces de aportar elevadas temperaturas (3.000°C e incluso más) con volúmenes muy bajos de muestra (5 a $100\ \mu\text{L}$). Esto elevaba la sensibilidad a ppbs por lo que se podía llegar a cuantificar cantidades absolutas de picogramos (10^{-12} g).

Los primeros hornos de grafito fueron diseñados por L'vov en 1.961¹⁷⁸. Posteriormente Massman en 1.968 y West y Williams en 1.969 desarrollaron otros dispositivos similares¹⁷⁹. De todos ellos el más empleado en la actualidad es el dispositivo ideado por Massmann conocido como cubeta Massmann.

Este sistema consta de un tubo hueco de grafito a través del cual pasa el rayo luminoso procedente de la lámpara de cátodo hueco.

Este tubo de unos 5 cm de longitud y de un diámetro interno de 0,5 cm posee un orificio superior por donde se introduce la muestra (entre 5 y 100 μL).

Los extremos del tubo son calentados eléctricamente por una corriente de 500 A a 1.000 V.

Mediante un adecuado programa se calienta la muestra que pasa por las etapas de desecación, incineración y atomización, pudiendo alcanzar hasta los 3.000°C en pocos segundos.

Debido a las elevadas temperaturas que se alcanzan, el tubo se encuentra rodeado por una camisa metálica por donde pasa agua de refrigeración. Además por su interior circula un gas inerte (argón) que no solo elimina el aire sino que sirve para desalojar los vapores generados por la matriz evitando asimismo la oxidación del grafito por las altas temperaturas.

Los tubos de grafito tienen el problema de que al ser porosos, permiten en ciertos casos, la difusión de parte del contenido de la matriz y del analito lo que dificulta la reproducibilidad de los ensayos¹⁸⁰.

Para evitar esto, actualmente los tubos son recubiertos de una capa de carbono de alrededor de 30 μ (30×10^{-4} cm ó 0,0012”), con lo que se obtienen los tubos de carbono (grafito) pirolítico.

El recubrimiento se realiza haciendo pasar gas metano mezclado con un gas inerte como el argón a través del tubo a temperatura elevada (2.200°C)^{179,180,181}.

Los cristales de carbono pirolítico producidos de esta manera son depositados paralelamente a la superficie del tubo constituyendo una barrera mejor dispuesta para evitar las pérdidas de los elementos atomizados.

También se han descrito revestimientos metálicos del tubo de grafito para aumentar la sensibilidad de algunos elementos. Es el caso del carburo de tungsteno para la determinación del cobre en fluidos biológicos¹⁸².

Este recubrimiento de la superficie del tubo de grafito produce una serie de ventajas para la técnica de absorción atómica como son¹⁷⁹:

- Mayor impermeabilidad para los gases calientes (o átomos)
- Mayor resistencia a la oxidación que el grafito normal
- Mayor inercia química
- Mayor tiempo de vida para los tubos (de todos modos las altas temperaturas acortan mucho la vida del tubo)
- Para algunos elementos como el aluminio, se produce una disminución de la temperatura de atomización porque el carbono calentado juega un papel importante en la formación de átomos de aluminio gracias a sus propiedades reductoras.

Existen dos tipos de tubos para absorción atómica:

- El que se emplea para utilizar sin plataforma y que posee en su interior dos ranuras que permiten que el líquido se quede depositado entre ambas, lo que le hace especialmente útil para desecar volúmenes grandes de disolventes orgánicos y para evitar que muestras con ácidos concentrados (como el ácido nítrico) se desparramen a lo largo del tubo.

-El que utiliza una plataforma con recubrimiento de grafito pirolítico (plataforma L'vov)¹⁸⁰. Esta plataforma contiene una depresión central que admite muestras de hasta 40 μ L. El efecto de la plataforma es disminuir la evaporación de la muestra hasta que el tubo haya alcanzado una temperatura estable.

III.3.C.3.-Atomización por generación de hidruros

Este procedimiento es empleado para algunos elementos como el arsénico, estaño, selenio y bismuto¹⁸³ que forman con facilidad hidruros volátiles.

El hidruro se obtiene haciendo reaccionar la muestra en medio ácido con una solución de borohidruro de sodio al 1%. Este hidruro volátil es arrastrado por medio de un gas inerte a una cámara calentada a varios cientos de grados donde se descompone obteniéndose el elemento en estado atómico que es analizado gracias a un rayo de luz monocromática que atraviesa la cámara.

Con este método se consigue aumentar la sensibilidad del ensayo entre 10 y 100 veces frente a la atomización simple del elemento por llama u horno de grafito. Además la técnica de generación de hidruros permite emplear equipos de A.A. por llama mucho más económicos que los electrotérmicos.

III.3.C.4.-Atomización por vapor frío

Es una técnica aplicada casi exclusivamente al mercurio y consiste en generar mercurio al estado elemental, normalmente volátil, mediante reducción de las sales de mercurio por el borohidruro sódico.

El mercurio en estado elemental se arrastra mediante un gas a una célula de cuarzo por donde pasa el rayo de luz monocromática correspondiente al mercurio. De esta forma es posible leer concentraciones de mercurio inferiores a 1 μ g.

La ventaja de esta técnica es que permite analizar pequeñas cantidades del metal en el seno de matrices complejas cuyo calentamiento a elevadas temperaturas supondría la pérdida por volatilización del mercurio.

III.3.D.-SISTEMAS DE CORRECCIÓN DE FONDO EN E.A.A.

De una manera ideal, la absorción atómica debería consistir en la absorción monocromática por parte de la masa de átomos que estamos analizando de la radiación procedente de una lámpara de cátodo hueco del mismo elemento a analizar.

Sin embargo, en la práctica esto no es así ya que en la atomización se producen otras especies diferentes a las del analito problema y si estas especies son capaces de absorber la radiación de igual longitud de onda que el problema y además ambas absorciones se superponen en el tiempo, entonces las medidas resultantes serán superiores a las producidas por la especie problema atomizada.

Como consecuencia se producirán errores de medida intolerables.

Las dos fuentes principales de absorción de fondo se producen por la dispersión de la radiación de resonancia debida a las partículas sólidas y por la absorción debida a especies moleculares originadas durante la descomposición de la matriz de la muestra.

Parte de estos problemas, especialmente los debidos a la dispersión de la radiación, pueden ser corregidos variando el programa de temperaturas e incluso modificando la matriz con vistas a separar en el tiempo la absorbancia del analito de la producida por la matriz.

Este efecto de separación en el tiempo de la absorción no atómica debida a los componentes de la matriz de la absorción atómica del analito, se puede

realizar mediante efectos interferenciales controlados químicamente (habitualmente denominados “modificadores de matriz”)¹⁸⁴.

Sin embargo no es posible en todas las ocasiones conseguir esta separación de ambas absorciones (analito y fondo) por lo que se precisan sistemas que corrijan la absorción originada por la matriz.

El procedimiento más habitual consistirá en sistemas que midan simultáneamente la absorción total de la muestra (analito y fondo) y la absorción sólo del fondo.

De esta manera, por diferencia de ambas señales obtendremos la absorción correspondiente al analito.

Hoy en día son dos los procedimientos más frecuentes en la espectroscopía de absorción atómica, la corrección de fondo por lámpara de deuterio y la corrección de fondo por efecto Zeeman.

III.3.D.1.-Corrección de fondo por lámpara de deuterio

Este sistema fue históricamente el primero que se empleó con eficacia¹⁸⁵ y aún hoy en día tiene una gran aplicación en espectroscopía de absorción atómica tanto de llama como de horno de grafito.

Esta técnica descansa en tres premisas:

-El efecto scattering o de dispersión de la luz es constante en toda la anchura de banda usada habitualmente (0,5 nm).

-La absorción molecular debida a los componentes de la matriz es constante también a lo largo de todo el ancho de banda.

-La línea de absorción atómica es mucho más estrecha (0,002 nm frente a 0,5 nm).

Según esto, la radiación proveniente de la lámpara de cátodo hueco es absorbida por los componentes de la matriz y por los átomos del analito y dispersada por las partículas sólidas mediante el efecto scattering. Todo ello se traducirá en una menor señal en el detector (A_t o absorción total).

Alternativamente, la radiación proveniente de la lámpara de deuterio será absorbida por todos los componentes de la muestra, sin embargo la anchura de rendija se ajustará con un ancho suficiente (0,5 nm) para que la absorción por parte del analito sea despreciable (A_f o absorción de fondo).

Por tanto la diferencia de absorciones dará lugar a la absorción correspondiente al problema (A_a o absorción del analito):

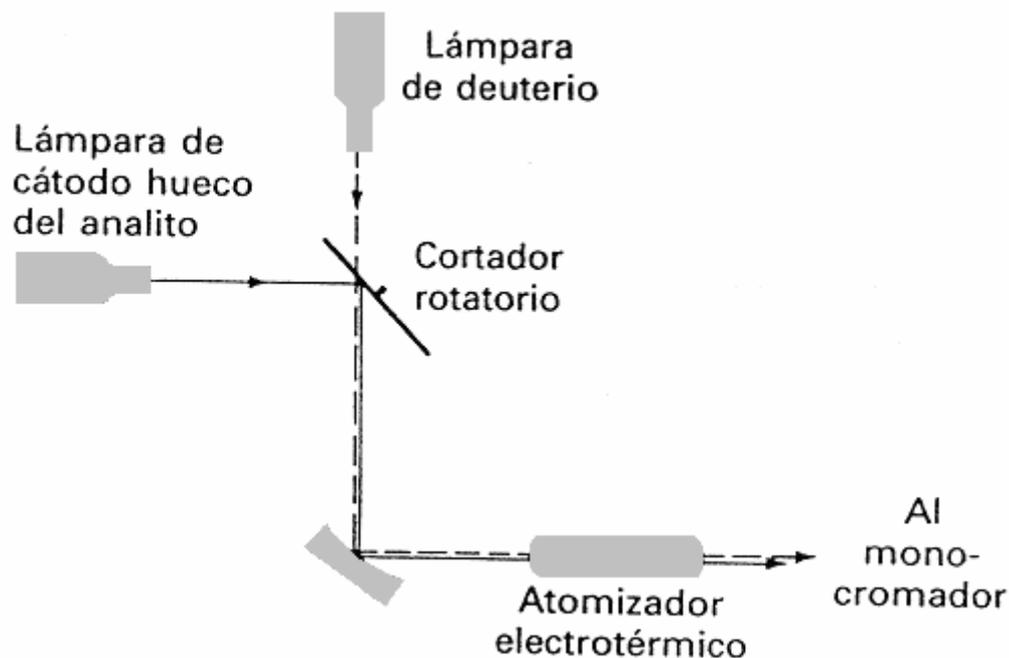
$$A_a = A_t - A_f$$

La figura 6 muestra en esquema un sistema de corrección de fondo por lámpara de deuterio.

Como puede observarse, el cortador rotatorio permite que alternativamente lleguen al detector atravesando el tubo de grafito, la radiación procedente de la lámpara de cátodo hueco y la proveniente de la lámpara de deuterio.

Sin embargo, este procedimiento presenta inconvenientes de corrección debidos a varias causas como la inevitable degradación de la relación señal/ruido que ocurre cuando se emplean alternativamente dos lámparas y un cortador, además de la escasa homogeneidad de los medios gaseosos a altas temperaturas lo que lleva a que ambas lámparas deben estar muy bien alineadas para que lean en el mismo punto, pues de lo contrario las variaciones de la composición del vapor atómico se traducirán en importantes errores de lectura positivos o negativos.

FIGURA 6



Por último, la radiación emitida por la lámpara de deuterio en la zona del visible es de intensidad tan baja que no hace posible su utilización a longitudes de onda por encima de los 350 nm¹⁸⁶.

III.3.D.2.-Corrección de fondo por efecto Zeeman

A pesar de que la corrección de fondo por lámpara de deuterio es un sistema muy usado en la actualidad, los inconvenientes apuntados anteriormente hacen que en los equipos de absorción atómica por cámara de grafito, cada vez sea más utilizada la corrección de fondo por efecto Zeeman.

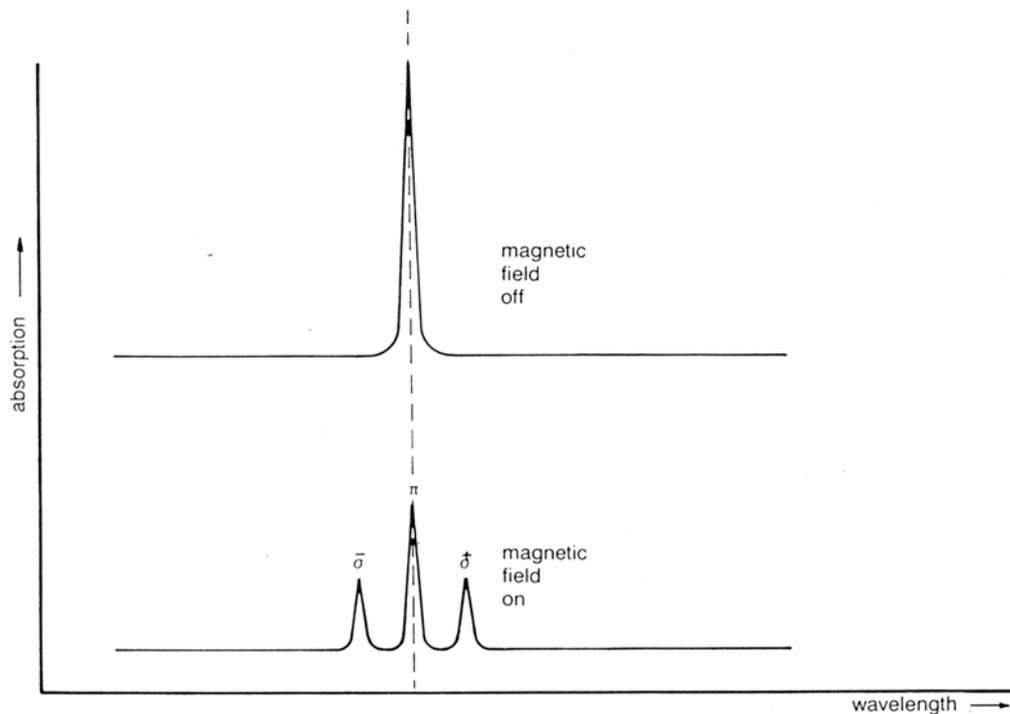
Se denomina "efecto Zeeman" a la descomposición que se produce en las líneas espectrales atómicas cuando éstas se someten a la acción de un campo magnético de cierta intensidad (0,1 a 1,0 Tesla)¹⁸⁶.

De esta manera, en presencia de un campo magnético la línea de absorción del vapor atómico de un elemento (Figura 7) se descompone en una

línea central de la misma longitud de onda (transición π) y en otras dos simétricamente desplazadas con respecto a la π , denominadas transiciones σ ($-\sigma$ y $+\sigma$ para longitudes de onda mayores y menores respectivamente).

FIGURA 7

EJEMPLO DEL EFECTO ZEEMAN EN LA LÍNEA DE EMISIÓN/ ABSORCIÓN DEL Cd (288,8 nm).



Este efecto observado por el físico alemán Zeeman en 1.897 ha servido de base para la corrección de fondo en los modernos equipos de absorción atómica electrotrémica.

El fundamento de este fenómeno aunque bastante complejo, puede resumirse teniendo en cuenta que este tipo de transiciones espectrales de los vapores atómicos son la resultante de la interacción de la fuente de radiación con los electrones de valencia más externos en movimiento alrededor del núcleo atómico.

De esta manera, cuando la radiación es paralela a un campo magnético aplicado, se produce una absorción del componente π de la radiación descompuesta por dicho campo, mientras que cuando la radiación incide perpendicularmente al campo magnético la absorción se produce por el componente σ . Para orientar la radiación con respecto al campo magnético se emplean polarizadores fijos o móviles según el equipo.

Este efecto es conocido como Zeeman Normal, pues existen otras descomposiciones de las líneas atómicas espectrales más complejas en las que se encuentran involucrados además del momento angular de los electrones de valencia los momentos de espín, que se conocen como Zeeman Anómalo.

En base a este fenómeno es posible corregir la absorción de fondo de muestras en espectroscopía atómica. Un esquema de este equipo se representa en la figura 8.

En este esquema, el campo magnético está modulado y el polarizador es fijo y está orientado perpendicularmente a la dirección del campo aplicado.

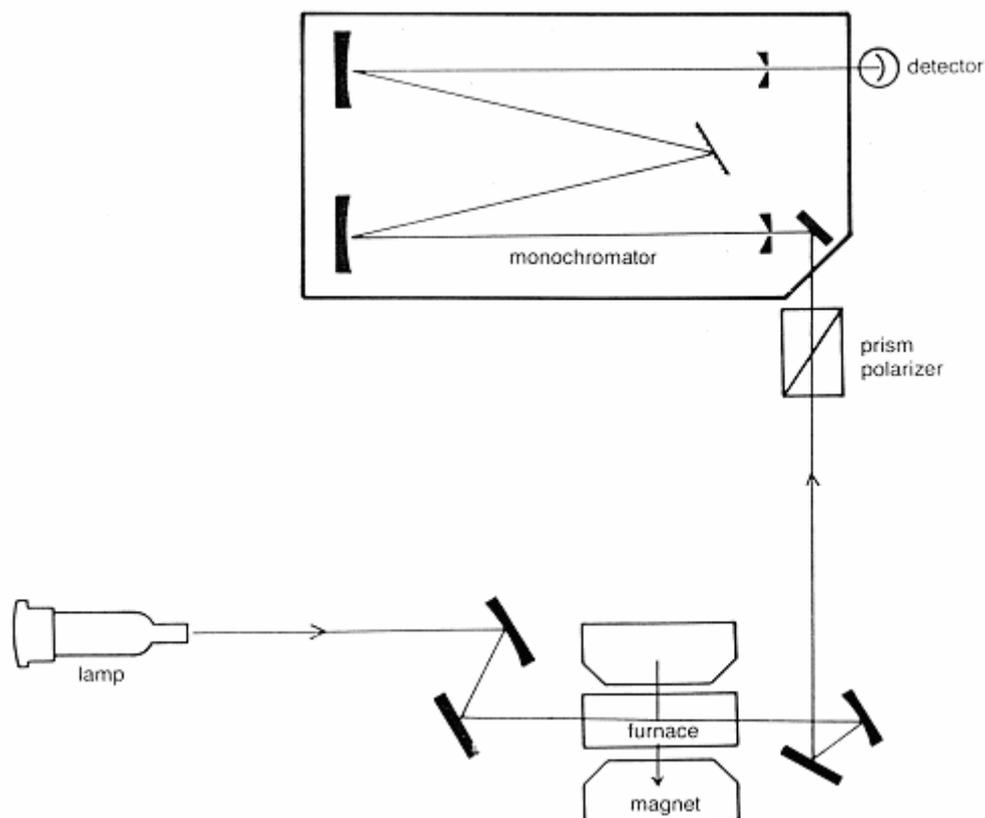
Cuando el electroimán no está funcionando, se produce la absorción de la radiación por parte del analito y del fondo. Sin embargo, con el campo magnético conectado, hay absorción del fondo y de los componentes σ que se encuentran a una λ lo suficientemente alejada de la λ del analito de forma que resulta una absorción atómica de cero. Por tanto por diferencia entre ambas absorbencias es posible eliminar la absorción de fondo.

Aunque este sistema es uno de los más empleados, existen sin embargo otros como los que emplean un polarizador móvil de manera que cuando la radiación polarizada sea paralela al campo magnético aplicado habrá absorción del analito y del fondo, mientras que cuando la radiación polarizada sea perpendicular al campo habrá absorción del fondo y del componente σ del

analito que como ya se ha dicho no supondrá absorción apreciable y por tanto por diferencia se podrá igualmente corregir el fondo.

FIGURA 8

CONFIGURACIÓN ÓPTICA DE UN ESPECTROFOTÓMETRO DE A.A.



Otros sistemas mucho menos empleados son los que aplican el efecto Zeeman a la lámpara de cátodo hueco con lo que la descomposición no es de la radiación absorbida sino de la emitida por la lámpara. Sin embargo, esta solución no es tan adecuada pues entre otras cosas, las lámparas de cátodo hueco no operan adecuadamente en presencia de campos magnéticos elevados¹⁸⁶.

La corrección de fondo por efecto Zeeman es particularmente útil en muestras con fondos que presentan una gran absorción como suero, orina o líquidos de hemodiálisis.

III.3.E.-SISTEMAS ÓPTICOS

Finalmente comentaremos dentro de la instrumentación empleada en la absorción atómica, el sistema óptico encargado de conducir y dispersar las radiaciones procedentes de la lámpara. Básicamente se pueden dividir en:

-Lentes y espejos

-Redes de difracción

III.3.E.1.-Lentes y espejos

Se emplean para conducir la radiación a lo largo del trayecto óptico del equipo.

Los espejos tienen una pérdida de energía en torno a un 4%.

Presentan el inconveniente de que se deterioran fácilmente y el ozono generado por la lámpara de deuterio puede dañar el aluminizado del espejo.

Sin embargo son mucho más económicos que las lentes y no precisan corrección en la distancia focal con el paso del tiempo.

Las lentes sin embargo, aunque más caras que los espejos presentan la ventaja de que no sufren deterioro y además pueden limpiarse con facilidad.

En la actualidad se prefieren las lentes a los espejos en los equipos de A.A.¹⁸⁷.

III.3.E.2.-Redes de difracción

Son los sistemas dispersivos empleados habitualmente en A.A.

Suelen estar constituidos de una lámina de aluminio dividida en surcos iguales y paralelos. Al incidir la radiación sobre las marcas de la superficie se produce la difracción según las diferentes longitudes de onda.

El poder de resolución de la red viene dado por la fórmula

$$R=mxN$$

donde N es el número de líneas o surcos en cm y m la longitud de la misma en cm¹⁸⁸.

Una red para las regiones UV-Visible contiene entre 30 y 200 surcos/cm, siendo los más comunes entre 120 y 140 surcos/cm¹⁸⁹.

Cuando se utilizan espejos, como poseen un ángulo sólido mayor que las lentes, el ancho de su luz de iluminación es mayor que el de éstas por lo que precisan redes de mayor tamaño que puedan recoger todo el haz de iluminación¹⁸⁷.

III.4.-INTERFERENCIAS

En la bibliografía se han descrito principalmente dos tipos de interferencias fundamentales, físicas y químicas^{179,190,191,192}. Igualmente se han descrito aunque en menor extensión interferencias espectrales^{179,193,194}.

III.4.A.-INTERFERENCIAS FÍSICAS

Este tipo de interferencias puede ser debido a diversos efectos como la viscosidad y la tensión superficial que si bien son de menor importancia que en la A.A. con llama, no deben despreciarse.

La pérdida de radiación por dispersión de la luz o absorción molecular en la muestra atomizada en el tubo de grafito, puede también causar una

disminución falsa de la señal que puede inducir a error a menos que sea corregida. Esta atenuación es típica de la A.A. con horno de grafito por lo que resulta fundamental utilizar la corrección de fondo que proporcionan los equipos.

III.4.B.-INTERFERENCIAS QUÍMICAS

Tal vez sean las más importantes en cuanto a garantizar una mayor exactitud en la respuesta.

Normalmente estos procesos se traducen en una disminución de la señal que llega al detector como consecuencia de la pérdida del analito.

Esto suele ser debido a:

-Formación de compuestos volátiles con el elemento problema que dan lugar a la pérdida de éste cuando se alcanzan las temperaturas de secado o calcinación (es decir a temperaturas relativamente bajas). Así por ejemplo, ciertos elementos como el plomo, estaño o zinc, forman cloruros volátiles en presencia de exceso de ion cloruro (caso del agua de mar por ejemplo). El cloruro del metal se puede volatilizar antes de que ocurra su descomposición y posterior liberación del metal.

