

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

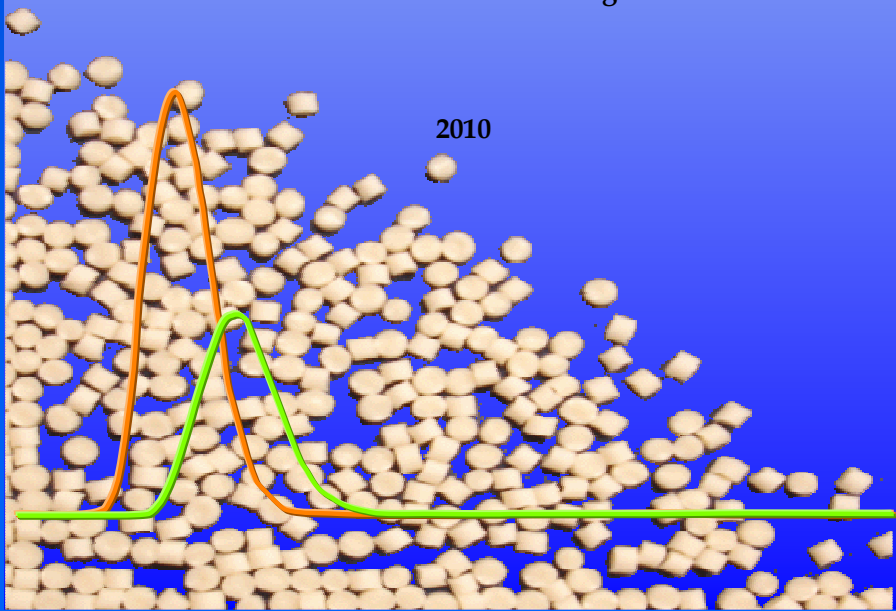
**Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología**

TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIONES CINÉTICAS DE ACETONA,
3-HIDROXIBUTIRATO/3-HIDROXIVALERATO
Y GLICEROL EN SISTEMAS DE FLUJO.**

Karina Beatriz Hueso Domínguez

2010



VNiVERSiDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIONES CINÉTICAS DE ACETONA,
3-HIDROXIBUTIRATO/3-HIDROXIVALERATO
Y GLICEROL EN SISTEMAS DE FLUJO.**

Karina Beatriz Hueso Domínguez

2010

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

**DETERMINACIONES CINÉTICAS DE ACETONA,
3-HIDROXIBUTIRATO/3-HIDROXIVALERATO
Y GLICEROL EN SISTEMAS DE FLUJO.**

Memoria que para optar al Grado de Doctora en Química presenta la
Licenciada:

Karina Beatriz Hueso Domínguez

Salamanca, 14 de abril de 2010.

Fdo.: Karina Beatriz Hueso Domínguez

D. Cándido GARCÍA DE MARÍA, Profesor Titular de la Universidad de Salamanca y **D. António O.S.S. RANGEL**, Profesor Asociado de la Universidade Católica Portuguesa, directores de la Memoria titulada ***“Determinaciones cinéticas de acetona, 3-hidroxiacetato/3-hidroxiacetato y glicerol en sistemas de flujo”***, realizada por Dña. **Karina Beatriz HUESO DOMÍNGUEZ** para optar al grado de Doctora en Química por la Universidad de Salamanca, autorizan la presentación de la misma, al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente propuestos.

Salamanca, 14 de abril de 2010.

Fdo.: Cándido García de María

Fdo.: António O.S.S. Rangel

Dña. M^a Concepción GARCÍA MORENO, Profesora Titular de Universidad y Directora del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca

INFORMA:

Que la Memoria titulada “***Determinaciones cinéticas de acetona, 3-hidroxibutirato/3-hidroxivalerato y glicerol en sistemas de flujo***”, que para optar al grado de Doctora en Química presenta la Licenciada **Dña. Karina Beatriz HUESO DOMÍNGUEZ**, ha sido realizada bajo la dirección de los Doctores **D. Cándido GARCÍA DE MARÍA** y **D. António O. S. S. RANGEL** en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, firma el presente informe en Salamanca, a 14 de abril de 2010.

Fdo.: M^a Concepción García Moreno

Los trabajos que se presentan han sido financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (antes Ministerio de Educación y Ciencia) a través del proyecto BQU2002-02332 y por la Junta de Castilla y León a través del proyecto SA003/04.

Deseo expresar mi agradecimiento al Ministerio de Ciencia e Innovación por la beca Predoctoral BES-2003-1012 del Programa de Formación de Personal Investigador.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar un gran sentimiento de gratitud a todas las personas que han hecho posible la elaboración de este Trabajo:

A Cándido por su gran entusiasmo, paciencia, constante dedicación y ayuda en todo momento, y además, por todo lo que me ha aportado a nivel personal y profesional.

A António O.S.S. Rangel por su participación y ayuda en el trabajo que se presenta. A Ildikó Tóth por su dedicación durante mi estancia en Oporto.

A Narciso Martín Garrido por su ayuda y su colaboración.

A Alan Townshend y Gillian M. Greenway por su colaboración durante mi estancia en Hull.

A todos los miembros del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología que hacen posible que la investigación sea mejor cada día.

A todos mis compañeros: Fernando y Ana por su disponibilidad, Ana C., Ángel Arroyo, Antonio, Arantxa, Armando, Carlos, Diego, Edith, Eli, Inés, Iris, Isma, Javi D., Javi, Josemi, Josemi H., Juan, Lara, Luis, M^a José, Marta, Merce, Noelia, Noemi, Miguel, Myriam, Patricia, Yolanda, Raquel. H., Raquel M., Raúl, Renata, Sara H., Sara S., Sara O., Sergio, Socorro y a todos los que me han ayudado durante estos años. Muchas gracias por todos esos agradables momentos que hemos compartido.

A mi familia, y en especial a mi hermano y a Jaime por su gran apoyo, optimismo y creatividad.

A todos, sinceramente, gracias.

*“Las oportunidades del hombre están
limitadas sólo por su imaginación.”*

Charles Franklin Kettering

A mi familia

ÍNDICE

ÍNDICE

	<u>Página ...</u>
PRÓLOGO.....	1
ACRÓNIMOS.....	3
CAPÍTULO I	
Determinación de acetona.....	5
1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO	7
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1. ACETONA: ANTECEDENTES.....	9
2.1.1. Propiedades y uso industrial.....	9
2.1.2. Distribución en la naturaleza.....	10
2.1.3. Efectos en la salud.....	11
2.1.4. Acetona en ambientes de interior	12
2.1.5. Acetona en diagnóstico clínico y veterinario.....	13
2.1.6. Métodos de determinación.....	14
2.2. CARACTERÍSTICAS DEL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO	26
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	27
3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL.....	27
3.1.1. Reactivos	27
3.1.2. Aparatos y material	28
3.2. ELECCIÓN DE REACTIVO Y CONDICIONES DE DETECCIÓN.....	34
3.2.1. Ensayos preliminares.....	34
3.2.2. Características espectroscópicas	35
3.2.2.1. Disoluciones ABA/acetona	36
3.2.2.2. Disoluciones ABA-DIA/acetona	36
3.2.3. Condiciones de reacción y detección	42
3.3. SISTEMA DE FLUJO	43
3.4. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES	45
3.4.1. Variables prefijadas	45
3.4.2. Optimización del volumen de inyección y del tiempo de desviación	47
3.4.3. Efecto de las concentraciones de NaOH y ABA-DIA en la reacción de fondo	50
3.4.4. Efecto de las concentraciones de NaOH y ABA-DIA en la reacción ABA-DIA/ acetona	54
3.4.5. Efecto de la concentración de acetona.....	58
3.4.6. Elección del tiempo de parada.....	61
3.4.7. Efecto de la temperatura.....	62

3.5. PROCEDIMIENTO PROPUESTO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	66
3.5.1. Condiciones y procedimiento experimentales	66
3.5.2. Características analíticas	67
3.5.3. Interferencias	69
3.6. MECANISMO DE REACCIÓN	70
4. DETERMINACIÓN DE ACETONA EN AIRE	75
4.1. Dispositivo de captación.....	75
4.2. Muestras de aire.....	76
4.3. Sistemas y procedimiento de trabajo	76
4.4. Estabilidad de las disoluciones acuosas de acetona frente al borboteo	78
4.5. Eficacia de la captación.....	80
4.6. Condiciones propuestas para la captación	81
5. CONCLUSIONES I	82

CAPÍTULO II

Determinación de 3-hidroxiacetato y/o 3-hidroxiacetato	85
1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO	87
2. INTRODUCCIÓN	89
2.1. BIOPOLÍMEROS: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES.....	89
2.2. POLIHIDROXIALCANOATOS.....	95
2.2.1. Composición y estructura	95
2.2.2. Propiedades	97
2.2.3. Aplicaciones	98
2.2.4. Determinación de 3HB y 3HV	99
3. PARTE EXPERIMENTAL	103
3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL.....	103
3.1.1. Reactivos	103
3.1.2. Inmovilización de 3-HBDH	104
3.1.3. Aparatos y material	106
3.2. SISTEMA DE FLUJO	108
3.3. ESTUDIO DE VARIABLES	110
3.3.1. Tamaño de reactores enzimáticos, caudal y volumen de inyección	110
3.3.2. Temperatura	111
3.3.3. Efecto del pH	112
3.3.4. Efecto de la concentración de NAD ⁺	112

3.4. DETERMINACIÓN DE 3HB Y 3HV.....	115
4. DETERMINACIÓN DE 3HB Y 3HV EN DEGRADADOS DE BIOPOLÍMEROS COMERCIALES.....	121
4.1. Descripción de las muestras.....	121
4.2. Análisis de las muestras mediante RMN.....	122
4.3. Degradación de las muestras.....	125
4.4. Análisis de los degradados.....	126
5. CONCLUSIONES II.....	129

CAPÍTULO III

Determinación de glicerol.....	131
1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO.....	133
2. INTRODUCCIÓN.....	135
2.1. ANÁLISIS POR INYECCIÓN SECUENCIAL. COMPARACIÓN FIA/SIA.....	135
2.2. GLICEROL: ANTECEDENTES.....	139
2.2.1. Propiedades.....	139
2.2.2. Uso y producción industrial.....	140
2.2.3. Métodos de determinación.....	143
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	150
3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL.....	150
3.1.1. Reactivos.....	150
3.1.2. Muestras del biorreactor de fermentación.....	151
3.1.3. Aparatos y material.....	151
3.2. SISTEMA DE FLUJO Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	154
3.3. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.....	156
3.3.1. Estudio de la secuencia de inyección.....	156
3.3.2. Efecto del pH y de las concentraciones de NAD ⁺ y GDH.....	159
3.3.3. Efecto de la temperatura.....	164
3.4. DETERMINACIÓN DE GLICEROL.....	166
3.4.1. Procedimiento propuesto.....	166
3.4.2. Características analíticas.....	167
4. APLICACIÓN A PROCESOS DE FERMENTACIÓN.....	169
5. CONCLUSIONES III.....	176
BIBLIOGRAFÍA.....	177
ARTÍCULOS PUBLICADOS.....	207

PRÓLOGO

La presente Memoria consta de tres capítulos, cada uno de los cuales corresponde al estudio, puesta a punto, caracterización y aplicación de un nuevo método analítico. Todos los métodos propuestos tienen en común su carácter cinético, entendiéndose por tal el hecho de que las medidas se realizan en condiciones en las que no se ha alcanzado el equilibrio químico. Todos ellos comparten también la utilización de sistemas de flujo, bien sea en la modalidad de Análisis por Inyección en Flujo (Flow Injection Analysis, FIA) o en la de Análisis por Inyección Secuencial (Sequential Injection Analysis, SIA).

En el Capítulo I se determina acetona en un sistema FIA a través de la medida de un intermedio de reacción fluorescente. El control y elección del tiempo de reacción son clave, más aún si se considera que los propios reactivos experimentan una reacción de fondo en la que también se originan intermedios con características fluorescentes similares a los de la reacción principal, aunque ésta es más rápida. Los resultados conducen a uno de los escasos métodos no cromatográficos existentes para la determinación de acetona en medio acuoso. Como ejemplo de aplicación, se determina acetona en aire, previa absorción del vapor de acetona en agua con un dispositivo construido en el laboratorio.

En el Capítulo II se propone un método para la determinación simultánea e individualizada de 3-hidroxi butirato (3HB) y 3-hidroxi valerato (3HV) basado en la diferente velocidad de las reacciones de estos analitos catalizadas por la enzima 3-hidroxi butirato deshidrogenasa (3-HBDH). Ésta se mantiene inmovilizada en un sistema FIA. El método se aplica al análisis de degradados de biopolímeros y se presenta como una buena alternativa a los métodos cromatográficos, los únicos que permiten actualmente diferenciar entre 3HB y 3HV.

Finalmente, en el Capítulo III se plantea la determinación de glicerol en un sistema SIA a través de la medida de la velocidad de la reacción catalizada por la enzima glicerol deshidrogenasa (GDH). La estrategia cinética utilizada permite evitar la interferencia de la matriz en muestras complejas. Los resultados llevan a proponer un sistema portátil, con bajo consumo de reactivos y escasa generación de residuos, que es aplicado al seguimiento de la concentración de glicerol en un proceso de fermentación de glucosa con la cepa mutante HC42 de *Saccharomyces cerevisiae*.

ACRÓNIMOS

ABA: ácido antranílico ó ácido 2-aminobenzoico.

ABA-DIA: ácido antranílico diazotado.

FIA: Análisis por Inyección en Flujo.

GDH: glicerol deshidrogenasa.

3-HBDH: (R)-3-hidroxi butirato deshidrogenasa.

3HB: (R)-3-hidroxi butirato / ácido (R)-3-hidroxi butírico.

3HV: (R)-3-hidroxi valerato / ácido (R)-3-hidroxi valérico.

NAD⁺: Dinucleótido de β -nicotinamida adenina, forma oxidada.

NADH: Dinucleótido de β -nicotinamida adenina, forma reducida.

PHA / PHAs : polihidroxi alcanoato(s).

PHB: polihidroxi butirato.

PHV: polihidroxi valerato.

SIA: Análisis por Inyección Secuencial.

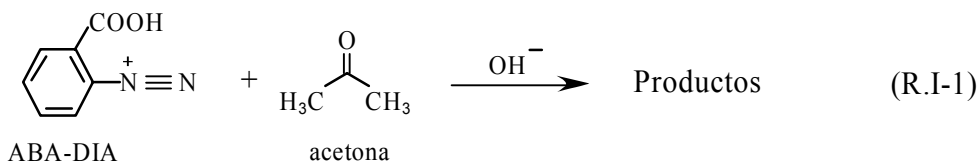
CAPÍTULO I

Determinación de acetona

1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO

El objetivo principal del trabajo desarrollado en este capítulo es el establecimiento de un método para la determinación directa (sin separación previa), sensible y selectiva de acetona en medio acuoso. Como objetivo secundario, y dado el interés de la acetona en el campo medioambiental, se plantea la aplicación del método establecido a la determinación de acetona en aire de interior.

Para la determinación de acetona se propone un método fluorimétrico basado en la reacción de este compuesto con ácido antranílico diazotado (ABA-DIA) en medio alcalino.



Esta reacción es lenta (tarda en torno a 30 minutos en completarse) y conduce finalmente a un producto coloreado que es la base de un procedimiento espectrofotométrico para la determinación de acetona en agua ya descrito (1). Aunque el producto final no es fluorescente, se ha observado una fluorescencia transitoria que aparece y desaparece durante los primeros minutos de reacción, indicando la existencia de al menos un intermedio fluorescente. La intensidad de la fluorescencia observada depende de la concentración de acetona, siendo ésta la base del nuevo método fluorimétrico que se propone.

La obtención de medidas fiables en condiciones cinéticas, es decir, sin que se alcance el equilibrio, requiere un riguroso control tanto del tiempo de reacción como de las condiciones experimentales. Por esta razón, para la puesta a punto del procedimiento se ha seguido la metodología del análisis por inyección en flujo, modalidad de los métodos continuos de análisis que satisface plenamente estos requisitos.

En la determinación de acetona en aire, el vapor de acetona es absorbido en medio acuoso utilizando para ello un dispositivo de captación construido y optimizado en el laboratorio. Las disoluciones acuosas obtenidas se analizan directamente según el método propuesto.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ACETONA: ANTECEDENTES

2.1.1. Propiedades y uso industrial

La acetona ($\text{CH}_3\text{-CO-CH}_3$, $P_m = 58,08$), también conocida como metilcetona, dimetilcetona, dimetilformaldehído, 2-propanona, propen-2-ona, β -cetopropano o ácido piroacético, es la más simple de las cetonas. En condiciones normales es un líquido transparente, incoloro, con olor afrutado, muy inflamable y volátil, poco viscoso y ampliamente soluble en agua y en disolventes orgánicos como éter etílico o metanol. Algunas de sus propiedades físicas se detallan en la [Tabla I-1](#). El vapor de acetona es más pesado que el aire y es capaz de difundir sus emisiones gaseosas a largas distancias. En cuanto a propiedades químicas, la acetona experimenta reacciones típicas de las cetonas saturadas: adición, oxidación-reducción y condensación, originando alcoholes, cetales, ácidos y aminas.

Tabla I-1. Propiedades físicas de la acetona

Propiedad	Valor
Masa molecular relativa	58,08 g mol ⁻¹
Color	Incoloro
Olor	Característico
Punto de fusión	-94,9 °C
Punto de ebullición	56,2 °C
Densidad a 20 °C	0,78996 g mL ⁻¹
Viscosidad a 25 °C	0,303 Cp

Debido a sus buenas características como disolvente, la acetona se utiliza ampliamente a nivel industrial en la elaboración de pinturas, pegamentos, cementos de contacto, tintes, gomas, ceras, resinas, grasas, aceites, colorantes, cosméticos y medicamentos. Se utiliza

también en procesos de extracción de grasas, como disolvente de limpieza en la industria electrónica, como precipitante, en la purificación de azúcar y almidón, como portador en bombonas de acetileno, y como reactivo intermedio en la elaboración de metacrilatos, metil-isobutil cetona, bisfenol A, reactivos aldólicos, antioxidantes, herbicidas, cetonas superiores, productos de condensación con formaldehído o difenilamina e intermediarios de vitaminas (2).

2.1.2. Distribución en la naturaleza

La presencia de acetona en la naturaleza se debe tanto a fuentes naturales como antropogénicas.

La acetona es un producto natural del metabolismo animal y prácticamente cada órgano y tejido contiene algo de acetona. Otras fuentes naturales de acetona son los incendios forestales, las emisiones volcánicas y el metabolismo de algunos insectos y vegetales.

La contribución de los procesos industriales a la presencia de acetona en el medio ambiente es mucho mayor que la de las fuentes naturales.

Las emisiones a la atmósfera proceden de productos manufacturados como quitaesmaltes, tableros de conglomerado, revestimientos de moquetas, decapantes de pinturas, ceras abrillantadoras, detergentes, adhesivos y limpiadores. El humo del tabaco, los gases de combustión de motores de coches y turbinas, la destilación de la madera y la combustión de basuras son también fuentes significativas.

La acetona de las aguas superficiales procede de los efluentes de aguas residuales de procesos de fabricación de yeso, cartón, papel, plásticos, productos farmacéuticos, limpiadores, abrillantadores, pinturas, productos derivados del caucho y de la madera y productos orgánicos industriales. Los efluentes de algunas industrias de la energía, como la gasificación del carbón, también contienen acetona.

Entre las fuentes de incorporación de acetona al suelo figuran el vertido de residuos agrícolas y alimentarios, residuos animales, deposición húmeda de la atmósfera, efluentes de fosas sépticas domésticas y vertederos de residuos químicos.

La acetona atmosférica se degrada por hidrólisis combinada con reacción con radicales hidroxilo. El periodo de vida media es de unos 30 días. La acetona puede ser físicamente eliminada del aire mediante deposición húmeda. En el agua y en el suelo la acetona se elimina por biodegradación (2,3).

2.1.3. Efectos en la salud

La acetona es relativamente menos tóxica que otros disolventes industriales. Por inhalación de sus vapores o por ingestión, la acetona pasa a la sangre alcanzando todos los órganos del cuerpo. En cantidades pequeñas no resulta peligrosa ya que es fácilmente degradada por el hígado. Sin embargo, la inhalación de niveles moderados o altos de acetona durante periodos cortos puede causar irritación de ojos, nariz, garganta y pulmones. Es también un depresor del sistema nervioso central y puede causar somnolencia, dolor de cabeza, mareo, desorientación, aceleración del ritmo cardíaco, náuseas, vómitos, pérdida de conciencia e, incluso, coma. En las mujeres puede alterar el ciclo menstrual.

La ingestión de niveles elevados de acetona puede dar lugar a pérdida de la conciencia y a daños bucales. El contacto con la piel produce irritación.

El olor, el picor de ojos y la irritación respiratoria son excelentes indicadores preventivos para evitar daños más graves.

2.1.4. Acetona en ambientes de interior

La calidad del aire interior y su purificación son aspectos con creciente interés, algo fácil de entender si se tiene en cuenta que la mayoría de las personas pasan el 80-90% de su tiempo dentro de distintos edificios (viviendas, centros de trabajo o de enseñanza, instalaciones comerciales o de ocio, hospitales, residencias de ancianos, etc.) (4). En el año 2000, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó un documento (5) en el que hacía hincapié en que todo ser humano tiene derecho a respirar aire interior saludable. Además, en un estudio hecho por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos en 1987 (6) se concluyó que la contaminación del aire interior supone mayor riesgo que la contaminación del aire exterior. Alergias y enfermedades como el asma y el síndrome del edificio enfermo (SEE) han aumentado considerablemente en las últimas décadas por lo que una evaluación de la calidad del aire interior es fundamental para comprender la repercusión de la contaminación del aire en la salud (7).

Los contaminantes del aire interior incluyen principalmente óxidos de nitrógeno (NOx) y compuestos orgánicos volátiles (COVs), entre ellos acetona. Debido a su amplio uso como intermedio químico y disolvente, la acetona es un contaminante común del aire de ambientes ocupacionales. La exposición momentánea o periódica a niveles medios o altos (200-50.000 mg m⁻³) de vapor de acetona puede causar efectos negativos (8) como dolor de cabeza, fatiga o incluso narcosis cuando la concentración de acetona en aire es superior a 23.700 mg m⁻³. La prevención de estos efectos hace necesarias la detección y medida de la concentración de acetona en ambientes de trabajo (9).

Las pautas para la evaluación de acetona en estos ambientes establecen 30 mg m⁻³ para exposición crónica e intermedia y 60 mg m⁻³ para exposición aguda. No existe una pauta para la evaluación del riesgo de cáncer en humanos ya que no se ha relacionado la exposición a acetona con esta enfermedad. Los efectos de exposiciones prolongadas sólo se conocen en experimentos con animales. Daños en el sistema nervioso, en el hígado y en los riñones, defectos congénitos e infertilidad en los machos son algunos de los efectos observados, aunque se desconoce si son extensibles a los humanos (2,10).

2.1.5. Acetona en diagnóstico clínico y veterinario

La acetona forma parte de los denominados cuerpos cetónicos (acetona, ácido acetoacético y ácido 3-hidroxi-butírico) cuyo nivel en sangre, orina, leche o aire pulmonar sirve de diagnóstico de fallos orgánicos postraumáticos, de enfermedades como la diabetes o de situaciones de malnutrición ([11,12,13,14,15,16,17,18,19,20](#)). En el ámbito de la ganadería, es común el análisis de cuerpos cetónicos en leche con el fin de asegurar la correcta alimentación de los animales en periodo de lactancia, especialmente sensibles a la malnutrición ([21,22,23,24](#)). Los cuerpos cetónicos se originan en el metabolismo de oxidación de los ácidos grasos cuando existe una alimentación deficiente en hidratos de carbono, en condiciones de ejercicio físico intenso o debido a enfermedades como la diabetes *mellitus*. Se producen principalmente en el hígado y son transportados a otros órganos y tejidos donde son utilizados como fuente de energía. Estos tres compuestos están relacionados entre sí: la oxidación del ácido 3-hidroxi-butírico conduce al ácido acetoacético y éste por descarboxilación produce acetona. En gran parte de los métodos existentes, el análisis global o individualizado de cuerpos cetónicos se basa en su conversión previa en acetona y su contenido se expresa en concentraciones equivalentes de este compuesto. El contenido normal de cuerpos cetónicos totales en sangre varía entre 5 y 30 mg L⁻¹ (expresados como acetona), pudiendo llegar en condiciones patológicas hasta los 2 g L⁻¹. Los contenidos en suero son, como promedio, un 10 % más bajos que los correspondientes a la sangre total. El contenido normal en orina está entre 17 y 400 mg L⁻¹, pudiendo alcanzar en la cetonuria valores tan elevados como 60 g L⁻¹. La proporción entre los diferentes cuerpos cetónicos también es variable. La proporción típica en orina corresponde a un 2 % de acetona, un 20 % de ácido acetoacético y un 78 % de ácido 3-hidroxi-butírico.

2.1.6. Métodos de determinación

El interés analítico de la acetona, ya sea de origen natural o industrial, se debe a su relación con los diferentes aspectos de la salud mencionados anteriormente, las muestras analizadas son principalmente de tipo medioambiental o biológico.

En cuanto a las **muestras medioambientales**, en la [Tabla I-2](#) se muestran los métodos habituales para el análisis de acetona en aire, agua y suelo [\(3\)](#). De forma general, y tras la concentración de la muestra, el análisis se lleva a cabo directamente por cromatografía de gases con diferentes tipos de detección o mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección UV previa derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) [\(8\)](#).

Entre los escasos procedimientos no cromatográficos cabe destacar, por su relación con este trabajo, el propuesto por RAHIM y BASHIR [\(1\)](#) para la determinación espectrofotométrica de acetona en agua. Consiste en la adición (por este orden) de ácido antranílico diazotado (preparado en frío), hidróxido potásico concentrado y almidón (estabilizante del color) sobre una muestra acuosa de acetona. Se forma lentamente un compuesto coloreado que se mide a 450 nm frente a un blanco una vez transcurridos entre 30 y 40 minutos. En el procedimiento interfieren sustancias que acompañan frecuentemente a la acetona como son etanol, metanol, acetato de etilo y formaldehído.

Los métodos propuestos más recientemente [\(Tabla I-3\)](#) para el análisis de acetona en aire y humo de tabaco son también mayoritariamente cromatográficos. RISNER y MARTIN [\(25\)](#) y, posteriormente, LIGGIO y McLAREN [\(26\)](#) han optimizado el análisis mediante HPLC previa derivatización con 2,4-DNPH. KEMPTER y col. [\(27\)](#) proponen el análisis mediante HPLC tras derivatización con reactivos diseñados a medida como CAZTH (4-cloro-6-(4-fenilazoanilino)-1,3,5-triazina-2-hidrazina).

DONG y MOLDOVEANU [\(28\)](#) proponen también cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS) pero tras derivatización con 2,4-DNPH. FUNG y col.

(29) han descrito un nuevo procedimiento analítico para la separación y cuantificación de cetonas y aldehídos basado en electrocromatografía.

ZHAO y col (30) han descrito el análisis de compuestos carbonílicos alifáticos de bajo peso molecular mediante cromatografía electrocinética micelar (MEKC) tras derivatización con 2,4-DNPH.

CAMARASU (31) propone un método para el análisis de restos de acetona y otros disolventes orgánicos en medicamentos mediante cromatografía de gases con muestreo de espacio de cabeza y detección por espectrometría de masas (HS-GC-MS), previa concentración de las muestras por microextracción en fase sólida (SPME). SUGAYA y col (32) analizan acetona en fibras sintéticas, pegamentos y materiales impresos mediante HS-GC-MS previa derivatización con PFBOA (*o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina).

CHI y col. determinan compuestos carbonílicos en muestras atmosféricas mediante HPLC e ionización por electrospray (ESI) acoplado con MS-MS previa derivatización con 2,4-DNPH (33).

SZULEJKO y col. determinan acetona y otros compuestos volátiles usando cromatografía de gases con espectrometría de masas de resonancia ión-ciclotrón por transformada de Fourier (GC-FT-ICR-MS) (34).

Los métodos no cromatográficos recientes para el análisis de acetona en muestras medioambientales son escasos. GAO (35) determina acetona en agua mediante espectrofotometría de doble longitud de onda. ZHANG y col. (36) y KOEHLER y col. (37) utilizan espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) para el análisis remoto de acetona en aire o en emisiones industriales. Finalmente, KHAYAMIAN y col. (38) determinan acetona en aire mediante espectrometría de movilidad iónica con descarga de corona (CD-IMS). WANG y col. determinan acetona en muestras acuosas mediante un electrodo de plomo en disolución de tartrato sódico (9). RELLA y col. analizan el aire interior

utilizando un sensor de gases basado en nanopartículas de TiO_2 depositadas sobre Si y Al_2O_3 mediante la técnica de evaporación con láser pulsado asistida por una matriz (MAPLE) (39).