-Formación de compuestos estables que no se volatilizan a elevadas temperaturas por lo que no se liberará el elemento al estado atómico. Esto es lo que ocurre con algunos elementos que pueden formar carburos estables que no se descomponen ni a temperaturas de atomización. Ello puede dar lugar a la aparición del efecto memoria que se produce cuando no se ha eliminado todo el problema depositado con una primera inyección, por lo que al hacer la segunda se acumula parte de la cantidad de problema correspondiente a la primera adición. Esto conlleva lógicamente un aumento de señal tras la segunda inyección. A pesar de este problema ciertos metales que forman carburos estables pueden analizarse por A.A. como el Ba, V, Mo y Ti.

Sin embargo hay otros casos como el tántalo, volframio o zirconio que no pueden ser analizados satisfactoriamente por esta técnica debido a la formación de carburos.

La adición de modificadores químicos, la modificación del programa de temperaturas y el empleo en algunos casos de plataformas pirolíticas son variaciones que pueden aumentar la exactitud cuando se presentan estos problemas.

III.4.C.-INTERFERENCIAS ESPECTRALES

Estas interferencias son menos frecuentes en A.A. con corrección de fondo Zeeman. Suceden cuando las líneas de absorción del fondo están próximas a la línea de absorción/emisión del elemento a analizar. Cuando se pone en marcha el campo magnético, las líneas espectrales de los componentes de la matriz se desplazarán hacia la línea del analito, solapándose ambas y dando lugar a un error en la medida.

III.5.-MODIFICADORES QUÍMICOS

Uno de los principales inconvenientes que presenta la técnica de A.A. es la falta de señal suficiente (poca absorción) del elemento a analizar. Esta deficiencia de la señal puede ser debida al elemento en sí, a la composición de la matriz o a ambas cosas.

El empleo de modificadores químicos se orienta a solucionar dichos problemas mediante una o varias de las siguientes actuaciones¹⁷⁹.

-Modificar, aumentando o disminuyendo la temperatura de atomización del elemento con el fin de evitar la absorción de fondo o la correspondiente a otros elementos y por tanto incrementar la exactitud de la medida.

-Aumentar la temperatura de calcinación reduciendo la volatilidad del analito con el fin de facilitar la eliminación del material de la matriz antes de la atomización.

-Disminuir la anchura del pico correspondiente a la absorción del elemento evitando así la aparición de picos anchos correspondientes a la descomposición y posterior absorción de elementos procedentes de especies moleculares procedentes de la matriz.

Así por ejemplo, se ha comprobado cómo la adición de ácido fosfórico a muestras de plomo, cadmio o zinc (en forma de nitratos) suponía un aumento de la temperatura de atomización de estos elementos¹⁷⁹.

Esta propiedad es empleada para reducir la volatilidad del plomo y cadmio además de producir un estrechamiento considerable del pico correspondiente al elemento^{195,196}.

Un problema importante en A.A. suele ser el agua de mar que se comporta como una matriz muy compleja debido a la elevada cantidad de sales presentes en ella (especialmente cloruro sódico) lo que da lugar a una elevada absorción de fondo.

Con el fin de obviar esta dificultad, se ha empleado nitrato amónico adicionado al agua de mar, en la determinación de cobre. Gracias a esta sal disminuye la señal de la matriz y aumenta considerablemente la del cobre^{191,197}.

Más recientemente se ha comprobado¹⁷⁹ cómo el empleo de modificadores que forman fuertes complejos con este metal como el EDTA y sales de citrato y oxalato, son más útiles que el nitrato amónico, permitiendo reducir la temperatura de atomización del cobre.

Otros modificadores como el ácido ascórbico se han empleado en la determinación de otros elementos, tales como el Pb, Sn, Mn, Mo y V. En el

primer caso la aparición del pico de absorción se produce antes mientras que con los demás elementos aparece después¹⁷⁹.

Un modificador que cada vez se está empleando más en multitud de elementos es el paladio. Habitualmente suelen usarse sales de Pd como el Pd(NO₃)₂ en solución nítrica. También suele emplearse juntamente con un agente reductor como el ácido ascórbico o solución de hidroxilamina con el fin de reducir el Pd a su forma metálica y de esta forma estabilizar la señal del elemento e incluso aumentar la temperatura de calcinación una media de 400°C¹⁹⁸.

Elementos como el Au, Ag, Pb, Sb, Se, Te, etc. están siendo determinados con modificadores de Pd.

Finalmente en la Tabla 4 se pueden apreciar algunos modificadores químicos para elementos específicos en A.A. por horno de grafito.

TABLA 4

Elemento	Modificador	Efecto
Ag	NH ₄ H ₂ PO ₄ (solución al 1%)	Permite una temperatura de calcinación más alta
As	Ni (50 µg/mL) Pd o Pt (100µg/mL a 2 mg/mL)	Permite una temperatura de calcinación más alta y aumenta la señal. Permite una temperatura de calcinación más alta y aumenta la señal.
Au	Ni(NO ₃) ₂ (solución al 0,25%)	Permite una temperatura de calcinación más alta

B	Ba(OH) ₂ (100µg/mL) o La(NO ₃) ₃ (1000µg/mL)	Aumenta la señal.
Bi	Pd o Ni (1000µg/mL)	Permite una temperatura de calcinación más alta y aumenta la señal.
Cd	H ₃ PO ₄ o NH ₄ H ₂ PO ₄ (1000µg/mL)	Convierte a fosfatos menos volátiles que se atomiza a temperaturas más altas
Ga	Ni(NO ₃) ₂ (1mg/mL) o Pd (solución al 0,005%)	Permite una temperatura de calcinación más alta y aumenta la señal.
Sn	Citrato ácido diamónico (solución al 0,1%)	Se acompleja con el estaño y aumenta la sensibilidad
Tl	H ₂ SO ₄ (solución al 1%)	Estabiliza la señal

III.6.-TEORÍAS DE FORMACIÓN DEL PICO DE ALUMINIO POR E.A.A.

Aunque la determinación del aluminio por E.A.A. es una técnica que se lleva a cabo de manera rutinaria se está todavía lejos de conocer con profundidad los mecanismos que originan la aparición de un pico de átomos de aluminio. A este respecto existen en la actualidad dos teorías fundamentales.

III.6.A.-TEORÍA DE FORMACIÓN DE CARBUROS GASEOSOS

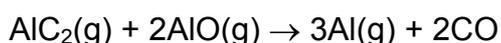
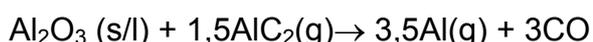
El uso del horno de grafito recomendado por L'vov hace 30 años constituye en la actualidad el modo principal del empleo de la E.A.A. debido a la extrema sensibilidad de sus medidas.

Además el hecho de la naturaleza del horno tubular construido a partir de grafito juega un papel fundamental según este autor, a la hora de explicar los mecanismos de formación de átomos que originarán los procesos de absorción que posteriormente serán cuantificables¹⁹⁹.

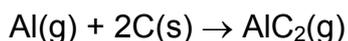
En síntesis L'vov indica que durante el proceso de atomización del aluminio se forman diversos carburos tales como Al_2C , Al_2C_2 , Al_2C_3 , Al_2C_5 y Al_4C_3 que aparecen alrededor de 100° a 200° K antes de la aparición de los átomos libres y de los óxidos del metal. Estas moléculas interaccionan para originar los átomos de $\text{Al}(\text{g})$.

La aparición del metal gaseoso se basaría en diversas reacciones que se indican a continuación²⁰⁰.

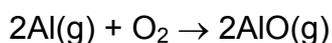
El modelo propuesto gira sobre el hecho de que el óxido metálico es directamente reducido por moléculas gaseosas de carburos metálicos que a su vez intreraccionan con los óxidos del aluminio para formar aluminio metálico, proponiéndose las siguientes ecuaciones^{201 202}:



Los carburos metálicos se forman por interacción del $\text{Al}(\text{g})$ con el carbono $\text{C}(\text{s})$ en la superficie del tubo de grafito.

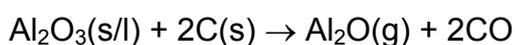
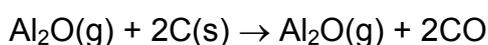
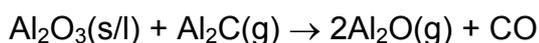


La formación de AlO provendría de la reacción:



De esta forma el aluminio generado inicialmente origina una serie de reacciones a través de los carburos que darán lugar a una mayor aparición de átomos de aluminio.

Además tras posteriores estudios, este autor y sus colaboradores han propuesto que el esquema anterior de reducción del Al_2O_3 podría completarse según las reacciones



El $\text{Al}_2\text{O}(\text{g})$ formado originaría a su vez $\text{Al}(\text{g})$ por reacción con los carburos de aluminio de manera similar a como sucede con el AlO .

En esta teoría serían los carburos del metal los principales responsables de la formación de átomos en vez de los óxidos metálicos.

El equipo empleado fue un Espectrofotómetro de absorción atómica y un espectrómetro de masas de cuadrupolo (QMS) para el estudio de las diversas moléculas formadas²⁰².

III.6.B.-TEORÍA DE LA REDUCCIÓN AUTOCATALÍTICA DEL Al_2O_3

Marc M. Lamoureux²⁰³ y col. han propuesto un mecanismo de formación del aluminio a partir de los trabajos de Gilmutdinov y col.^{204, 205} que usaron una cámara de cine equipada con una película sensible a la luz U.V. para filmar el interior del horno de grafito durante la fase de atomización.

Lamoureux et al. en el trabajo citado, emplean un equipo diseñado específicamente para permitir la medición simultánea de los átomos de

aluminio por espectroscopía de A.A., de las moléculas con aluminio por espectroscopía de absorción molecular y un ICP-MS conectado al horno de grafito para identificar las diversas especies moleculares.

Para recoger las sombras de los espectros formados emplearon la técnica de Gilmutdinov y col.²⁰⁴ de filmación espectral de la sombra o Shadow Spectral Filming (SSF) y la técnica de Chakrabarti et al de recogida de imágenes mediante digitalización espectral de la sombra o Shadow Spectral Digital Imaging (SSDI)²⁰⁶.

Gracias a estas técnicas se ha podido estudiar la distribución espacial de los átomos de aluminio y de las moléculas conteniendo este elemento. A partir de aquí se han postulado las interacciones que pueden ocurrir entre las especies que contienen aluminio, el oxígeno presente dentro del tubo y la superficie del grafito.

De esta forma se ha podido observar que los principales especies detectadas por el ICP-MS han sido: Al, AlO, Al₂O y AlC₂.

Además de los espectros de absorción recogidos durante la atomización del aluminio correspondientes al metal en estado atómico y en diversas moléculas, todas las imágenes mostraron un perfil similar en forma de “donut” donde la absorción es mayor en las proximidades de las paredes de grafito para posteriormente ir decreciendo hacia el interior del tubo. Esto que es mucho más aparente en ausencia de flujo de argón es menos notorio con un flujo de gas de 50mL/min.

Gilmutdinov y col. en su trabajo citado²⁰⁵ proponen una formación inicial de subóxido de aluminio vaporizado Al₂O(g) que sería transformado a continuación en Al₂O₃ merced a la reacción de la primera molécula con el oxígeno que entra en el orificio de dosificación.

Por su parte, L'vov²⁰⁷ sugiere que la formación de la estructura de “donut” proviene de la condensación de las especies en fase vapor en la porción final del tubo que está más frío. Estas especies serán principalmente Al y Al₂O₃.

A partir de aquí, Lamoureux et al. han propuesto el siguiente mecanismo de formación del pico de aluminio²⁰³.

Durante el pretratamiento térmico y antes de la atomización, el residuo de la solución de aluminio desecado se convierte en Al₂O₃ en el rango de temperaturas entre 500 y 1.000°C. La disociación térmica ocurre lentamente a temperaturas por debajo de 2.050°C (el punto de fusión del Al₂O₃).

Aunque la disociación térmica del Al₂O₃ es una posible fuente de átomos de aluminio en estado gaseoso, el paso más favorable para la formación del Al(g) es la disociación térmica de los carburos de aluminio.

Estas moléculas y los oxcarburos juegan un papel importante en la producción de aluminio elemental por fusión carbotérmica.

El carburo de aluminio fase condensado [Al₄C₃(s,l)] cuya presencia se ha informado durante la atomización del Al, es formado a través de las siguientes reacciones:



que originan la reacción global:



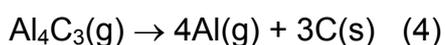
La formación del oxcarburo (ecuación 1) se produce rápidamente a temperaturas superiores a 1.450°C y la reacción global (ecuación 3) a 1.810°C.

Kantar et al²⁰⁸ informaron que la reacción descrita por la ecuación 3 puede ocurrir por agentes reactantes mezclados desigualmente a elevadas concentraciones y es altamente exotérmica.

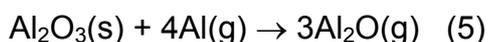
De todas maneras el Al_4C_3 solo puede ser formado si el Al_2O_3 está en contacto íntimo con el sustrato de grafito y la reacción ocurre preferiblemente en los sitios activos como roturas y otros defectos.

De esta manera, bajo las condiciones de formación del pico de aluminio solo una pequeña fracción del aluminio total se podría esperar que estuviera en la forma de Al_4C_3 y la mayoría del aluminio permanecería como Al_2O_3 . El carburo de aluminio Al_4C_3 podría ser generado a una temperatura superior a su punto de fusión de 1.400°C y aparecería como un líquido fundido con algo de Al_2O_3 disuelto en él.

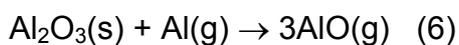
La exotermicidad de la acción representada por la ecuación 3 hace razonable esperar que algo de Al_4C_3 se vaporizará y posteriormente se disociará en la fase gaseosa para formar átomos de aluminio:



Los átomos de aluminio formados por disociación del $\text{Al}_4\text{C}_3(\text{g})$ pueden actuar como semillas que generarán una reacción en cascada donde el aluminio reaccionará con el Al_2O_3 para dar:



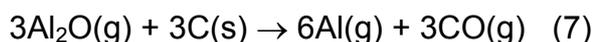
o



Motzfeldt y Steinmo indicaron²⁰⁹ que se formaba preferentemente $\text{Al}_2\text{O}(\text{g})$ en vez de $\text{AlO}(\text{g})$. Basándose en consideraciones de equilibrio estos autores establecieron que la $p_{\text{Al}_2\text{O}}$ aumentaba mucho más rápidamente que la p_{AlO} , conforme aumentaba la p_{Al} . De esta manera el mecanismo propuesto sólo consideraría la formación del Al_2O .

De todos modos parece ser que se precisa un cierto valor de presión parcial de $\text{Al}(\text{g})$ - p_{Al} - necesario para que la reacción con el Al_2O_3 (ecuación 5) pueda comenzar.

Tras la formación del $\text{Al}_2\text{O}(\text{g})$ sucede una reacción en cadena sobre la superficie del grafito según la ecuación:



De esta manera cada vez que se forman 4 átomos del $\text{Al}(\text{g})$ (ecuación 4) se generan por este procedimiento 6 átomos de $\text{Al}(\text{g})$ (ecuación 7) lo que supone una multiplicación por un factor de 1,5.

Este mecanismo autocatalítico requiere que:

- El Al y Al_2O estén presentes simultáneamente en la fase gaseosa.
- Que el Al_2O es el precursor significativo de la formación de átomos de Al
- Que la distribución espacial de Al y Al_2O sean complementarias

Estas premisas son consistentes con los resultados obtenidos de las medidas simultáneas de E.A.A., E.M.S. e ICP-Masas.

El pico de aluminio desaparece además de por falta de suministro de aluminio, porque pueden ocurrir cualquiera de los siguientes factores limitantes:

-La presión parcial de equilibrio del Al (p_{Al}) sobre el $Al_4C_3(s/l)$ (que es aproximadamente 10^5 veces mayor que sobre el $Al_2O_3(s)$) y

-La p_{CO} gobernada por la ecuación 7.

Cuando se alcanza cualquiera de ambas se pueden originar una serie de reacciones reversibles que terminarán la formación del pico de Al.

Así el Al_2O y el CO o el O_2 pueden reaccionar para generar partículas de Al_2O_3 o el Al y el CO pueden reaccionar también para formar partículas de Al_4C_3 y Al_2O_3 todas ellas dispersadas en la fase gaseosa. Del mismo modo, también es posible que algunas especies en fase vapor condensen en las zonas más frías del tubo.

Todo esto es consistente con la observación por diferentes técnicas de fotografía de espectros de las estructuras de "donut" que son atribuidos tanto a la formación del Al_2O_3 como a la condensación de otras especies en los puntos fríos del tubo.

Cuando se alcanza la temperatura apropiada de formación de Al, de nuevo se repite todo el proceso y las reacciones 5 y 7 se acoplan dando lugar a la formación del Al.

El mecanismo propuesto para la formación del pico de Al es probablemente una parte de un conjunto de fenómenos más complejos en los que intervendrán especies como AlH o incluso Al_2 que se sabe que existen cuando aparece el pico de aluminio y que no se ha considerado por los autores en el mecanismo propuesto.

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

IV-MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1.-INSTRUMENTACIÓN

Para realizar este trabajo se empleó un espectrofotómetro Varian SpectrAA 600 con corrección de fondo Zeeman, de fabricación australiana importado por Varian Ibérica S.L.

El funcionamiento del equipo y el tratamiento de los datos se realizó con un procesador 486SX/33 MHz con un sistema operativo OS/2 de IBM integrado en el equipo.

El horno de grafito empleado ha sido el modelo GTA-100 de diseño Varian. Los tubos de grafito fueron de grafito pirolítico z-tek®.

La lámpara de cátodo hueco de aluminio fue fabricada por Varian y suministrada con el equipo.

Para inyectar la muestra se utilizó un inyector automático PSD-100 con capacidad para 50 muestras por carrusel en viales de 2 mL. Pudiéndose inyectar entre 1 y 100µL.

Para dosificar, se emplearon micropipetas de 1 mililitro, en pasos variables de 100 microlitros.

IV.2.-REACTIVOS Y ESTÁNDARES

Ácido nítrico 65%, Suprapur de Merck.

Para el estudio de la rampa de temperatura se empleó una solución de aluminio de 20 ppbs en agua desionizada y ácido nítrico Suprapur al 1%, preparada a partir de una solución de aluminio de $1,000 \pm 0,002$ g/L de Panreac para espectrofotometría, referencia 313170.

Para la cuantificación del aluminio en los líquidos de hemodiálisis se utilizó una disolución de aluminio de 10 ppbs preparada a partir de la misma solución de aluminio de Panreac.

Modificador de matriz de nitrato de magnesio de Merck, referencia 1.05813.0050 conteniendo $10,0 \pm 0,2$ g/L de magnesio. A partir de ésta se preparó una solución de trabajo conteniendo 0,5 g de magnesio /L.

Modificador de matriz de cloruro de magnesio de Merck, referencia 1.05742.0030 conteniendo $10,0 \pm 0,2$ g/L de magnesio. A partir de ésta se preparó una disolución de trabajo conteniendo 0,5 g de magnesio /L.

Modificador de matriz de nitrato de paladio de Merck, referencia 14282.05.00 conteniendo 1.000 mg/L de paladio. A partir de ésta se preparó una disolución de trabajo conteniendo 0,5 g de paladio/L.

El agua empleada, apta para absorción atómica, fue tratada en un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford,).

IV.3.-LIMPIEZA DEL MATERIAL

Todo el material de vidrio empleado en el trabajo, se mantuvo 24 horas sumergido en una solución de ácido nítrico al 5% y posteriormente enjuagado con agua calidad absorción atómica, al menos cinco veces y secado a 70°C.

V-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1.-INTRODUCCIÓN

A la hora de desarrollar un método para determinar aluminio en soluciones complejas como el agua de mar o los líquidos de hemodiálisis, nos encontramos con la dificultad de la gran cantidad de sales presentes que van a dificultar su determinación.

La composición del líquido de hemodiálisis donde se va a desarrollar el método, es la siguiente:

COMPOSICIÓN DEL CONCENTRADO

Cloruro sódico	168,451 g
Cloruro potásico	4,028 g
Cloruro cálcico 2 H ₂ O	9,261 g
Cloruro magnésico 6 H ₂ O	3,654 g
Glucosa anhidra	54,005 g
Ácido acético glacial	8,200 mL
Agua desionizada c.s.p.	1.000 mL

Debido a que la cantidad de sales que incorpora es muy grande, por lo que fue necesario realizar una dilución del producto puesto que la inyección directa de 10 µl del líquido de hemodiálisis sin diluir producía una absorción de fondo superior a 2,5 u.a. que es la máxima corrección permitida por las especificaciones del equipo.

Se intentaron entonces diversas diluciones del líquido de hemodiálisis con el fin de hacer posible la determinación del aluminio. Las diluciones 1:2 y 1:5 con agua desmineralizada y filtrada dieron absorbancias de fondo muy elevadas y no fue posible calibrar. Por ello, optamos por diluir la muestra 1:10.

Además, en la mayor parte de los análisis realizados para la puesta a punto del método, hemos optado por inyectar líquido de hemodiálisis 1:10 mezclado en el inyector con solución patrón de aluminio a diversas concentraciones, con el fin de aumentar la señal del metal y así poder determinar mejor los parámetros del horno y el programa de temperaturas, aun teniendo presente que la cantidad inyectada en estas pruebas va a dar una señal superior a la que luego se leerá en la muestra del líquido de hemodiálisis.

V.2.- OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE TEMPERATURAS

En el horno de grafito, la muestra se somete a una serie de pasos con diferentes temperaturas y tiempos con el fin de obtener átomos de aluminio en la fase de atomización.

Cuanto mejor se consiga separar el aluminio en las fases previas a la atomización, mejor se podrá determinar éste.

Existen por tanto tres etapas claramente determinadas en la técnica de absorción atómica:

-Fase de secado

-Fase de calcinación o pirólisis

-Fase de atomización

Por último existe una fase de limpieza con el fin de eliminar los restos de muestra que hayan quedado en cada ensayo.

V.2.A.- FASE DE SECADO

Durante la puesta a punto de la técnica de optimización de los parámetros del horno, hemos utilizado una muestra de 10 μ l de líquido de hemodiálisis diluido 1:10 con agua desionizada y ácido nítrico al 1% y distintas disoluciones de Al en el mismo solvente. El Al se añadió para poder apreciar mejor la evolución de la señal durante la puesta a punto del método.

Durante la fase de secado se obtiene una eliminación completa del agua. Durante esta fase se incrementa gradualmente la temperatura con el fin de eliminar totalmente el disolvente.

Además, como la muestra lleva ácido nítrico (1%) la solución se irá volviendo cada vez más concentrada en este ácido hasta alcanzar la mezcla azeotrópica (p.e. 121°C)²¹⁰. Así pues los tres primeros pasos de desecación quedarán fijados de la siguiente manera:

Paso nº	Temperatura (°C)	Tiempo (seg.)	Flujo (L/min)	Tipo de Gas	Lectura
1	75	5,0	0	Argón	No
2	95	40,0	3,0	Argón	No
3	120	40,0	3,0	Argón	No

V.2.B.- FASE DE CALCINACIÓN

Además de la fase de secado o desolvatación, se hace necesario una etapa que elimine todos los componentes de la matriz como paso previo a la atomización. Este paso es particularmente importante en aquellas mezclas muy complejas como la que estamos estudiando donde los componentes de la misma son muy variados.

Los componentes de la matriz pueden vaporizarse o descomponerse por calentamiento para dar una absorción de fondo resultado de la absorción molecular o de la dispersión de la luz, por lo que se hace necesario minimizar la cantidad de matriz presente en el tubo cuando comience la atomización. Además, mediante esta etapa se pretende reducir posibles interferencias.

La técnica que hemos seguido, ha consistido en probar diferentes temperaturas de calcinación y medir la señal obtenida durante la fase de atomización, tanto del fondo como del aluminio.

Con el fin de alcanzar de manera progresiva la temperatura de calcinación, hemos incluido en todos los ensayos una etapa de calentamiento de 120°C a 500°C en 15,0 segundos. A partir de aquí hemos estudiado cómo influían en la señal las diferentes temperaturas de calcinación.

Paso nº	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo (L/min)	Tipo de Gas	Lectura
4	500	15,0	3,0	Argón	No

La primera prueba que realizamos, consistió en comprobar cómo influía en la absorción de fondo la temperatura de calcinación.