La determinación de acetona en aire requiere procedimientos de muestreo que pueden ser de tipo activo o pasivo. En los métodos activos el aire se hace pasar mediante bombeo a través del muestreador mientras que las técnicas pasivas se basan en procesos de difusión.

Los **métodos activos** se basan usualmente en borboteadores (impingers) líquidos, cartuchos impregnados o tubos de absorción. Generalmente son un paso de colección/preconcentración que pueden involucrar crio-atrapamiento (40), sólidos absorbentes (41) o SPME (31,42,43,44,45), antes de la introducción de la muestra captada en la columna de cromatografía de gases de alguno de los métodos descritos.

Entre las técnicas más frecuentes recomendadas por la Agencia de Protección del Medio Ambiente americana (3,8) y los métodos ISO para la determinación de trazas de acetona en aire ambiental están la preconcentración en sólidos sorbentes. La desorción puede emplear líquidos o calentamiento. Sus ventajas son la selectividad y su capacidad de absorción, no obstante, pueden presentar una absorción incompleta de los compuestos más volátiles, reacciones químicas de los analitos con el sorbente y un caudal de flujo limitado. QIN y col. obtienen que los valores resultantes tras la preconcentración en gel de sílice son un 10% superiores a los obtenidos con sorbentes basados en carbón activo. Su método de muestreo permite detectar cantidades de acetona desde 3 nmol L^{-1} hasta valores inferiores a $0,1 \text{ nmol L}^{-1}$ (ppb) (41).

La SPME es una nueva tecnología de preconcentración que supera las desventajas de los métodos tradicionales que requieren dispositivos complejos, altos costes o un largo tiempo de preparación. Es una técnica rápida, económica y eficiente tanto para el muestreo de sólidos, líquidos o muestras gaseosas. No requiere el uso de disolventes o aparatos complicados. El análisis de los extractos se lleva a cabo mediante GC, GC-MS o HPLC. GROTE y PAWLISZYN (46) estudian un método que implica extracción y preconcentración con fibra de sílice fundida impregnada con fase estacionaria polimérica y el análisis mediante GC-MS. El método lo validan con etanol, acetona e isopreno en aliento. Comparan tres fibras:

polidimetilsiloxano (PDMS), Carbowax/Divinilbenceno y Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS-DVB), alcanzando esta última un límite de detección de $1,8 \text{ nmol L}^{-1}$ de acetona.

DENG y ZHANG desarrollan un método para determinar acetona en la respiración humana. El gas de la respiración de pacientes diabéticos es recogido en bolsas Tedlar y expuesto a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 4 minutos en fibras de SPME de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) previamente derivatizadas con O-2,3,4,5,6-(Pentafluorobenzil) hidroxilamina hidrocloreto (PFBHA). Finalmente, el derivado formado en la fibra es desorbido y analizado mediante GC-MS (42).

TESHIMA y col. estudian dos sistemas de muestreo. El primero consiste en una máscara conectada a una pequeña bomba de muestreo mediante la que se aspira el aire a través de un lavador de gases ("scrubber") de difusión a $0,4 \text{ L min}^{-1}$. El segundo colector consiste en inflar un balón Mylar de capacidad 9 L. Ambos permiten detectar 14 ppbv de acetona gaseosa, extendiéndose el rango lineal hasta $1,21 \text{ ppmv}$ (47).

Existen tecnologías alternativas emergentes en las que el aire es muestreado a través de cartuchos cubiertos con 2,4-DNPH en las que se consigue utilizando electrocromatografía/MS un límite de detección de $7 \times 10^{-10} \text{ M}$ (29).

CAVALCANTE y col. han analizado acetona en aire de ambientes interiores y exteriores para estimar el riesgo de cáncer. Las muestras se recogen haciendo pasar un volumen de aire (100-120 L) con un caudal de flujo de entre $0,8$ y $1,2 \text{ L min}^{-1}$ a través de cartuchos C_{18} impregnados con 2,4-DNPH y se miden mediante HPLC (48).

HUNG y col. comparan la adsorción de acetona sobre diferentes tipos de partículas de sílice (49).

Los **muestreadores pasivos** (tubos de difusión o bolsas de gases) se han desarrollado para medir concentraciones de acetona en aire como una alternativa a las técnicas de muestreo activo. Para el muestreo pasivo se puede utilizar el mismo medio de captación

(sólidos sorbentes) que para el muestreo activo. Las ventajas de estos muestreadores son que no tienen piezas móviles que puedan averiarse, la calibración regular del flujo es innecesaria y no se requieren bombas costosas. El tubo, o la bolsa de gas, se expone a las condiciones ambientales durante un período de tiempo (generalmente un período mucho más largo que el tiempo de bombeo en el muestreo activo) y después la acetona es analizada por el método analítico apropiado (8).

ZHANG y col. encuentran que entre los muestreadores pasivos que mejor límite de detección alcanzan se puede destacar el sistema de muestreo que consiste en un sólido adsorbente con dansilhidrazina que llega hasta $6,9 \times 10^{-9}$ - $2,7 \times 10^{-8}$ M mediante HPLC-fluorescencia. UCHIYAMA y HASEGAMA han desarrollado un muestreador de difusión que permite analizar concentraciones de ppbv. Este dispositivo consta de tres partes: un tubo de politetrafluoroetileno (PTFE), una pieza de polipropileno y gel de sílice con 2,4-DNPH. La acetona es absorbida por el 2,4-DNPH y finalmente detectada mediante HPLC-UV (8).

Tabla I-2. Métodos habituales para determinar acetona en muestras medioambientales.

MUESTRA	PRETRATAMIENTO	L.D., M	MÉTODO	Ref.
Agua	Reacción con ácido antranílico diazotado	9×10^{-6}	Espectrofotometría	1
Agua dulce Agua de mar	Derivatizar con 2,4-DNPH. Pasar por C_{18} . Eluir con acetonitrilo	5×10^{-10}	HPLC-UV	50
Aguas residuales, suelos, sedimentos	Mezcla con agua destilada. Purga y trampa	2×10^{-6}	GC-MS	51
Aire (ocupacional)	Aire a través de carbón vegetal y desorber con CS_2	2×10^{-7}	GC-FID	52
Aire (ambiente)	Pasar aire a través de trampa criogénica	2×10^{-11}	GC-RGD	53
Aire (ambiente)	Pasar aire a través de un cartucho con de 2,4-DNPH. Eluir con acetonitrilo y tetrahidrofurano	5×10^{-8}	HPLC-UV	54
Aire (interior)	Difundir muestra en gel de sílice con 2,4-DNPH. Eluir con acetonitrilo	3×10^{-7}	HPLC-UV	55
Aire	Pasar aire a través de bisulfito sódico 1%. Reacción de la acetona absorbida con vainillina	9×10^{-6}	Espectrofotometría	56

Tabla I-3. Otros métodos para determinar acetona en muestras medioambientales.

MUESTRA	PRETRATAMIENTO	L.D., M	MÉTODO	Ref.
Humo de cigarro	Derivatizar con 2,4-DNPH		HPLC	25
Humo de cigarro	Derivatizar con 2,4-DNPH, acetonitrilo y ácido perclórico	3x10 ⁻⁷	GC-MS	28
Vapor de acetona		0,1 mL	Sensor basado en Co-SnO ₂	57
Productos farmacéuticos	Fibras de Carboxen/Polidimetilsiloxano	9x10 ⁻⁸	HS-GC-MS	31
Fibras sintéticas, pegamentos y materiales	Derivatizar con PFBOA		HS-GC-MS	32
Agua			Espectrofotometría de doble λ	35
Ciclohexano	DVB/Carboxen/PDMS	2x10 ⁻¹¹	GC-MS	58
Aire exterior	Derivatizar con 2,4-DNPH	7x10 ⁻⁸	LC-ESI-MS/MS	33
Aire o en emisiones industriales			Espectroscopía infrarroja con TF	37
Aire	Derivatizar con CAZTH	2x10 ⁻⁹	HPLC Fluorimetría	27
Aire	Derivatizar con 2,4-DNPH	3x10 ⁻⁵	MEKC	30
Aire		1x10 ⁻⁶	CD-IMS	38
Aire interior	Nanopartículas de TiO ₂ depositadas en Si y Al ₂ O ₃	3x10 ⁻⁴	Sensor MAPLE TiO ₂	39
Aire		1x10 ⁻⁶	Sensor de La ₂ O ₃	59
Aire interior	Derivatizar con 2,4-DNPH	8x10 ⁻⁹	HPLC-UV	26
Aire interior	Pasar a través de cartuchos con gel de sílice, lavar con acetonitrilo e impregnar con 2,4-DNPH	5x10 ⁻⁶	Electrocromatografía	29
Aire interior y exterior	Cartucho C ₁₈ impregnado con 2,4-DNPH, desorción con acetonitrilo	2x10 ⁻⁷	HPLC/Diodo array UV-Vis	48

Los métodos habituales para la determinación de acetona en diferentes **muestras biológicas** de origen humano (3) se resumen en la [Tabla I-4](#). Como puede observarse, en la mayoría de los casos el análisis se lleva a cabo mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama tras un tratamiento adecuado de las muestras.

La exposición a acetona se puede diagnosticar a través de exámenes para medir la cantidad de acetona presente en el aliento, la sangre o la orina. El análisis de aliento dado su carácter no invasivo tiene el potencial de reemplazar al análisis en sangre y en orina de muchos COVs y ha sido usado como una herramienta para el diagnóstico de muchas enfermedades. La acetona en aliento está presente en cantidades de nanomolar. El análisis de trazas a niveles de ppmv o inferiores, puede ser útil en toxicología y especialmente, en el diagnóstico de enfermedades como la diabetes.

La determinación de acetona en muestras como sangre u orina es difícil debido a que la acetona es un metabolito de los otros cuerpos cetónicos. La cantidad de acetona producida depende de las condiciones de almacenamiento y análisis de las muestras. Incluso si éstas se mantienen refrigeradas, cuando el tiempo entre la toma y el análisis es elevado pueden generarse cantidades importantes de acetona debido a la descarboxilación espontánea del ácido acetoacético. Otro grave inconveniente es la descarboxilación parcial de este ácido que se produce en el inyector o en la columna cromatográfica por efecto de la temperatura (60).

Para resolver este inconveniente de la descarboxilación y otros, como la laboriosidad del método o el tiempo consumido durante el muestreo, se han propuesto los métodos alternativos que se indican en la [Tabla I-5](#). BREGA y col. (61) han propuesto un procedimiento que consiste en la desproteínización de las muestras con acetonitrilo, derivatización con 2,4-DNPH y separación y análisis de las hidrazonas mediante HPLC.

FELBY y NIELSEN (62) han determinado acetona en sangre mediante cromatografía de gases con espacio de cabeza con detector de ionización de llama (HS-GC-FID). CORDIS y

col. (63) analizan acetona y otros compuestos volátiles en efluentes cardiacos mediante derivatización con 2,4-DNPH seguida de separación por HPLC y posterior análisis de las fracciones mediante GC-MS. Más recientemente, QIN y col. han determinado acetona en suero y aliento mediante GC-MS previa concentración en sorbentes sólidos (41) o mediante SPME (42,46,64,65). DENG y col. (66) combinan SPME y derivatización con PFBHA (clorhidrato de *o*-2,3,4,5,6-(pentafluorobencil)hidroxilamina) para evitar pérdidas de acetona en el inyector cromatográfico. DONG y col. (67) también utilizan SPME y PFBHA para medir posteriormente acetona mediante GC-MS en muestras de sangre. XIE y col. (68) analizan acetona y otros compuestos volátiles en aliento mediante espectrometría de movilidad iónica acoplada a una fuente UV de ionización y a una columna capilar de alta velocidad (HSCC-UV-IMS). SEKINE y col. MUSA y col. miden la acetona del aliento de niños mediante GC con el objetivo de determinar si la acetona en aliento puede utilizarse para predecir el nivel de cuerpos cetónicos (ácido acetoacético, ácido 3-hidroxi-butírico y acetona) en sangre. Para ello desarrollan un muestreador pasivo de flujo que permite determinar la acetona que emana de la superficie de la piel humana. El dispositivo dispone de un filtro impregnado con 2,4-DNPH donde se impregnan los gases que posteriormente se determinan mediante HPLC (69,70). HRYNIUK y col. proponen una técnica rápida de análisis de aliento combinando desorción térmica y espectrometría de masas con la que el análisis de una muestra puede efectuarse en menos de 5 minutos, tiempo muy inferior a los 20-40 minutos requeridos en el análisis convencional mediante TD-CG (71).

Entre los escasos métodos no cromatográficos para el análisis de acetona en fluidos humanos está el propuesto por PEZZANITI y col. (72) que determinan acetona en orina mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).

Dentro de las muestras biológicas, el análisis de acetona en leche animal tiene interés en ganadería para el control de la alimentación. El método más utilizado es la cromatografía de gases con espacio de cabeza con detección por ionización de llama (73,74,75) o por captura electrónica, previa transformación de acetona en bromoacetona (76). Más recientes

son los métodos basados en FT-IR ([77,78](#)) y un método potenciométrico ([79](#)) en el que, mediante un electrodo selectivo, se mide el bromuro generado en la transformación de acetona en bromoacetona.

Procedimientos cromatográficos similares a los mencionados se han aplicado al análisis de acetona en alimentos ([80,81,82](#)). SCOTTER y col. determinan acetona y dietil éter en muestras de berberechos (*Cerastoderma edule*) y mejillones (*Mytilus edulis*) mediante espacio de cabeza GC-MS ([83](#)). TAKEOKA y col. analizan en fruta fresca 62 componentes volátiles, entre ellos acetona, mediante GC-MS previa destilación a vacío y extracción de la pulpa ([84](#)). También se ha descrito un método de análisis con inyección secuencial basado en FT-IR para el control de procesos de fermentación en la producción industrial de acetona/butanol ([85](#)).

Tabla I-4. Métodos habituales para determinar acetona en muestras biológicas.

MUESTRA	PRETRATAMIENTO	L.D., M	MÉTODO	Ref.
Sangre entera	Desproteneizar con HClO ₄ / purga y trampa	4x10 ⁻⁷	GC-FID	86
Sangre entera	Purga y trampa	4x10 ⁻⁶	GC-MS	87
Suero	Desproteínizar con wolframato sódico y sulfato cúprico	1x10 ⁻⁶	GC-FID	88
Suero	Centrifugar e inyectar el líquido claro	1x10 ⁻⁷	GC-FID	89
Orina	Derivatizar con cloruro de pentafluorobenziloxilamonio y extraer con hexano	4x10 ⁻⁶	GC-FID	90
Hígado, sangre, orina	Reducir con NaBH ₄	4x10 ⁻⁵	GC ó HPLC	60
Hígado	Reducir con NaBH ₄	7x10 ⁻⁵	GC-FID	91
Hígado, pulmón, riñón, grasa	Purga y trampa			
Aliento	Inyección directa en GC	3x10 ⁻⁸	GC-FID	92
Aliento	Reacción de la acetona absorbida con salicilaldehído en medio alcalino	2x10 ⁻⁷	Fotometría basada en LED	47

Tabla I-5. Otros métodos para determinar acetona en muestras biológicas.

MUESTRA	PRETRATAMIENTO	L.D., M	MÉTODO	Ref.
Sangre y orina	Desproteínizar con acetonitrilo y derivatizar con 2,4-DNPH	4×10^{-5}	HPLC-UV	61
Sangre post mortem	Añadir cloruro sódico y calentar a 100 °C	2×10^{-7}	HS-GC-FID	62
Sangre	Concentrar con fibra PDMS-Carboxen	8×10^{-11}	GC-MS	64
Sangre	Derivatizar con PFBHA. Fibras PDMS/DVB	8×10^{-11}	GC-MS	66
Sangre	Derivatizar con PFBHA	6×10^{-10}	GC-MS	93
Sangre	Derivatizar con PFBHA	2×10^{-9}	GC-MS	67
Sangre de rata	Añadir H ₂ SO ₄ y calentar	1×10^{-6}	HS-GC-FID	75
Efluentes cardiacos	Derivatizar con 2,4-DNPH		HPLC-UV	63
Orina	Clorhidrato de creatinina	5×10^{-3}	FT-IR	72
Orina		1×10^{-5}	SIFT-MS	94
Orina	Calentar a 80 °C durante 5 min	5×10^{-5}	UV-IMS	95
Sangre y orina	Diluir en n-propanol		GC-FID	73
Sangre y orina	Añadir sulfato potásico. Calentar a 70 °C		HS-GC-FID	74
Leche	Añadir clarificantes: ZnSO ₄ , K ₄ [Fe(CN) ₆] y centrifugar	9×10^{-7}	GC-ECD	76
Leche	Conservar con bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol)	7×10^{-4}	FT-IR	77
Leche		$2,5 \times 10^{-4}$	FT-IR	78
Suero y aliento	Concentrar en sorbentes sólidos: gel de sílice y carbón activo	1×10^{-10}	GC-MS	41
Aliento	Fibra de sílice derivatizada con polímero	2×10^{-9}	GC-MS	46
Aliento		5×10^{-8}	HSCC-UV-IMS	68
Aliento	Fibras DVB/Carboxen/ PDMS		GC-MS	65
Aliento	Concentrar con fibra PDMS	4×10^{-8}	GC-FID	44
Aliento	Introducir en tubos de desorción	2×10^{-6}	TD-SIFT-MS	71

2.2. CARACTERÍSTICAS DEL ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

El Análisis por Inyección en Flujo (FIA) forma parte de los métodos de análisis en flujo continuo. Impulsado y definido como tal en 1975 por RUZICKA y HANSEN ([96](#), [97](#)), es hoy una técnica ampliamente difundida ([98](#)), siendo muy numerosas y variadas sus aplicaciones en campos tan diversos como la Química Clínica, Química Farmacéutica, Medio Ambiente, Análisis de Alimentos, etc. ([99](#),[100](#),[101](#)).

Los aspectos que caracterizan y diferencian esta técnica son los siguientes:

1. El flujo no está segmentado por burbujas de aire; en esto se diferencia de los métodos convencionales de análisis en flujo continuo segmentado.
2. Las soluciones de muestra son inyectadas o insertadas de forma discreta en una corriente de reactivo en vez de ser aspiradas y mezcladas de forma continua con dicha corriente.
3. Durante su transporte hacia el detector, la porción de muestra inyectada puede experimentar diversos procesos químico-físicos (dispersión, dilución, reacción química, precipitación, extracción, diálisis, etc.). En el momento en que la muestra llega al detector, no se ha alcanzado aún el equilibrio físico (homogeneización de la zona de muestra) ni químico (reacción completa). Por esta razón, el Análisis por Inyección en Flujo es incluido en los métodos cinéticos de Análisis, siendo especialmente útil en procedimientos basados en reacciones de cinética lenta.
4. Los tiempos de inyección, transporte y detección, y en consecuencia los procesos químicos-físicos experimentados por la muestra inyectada, son muy reproducibles.
5. Estos tiempos son, además, controlables a través de las condiciones experimentales del sistema de flujo, tales como: composición de reactivos, caudales, tamaño y forma de reactores, volumen inyectado, temperatura, etc.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL

3.1.1. Reactivos

- **Ácido antranílico**, (Ác. 2-aminobenzoico, ABA), $\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{COOH}$, PA, 98% (Scharlab).
- **Nitrito sódico**, NaNO_2 , Puris., 96% (Panreac).
- **Hidróxido sódico**, NaOH , PA, 99% (Scharlab).
- **Ácido clorhídrico**, HCl , PA, 37% (Scharlab).
- **Acetona**, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, reactivo HPLC, 99,75% (Scharlab).
- **Metanol**, CH_3OH , reactivo HPLC, 99,9% (Merck).
- **Etanol absoluto**, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, PA, 99,8% (Scharlab).
- **Fenol**, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$, Puris., 90% solución acuosa (Panreac).
- **Sulfito sódico**, Na_2SO_3 , PA, 95% (Panreac).
- **Acetato sódico**, CH_3COONa , PA, 99% (Scharlab).
- **Sulfuro sódico**, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, para síntesis, 99% (Carlo Erba).
- **Formaldehído**, HCHO , estabilizado con metanol, PA, 35-40% (Panreac).
- **Acetaldehído**, CH_3CHO , PA, 99,5% (Acros).
- **Sulfato potásico**, K_2SO_4 , PA, 99% (Panreac).
- **Sulfato de hidracina**, $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4\text{H}_2$, PA (Probus).
- **Hidróxido amónico**, NH_4OH , PA, 32% (Scharlab).
- **Éter etílico**, $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$, reactivo HPLC, 98% (Scharlab).

Las disoluciones de ácido antranílico diazotado (ABA-DIA) se preparan añadiendo cantidades adecuadas de nitrito sódico y de ácido antranílico (ABA) sólidos sobre un volumen medido de HCl 0,25 M previamente enfriado ($\approx 4\text{ }^\circ\text{C}$). El ABA se disuelve mejor en presencia de nitritos. Las disoluciones se mantienen refrigeradas.

Las disoluciones de acetona se preparan en el momento de su utilización a partir de otra de mayor concentración ($\approx 0,135\text{ M}$) que se prepara en el día. El reactivo original y todas

estas disoluciones permanecen estables al menos durante 12 h cuando se mantienen refrigeradas.

Todas las disoluciones de trabajo se preparan con agua destilada y desionizada.

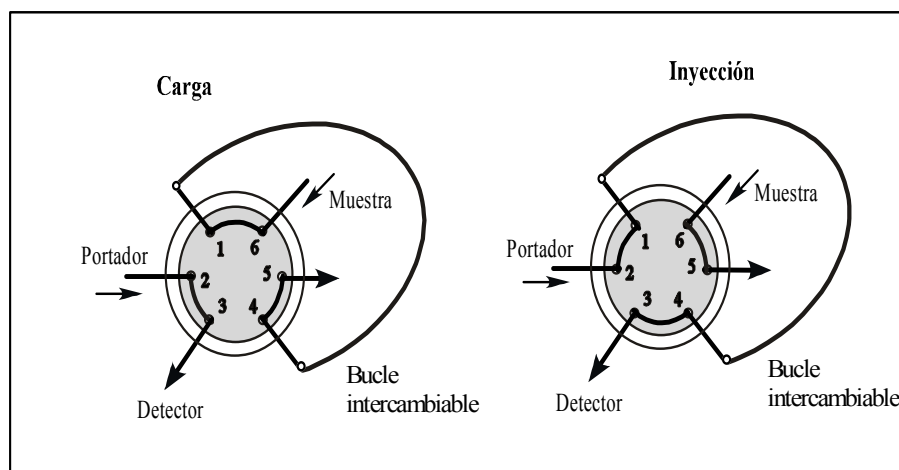
3.1.2. Aparatos y material

- **Espectrofotómetro UV 160** (Shimadzu) con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Hellma).
- **Espectrofluorímetro RF-5000** (Shimadzu) con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico (Hellma).

En el montaje del sistema de flujo de trabajo se utilizan los siguientes elementos:

- **Fluorímetro RF-10AXL** con célula de flujo de 12 μ L y provisto de un módulo de control SCL10AVP manejado por ordenador a través del software de adquisición y procesado de datos LC Solution (todo de Shimadzu). Esta aplicación, inicialmente diseñada para HPLC, se adapta para el registro y procesado de las señales obtenidas en análisis por inyección en flujo.
- **Bombas peristálticas Minipuls 2HP4** (Gilson) con tubos de bomba de vinilo de diferentes diámetros. Los caudales se establecen mediante selección adecuada del diámetro de tubo y de la velocidad de giro de la bomba. El caudal se controla periódicamente recogiendo el flujo de salida en un matraz aforado y midiendo el tiempo requerido para completar el volumen. Es necesario considerar que desde la puesta en marcha de la bomba hasta la estabilización del flujo correspondiente, transcurre un tiempo dependiendo del tipo, tamaño y caudal de los tubos de bomba. Una vez transcurrido este periodo, los caudales permanecen estables.

- **Válvula de inyección de 6 vías V-1451**(Upchurch Scientific) con activación electrónica. Su funcionamiento ([Figura I-1](#)) permite la inserción de un determinado volumen de muestra líquida sobre una corriente portadora. La muestra a inyectar está contenida en un bucle que puede ser alimentado de forma manual con una jeringa o mediante una bomba peristáltica independiente del flujo principal. El volumen inyectado puede variarse utilizando bucles de diferente tamaño. El volumen de cada bucle, el volumen residual de la válvula y el volumen total inyectado (volumen de bucle + volumen residual) se han calibrado mediante un procedimiento fluorimétrico con quinina. El volumen mínimo que puede inyectarse corresponde al volumen residual y se obtiene conectando entre sí las terminales de conexión del bucle de muestra.

**Figura I-1****Válvula de inyección de 6 vías V-1451.**

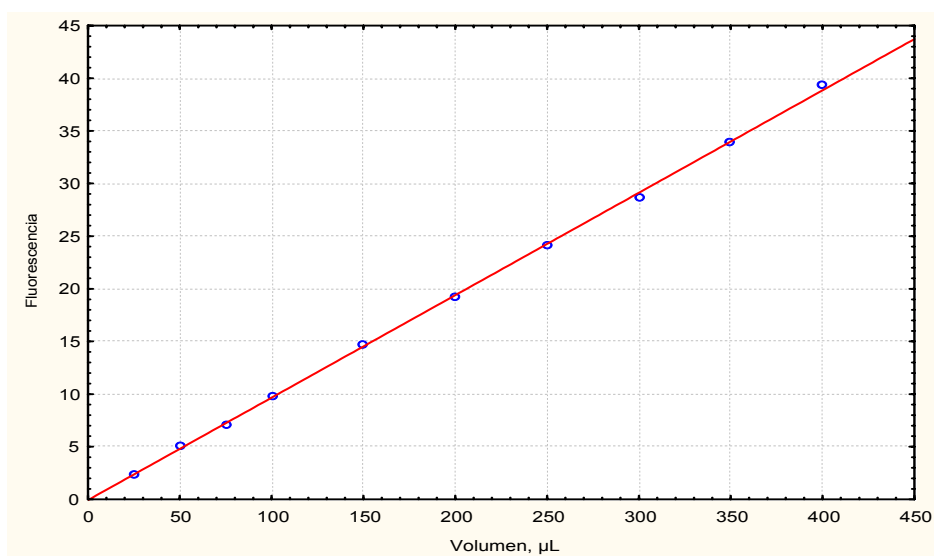
Calibrado de bucles

En matraces aforados de 10 mL se colocan, mediante una microjeringa de precisión graduada, tipo Hamilton, volúmenes comprendidos entre 25 y 400 μL de una disolución de quinina de concentración 1 ppm en H_2SO_4 0,05 M. Después de enrasar con H_2SO_4 0,05 M, se mide la fluorescencia de las disoluciones resultantes ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 450$ nm) y se construye el correspondiente calibrado fluorescencia/ volumen puesto. La línea de calibrado ([Figura I-2](#)) se ajusta a la ecuación de una recta ($F = -0,0643 + 0,0973 V$; $r^2 = 0,9995$). A continuación, utilizando un sistema FIA de un solo canal y H_2SO_4 0,05 M como portador, se inyectan diferentes volúmenes de la misma disolución de quinina, utilizando los bucles que se pretende calibrar. La quinina inyectada, junto con el portador es recogida en matraces aforados de 10 mL, manteniendo el bombeo ($3,5 \text{ mL min}^{-1}$) y la válvula en posición de inyección hasta que los matraces quedan enrasados. La medida de la fluorescencia de las disoluciones resultantes permite establecer a partir del calibrado el volumen total inyectado y el volumen de cada bucle ([Tabla I-6](#)). Cada bucle se etiqueta con el volumen total inyectado, correspondiente a la suma del volumen residual y del volumen real del bucle.

Tabla I-6. Valores de fluorescencia y volumen de patrones y bucles calibrados.

	VOLUMEN, μL			Fluorescencia*
	Patrones	Bucles	Total inyectado	
Patrones				
P1	25			2,4
P2	50			5,0
P3	75			7,1
P4	100			9,7
P5	150			14,6
P6	200			19,3
P7	250			24,0
P8	300			28,7
P9	350			34,1
P10	400			39,5
Bucles				
B0 Residual			34	3,2
B1		57	91	8,8
B2		82	116	11,2
B3		149	183	17,7
B4		207	241	23,4
B5		268	302	29,3
B6		320	354	34,4

*: Media de tres determinaciones

**Figura I-2**

Calibrado de bucles. Recta de calibrado.

- **Válvula rotatoria de 4 vías de flujo diagonal V-1101D** (Upchurch Scientific).

Se utiliza para la parada de flujo en el reactor R ([Figura I-3](#)) conectado a dos de sus cuatro terminales. Tiene dos posiciones. En la primera, el flujo pasa a través del reactor hacia el detector. Al cambiar a la segunda, el flujo va directamente hacia el detector y el contenido del reactor queda detenido y aislado. Al cambiar de nuevo a la primera posición, el contenido del reactor es arrastrado hacia el detector.