Como ya se ha dicho, eliminar en esta etapa el máximo que se pueda de las sales presentes en la muestra es importante, porque de lo contrario hay pérdidas de intensidad de la radiación transmitida I con respecto a la incidente I_0 lo que se traducirá en errores a la hora de determinar la concentración.

Para ello, inyectamos en el horno de grafito 10 μ l de una solución del líquido de hemodiálisis diluido 1:10 con blanco, 10 de blanco y 5 μ L de modificador de nitrato magnésico conteniendo $10 \pm 0,2$ g de Mg/L (Ref. 1.05813 de Merck). El tubo de grafito era nuevo.

El blanco fue una solución de HNO₃ Suprapur en agua, calidad A.A. al 1%. Se han realizado 5 inyecciones por temperatura.

En la tabla siguiente se puede comprobar cómo varía la señal de fondo en función de la temperatura de calcinación:

Temperatura (°C)	Fondo en altura de pico u.a.	Fondo en área u.a.
600	0,234	0,089
700	0,229	0,088
800	0,169	0,033
900	0,154	0,017
1000	0,027	0,020
1100	0,022	0,020
1200	0,021	0,021
1300	0,021	0,020
1400	0,022	0,021
1500	0,029	0,020

Como puede observarse, hay una bajada progresiva de la señal del fondo que es especialmente intensa a partir de los 1000°C. Asimismo, a partir de 1200°C no hay más descenso de la señal.

Con el fin de confirmar estos datos y ver el comportamiento de la señal del aluminio, utilizamos una mezcla de 10 µL de una solución de aluminio de 100 ppbs, 10 µL de la solución del líquido de hemodiálisis(1:10) y 5 µL del modificador de nitrato de magnesio. El tubo que empleamos tenía 160 inyecciones.

En la siguiente tabla se puede comprobar como variaba la señal del fondo y del aluminio tanto en área como en altura de pico:

Temperatura (°C)	Fondo en altura de pico u.a.	Al en altura de pico u.a.
600	0,505	0,775
700	0,405	0,750
800	0,305	0,700
900	0,193	0,725
1000	0,105	0,537
1100	0,115	0,455
1200	0,115	0,527
1300	0,097	0,530
1400	0,058	0,247
1500	0,058	0,208

Temperatura (°C)	Fondo en área de pico u.a.	Al en área de pico u.a.
600	0,208	0,184
700	0,200	0,170
800	0,168	0,184
900	0,110	0,180
1000	0,080	0,170
1100	0,070	0,200
1200	0,070	0,198
1300	0,065	0,190
1400	0,062	0,157
1500	0,062	0,131

Ante la caída de absorbancia y las fluctuaciones de señal observadas en las diversas temperaturas, probamos con un tubo nuevo para ver cómo se comportaba la señal correspondiente al aluminio, y pudimos apreciar que la misma disolución a 900°C de temperatura de calcinación daba una absorbancia correspondiente al aluminio de 4 u.a., que se mantenía hasta 1500°C.

Por tanto como se ve, es notoria la importancia del estado del tubo de grafito a la hora de estudiar el aluminio.

Repetimos entonces los ensayos esta vez con un tubo nuevo y con la siguiente mezcla : 10 μ l de una solución de 20 ppbs de Al, 10 μ l de la solución de hemodiálisis (1:10) y 5 μ l de modificador. Blanco de 20 μ l de agua calidad A.A. con HNO₃ al 1% y 5 μ l de modificador.

Añadimos al líquido de hemodiálisis la solución de 20 ppbs de aluminio con el fin de aumentar la señal. El tiempo empleado en la calcinación fue de 37 segundos. (Gráfica 1).

Los resultados fueron, partiendo de 800°C:

Temperatura (°C)	Fondo en altura de pico u.a.	Al en altura de pico u.a.
800	0,377	0,494
900	0,212	0,534
1000	0,150	0,585
1100	0,135	0,597
1200	0,134	0,620
1300	0,130	0,632
1400	0,132	0,428
1500	0,115	0,459

Temperatura (°C)	Fondo en área de pico u.a.	Al en área de pico u.a.
800	0,052	0,070
900	0,049	0,075
1000	0,048	0,079
1100	0,049	0,079
1200	0,048	0,081
1300	0,047	0,084
1400	0,048	0,068
1500	0,040	0,069

Como se demuestra por las tablas, ahora la señal de aluminio es mayor y sobre todo más estable.

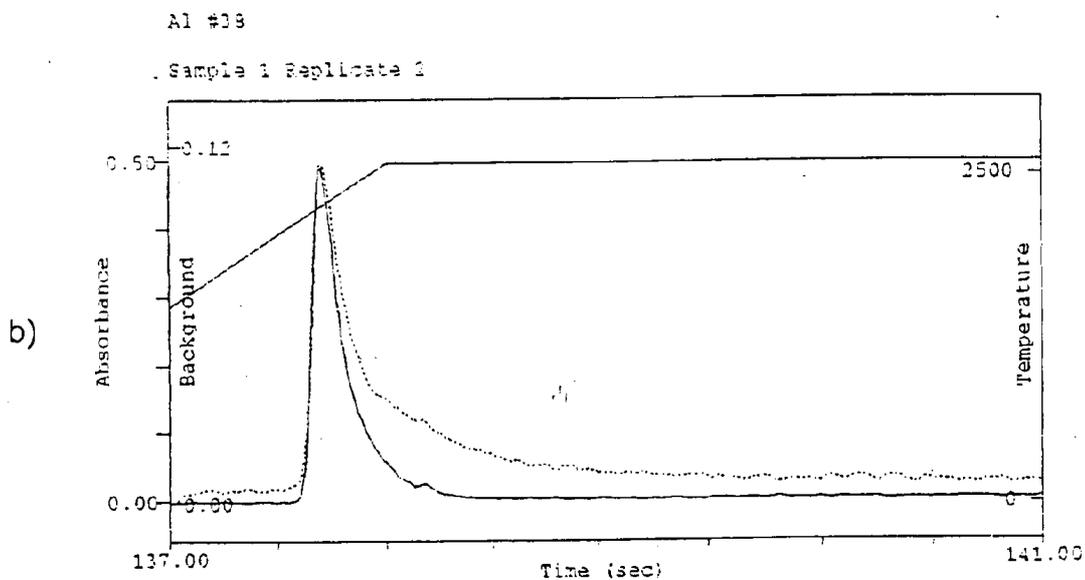
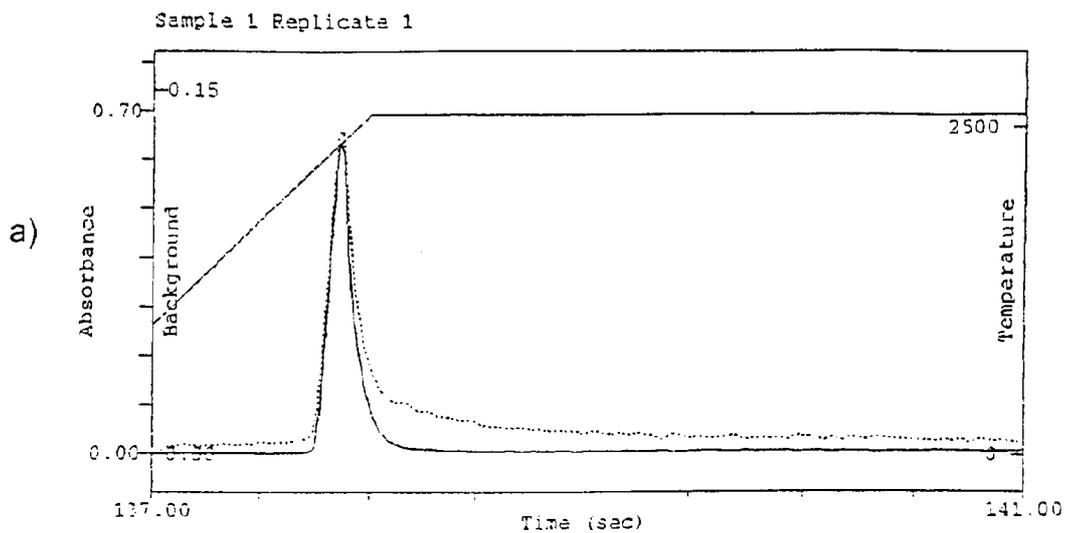
Se observa además una subida de la señal claramente mayor a partir de los 1.000°C de temperatura de calcinación, que coincide con una bajada importante del fondo.

Esta señal aumenta hasta los 1.300°C de temperatura.

A temperaturas más altas, la señal va descendiendo, notándose este fenómeno especialmente cuando la medición se hace en altura.

Este hecho, puede indicar que a partir de esa temperatura se produce pérdida de aluminio. Por ello, aun cuando la señal de fondo desciende a 1.500°C, la caída de absorción debida al aluminio es muy notable por lo que no interesa alcanzar temperaturas tan elevadas.

En la Gráfica 1, se muestran los picos obtenidos a 1.300°C y 1.500°C, con un tiempo de calcinación de 37 s.



Gráfica 1.- Ejemplos de pico de aluminio a 1.300°C (a) y 1.500°C (b).
 Tiempo de calcinación 37 segundos. La señal es mayor a 1.300°C.

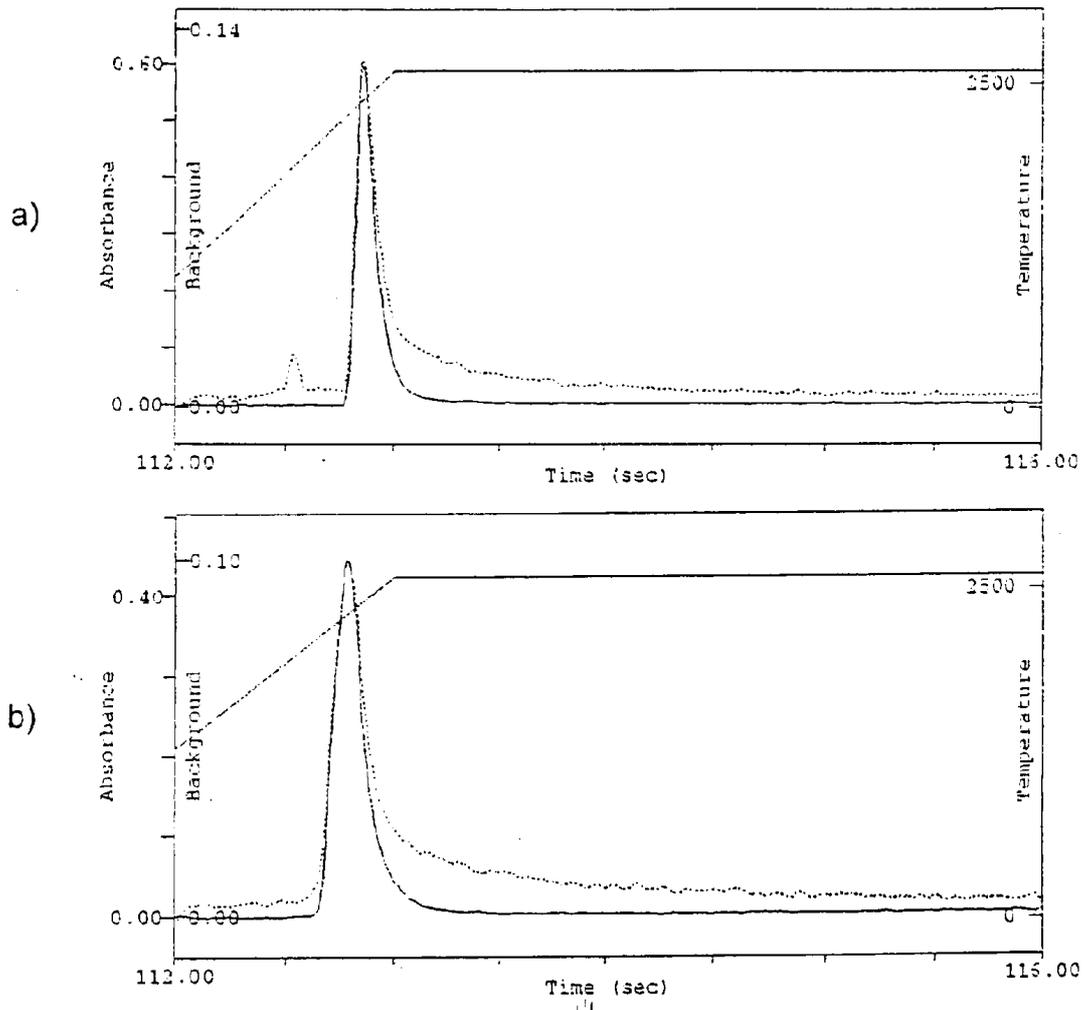
En el siguiente paso, probamos a acortar el tiempo de calcinación a 12 segundos para ver si así se podía reducir el tiempo del análisis (Gráfica 2).

Los resultados obtenidos fueron:

Temperatura (°C)	Fondo en altura de pico u.a.	Al en altura de pico u.a.
800	0,380	0,480
900	0,210	0,500
1000	0,145	0,550
1100	0,138	0,580
1200	0,137	0,611
1300	0,135	0,621
1400	0,115	0,450
1500	0,105	0,400

Temperatura (°C)	Fondo en área u.a.	Al en área u.a.
800	0,058	0,068
900	0,065	0,070
1000	0,054	0,073
1100	0,042	0,074
1200	0,042	0,076
1300	0,040	0,079
1400	0,040	0,065
1500	0,040	0,060

En estas tablas podemos observar que el incremento de la señal va aumentando aunque muy lentamente para las medidas en áreas, hasta los 1.300°C en los que se aprecia un máximo, que se hace mayor cuando el tiempo de calcinación es de 37 segundos frente a los 12 de la segunda tabla.



Gráfica 2.- Ejemplos de pico de aluminio a 1.300°C(a) y 1.500°C (b). Tiempo de calcinación 12 segundos. La señal es mayor a 1.300°C

V.2.C.-CAUDAL DE FLUJO DE GAS

Otro de los parámetros de la atomización que influye en la técnica de absorción atómica, es la corriente de gas inerte, en este caso argón, que se emplea para retirar los componentes de la muestra del atomizador en cada paso del análisis y para proteger el tubo de grafito de la oxidación.

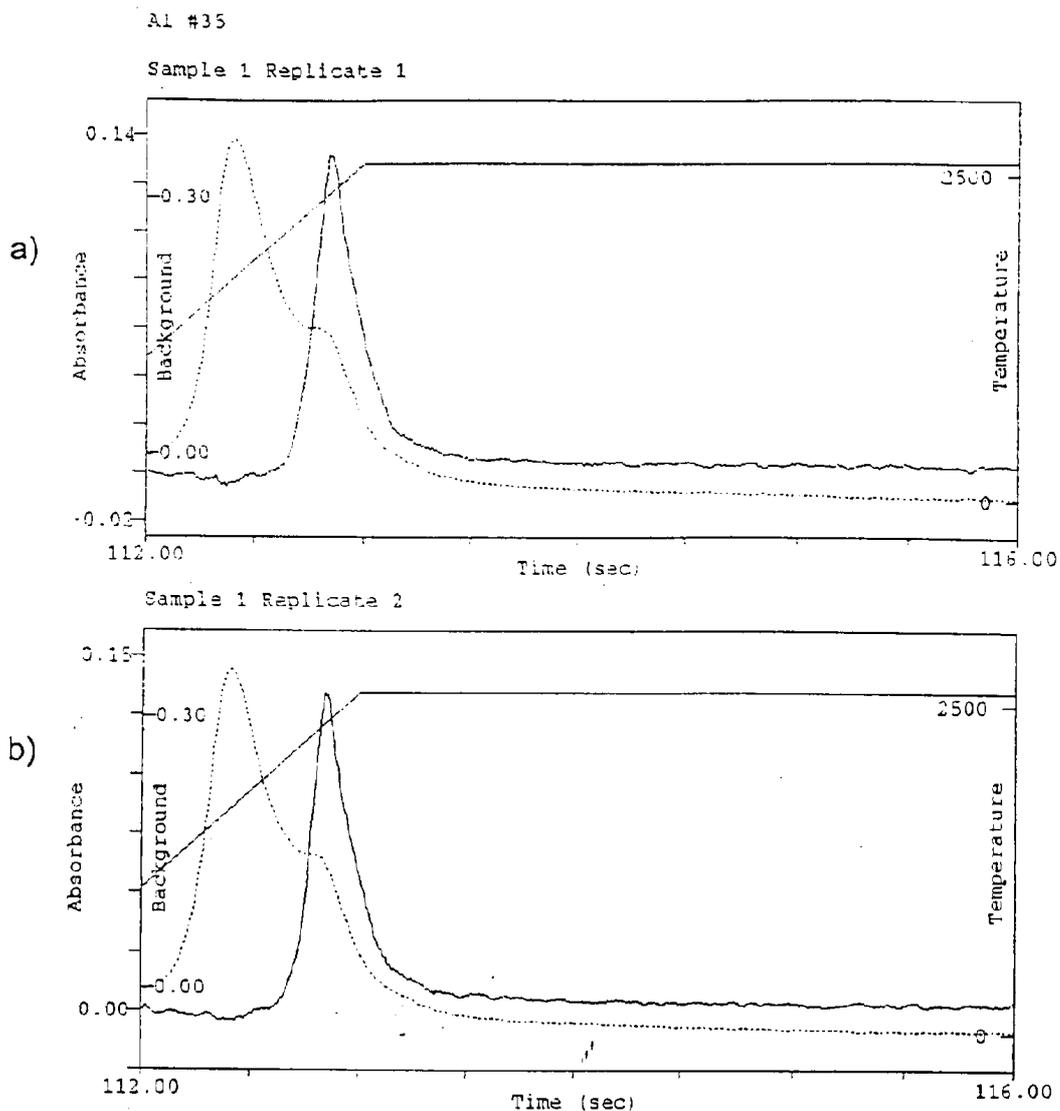
Durante la fase de secado, y calcinación el flujo de gas puede ser programado a diferentes caudales. En los ensayos anteriores hemos establecido un flujo de 3,0 L/min. durante todas las etapas excepto la atomización. A continuación veremos como varía la señal modificando el flujo de gas inerte.

Primero se hizo el ensayo sin corriente de gas. Se partió de 1.000°C al haber comprobado que es a partir de esta temperatura cuando la señal del aluminio es mayor. Se empleó un tubo con 114 inyecciones y 12 segundos de tiempo de calcinación (Gráfica 3).

Los resultados han sido:

Temperatura (°C)	Fondo en altura de pico u.a.	Al en altura de pico u.a.
1000	0,403	0,103
1100	0,360	0,113
1200	0,350	0,133
1300	0,340	0,143
1400	0,270	0,120

Temperatura (°C)	Fondo en área de pico u.a.	Al en área de pico u.a.
1000	0,152	0,035
1100	0,137	0,043
1200	0,134	0,042
1300	0,131	0,046
1400	0,111	0,037



Gráfica 3.- Ejemplos de pico de aluminio a 1.200°C (a) y 1.300°C (b) con tiempo de calcinación de 12 segundos. Durante la fase de calcinación se cortó el flujo de argón. Se observa un desplazamiento entre el máximo de la corrección de fondo y el máximo de la señal correspondiente al aluminio.

Ante la bajada de señal que se observa sin gas, se hizo otro ensayo con un tubo nuevo.

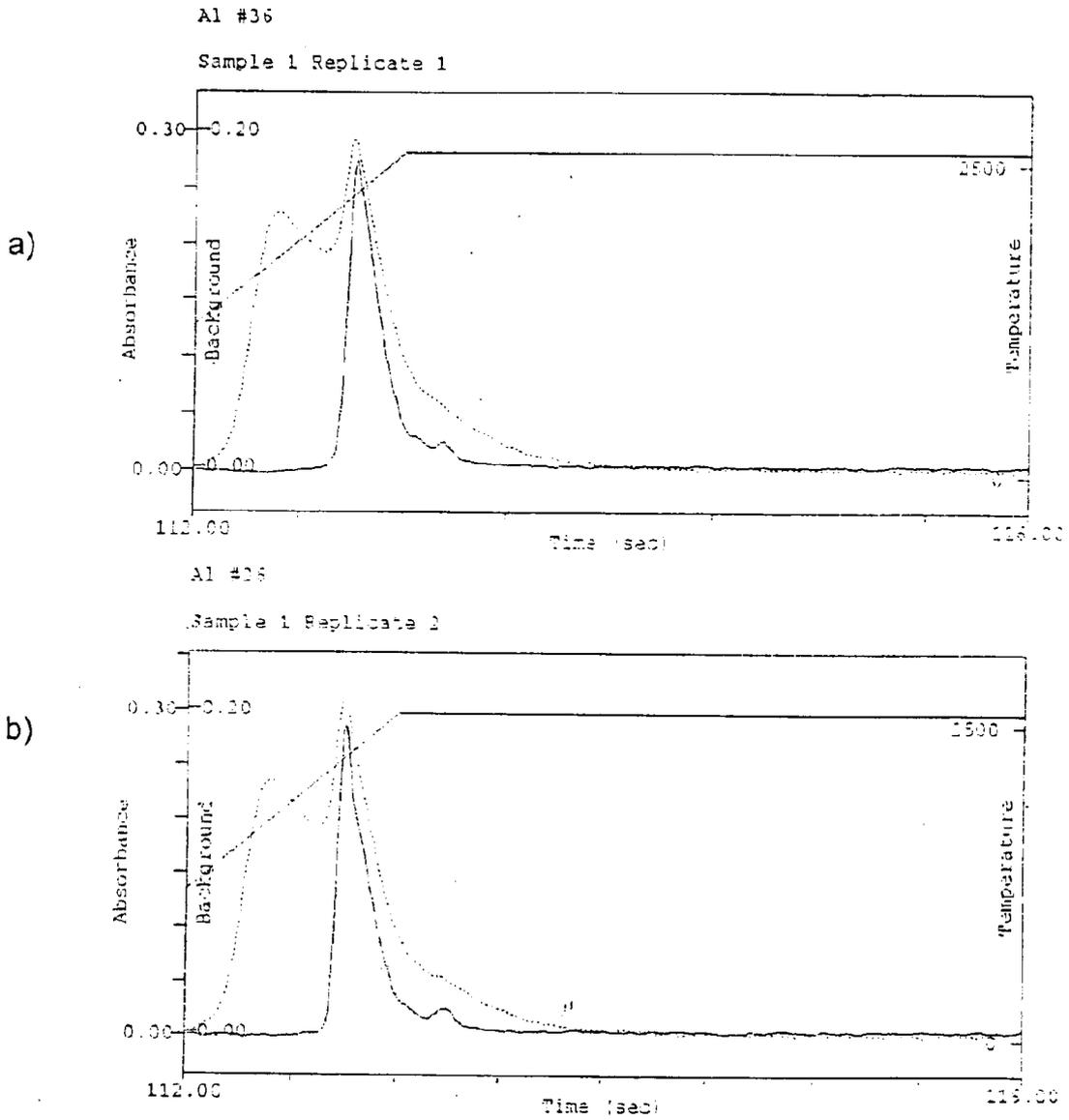
Los resultados obtenidos quedan reflejados en las siguientes tablas:

Temperatura (°C)	Fondo en altura de pico u.a.	Al en altura de pico u.a.
1000	0,354	0,249
1100	0,320	0,250
1200	0,200	0,271
1300	0,199	0,286
1400	0,201	0,218

Temperatura (°C)	Fondo en área de pico u.a.	Al en área de pico u.a.
1000	0,157	0,065
1100	0,122	0,064
1200	0,122	0,065
1300	0,113	0,072
1400	0,119	0,062

Algunos de los picos obtenidos figuran en la Gráfica 4.

Como puede comprobarse por las tablas, es necesario trabajar con flujo de gas, pues sin él la señal es muy baja y el fondo muy alto. Además, se somete al tubo a un mayor estrés térmico.



Gráfica 4.- Iguales condiciones que la gráfica 3 solo que con tubo de grafito nuevo.

En las siguientes tablas se aprecia como evoluciona la señal con diferentes temperaturas de calcinación y un flujo de 0,5 L/min. El tiempo de calcinación fue de 37 segundos.