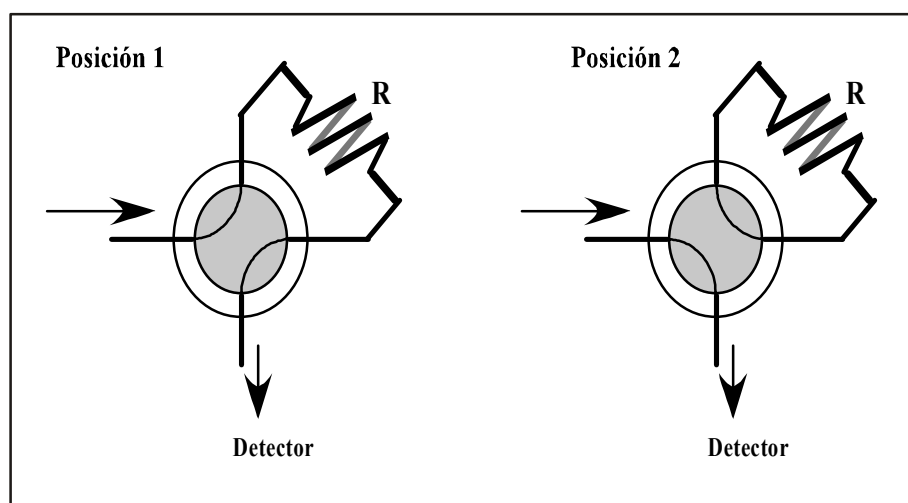


Figura I-3

Válvula rotatoria de 4 vías de flujo diagonal V-1101D.

- **Conducciones y Reactores.** En las conducciones y conexiones de los diferentes canales se utilizan tubos de teflón de 0,5 mm de diámetro interno y 1,6 mm de diámetro externo con conectores y conexiones lineales y en T normalizados (Upchurch Scientific). La mezcla y, en su caso, reacción química, se lleva a cabo en reactores tubulares insertados en el sistema de flujo. Estos reactores son tubos de teflón de diferente longitud, enrollados o anudados, y provistos en sus extremos de conectores normalizados.
- **Termostato de recirculación Lauda E-100** (Hucoa-Erlöss) conectado en serie con distintas cámaras que actúan de intercambiadores de calor con los reactores que se

encuentran situados en su interior, formando un circuito cerrado a través del cual se hace recircular agua a la temperatura adecuada para controlar la temperatura de trabajo.

En la determinación de acetona en aire se utiliza además:

- **Bolsas reutilizables Tedlar®** de 1,6 L para análisis de gases (Sigma-Aldrich), provistas de un septum de silicona/PTFE.
- **Jeringa Halminton**, 100 μ L.
- **Caudalímetro S-2150** con regulador de flujo (Tecfluid), 0,15 – 1,4 L min⁻¹.
- **Bomba de succión** fabricada en vidrio con válvula de rebote incorporada (Afora).
- **Llave de tres vías Discifix®-C** (B. Braun).
- **Dispositivo de captación de acetona** construido en el laboratorio con:
 - Filtro de entrada de disolvente A-446 (Upchurch Scientific), de 10 μ m de tamaño de poro y fabricado en material hidrofóbico UHMWPE (ultra-high molecular weight polyethylene).
 - Tubo de ensayo de vidrio (20 cm x 2,5 cm de diámetro externo)
 - Tubo de teflón 1 mm de diámetro interno (Scharlab)

Otro material utilizado:

- **Potenciómetro (pH-metro CRISON 2001).**
- **Cronómetro digital.**
- **Baños termostáticos.**
- **Micropipetas.**
- **Otro material de laboratorio.**

3.2.2. Características espectroscópicas

Para el estudio de la reacción se compararon las características espectroscópicas de las disoluciones de ABA y ABA-DIA en presencia y ausencia de acetona y en diferentes medios ácidos y básicos, tomando como referencia las condiciones descritas por RAHIM y BASHIR (1).

Para ello se realizaron experimentos semicuantitativos en discontinuo con cubetas estándar de 1 cm de paso óptico. Se prepararon disoluciones $1,5 \times 10^{-3}$ M de ABA o ABA-DIA ($1,5 \times 10^{-3}$ M ABA + $1,8 \times 10^{-3}$ M NaNO_2) en HCl 0,25 M sin y con (entre $5,0 \times 10^{-5}$ y $1,0 \times 10^{-3}$ M) acetona. Sobre estas disoluciones se añadieron, de forma independiente, concentraciones crecientes de NaOH hasta un exceso de éste de 0,2 M. En cada caso, se registró el espectro de absorción o los de fluorescencia de la disolución recién preparada y su evolución durante un mínimo de 15 minutos.

Las disoluciones de ABA-DIA $\geq 5,0 \times 10^{-2}$ M en HCl 0,25 M son ligeramente pardas e inestables, evolucionando en horas hacia color rojizo. La evolución es más lenta si se mantienen refrigeradas. Las disoluciones diluidas ($\leq 10^{-3}$ M) son incoloras y evolucionan más lentamente. En medios menos ácidos se obtienen disoluciones más inestables. En HCl 0,01 M, por ejemplo, las disoluciones de ABA-DIA son rojizas y evolucionan en pocos minutos originando un precipitado pardo rojizo. Un análisis del precipitado por espectrometría de masas dio como resultado la existencia de un compuesto de elevado peso molecular (> 15.000), lo que indica algún tipo de reacción de polimerización. En comparación con las de ABA-DIA y en los mismos medios ácidos, las disoluciones de ABA son incoloras y aparentemente estables.

3.2.2.1. Disoluciones ABA/acetona

Las disoluciones de ABA en HCl 0,25 M son incoloras. Su espectro de absorción presenta un máximo a 325 nm ($\epsilon \approx 40 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) cuya posición y altura no cambia con el tiempo. Las disoluciones básicas o alcalinas presentan igualmente un máximo estable a 325 nm pero de mayor altura ($\epsilon \approx 3,4 \times 10^2 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que en medio ácido.

El espectro de excitación del ABA en medio HCl 0,25 M presenta un máximo a 335 nm y otro menor a 285 nm. La emisión máxima se produce a 415 nm. El aumento de la concentración de NaOH conduce a espectros de excitación en los que el máximo de 285 nm desaparece gradualmente, mientras que el de 335 nm se desplaza hasta los 350 nm para volver hasta los 335 nm con concentraciones elevadas de NaOH. En el mismo sentido, el máximo de emisión se desplaza hasta los 390 nm. Tanto en medio ácido como básico, para valores fijos de λ_{ex} y λ_{em} , la intensidad de fluorescencia permanece constante con el tiempo. De forma global, la máxima intensidad de fluorescencia se observa en medios neutros o poco ácidos (pH 2-7; $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 415 \text{ nm}$), lo que apunta hacia la forma anfótera del sistema ácido-base del ABA ($pK_a = 2,1$; $pK_a = 4,9$ (102)) como especie más fluorescente.

Al comparar los espectros de disoluciones de ABA homólogas, con y sin acetona, no se encontraron en ningún caso diferencias significativas. Esto indica que, en las condiciones investigadas no existe reacción entre ABA y acetona, o que, en el caso de que exista, la reacción no repercute en las propiedades ópticas de la disolución.

3.2.2.2. Disoluciones ABA-DIA/acetona

Las disoluciones de ABA-DIA en HCl 0,25 M son incoloras, su espectro de absorción presenta un máximo estable con el tiempo a 300 nm ($\epsilon \approx 1,5 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). La adición de NaOH origina disoluciones de color amarillo pálido que evoluciona a pardo-rojizo. Los espectros de absorción de estas disoluciones presentan un máximo a 250 nm estable en posición e intensidad ($\epsilon \approx 1,9 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), un hombro igualmente estable a 280 nm y otro máximo en torno a 400 nm que experimenta un efecto hipercrómico (mayor altura) y

desplazamiento hipsocrómico (hacia menores longitudes de onda) con el tiempo (ϵ de $1,5 \times 10^1$ a $2,3 \times 10^2$ L mol⁻¹ cm⁻¹ y $\lambda_{\text{máx}}$ de 400 a 385 nm en los primeros 4 minutos).

En medio HCl 0,25 M, el espectro de excitación del ABA-DIA presenta un único máximo a 350 nm, siendo la emisión máxima a 385 nm. La intensidad de fluorescencia no cambia con el tiempo. En este medio, el ABA-DIA es menos fluorescente que el ABA. Efectuando medidas a las λ_{ex} y λ_{em} óptimas respectivas, la intensidad de fluorescencia relativa ABA/ABA-DIA es 100/20, aproximadamente.

La adición de exceso de NaOH sobre la disolución ácida conduce a disoluciones básicas que inicialmente no presentan fluorescencia. Sin embargo, ésta aparece gradualmente, de forma paralela a la coloración amarilla descrita anteriormente. En el espectro de excitación se observa entonces un máximo fijo a 305 nm y un hombro a 335 nm que desaparece con el tiempo. El máximo de emisión, inicialmente a 395 nm, se desplaza lentamente hasta los 425 nm, pasando por un estado de meseta en el que la emisión es máxima en todo el intervalo de 395 nm a 425 nm. La intensidad de fluorescencia varía con el tiempo. Primero aumenta y después disminuye hasta desaparecer completamente, siendo este efecto cualitativamente independiente de la λ_{em} a la que se efectúan las medidas. Cabe resaltar que el máximo de emisión alcanza la posición de 425 nm durante el periodo de disminución de la fluorescencia. Tanto la velocidad de desplazamiento del máximo como el cambio de la intensidad con el tiempo dependen de la concentración de NaOH. La desaparición total de la fluorescencia se produce en todos los casos en tiempos inferiores a 30 minutos.

En disoluciones ácidas o poco básicas ($\text{pH} \leq 11$, aproximadamente) no se observa ninguna diferencia entre disoluciones homólogas de ABA-DIA con y sin acetona. Sin embargo, a $\text{pH} > 11$, en las disoluciones con acetona aparece un color rojo que cambia de intensidad con el tiempo siguiendo el comportamiento cualitativo representado en la [Figura I-4A](#). Inicialmente, la intensidad cambia de forma rápida, aumentando primero y disminuyendo después hasta desaparecer completamente, de forma que se recupera el fondo amarillo propio de las disoluciones básicas de ABA-DIA poco evolucionadas. A continuación se produce un aumento lento y gradual de la intensidad que finalmente alcanza un valor estable.

La intensidad del pico inicial aumenta con la concentración de acetona al igual que la rapidez con la que se produce, y ésta disminuye al incrementar la concentración de NaOH. En experimentos adicionales se comprobó que la concentración de ABA-DIA (entre $3,0 \times 10^{-4}$ y $3,0 \times 10^{-3} \text{M}$) también afecta a la intensidad y a la rapidez del máximo inicial, estando este efecto interrelacionado con la concentración de NaOH.

Los espectros de absorción de las disoluciones alcalinas ($\text{pH} > 11$) de ABA-DIA con acetona, frente a sus disoluciones homólogas sin acetona como blanco ([Figura I-4B](#)), presentan un máximo de absorbancia a 460 nm cuya intensidad varía según el modelo descrito en la ([Figura I-4A](#)). Durante la evolución aparece un hombro de intensidad creciente en torno a 400 nm.

A $\text{pH} < 11$, los espectros de fluorescencia de las disoluciones homólogas de ABA-DIA sin y con acetona no presentan diferencias observables. La adición de exceso de NaOH sobre disoluciones ácidas de ABA-DIA con acetona conduce a disoluciones básicas que inicialmente no presentan fluorescencia. Sin embargo, ésta aparece gradualmente, junto con el color rojo descrito en el comportamiento espectrofotométrico. En el espectro de excitación ([Figura I-5](#)) se observa entonces un máximo fijo a 305 nm y un hombro a 335 nm que desaparece con el tiempo. El máximo de emisión, inicialmente a 395 nm, se desplaza lentamente hasta los 425 nm, pasando por un estado de meseta en el que la emisión es máxima en todo el intervalo de 395 nm a 425 nm. La intensidad de fluorescencia varía con el tiempo. Primero aumenta y después disminuye hasta desaparecer completamente, siendo este efecto cualitativamente independiente de la λ_{em} a la que se efectúan las medidas. El comportamiento fluorimétrico descrito para las disoluciones de ABA-DIA con acetona es idéntico al indicado para las disoluciones de ABA-DIA sin acetona, con la diferencia de que los cambios en la intensidad de fluorescencia son más rápidos y acusados, tanto más cuanto mayor es la concentración de acetona. Este efecto se ilustra cualitativamente en la [Figura I-6](#). Los valores del gráfico corresponden a medidas efectuadas con $\lambda_{\text{ex}} = 305$ y $\lambda_{\text{em}} = 395$ nm. Cambiando λ_{em} a cualquier valor en el intervalo 395-425 nm se obtienen gráficos similares.

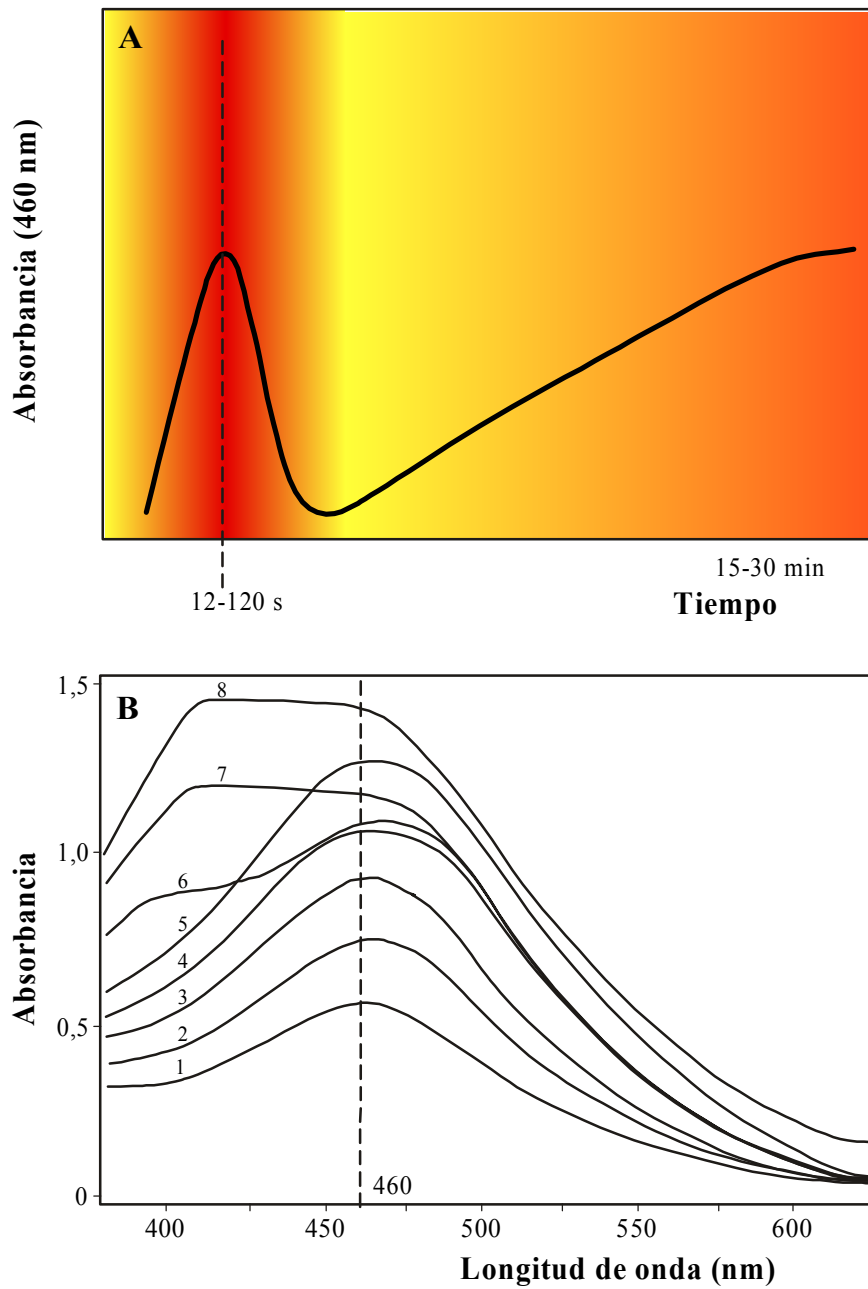


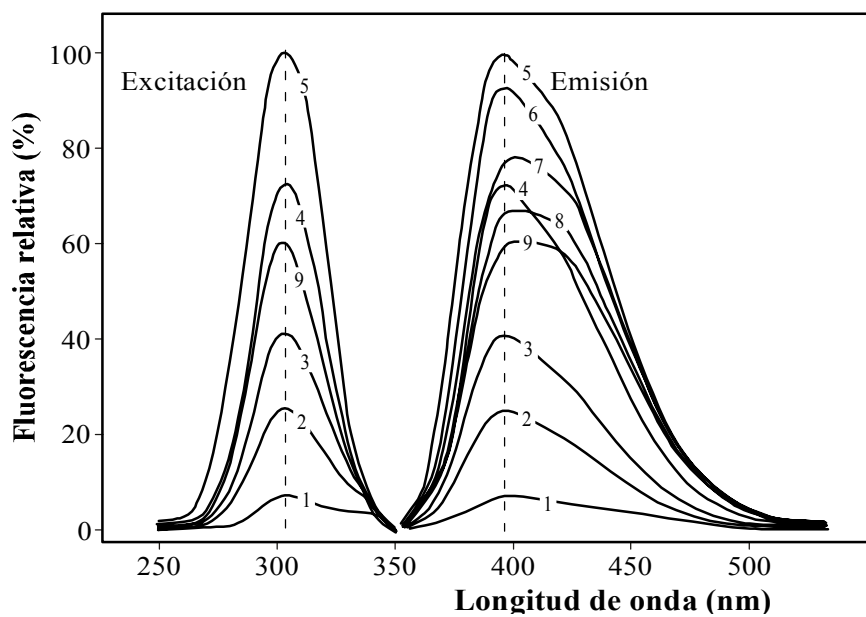
Figura I-4

Características absorbentes de las disoluciones alcalinas de ABA-DIA/acetona.

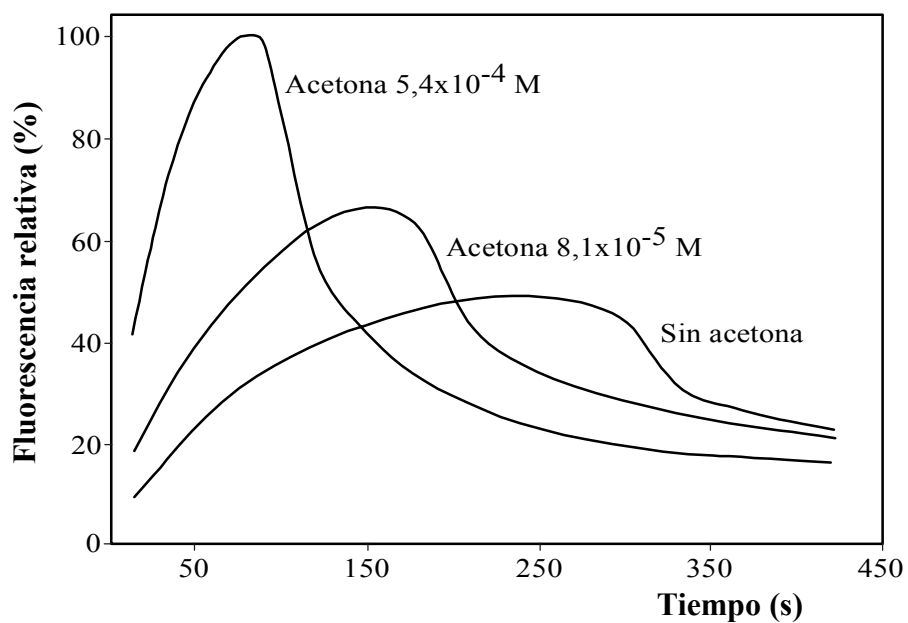
A) Representación cualitativa de la evolución del color (absorbancia a 460 nm).

B) Espectros a diferentes tiempos. Acetona: 1×10^{-3} M; Blanco: ABA-DIA.

Tiempo, s: 1) Inicial 2) 30 3) 60 4) 90 5) 120 6) 210 7) 300 8) 600.

**Figura I-5****Características fluorescentes de disoluciones alcalinas de ABA-DIA/acetona.**

Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 395 \text{ nm}$) y emisión ($\lambda_{ex} = 305 \text{ nm}$) a diferentes tiempos. Velocidad de escaneo: 60 nm s^{-1} ; intervalo de escaneo: 18 s (los números en el espectro indican el orden de escaneo); acetona: $6,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; ABA-DIA: $6,5 \times 10^{-4} \text{ M}$; NaOH: 0,15 M en exceso.

**Figura I-6**

Evolución de la fluorescencia para disoluciones alcalinas de ABA-DIA con y sin acetona.

$\lambda_{\text{ex}} = 305$ y $\lambda_{\text{em}} = 395$ nm. ABA-DIA: $1,0 \times 10^{-3}$ M; NaOH: 0,05 M en exceso.

3.2.3. Condiciones de reacción y detección

Del comportamiento descrito pueden resumirse las siguientes conclusiones:

1. La reacción de acetona con ABA-DIA se produce sólo en medios muy básicos ($\text{pH} > 11$), es de cinética lenta y tarda en completarse unos 30 minutos. La velocidad depende al menos de las concentraciones de acetona, ABA-DIA y NaOH. El mecanismo incluye aparentemente varias etapas. Inicialmente se forman intermedios coloreados (rojo) y/o fluorescentes que desaparecen en los primeros minutos. Después se forma lentamente un nuevo compuesto coloreado (también rojo) aunque no fluorescente.

2. Paralelamente a la reacción entre ABA-DIA y acetona se produce una reacción de fondo debida a la inestabilidad del ABA-DIA en medio alcalino. El ABA-DIA evoluciona lentamente originando primero disoluciones ligeramente amarillas que de forma gradual se tornan de color rojo-pardo al cabo de varias horas. En las primeras etapas de esta reacción de fondo se producen también intermedios fluorescentes, pero los cambios en la intensidad de fluorescencia son más lentos y menos acusados que en la reacción entre ABA-DIA y acetona.

3. La reacción entre ABA-DIA y acetona puede seguirse en su totalidad mediante detección espectrofotométrica a 460 nm.

4. Durante los primeros minutos de reacción, también es posible la detección fluorimétrica. Se propone la medida durante el periodo de crecimiento de la fluorescencia en el que las longitudes de onda óptimas permanecen estables ($\lambda_{\text{ex}}=305$ nm, $\lambda_{\text{em}}=395$ nm. Una vez iniciado el descenso de la fluorescencia, las medidas serían más complejas ya que se mantiene la λ_{ex} pero la λ_{em} óptima se desplaza gradualmente con el tiempo.

5. Tanto en las medidas espectrofotométricas como en las fluorimétricas es necesario

utilizar blancos de referencia adecuados debido a las propiedades absorbentes y fluorescentes de las disoluciones alcalinas de ABA-DIA y a su evolución con el tiempo.

6. En algunas condiciones experimentales, las medidas están fuertemente condicionadas por la reproducibilidad del tiempo de reacción. En los experimentos en discontinuo descritos, esta reproducibilidad es claramente insuficiente, especialmente si se considera la etapa inicial. Para un conocimiento más cuantitativo de la reacción y de las variables que la afectan se propone su estudio en un sistema con inyección en flujo, donde los tiempos de reacción son altamente reproducibles.

3.3. SISTEMA DE FLUJO

En la [Figura I-7](#) se muestra el sistema de flujo de trabajo. Las muestras de acetona se introducen mediante un inyector (I) sobre una corriente de agua (canal C_2) que se mezcla primero con una disolución ácida de ABA-DIA (canal C_1) y posteriormente con el NaOH (canal C_3) necesario para la reacción. Tras la segunda confluencia, el flujo global se hace pasar por una válvula de 4 vías de flujo diagonal (V-4) en la que dos de las terminales se han conectado con un reactor tubular anudado (R). La válvula tiene dos posiciones que permiten dirigir el flujo hacia el detector pasando o sin pasar por el reactor R. La mezcla de corrientes se favorece con reactores tubulares de nudos (M_1 y M_2). La disolución ácida de ABA-DIA se mantiene sumergida en un baño de hielo y la temperatura de la corriente C_1 se ajusta mediante un reactor tubular helicoidal (S). Los reactores R y S y las corrientes de agua y NaOH se mantienen a la temperatura de trabajo mediante un baño termostático con recirculación.

El procedimiento de operación es el siguiente. Inicialmente, el flujo se hace pasar a través de R. Se inyecta la muestra de acetona y después, a un tiempo determinado (**tiempo de desviación, t_d**), cuando la muestra se encuentra en R, se cambia la posición de la válvula. La muestra de acetona queda atrapada y continúa su reacción en el reactor R durante el tiempo deseado (**tiempo de parada, t_p**), hasta que se vuelve a cambiar la posición de la

válvula. El contenido del reactor es entonces arrastrado hacia el detector originando una señal en forma de pico que es función de las condiciones de reacción. La señal del blanco se obtiene cuando en el inyector se introduce agua en lugar de la muestra de acetona. El estudio de las diferentes variables que afectan a la reacción principal y a la reacción de fondo se basa en la medida de las alturas de pico (F) obtenidas para la muestra y para el blanco y en la señal neta de la muestra ($\Delta F = F_{\text{acetona}} - F_{\text{blanco}}$).

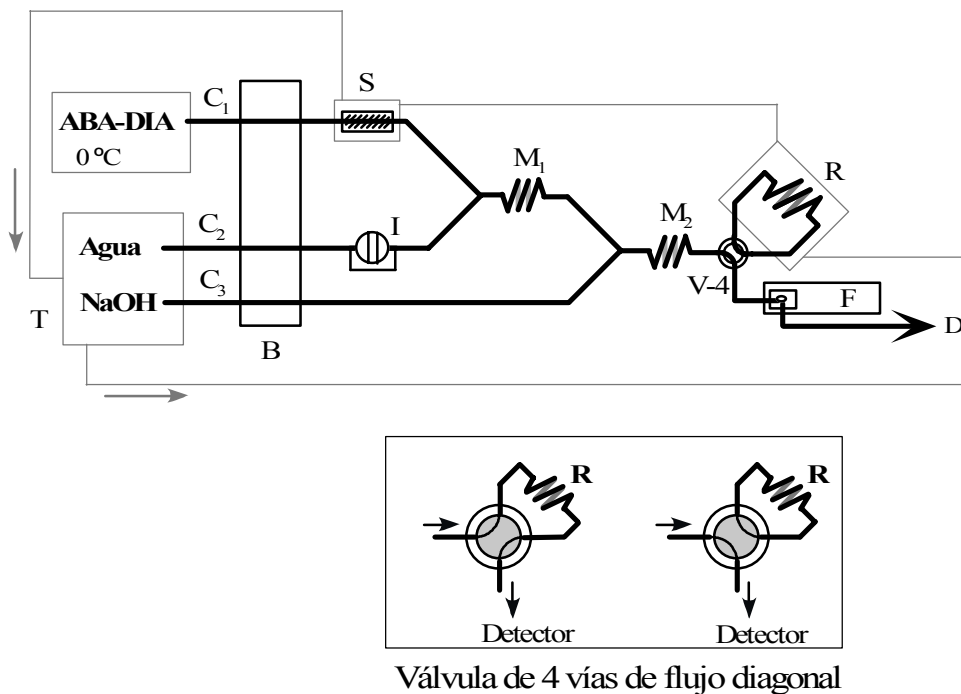


Figura I-7

Sistema de flujo propuesto para la determinación de acetona.

B: bomba peristáltica; C₁, C₂ y C₃: canales; S: reactor de termostatación; I: inyector; M: reactores de mezcla; V-4: válvula de 4 vías; R: reactor principal; T: termostato; F: fluorímetro; D: desecho.

3.4. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES

En el sistema de flujo descrito se ha estudiado el efecto de las siguientes variables, tanto en la reacción principal entre ABA-DIA y acetona como en la reacción de fondo:

- Tiempo de parada, t_p (tiempo de reacción)
- Concentración de NaOH
- Concentración de ABA-DIA
- Temperatura

Para facilitar la interpretación de los efectos y evitar su interdependencia con los de otras variables propias del sistema de flujo (caudales, volumen de inyección, forma y tamaño de reactores, tiempo de desviación), estas últimas se optimizaron y/o fijaron antes del estudio de las reacciones.

Tomando como base los ensayos preliminares, los estudios se limitaron a los 5 primeros minutos de reacción ya que, con o sin acetona, en la mayor parte de los experimentos, la aparición, crecimiento y posterior declive de la fluorescencia se producía durante este periodo.

3.4.1. Variables prefijadas

El tamaño y forma de los reactores M_1 , M_2 , S y R y los caudales de los diferentes canales se fijaron directamente en los siguientes valores y características:

- M_1 y M_2 : 25 cm x 0,5 mm d.i., tubos anudados
- S: 500 cm x 0,5 mm d.i., tubo helicoidal
- R: 125 cm x 0,5 mm d.i., tubo anudado
- Caudal: 1,00 mL min⁻¹ para cada canal C_1 , C_2 y C_3 .