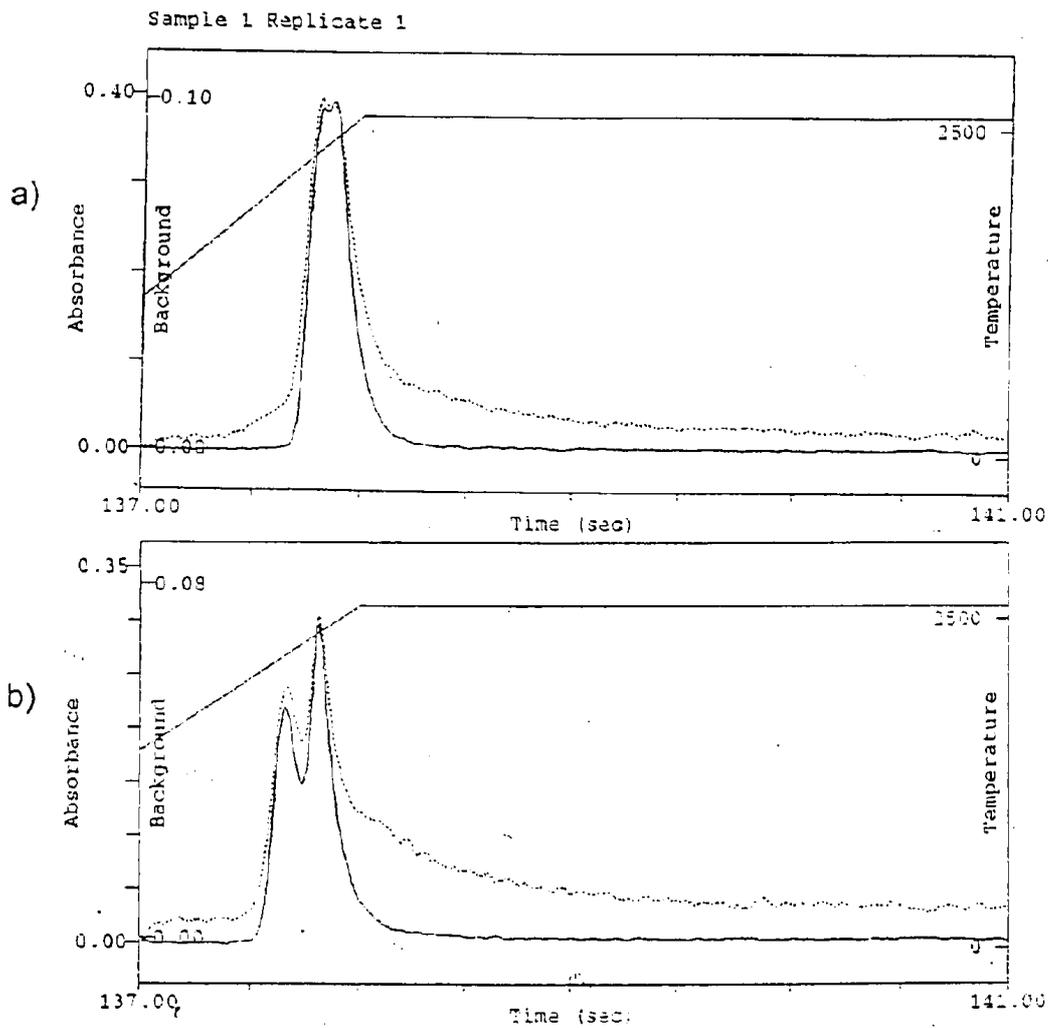
Dado que la señal experimenta un incremento apreciable a partir de 1.000 °C, las pruebas que se detallan a continuación se han efectuado desde esa temperatura con 5 inyecciones por muestra:

Temperatura (°C)	Fondo en altura de pico u.a.	AI en altura de pico u.a.
1000	0,105	0,322
1100	0,102	0,365
1200	0,100	0,379
1300	0,098	0,390
1400	0,085	0,313
1500	0,075	0,328

Temperatura (°C)	Fondo en área de pico u.a.	AI en área de pico u.a.
1000	0,050	0,076
1100	0,052	0,077
1200	0,050	0,079
1300	0,051	0,082
1400	0,050	0,080
1500	0,053	0,075

Puede observarse en esta tabla como la señal es también menor con respecto a la que emplea flujo de 3 L/min y tiempo de calcinación de 37 segundos.

Algunos de los picos obtenidos figuran en la gráfica 5.



Gráfica 5.- Señales del pico de aluminio a 1.300°C (a) y 1.500°C (b) de temperatura de calcinación. Flujo de argón 0,5L/min y tiempo de calcinación 37 segundos. Puede comprobarse la deformación del pico de aluminio especialmente a la temperatura de 1.500°C que coincide con una bajada de la señal.

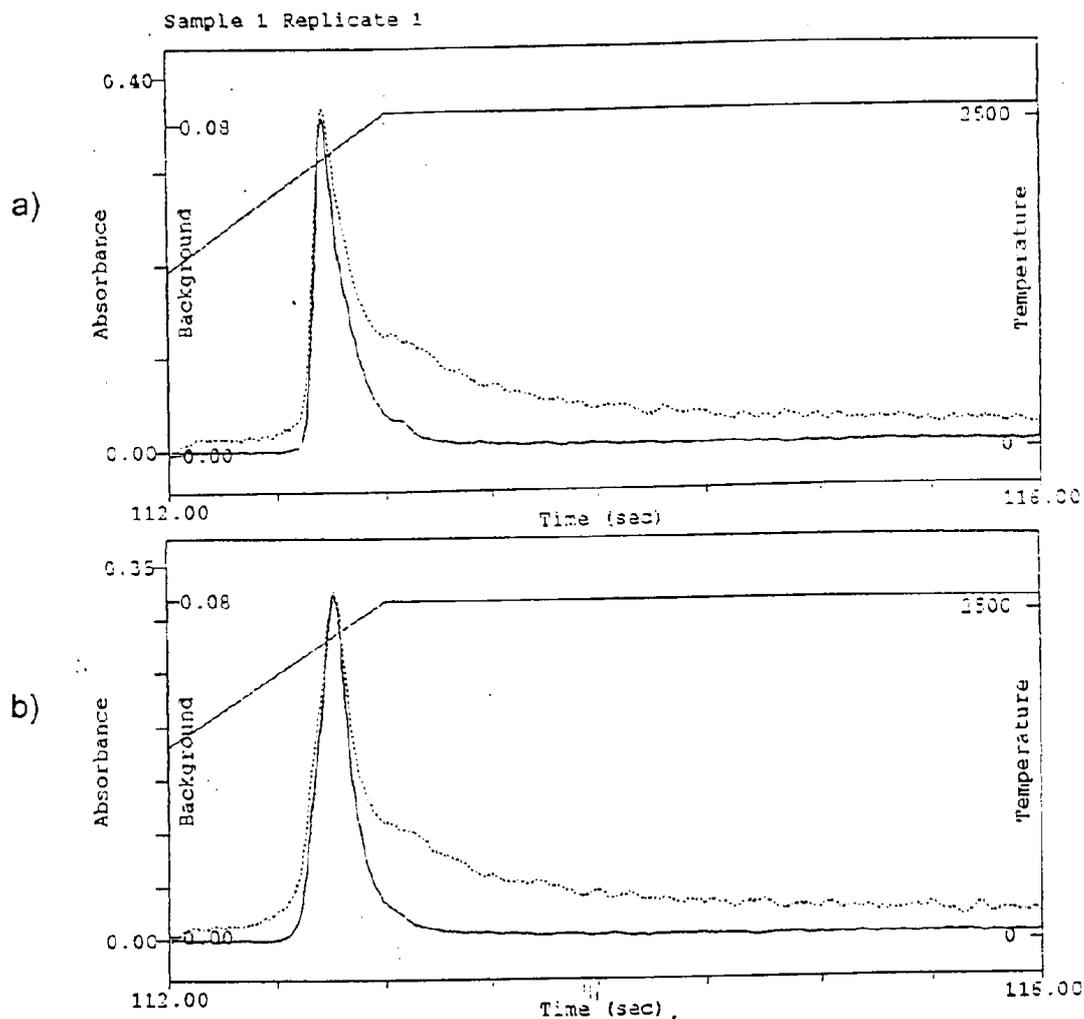
La última prueba que se hizo con el fin de ver qué condiciones de calcinación eran las mejores, fue repetir el ensayo anterior solo que acortando el tiempo de calcinación a 12 seg.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas siguientes y en la Gráfica 6.

TIEMPO DE CALCINACIÓN 12 SEGS.

Temperatura (°C)	Fondo en altura de pico u.a.	Al en altura de pico u.a.
1000	0,122	0,267
1100	0,094	0,278
1200	0,090	0,356
1300	0,085	0,359
1400	0,085	0,334
1500	0,086	0,324

Temperatura (°C)	Fondo en área de pico u.a.	Al en área de pico u.a.
1000	0,052	0,067
1100	0,057	0,068
1200	0,051	0,077
1300	0,052	0,075
1400	0,050	0,076
1500	0,050	0,073



Gráfica 6.- Iguales condiciones que en la gráfica 5 solo que con un tiempo de calcinación de 12 segundos.

Igualmente la señal fue notablemente menor que en las condiciones antes citadas. No obstante sigue observándose un aumento de señal a los 1.300°C. Así pues es conveniente emplear una velocidad de flujo de gas inerte durante la fase de calcinación de 3 L/min frente a caudales menores (0,5 L/min).

Como ya se ha dicho, a partir de 1000°C se produce un notable incremento de la señal correspondiente al aluminio. Sin embargo, estudiando la señal entre 1000 y 1300°C, podemos decir que existen dos temperaturas de calcinación o pirólisis que pueden considerarse las más idóneas para esta

técnica de determinación del aluminio por absorción atómica: 1.200°C y 1.300°C. Además se hacía necesario comprobar qué condiciones de tiempo eran mejores: calcinación lenta 37 segundos o rápida 12 segundos. Para ello se programaron 5 inyecciones de 10 μ l de una solución de Al de 20 ppbs, 10 μ l de líquido de hemodiálisis (1:10) y 5 μ l de modificador.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en las tablas siguientes:

Temperatura (°C)	tiempo (s)	Al en altura de pico Abs. media	C.V. (%)
1.300	37	0,635	6,01
1.200	37	0,622	6,53
1.300	12	0,623	7,62
1.200	12	0,610	8,03

Temperatura (°C)	tiempo (s)	Al en área de pico Abs. media	C.V. (%)
1.300	37	0,083	6,89
1.200	37	0,078	7,84
1.300	12	0,078	7,80
1.200	12	0,076	8,50

Tras estos resultados, hemos optado por fijar unas condiciones de calcinación de:

Temperatura (°C)	tiempo (s)	Flujo (Φ) de gas argón (L/min)
1.300	37	3

Con la temperatura de 1.300°C la señal es notablemente mayor, y evitamos posibles pérdidas de aluminio. Hemos preferido emplear un tiempo de calcinación de 37 segundos, ya que en este caso, la señal es algo mayor que a 12 segundos y los coeficientes de variación en altura son algo menores también. Finalmente con el flujo de 3 L/min la señal es también mayor.

Según esto, las etapas siguientes de calcinación serán:

Paso nº	Temperatura (°C)	Tiempo (seg.)	Flujo (L/min)	Tipo de Gas	Lectura
5	1.300	25,0	3	Argón	No
6	1.300	10,0	3	Argón	No
7	1.300	2,0	0	Argón	No

Con el fin de garantizar que durante la fase de atomización no hay pérdida de muestra, introducimos una etapa final de la calcinación en la que se corta el flujo del gas inerte (etapa 7).

V.2.D.-MODIFICADORES DE MATRIZ

En muchos casos, la complejidad de la muestra y las características del átomo a analizar hacen necesario el empleo de sustancias que añadidas a la muestra, actúen de diversas maneras tales como facilitando temperaturas de calcinación más elevadas sin pérdida del analito, eliminando moléculas que causen grandes señales de fondo como por ejemplo el cloruro sódico, o aumentando la señal del elemento a analizar²¹¹.

Existen diferentes técnicas publicadas para el análisis del aluminio en cantidades trazas, por espectroscopía de absorción atómica²¹². En nuestro caso estudiaremos dos posibles modificadores.

Que el empleo de un modificador es necesario, especialmente para concentraciones de aluminio tan bajas (menos de 10 ppbs en la muestra inyectada de líquido de hemodiálisis diluido), se demuestra si estudiamos la señal correspondiente al aluminio en la muestra sin modificador.

Para ello se inyectaron 20 μ l de una mezcla a partes iguales de líquido concentrado de hemodiálisis diluido 1:10 y una solución de 20 ppbs de aluminio. Se realizaron 5 inyecciones por cada temperatura. No se inyectó modificador. Los resultados fueron:

Temperatura (°C)	Fondo en altura de pico u.a.	Al en altura de pico u.a.
600	0,234	0,004
700	0,229	0,016
800	0,169	0,021
900	0,154	0,021
1000	0,077	0,093
1100	0,060	0,200
1200	0,053	0,234
1300	0,050	0,263
1400	0,045	0,199
1500	0,034	0,135

Temperatura (°C)	Fondo en área de pico u.a.	Al en área de pico u.a.
600	0,089	0,014
700	0,088	0,017

Temperatura (°C)	Fondo en área de pico u.a.	AI en área de pico u.a.
800	0,089	0,024
900	0,080	0,025
1000	0,043	0,038
1100	0,029	0,063
1200	0,030	0,061
1300	0,030	0,060
1400	0,026	0,062
1500	0,026	0,046

Como puede comprobarse la señal es netamente inferior.

También se estudió la señal en la misma muestra pero esta vez no se inyectó modificador, aunque las muestras sí llevaban incorporado ácido nítrico al 1%. Se realizaron 5 inyecciones por cada temperatura. Los resultados se indican a continuación:

Temperatura (°C)	Fondo en altura de pico u.a.	AI en altura de pico u.a.
800	0,310	0,500
900	0,200	0,550
1000	0,154	0,458
1100	0,141	0,594
1200	0,119	0,606
1300	0,099	0,610
1400	0,055	0,450
1500	0,050	0,427

Temperatura (°C)	Fondo en área de pico u.a.	Al en área de pico u.a.
800	0,050	0,068
900	0,048	0,069
1000	0,051	0,065
1100	0,050	0,074
1200	0,049	0,076
1300	0,052	0,076
1400	0,037	0,060
1500	0,036	0,058

En este ensayo, aun cuando la señal es similar a cuando se emplea modificador, los resultados son más erráticos (sus C.V. son mucho mayores).

Temperatura (°C)	Al en altura de pico con nítrico y sin modificador	C.V.(%)	Al en altura de pico con nítrico y con modificador	C.V.(%)
1300	0,610	16,4	0,660	6,0
1200	0,606	21,6	0,627	6,5

Temperatura (°C)	Al en área de pico con nítrico y sin modificador	C.V.(%)	Al en área de pico con nítrico y con modificador	C.V.(%)
1300	0,074	7,4	0,083	6,90
1200	0,076	8,6	0,078	7,84

V.2.D.1.-Influencia de las sales de magnesio en la determinación del aluminio por E.A.A.

Como ya se ha demostrado, las sales de magnesio producen un aumento y estabilización de la señal del aluminio (bajos coeficientes de variación) cuando se analiza por espectroscopía de absorción atómica.

Hemos empleado dos sales de magnesio diferentes, el cloruro de magnesio (MgCl_2) y el nitrato de magnesio $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

La influencia del tipo de sal de magnesio empleada se evidencia comparando las absorbancias obtenidas:

-Solución de MgCl_2 conteniendo 500 mg de Mg por litro.

El disolvente es agua filtrada y desionizada conteniendo un 1% de HNO_3 .

La cantidad inyectada de modificador fue de 5 μl que corresponden a 2,5 μg de Mg.

-Solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ conteniendo 500 mg de Mg por litro.

El disolvente es agua filtrada y desionizada conteniendo un 1% de HNO_3 , y se inyectaron 5 μl que corresponden a 2,5 μg de Mg.

Se inyectaron en el tubo de grafito 10 μl de la solución de hemodiálisis diluida 1:10, junto con 10 μl de una solución de 20 ppb de aluminio (200 pg de Al) y 5 μl de los modificadores.

Número de réplicas = 10

La temperatura de calcinación fue de 1.300°C y la de atomización de 2.600°C.

Resultados en altura de pico:

	Absorbancias ($x \pm s$)
Modificador de $MgCl_2$	$0,427 \pm 0,030$
Modificador de $Mg(NO_3)_2$	$0,645 \pm 0,042$

Resultados en área de pico:

	Absorbancias ($x \pm s$)
Modificador de $MgCl_2$	$0,075 \pm 0,006$
Modificador de $Mg(NO_3)_2$	$0,086 \pm 0,006$

Se comprueba como a la temperatura de atomización, el aluminio presenta más señal en presencia de $Mg(NO_3)_2$ que de $MgCl_2$.

V.2.D.2.-Cantidad óptima de $Mg(NO_3)_2$ para la determinación del aluminio en el líquido de hemodiálisis

Se inyectaron en el tubo de grafito 10 μ l de la solución de hemodiálisis diluida 1:10, junto con 10 μ l de una solución de 20 ppb de aluminio (200 pg de Al) y 2, 5 y 10 μ l del modificador de nitrato de magnesio

Se han realizado 4 réplicas por medida.

μ g de Mg	Abs. en altura ($x \pm s$)	n° de réplicas
1,00	$0,356 \pm 0,014$	4
2,50	$0,640 \pm 0,039$	4
5,00	$0,630 \pm 0,037$	4

μg de Mg	Abs. en área ($x \pm s$)	nº de réplicas
1,00	0,059 \pm 0,0063	4
2,50	0,084 \pm 0,0058	4
5,00	0,078 \pm 0,0055	4

Empleando soluciones que permitan una presencia de 2,5 μg de Mg como $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ en el tubo de grafito se estabilizan los 200 pg de aluminio inyectados.

V.2.D.3.- $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ para la determinación del aluminio en el líquido de hemodiálisis

El paladio se está empleando en la determinación de numerosos metales como modificador. En nuestro caso hemos querido comparar cómo se comporta este metal frente al magnesio. Para ello, hemos empleado nitrato de paladio en la concentración de 1g/L de paladio de Merck, referencia 14282.0500.

Hemos empleado también diferentes cantidades para ver la señal frente al aluminio. Las cantidades inyectadas han sido de 2, 3 y 5 μl de esta solución, que corresponden respectivamente a 2, 3 y 5 μg de paladio, cantidades similares a las del magnesio junto con la misma cantidad de muestra.

Los resultados obtenidos han sido:

Se han realizado 4 réplicas por medida.

μg de Pd	Abs. en altura ($0 \pm s$)	nº de réplicas
2	0,245 \pm 0,010	4
3	0,358 \pm 0,025	4
5	0,360 \pm 0,024	4

μg de Pd	Abs. en área ($0 \pm s$)	n° de réplicas
2	$0,062 \pm 0,0050$	4
3	$0,072 \pm 0,0055$	4
5	$0,074 \pm 0,0054$	4

Como puede comprobarse, la señal del nitrato de paladio es mucho menor que la del nitrato magnésico, siendo la cantidad de 3 μl por inyección la óptima para el nitrato de paladio.

V.3.- VARIACIÓN DE LA SEÑAL DEPENDIENDO DEL ESTADO DEL TUBO DE GRAFITO

Con la E.A.A., se emplean tubos de grafito que se someten a temperaturas muy altas durante espacios cortos de tiempo, en nuestro caso 2.600°C. Esto hace que sufran mucho aunque sean tubos pirolíticos especialmente preparados.

Se producen en el interior del tubo, e incluso en el exterior, alteraciones de la superficie que al final llevan a una modificación de la señal. Ello se ve agravado por el tipo de muestra que inyectamos con un contenido en sales enormemente elevado que produce una mayor abrasión del tubo.

Con el fin de ver la variación de la señal a través del tiempo en función del número de inyecciones de muestra que se traduce en una variación del estado del tubo, inyectamos en un tubo nuevo de grafito pirolítico z-tek® como los empleados en todo el trabajo, 20 μl de una mezcla formada por 10 μl de una solución de aluminio de 10 ppbs, 5 μl de agua con HNO_3 al 1% y 5 μl de modificador de nitrato magnésico.

El equipo estuvo funcionando hasta que el aparato se paró automáticamente por fallo del tubo, cosa que sucedió a las 219 inyecciones.

Tras el estudio de la señal hemos podido comprobar :

-Que a los 58 pinchazos ha habido una drástica bajada de la señal

-Que a los 119 pinchazos se produce otra bajada importante de la señal.

-Que a partir de los 119 pinchazos la señal decae progresivamente y no se estabiliza.

Los resultados obtenidos han sido:

Nº de pinchazos	Valor medio en alturas	s	C.V.
Hasta 58	0,258	± 0,016	6,2%
Desde 59 hasta 119	0,224	± 0,017	7,5%

Nº de pinchazos	Valor medio en áreas	s	C.V.
Hasta 58	0,030	± 0,0024	8,0%
Desde 59 hasta 119	0,025	± 0,0026	10,3%

En el estudio que hemos hecho, contemplamos tres estados de tubo en función del número de inyecciones en el mismo.

Así, podemos establecer como tres “estados” de calidad del horno de grafito según el número de inyecciones de muestra:

-Tubos nuevos: Aproximadamente de 0 a 50 inyecciones de muestra

-Tubos seminuevos: Aproximadamente de 50 a 110 inyecciones de muestra

-Tubos gastados: Con más de 110 inyecciones de muestra. A partir de aquí se hace mucho más difícil obtener valores reproducibles de los datos ya que la señal no se estabiliza y decae progresivamente.

Estos resultados son también interesantes a la hora de emplear el método con muchas muestras, pues a partir de un determinado número de ellas que coincidirán con el número de inyecciones (de 0 a 50 o de 50 a 110), será necesaria una recalibración para corregir el descenso de señal producido por el gasto del tubo. Además la vida útil para este elemento está sensiblemente acortada y así cuando para otros análisis ésta puede llegar hasta 250 inyecciones o más (como por ejemplo para el plomo), con el aluminio no se deben sobrepasar los 120 pinchazos si no queremos obtener resultados muy poco reproducibles.

Por último, aun cuando la señal a partir de 50 pinchazos aproximadamente, es repetitiva, su coeficiente de variación es mucho mayor por lo que los resultados serán menos reproducibles.

Hay que tener en cuenta no obstante, las cantidades de aluminio tan pequeñas que se inyectan lo que dificulta la obtención de resultados con coeficientes de variación menores.

Esta variación de señal conforme se va gastando el tubo de grafito influirá en las rectas de calibración por lo que se tendrá que tener en cuenta a la hora de establecer la técnica de calibración.

V.4.-ATOMIZACIÓN

Para la atomización del aluminio necesitamos un rápido incremento de la temperatura, para obtener una densidad de nubes de átomos que haga posible una sensibilidad adecuada a las bajas concentraciones del metal en el líquido de hemodiálisis.

Sin embargo, tampoco es conveniente exceder en mucho la temperatura de atomización, ya que temperaturas demasiado altas suponen un mayor sufrimiento del tubo con los inconvenientes señalados más arriba, además de que pueden producirse pérdidas por difusión en todo el tubo, lo que deteriora la eficiencia de la medida.

La principal ventaja de un calentamiento rápido es que permite menores temperaturas de atomización con aumento de la sensibilidad.

El modelo experimental diseñado estudia el efecto de la velocidad para alcanzar la temperatura de atomización (2600°C) a partir de una temperatura de calcinación de 1300°C.

V.4.A.-CURVA A DE CALENTAMIENTO RÁPIDO.

Se ensayaron distintas temperaturas de atomización a una velocidad de 1625°C por segundo (de 1300° a 2600°C en 0,8 segundos).

Los parámetros del muestreador fueron:

VOLUMEN (μl)

ESTÁNDAR	BLANCO	MODIFICADOR
10	10	5

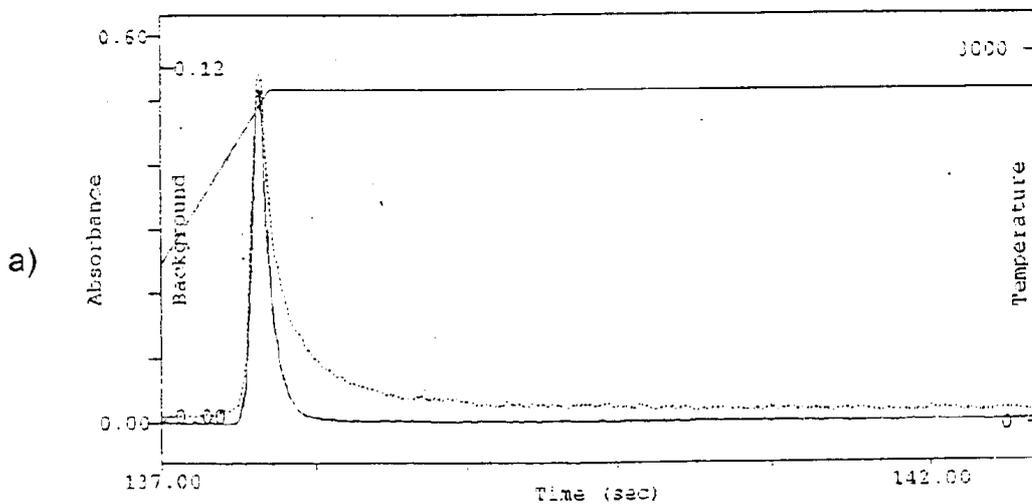
Programamos la inyección automática de 10 μl de estándar de 20 ppbs, 10 μl de líquido de hemodiálisis (1:10) en agua con HNO₃ al 1% y 5 μl de modificador de Mg(NO₃)₂. Con 4 réplicas por punto.

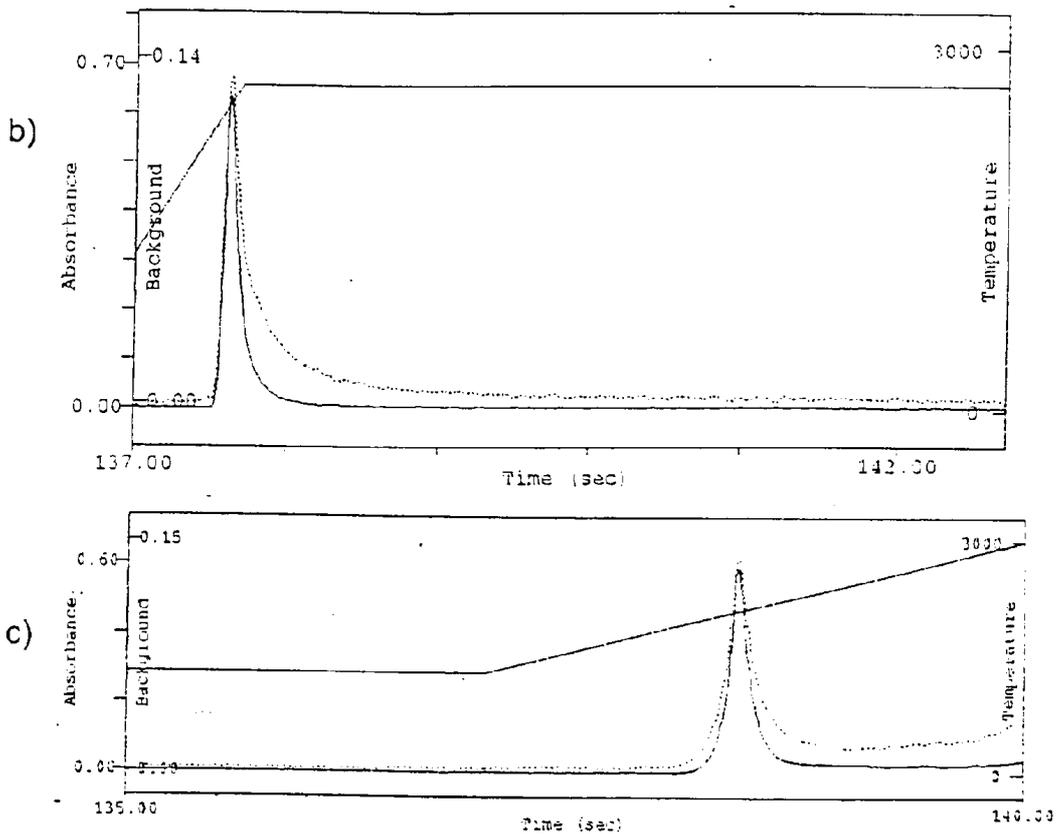
Los resultados fueron:

T ^a de atomización	Absorbancia (x ± s) en alturas
1700	0,009 ± 0,0016
2000	0,370 ± 0,024
2300	0,491 ± 0,034
2600	0,630 ± 0,037
3000	0,620 ± 0,034

T ^a de atomización	Absorbancia (x ± s) en áreas
1700	0,007 ± 0,0012
2000	0,060 ± 0,0047
2300	0,066 ± 0,0050
2600	0,081 ± 0,0059
3000	0,078 ± 0,0045

Como puede observarse por los resultados, con esta velocidad de atomización la temperatura óptima de atomización será de 2600°C, ya que temperaturas superiores no aportan una mejor señal y sin embargo producen mayor sufrimiento al tubo.





Gráfica 7.- Representación del pico de aluminio a distintas temperaturas de atomización: 2.300°C (a), 2.600°C (b) y 3.000°C (c). Velocidad de atomización rápida (de 1.300 a 2.600°C en 0,8 segundos).

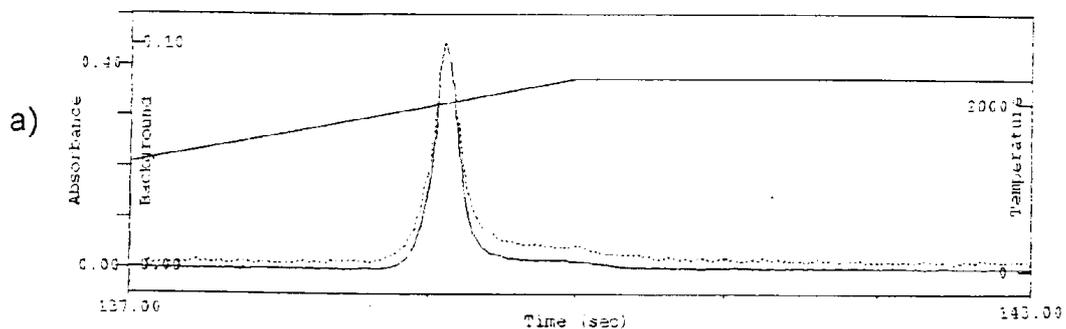
V.4.B.-CURVA B DE CALENTAMIENTO LENTO

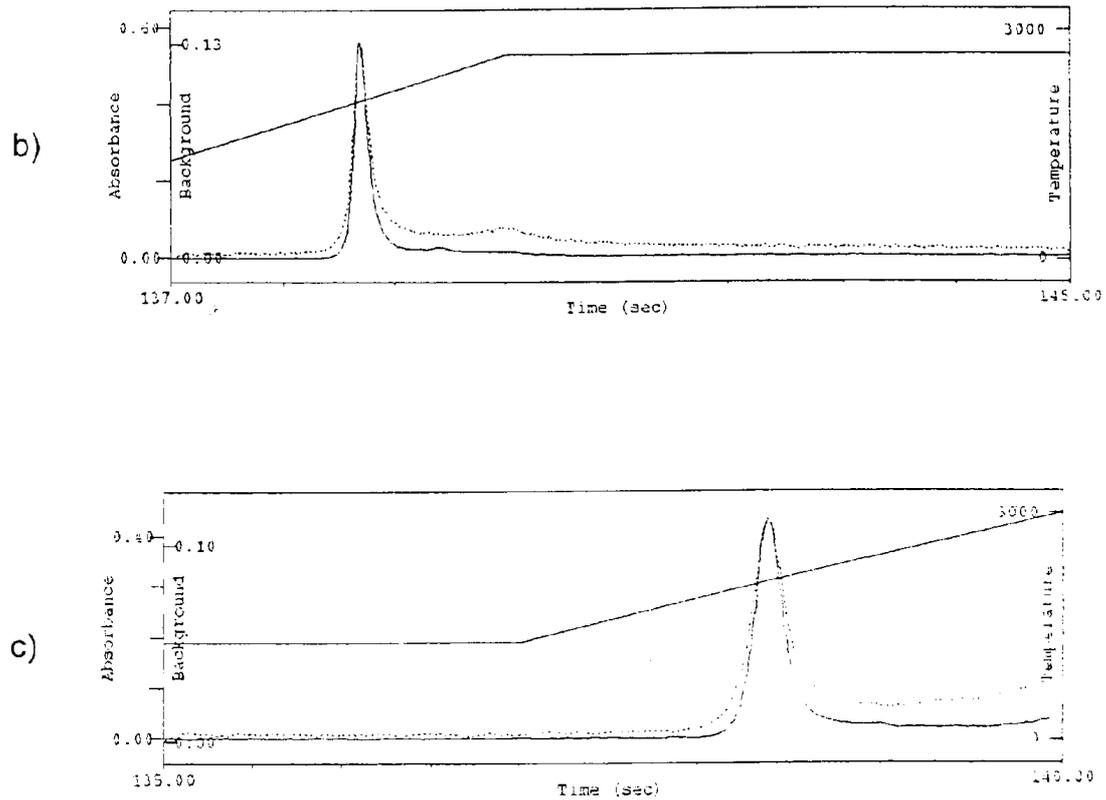
Se ensayaron distintas temperaturas de atomización a una velocidad de 500°C por segundo (de 1300 a 2600°C en 2,6 segundos).

Los resultados obtenidos fueron.

T ^a de atomización	Absorbancia (x ± s) en alturas
1700	0,007 ± 0,0016
2000	0,288 ± 0,025
2300	0,445 ± 0,027
2600	0,563 ± 0,030
3000	0,460 ± 0,029

T ^a de atomización	Absorbancia (x ± s) en áreas
1700	0,005 ± 0,0022
2000	0,050 ± 0,0028
2300	0,051 ± 0,0032
2600	0,061 ± 0,0039
3000	0,060 ± 0,0038





Gráfica 8.- Representación del pico de aluminio a distintas temperaturas de atomización: 2.300°C (a), 2.600 °C (b) y 3.000°C (c). Velocidad de atomización lenta (de 1.300° a 2.600°C en 2,6 segundos).

El calentamiento a una máxima velocidad consigue unas máximas sensibilidades, mientras que con un calentamiento más lento no se alcanzan esas absorbancias.

Seleccionamos como temperatura óptima de atomización 2600°C, alcanzados en 0,8 segundos a partir de una temperatura de 1300°C.

En el paso siguiente mantenemos 2600°C durante 3 segundos, tiempo necesario para completar la atomización del analito.

Es en estos 3,8 segundos cuando activamos el comando de lectura que nos medirá la señal del aluminio, evitando la lectura en el resto del proceso.

Se ha dejado un tiempo de 2 segundos de calcinación sin flujo de gas previo a la atomización, con el fin de garantizar que no hay pérdida de analito mientras se efectúa la lectura durante la atomización.

La temperatura de atomización en la muestra de hemodiálisis es mayor de 2500°C, que es la temperatura habitual de atomización del aluminio en solución acuosa ²¹³. Ello es debido a que en matrices complejas y/o poco volátiles son necesarias temperaturas de atomización mayores ²¹⁴.

Finalmente se incluye un último paso a 2800°C durante 3 segundos para limpiar los residuos que queden de la muestra en el tubo de grafito, inyectándose al mismo tiempo argón a un flujo de 3 L/min.

PARÁMETROS DEL HORNO

Paso nº	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo de gas (L/min)	Tipo de gas	Lectura
1	75	5,0	0,0	Argón	No
2	95	40,0	3,0	Argón	No
3	120	40,0	3,0	Argón	No
4	500	15,0	3,0	Argón	No
5	1300	25,0	3,0	Argón	No
6	1300	10,0	3,0	Argón	No
7	1300	2,0	0,0	Argón	No

Paso nº	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo de gas (L/min)	Tipo de gas	Lectura
8	2600	0,8	0,0	Argón	Sí
9	2600	3,0	0,0	Argón	Sí
10	2800	3,0	3,0	Argón	No

V.5.-LECTURA A LONGITUD DE ONDA DE 309,3 nm

El aluminio absorbe las radiaciones electromagnéticas de longitud de onda de 396,2 nm al ser ésta una de las longitudes de onda de excitación de este metal, sin embargo existe otra longitud de onda alternativa a 309,3 nm que se recomienda en algunos casos ²¹⁴. Esta longitud de onda presenta el inconveniente de tener un MSR (Ratio de Sensibilidad Magnética) del 88% frente a un MSR del 100% para los 396,2 nm²¹⁴.

Para ello y con el fin de ver el comportamiento del aluminio a esta longitud de onda, se han efectuado varios ensayos tendentes a comprobar la posibilidad de su empleo en el líquido de hemodiálisis.

V.5.A.-ANÁLISIS DE SOLUCIÓN PATRÓN DE ALUMINIO DE 10 PPB EN AGUA Y HNO₃ AL 1%:

Se utilizó la rampa de temperaturas citada más arriba midiendo a 309,3 nm. Se han inyectado 10µl de una solución de 10 ppbs de aluminio, 5 µl de blanco (agua calidad A.A. con HNO₃ al 1%) y 5 µl de modificador de Mg(NO₃)₂. Cantidad inyectada 100 pg.

Los resultados obtenidos sobre 10 medidas fueron:

Longitud de onda (nm)	Señal de Al en altura	C.V.	Señal de Al en área	C.V.
309,3	0,262	6,7	0,038	7,6

La señal de fondo fue:

Fondo en altura	Fondo en área
0,061	0,011

V.5.B.-ANÁLISIS DE SOLUCIÓN PATRÓN DE ALUMINIO DE 10 PPB EN LÍQUIDO DE HEMODIÁLISIS:

Todos estos valores son aceptables si se comparan con lecturas a la longitud de onda de 396,2. Sin embargo, los resultados se complican cuando se realiza la inyección de esta misma solución mezclada con líquido de hemodiálisis según la siguiente proporción: 10 μ l de la solución de 10 ppbs de aluminio, 10 μ l de líquido de hemodiálisis diluido 1:10 y 5 μ l del modificador de $Mg(NO_3)_2$. El blanco se hizo con agua calidad A.A. con HNO_3 al 1%. Cantidad inyectada 100 pg.

Los resultados obtenidos sobre 10 medidas han sido:

Longitud de onda (nm)	Señal de Al en altura	Señal de Al en área
309,3	0,041	0,006

La lectura del fondo por el contrario fue de:

Fondo en altura	Fondo en área
0,288	0,037

Como se puede observar, la señal de fondo está anormalmente elevada mientras que la señal del aluminio muy disminuida. Esto puede ser debido a que a la longitud de onda de 309,3 nm no se produce una adecuada corrección del fondo, lo que se traduce en una disminución de la señal del metal que llega al detector. Todo esto excluye realizar el ensayo a 309,3 nm.

V.6. OPTIMIZACIÓN DE LA MUESTRA A INYECTAR

En todos los ensayos que se han realizado ha sido fundamental la inyección de la muestra y la manera en que ésta se preparara para la realización del análisis.

En lo que se refiere a la inyección de la muestra, se considera indispensable, dada la cantidad tan pequeña de aluminio a inyectar y los problemas que éste presenta para su determinación, el empleo de un inyector automático que asegure al máximo la reproducibilidad de la inyección y lo que tal vez sea más importante, garantice que la muestra va a depositarse en la misma posición del tubo en todo momento.

Esto es importante pues se ha podido observar cómo según se depositara la gota en el fondo del tubo de grafito o resbalara por las paredes, los resultados eran muy distintos. En el primer caso es posible asegurar una correcta reproducibilidad del análisis, mientras que en el segundo caso esto resulta imposible. Las señales varían totalmente hasta el punto de hacer imposible la calibración.

La forma en que la muestra se prepara para ser inyectada en el tubo es otro factor fundamental a la hora de poder realizar el análisis de aluminio en líquido de hemodiálisis por espectroscopía de absorción atómica. En efecto,

como ya se ha demostrado más arriba la inyección de este producto sin una adecuada dilución hace imposible determinar el aluminio por este método. El líquido de hemodiálisis inyectado sin diluir, produce tal deposición de sales en el tubo de grafito que impide la adecuada siembra de las restantes muestras.

Finalmente, se ha comprobado cómo el tubo de grafito, tal vez por el resultado de la abrasión producida por las sales disueltas, no resiste más de 100-110 inyecciones sin sufrir un deterioro tal que hace necesario su sustitución.

Por ello en los ensayos que se han realizado se optó por emplear en todo momento líquido de hemodiálisis diluido 1:10 con agua calidad A.A. y HNO₃ Suprapur de Merck al 1%.

Como se observa en el trabajo, esta manera de presentar la muestra (diluida 1:10) tiene la ventaja de que elimina el grave problema de la gran cantidad de sales disueltas en el preparado farmacéutico. No obstante este sistema no carece por desgracia de inconvenientes, ya que si bien se consigue obviar de una manera importante el problema de fondo y de abrasión del tubo de grafito, se introduce otro problema importante cual es el hecho de disminuir mucho (10 veces) la cantidad de aluminio que se inyecta en cada análisis.

Esto es un problema importante a la hora de la reproducibilidad de la técnica, porque si ya la cantidad de aluminio presente en el líquido de hemodiálisis es de por sí reducida (el máximo permitido por las farmacopeas es de 100 ppbs^{215, 216} aunque la mayoría de los preparados farmacéuticos presentan concentraciones de aluminio menores), ésta todavía se disminuye más como consecuencia de la dilución.

De esta manera, a la hora de cuantificar hay que tener presente que habitualmente se van a hacer mediciones de 2-3 ppbs lo que supone una cantidad de 20-30 pg de muestra por cada inyección. La concentración en el líquido de hemodiálisis se obtendrá multiplicando por 10 el resultado del análisis.

Sin embargo y a pesar de estas dificultades es posible mediante esta técnica, como se verá a continuación, obtener resultados aceptables con una exactitud y precisión razonables.

V.7.-EMPLEO DE PLATAFORMA

El uso de plataforma de grafito en espectroscopía de absorción atómica es beneficioso en algunos casos ya que se consiguen eficiencias de atomización mejores al poder vaporizar el analito a fase gaseosa a temperaturas menores.

La plataforma consiste en una pequeña “bandeja” también de grafito, introducida en el interior del tubo y “fijada” al mismo mediante unas guías o ranuras realizadas en su interior.

Además, con la plataforma, las temperaturas son más uniformes en toda la muestra que cuando se usa el tubo directamente, ya que en este caso la parte de muestra en contacto con la pared se calienta más rápidamente.

Con el fin de comprobar si para esta técnica era recomendable o necesario su empleo, se inyectaron 10 μ l de una solución patrón de aluminio de 10 ppbs (cantidad inyectada 100 pg), 10 μ l de líquido de hemodiálisis diluido 1:10 y 5 μ l del modificador sobre la plataforma de grafito.

Se han empleado plataformas de grafito pirolítico “forked” en tubos de grafito pirolítico especialmente diseñados para contenerlas.

Tras los ensayos realizados, se han observado algunos inconvenientes:

1.-Disminuye ligeramente la precisión al pasar de un coeficiente de variación de la señal en altura de 6,5% sin plataforma a 8,0% con plataforma con cinco aplicaciones.

2.-Disminuye la sensibilidad pasando de una absorbancia en altura de 0,360 sin plataforma a 0,250.

Estos inconvenientes añadidos al hecho de que sin plataforma se consiguen calcinaciones a 1.300°C sin pérdidas apreciables de analito, nos llevó a prescindir de la plataforma de grafito para el análisis de aluminio en el líquido concentrado de hemodiálisis.

V.8.-EMPLEO DE PREINYECCIÓN

Con el fin de ver posibles diferencias entre la adición del modificador mezclado con la muestra o previamente a la misma, procedimos a realizar este ensayo en el que el modificador se adicionaba antes que la muestra.

El modificador (5 μ l) es preinyectado en el tubo de grafito y sometido al primer paso del programa, que en 5 segundos alcanza los 75 °C.

El programa del horno comienza de nuevo con el primer paso cuando inyecta la muestra y el estándar.

De los resultados obtenidos podemos decir que el empleo de la pre-inyección no conlleva mejoras analíticas: inyectamos 150 pg (10 μ l de una solución de 15 ppbs de aluminio) de aluminio con 5 μ l del modificador de Mg(NO₃)₂ y 10 μ l de líquido de hemodiálisis 1:10. Volumen total de inyección de 25 μ l.

Datos obtenidos:

	Sin pre-inyección	Con pre-inyección
Coeficiente de Variación	6,81%	6,92%

	Sin pre-inyección	Con pre-inyección
Absorbancia media en altura	0,505	0,500
Nº de lecturas	10	10
D.S.(s)	0,034	0,035

	Sin pre-inyección	Con pre-inyección
Coefficiente de Variación	7,5%	8,9%
Absorbancia media en área	0,065	0,060
Nº de lecturas	10	10
D.S.(s)	0,0049	0,0053

V.9.-MEDIDA ANALÍTICA Y LECTURA

Con la EAA se pide velocidad, alta precisión y los menores límites de detección. Estos dos últimos puntos pueden alcanzarse gracias al sistema de medida eléctrica capaz de registrar pequeñas diferencias de absorción. Pero éstas sólo tiene significado si las señales son estacionarias y estables. Esto se consigue con una buena fuente de radiación que sea estable y con un sistema óptico adecuado.

Para medir los cambios de absorbancia que dependen del tiempo se puede registrar la altura máxima del pico de absorbancia (lo que suele llamarse lecturas en altura de pico), generado durante la medida.

La otra posibilidad de medida es registrar valores integrados calculados de medidas instantáneas durante un determinado periodo de tiempo seleccionado (lecturas en área de pico).

Las medidas en área de pico (absorbancias integradas) suelen ser las preferidas. Dado que la matriz influye en la velocidad de atomización del analito, las medidas hechas de la altura del pico variarán al modificarse la matriz, mientras que la absorbancia integrada estará menos afectada, siendo mejor la precisión alcanzada con medidas de área de pico.

Sin embargo, cuando se analizan señales bajas, cerca del límite del método, el ruido electrónico influye más en la lectura del área de pico que en la altura de pico por lo que es más razonable leer en altura de pico.

En nuestro caso hemos podido comprobar como las medidas de altura de pico son mayores y más precisas. Para esta experiencia, hemos medido la señal de 20 muestras de 5, 10 y 15 ppb,s en áreas y alturas. El volumen inyectado en las muestras ha sido de 10 μ l de cada una de estas diluciones y 5 μ l de modificador.

Los resultados obtenidos han sido para las distintas soluciones del patrón:

Concentración (ppbs)	Señal en altura (Valor medio)	D.S.	C.V.	Señal en área (Valor medio)	D.S.	C.V.
5	0,134	$8,7 \cdot 10^{-3}$	6,51 %	0,018	$1,3 \cdot 10^{-3}$	7,06 %
10	0,265	$14,9 \cdot 10^{-3}$	5,30 %	0,037	$2,4 \cdot 10^{-3}$	6,60 %
15	0,400	$20,3 \cdot 10^{-3}$	5,10 %	0,055	$4,0 \cdot 10^{-3}$	7,30 %

Como puede observarse, los C.V. de las distintas soluciones son mejores cuando medimos la señal en altura, por lo que en nuestro caso, utilizaremos los resultados que se obtienen de las medidas en altura de pico.

V.10.-TÉCNICA DE CALIBRACIÓN

La matriz en la que se encuentra el aluminio, es muy compleja al estar formada por muy diversas sales en elevada concentración. Por ello, se hace imprescindible contemplar el posible efecto que la matriz puede ejercer sobre la determinación del metal por absorción atómica.

Para ello, hemos estudiado dos técnicas de calibración del aluminio en el líquido de hemodiálisis.