Una vez fijados estos parámetros, el volumen de inyección y el tiempo de desviación se optimizaron de forma simultánea para conseguir una dispersión mínima de las muestras inyectadas y un máximo atrapamiento de las mismas en el reactor R.

Los reactores M_1 y M_2 se utilizaron para facilitar la mezcla de corrientes tras cada confluencia. Se eligieron reactores de nudos de pequeña longitud. Estos reactores producen

buena mezcla radial con poca mezcla axial (innecesaria en una confluencia y de efecto negativo ya que da lugar a la dispersión de las muestras).

El tamaño del reactor S no afecta directamente a los procesos de dispersión o reacción en el sistema de flujo. Se utilizó un reactor helicoidal suficientemente largo para asegurar el calentamiento de la corriente de ABA-DIA hasta la temperatura de trabajo.

El tamaño y forma del reactor R afecta a la eficacia del atrapamiento de las muestras inyectadas, a su dispersión y a la frecuencia máxima de inyección. Todo esto depende además del volumen de muestra inyectado. Reactores grandes facilitan el atrapamiento y hacen menos crítica la elección del tiempo de desviación, pero aumentan la dispersión de las muestras y disminuyen la frecuencia de inyección. Se eligió un reactor relativamente pequeño para obtener buena frecuencia de muestreo y baja dispersión de la muestra. Se utilizó un reactor de nudos ya que estos facilitan la mezcla radial dentro del reactor, pero disminuyen el estiramiento o dispersión axial de la zona de muestra, lo que contribuye a un mejor atrapamiento de la misma.

La elección del caudal se basó en diferentes consideraciones. En condiciones de flujo ininterrumpido, el caudal total después de la segunda confluencia determina el tiempo de reacción, de forma que caudales bajos proporcionan mayores tiempos de reacción y al contrario. Con la configuración elegida, éste no es un condicionante ya que la muestra reaccionante se mantiene parada en el reactor R durante el tiempo deseado (tiempo de parada) y el tiempo de reacción se puede modificar a voluntad sin cambiar el caudal.

Por otro lado, caudales altos arrastraban más rápidamente el contenido del reactor y daban lugar a picos más estrechos aumentando la frecuencia de inyección. Sin embargo, caudales demasiado altos producían pérdida de reproducibilidad y, sobre todo, hacían que la elección del tiempo de desviación fuera más crítica (pequeñas variaciones en el tiempo de desviación conducían a variaciones importantes en el atrapamiento de la muestra en R). Con caudales muy bajos, la reacción, que se inicia en la segunda confluencia, avanzaría de forma

significativa antes de llegar al reactor R.

El caudal elegido es un valor de compromiso para los diferentes aspectos descritos. Con este caudal y en las condiciones prefijadas, el tiempo de reacción antes de R es muy pequeño de forma que el tiempo total de reacción coincide prácticamente (con una diferencia constante de aproximadamente 1 s) con el tiempo de parada y éste puede elegirse a voluntad con la manipulación de la válvula V-4.

3.4.2. Optimización del volumen de inyección y del tiempo de desviación

Para un caudal determinado y manteniendo constantes el tamaño y forma de los reactores, la variación del volumen de inyección afecta a la dispersión de las muestras inyectadas. Por otro lado, diferentes volúmenes de inyección requieren también tiempos de desviación distintos para atrapar las muestras de forma óptima en el reactor R. Dada la interacción de sus efectos, estas dos variables, volumen de inyección y tiempo de desviación, se optimizaron simultáneamente, teniendo como objetivo la mínima dispersión de las muestras y su máximo atrapamiento en R.

Siendo la dispersión y el atrapamiento dos procesos esencialmente físicos, para esta optimización se prescindió de la reacción entre acetona y ABA-DIA. En su lugar se utilizaron muestras fluorescentes de quinina inyectadas sobre una corriente de ácido sulfúrico. En las condiciones de trabajo, la quinina es estable y, al no existir reacción química, los efectos observados corresponden únicamente a la influencia del volumen de inyección y del tiempo de desviación en la dispersión de la muestra y en la eficacia de su atrapamiento en R. La existencia simultánea de una reacción daría lugar a efectos solapados que dificultarían la interpretación.

En el sistema de flujo propuesto y con las condiciones prefijadas ya indicadas, el fluorímetro se ajustó a las condiciones de detección de quinina ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$). En el canal C₂ se introdujo ácido sulfúrico 0,05 M y en C₁ y C₃ agua destilada. Utilizando los bucles adecuados, se inyectaron volúmenes entre 35 y 245 μL de una disolución de quinina de concentración constante ($\approx 1 \text{ ppm}$) en ácido sulfúrico 0,05 M. Para cada volumen se llevó a cabo una serie de experimentos por triplicado según el siguiente procedimiento.

Procedimiento

Se realiza una primera inyección manteniendo el flujo a través de R. La altura del pico registrado ($F^{o_{vi}}$) corresponde a la máxima señal que puede obtenerse con el volumen inyectado y se utiliza como valor de referencia y como medida de la dispersión de la muestra. A continuación se realizan inyecciones con el flujo inicialmente a través de R pero activando la válvula V-4 a tiempos variables después de la inyección (tiempo de desviación, t_d). Una fracción de la muestra inyectada queda retenida en R mientras que en el detector se observa un pico (o picos) debido a la fracción no retenida. Una vez que el pico desaparece y se recupera la línea base, se activa de nuevo V-4 obteniéndose un segundo pico que se debe a la fracción de muestra retenida en R. El grado de proximidad entre la altura de este pico y la altura de referencia ($F^{o_{vi}}$) se toma como medida de la eficacia del atrapamiento de la muestra en R.

Los resultados se muestran en la [Tabla I-7](#) y se han representado en la [Figura I-8](#). Como puede observarse, la máxima señal de fluorescencia aumenta con el volumen inyectado hasta alcanzar un valor prácticamente constante por encima de los 115 μL . Cada volumen de inyección presenta un intervalo de tiempo de desviación óptimo en el cual la señal es máxima. Fuera del intervalo, la señal disminuye lo que indica que, en el momento de la desviación del flujo, el centro de la zona de muestra inyectada no ha alcanzado o ha rebasado el reactor R.

La señal de fluorescencia dentro del intervalo óptimo de cada volumen de inyección coincide además con el valor de referencia respectivo. Esto indica que no existe dispersión adicional de la muestra en el reactor R durante la retención.

A la vista de los resultados puede concluirse que un volumen de inyección en torno a los 115 μL y un tiempo de desviación entre 8 y 11 s proporcionaban dispersión y retención de muestra óptimos. Todos los experimentos subsiguientes se llevaron a cabo en estas condiciones ($V_i = 115 \mu\text{L}$, $t_d = 9 \text{ s}$).

Tabla I-7. Valores de fluorescencia para diferentes volúmenes de inyección y tiempos de desviación. Muestras: 1 ppm quinina en H₂SO₄ 0,05 M. λ_{ex} = 350 nm; λ_{em} = 450 nm.

Volumen V_i (μ L)	FLUORESCENCIA, F^*										
	$F^{\circ}_{V_i}$	Tiempo de desviación, t_d (s)									
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	15
35	51	38	51	51	51	51	42				
90	104	35	58	96	103	105	105	96	80		
115	131			106	128	131	130	126	113		
185	134			101	120	129	130	134	134	135	122
245	134										

*: Media de 3 valores.

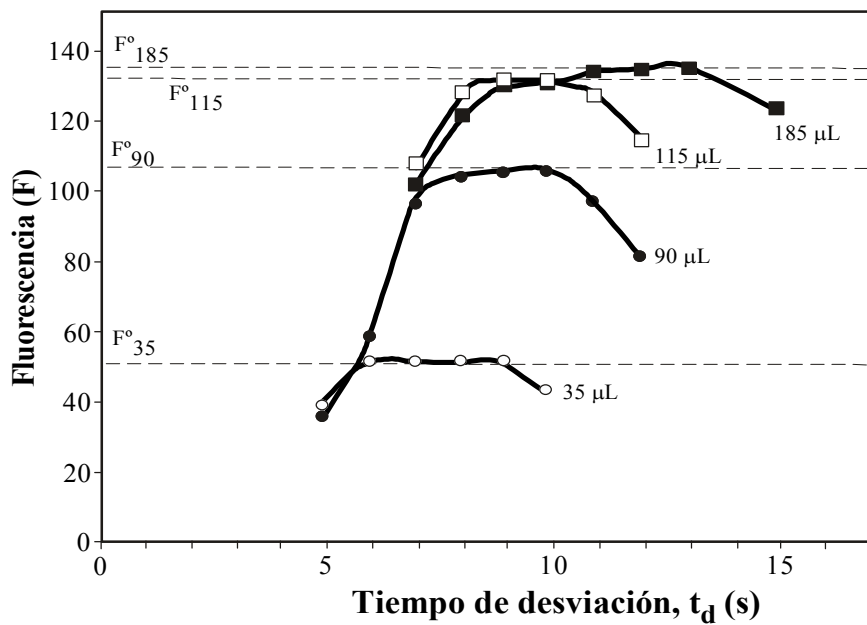


Figura I-8

Variación de la fluorescencia con el tiempo de desviación para diferentes volúmenes de inyección.

Muestras: 1 ppm quinina en H₂SO₄: 0,05 M. λ_{ex} = 350 nm; λ_{em} = 450 nm.

3.4.3. Efecto de las concentraciones de NaOH y ABA-DIA en la reacción de fondo

Para el estudio de estos efectos, en las condiciones experimentales prefijadas (Ver 3.4.1. Variables prefijadas, [pág. 45](#) y 3.4.2. Optimización del volumen de inyección y del tiempo de desviación, [pág. 47](#)) y con una temperatura de trabajo en torno a 35 °C, se realizaron series de experimentos por triplicado inyectando agua como muestra y variando la concentración de ABA-DIA entre $3,0 \times 10^{-4}$ M y $1,0 \times 10^{-2}$ M (canal C₁) y la de NaOH entre 0,28 y 2,5 M (canal C₃). En cada serie, correspondiente a concentraciones fijas de NaOH y ABA-DIA se varió el tiempo de parada entre 0 y un máximo de 300 s con intervalos de 30 s. Los valores medios de intensidad de fluorescencia relativa obtenidos se resumen en la [Tabla I-8](#).

En la [Figura I-9](#) se muestra la variación de la señal de fluorescencia con el tiempo de parada a diferentes concentraciones de NaOH y la variación de la señal con la concentración de NaOH a diferentes tiempos de parada, todo ello para una concentración $3,0 \times 10^{-3}$ M de ABA-DIA. En la [Figura I-9B](#) puede observarse que, para cualquier tiempo de parada, la señal disminuye al aumentar la concentración de NaOH alcanzando valores mínimos constantes por encima de 1 M aproximadamente. Con otras concentraciones de ABA-DIA, se obtienen gráficos similares en los que el valor de NaOH de estabilización de la señal está igualmente y en todos los casos en torno a 1 M.

En la [Figura I-10](#) se muestra el efecto de la concentración de ABA-DIA en la señal del blanco a diferentes tiempos de parada para una concentración de NaOH de 0,5 M. Gráficos similares se obtienen con otras concentraciones de NaOH. Para tiempos de reacción cortos, la señal debida a la reacción de fondo aumenta gradualmente con la concentración de ABA-DIA. Con el aumento del tiempo de reacción, la máxima señal se obtiene con concentraciones intermedias de ABA-DIA, en todos los casos en torno a 3×10^{-3} M.

Tabla I-8. Efecto de NaOH y ABA-DIA en la reacción de fondo. Valores medios de intensidad de fluorescencia a diferentes tiempos de parada y concentraciones de NaOH y ABA-DIA.

Serie	NaOH M	ABA-DIA Mx10 ³	Fluorescencia*, F(%)														
			t _p (s)	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300			
1	0,3	0,3	1	6	8	15	19	23	27								
2	0,3	1,5	2	16	30	44	58	71	83	94	99	100					
3	0,3	3	4	22	39	54	73	83	86	84							
4	0,3	6	3	21	36	49	56	58	57	54							
5	0,3	10	3	19	31	40	44	46	46	43	41						
6	0,5	0,3	0	2	3	5	7	9	12	16	21	24					
7	0,5	1,5	2	6	11	17	25	33	44	54	57						
8	0,5	3	4	9	15	22	30	39	43	43							
9	0,5	6	4	12	19	24	30	33									
10	0,5	10	6	14	20	23	25	25	23	21							
11	1,0	0,3	1	1	1	2	2	4	5	7	10	11					
12	1,0	1,5	3	3	4	5	7	10	15	22	30	40	46				
13	1,0	3	4	6	7	10	12	15	20	25	33	38					
14	1,0	6	4	5	6	8	11	17	21	30	31	31					
15	1,0	10	6	6	8	8	9	10									
16	1,5	0,3	0	1	1	2	2	3	3	5	7	9					
17	1,5	1,5	2	2	3	4	6	8	12	18	34	42					
18	1,5	3	4	5	6	7	8	10	14	18	24						
19	1,5	6	5	5	6	7	10	12	19	25	30	32					
20	1,5	10	6	6	6	7	7	8									
21	2,5	0,3	0	1	1	2	2	2	4	4	6	8	10				
22	2,5	1,5	3	3	3	4	4	6	9	12	18	24					
23	2,5	3	5	5	5	5	7	10	12	17	22						
24	2,5	6	6	6	6	6	8	10	14	19	26						
25	2,5	10	7	7	7	7	7	8	8								

*: Media de 3 valores.

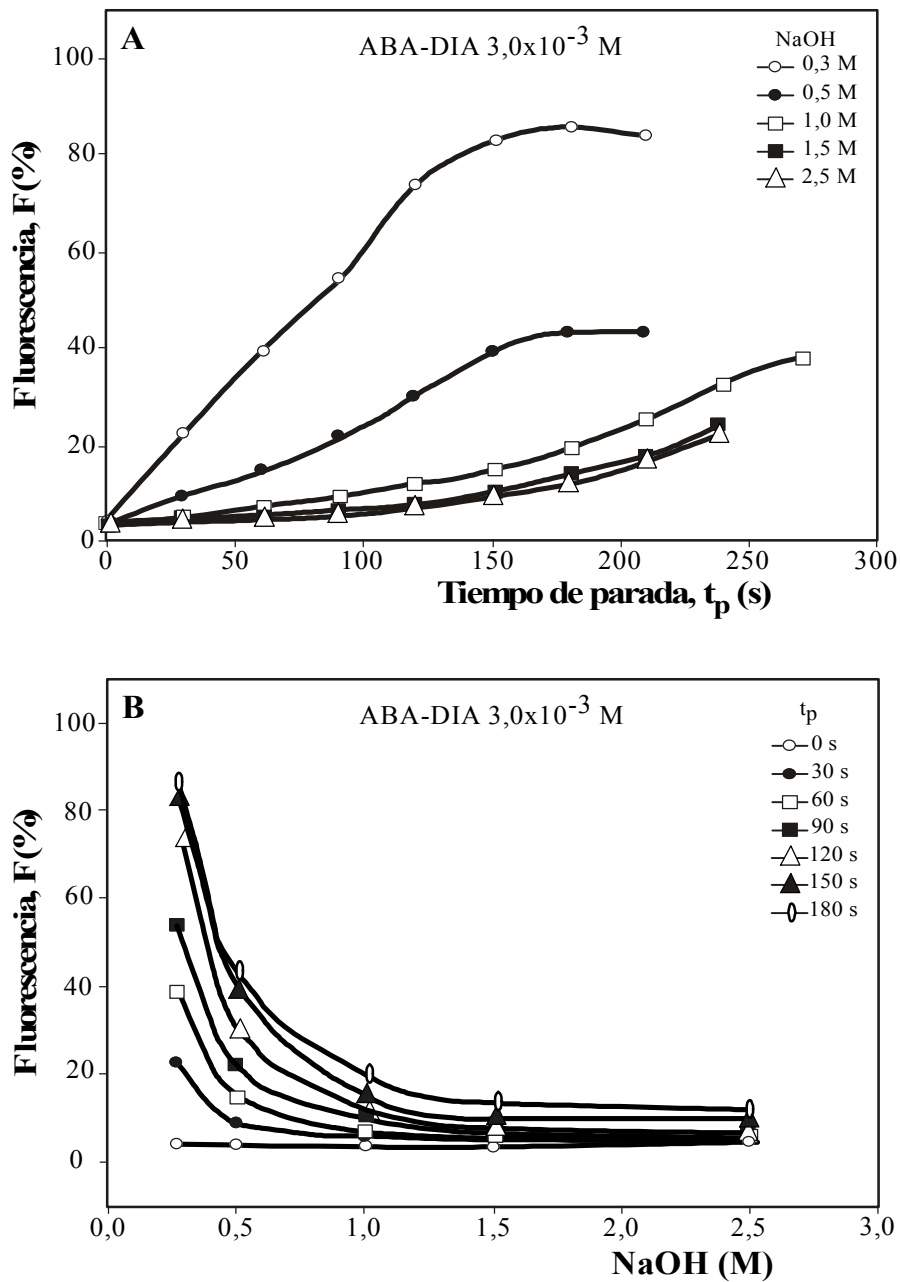


Figura I-9

Efecto de la concentración de NaOH en la reacción de fondo.

A) Variación de la fluorescencia con el tiempo de parada.

B) Variación de la fluorescencia con la concentración de NaOH.

ABA-DIA: $3,0 \times 10^{-3}$ M; Temperatura: 35 °C.

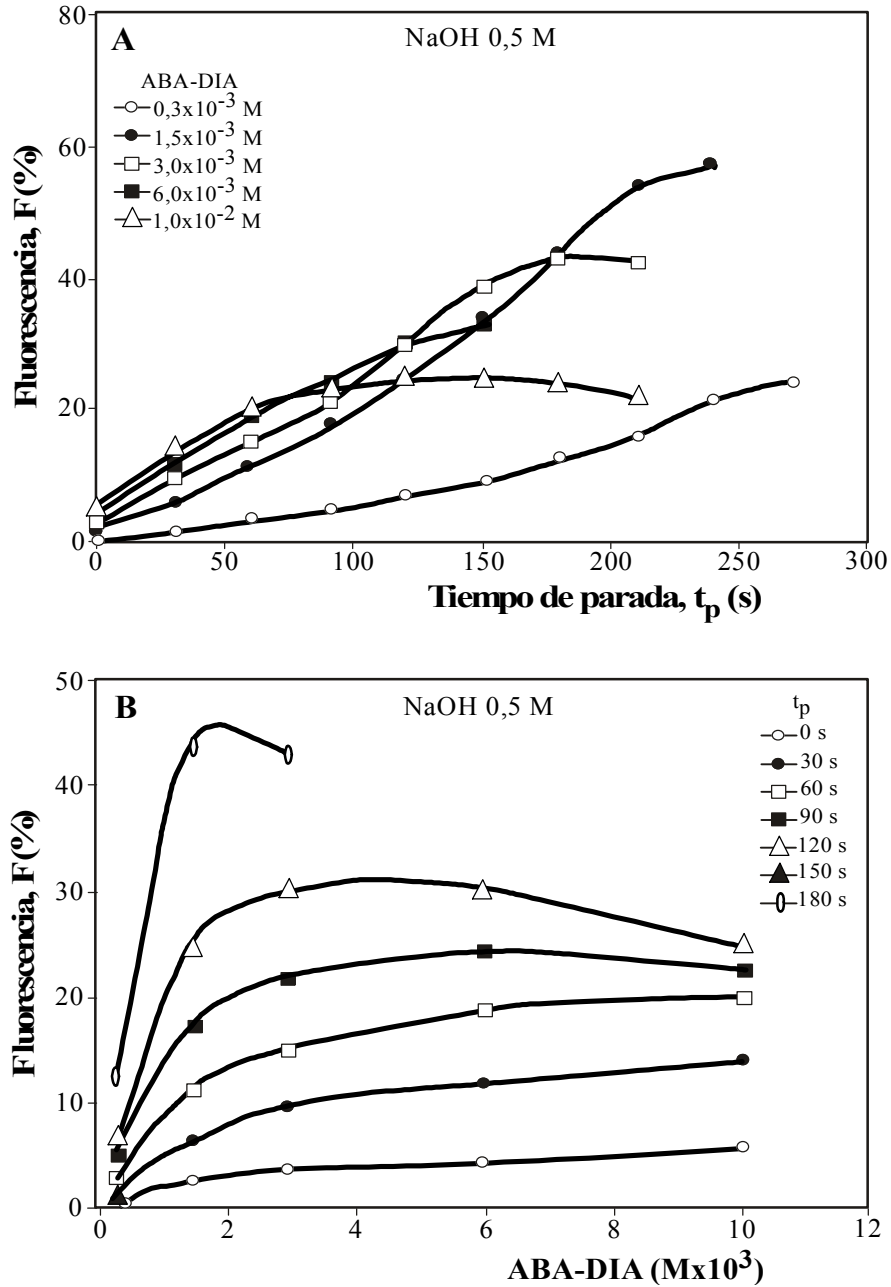


Figura I-10

Efecto de la concentración de ABA-DIA en la reacción de fondo.

A) Variación de la fluorescencia con el tiempo de parada.

B) Variación de la fluorescencia con la concentración de ABA-DIA.

NaOH: 0,5 M; Temperatura: 35 °C.

3.4.4. Efecto de las concentraciones de NaOH y ABA-DIA en la reacción ABA-DIA/ acetona

Para el estudio de estos efectos, en las condiciones experimentales prefijadas (Ver 3.4.1. Variables prefijadas, [pág. 45](#) y 3.4.2. Optimización del volumen de inyección y del tiempo de desviación, [pág. 47](#)) y con una temperatura de trabajo de 35 °C, se realizaron series de experimentos por triplicado inyectando acetona $6,0 \times 10^{-4}$ M como muestra y variando la concentración de ABA-DIA entre $3,0 \times 10^{-4}$ M y $1,0 \times 10^{-2}$ M (canal C₁) y la de NaOH entre 0,28 y 2,5 M (canal C₃). En cada serie, correspondiente a concentraciones fijas de NaOH y ABA-DIA se varió el tiempo de parada entre 30 y 150 s con intervalos de 30 s. En cada experimento se realizó un ensayo en blanco inyectando agua en vez de acetona. En la [Tabla I-9](#) se muestran Los valores medios de la señal neta de fluorescencia ($\Delta F = F_{\text{acetona}} - F_{\text{blanco}}$) obtenidos.

En la [Figuras I-11A y B](#) se muestra la variación de la señal neta con el tiempo para diferentes concentraciones de NaOH y el efecto de la concentración de NaOH en la señal neta obtenida a diferentes tiempos de parada con una concentración $1,5 \times 10^{-3}$ M de ABA-DIA. Según se desprende de la [Figura I-11B](#), para cualquier tiempo de reacción, el aumento de la concentración de NaOH conduce inicialmente a una mayor señal pero ésta disminuye de nuevo con concentraciones de NaOH elevadas. Este comportamiento es claramente diferente al observado para la reacción de fondo ([Figura I-10B](#), [pág. 53](#)). En los experimentos representados, la máxima señal se obtiene con concentraciones de NaOH en torno a 0,5 M. Para otras concentraciones de ABA-DIA, los gráficos son similares y la máxima señal se obtiene en todos los casos con concentraciones de NaOH entre 0,5 y 1 M.

El efecto de la concentración de ABA-DIA en la señal neta de acetona obtenida a diferentes tiempos de reacción se muestra en las [Figuras I-12A y B](#) para una concentración de NaOH de 0,5 M. En la [Figura I-12B](#) se observa que, cualquiera que sea el tiempo de reacción, la máxima señal neta se obtiene a concentraciones de ABA-DIA intermedias, en torno a 2×10^{-3} M. Con otras concentraciones de NaOH los gráficos son similares y, en todos los casos, la máxima señal se obtiene con concentraciones entre 2×10^{-3} y 6×10^{-3} M de ABA-

DIA. Con tiempos de parada largos y concentraciones de ABA-DIA elevadas, la señal neta de acetona puede tomar valores negativos, indicando éstos que la intensidad de fluorescencia registrada en presencia de acetona es menor que la medida cuando existe únicamente a la reacción de fondo. Este efecto se observó sólo para concentraciones de NaOH inferiores a 1 M.

Tabla I-9. Efecto de NaOH y ABA-DIA en la reacción ABA-DIA/acetona. Valores medios de la señal neta de fluorescencia para acetona $6,0 \times 10^{-4}$ M a diferentes tiempos de parada y concentraciones de NaOH y ABA-DIA.

Serie	NaOH M	ABA-DIA Mx10 ³	Fluorescencia neta* (ΔF)						
			t _p (s)	0	30	60	90	120	150
1	0,3	0,3		0	0	0	0	0	0
2	0,3	1,5		0	0	3	7	12	17
3	0,3	3		0	0	4	11	19	-7
4	0,3	6		0	0	0	-3	-12	-30
5	0,3	10		0	-3	-3	-6	-12	-28
6	0,5	0,3		0	5	11	19	32	48
7	0,5	1,5		0	12	36	62	93	104
8	0,5	3		4	15	39	64	76	27
9	0,5	6		3	8	27	42	0	-25
10	0,5	10		1	3	16	6	-10	-22
11	1,0	0,3		0	0	3	6	12	16
12	1,0	1,5		0	6	14	28	48	74
13	1,0	3		1	12	29	47	66	93
14	1,0	6		1	29	53	73	87	74
15	1,0	10		0	6	25	59	56	43
16	1,5	0,3		0	0	0	1	3	7
17	1,5	1,5		1	6	9	19	31	43
18	1,5	3		1	6	11	23	43	62
19	1,5	6		6	8	12	34	53	74
20	1,5	10		0	0	9	22	43	53
21	2,5	0,3		0	0	0	0	1	2
22	2,5	1,5		0	1	5	6	19	28
23	2,5	3		4	5	16	26	47	50
24	2,5	6		3	4	6	12	22	37
25	2,5	10		0	1	1	2	12	27

*: Media de 3 valores.

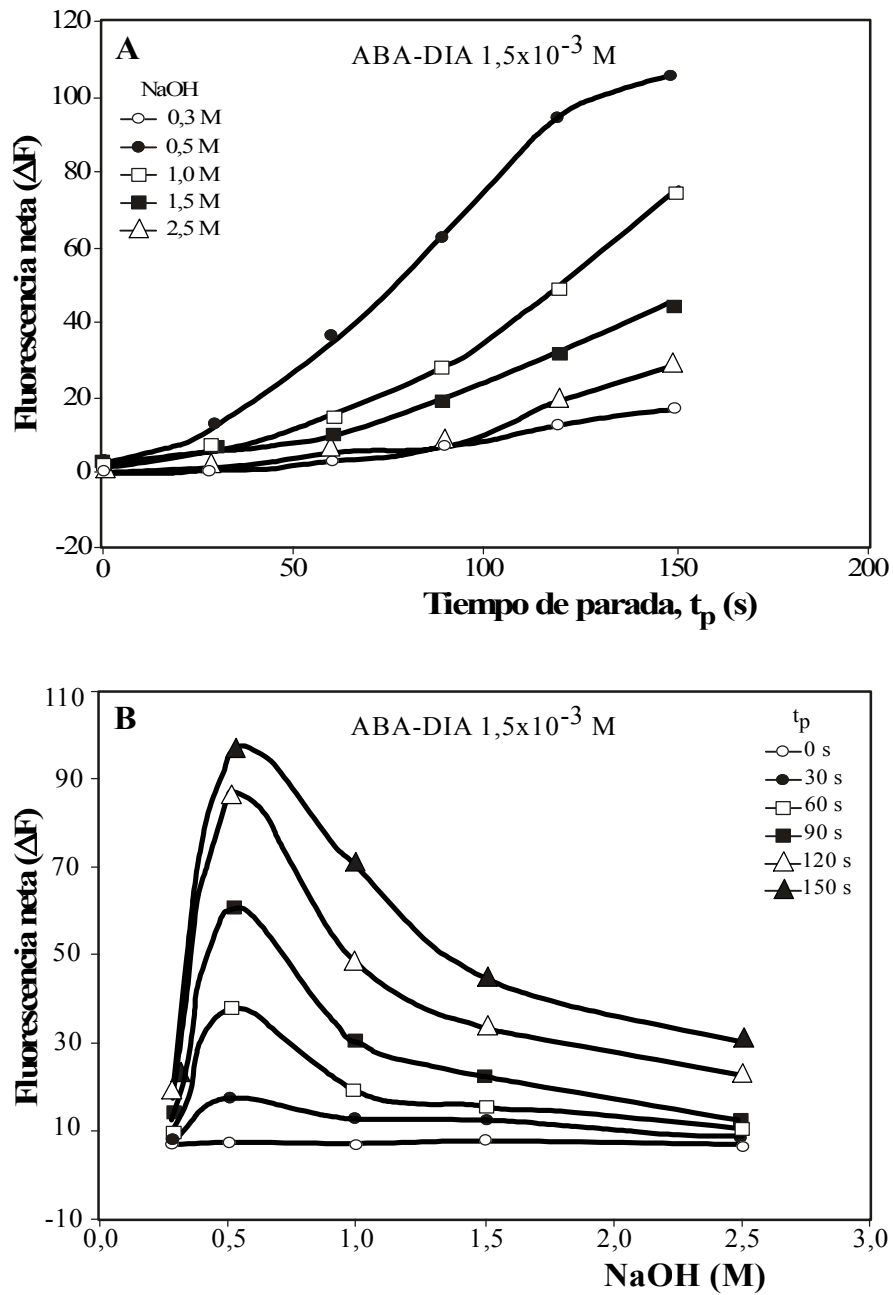


Figura I-11

Efecto de la concentración de NaOH en la reacción ABA-DIA/acetona.