V.10.A.-CALIBRACIÓN NORMAL

Puesto que la muestra no es posible inyectarla tal cual en el horno de grafito por los problemas ya citados con anterioridad, hemos recurrido a realizar una dilución 1:10 de la misma en agua calidad absorción atómica, conteniendo HNO₃ Suprapur al 1%. Nos planteamos la posibilidad de poder determinar el aluminio en esta dilución empleando una recta de calibración en la que el metal estuviera disuelto en agua con HNO₃ Suprapur al 1%.

Para esto, hemos empleado una recta de calibración de 3 puntos con 5, 10 y 15 ppbs de aluminio. Estas concentraciones nos han parecido adecuadas por cuanto, como ya se ha dicho, los límites máximos permitidos en las farmacopeas para el aluminio en los líquidos concentrados de hemodiálisis son de 100 ppbs. Puesto que la dilución que vamos a efectuar es de 1:10 el límite máximo permitido para nuestra dilución será de 10 ppbs. (En realidad 100 pg ya que se van a inyectar 10 µl de la muestra diluida en el horno de grafito).

Para ello, y a partir de una solución patrón de aluminio de $1,000 \pm 0,002$ g/L, preparamos una solución patrón de aluminio de 10 ppbs en agua con HNO₃ Suprapur al 1%.

El inyector automático está programado para realizar tres inyecciones del patrón de 50, 100 y 150 pg que equivaldrán a los tres puntos de la recta de calibración de 5, 10 y 15 ppbs.

Como modificador se ha empleado nitrato magnésico a una concentración de $10,0 \pm 0,2$ g/L de Mg. Se inyectan $5 \mu\text{l}$ del modificador. El volumen final es de $20 \mu\text{l}$ completándose con agua calidad A.A. y HNO_3 al 1%.

Se han realizado cinco curvas de calibración, los valores medios obtenidos son:

$$b = 0,02240 \quad s = 2,01 \times 10^{-3}$$

$$a = 0,04732 \quad s = 12,60 \times 10^{-3}$$

Siendo a y b los coeficientes de la recta. $y = a + bx$, en la que la ordenada representa los valores de absorbancia medidos y las abcisas las concentraciones de aluminio ($\mu\text{g/L}$) de los patrones.

El coeficiente de correlación r medio obtenido fue de 0,9935 ($s = 4,98 \times 10^{-3}$)

V.10.B.-ADICIONES ESTÁNDAR

Se realiza una técnica de calibración por adiciones de estándares en las que se van añadiendo cantidades crecientes de aluminio a una solución diluida igualmente 1:10 con agua destilada calidad absorción atómica. De esta manera obtenemos una recta de calibración de 0, 5, 10 y 15 ppbs.

Se han elegido estos puntos porque se recomienda que la concentración del patrón sea tal que el punto medio de la recta coincida con el límite máximo permitido en aluminio por las farmacopeas^{215, 216}, si bien diluido diez veces, por el problema ya visto de la gran cantidad de sales presentes en estos líquidos de hemodiálisis.

Se realizan tres réplicas por adición.

La aproximación de la regresión de mínimos cuadrados se aplica a los puntos de calibración para producir una gráfica lineal. Por esta razón, es necesario elegir los volúmenes de muestra, longitudes de onda analíticas y parámetros operacionales adecuados para asegurar que las medidas de absorbancia estén en la región lineal de la curva analítica.

La obtención de muestras alícuotas, así como la adición de cantidades crecientes de patrón de aluminio y de solvente (agua con nítrico al 1%) se realiza automáticamente ajustándose al siguiente programa:

PARÁMETROS DEL MUESTREADOR

VOLÚMENES (μL)

	ESTÁNDAR	MUESTRA	BLANCO	MODIFICADOR
Blanco	-	-	25	5
Adición 1	5	10	10	5
Adición 2	10	10	5	5
Adición 3	15	10	0	5
Muestra	-	10	15	5

El muestreador automático pipetea exactamente los volúmenes especificados a partir de las siguientes soluciones:

Estándar: 10 $\mu\text{g/L}$ de aluminio

Modificador: 500 mg de Mg /L

Blanco: agua destilada con HNO_3 al 1% V/V

Muestra: Líquido concentrado de hemodiálisis diluido 1:10 en blanco.

Realizada la recta cinco veces, los valores medios obtenidos son:

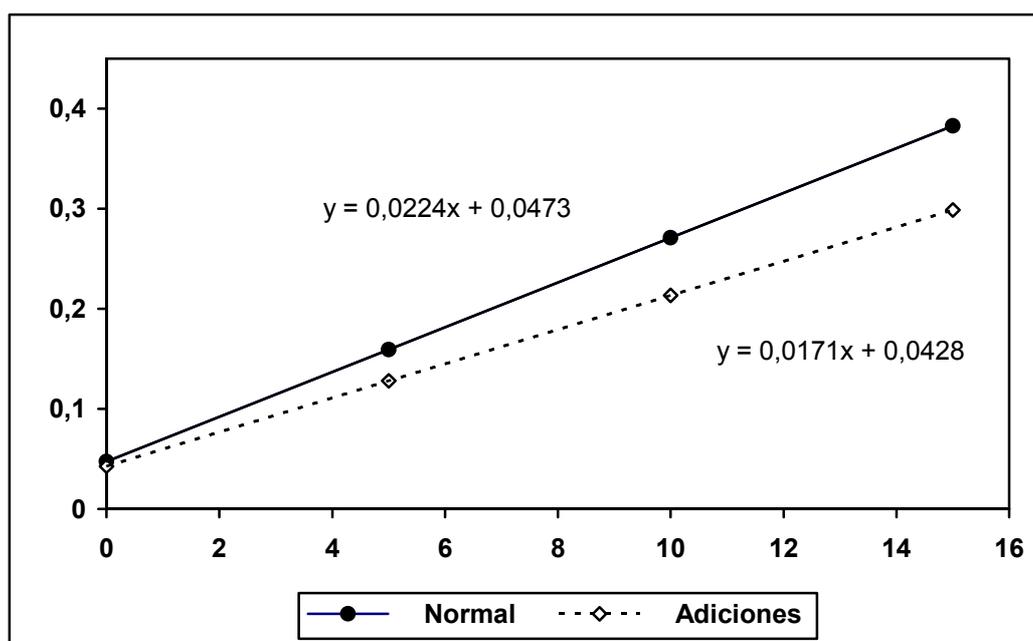
$$b = 0,01707 \quad s = 6,02 \times 10^{-3}$$

$$a = 0,04280 \quad s = 0,01390$$

Siendo a y b los coeficientes de la recta $y = a + bx$, donde la ordenada son los valores de absorbancia medidos frente a la abscisa, que representa las concentraciones añadidas de patrón de aluminio.

El coeficiente de correlación r medio obtenido fue de 0,9847 ($s = 0,0147$)

La pendiente de la recta de calibración normal (0,02236) es un 23,64% mayor que la de por adiciones estándar (0,01707) (Gráfica 9).



Gráfica 9.- Comparación de pendientes de las dos rectas de calibración con y sin adiciones estándar.

Por ello, se hace necesario analizar las dos rectas de calibración con el fin de averiguar cual de ellas puede interesar más a la hora de establecer el método de análisis.

Analizando los valores de a, b y r de las rectas de calibración resultantes por ambos métodos, los resultados (s y C.V.) de cada una de las variables de la recta se indican en tabla adjunta:

CALIBRACIÓN NORMAL (medidas en alturas):

b	a	r
$s = 2,01 \times 10^{-3}$	$s = 12,60 \times 10^{-3}$	$s = 4,98 \times 10^{-3}$

ADICIONES ESTÁNDAR (medidas en alturas):

b	a	r
$s = 6,02 \times 10^{-3}$	$s = 13,9 \times 10^{-3}$	$s = 14,7 \times 10^{-3}$

Ante los resultados obtenidos y dado que en ambos casos es preciso diluir considerablemente la muestra (10 veces) con agua calidad A.A. optamos por seguir la técnica de calibración con estándares acuosos.

V.11 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de detección según la IUPAC²¹⁷ es la menor concentración (D_L) o cantidad (Q_L) de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado.

Según USP XXIV²¹⁸ el límite de detección es la menor cantidad de analítico en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones experimentales establecidas. El límite de detección suele ser expresado en términos de concentración (porcentaje, partes por billón, etc.) en la muestra.

Aunque existen diferentes procedimientos para el cálculo del límite de detección ²¹⁹, nosotros hemos empleado el método del análisis repetido del blanco de la muestra.

Para ello, hemos empleado una recta de calibración de pendiente 0,02408 frente a la cual hemos leído 10 blancos cada uno de ellos tres veces.

Aplicando la fórmula :

$$D_L = \frac{K \cdot s_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{3}}$$

donde:

K es una constante = 3

s_{bl} es la desviación estándar de 10 blancos = $6,3 \times 10^{-3}$

b es la pendiente de la recta de calibración = 0,02408

A partir de aquí el valor de D_L es = 0,453 ppbs. Teniendo en cuenta que la dilución del líquido de hemodiálisis es 1:10, el límite de detección del aluminio en estos preparados concentrados será de 4,53 ppbs.

El límite de detección es un parámetro analítico de gran interés en los casos como este en que se analizan elementos a nivel de trazas, pues de esta manera podemos saber por debajo de que concentración no hay certeza de poder ser detectado.

El límite de cuantificación es, según la USP XXIV²¹⁸, la menor concentración C_L o cantidad Q_L de analito de una muestra que puede ser determinada con aceptable precisión y exactitud bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de cuantificación es un término cuantitativo (menor cantidad medible), mientras que el límite de detección es cualitativo (menor cantidad detectable).

En nuestro caso, los límites de detección y cuantificación son convenientes conocerlos, puesto que en nuestro ensayo nos movemos en los niveles de trazas al estar investigando un elemento presente en muy bajas concentraciones.

La fórmula a aplicar es la anterior sólo que en este caso $K = 10$.

$C_L = 1,511$ ppbs. Por el mismo razonamiento anterior la cantidad mínima cuantificable será de 15,11 ppbs.

V.12.TESTS DE LINEALIDAD Y PROPORCIONALIDAD

V.12.A.-TEST DE LINEALIDAD

En nuestro ensayo, hemos comprobado la linealidad hasta un total de 25 ppbs lo que supone 2,5 veces la concentración máxima permitida en el líquido de hemodiálisis, si suponemos como siempre una dilución previa en agua calidad A.A. de 1:10.

Programamos las inyecciones de estándar (aluminio), modificador y blanco adecuadas para conseguir las siguientes concentraciones:

$\mu\text{g Al/L}$	Absorbancias medias	% C.V. (3 réplicas)
0	0,061	8,15
5	0,138	6,04
10	0,270	5,50
15	0,410	5,30

$\mu\text{g Al/L}$	Absorbancias medias	% C.V. (3 réplicas)
20	0,540	4,92
25	0,687	5,13

Se observa un significativo aumento en el C.V. del blanco que es debido a que la señal es muy baja, por lo que la variación entre las diversas medidas es mayor que cuando la muestra tiene aluminio presente.

Para nosotros es suficiente comprobar la linealidad hasta estos límites puesto que teniendo en cuenta la dilución antedicha de las muestras, una lectura de 25 ppbs nos supondría un contenido en aluminio en el líquido concentrado de hemodiálisis de 250 ppbs, cifra 2,5 veces superior al límite máximo permitido por las farmacopeas (cifrado en 100 ppbs). Este límite nos permite un margen en la linealidad suficientemente grande como para dar No Aceptable cualquier muestra con valores de aluminio superior a las 100 ppbs.

La recta correspondiente a estos datos tiene una ecuación (Gráfica 10):

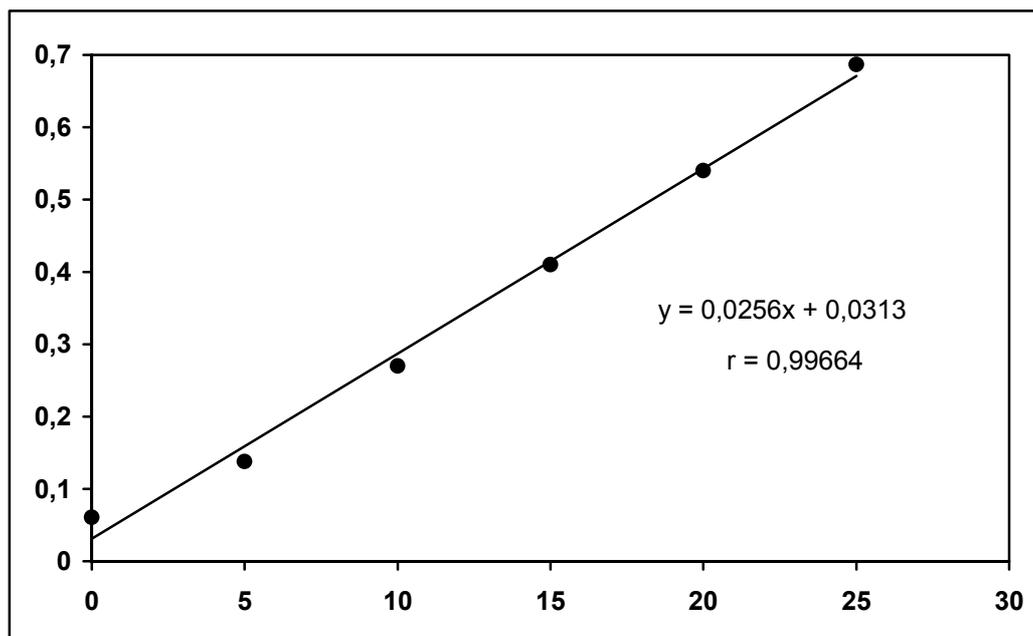
$$y = 0,0256 x + 0,0313$$

siendo el valor de r de 0,99664 y el de r^2 de 0,9933.

El valor de r refleja el grado de relación o ligazón entre las variables x (concentración) e y (respuesta).

Su valor máximo es 1. Si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada.

En análisis de trazas como es nuestro caso, se aceptan valores de r iguales o superiores a 0,990.



Gráfica 10.- Recta de calibración empleada para los tests de linealidad y proporcionalidad.

En nuestro caso, en las tablas de r , para $n-2$ grados de libertad $(18-2) = 16$, el valor obtenido supone una correlación positiva con una probabilidad superior al 99,9% (significativa al uno por mil) ya que $r(16, 0,001) = 0,708$.

El cuadrado del coeficiente de correlación r^2 se denomina coeficiente de determinación e indica la proporción de la varianza total de y que es explicada por el modelo lineal de regresión. En nuestro caso la variable independiente explica una 99,30% de la varianza total de y .

Sin embargo, no es suficiente con valores elevados de r para demostrar la linealidad. Ésta se demuestra mediante los procedimientos siguientes:

a) Coeficiente de variación de los factores de respuesta:

El factor de respuesta (f) es el cociente entre los valores del término dependiente (lecturas) y el independiente (concentración). Puede tomarse como una aproximación de la sensibilidad de calibrado a esa concentración.

Cuando la calibración es lineal, los factores de respuesta para los valores de las diferentes concentraciones deberán ser similares entre sí, lo que indicará una similitud en la sensibilidad de calibrado a lo largo de los diferentes puntos de la recta. Por este motivo se puede tomar el coeficiente de variación de los factores de respuesta como una expresión de la linealidad. Valores superiores al 5% del coeficiente de variación de f se consideran falta de linealidad.

En nuestro caso, los resultados son:

Media de f	s_f	C.V. de f
0,027	0,00057	2,117

Como puede comprobarse los factores de respuesta son cercanos entre sí y próximos al valor de la pendiente.

b) Significación estadística del valor de la pendiente

Varios valores se emplean para expresar la linealidad:

La varianza de la pendiente s_b^2 , el error estándar de la pendiente s_b y la desviación estándar relativa s_b rel (%).

Los resultados obtenidos en nuestro caso son:

s_b^2	error estándar de la pendiente s_b	s_b rel (%).
$2,89 \times 10^{-7}$	0,0005	2,103

Los límites de confianza de la pendiente se hallan a partir de la expresión:

$$b \pm t s_b$$

siendo t el valor de distribución de Student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad de $p = 0,05$.

En nuestro caso, los valores oscilan entre:

$$0,0256 \pm 0,0012$$

Otro procedimiento para ver la linealidad, corresponde al test de t .

Consiste en calcular el t experimental t_{exp} a partir de la expresión:

$$t_{exp} = \frac{|b|}{s_b}$$

En nuestro caso el $t_{exp} = 47,545$, valor muy superior al tabulado para $n-2$ datos, incluso para un $p = 0,001$ (0,1 %).

Este valor tan alto nos indica que la probabilidad de ser $b \neq 0$ es muy alta, superior al 99,9%.

Por tanto podemos concluir que el método cumple el test de linealidad siendo por tanto suficientemente lineal para las concentraciones ensayadas.

V.12.B.-TEST DE PROPORCIONALIDAD

Para el test de proporcionalidad se estudia el valor de la ordenada en el origen, que en el caso ideal debería ser 0 lo que indicaría que la recta de calibración pasa por el eje de coordenadas.

Varios valores se emplean para expresar la proporcionalidad:

La varianza del término independiente s_a^2 , el error estándar del término independiente s_a y la desviación estándar relativa $s_a \text{ rel}$ (%).

Los resultados obtenidos en nuestro caso son:

s_a^2	error estándar del término independiente s_a	s_a rel (%).
$6,63 \times 10^{-5}$	0,0081	26,03

Los límites de confianza del término independiente s_a se hallan a partir de la expresión:

$$a \pm t s_a$$

siendo t el valor de distribución de Student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad de $p = 0,05$.

En nuestro caso, los valores oscilan entre:

$$0,0313 \pm 17,26 \times 10^{-3}$$

Otro procedimiento para ver la linealidad, corresponde al test de t .

Consiste en calcular el t experimental t_{exp} a partir de la expresión:

$$t_{exp} = \frac{|a|}{s_a}$$

En nuestro caso el $t_{exp} = 3,841$ valor muy superior al tabulado para $n-2$ datos, incluso para un $p = 0,001$ (0,1 %).

Este resultado nos indica que hay una probabilidad entre el 99,8 y 99,9 % de que a sea distinto de cero.

V.13.-DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN

Podemos definir la precisión como el grado de concordancia entre los valores de un ensayo efectuado sobre una muestra homogénea o también, la distribución de los valores analíticos alrededor de la media.

La precisión nos indica el grado de repetibilidad y reproducibilidad del método analítico en las condiciones normales del ensayo.

En este sentido podemos considerar dos conceptos dentro del mismo:

-Repetibilidad: Es la medida de la precisión de un método efectuado en las mismas condiciones, sobre la misma muestra, por un mismo analista en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis efectuados en un corto intervalo de tiempo. También se puede definir como “precisión intraensayo”.

-Reproducibilidad: Es la medida de la precisión de los resultados de un método analítico efectuado sobre la misma muestra pero en condiciones diferentes. En nuestro caso realizamos el ensayo en 4 días distintos. También se puede definir como “precisión interensayo”.

V.14.-REPETIBILIDAD

Como no existe ningún patrón de líquido de hemodiálisis con una concentración conocida de aluminio y puesto que prepararlo no es posible al desconocer el contenido de aluminio que se encuentra como impureza en las diferentes sales que lo forman, decidimos preparar una dilución 1:10 del líquido de hemodiálisis lote J-36 con blanco (agua calidad a.a. y ácido nítrico al 1%). Inyectamos la muestra 15 veces y los resultados obtenidos fueron:

Concentración en ppbs	$(x - \bar{x})^2$
3,2	0,01
2,8	0,09
2,8	0,09
3,1	0
2,8	0,09
3,6	0,25
3,0	0,01
3,3	0,04
2,8	0,09
3,3	0,04
3,2	0,01
3,7	0,36
3,5	0,16
2,9	0,04
3,1	0
$\bar{x} = 3,1$	$\Sigma(x - \bar{x})^2 = 1,28$

La desviación estándar s calculada a partir de la fórmula: $\sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$

es de 0,30.

El coeficiente de variación (C.V.) calculado a partir de la fórmula: $\frac{s}{\bar{x}} \times 100$

es del 9,7%.

El intervalo de confianza individual calculado a partir de $\bar{x} \pm t.s$ resultó ser de $3,1 \pm 0,64$

El valor de t para n-1 grados de libertad y un 95% de probabilidad es de 2,145.

El intervalo de confianza de los resultados individuales indica que el 95% de los valores están entre 3,74 y 2,46 ppbs de Al.

El intervalo de confianza de la media (95%) según la fórmula: $\bar{x} \pm t.s\bar{x}$ resultó ser de $3,1 \pm 0,165$. Siendo $t = 2,145$ y la desviación estándar de la media $s\bar{x}$ de 0,077.

Este intervalo de confianza indica que el contenido medio de aluminio en la dilución del líquido de hemodiálisis se encuentra, con una probabilidad del 95%, entre 3,265 y 2,935 ppbs de aluminio.

V.15.-REPRODUCIBILIDAD

Para el caso de la reproducibilidad o precisión interensayos, hemos realizado 5 ensayos diarios durante cuatro días consecutivos, teniendo en cuenta que hubo que preparar la muestra diariamente (dilución 1:10 del líquido de hemodiálisis con el blanco), ya que ésta se alteraba de un día para otro a pesar de tenerla tapada y en nevera.

Las concentraciones en ppbs de las muestras han sido:

1^{er} día	2^o día	3^{er} día	4^o día
3,0	3,4	3,5	2,9
3,1	3,8	3,9	3,4
2,8	3,7	3,8	3,1

1 ^{er} día	2 ^o día	3 ^{er} día	4 ^o día
2,8	3,5	3,6	3,2
2,9	3,6	3,7	3,3

$$\bar{x} = 3,35$$

Los valores de la desviación estándar s , la desviación estándar de la media $s_{\bar{x}}$ y el CV son:

s	$s_{\bar{x}}$	CV
0,536	0,079	10,63%

El intervalo de confianza individual (95%) = $3,35 \pm 0,745$

El intervalo de confianza de la media (95%) = $3,35 \pm 0,079$

En cuanto a los coeficientes de variación máximos permitidos en el estudio de la precisión, conviene indicar que éstos varían en función de las concentraciones a detectar en la muestra.

No es lo mismo estudiar un método de análisis de un componente mayoritario que puede estar en el orden de g o mg/L, que sustancias que pueden aparecer al estado de trazas como es el caso de los contaminantes como el aluminio donde la concentración puede estar en el orden de ppms ($\mu\text{g/L}$) e incluso ppbs (ng/L).

En este sentido, Kolthoff y Horwitz²²⁰ indican diferentes coeficientes de variación en función del porcentaje de análisis de la muestra.

MÁXIMOS PERMITIDOS SEGÚN KOLTHOFF Y HORWITZ

Porcentaje de analito en la muestra CV	CV(%) Máximo KOLTHOFF	CV(%) Máximo HORWITZ
100	0,1-0,3	2
50	0,3	2,2
10	1	2,8
1	2-5	4
0,1	5-10	5,7
0,01-0,001	10	8-11,3
0,0001	-----	16

Según estos autores, para el elemento aluminio que se encuentra en líquidos de hemodiálisis en concentraciones de 100 ppbs (0,00001%) como máximo admitido por las farmacopeas, Horwitz admite hasta un 16% de CV, valor muy superior a los CV,s que estamos manejando en nuestro método.

Además puede observarse como los CV,s de la reproducibilidad son mayores que los de la repetibilidad.

Finalmente comentar que las diferencias en los C.V. entre las soluciones patrón de aluminio en agua y nítrico al 1% con las obtenidas al disolver el líquido de hemodiálisis en proporción 1:10 con agua y nítrico al 1%, podrían ser debidas al diferente comportamiento de la muestra en el horno de grafito, como consecuencia de la diferencia tan grande en el contenido de sales entre la solución patrón y la resultante de diluir el líquido concentrado de hemodiálisis, lo que se refleja en la diferente señal de fondo de ambas muestras.

En este sentido, la solución acuosa en ácido nítrico al 1% de 5 ppbs de aluminio presenta un fondo de 0,017 unidades de absorción con un CV de un

8,4% mientras que el fondo del lote J-36 del líquido de hemodiálisis con el que hemos realizado los ensayos presenta un fondo de 0,030 con un CV de 9,2%.