A) Variación de la fluorescencia neta con el tiempo de parada.

B) Variación de la fluorescencia neta con la concentración de NaOH.

Acetona: $6,0 \times 10^{-4}$ M; ABA-DIA: $1,5 \times 10^{-3}$ M; Temperatura: 35 °C.

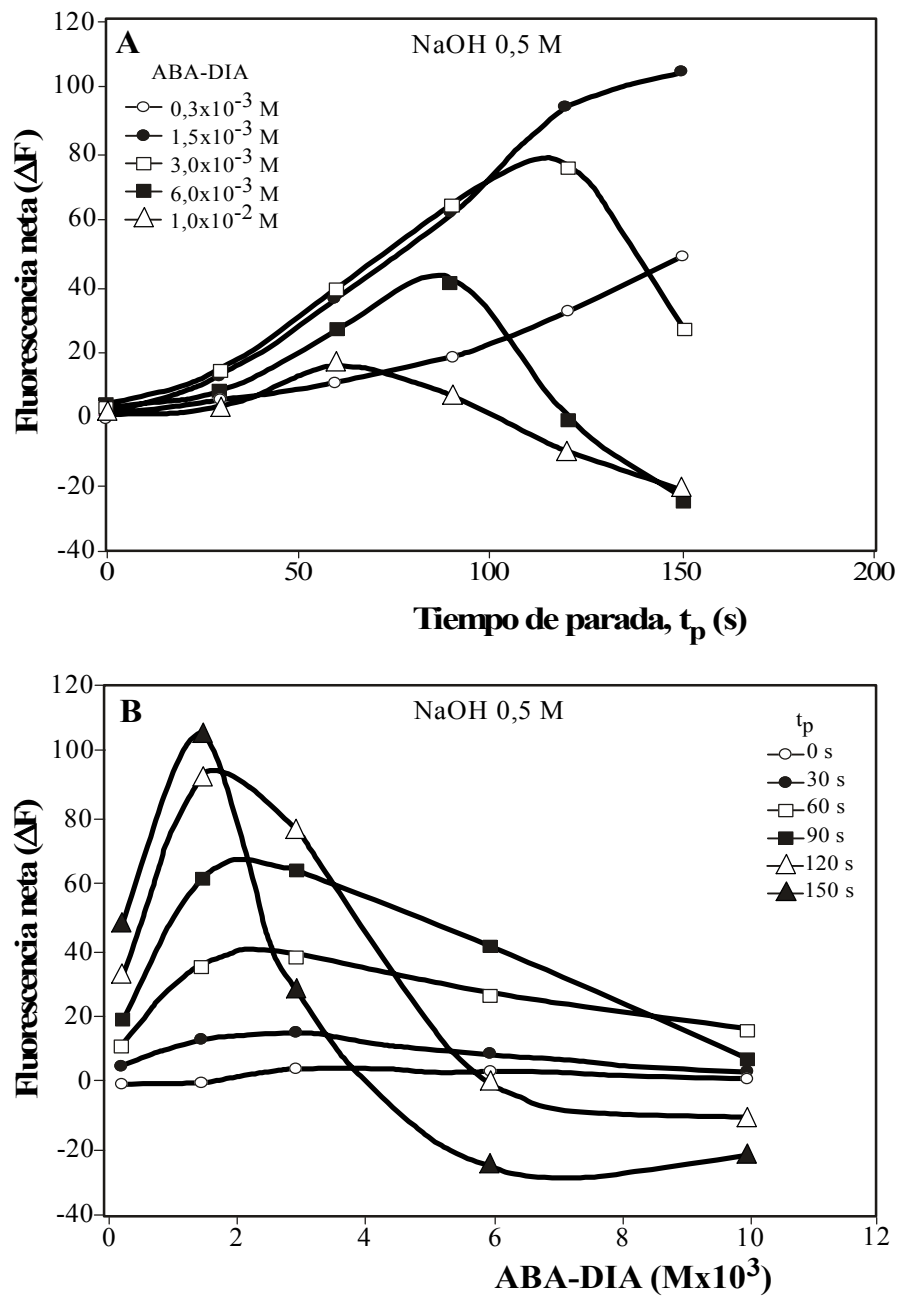


Figura I-12

Efecto de la concentración de ABA-DIA en la reacción ABA-DIA/acetona.

A) Variación de la fluorescencia neta con el tiempo de parada.

B) Variación de la fluorescencia neta con la concentración de ABA-DIA.

Acetona: $6,0 \times 10^{-4}$ M; NaOH: 0,5 M; Temperatura: 35 °C.

3.4.5. Efecto de la concentración de acetona

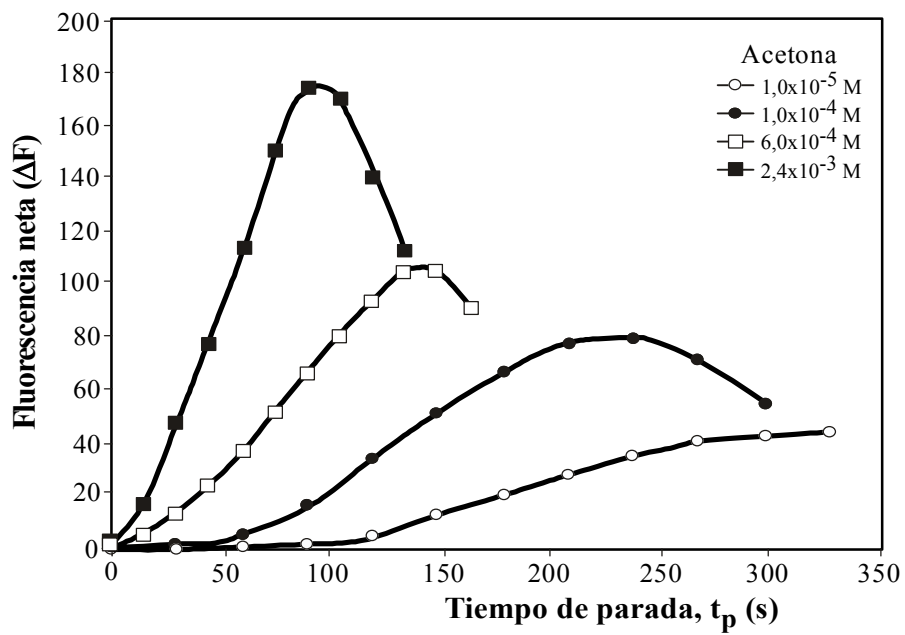
En la [Tabla I-10](#) se muestran los valores medios de las señales netas de fluorescencia obtenidas con diferentes concentraciones de acetona para concentraciones fijas de ABA-DIA ($2,0 \times 10^{-3}$ M) y NaOH (0,5 M) a 35 °C. La señal presenta un máximo frente al tiempo, según se muestra en la [Figura I-13](#). Al aumentar la concentración de acetona, el máximo es más alto, se produce a tiempos más cortos y su perfil es más estrecho.

En las condiciones experimentales correspondientes a la [Figura I-13](#), las señales son siempre positivas, cualquiera que sea la concentración de acetona o el tiempo de parada. Sin embargo, y dependiendo de la relación ABA-DIA/NaOH, la señal neta puede tomar valores negativos, especialmente en el tramo de descenso y a tiempos de parada elevados (ver apartado anterior). Cuanto mayor es esta relación, más negativos son los valores, que se alcanzan además a tiempos más cortos. Dentro de los márgenes investigados, para concentraciones de NaOH ≥ 1 M las señales son siempre positivas, para cualquier concentración de ABA-DIA.

Tabla I-10. Efecto de la concentración de acetona. Valores medios de señal neta de fluorescencia para diferentes concentraciones de acetona y tiempos de parada. ABA-DIA: $2,0 \times 10^{-3}$ M; NaOH: 0,5 M.

Tiempo de parada tp (s)	Fluorescencia neta* (ΔF)				
	Acetona $M \times 10^3$	0,01	0,1	0,6	2,4
0		0	0	0	0
15				5	17
30		0,2	2,2	13	47
45				23	77
60		0,6	6	36	114
75				51	150
90		1,7	17,2	65	173
105				80	169
120		4,5	35	93	140
135				104	112
150		12,6	52	104	
165				90	
180		20	67		
210		28	78		
240		35	80		
270		40	72		
300		43	55		
330		44			

*: Media de 3 valores.

**Figura I-13****Efecto de la concentración de acetona.**

Variación de la fluorescencia neta con la concentración de acetona y el tiempo de parada.

ABA-DIA: $2,0 \times 10^{-3}$ M; NaOH: 0,5 M; Temperatura: 35 °C.

3.4.6. Elección del tiempo de parada

Según el comportamiento descrito y a la hora de las medidas analíticas, es necesario tener en cuenta los aspectos que se indican a continuación. Por un lado, el tiempo de reacción necesario para obtener la máxima señal neta disminuye al aumentar la concentración de acetona (ver esquema de [Figura I-14](#)). Por otro, la elección del tiempo es clave para la realización de medidas a tiempo prefijado. En efecto, supóngase que quiere medirse concentraciones de acetona, C , en el intervalo $C_1 \leq C \leq C_2$. Sean t_1 y t_2 los tiempos a los que se obtiene máxima señal para las concentraciones C_1 y C_2 , respectivamente. Para una determinada concentración el tiempo de máxima señal estará en el intervalo $t_2 \leq t \leq t_1$. Para un tiempo de medida $t_m < t_2$, la señal neta de fluorescencia aumenta con la concentración de acetona. En el mismo sentido pero con $t_m > t_2$, la señal puede ser mayor, igual o menor dependiendo del t_m elegido, pudiendo incluso obtenerse valores negativos según las condiciones de ABA-DIA y NaOH. Para $t_m > t_1$, la señal neta sería siempre menor al aumentar la concentración. Resulta evidente que, para obtener proporcionalidad entre la señal neta y la concentración de acetona, el tiempo de medida debe fijarse en un valor inferior al tiempo de máxima señal de la mayor concentración de acetona a analizar.

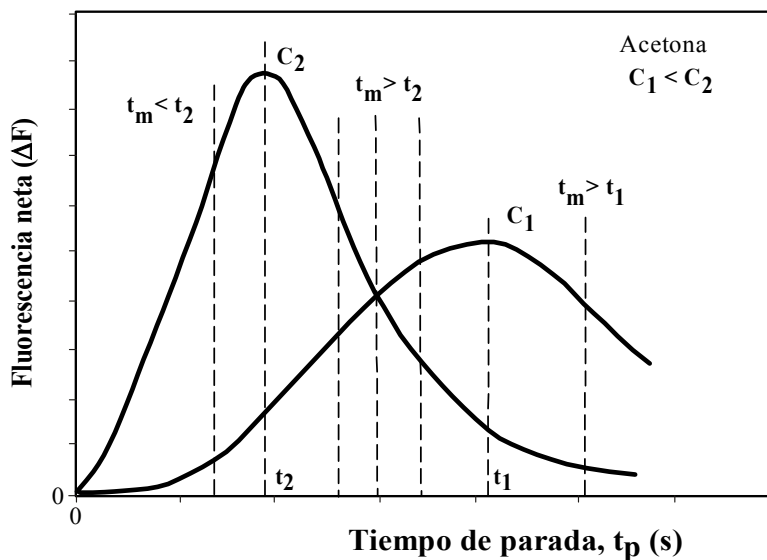


Figura I-14

Esquema para la elección del tiempo de parada.

3.4.7. Efecto de la temperatura

El efecto de esta variable se estudió en el intervalo de 25 a 40 °C, manteniendo fijas las concentraciones de ABA-DIA ($2,0 \times 10^{-3}$ M) y NaOH (0,5 M). Las demás condiciones experimentales se ajustaron a los valores prefijados ya descritos (Ver 3.4.1. Variables prefijadas, [pág. 45](#) y 3.4.2. Optimización del volumen de inyección y del tiempo de desviación, [pág. 47](#)).

Para cada temperatura se inyectaron muestras de acetona $1,0 \times 10^{-4}$ M y se varió el tiempo de parada entre 30 y 210 s con intervalos de 30 s. En cada experimento se realizó un ensayo en blanco, inyectando agua en vez de acetona.

En la [Tabla I-11](#) se recogen los valores medios de fluorescencia correspondientes a los picos registrados en los diferentes experimentos.

El efecto de la temperatura en la señal del blanco se ha representado en las [Figura I-15](#). La señal aumenta con la temperatura, siendo este efecto más acusado cuanto mayor es el tiempo de parada.

El efecto en la señal neta de acetona puede observarse en la [Figura I-16](#). Para tiempos de reacción inferiores a los 120 s, la señal aumenta con la temperatura en todo el intervalo de experimentación. Con tiempos mayores, la señal aumenta hasta los 35 °C aproximadamente y por encima de esta temperatura se produce un descenso de la señal, tanto más acusado cuanto mayor es el tiempo de reacción.

Por otro lado, en los experimentos a 40 °C se observó una pérdida importante de reproducibilidad, aparentemente asociada a la formación de pequeñas burbujas en el reactor R. Este efecto es más acusado al aumentar el tiempo de reacción. Temperaturas superiores a 35 °C y tiempos de reacción largos no son, por tanto, recomendables.

Tabla I-11. Efecto de la temperatura. Valores medios de fluorescencia para diferentes temperaturas y tiempos de parada. ABA-DIA: 2×10^{-3} M; NaOH: 0,5 M; muestras: acetona $1,0 \times 10^{-4}$ M; blanco: agua.

Temperatura °C	Muestra	Fluorescencia* (F)							
		t_p (s)	30	60	90	120	150	180	210
25	Blanco	2	2	3	4	4	5	7	
	Muestra	2	3	5	11	18	24	31	
30	Blanco	4	5	7	9	11	15	22	
	Muestra	4	6	14	25	41	57	74	
35	Blanco	7	10	14	20	33	53	80	
	Muestra	13	25	47	72	108	146	195	
40	Blanco	14	24	63	136	234	301	297	
	Muestra	15	69	166	276	295	290	287	

*: Media de 3 valores.

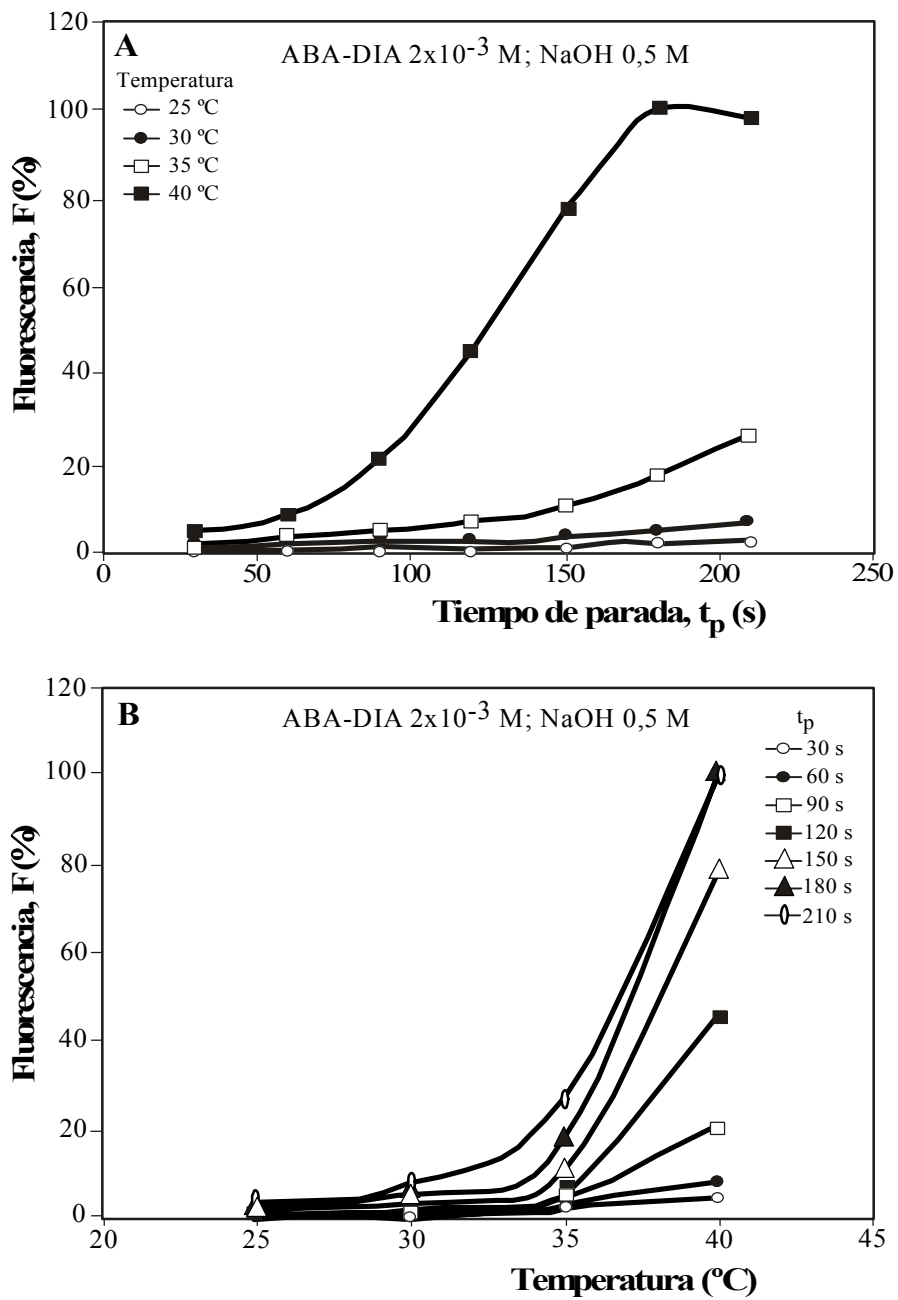


Figura I-15

Efecto de la temperatura en la reacción de fondo.

A) Variación de la fluorescencia con el tiempo de parada.

B) Variación de la fluorescencia con la temperatura.

ABA-DIA: $2,0 \times 10^{-3}$ M; NaOH: 0,5 M.

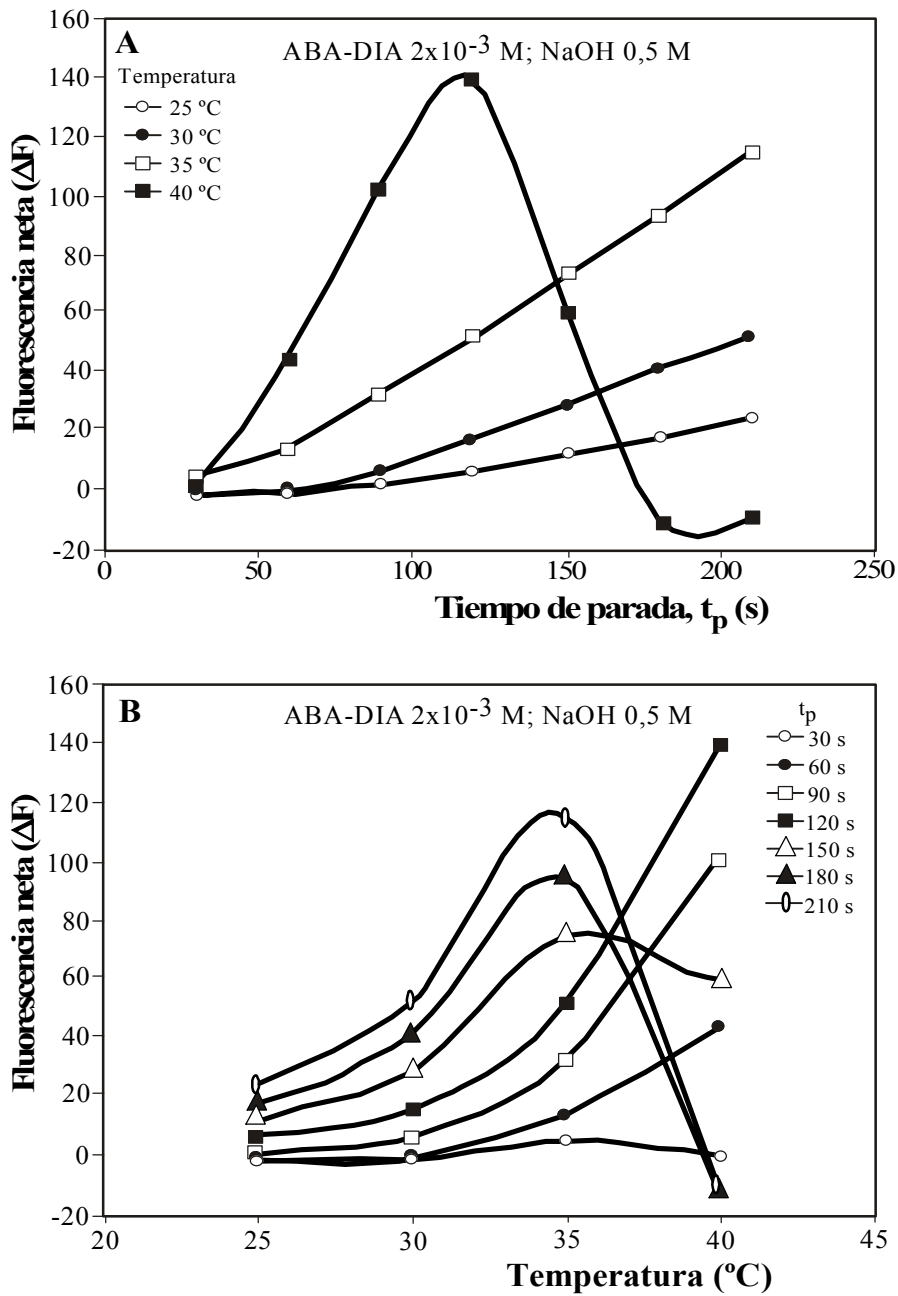


Figura I-16

Efecto de la temperatura en la reacción ABA-DIA/acetona.

A) Variación de la fluorescencia neta con el tiempo de parada.

B) Variación de la fluorescencia neta con la temperatura.

ABA-DIA: $2,0 \times 10^{-3}$ M; NaOH: 0,5 M; acetona: $1,0 \times 10^{-4}$ M.

3.5. PROCEDIMIENTO PROPUESTO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

3.5.1. Condiciones y procedimiento experimentales

Como resultado de los estudios precedentes, a continuación se resumen las condiciones experimentales y el procedimiento a seguir para la determinación de acetona.

Condiciones experimentales

En el sistema de flujo de la [Figura I-7 \(pág. 44\)](#) se proponen las siguientes condiciones de trabajo:

- Canal C₁: ABA-DIA 2,0x10⁻³ M, HCl 0,25 M, 1,00 mL min⁻¹.
- Canal C₂: agua destilada, 1,00 mL min⁻¹.
- Canal C₃: NaOH 0,5 M, 1,00 mL min⁻¹.
- Reactores de mezcla, M₁ y M₂: 25 cm x 0,5 mm d.i., tubos anudados
- Reactor de termostatación, S: 500 cm x 0,5 mm d.i., tubo helicoidal
- Reactor principal, R: 125 cm x 0,5 mm d.i., tubo anudado
- Volumen de inyección, V_i: 115 µL
- Tiempo de desviación, t_d: 9 s
- Tiempo de parada, t_p: 120 s
- Temperatura:
 - C₁ a 0°C (baño de hielo)
 - C₂, C₃, S y R a 35°C
- Detector:
 - λ_{ex} = 305 nm Δλ_{ex} = 10 nm
 - λ_{em} = 395 nm Δλ_{em} = 10 nm

Procedimiento

Inicialmente se posiciona la válvula V-4 de forma que el flujo pasa por R. Se inyecta entonces la muestra de acetona y 9 s después de la inyección, se cambia la posición de V-4. La muestra inyectada queda parada y reaccionando en R. Tras 120 s de parada se cambia V-4 a la posición inicial. El contenido del reactor origina entonces en el detector un pico cuya altura depende de la concentración de acetona en la muestra inyectada. Inyectando agua en lugar de la muestra se obtiene la señal del blanco. Se toma como parámetro analítico la diferencia de altura (ΔF) entre los picos de las muestras y el del blanco. Tras el registro de cada pico, y una vez recuperada la línea base, el sistema queda listo para una nueva inyección.

3.5.2. Características analíticas

Las principales características se resumen en la [Tabla I-12](#). El procedimiento propuesto permite la detección de concentraciones de acetona superiores a 8×10^{-7} M con un margen lineal de cuantificación entre $1,0 \times 10^{-6}$ y $2,0 \times 10^{-4}$ M ([Tabla I-13](#), [Figura I-17](#)). Se considera como límite de detección la concentración inyectada que origina una señal neta igual a 3 veces la desviación estándar del blanco. La señal neta para acetona $1,0 \times 10^{-5}$ M presenta una desviación estándar relativa del 2,7% ($n = 10$). La frecuencia media de muestreo está en torno a las 24 inyecciones h^{-1} . Las características descritas podrían ser modificadas dependiendo de los requerimientos analíticos. Así, por ejemplo, un aumento del tiempo de parada llevaría a un procedimiento más lento, más sensible y con un intervalo lineal de aplicación desplazado hacia concentraciones más bajas debido a la limitación en la concentración máxima analizable.

Tabla I-12. Procedimiento propuesto. Características analíticas.

Característica	Valor
Límite de detección, M	8×10^{-7}
Margen lineal de aplicación, M	$1,0 \times 10^{-6} - 2,0 \times 10^{-4}$ $\Delta F = (4,70 \pm 0,04) 10^5 [\text{acetona}] + (0,4 \pm 0,4)$; $R^2 = 0,9995$; $n = 9$
Desviación estándar relativa, % (Acetona $1,0 \times 10^{-5}$; $n = 10$)	2,7
Frecuencia de inyección, h^{-1}	24

Tabla I-13. Procedimiento propuesto. Valores de fluorescencia neta para diferentes concentraciones de acetona.

Acetona, M	Fluorescencia neta (ΔF^*)
$1,0 \times 10^{-6}$	1,9
$5,0 \times 10^{-6}$	3,5
$1,0 \times 10^{-5}$	5,0
$2,5 \times 10^{-5}$	11,3
$5,0 \times 10^{-5}$	22,6
$8,0 \times 10^{-5}$	38,0
$1,0 \times 10^{-4}$	47,0
$1,5 \times 10^{-4}$	71,7
$2,0 \times 10^{-4}$	94,4

* : Media de 3 valores.

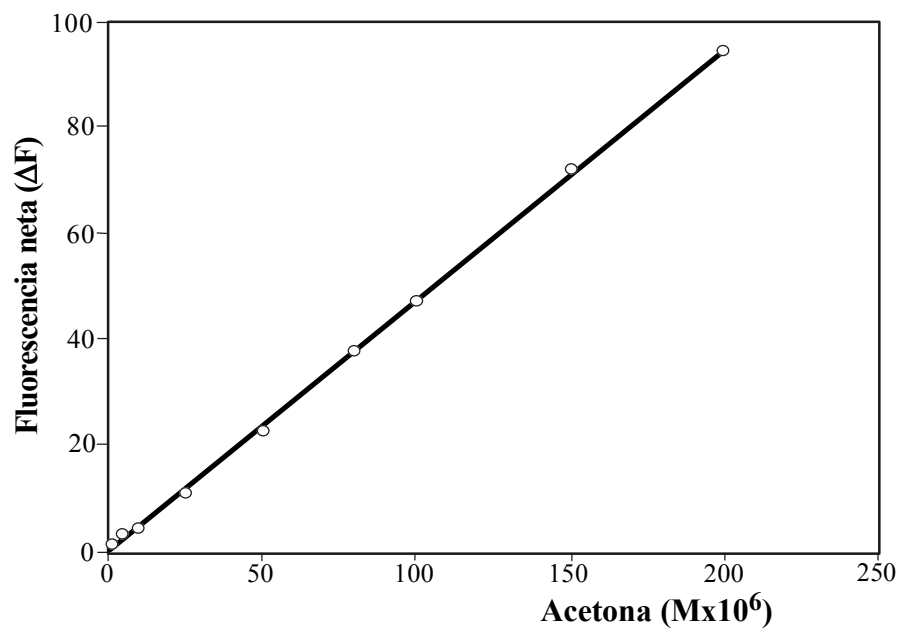


Figura I-17

Procedimiento propuesto. Recta de calibrado.

3.5.3. Interferencias

Para el estudio de interferencias se han considerado dos posibles efectos. Por un lado se ha investigado la capacidad de otras sustancias para originar una señal neta en las condiciones experimentales propuestas. Para ello se inyectaron disoluciones de concentración variable conteniendo únicamente la potencial interferencia y, operando según el procedimiento propuesto, se comparó la señal obtenida con la del blanco. En la [Tabla I-14](#) se resumen las sustancias investigadas y su nivel de interferencia.

Por otro lado, se ha investigado también la posible interferencia de sustancias capaces de reaccionar con acetona en las condiciones experimentales propuestas. El estudio se llevó a cabo comparando las señales correspondientes a la inyección de muestras conteniendo sólo acetona $5,0 \times 10^{-5}$ M o la misma concentración de acetona junto con concentraciones variables de la especie investigada. No se ha encontrado ninguna sustancia con este efecto interferente.

Tabla I-14. Procedimiento propuesto. Interferencias.

Sustancia	Nivel de interferencia, M
Acetaldehído	$\geq 7 \times 10^{-6}$
Acetato	$\geq 2 \times 10^{-2}$
Acetoacetato	$\geq 7 \times 10^{-6}$
Amoniaco	$\geq 3 \times 10^{-3}$
Etanol	$\geq 2 \times 10^{-2}$
Fenol	$\geq 7 \times 10^{-7}$
Formaldehído	$\geq 2 \times 10^{-3}$
Hidracina	$\geq 5 \times 10^{-7}$
Metanol	$\geq 5 \times 10^{-2}$
Sulfito	$\geq 3 \times 10^{-5}$
Sulfuro	$\geq 3 \times 10^{-6}$

3.6. MECANISMO DE REACCIÓN

A la vista de las características espectroscópicas descritas en los ensayos preliminares y del comportamiento observado en el estudio de variables, se propone para las reacciones de fondo (ABA-DIA en medio alcalino) y ABA-DIA con acetona los mecanismos que se muestran en las [Figura I-18](#) y [Figura I-19](#), respectivamente.

En cuanto a la reacción de fondo, el ABA-DIA experimentaría en medio básico el ataque nucleófilico de los iones hidroxilo originando el correspondiente ácido diazoico (**I_B**) y posteriormente diazoato (**II_B**). Éste existe en las formas isómeras *sin* (cis) y *anti* (trans). La forma *sin* se origina en disoluciones débilmente alcalinas ([103](#)) y es inestable, evolucionando lentamente al isómero *anti*. El cambio se acelera en medio fuertemente alcalino. La forma *anti* puede condensarse con otra molécula de ABA-DIA y está en equilibrio con un diazoóxido (**III_B**) ([104](#)). El intermedio fluorescente de esta reacción sería el *sin*-diazoato mientras que la forma *anti* sería no fluorescente o menos fluorescente que la forma *sin*. El diazoóxido final sería no fluorescente. La lenta transformación de **II_B-sin** en **II_B-anti**, favorecida por el medio fuertemente alcalino, explicaría el descenso de fluorescencia observado al aumentar la concentración de NaOH (ver [Figura I-9](#), [pág. 52](#)) y también el hecho de que este descenso sea más acusado con el tiempo.

Los compuestos **II_B-anti** y/o **III_B** serían coloreados. Esto explicaría la aparición e intensificación del color amarillo-naranja que se observa al alcalinizar una disolución ácida de ABA-DIA.

Por otra parte, la formación de **III_B** estaría favorecida al aumentar la concentración de ABA-DIA, algo que coincide con el comportamiento observado (ver [Figura I-10](#), [pág. 53](#)). Para una concentración fija de NaOH, la máxima fluorescencia se obtiene con concentraciones intermedias de ABA-DIA. Además, en la evolución con el tiempo, el descenso de fluorescencia se inicia a tiempos tanto más cortos cuanto mayor es la concentración de ABA-DIA, lo que apunta claramente a la formación del diazoóxido no fluorescente.

En cuanto a la reacción de ABA-DIA con acetona, el mecanismo propuesto se basa en el sugerido por RAHIM y BASHIR ([1](#)). Se trataría de una reacción similar a la reacción de fondo,

sustituyendo el hidroxilo por acetona como especie nucleofila. La acetona es un ácido débil ($pK_a \approx 20$) y en medio fuertemente alcalino está en equilibrio con su correspondiente carbanión, nucleófilo que reaccionaría con ABA-DIA para dar el compuesto **I**, de estructura parecida a la de **I_B**. En exceso de OH^- se formaría el compuesto **II** y éste se condensaría con otra molécula de ABA-DIA para dar el compuesto final coloreado, **III**, propuesto en (1). Considerando una reacción similar a la del fondo, puede suponerse para **II** el mismo comportamiento que para **II_B**. Existiría un isómero **II-sin**, fluorescente pero inestable que se transformaría lentamente en el **II-anti** en medio fuertemente alcalino. Este isómero sería no fluorescente, o menos fluorescente que el **II-sin** y estaría en equilibrio con **III**, coloreado pero no fluorescente.

Los efectos de NaOH y de ABA-DIA en la señal neta de acetona ([Figura I-11](#) y [Figura I-12](#), pág. [56-57](#)) respaldan estos supuestos. En ambos casos se observa máxima señal para valores intermedios de NaOH y de ABA-DIA. Al aumentar la concentración de OH^- , aumentaría también la forma básica de la acetona y por tanto la reacción y la formación de **II-sin**, pero en el mismo sentido se favorecería la formación del isómero **II-anti**, no (o menos) fluorescente. El efecto global se explicaría por la superposición de ambos efectos contrapuestos. De forma similar, el aumento de la concentración de ABA-DIA favorecería la reacción, pero también la formación de **III**. El efecto global en la señal sería igualmente el resultado de dos efectos contrarios.

Por otro lado, la analogía entre la reacción de fondo y la principal está igualmente soportada por las observaciones espectroscópicas. Los compuestos **II-sin** y **II_B-sin** tienen estructuras parecidas. Sus características fluorescentes, asociadas al núcleo aromático, deberían ser también muy similares. Esto coincide con las observaciones de los ensayos preliminares, donde se encontró que los espectros de los intermedios de la reacción de fondo y de la reacción con acetona presentan las mismas longitudes de onda de máxima excitación y emisión. La diferencia en la intensidad de fluorescencia a estas longitudes de onda y su diferente evolución con el tiempo ([Figura I-6](#), pág. [41](#)) se explicarían por el mayor carácter nucleófilo del anión de la acetona en comparación con el ión hidroxilo. En presencia de acetona, la reacción de fondo y la principal compiten entre sí, estando favorecida la segunda

que es más rápida. La fluorescencia transitoria aparece y desaparece más rápidamente que cuando sólo existe la reacción de fondo. La mayor velocidad de la reacción con acetona explica las señales netas negativas que se obtienen cuando se mide a tiempos de reacción relativamente largos.

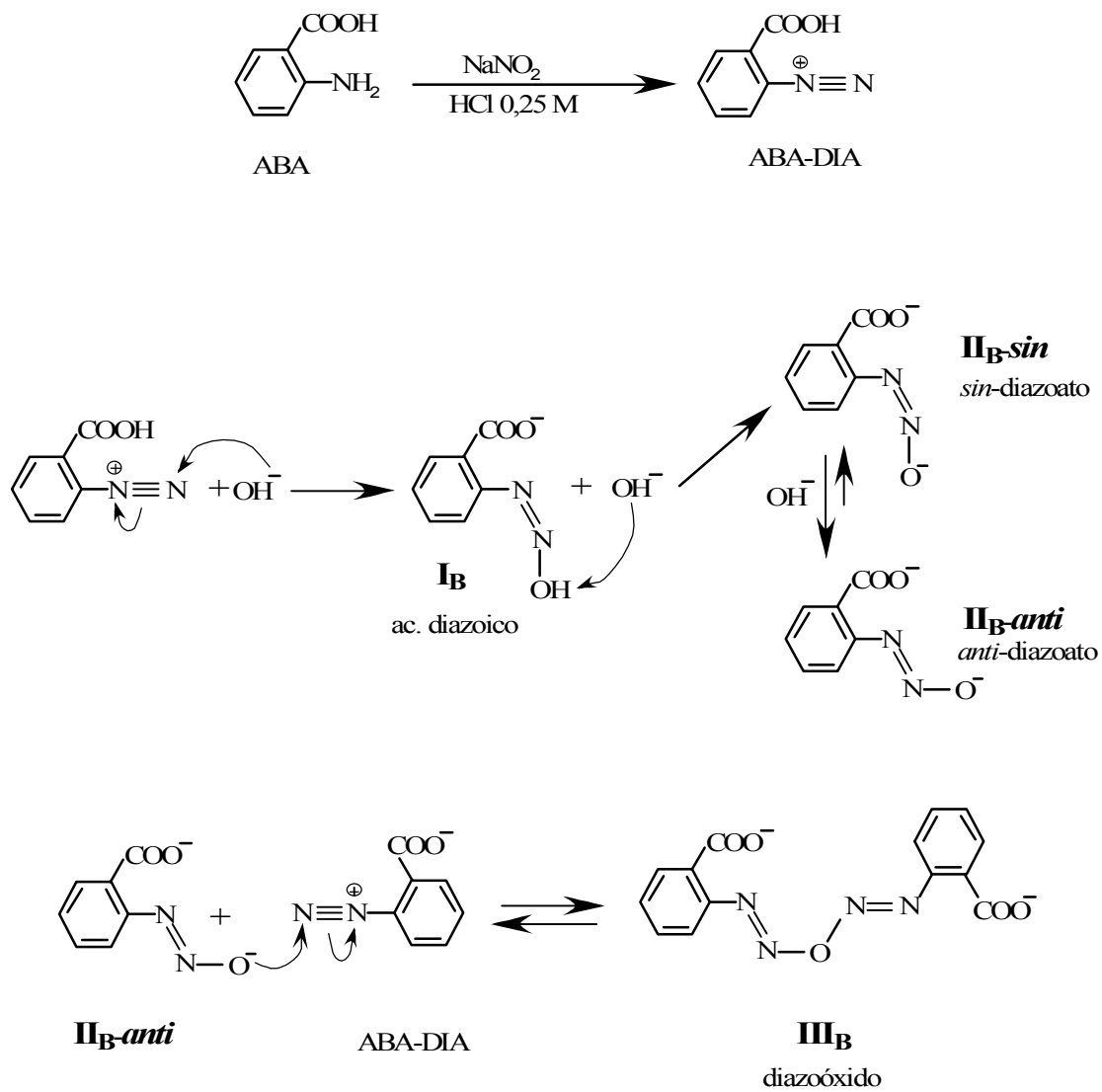


Figura I-18

Mecanismo propuesto para la reacción de fondo (ABA-DIA con OH⁻).

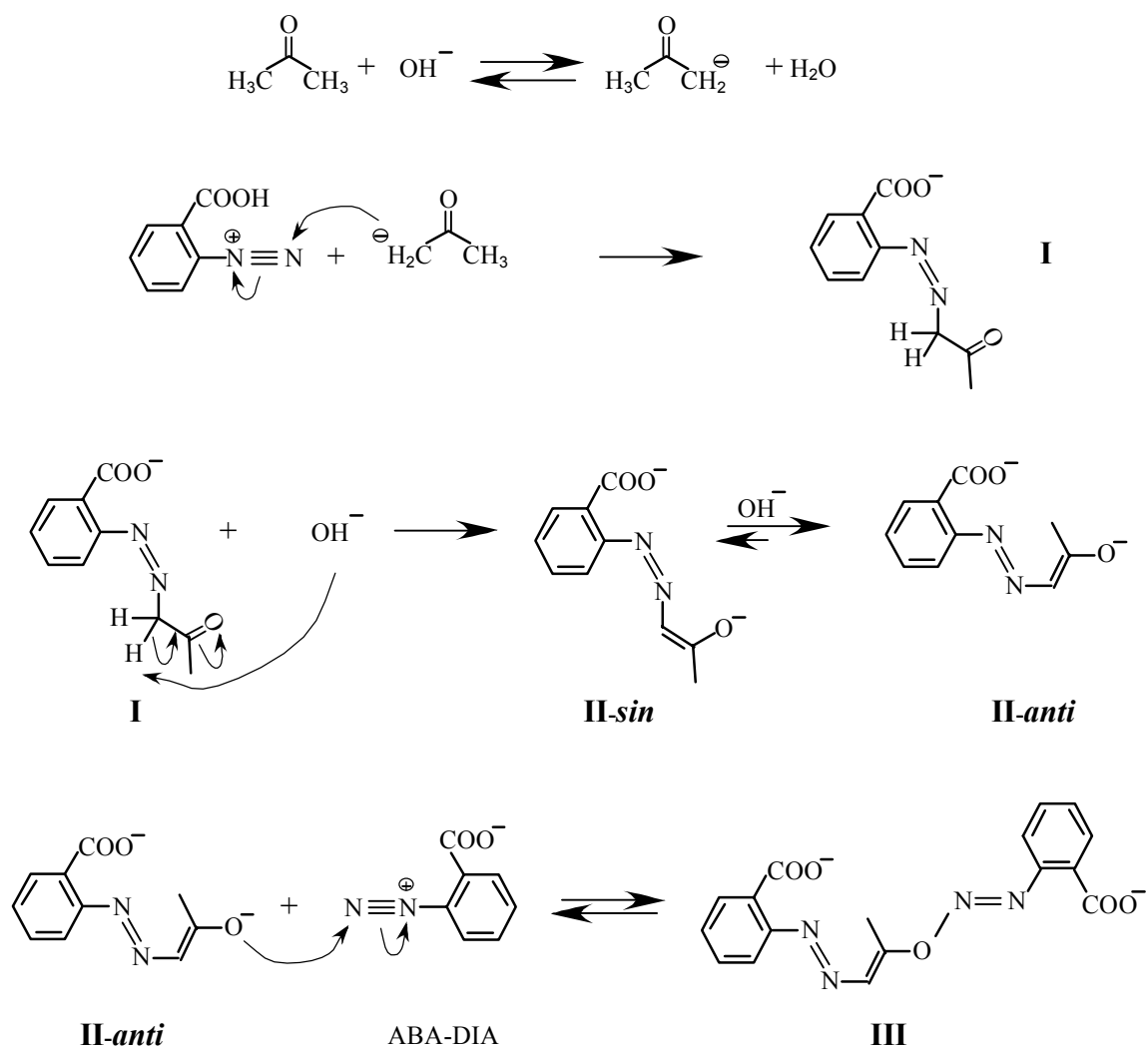


Figura I-19

Mecanismo propuesto para la reacción de ABA-DIA con acetona.

4. DETERMINACIÓN DE ACETONA EN AIRE

Para esta aplicación, se estudió y optimizó la retención del vapor de acetona del aire mediante un dispositivo de captación, tipo borboteador o 'impinger' líquido, construido en el laboratorio con elementos comerciales. Tomando como base la elevada solubilidad de la acetona en agua y estudios existentes acerca de la eliminación de acetona del aire (105) se optó por utilizar simplemente agua destilada como líquido absorbente. La concentración de acetona en las disoluciones de captación se determinó según el procedimiento descrito.

4.1. Dispositivo de captación

El esquema del borboteador construido se muestra en la [Figura I-20](#). El líquido captador se coloca en un tubo de ensayo de vidrio (20 cm x 2,5 cm diámetro externo) provisto de un tapón perforado de teflón y conducciones de entrada y salida de 1 mm de diámetro interno también de teflón. El tubo de entrada está conectado a un filtro de disolventes A-446 con forma de cilindro hueco (3,81 cm x 1,27 cm diámetro externo), fabricado en UHMWPE (ultra-high molecular weight polyethylene) y con un tamaño de poro de 10 μm . En pruebas preliminares, al bombear aire a caudales adecuados, se observó la formación de burbujas muy pequeñas distribuidas a lo largo de toda la superficie externa del filtro, hecho que sin duda favorecía un intenso contacto entre el aire bombeado y el líquido captador.

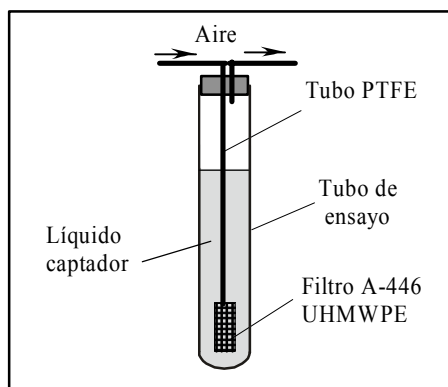


Figura I-20
Esquema del borboteador.

4.2. Muestras de aire

Las muestras de aire con vapor de acetona se prepararon en bolsas reutilizables Tedlar® de muestreo de gases con capacidad de 1,6 L y provistas de un septum de silicona/PTFE. Una vez llenas de aire limpio, la acetona se introducía en las bolsas mediante una jeringa de precisión a través del septum. Se prepararon muestras con diferentes contenidos de acetona inyectando un pequeño volumen (50 μ L) de acetona pura o de disoluciones de acetona en éter etílico. La utilización de disoluciones acuosas de acetona no fue posible debido a que las gotículas inyectadas se evaporaban de forma muy lenta e incompleta, quedaban adheridas a las paredes de la bolsa y hacían imposible su reutilización. Tanto la acetona pura como sus disoluciones en éter etílico se evaporaban de forma instantánea tras la inyección.

4.3. Sistema y procedimiento de trabajo

El sistema para la captación de la acetona gaseosa contenida en un volumen de aire se muestra en la [Figura I-21](#). El aire se hacía pasar por el borboteador (B) mediante una bomba de succión (S) y el caudal se controlaba y regulaba con un caudalímetro provisto de regulador de flujo (C). A través del septum, las bolsas de muestra se conectaban a la entrada del borboteador mediante un tubo de teflón en el que se insertó una válvula de 3 vías (V-3). Ésta permitía alternar el flujo de aire desde el exterior a la bolsa (posición 1), del exterior al borboteador (posición 2) o de la bolsa al borboteador (posición 3).

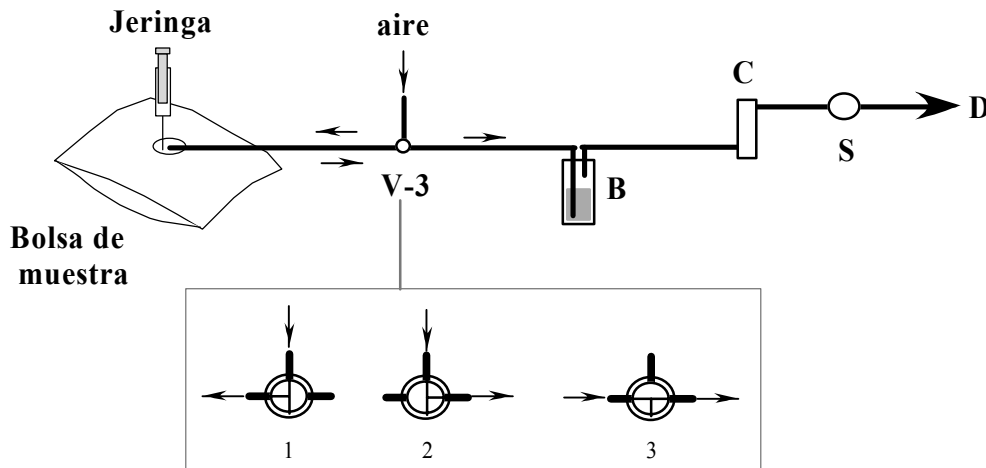


Figura I-21

Sistema de trabajo.

V-3: válvula de 3-vías; B: borboteador; C: caudalímetro; S: bomba de succión; D: desecho.

Con V-3 en la posición 1 se introducía el aire en la bolsa de muestra mediante una bomba neumática manual. A continuación, con V-3 en la posición 2, se inyectaba la acetona en la bolsa a la vez que, de forma independiente, se establecía y ajustaba el flujo de aire a través del borboteador. Al pasar V-3 a la posición 3, el contenido de la bolsa era arrastrado al borboteador. Una vez vaciada la bolsa, se detenía el flujo o se pasaba V-3 a la posición 2. Mediante el procedimiento propuesto, se medía la concentración de acetona en el líquido del borboteador, previa dilución con agua en caso necesario.

Con el montaje descrito se estudió la eficacia de la captación para muestras de aire con diferentes contenidos de acetona y a diferentes caudales de aire. Previamente, y considerando que el borboteo prolongado podía liberar la acetona captada, se estudió la estabilidad de las disoluciones acuosas de acetona frente al período y caudal de borboteo. Los experimentos llevaron a proponer las condiciones más adecuadas para la captación de acetona.

4.4. Estabilidad de las disoluciones acuosas de acetona frente al borboteo

Para este estudio se utilizó el montaje de la [Figura I-21](#), manteniendo V-3 en la posición 2. En el borboteador se colocaron alícuotas de 50mL de disoluciones patrón $5,4 \times 10^{-5}$ M o $1,4 \times 10^{-2}$ M de acetona y se borbotearon de forma independiente con diferentes caudales de aire y durante períodos de tiempo variables. En cada alícuota se midió la concentración de acetona remanente al cabo del período de borboteo y se comparó con su valor inicial. Los porcentajes de acetona remanente ([Tabla I-15](#)) están representados en la [Figura I-22](#). En ésta se observa una pérdida gradual de acetona al aumentar el tiempo de borboteo, siendo la pérdida más acusada a caudales más altos. En la figura puede observarse también que para cada tiempo y caudal de borboteo, la disminución relativa de acetona es independiente de la concentración inicial. Los resultados indican que, aunque hay una reducción gradual y esperable en la concentración de acetona, las soluciones son relativamente estables: así, por ejemplo, es necesario bombear durante períodos de tiempo de 35 – 40 min a un caudal de $0,15 \text{ L min}^{-1}$ o durante 10 – 15 min a $0,30 \text{ L min}^{-1}$ para que la pérdida de acetona sea significativa. Sin embargo, la cantidad remanente de acetona al aumentar el caudal por encima de $0,30 \text{ L min}^{-1}$ disminuye rápidamente, incluso a tiempos muy cortos.

Tabla I-15. Efecto del borboteo en la estabilidad de las disoluciones de acetona. Porcentajes de acetona remanente para diferentes periodos y caudales de borboteo.

Caudal L min ⁻¹	Acetona inicial (M)	Acetona remanente* (%)									
		Tiempo (min)	2	5	10	15	20	30	40	50	60
0,15	5,4x10 ⁻⁵	100	101	100	100	100	100	97	92	88	
	1,4x10 ⁻²	102	101	101	99	101	101	95	90	89	
0,30	5,4x10 ⁻⁵	100	100	100	97	96	87	85	80		
	1,4x10 ⁻²	101	101	100	98	96	87	85	80		
0,60	5,4x10 ⁻⁵	100	100	97	91	80	64				
	1,4x10 ⁻²	100	100	97	90	81	60				
1,20	5,4x10 ⁻⁵	100	99	87	66	56	44				
	1,4x10 ⁻²	98	99	85	68	58	44				

*: Media de 3 valores.

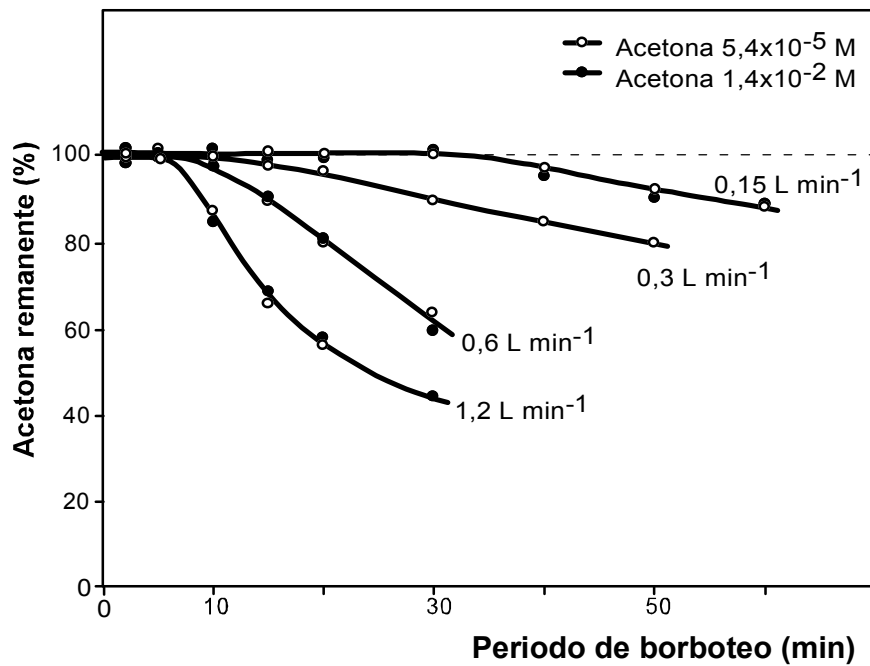


Figura I-22

Efecto del borboteo en la estabilidad de las disoluciones acuosas de acetona.
Variación del porcentaje de acetona remanente con el tiempo y caudal de borboteo.

4.5. Eficacia de la captación

En el montaje de la [Figura I-21](#) se utilizaron muestras de aire con concentraciones de acetona de 9,1, $9,1 \times 10^1$, $9,1 \times 10^2$ y $2,5 \times 10^4$ mg m⁻³ y alícuotas de 50,0 mL de agua destilada a 25 °C como líquido absorbente. Las concentraciones de acetona se obtuvieron inyectando en las bolsas de muestra 50 µL de acetona pura o de disoluciones $5,0 \times 10^{-1}$, $5,0 \times 10^{-2}$ y $5,0 \times 10^{-3}$ M de acetona en éter etílico. Con V-3 en la posición 3, el contenido de las bolsas se arrastró al borboteador con caudales de 0,15, 0,30 o 1,20 L min⁻¹ y se determinó la concentración de acetona en la disolución resultante previa dilución con agua en caso necesario. Cada experimento se realizó por triplicado. En una prueba en blanco, realizada con una muestra de aire en la que se inyectó únicamente 50 µL de éter etílico, se comprobó que las trazas de acetona especificadas en la composición del éter etílico comercial no eran detectables según el procedimiento descrito.

Por otro lado, se prepararon patrones $5,0 \times 10^{-6}$, $5,0 \times 10^{-5}$, $5,0 \times 10^{-4}$ y $1,4 \times 10^{-2}$ M de acetona en agua, correspondiendo estos valores de concentración a los que se obtendrían con las diferentes muestras de aire utilizadas, supuesta la absorción total de la acetona que contenían en los 50,0 mL de agua del borboteador.

En cada experimento se evaluó la eficacia de la captación comparando la señal de la disolución del borboteador con la de su patrón correspondiente.

En prácticamente la totalidad de los experimentos realizados, la captación de acetona fue completa. Únicamente en el experimento con las muestras de mayor contenido de acetona ($2,5 \times 10^4$ mg m⁻³) y con el caudal más elevado (1,20 L min⁻¹) la captación no fue total, recuperándose en este caso sólo el 89 % de la acetona.

Se observó mayor reproducibilidad de las medidas para caudales más bajos. Para un caudal de 0,15 L min⁻¹ y muestras de 90,6 mg m⁻³, la desviación estándar relativa (n = 10) calculada para la recuperación de acetona fue del 3,1 %.

La eficacia de la captación estaba claramente ligada al filtro A-446 UHMWPE ya que, si éste se retiraba del borboteador, la recuperación era incompleta. Así, en experimentos con muestras de 9,1 y $2,5 \times 10^4$ mg m⁻³, borboteadas con un caudal de 0,30 L min⁻¹ directamente

a través de un tubo de teflón de 0,5 mm de diámetro interno, las recuperaciones obtenidas fueron sólo del 87 y 75 %, respectivamente. La elevada eficacia en la captación podría estar relacionada con el pequeño tamaño de las burbujas originadas y con su distribución a lo largo de toda la superficie del filtro. Ambos aspectos favorecerían un contacto intenso entre el aire y el líquido absorbente, aumentando así el proceso de absorción.

4.6. Condiciones propuestas para la captación

Según los resultados de los apartados precedentes, para la captación óptima de acetona en el montaje de la [Figura I-21](#) se proponen las siguientes condiciones experimentales:

- Disolución captadora: 50,0 mL de agua destilada.
- Caudal de aire: 0,15 L min⁻¹ o inferior.
- Tiempo de borboteo: hasta 40 min.
- Temperatura de captación: temperatura ambiente (25 °C).

En estas condiciones, la captación de acetona es completa, las medidas son reproducibles, y no se producen pérdidas significativas por efecto del borboteo. Considerando el máximo período de bombeo de aire (40 min) a 0,15 L min⁻¹ y el límite de detección del procedimiento propuesto para la determinación de acetona en medio acuoso (8×10^{-7} M), la captación en las condiciones descritas permitiría la determinación de vapor de acetona en aire en concentraciones superiores a 0,4 mg m⁻³.

5. CONCLUSIONES I

El interés del trabajo realizado en el Capítulo I puede resumirse en los siguientes puntos.