V.16.-DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD

La exactitud indica la capacidad que tiene el método analítico para dar valores próximos al verdadero.

Si la diferencia entre el valor hallado y el verdadero es buena el método es suficientemente exacto y si por el contrario hay grandes diferencias entre los valores obtenidos y el real el método será poco exacto.

La exactitud no debe confundirse con la precisión, así métodos que dan lugar a valores muy próximos unos de otros son métodos precisos aunque puedan no ser muy exactos si los valores obtenidos están alejados del valor real. Por el contrario, podemos tener métodos bastante exactos pero que la dispersión de resultados sea considerable. De la unión de precisión y exactitud en términos adecuados obtendremos un método analíticamente aceptable.

La falta de exactitud puede ser por exceso o por defecto.

-Las desviaciones por exceso suelen producirse cuando existen interferencias analíticas y la selectividad del método no es la adecuada. En estos casos se están obteniendo resultados aumentados por lo que será necesario aumentar esta falta de selectividad.

-Las desviaciones por defecto suelen darse en métodos analíticos que implican muchos pasos como extracciones, purificaciones, concentraciones, etc. que pueden dar lugar a una disminución de la recuperación del producto a analizar.

Con el estudio de la exactitud es posible hallar el porcentaje promedio de recuperación y a partir de aquí establecer un factor de corrección en los cálculos finales que compensen la pérdida de analito.

La exactitud se expresa matemáticamente en forma de porcentaje de recuperación de la cantidad de analito o como diferencias entre el valor hallado y el verdadero.

En nuestro caso el método que seguiremos para el cálculo de la exactitud, es el del análisis repetitivo de varias muestras de concentraciones diferentes.

Estadísticamente se emplea el test t de Student, aunque previamente para determinar si el factor concentración tiene alguna influencia en los resultados, se utiliza un test de igualdad de varianzas de varios grupos muestrales del mismo tamaño. En nuestro caso utilizaremos el test G de Cochran²²¹.

Para determinar si el valor medio hallado y el considerado verdadero no difieren significativamente para un grado de probabilidad determinado, se emplea el test t de Student.

Si el t_{exp} es menor que el t_{tablas} para el riesgo escogido (generalmente $P = 0,05$) y $n-1$ grados de libertad, significa que ambos valores (valor medio experimental y valor considerado real) no son estadísticamente diferentes y que el método escogido es suficientemente exacto.

Preparación de las muestras:

Como ya se ha dicho, no existen patrones de líquido de hemodiálisis con un contenido en aluminio previamente conocido. Para ello, empleamos líquido concentrado de hemodiálisis C-1 J-36 de concentración conocida 33,5 ppbs.

Para realizar este ensayo tomamos varias garrafas de líquido concentrado de hemodiálisis del citado lote y les dosificamos solución de aluminio con el fin

de obtener concentraciones en estas garrafas de 80, 100 y 120 ppbs respectivamente. Valores correspondientes al límite máximo de este metal considerado por las Farmacopeas (100 ppbs) así como un 20% por arriba y por debajo de este valor.

Aplicamos nuestro método y los resultados obtenidos fueron:

80 ppbs	% de recup	$(x-\bar{x})^2$ % recup	100 ppbs	% de recup	$(x-\bar{x})^2$ % recup	120 ppbs	% de recup	$(x-\bar{x})^2$ % recup
78	97,5	0,127	94	94	29,474	128	106,7	38,800
86	107,5	92,930	108	108	73,462	127	105,8	29,398
78	97,5	0,127	101	101	2,468	115	95,8	21,818
72	90	61,780	106	106	43,178	114	95	29,932
86	107,5	92,930	90	90	88,906	112	93,3	51,423
76	95	8,180	106	106	43,178	126	105	12,454
78	90	61,780	91	91	71,048	122	101,7	1,510
$\Sigma(x-\bar{x})^2$ % recup = 317,854			$\Sigma(x-\bar{x})^2$ % recup = 351,714			$\Sigma(x-\bar{x})^2$ % recup = 185,341		

% teórico	%media \pm s	s ²
80	97,86 \pm 7,278	52,970
100	99,429 \pm 7,656	58,614
120	100,471 \pm 5,560	30,910

El test G de Cochran se obtiene de la fórmula:

$$G_{\text{exp}} = \frac{s_{\text{max}}^2}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2} \text{ en nuestro caso:}$$

$$s_{\max}^2 = 58,614 \quad \text{y} \quad G_{\text{exp}} = \frac{58,614}{52,970 + 58,614 + 30,910} = \frac{58,614}{142,494} = 0,411$$

$$G_{\text{tablas}} (P = 0,05, K = 7, n = 3) = 0,671$$

Al ser $G_{\text{exp}} < G_{\text{tablas}}$ significa que las varianzas de las tres concentraciones son equivalentes o dicho de otra forma, que el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

El test t de Student nos indicará si estadísticamente la exactitud es aceptable:

% teórico	Resultados como % de recuperación						
Muestra 1-80	97,5	107,5	97,5	90	107,5	95	90
Muestra 2-100	94	108	101	106	90	106	91
Muestra 3-120	106,7	105,8	95,8	95	93,3	105	101,7

Recuperación media $n = 21$ $R = 99,25\%$

Desviación estándar $s = 6,640$

Coefficiente de variación $CV (\%) = 6,7\%$

$$\text{El } t_{\text{exp}} = \frac{|100 - R|}{CV} \sqrt{n} = \frac{3,44}{6,70} = 0,513$$

$$t_{\text{tablas}} (P = 0,05, \text{GL } 21-1 = 20) = 2,086$$

$$t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}} (0,513 < 2,086).$$

Al ser $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$ no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando la buena exactitud del método.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1^a Se ha puesto a punto un método de análisis mediante espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito y corrección Zeeman, para determinar aluminio en líquidos concentrados de hemodiálisis a concentraciones por debajo de las máximas permitidas en las farmacopeas (100 µg/L), salvando la absorción de fondo provocada por la matriz de sales de estos líquidos.

2^a No fue posible emplear directamente líquido concentrado de hemodiálisis pues su elevado contenido en sales produce una absorción de fondo superior a 2,5 u.a. que es la máxima corrección permitida por las especificaciones del equipo. Lo mismo ocurrió con diluciones 1:2 y 1:5 en agua y nítrico al 1%, optándose al final por realizar los ensayos en una dilución del líquido de hemodiálisis 1:10.

3^a En el estudio del tratamiento térmico de la muestra, se ha encontrado una temperatura óptima de calcinación de 1.300°C y de atomización de 2.600°C.

4^a se ensayaron distintas sales de magnesio como modificadores de matriz. La mayor señal conseguida fue con el nitrato de magnesio, comprobándose además que con 2,5 µg de magnesio por inyección se produce la mayor señal de aluminio.

5^a Se empleó nitrato de paladio como modificador para sustituir al nitrato de magnesio. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios. La señal con el paladio fue menor que con el magnesio con mayores coeficientes de variación.

6^a Se ensayaron distintos flujos de gas durante la calcinación, comprobándose que a 3,0 L/min y con un tiempo de calcinación de 37 segundos es cuando se produce una señal mayor de aluminio.

7^a Los ensayos correspondientes a la atomización del aluminio demuestran que la señal es mayor y más precisa si la velocidad de calcinación es rápida (de 1.300 a 2.600°C en 0,8 segundos). Otras condiciones de calcinación más lentas (de 1.300 a 2.600°C en 2,6 segundos) dan una menor señal, probablemente debido a pérdidas de aluminio durante la atomización.

8^a Se ha podido comprobar cómo la absorción del aluminio en una matriz salina de concentración elevada como es el caso del líquido de hemodiálisis, incluso diluido diez veces, es mayor a 396,2 nm que a 309,3 nm.

9^a Se estudió también el comportamiento de la señal según el estado del tubo de grafito. Se ha podido comprobar que la señal es más elevada durante las 58 primeras inyecciones, aun cuando pueden realizarse ensayos satisfactorios con buenas calibraciones en las condiciones de trabajo del ensayo, con tubos que han recibido hasta 110-120 inyecciones de muestra. Tubos con más inyecciones experimentan una elevada caída de la señal lo que hace muy difícil la cuantificación con ellos.

10^a No se ha demostrado mejora en la señal de absorción del aluminio empleando plataforma ni preinyección de la muestra.

11^a Se han estudiado dos técnicas de calibración para determinar el contenido de aluminio de la solución de hemodiálisis. En ambas técnicas los 3 puntos de calibración fueron 5, 10 y 15 ppbs de aluminio. Tanto en la recta de calibración sin adiciones estándar como en la que emplea adiciones estándar la linealidad fue buena, con un coeficiente de correlación de 0,9935 y 0,9847 respectivamente. La mayor pendiente del primer método (0,02240) frente a la del segundo (0,01707) ha hecho que se utilizara para la cuantificación de las muestras la primera técnica de calibración frente a la segunda.

12^a El límite de detección del aluminio en esta técnica es de 0,453 ppbs para la muestra diluida (4,53 en el líquido concentrado de hemodiálisis) y el límite de cuantificación es de 1,511 ppbs (15,11 ppbs en el líquido de hemodiálisis).

13^a El principal problema a la hora de cuantificar el aluminio en los líquidos concentrados de hemodiálisis fue la inexistencia de soluciones patrón o estándar comerciales con las que poder trabajar partiendo de valores de aluminio conocidos. La repetibilidad, reproducibilidad y exactitud del método se realizó empleando una muestra de un lote determinado de líquido concentrado de hemodiálisis comercial.

14^a La repetibilidad del ensayo o precisión intraensayo resultó ser de $3,10 \pm 0,640 \mu\text{g/L}$ para los valores individuales con un coeficiente de variación del 9,70%.

15^a La reproducibilidad o precisión interensayos fue de $3,35 \pm 0,745 \mu\text{g/L}$ para los valores individuales con un coeficiente de variación del 10,63%.

16^a La repetibilidad y reproducibilidad tienen un coeficiente de variación muy por debajo de los indicados por Horwitz para aquellos analitos que se encuentran en cantidades trazas (menores de 0,0001%).

17^a El test G de Cochran nos indica que para concentraciones de 80, 100 y 120 ppbs de aluminio en los líquidos concentrados de hemodiálisis (valor máximo permitido por las farmacopeas y valores un 20% inferiores y superiores al límite máximo), el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.

18^a El test t de Student indica que para las muestras analizadas con una probabilidad de 0,05 y n-1 grados de libertad, no existe diferencia significativa entre la recuperación media y 100, confirmando la buena exactitud del método.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Kopeloff L.M., Barrear S.E. y Kopeloff N.; *Am. J. Psichiatry*, **98**,881 (1942)
- 2.- Klatzo Y., Wisniewsky H. y Streicher E.; *Neuropatho. Exp. Neurol.*, **24**,187 (1.965)
- 3.- Alfrey A.C., Legendre G.R. y Kaenney W.D.; *N. Engl. J. Med.*, **294**, 184 (1.976)
- 4.- Alfrey A.C., Mishell J.M., Burls J.S., Contiguelia S.R., Rudolph H., Lewin E. y Holmes J. H.; *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organis.*, **18**, 257 (1.972)
- 5.- Berlyne G.M., Ben Ari J., Pest D., Weinberger J., Stern M., Gilmore G.R. y Levine R.; *Lancet*, 494 (1970)
- 6.- Yates C.M., Gordon A. y Wilson H.; *Neuropathol. Appl. Neurobiol*, **2**,131 (1.976)
- 7.- Alfrey A.C., Mishell J.M. y Burks J.; *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* ,**18**, 25 (1972)
- 8.- Arieff A.I. y Massry S.G.; *J. Clin. Invest.*, **53**, 387 (1974)
- 9.- Baluarate H.R., Gruskin A.B. y Hiner L.B.; *Clin. Dial. Transplant Forum* ,**7**, 95 (1977)
- 10.- Dunea G., Mahurkar S.D. y Mamdami B.; *Ann. Intern. Med.* , **88**, 502 (1978)
- 11.- Felndring J.A., Kruis H., y Das H.A.; *Lancet*, **1**, 1235 (1976)
- 12.- Parkinson I.S., Ward M.K. y Feest T.G.; *Lancet* ,**1** ,406 (1979)
- 13.- Pierides A.M., Edwards W.G. y Cullum U.X.; *Kidney Int.* ,**18**,115 (1980)
- 14.- Prior J.C., Cameron E.C. y Knickerboker W.J.; *Am. J. Med.* , **72**, 33 (1982)
- 15.- Rotundo A., Nevins T.E. y Lipton M.; *Kidney Int.* , **21**, 486 (1982)
- 16.- Ward M. K., Feest T. G. y Ellis H. A; *Lancet* ,**1**, 841 (1978)
- 17.- Wing A.J.; *Lancet* , **2**, 190 (1980)
- 18.- Andress D.L.y Sherrar D. J.; Uremic Syndrome. "Diseases of the kidney", Little Brown and Company Editores, Boston, 3078 (1990)
- 19.- Frieman E.A. y Lundin A.P.; Magement of End-satge Renal failure. "Diseases of the kidney", Little Brown and Company Editores, Boston 3075 (1990)
- 20.- Mahurkar S.D., Dhar S.K. y Salta R; *Lancet* ,**1**, 1412 (1973)
- 21.- Arieff A.I; Neurological Complications of Uremia."The Kidney", B. M. Brenner y F.C. Rector, Jr Editores., Philadelphia: (1986)
- 22.- Arieff A.I y Mahoney C.A.; *Neurobehav. Toxicol. Teratol*, **5**, 641 (1983)
- 23.- Alfrey A.C.; Nutrition,drugs and the kidney. "Diseases of the kidney". Little Brown and Co. Eds., Boston, 3158 (1990)
- 24.- Arieff A.I., Lazarowitz V.C. y Guisado R.; *Kidney Int.* ,**14**, 270 (1978)
- 25.- Dunea G., Mahurkar S.D.y Mamdami B.; *Ann. Intern. Med.* ,**88** , 502 (1978)
- 26.- Arieff A.I., Cooper J.D. y Armstrong D.; *Ann. Intern. Med.* , **90** ,741 (1979)
- 27.- Wisniewski H.M., Sturman J.A. y Shek J.W.; *Neurotoxicology* ,**1**, 121 (1980)
- 28.- Griswold W.R., Reznik V. y Mewndoza S.A.; *Pediatrics* , **71**, 56 (1983)
- 29.- Galle P., Chatel M., Berry J.P., y Menault F.; *Nouv. Presse Med.*, **8**, 4091 (1979)
- 30.- Buge A., Escourolle R., Poisson M., Gray G., Bleibel J.M. y Jaudon M.C.; *Nouv. Presse Med.*, **8**, 1071 (1979)

- 31.- Sturman J.A. y Wisniewski H. M.; *"Metal Neurotoxicity"*, Stephen C. Bondy Editor, Boston, 74 (1988)
- 32.- Crapper D.R., Quittkat S., Krisham S.S., Dalton A.J., y De Boni U.; *Acta Neuropathol.*, **50**, 19 (1980)
- 33.- Good P.F. y Perl D.P.; *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **47**, 321 (1988)
- 34.- Álvarez Grande J. y Gago González E.; Hemodiálisis, problemas clínicos y diálisis en casa. *"Tratado de nefrología"*, Ediciones Norma, Madrid, **2ª edic**, 950 (1993)
- 35.- Alfrey A.C.; *Neurotoxicology* , **1**, 43 (1980)
- 36.- Alfrey A.C., Hegg A., y Craswell P.; *Am. J. Clin. Nutr.* , **33**, 1509 (1980)
- 37.- Altmann P., Al-salihi F. y Butter K.; *N. Engl. J. Med.* , **317** ,80 (1987)
- 38.- López-Hilker S., Dusso A. Y Rapp N.; *Am. J. Physiol.* , **259**, F 432 (1990)
- 39.- Farrar G., Altmann P. y Welch S.; *Lancet* , **335**, 747 (1990)
- 40.- Bakir A.A., Hryhorczuck D.O. y Berman E.; *Am. Soc. Artif. Organs*, **32** ,171 (1986)
- 41.- Kirschbaum G.G. y Schoolwerth A.C.; *Am. J. Med. Sci.* , **297** ,9 (1989)
- 42.- Ackrill P., Ralston A.J., y Day J.P.; *Kidney Int.*, **29**, S104 (1986)
- 43.- Sedman A.B., Klein G.L. y Merritt R.J.; *N. Engl. J. Med.* , **312** ,1337 (1985)
- 44.- Sedman A.B., Miller N.I.L., y Worady B.A.; *Kidney Int.* ,**26** ,201 (1984)
- 45.- Grosso S., Fernández Martín J.L., Gómez Alonso C., Barreto S., Díaz Cortes C. y Cannata J.B.; *Nefrología*, **XVI**, 2 (1996)
- 46.- Ellorriaga R., Fernández Martín J.L., Menéndez Fraga P., Naves M.L. y Cannata J.B. ; *Drugs today* , **28** ,177 (1992)
- 47.- Fernández Martín J.L. Menéndez Fraga P., Canteros A., Díaz López J.B. y Cannata Audia J.B.; *Clin. Chem. Acta* ,**230** ,137 (1994)
- 48.- Hodsman A.B., Sherrard D.J. y Wong E.G.C.; *Ann. Intern. Med* ,**94** ,629 (1981)
- 49.- Platts M.M., Goode G.C., y Hislop J.S.; *Br. Med. J.* , **2**,657 (1977)
- 50.- Hudson G.A., Milne F.J. y Meyers A. M.; *Kidney int.* ,**17** , 532 (1980)
- 51.- Parkinson I.S., Word M.K. y Feast T.G.; *Lancet* ,**1**, 406 (1979)
- 52.- Chan Y-L. Furlong T.J. y Cornish C.J.; *Medicine* , **64**, 296 (1985)
- 53.- Lach F., Felsenfeld A.J. y Coleman M.D.; *Kidney Int.* , **29** ,574 (1986)
- 54.- Romero R., Novoa D., Alonso M.C.,Arcoche V. y Sánchez-Guisande D.; *Nefrología* ,**11/2** ,167 (1991)
- 55.- Ittel T.H., Schefer C., Schmitt H., Gladziwa U. y Sieberth H.G.; *Klinn-Wochenschr* ,**69/2** ,59 (1.991)
- 56.- Neste A.W., Meyers A.M. Paiker J. y Rollin Hb. ; *Nephron.* , **68** ,197 (1994)
- 57.- Harris DCH. y Yuill-L.; *Nephron* , **65** ,324 (1993)
- 58.- Krugers-Dagneaux-PGLC; Klein-Elhorst-JT; Knuiff-A-JH y Gonkel-F.; *Pharmweek BL.* ,**126/28** ,642 (1991)
- 59.- Ott. S.M., Maloney N.A. y Coburn J.W.; *N. Engl. J. Med.* ,**307** ,709 (1982)
- 60.- Goodman W.G., Henry D.A. y Horst R.; *Kidney Int.* ,**25** ,379 (1984)
- 61.- Robertson J.A., Felsenfeld A.J. y Haygood C.C.; *Kidney Int.* , **23** ,327 (1983)
- 62.- Domínguez Carmona M.; *"Metales, Aluminio y Salud"* , Ediciones Instituto de España. Real Academia de Farmacia, Madrid , 27 (1990)
- 63.- Alfrey A.C.; *Am. J. Kidney Dis.* , **6** , 209 (1985)
- 64.- Felsenfeld A.J., Harrelson J.M. y Gurman R.; *Ann. Intern. Med.* , **96** , 34 (1982)
- 65.- Graf. H., Stummvold H.K. y Meisinger V. ; *Kidney Int.* ,**19** , 587 (1981)

- 66.- Mayor. G.H. , Sprague S.M. y Hourani M.R.; *Kidney Int.* , **17** , 40 (1980)
- 67.- Zhu J.M., Huffer W., y Alfrey A.C.; *Kidney Int.* , **38** , 1141 (1990)
- 68.- Lieberherr M., Grosse B. y Cournot-Witmar G.; *Calcif. Tissue Int.* , **34** ,280 (1982)
- 69.- Cournot-Witmar G., Plachot J.J. y Bordeau A.; *Kidney Int.* , **29** ,S37 (1986)
- 70.- O'Hare J.A., y Murnaghan D.J. ; *N. Engl. J. Med.* , **306** , 654 (1982)
- 71.- Short A.I.K., Winney R.J., y Robsop J.S.; *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.*, **17**, 226 (1980)
- 72.- Tonam M., Martínez F. y Lacour B.; *Clin. Nephrol.* , **19** , 295 (1983)
- 73.- Casati S., Castelnovo C. y Campise M. ; *Nephrol. Dial. Transplant.* , **5** ,441 (1990)
- 74.- Huber C.T., y Frieden E.; *J. Biol. Chem.* , **245** , 3979 (1970)
- 75.- Morelli (jr) O.H., Morelli O.H. y Estraviz H.O.; Principios físico-químicos y aspectos técnicos. "*Tratado de Nefrología*", Ediciones Norma, Madrid, **2ª edición**, 1070 (1993)
- 76.- Steinmann T.I. y Yager H.M.; *Ann. Intern. Med.* , **89** , 74 (1978)
- 77.- Kiley J.E., Wooddruff N.W. y Pratt K.L.; *Clin Nephrol* , **5** , 245 (1976)
- 78.-Jennekens F.G.I. y Jennekens-Schinkel A.A.G.J.E.; Neurological aspects of dialysis patients. "*Replacement of renal function by dialysis*" , John F. Maher, Kluwer Academic Publishers Editores, Boston, 972 (1989)
- 79.- Callaghan N.; *Neurology* ,**17** , 359 (1966)
- 80.- Boghen D.; *Ann Neurol* , **6** , 341 (1979)
- 81.- Van Scheele C; *Lancet* , **2** , 426 (1986)
- 82.- Tyler H.R.; Neurological aspects of dialysis patients. "*Replacement of renal function by dialysis*", W. Drukker, FM Parsons y JF Maher, Martinus Mijhoff Medical Divisions Editores, La Haya, 601, (1978)
- 83.- Nielsen, V.K.; *Acta Med Scand* ,**191** ,287 (1972)
- 84.- Jennekens F.G.I., Dorhout, Mees E. J., Van der Most y Van Spikj D.; *Nephrol* , **8** 414 (1971)
- 85.- Nielsen V.K.; *Acta Med Scand* ,**195** ,155 (1974)
- 86.- Hoy R.H.; *Am. J. Hosp. Pharm.* , **38** ,1512 (1981)
- 87.- "*Investigation of the Risks and Hazards Associated with Hemodialysis Devices*" FDA Medical Device Standards Publication, Washington D.C., Government Printing Office (1980)
- 88.- Botella J., Traver J.A. y Sanz-Guajardo D.; *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* **14** ,192 (1977)
- 89.- Rivera-Vázquez A.B., Noriega-Sánchez A. y Ramírez-González R.; *Nephron* , **25** ,243 (1980)
- 90.- Weiss B.; *Fed. Proc.* , **37** ,22 (1978)
- 91.- Hoguenoer J.M. y Furon D.; "*Toxicologie et Higiene Industriale 1^{ere} Partie*". Editorial Technique et Documentation, Paris, 368 (1981)
- 92.- Hoguenoer J.M. y Furon D.; "*Toxicologie et Higiene Industriale 1^{ere} Partie*". Editorial Technique et Documentation, Paris, 369 (1981)
- 93.- Hoguenoer J.M. y Furon D.; "*Toxicologie et Higiene Industriale 1^{ere} Partie*". Editorial Technique et Documentation, Paris, 371 (1981)
- 94.- Arieff A.I.; *Georgetown University Press* ,**2** , 55 (1980)
- 95.- Berlyne G.M. , Ben Ari J. y Pest D.; *Lancet* , **2** ,494 (1970)
- 96.- Kaehny W.D., Hegg A.P. y Alfrey A.C.; *N. Engl. J. Med.* , **296** ,1389 (1977)
- 97.- Berlyne G.M., Ari J.B. y Knopf E.; *Lancet* ,**1** ,564 (1972)