- Se ha puesto de manifiesto la existencia de intermedios fluorescentes, tanto en la reacción de fondo, ABA-DIA en medio alcalino, como en la reacción principal entre ABA-DIA con acetona, para las que se propone un mecanismo basado en los resultados de los experimentos. A pesar de que los compuestos de diazonio, y particularmente los benzodiazonios, son sobradamente conocidos y utilizados, no se ha encontrado ninguna referencia previa a intermedios de reacción con propiedades fluorescentes. Dada la variada reactividad de los compuestos de diazonio, la posible existencia de intermedios fluorescentes en reacciones similares a las consideradas en este capítulo podría resultar de interés para el desarrollo de nuevos métodos analíticos o para el estudio de mecanismos de reacción.
- Se han establecido las condiciones para la detección y medida de los intermedios fluorescentes observados, su evolución con el tiempo y su dependencia de condiciones experimentales como la temperatura, concentración de ABA-DIA y grado de alcalinidad.
- Basado en la medida de los intermedios fluorescentes, se ha puesto a punto un método fluorimétrico para la detección de acetona en medio acuoso en concentraciones superiores a 8×10^{-7} M con un margen lineal de cuantificación entre $1,0 \times 10^{-6}$ y $2,0 \times 10^{-4}$ M y una frecuencia media de muestreo de 24 inyecciones h^{-1} . El propuesto es el único método fluorimétrico para la determinación de acetona en agua descrito hasta la fecha y supera notablemente las características de los escasos métodos no cromatográficos (colorimétricos) existentes al respecto, siendo de destacar la sensibilidad y la velocidad de análisis. Así, en el método de RAHIM y BASHIR (1), punto de partida de este trabajo, la determinación colorimétrica de acetona requiere del orden de 40 min por análisis, estando el límite de detección en torno a 9×10^{-6} M, y en el método colorimétrico con vainillina de AMLATHE y GUPTA (56) se necesitan 20 minutos por análisis estando el límite de detección también en torno a 9×10^{-6} M. Además, y a diferencia del método de RAHIM Y BASHIR, en el método propuesto, sustancias

como metanol, etanol y formaldehído que acompañan comúnmente a la acetona, no interfieren.

- Se ha construido un dispositivo tipo borboteador (impinger líquido) que permite la captación completa del vapor de acetona del aire por absorción en agua destilada. Se trata de un dispositivo en el que no se requieren reactivos de captación, pudiéndose determinar la acetona directamente en las disoluciones acuosas del borboteador. El dispositivo puede ser una alternativa limpia y sencilla en comparación con los muestreadores habituales en los que la acetona es captada por derivatización, recuperándose los derivados con disolventes orgánicos para su posterior análisis por métodos cromatográficos. El dispositivo se ajustaría a la nueva tendencia tecnológica en el sector del medio ambiente, descrita por la Fundación Observatorio de Prospectiva Tecnológica Industrial (OPTI Medio Ambiente) que insta a la utilización de productos menos contaminantes ([106](#)).
- El método y el borboteador propuestos se han aplicado a la determinación de acetona en muestras de aire preparadas. Con las condiciones de trabajo propuestas, se podrían determinar concentraciones superiores a $0,4 \text{ mg m}^{-3}$, lo que permitiría la aplicación a muestras de aire de ambientes de interior, en los que la concentración de acetona está regulada por encima de 30 mg m^{-3} ([2,10](#)).

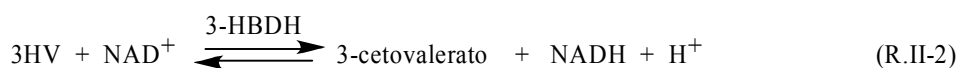
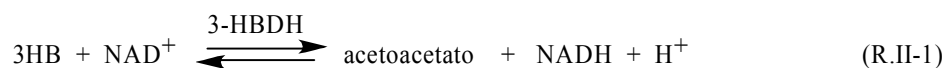
CAPÍTULO II

Determinación de 3-hidroxibutirato y/o 3-hidroxivalerato

1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO

La finalidad de los trabajos descritos en este capítulo es el establecimiento de un método enzimático que permita la determinación individual y/o simultánea de (R)-3- hidroxibutirato (3HB) y (R)-3-hidroxivalerato (3HV) y su aplicación al análisis de degradados de biopolímeros polihidroxialcanoatos.

La base del método es la diferente velocidad de las reacciones de estos compuestos con la coenzima NAD^+ , reacciones que están catalizadas por la enzima (R)-3-hidroxibutirato deshidrogenasa (3-HBDH):



La acción catalítica de 3-HBDH es altamente selectiva, pero no específica, para el isómero R del 3HB. El isómero S no reacciona, pero otros (R)-3-hidroxiácidos, sí lo hacen aunque su velocidad de reacción es menor. Éste es el caso del ácido (R)-3-hidroxivalérico ((R)-3-hidroxipentanoico). La concentración de NADH total producida por las reacciones [\(R.II-1\)](#) y [\(R.II-2\)](#) se mide bajo dos condiciones cinéticas (sin alcanzar el equilibrio) diferentes y las concentraciones de 3HB y 3HV se calculan a partir de estas medidas por métodos estadísticos. La elevada reproducibilidad de las medidas necesaria para el análisis cinético se obtiene efectuando el proceso en un sistema con inyección en flujo con doble detección y 3-HBDH inmovilizada en reactores enzimáticos de tipo empaquetado.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. BIOPOLÍMEROS: CONCEPTO, TIPOS Y APLICACIONES

Los *polímeros* son macromoléculas, generalmente orgánicas, formadas por la unión de moléculas más pequeñas llamadas monómeros que pueden ser iguales (homopolímeros) o diferentes (copolímeros o heteropolímeros).

Atendiendo a su origen, los polímeros pueden ser *naturales* (los que existen en la naturaleza, como proteínas, celulosa o caucho), *sintéticos* (se fabrican a partir de monómeros; nylon, poli-estireno o PVC son de este tipo) y *semisintéticos* (como el caucho vulcanizado o la nitrocelulosa que se obtienen por manipulación de los polímeros naturales).

Los polímeros pueden también clasificarse en función de otros criterios: el mecanismo de polimerización, la composición química, las aplicaciones o el comportamiento frente a la temperatura son algunos de ellos. Un polímero es *termoplástico* cuando al calentarlo por encima de una cierta temperatura funde pero mantiene su composición, solidificando de nuevo al enfriar. Por el contrario, un polímero *termoestable* no funde, y el aumento de la temperatura puede conducir únicamente a su descomposición química. También es interesante la clasificación en función de las aplicaciones. Según este criterio se distinguen polímeros de los siguientes tipos:

- *Elastómeros*. Son materiales de baja elasticidad y alta extensibilidad. Se deforman mucho al someterlos a un esfuerzo pero recuperan su forma inicial al eliminar el esfuerzo.
- *Plásticos*. Son polímeros que, ante un esfuerzo suficientemente intenso, se deforman irreversiblemente, no pudiendo volver a su forma original. El término *plástico* se utiliza frecuentemente de forma incorrecta para referirse a la totalidad de los polímeros.
- *Fibras*. Presentan elevada elasticidad y baja extensibilidad. Se utilizan para confeccionar tejidos.
- *Recubrimientos*. Normalmente son líquidos, que se adhieren a la superficie de otros materiales.

- *Adhesivos*. Son polímeros con alta capacidad de adhesión y cohesión, capaces de unir dos o más cuerpos por contacto superficial.

El concepto de **biopolímero**, a pesar de la muy extensa utilización de este término, es ambiguo ya que no tiene un significado concreto. La definición tradicional de biopolímeros se refiere a los encontrados en la naturaleza, concepto que se identifica con el de *polímeros naturales* según la clasificación general mencionada anteriormente. Esta definición incluiría cualquier polímero existente en el petróleo, en los vegetales, en los animales o en los microorganismos.

Otros conceptos más aceptados, entre ellos el de la Real Academia Española de la Lengua (107), consideran los biopolímeros como “*polímeros que intervienen en los procesos biológicos*”, “*macromoléculas formadas por los seres vivos*” o “*polímeros que se encuentran en o son formados por los seres vivos*”.

Sin embargo el término biopolímero se utiliza también para referirse, por ejemplo, a:

- *Polímeros sintéticos con características similares a los naturales.*
- *Polímeros formados a partir de fuentes naturales renovables.*
- *Polímeros elaborados mediante un proceso de producción no tóxico.*
- *Polímeros sintetizados a partir de materiales biológicos.*
- *Polímeros biodegradables.*
- *Polímeros compatibles con tejidos de seres vivos.*

Desde un punto de vista práctico, una de las características clave de los biopolímeros es su **degradabilidad**. En muchas aplicaciones se buscan biopolímeros que sean estables durante su procesado, almacenamiento y utilización, pero que puedan degradarse una vez desechados. La naturaleza y velocidad del proceso de degradación y los productos que se originan pueden ser determinantes de las aplicaciones potenciales de un determinado biopolímero. De forma general, la degradación se define (108,109,110) como un proceso irreversible en el que se producen cambios significativos en la apariencia del (bio)polímero, en sus propiedades mecánicas y físicas o en su estructura química, pudiendo estos cambios

medirse por ensayos normalizados. Atendiendo a la causa del proceso, la degradación puede ser principalmente: hidrolítica, fotodegradación, térmica o biodegradación.

En la *degradación hidrolítica*, las moléculas de agua rompen los enlaces del polímero. La penetración del agua dentro de la matriz provoca el inflamamiento, ruptura de puentes de hidrógeno intermoleculares, hidratación de las moléculas y finalmente la hidrólisis de los enlaces inestables. La ruptura de los grupos funcionales por hidrólisis, puede suceder tanto en los grupos situados en la cadena principal como en los sustituyentes laterales. Este tipo de degradación ocurre bajo condiciones ácidas o alcalinas.

La *fotodegradación* tiene lugar por la acción de la luz ultravioleta a una longitud de onda de 290-400 nm. Para obtener una adecuada fotodegradación, la mayoría de los polímeros necesitan ser modificados mediante la inserción de grupos funcionales sensibles a la radiación UV. Otra forma de obtener biopolímeros fotodegradables es introduciendo aditivos fotosensibles, catalizadores y peroxidantes que aceleren el proceso de degradación.

La *degradación térmica* se origina por efecto del calor y se caracteriza por la ruptura de enlaces en cadenas y radicales libres ([111,112](#)). Este tipo de degradación es de gran importancia puesto que el calor interviene de forma muy directa en el procesado de polímeros.

El término **biodegradación** hace referencia a la transformación y deterioro que se produce en el polímero debido a la acción de enzimas, normalmente asociadas a microorganismos como bacterias, hongos y algas ([110](#)). La biodegradación puede ser parcial o total. La parcial consiste en la alteración en la estructura química del material y la pérdida de propiedades específicas. En la biodegradación total, el material es degradado completamente originándose CO₂ (condiciones aeróbicas), metano (condiciones anaeróbicas), agua, sales minerales y biomasa ([113](#)). La biodegradación tiene lugar en dos pasos. El primero consiste en la fragmentación de los polímeros en especies de bajo peso molecular por medio de reacciones abióticas (oxidación, fotodegradación o hidrólisis) o bióticas (enzimáticas). El segundo paso es la bioasimilación de los fragmentos de los polímeros por los microorganismos para su mineralización. La biodegradabilidad no sólo

depende del origen del biopolímero sino también de su estructura química y de las condiciones de degradación (114).

Atendiendo a su biodegradabilidad y al carácter de renovable o no de la materia prima de la que proceden, los biopolímeros pueden clasificarse en tres categorías:

- Biopolímeros biodegradables de materias primas renovables (MPR).
- Biopolímeros no biodegradables de MPR.
- Biopolímeros biodegradables de materias primas no renovables.

La categoría de mayor importancia es la primera. A estos biopolímeros biodegradables procedentes de MPR se hace referencia cuando se habla de “bioplásticos” en general. En función de su origen, los productos de este grupo pueden subclasificarse en las cuatro categorías siguientes (115), de las cuales se indican algunos ejemplos representativos:

- Biopolímeros MPR biodegradables de origen microbiano (ácido poliláctico (PLA), polihidroxicanoatos (PHAs), ácidos grasos polihidroxicos).
- Biopolímeros MPR biodegradables de origen vegetal (derivados de almidón, celulosa, lignina o pectina).
- Biopolímeros MPR biodegradables de origen animal (colágeno/gelatina, quitina/quitosan).
- Biopolímeros biodegradables de origen fósil (poliésteres; polivinilalcohol (PVA); policaprolactona (PCL); ácido poliglicólico (PGA)).

La utilización de biopolímeros biodegradables, particularmente la de los biopolímeros MPR, tiene en la actualidad un interés extraordinario. Sus aplicaciones más frecuentes son la elaboración de **plásticos ecológicos** y de **productos biomédicos** aunque existen otras muy específicas y de momento limitadas debido al alto coste de producción de estos polímeros.

El uso de plásticos convencionales, obtenidos a partir de derivados del petróleo, ha crecido rápidamente durante las últimas décadas, consumiéndose cerca de 150 millones de

toneladas de materiales plásticos en todo el mundo. La degradación de estos plásticos es lenta pudiendo persistir en el ambiente durante una media de 100 años y creando así un grave problema de contaminación. Una solución parcial a este problema es la eliminación de los plásticos, generalmente por incineración, o su reciclado. La incineración es costosa y puede generar subproductos tóxicos mientras que el reciclado es, en muchos casos, caro o técnicamente inviable. En este contexto, la sustitución de los plásticos tradicionales por biopolímeros totalmente degradables obtenidos además a partir de fuentes de carbono renovables se presenta como una alternativa prometedora para el futuro ([113,116](#)). Algunos campos y aplicaciones de estos plásticos ecológicos son los siguientes ([114](#)):

- Alimentación: envoltorios, embalajes, envases, cubiertos, vasos, bandejas, bolsas.
- Agricultura: tuberías de riego, redes, invernaderos, macetas.
- Automóvil: armazones, soportes de revestimientos, pantallas solares.
- Cosmética e higiene: envases, pañales, productos de higiene femenina.
- Construcción: barandillas, herramientas, cuadros de circuitos, láminas, redes.
- Deportes: canoas, palos de golf, zapatillas deportivas.
- Equipos: enchufes, instrumentos musicales.
- Jardinería: elementos decorativos, macetas, urnas.
- Mueble: sillas, mesas, estanterías, armarios.
- Pesca: hilos, redes, anzuelos, herramientas.
- Textil: botones, clips, soportes, ropa protectora.

Otro campo de interés de los biopolímeros biodegradables es el **área médica**. Las aplicaciones son principalmente de tres tipos ([117,118,119,120](#)):

- *Implantes* y elementos (clavos, placas) para la fijación o reconstrucción de huesos y articulaciones fracturadas. Se utilizan en sustitución de los implantes metálicos habituales. Al tratarse de materiales biocompatibles ([121](#)) hacen innecesaria una segunda operación para retirar las prótesis una vez sanada la fractura.

- *Elementos quirúrgicos* (hilos, grapas, mallas) para la sutura y curado de heridas. Se eliminan fácilmente por degradación y reabsorción.
- *Liberación controlada de fármacos*. El uso de cápsulas, nanoesferas, parches o cilindros que se biodegradan con una cierta velocidad y que se inyectan, ingieren o implantan en el cuerpo, permite la liberación de dosis adecuadas de medicamentos en un punto concreto del cuerpo, evitando efectos secundarios en otros órganos.

La liberación controlada de drogas tiene también aplicación en el campo veterinario y en agricultura para la liberación lenta y controlada de fertilizantes y pesticidas. Otras aplicaciones son la dosificación gradual de detergentes o de productos en sistemas de depuración de aguas [\(120\)](#).

La **producción** de biopolímeros biodegradables ha aumentado en los últimos años debido al mejor conocimiento y regulación de sus rutas biosintéticas, lo que ha permitido la construcción de organismos recombinantes (bacterias, levaduras y plantas) capaces de sintetizar estos biopolímeros a partir de fuentes de carbono económicas (melaza, sacarosa, lactosa, glicerol, aceites y metano) [\(121,122,123,124,125\)](#). Aún así, las fermentaciones tradicionales realizadas con bacterias recombinantes y plantas transgénicas no pueden competir aún con la producción industrial convencional de los plásticos sintéticos [\(122\)](#), aunque esta falta de competitividad podría atribuirse principalmente al bajo volumen de producción más que a los costes de las materias primas [\(126\)](#).

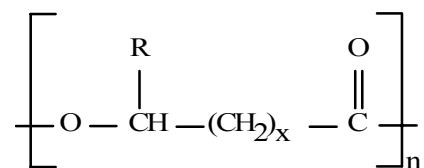
Una estrategia alternativa de producción es la síntesis enzimática (con enzimas purificadas) [\(122,127\)](#). Aunque hasta la fecha este proceso de producción no es económicamente rentable, la caracterización de las enzimas implicadas podría facilitar su producción a gran escala y con ella la de nuevos bioplásticos mediante biorreactores [\(128\)](#).

2.2. POLIHIDROXIALCANOATOS

2.2.1. Composición y estructura

Los polihidroxicanoatos (PHAs) ([114,129](#)) constituyen un extenso grupo de polímeros naturales sintetizados por gran variedad de bacterias como material de almacenamiento energético ([130,131](#)). Los PHAs se obtienen mediante fermentación aeróbica en medios ricos en hidratos de carbono, bajo condiciones desfavorables de estrés nutricional ([132](#)). Los hidratos de carbono pueden provenir de fuentes naturales renovables como glucosa, sacarosa o bien desechos de la industria alimentaria como mosto de uva u oliva, melaza de caña de azúcar, etc. Si durante su crecimiento la bacteria detecta falta o reducción de algún nutriente (N, P, Mg, K, O, S) genera una reserva de energía mediante la acumulación en el citoplasma de PHAs en forma de gránulos insolubles en agua. Existen también PHAs semisintéticos que se elaboran mediante fermentación en medios a los que se añaden precursores no habituales.

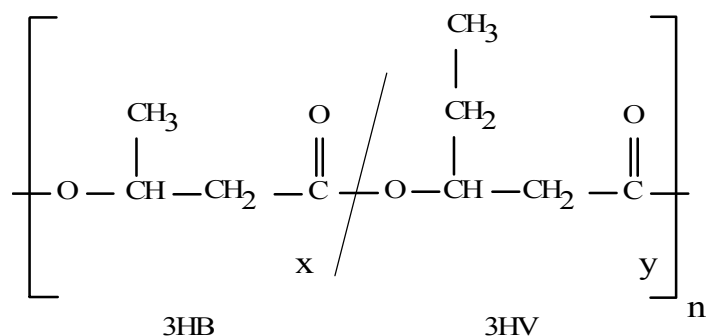
En cuanto a su estructura química, los PHAs son poliésteres constituidos por monómeros de ácidos hidroxialcanoicos de carácter quiral. La estructura genérica de los PHAs es la siguiente:



En la que x es igual a 1 para todos los polímeros comercialmente relevantes (se trata por tanto de polímeros de ácidos 3-hidroxialcanoicos) y R puede ser H o una cadena hidrocarbonada de hasta 16 átomos de carbono. Existen más de 150 monómeros distintos que pueden combinarse para originar PHAs, tanto homo- como heteropolímeros. La gran diversidad de PHAs radica principalmente en la naturaleza del sustituyente R del carbono asimétrico. Dependiendo del número de carbonos de este sustituyente, los PHAs suelen

denominarse de cadena corta (1-5 C), media (6-14 C) o larga (más de 15 C).

A pesar del elevado número de posibles PHAs, sólo unos pocos de ellos se utilizan a nivel industrial. El más común de todos es el poli(3-hidroxitirato) (PHB), un homopolímero del ácido (R)-3-hidroxitirico (3HB). El elevado coste y algunas características desfavorables del PHB han llevado a la producción de copolímeros de 3HB con otros ácidos hidroxialcanoicos. Los productos comerciales más difundidos son los poli(3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato) (PHB/PHV) que son copolímeros con diferentes proporciones de 3HB y ácido (R)-3-hidroxitirico (3HV) o ácido (R)-3-hidroxipentanoico. La estructura de estos compuestos, comercializados originalmente con el nombre de Biopol[®], es la siguiente:



Entre los productos comerciales existen también mezclas de PHAs (mezclas de homopolímeros, de copolímeros o de ambos) y mezclas de PHAs con otros polímeros biodegradables.

2.2.2. Propiedades

Con propiedades similares a las de los plásticos sintéticos, los PHAs tienen también las características generales descritas para los biopolímeros y algunas propias de los PHAs:

- Son compuestos termoplásticos y/o elastómeros
- Son insolubles en agua.
- Presentan un considerable grado de polimerización.
- No son tóxicos.
- Son biocompatibles.
- Se obtienen a partir de materias primas renovables.
- Son biodegradables.
- Son compuestos enantioméricamente puros, formados sólo por isómeros R.

En relación con los productos descritos, el PHB es un material relativamente rígido y quebradizo, de regular cristalinidad, moderada resistencia mecánica y con un comportamiento termomecánico similar al del polipropileno. El PHB tiene un punto de fusión que se encuentra ligeramente por debajo de su temperatura de descomposición térmica. Debido a estas desventajas y al alto coste se tiende a la producción del copolímero PHB/PHV cuyas propiedades varían en función del porcentaje de 3HV. La inclusión de monómeros de valerato mejora las propiedades mecánicas. El aumento del porcentaje de valerato permite expandir el intervalo de temperaturas de trabajo, disminuir el coste de producción y mejorar el procesado, la tenacidad al impacto, la flexibilidad, las propiedades barrera y el alargamiento a la rotura ([133,134](#)).

2.2.3. Aplicaciones

Como en el caso de otros biopolímeros, la mayoría de las aplicaciones de los PHAs se basan en sus características de biodegradabilidad y biocompatibilidad. El creciente interés por estos compuestos procede principalmente de los tres campos siguientes ([113,120,135,136](#)):

- Plásticos ecológicos.
- Productos biomédicos.
- Síntesis orgánica: producción de compuestos quirales.

Los dos primeros campos y aplicaciones son comunes a los ya indicados para otros biopolímeros biodegradables ([págs. 92-94](#)). El copolímero PHB/PHV es de creciente importancia en la sustitución de los polímeros petroquímicos ([137](#)). Tanto este copolímero como el PHB y sus productos de degradación son compuestos no tóxicos y biocompatibles y se utilizan con fines médicos en implantes, suturación de heridas y liberación controlada de medicamentos ([135,138](#)). El PHB/PHV tiene propiedades piezoeléctricas similares a las de los huesos, pudiéndose estimular el crecimiento y curación de éstos a medida que el polímero se degrada lentamente. Se ha comprobado que suturas quirúrgicas fabricadas de PHB o PHB/PHV (15 % de 3HV) implantadas intramuscularmente durante un período de 1 año no causan reacción vascular aguda ni efectos adversos tales como inflamación supurativa o calcificación en el sitio de implantación ([139](#)). Los PHAs se emplean también en el campo de la ingeniería de tejidos como construcciones temporales en las que las células epiteliales pueden crecer y regenerar tejidos, es decir, como soportes para la producción *in vitro* e *in vivo* de tejidos artificiales ([120](#)).

Una aplicación específica de los PHAs es su utilización como *fente de isómeros ópticos* de ácidos hidroxialcanoicos. Los PHAs son compuestos enantioméricamente puros, generalmente formados sólo por el isómero R del o de los monómeros correspondientes. Mediante la degradación adecuada del polímero o copolímero se obtienen los monómeros que posteriormente se utilizan en la síntesis de compuestos quirales como aminoácidos,

vitaminas, antibióticos, feromonas, perfumes o disolventes biodegradables ([131,140,141,142](#)).

2.2.4. Determinación de 3HB y 3HV

Como polímeros biodegradables, los PHAs pueden ser degradados por microorganismos pero también mediante otros procesos (reacciones químicas, fotodegradación, degradación térmica). Desde el punto de vista de su aplicabilidad, el conocimiento de la cinética de degradación de un determinado PHA es esencial ya que la extensión y velocidad de la degradación y los productos resultantes pueden determinar su uso potencial. Para un determinado proceso, la cinética de degradación depende de las condiciones experimentales (temperatura, medio, tiempo, etc.) pero también de la estructura, morfología o cristalinidad del PHA ([114,143,144](#)). Así, por ejemplo, los procesos de (bio)degradación del copolímero PHB/PHV son más rápidos que los del homopolímero PHB, y aún más rápidos en presencia de plastificantes que disminuyen la cristalinidad.

El control de la degradación es también fundamental en algunos métodos analíticos en los que la cantidad y composición de los PHAs se evalúan indirectamente a través de los productos formados en la degradación de los polímeros en condiciones adecuadas ([120,137,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153](#)).

Dado que PHB, PHV y sus copolímeros son los componentes más comunes de los PHAs, los monómeros que los constituyen, 3HB y/o 3HV o sus derivados, están frecuentemente entre los productos de degradación y su determinación puede proporcionar información sobre la cinética del proceso (velocidad y mecanismo) y también sobre la composición y estructura de estos biopolímeros. Esta determinación se lleva a cabo habitualmente mediante métodos cromatográficos o enzimáticos.

Para determinar la composición de copolímeros PHB/PHV con diferentes porcentajes de 3HV, SATO y col. ([137](#)) efectúan la degradación térmica de los polímeros a 350 °C en

presencia de hidróxido de tetrametilamonio y miden mediante cromatografía de gases (GC-FID) los 3-metoxi-derivados formados.

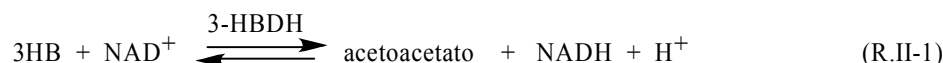
En medio ácido sulfúrico concentrado, el PHB se convierte mayoritariamente en ácido crotonico (ácido trans-2-butenoico) que puede ser analizado mediante HPLC con detección ultravioleta (144,145). Esto no es aplicable a PHV (154).

La hidrólisis alcalina del PHB proporciona una mezcla de ácido crotonico y 3HB mientras que el PHV se convierte en 3HV. Estos productos se determinan generalmente por métodos cromatográficos (144,146). Los porcentajes de 3HB y ácido crotonico en la degradación alcalina de PHB dependen en gran medida de las condiciones de degradación (tiempo, temperatura, grado de alcalinidad) y de la morfología del polímero (gránulos, película, precipitado).

Otra forma común de degradación de PHAs es la alcoholisis en medio ácido clorhídrico o sulfúrico. Se aplica en la cuantificación indirecta de PHB, PHV y sus copolímeros. Los polímeros son transformados en ésteres de 3HB y/o 3HV que pueden ser extraídos en cloroformo u otros disolventes y determinados mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) (147,148,149,150) o espectrometría de masas (GC-MS) (146,151). En estos métodos, la recuperación de PHB y PHV no es completa, debido a la distribución de los ésteres entre las fases acuosa y orgánica. Alternativamente, los ésteres pueden ser hidrolizados a sus respectivos hidroxiacidos y determinados directamente en disolución acuosa mediante cromatografía de intercambio iónico con detección conductimétrica (143). HESSELMANN y col. (143) han comparado la eficacia de la degradación con diferentes alcoholes en medio ácido sulfúrico y proponen la propanólisis seguida de hidrólisis alcalina de los ésteres propiónicos para obtener la recuperación completa de los polímeros comerciales PHB y PHV. La recuperación con etanol es menos eficaz y menos aún con metanol.

Independientemente del proceso de degradación, el 3HB formado puede ser determinado directamente en disolución acuosa mediante análisis enzimático, siendo ésta una rápida alternativa a los métodos cromatográficos. Las determinaciones enzimáticas se

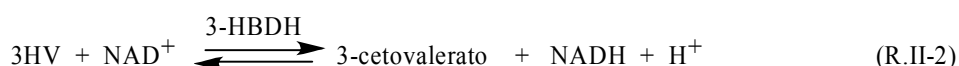
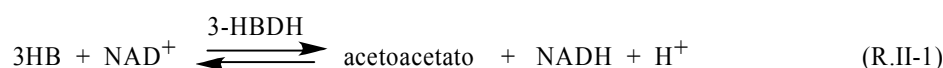
basan en la acción de la enzima (R)-3-hidroxiacetato deshidrogenasa (3-HBDH) que cataliza de forma selectiva la oxidación de 3HB con NAD⁺ para dar acetoacetato y NADH:



La acción catalítica de 3-HBDH es altamente selectiva, pero no específica, para el isómero R del 3HB. El isómero S no reacciona, pero otros (R)-3-hidroxiácidos, como el (R)-3-hidroxiacético o el (R)-3-hidroxihexanoico, sí lo hacen aunque su velocidad de reacción es menor (155). La reacción R.II-1, utilizada por primera vez por Williamson y col. (156) es también la base de gran variedad de métodos para la determinación de 3HB en fluidos biológicos como sangre, orina o leche, con fines clínicos o veterinarios (156,157,158, 159,160).