- 98.- Florez J.; Metales, toxicología y antídotos. "Farmacología Humana", Ediciones Científicas y Técnicas S.A. Masson-Salvat Medicina, Barcelona, **2ª edición**, 906 (1992)
- 99.- Campbell I.R., Cass J.S. y Cholek J.; *AMA Arch. Indust. Health*, **15**, 359 (1957)
- 100.- Jungers P.; "Lo esencial de la hemodiálisis", Editorial Marban, Madrid, 32 (1979)
- 101.- Jungers P.; "Lo esencial de la hemodiálisis", Editorial Marban, Madrid, 52 (1979)
- 102.- Madsen R.f., Nielsen B., Olsen O.J. y Raaschou F.; *Nephron*, **7**, 545 (1970)
- 103.- "Boletín Técnico Millipore", **11**, 3 (1991)
- 104.- "Boletín Técnico Millipore", **10**, 5 (1986)
- 105.- Treybal R.E; "Operaciones con transferencia de masa". Editorial Hispanoamericana, México, **2ª edición**, 150 (1973)
- 106.- "Novedades técnicas. Resumen". Millipore Ibérica (1991)
- 107.- "Hemodialysis Systems Standard". Association for the Advancement of Medical Instrumentation. American National Institute. Inc. (1982)
- 108.- "USP XXII", **24 edición**, 1518 (1990)
- 109.- "USP XXIV", **24 edición**, 1856 (2000)
- 110.- "BP 88", **14 edición**, 880 (1988)
- 111.- "BP 88", **14 edición**, 881 (1988)
- 112.- "R.D. 1138/1990 de 14 de septiembre por el que se aprueba la Reglamentación Técnico Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público", Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, BOE 226 (1990)
- 113.- "BP 93", **15 edición**, 934 (1993)
- 114.- "BP 93", **15 edición**, 935 (1993)
- 115.- "BP 93, Addendum 1.994", **15 edición**, 1430 (1994)
- 116.- "BP 93, Addendum 1.994", **15 edición**, 1432 (1994)
- 117.- Solutions Concentrées pour Hemodialyse. "Pharmacopée Française", **10 edición**, 3,(1989)
- 118.- Eau pour dilutions des solutions concentrées pour Hémodialyse, "Pharmacopée Française", **10 edición**, 2 (1989)
- 119.- "Solutions concentrées pour Hémodialyse, "Pharmacopée Française", **10 edición**, 3 (1993)
- 120.- "Farmacopea Europea", **2ª edición**, 2, 128 (1988)
- 121.- "Farmacopea Europea, Revisión de 1.991", **2ª edición**, 8, 128 (1991)
- 122.- "Farmacopea Europea, Revisión de 1992", **2ª edición**, 12, VIII.9 (1992)
- 123.- "Farmacopea Europea", **3ª edición**, 922 (1997)
- 124.- "Farmacopea Europea", **3ª edición**, 924 (1997)
- 125.- "Farmacopea Europea", **3ª edición**, 925 (1997)
- 126.- "BP 93, Addendum 1.994", **15 edición**, 1433 (1994)
- 127.- "BP 93, Addendum 1.995", **15 edición**, 1658 (1995)
- 128.- "BP 93, Addendum 1.996", **15 edición**, 1893 (1996)
- 129.- Morcillo J.; "Temas Básicos de Química", Ediciones Alhambra Universidad, **2ª edición**, Madrid, 378 (1986)
- 130.- Fernández-Crehuet Navajas; Servicios de Abastecimientos de Aguas. "Medicina Preventiva y Salud Pública", Ediciones Salvat, **8ª edición**, Barcelona, 170 (1988)

- 131.- Skoog Douglas A. y Leary James J.; *"Análisis Instrumental"*, Ediciones Mc.Graw-Hill, **4ª edición**, Madrid, 147 (1994)
- 132.- *"Technical Paper 103"*, Water Research Association, Medmenham, (1973)
- 133.- Dougan W. K. y Wilson A.L.; *Analyst*, **99**, 413 (1974).
- 134.- Shull K.E. y Ghutan G.R.; *J. Amer. Water Works Assoc.*, **59**, 1456 (1967)
- 135.- Poole P y Segrove M.D., *Trans. Soc. glass Tech.*, **39**, 205, (1955)
- 136.- *"Methods of Testing Water Used in Industry, D.S. 2690"*, British Standards Institution, Londres, (1956)
- 137.- *"Standard Methods for the Examination of Water, Sewage and Industrial Wasters"*, Ediciones APHA, **10ª edición**, Nueva York, (1955).
- 138.- Packman R.F; *Proc. Society Water Treat. and Exam.*, **7**, 102 (1958).
- 139.- *"Approved Methods for the Physical and Chemical Examination of Water"* Institution of Water Engineers, Londres, **3ª edición**, 52 , (1960)
- 140.- *"Analysis of Raw, Potable and Waste Waters"*, Department of Environment HMSO, Londres, (1972).
- 141.- Mok A.W.S.; *Water Supply*, **10**, 21 (1.992)
- 142.- *"Orden de 1 de Julio de 1987 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis físico-químicos para aguas potables de consumo público"*.Ministerio de Relaciones con las Cortes y de la Secretaría del Gobierno, BOE 163 (1987)
- 143.- *"Voltammetric Determination of Aluminium"*, Metrohm, Application Bulletin 131/1e (1990)
- 144.- Ritchie G.S.P./Posner A.M.y Ritchier J.M., *Anal. Chim. Acta* ,**117**, 233 (1980)
- 145.- Wang J, Farias P.a.M. y Mahmoud J.S., *Anal. Chim. Acta* ,**172**, 57 (1985)
- 146.- Van Der Berg C.M.G., Murphy K. y Riley J.P., *Anal. Chim. Acta* ,**188**, 177 (1986)
- 147.- Stryjewska E, Rubel S., Kusmierczyk K. y Fresenius Z., *Anal. Chem.*,**334**, 627 (1989)
- 148.- Chiang L., James B.D. y Magee R.J., *Mikrochim Acta*, 149 (1989)
- 149.- Carvajal A., Übeda V. y Maestre M.A., *"Polarografía-Voltamperometría de redisolución. Fundamento y Aplicaciones"*. Metrohm. Análisis Iónico, Ediciones Gomensoro S.A., Madrid, 56 (1991)
- 150.- Carvajal A., Übeda V., Maestre M.A., *"Polarografía-Voltamperometría de redisolución. Fundamento y Aplicaciones"*. Metrohm. Análisis Iónico, Ediciones Gomensoro S.A., Madrid, 5, (1991)
- 151.- *"Farmacopea Europea"*, **2ª edición**, **1**, V.6.15 (1988)
- 152.- *"Farmacopea Europea, Apéndice 2.2.21"* , **3ª edición** (1997)
- 153.- *"BP 98, Appendix II E"*, **16 edición**, 92 (1998)
- 154.- *"Real Farmacopea Española"*, **1ª edición** , 57 (1997)
- 155.- *"BP 93"*, **15 edición**, A 127 (1993)
- 156.- *"Farmacopea Europea, Revisión de 1.991"*, **2ª edición**, **5**, V.3.2.17 (1991)
- 157.- *"Farmacopea Europea, Apéndice 2.4.17"*, **3ª edición** (1997)
- 158.- Skoog Douglas.A.y Leary James .J.; *"Análisis Instrumental"*, Ediciones Mc.Graw-Hill/ Interamericana de España, Madrid, **4ª edición**, 219 (1994)
- 159.- Skoog Douglas.A.y Leary James .J.; *"Análisis Instrumental"* , Ediciones Mc.Graw-Hill/ Interamericana de España, Madrid, **4ª edición**, 227 (1994)
- 160.- Doidge P.; Development of analytical programs. *"Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers"*. Varian Australia Pty Ltd. Editor E. Rothery, Mulgrave, 25 (1988)

- 161.- Walsh A.; *"Atomic Absorption Spectroscopy, Application to Chemical Analysis"*, Plenum Press, N. York (1970)
- 162.- Walsh A.; *"Principles of Atomic Absorption, Emission and Fluorescence"*, Editorial Fullerton, N. York, 35 (1979)
- 163.- Skoog Douglas A. y Leary James J.; *"Análisis Instrumental"*, Ediciones Mc.Graw-Hill/ Interamericana de España, Madrid, **4ª edición**, 259 (1994)
- 164.- Skoog Douglas A y Leary James J.; *"Análisis Instrumental"*, Ediciones Mc.Graw-Hill/ Interamericana de España, Madrid, **4ª edición**, 234 (1994)
- 165.- Browning D.R.; *"Espectroscopía"*, Ediciones Toray-Masson, Barcelona, 50 (1971)
- 166.- Chang R.; *"Principios Básicos de Espectroscopía"*, Ediciones A.C., Madrid 67 (1977)
- 167.- Banks R.C., Matjeda E.R. y Mercer G.D.; *"Introductory Problems in Spectroscopy"*, Editorial Addison Wesley, Amsterdam, 35 (1980)
- 168.- Vanose G.A.; *"Spectrometric Techniques"*, Ediciones Academic Press, N. York, 58 (1977)
- 169.- Ortega M.; Espectroscopía de absorción atómica. *"Técnicas Instrumentales. Métodos Ópticos"*, Ediciones L.A.E.F., Madrid, XII-2 (1.976)
- 170.- Beaty R.D.; *"Espectrofotometría de Absorción Atómica"*. Ediciones Perkin-Elmer, Beaconsfield, 25 (1979)
- 171.- Skoog Douglas A y Leary James J.; *"Análisis Instrumental"*, Ediciones Mc.Graw-Hill/ Interamericana de España, Madrid, **4ª edición**, 246 (1994)
- 172.- Seijas Martínez-Echevarría, Mª Victoria; *"Determinación de Selenio en Suero por EAA."*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 40 (1993)
- 173.- Skoog Douglas A y Leary James J.; *"Análisis Instrumental"*, Ediciones Mc.Graw-Hill/ Interamericana de España, Madrid, **4ª edición**, 247 (1994)
- 174.- Barnett W.B., Vollmer J.W. y de Nuzzo S.M.; *At. Abs. News*, **15**, 33 (1976)
- 175.- Seijas Martínez-Echevarría, Mª Victoria; *"Determinación de Selenio en Suero por EAA."*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 42 (1993)
- 176.- Ortega M.; Espectroscopía de absorción atómica. *"Técnicas Instrumentales. Métodos Ópticos"*, Ediciones L.A.E.F., Madrid, XII-6 (1.976)
- 177.- Dresser R.D., Mooney R.A., Heithmar E.M. y Pankey F.W.; *J. Chem. Educ.*, **52**, A-403 (1975)
- 178.- Ortega M.; Espectroscopía de absorción atómica. *"Técnicas Instrumentales. Métodos Ópticos"*, Ediciones L.A.E.F., Madrid, XII-8 (1976)
- 179.- Brodie K.; Furnace Atomization. *"Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers"*, Varian Australia Pty Ltd. Editor E. Rothery, Mulgrave, 3 (1988)
- 180.- Skoog Douglas A y Leary James J.; *"Análisis Instrumental"*, Ediciones Mc.Graw-Hill/ Interamericana de España, Madrid, **4ª edición**, 244 (1994)
- 181.- Szydlowsky F.J., Peck E. y Bax B.; *Applied Spectroscopy*, **32**, 402 (1978).
- 182.- Norval E.; *Anal. Chim. Acta*, **97**, 399 (1978).
- 183.- Robbins W.B. y Caruso J. A.; *Anal. Chem.*, **51**, 889 A (1971)
- 184.- Shaw R.; The Zeeman effect in furnace A.A. *"Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers"*, Varian Australia Pty Ltd. Editor E. Rothery, Mulgrave, 30 (1988)
- 185.- Koirtyohann S.R. y Pichet E.E.; *Anal. Chem.*, **37**, 603 (1965).
- 186.- Skoog Douglas A y Leary James J.; *"Análisis Instrumental"* Ediciones Mc.Graw-Hill/ Interamericana de España, Madrid, **4ª edición**, 252 (1994)
- 187.- Seijas Martínez-Echevarría, Mª Victoria; *"Determinación de Selenio en Suero por EAA."*, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 56 (1993)

- 188.- Ortega M.; Espectroscopía de absorción atómica. "Técnicas Instrumentales. Métodos Ópticos", Ediciones L.A.E.F., Madrid, IV-24 (1.976)
- 189.- Skoog Douglas A y Leary James J.; "Análisis Instrumental",. Ediciones Mc.Graw-Hill/ Interamericana de España, Madrid, **4ª edición** , 105 (1994)
- 190.- Doidge P; *Varian Instrument At Work*, **25**, 3 (1982)
- 191.- Voth L.; *Varian Instruments At Work* , **35**, 2 (1983)
- 192.- Voth L.; *Varian Instruments At Work*, **45**, 5 (1985)
- 193.- Wibetoe G y Langmyrh F.; *Anal. Chim. Acta*, **165**, 87 (1984)
- 194.- Wibetoe G y Langmyrh F.; *Anal. Chim. Acta*, **176**, 33 (1985)
- 195.- Matouseck J.P. y Brodie K.G.; *Anal. Chim. Acta* , **45** , 1606 (1973)
- 196.- Brodie K.G. y Matouseck J.P.; *Anal. Chim. Acta* **106**, 121 (1979).
- 197.- McKenzie T, *Varian Instruments At Work* , **AA-8**, 3 (1980).
- 198.- Beach L.; Chemical modification using reduced palladium. "Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers", Varian Australia Pty Ltd. Editor E. Rothery, Mulgrave, 157 (1988)
- 199.- Chapuis P.; "Médecine et Biologie", Coordonateur Philippe Chapuis, Paris, 150 (1990)
- 200.- L'vov B.V. ; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **5**, 163 (1990)
- 201.- L'vov B. V.; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **5**, 167 (1990)
- 202.- L'vov B.V. ; *Spectrochimica Acta* , **B 51** , 535 (1996)
- 203.- Lamoureux Marc M.; *Spectrochimica Acta* , **B 50** , 1847 (1995)
- 204.- Gilmutdinov A.Kh.; *At. Spectrom.* , **6** , 505 (1991)
- 205.- Gilmutdinov A.Kh.; *At. Spectrom.* , **7** , 675 (1992)
- 206.- Chakrabarti C.L.; Gilmutdinov A. Kh. y Hutton J.C.; *Anal. Cem.* , **65** , 716 (1993)
- 207.- L'vov B.V.; *Spectrochimica Acta* , **B 48** , 1633 (1993)
- 208.- Kantor T., Bazur L., Pungor E. y Winefordner J.D.; *Spectrochimica Acta*, **B 38**, 581 (1983)
- 209.- Motzfeldt K. y Steinmo M.; *Polyteknin Forlag*, **2** , 91 (1973)
- 210.- Doidge P.; Development of analytical programs. "Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers", Varian Australia Pty Ltd. Editor E. Rothery, Mulgrave, 23 (1988)
- 211.- Varian ; *AA instruments*, **AA -121**,1 (1995)
- 212.- Varian ; *AA instruments*, **AA -109**,2 (1993)
- 213.- Knowles M.; Analytical data. "Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers", Varian Australia Pty Ltd. Editor E. Rothery, Mulgrave , 38 (1988)
- 214.- Doidge P.; Development of analytical programs. "Analytical Methods for Graphite Tube Atomizers", Varian Australia Pty Ltd. Editor E. Rothery, Mulgrave, 26 (1988)
- 215.- "Farmacopea Europea" , **2ª edición**, **17**, 128-3 (1992)
- 216.- "Real Farmacopea Española", **1ª edición** , 1065 (1997)
- 217.- "Monografías AEFI. Sección Catalana. Validación de Métodos Analíticos", 44 (1989)
- 218.- "USP XXIV", **24 edición**, 2150 (2000)
- 219.- "Monografías AEFI. Sección Catalana. Validación de Métodos Analíticos", 45 (1989)
- 220.- "Monografías AEFI. Sección Catalana. Validación de Métodos Analíticos", 31 (1989)
- 221.- "Monografías AEFI. Sección Catalana. Validación de Métodos Analíticos", 41 (1989)

ÍNDICE

ÍNDICE

OBJETIVOS	3
PARTE GENERAL	7
I.-EL ALUMINIO Y LOS LÍQUIDOS DE HEMODIÁLISIS	7
I.1.- INTRODUCCIÓN	7
I.2.-TOXICIDAD POR ALUMINIO EN HEMODIALIZADOS	8
I.2.A.- DEMENCIA POR DIÁLISIS	8
I.2.A.1.-Etiología de la demencia	9
I.2.A.2.-Posibles mecanismo responsables de la demencia por diálisis	11
I.2.A.3.-Tipos de demencia por diálisis.....	12
I.2.B.-OSTEODISTROFIA RENAL O ENFERMEDAD DEL HUESO POR INTOXICACIÓN ALUMÍNICA	14
I.2.C.-TOXICIDAD HEMATOLÓGICA	16
I.3.-PREVENCIÓN DE LA INTOXICACIÓN ALUMÍNICA EN PACIENTES DIALIZADOS	17
I.3.A.-IMPORTANCIA DE LA CANTIDAD DE LÍQUIDO DE HEMODIÁLISIS EN CONTACTO CON EL ENFERMO DIALIZADO	18
I.3.B.-SISTEMAS DE TRATAMIENTO DEL AGUA POR HEMODIÁLISIS	21
I.3.B.1.-Filtros de sedimentación.....	22
I.3.B.2.-Filtros de carbón activo.....	22
I.3.B.3.-Ablandadores.....	23
I.3.B.4.-Desionizantes	23
I.3.B.5.-Ósmosis inversa	24
I.4.-NIVELES MÁXIMOS DE ALUMINIO ADMITIDOS EN LOS LÍQUIDOS CONCENTRADO DE HEMODIÁLISIS Y EN EL AGUA PARA DILUIRLOS	26
I.4.A.-NIVELES DE LA ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF MEDICAL INSTRUMENTATION (AAMI-USA)⁷³;	26

<i>I.4.B.-FARMACOPEA AMERICANA 1990 (USP XXII)</i>	28
<i>I.4.C.-FARMACOPEA AMERICANA 2000 (USP XXIV)</i>	28
<i>I.4.D.-FARMACOPEA BRITÁNICA. EDICIÓN 1988</i>	28
<i>I.4.E.-FARMACOPEA BRITÁNICA. EDICIÓN 1.993</i>	29
<i>I.4.F.-FARMACOPEA FRANCESA 10ª EDICIÓN</i>	30
<i>I.4.G.-FARMACOPEA EUROPEA 2ª EDICIÓN</i>	30
<i>I.4.H.-FARMACOPEA EUROPEA 3ª EDICIÓN</i>	31
<i>I.4.I.-REAL FARMACOPEA ESPAÑOLA 1997</i>	31
II-TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE ALUMINIO	32
II.1.-TÉCNICAS DE ABSORCIÓN MOLECULAR	32
<i>II.1.A.-MÉTODO DEL VIOLETA DE PIROCATECOL</i>	33
<i>II.1.B.-MÉTODO DE LA ERIOCROMOCIANINA</i>	33
<i>II.1.C.-MÉTODO DEL ALUMINÓN</i>	34
II.2.-TÉCNICAS POR VOLTAMPEROMETRÍA	35
II.3.-TÉCNICAS POR FLUORIMETRÍA	36
II.4.-TÉCNICAS DE ESPECTROSCOPIA ATÓMICA	37
III-ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA	40
III.1.-INTRODUCCIÓN	40
III.2.-FUNDAMENTOS FÍSICO-QUÍMICOS	40
III.3.-INTRUMENTACIÓN	44
<i>III.3.A.-FUENTES DE RADIACIÓN</i>	44
<i>III.3.A.1.-Lámparas de cátodo hueco</i>	45
<i>III.3.A.2.-Lámparas de descarga sin electrodos</i>	46
<i>III.3.B.-MODULACIÓN DE LA FUENTE</i>	47
<i>III.3.C.-ATOMIZADORES</i>	47
<i>III.3.C.1.-Atomización por llama</i>	49
<i>III.3.C.1.1-Quemador</i>	49
<i>III.3.C.1.2.-Llama</i>	50
<i>III.3.C.2.-Atomización por horno de grafito o electrotérmica</i>	52
<i>III.3.C.3.-Atomización por generación de hidruros</i>	55
<i>III.3.C.4.-Atomización por vapor frío</i>	55
<i>III.3.D.-SISTEMAS DE CORRECCIÓN DE FONDO EN E.A.A.</i>	56
<i>III.3.D.1.-Corrección de fondo por lámpara de deuterio</i>	57

III.3.D.2.-Corrección de fondo por efecto Zeeman	59
III.3.E.-SISTEMAS ÓPTICOS	63
III.3.E.1.-Lentes y espejos.....	63
III.3.E.2.-Redes de difracción	63
III.4.-INTERFERENCIAS	64
III.4.A.-INTERFERENCIAS FÍSICAS	64
III.4.B.-INTERFERENCIAS QUÍMICAS	65
III.4.C.-INTERFERENCIAS ESPECTRALES.....	66
III.5.-MODIFICADORES QUÍMICOS	66
III.6.-TEORÍAS DE FORMACIÓN DEL PICO DE ALUMINIO POR E.A.A. ... 69	
III.6.A.-TEORÍA DE FORMACIÓN DE CARBUROS GASEOSOS.....	69
III.6.B.-TEORÍA DE LA REDUCCIÓN AUTOCATALÍTICA DEL Al_2O_3	71
PARTE EXPERIMENTAL	79
IV-MATERIALES Y MÉTODOS	79
IV.1.-INSTRUMENTACIÓN	79
IV.2.-REACTIVOS Y ESTÁNDARES	79
IV.3.-LIMPIEZA DEL MATERIAL.....	80
V-RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
V.1.-INTRODUCCIÓN.....	81
V.2.- OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE TEMPERATURAS.....	82
V.2.A.- FASE DE SECADO	83
V.2.B.- FASE DE CALCINACIÓN	83
V.2.C.-CAUDAL DE FLUJO DE GAS	91
V.2.D.-MODIFICADORES DE MATRIZ	101
V.2.D.1.-Influencia de las sales de magnesio en la determinación del aluminio por E.A.A.	105
V.2.D.2.-Cantidad óptima de $Mg(NO_3)_2$ para la determinación del aluminio en el líquido de hemodiálisis	106
V.2.D.3.- $Pd(NO_3)_2$ para la determinación del aluminio en el líquido de hemodiálisis	107
V.3.- VARIACIÓN DE LA SEÑAL DEPENDIENDO DEL ESTADO DEL TUBO DE GRAFITO	108

V.4.-ATOMIZACIÓN.....	110
V.4.A.-CURVA A DE CALENTAMIENTO RÁPIDO.....	111
V.4.B.-CURVA B DE CALENTAMIENTO LENTO.....	113
V.5.-LECTURA A LONGITUD DE ONDA DE 309,3 nm.....	117
V.5.A.-ANÁLISIS DE SOLUCIÓN PATRÓN DE ALUMINIO DE 10 PPB EN AGUA Y HNO ₃ AL 1%:	117
V.5.B.-ANÁLISIS DE SOLUCIÓN PATRÓN DE ALUMINIO DE 10 PPB EN LÍQUIDO DE HEMODIÁLISIS:.....	118
V.6. OPTIMIZACIÓN DE LA MUESTRA A INYECTAR.....	119
V.7.-EMPLEO DE PLATAFORMA.....	121
V.8.-EMPLEO DE PREINYECCIÓN.....	122
V.9.-MEDIDA ANALÍTICA Y LECTURA	123
V.10.-TÉCNICA DE CALIBRACIÓN.....	125
V.10.A.-CALIBRACIÓN NORMAL	125
V.10.B.-ADICIONES ESTÁNDAR.....	126
V.11 LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	129
V.12.TESTS DE LINEALIDAD Y PROPORCIONALIDAD	131
V.12.A.-TEST DE LINEALIDAD.....	131
V.12.B.-TEST DE PROPORCIONALIDAD	135
V.13.-DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN.....	137
V.14.-REPETIBILIDAD	137
V.15.-REPRODUCIBILIDAD	139
V.16.-DETERMINACIÓN DE LA EXACTITUD	142
CONCLUSIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	155