En contraste con las determinaciones de 3HB en fluidos biológicos, las llevadas a cabo en muestras de biopolímeros son escasas, debido a la interferencia de otros 3-hidroxiácidos, principalmente 3HV. Los métodos enzimáticos existentes se basan en medidas bajo condiciones de equilibrio (es decir, cuando la reacción enzimática es completa) y la cuantificación de 3HB sólo es posible si no están presentes otros hidroxiácidos interferentes. En las aplicaciones existentes, el NADH originado se mide directamente mediante fotometría a 340 nm (152) o indirectamente, tras el acoplamiento con otras reacciones enzimáticas, con detección fotométrica (143) o amperométrica (153). Ninguna de estas aplicaciones permite la determinación individual de 3HV o de otros 3-hidroxiácidos diferentes al 3HB. HESSELMANN (143) propone un procedimiento en el que se determina la suma total de 3HB y 3HV pero estos compuestos no pueden ser cuantificados individualmente.

En este capítulo se propone un nuevo método enzimático con 3-HBDH que hace posible la determinación individual y simultánea de 3HB y 3HV. La base de la determinación es la diferente velocidad de las reacciones catalizadas de estos compuestos con NAD⁺:



La concentración total de NADH producida por ambas reacciones se mide bajo dos condiciones cinéticas (sin alcanzar el equilibrio) distintas. Para obtener medidas con buena reproducibilidad se propone un sistema con inyección en flujo con dos detectores en el que la enzima 3-HBDH se mantiene inmovilizada.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL

3.1.1. Reactivos

- **Vidrio de poro controlado**, PG 240-120 tamaño de poro 240, tamaño de malla 80-120, (Sigma-Aldrich).
- **Ácido nítrico**, HNO_3 , PA, 65 % (Scharlab).
- **3-Aminopropiltrietoxisilano**, $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$, PA (Sigma-Aldrich).
- **Glutaraldehído** en solución acuosa al 50% w/v, $\text{OHC}(\text{CH}_2)_3\text{CHO}$, PA (Sigma-Aldrich).
- **Dihidrógeno fosfato sódico**, NaH_2PO_4 , PA (Scharlab).
- **Sal sódica de ácido (R)-3-hidroxi-butírico**, $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{COONa}$, PA, (Sigma-Aldrich).
- **(R)-3-hidroxi-butirato deshidrogenasa** (E.C. 1.1.1.30) de *Pseudomonas lemoignei* (100 u), 6,2 mg de sólido, 22,8 u mg^{-1} de sólido, 457 u mg^{-1} de proteína (Sigma-Aldrich).
- **(-)-Metil (R)-3-hidroxi-valerato**, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_3$ PA, >98% (Sigma-Aldrich).
- **Trizma**, hidrocloreto de tris(hidroxi-metil)aminometano, PA, 99% (Sigma-Aldrich).
- **Dinucleótido de β -nicotinamida adenina**, forma oxidada, NAD^+ , grado I, PA, 100% (Roche).
- **Ácido crotonico**, ácido trans-2-butenoico, $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2$, PA, 98% (Sigma-Aldrich).
- **Ácido cítrico**, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, PA (Scharlab).
- **Cloroformo**, CHCl_3 , PA, (Sigma-Aldrich).
- **Hidróxido sódico**, NaOH , PA, 99% (Scharlab).
- **Ácido clorhídrico**, HCl , PA, 37% (Scharlab).
- **1-Propanol**, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, PA, 99,8%, (Scharlab).
- **Muestras de PHAs comerciales** (Goodfellow).
 - Biopolímero polihidroxi-butirato/polihidroxi-valerato 12% (PHB88/PHV12), gránulos plastificados 10% (éster cítrico).
 - Biopolímero polihidroxi-butirato (PHB), placa 1,35 mm, grado técnico.
 - Biopolímero polihidroxi-butirato (PHB), tela no tejida, 0,125 mm, grado investigación.

Las disoluciones de 3-hidroxiacetato se preparan a partir de otra $5,0 \times 10^{-3}$ M (0,0630 g de 3-hidroxiacetato en 100 mL de agua).

Las disoluciones de 3-hidroxiacetato se obtienen a partir de otra $1,8 \times 10^{-3}$ M que se prepara en el momento de trabajo mediante hidrólisis del éster metílico con NaOH 0,05 M durante 30 minutos y a temperatura ambiente (30 μ L de (-)-Metil (R)-3-hidroxiacetato comercial se mezclan con 100 mL de agua destilada, resultando una disolución $2,3 \times 10^{-3}$ M; de ésta se toman 20 mL, se añaden 2,5 mL de NaOH 0,5 M y se enrasa a 25 mL).

Todas las disoluciones de trabajo se preparan con agua destilada y desionizada.

3.1.2. Inmovilización de 3-HBDH

La enzima 3-HBDH se inmovilizó sobre vidrio de porosidad controlada (CPG) mediante unión covalente indirecta a través de 3-aminopropiltriétoxissilano como reactivo espaciador y glutaraldehído como entrecruzante, según el procedimiento descrito en bibliografía ([161](#)). Se utilizaron 100 U de 3-HBDH/0,1 g de CPG.

Procedimiento

Se hierven 0,1 g de CPG durante 30 minutos en unos 20 mL de ácido nítrico al 5%. Una vez frío, el vidrio se filtra y lava con agua desionizada sobre placa filtrante de vidrio nº 3. A continuación se seca en estufa a 95 °C durante 1 hora. La disolución alquilaminante se prepara con 3-aminopropiltriétoxissilano (2,5 mL) en agua (20 mL). El pH de la disolución se ajusta cuidadosamente a 3,4-3,5 con HCl 5 M; se añade el vidrio seco y se reajusta el pH. La mezcla resultante se sumerge en un baño termostático a 75 °C durante 150 minutos, agitando cada 15 minutos. El vidrio alquilaminado se filtra y lava con agua, secándolo en estufa como en el paso precedente. El proceso de alquilaminación se repite 2 veces para asegurar la completa activación del vidrio. La disolución de agente entrecruzante se prepara

añadiendo 1,25 mL de glutaraldehído (50% en peso) sobre tampón fosfato (0,1 M, pH= 7,0) y enrasando con tampón hasta 25 mL; 5 mL de la disolución resultante se tratan con corriente de nitrógeno y a continuación se añade el vidrio seco, manteniendo el contacto durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se burbujea nitrógeno durante la primera media hora a intervalos de 10 minutos. El vidrio se filtra a vacío, lavándolo con agua desionizada. La unión de la enzima debe realizarse inmediatamente después del tratamiento con glutaraldehído. La enzima (100 U) se disuelve en unos 2 mL de tampón fosfato (0,1 M, pH= 6,0, 4 °C) y se añade al vidrio activado, manteniendo el contacto durante 3 horas a 4 °C y burbujeando nitrógeno la primera media hora a intervalos de diez minutos. Finalmente el vidrio con la enzima inmovilizada se filtra y se lava en frío, primero con tampón fosfato (0,1 M, pH= 6,0) y luego con agua. La enzima inmovilizada se conserva en tampón (0,1 M, pH= 6,0) a 4 °C. Bajo estas condiciones, la enzima inmovilizada es muy estable: al cabo de aproximadamente dos años, la enzima presentaba el 55 % de su actividad catalítica inicial (la actividad se comparó en las mismas condiciones experimentales y con reactores enzimáticos recién preparados a partir de la enzima almacenada).

3.1.3. Aparatos y material

En el montaje del sistema de flujo de trabajo se utilizan los siguientes elementos:

- **Detector fluorimétrico RF-10AXL** (Shimadzu) con célula de flujo de 12 μL y **Detector espectrofotométrico SPD 6AV UV-Vis** (Shimadzu) con célula de flujo de 8 μL . Ambos detectores se conectaron simultáneamente a un módulo de control SCL10AVP manejado por ordenador a través del software de adquisición y procesamiento de datos LC Solution (todo de Shimadzu). Mediante esta aplicación se adquirirían de forma simultánea los datos procedentes de ambos detectores, obteniéndose una doble señal en tiempo real.
- **Bombas peristálticas Minipuls 2HP4** (Ver Capítulo I, [pág. 28](#)).
- **Válvula de inyección de 6 vías V-1451** (Ver Capítulo I, [pág. 29](#)).
- **Termostato de recirculación Lauda E-100** (Hucoa-Erlöss) conectado en serie con distintas cámaras que actúan de intercambiadores de calor con los reactores que se encuentran situados en su interior, formando un circuito cerrado a través del cual se hace recircular agua a la temperatura adecuada para controlar la temperatura de trabajo.
- **Conducciones y conexiones.** En las conducciones de los diferentes canales se utilizan tubos de teflón de 0,5 mm de diámetro interno y 1,6 mm de diámetro externo con conectores y conexiones lineales y en T normalizados (Upchurch Scientific). La mezcla de reactivos se favorece mediante reactores tubulares insertados en el sistema de flujo. Estos reactores son tubos de teflón de diferente longitud, enrollados o anudados, y provistos en sus extremos de conectores normalizados.

- **Reactores enzimáticos.** Los reactores enzimáticos (Figura II-1) se fabricaron relleno de tubos de teflón de 1 mm de diámetro interno y 5 ó 6 cm de longitud con la enzima inmovilizada sobre CPG. En los extremos de los tubos se colocaron conectores normalizados y discos filtrantes de 10 μm de tamaño de poro para evitar pérdidas de CPG. La limpieza periódica de estos filtros en un baño de ultrasonido evitaba la colmatación y obstrucción. Cuando no eran utilizados, los reactores se mantenían humedecidos con agua destilada y refrigerados (4 °C).

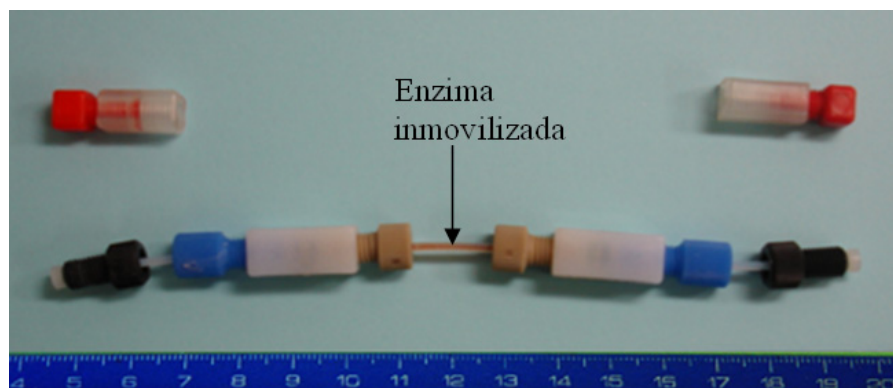


Figura II-1

Reactor enzimático.

3.2. SISTEMA DE FLUJO

El montaje de trabajo está esquematizado en la [Figura II-2](#). Consiste en un sistema de inyección de flujo con dos reactores enzimáticos de 3-HBDH (ER-1, ER-2) y dos detectores, un fluorímetro (F) y un espectrofotómetro (E). Ambos detectores se ajustan para la detección de NADH y están conectados a un módulo de control multicanal (MC) manejado por ordenador (PC). El montaje permite la adquisición y representación simultánea de los datos de los dos detectores en tiempo real. Las muestras (disoluciones) con 3HB, 3HV o ambos se introducen a través del inyector (I) en una corriente portadora (canal C₁) que se mezcla con la disolución de reactivo (canal C₂, NAD⁺ en medio tamponado) antes de su paso por los reactores enzimáticos. Las muestras experimentan las reacciones R.II-1 y/o R.II-2 ([pág. 101](#)) durante dos periodos de tiempo secuenciales, correspondientes a su paso por los reactores enzimáticos. Para controlar la temperatura de reacción, todas las disoluciones (portador, reactivos y muestras inyectadas), el reactor de mezcla y los reactores enzimáticos se mantienen a temperatura constante por medio de un termostato de circulación.

Cada muestra inyectada origina una señal en forma de pico en cada detector. La altura de pico de fluorescencia (Δh_F) es proporcional a la concentración de NADH generada en el primer reactor enzimático. La altura de pico en el detector de absorbancia (Δh_E) es proporcional al NADH total acumulado después del segundo reactor enzimático (es decir, después de los dos períodos de reacción). Con la configuración propuesta, la menor sensibilidad del espectrofotómetro en comparación con la del fluorímetro está parcialmente compensada por las mayores concentraciones de NADH detectadas después del segundo reactor enzimático.

Las cuantificaciones se basan en Δh_F , en Δh_E o en ambos parámetros.

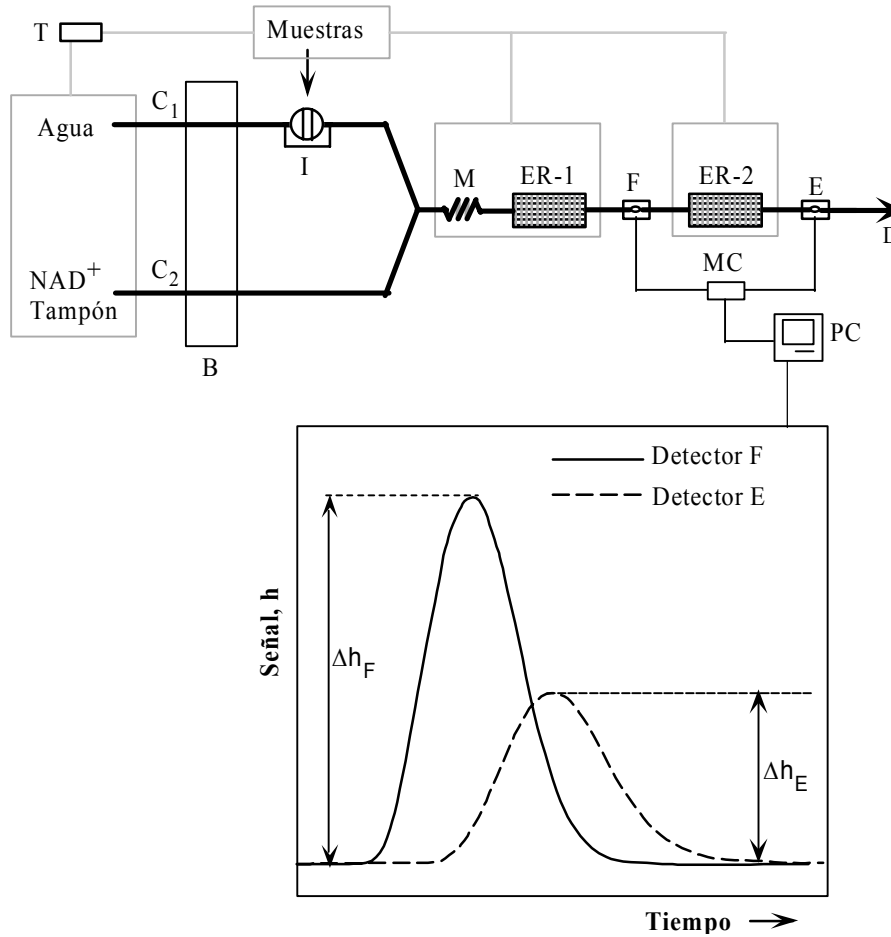


Figura II-2

Sistema de flujo para la determinación de 3HB y/o 3HV.

B: bomba peristáltica; C₁, C₂: canales; I: inyector; M: reactor de mezcla;
 ER: reactores enzimáticos; F: detector fluorimétrico; E: detector espectrofotométrico;
 MC: módulo de control; PC: ordenador; T: termostato; D: desecho.

3.3. ESTUDIO DE VARIABLES

En el sistema de flujo de la [Figura II-2](#), algunas de las condiciones experimentales (caudal, volumen de inyección, tamaño de los reactores enzimáticos y temperatura) se fijaron tras la realización de ensayos cualitativos preliminares. Con estas variables prefijadas, se estudió el efecto de la composición del reactivo (pH y concentración de NAD⁺) en las señales obtenidas. En la [Tabla II-1](#), se resumen los intervalos de experimentación y los valores finalmente propuestos para cada variable.

3.3.1. Tamaño de reactores enzimáticos, caudal y volumen de inyección

Con el sistema de flujo propuesto, las señales registradas aumentaban, como era de esperar, con el tiempo de reacción, estando éste determinado por el tamaño de los reactores enzimáticos y por el caudal a través de ellos. Se realizaron y compararon experimentos con reactores de entre 1 y 10 cm de longitud con caudales de 0,10 – 0,75 mL min⁻¹ para cada canal.

Los reactores pequeños proporcionaban señales demasiado bajas, a no ser que los caudales fueran también muy pequeños, obteniéndose entonces picos muy anchos y una frecuencia de inyección muy reducida. Por el contrario, con reactores largos y caudales moderados, se obtenían buenas señales, y por tanto buena sensibilidad, así como una frecuencia de análisis aceptable. Sin embargo, al aumentar la longitud, los reactores presentaban un comportamiento hidrodinámico menos reproducible, se producían fugas y se obstruían al cabo de unas horas de funcionamiento.

Para reactores y caudal fijos, el aumento del volumen de inyección proporcionaba, como era de esperar, señales más altas pero también menor frecuencia de muestreo.

Los reactores, caudales y volumen de inyección propuestos ([Tabla II-1](#)) proporcionaban señales y frecuencia de inyección aceptables, sin problemas de obstrucción después de al menos 7-8 horas de funcionamiento. Es obvio que las condiciones propuestas pueden modificarse en función de los requisitos analíticos deseados.

Tabla II-1. Condiciones experimentales. Intervalos de experimentación y valores propuestos.

Variable	Intervalo experimental	Valor fijado/propuesto
Detección fluorimétrica		
λ_{ex}		340 nm
λ_{em}		460 nm
Detección espectrofotométrica		
		340 nm
Caudal (mL min ⁻¹)		
Canales C ₁ y C ₂	0,10-0,75	0,20
Tamaño de los reactores (cm)		
M		125
ER-1	1-10	5
ER-2	1-10	6
Volumen de inyección (μ L)	35-250	115
Temperatura (°C)	20-40	25
pH	7,0-9,0	8,3
NAD ⁺ (M)	$1,5 \times 10^{-4} - 3,0 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-3}$

3.3.2. Temperatura

En experimentos comparativos efectuados a temperaturas comprendidas entre 20 y 40 °C se comprobó que el aumento de temperatura conducía a mayores señales en ambos detectores, siendo esto una consecuencia del aumento de la actividad enzimática. Sin embargo, al aumentar la temperatura se observó también una pérdida gradual en la reproducibilidad de los picos del detector fluorimétrico, efecto que no era apreciable en los picos de absorbancia. Este efecto podría ser debido a la variación de la fluorescencia del NADH con la temperatura (162) ya que, aunque las disoluciones de reactivos y los reactores se mantenían a temperatura constante, la célula de flujo del detector fluorimétrico carecía de dispositivo de termostatación. Para minimizar este efecto se optó por trabajar a una temperatura próxima a la del laboratorio.

3.3.3. Efecto del pH

Con las variables precedentes prefijadas en los valores indicados en la [Tabla II-1.](#), se estudió el efecto del pH de la disolución de reactivo en la actividad catalítica de la enzima 3-HBDH para las reacciones R.II-1 y R.II-2 ([pág. 101](#)). El pH del reactivo (NAD^+ $1,5 \times 10^{-3}$ M, TRIZMA 0,10 M) se varió entre 7,5 y 9,0 y para cada valor de pH se inyectaron disoluciones de 3HB o 3HV $5,0 \times 10^{-5}$ M. Las alturas de pico registradas con el detector fluorimétrico ([Tabla II-2.](#)) se muestran y comparan en la [Figura II-3.](#) (las señales del detector espectrofotométrico proporcionaron un gráfico similar). Los perfiles de pH indican que la máxima actividad catalítica de la enzima 3-HBDH tiene lugar a un pH cercano a 8,3, tanto para 3HB como para 3HV. Los perfiles indican también que, tal como se esperaba, la velocidad de transformación del 3HV es menor que la del 3HB.

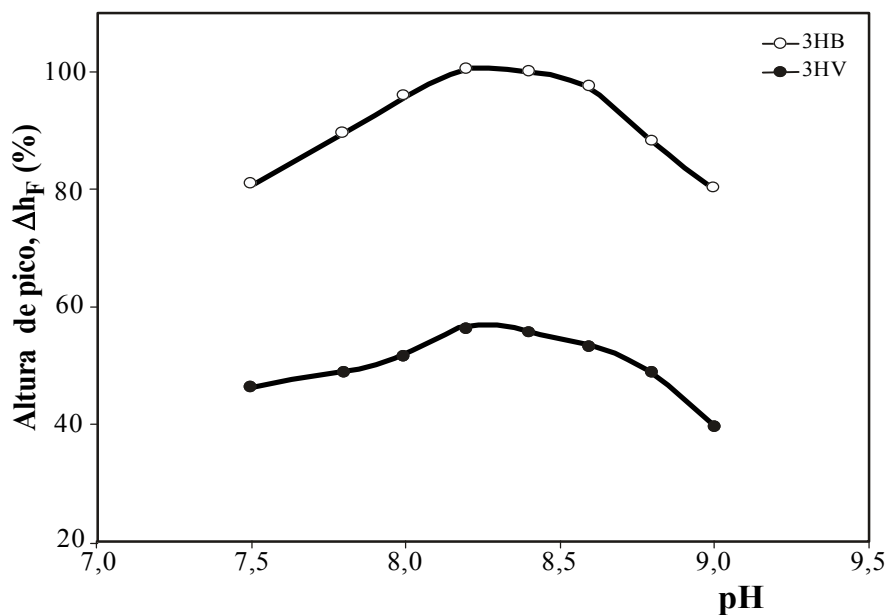
3.3.4. Efecto de la concentración de NAD^+

La concentración de NAD^+ en el reactivo (Tampón TRIZMA 0,10 M a pH 8,3) se varió entre $1,5 \times 10^{-4}$ y $3,0 \times 10^{-3}$ M. Con cada concentración se inyectaron disoluciones $5,0 \times 10^{-5}$ M de 3HB o de 3HV y se midieron y compararon las alturas de los picos registrados en el detector fluorimétrico ([Tabla II-3.](#), [Figura II-4](#)). Las señales aumentan de forma gradual con el incremento de la concentración de NAD^+ , siendo este efecto menos pronunciado para concentraciones superiores a $1,5 \times 10^{-3}$ M. En experimentos posteriores se utilizó siempre esta concentración ya que permitía economizar NAD^+ sin una pérdida significativa de sensibilidad.

Tabla II-2. Valores de altura de pico a diferentes pH para 3HB y 3HV $5,0 \times 10^{-5}$ M.

pH	Altura de pico*, Δh_F (%)	
	3HB	3HV
7,5	80	46
7,8	89	49
8,0	95	52
8,2	100	56
8,4	99	55
8,6	97	53
8,8	88	48
9,0	80	39

*: media de 3 valores.

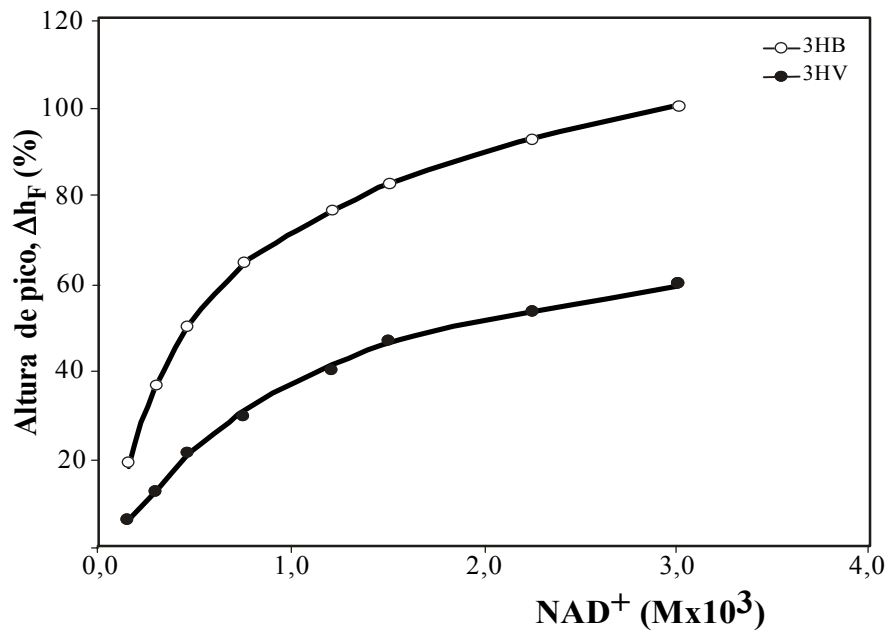
**Figura II-3****Efecto del pH.**

Variación de la altura de pico con el pH para 3HB y 3HV $5,0 \times 10^{-5}$ M.
 Tampón TRIZMA 0,10 M; NAD^+ $1,5 \times 10^{-3}$ M.

Tabla II-3. Valores de altura de pico a diferentes concentraciones de NAD^+ para 3HB y 3HV $5,0 \times 10^{-5}$ M.

NAD^+ $\text{M} \times 10^3$	Altura de pico*, Δh_F (%)	
	3HB	3HV
0,15	19	6
0,3	37	12
0,5	50	21
0,8	64	30
1,2	76	40
1,5	83	46
2,3	93	53
3,0	100	60

*: Media de 3 valores

**Figura II-4****Efecto de la concentración de NAD^+ .**

Variación de la altura de pico con la concentración de NAD^+ para 3HB y 3HV $5,0 \times 10^{-5}$ M.
Tampón TRIZMA 0,10 M; pH: 8,3.

3.4. DETERMINACIÓN DE 3HB Y 3HV

En el sistema de flujo de la [Figura II-2 \(pág. 109\)](#) y con las condiciones propuestas en la [Tabla II-1 \(pág. 111\)](#), se inyectaron disoluciones patrón con diferentes concentraciones de 3HB, de 3HV o de ambos y se estudió la relación entre las alturas de pico medidas y las concentraciones inyectadas. En la [Tabla II-4](#), se muestran las alturas de pico, Δh_F y Δh_E , para diferentes concentraciones, una vez descontada la señal media del blanco que se obtiene al inyectar agua destilada. Las ecuaciones de calibrado encontradas y su correspondiente intervalo de aplicación se muestran en la [Tabla II-5](#).

Para las muestras con un único analito, tanto Δh_F como Δh_E presentan una relación lineal con las concentraciones de 3HB o 3HV inyectadas en el intervalo de 1×10^{-6} a 1×10^{-4} M, aproximadamente ([Figura II-5](#)). Los valores de las pendientes en las ecuaciones de la [Tabla II-5](#), indican que la detección de 3HV es menos sensible que la de 3HB, siendo éste un resultado esperado debido a su menor velocidad de reacción. Los valores calculados para los límites de detección (LD) fluorimétrica o espectrofotométrica de estos analitos en muestras individuales están comprendidos entre 2×10^{-8} y 5×10^{-8} M. El cálculo se efectúa según la expresión $LD = 3s_B/m$, siendo s_B la desviación estándar ($n=10$) de la altura de pico del blanco y m la pendiente de la ecuación de calibrado correspondiente. Las desviaciones estándar relativas ($n=10$) de las alturas de pico correspondientes a muestras de concentración 1×10^{-5} M presentan valores comprendidos entre 0,8 % y 1,5 %.

Para muestras que contienen simultáneamente 3HB y 3HV, las alturas de pico Δh_F y Δh_E son predecibles mediante regresión lineal múltiple, siendo esto aplicable sólo cuando la concentración total de 3HB+3HV es inferior a $1,0 \times 10^{-4}$ M, aproximadamente. Los coeficientes de regresión parciales de las ecuaciones multilineales ([Tabla II-5](#)) coinciden con los coeficientes individuales encontrados para las muestras con sólo 3HB o 3HV. Esto indica que las señales de 3HB y 3HV son aditivas de forma que las señales fluorimétricas o espectrofotométricas de cualquier mezcla de 3HB y 3HV pueden calcularse mediante adición de las señales de las correspondientes muestras individuales de 3HB o 3HV. Además de ser

impredicibles mediante regresión lineal múltiple, las señales de mezclas con concentraciones de 3HB+3HV superiores a $1,0 \times 10^{-4}$ M y relaciones 3HB/3HV próximas a la unidad presentaban desviaciones negativas respecto a la aditividad de las señales individuales. Esto podría indicar algún tipo de interacción entre 3HB y 3HV, probablemente un efecto competitivo entre ambos sustratos por los sitios activos en la enzima inmovilizada. En la [Figura II-6](#) se han representado los valores observados frente a los predichos según las ecuaciones propuestas.

Tabla II-4. Alturas de pico para diferentes muestras patrón de 3HB y/o 3HV.

Patrón	Concentración (M)		Altura de pico* (μV)	
	3HB	3HV	Δh_F	Δh_E
1	$8,0 \times 10^{-7}$	-	1322	638
2	$1,0 \times 10^{-6}$	-	1684	645
3	$2,0 \times 10^{-6}$	-	2348	801
4	$4,0 \times 10^{-6}$	-	5688	2269
5	$6,0 \times 10^{-6}$	-	8355	3848
6	$1,0 \times 10^{-5}$	-	14780	6275
7	$2,0 \times 10^{-5}$	-	28981	12934
8	$5,0 \times 10^{-5}$	-	71525	32571
9	$8,0 \times 10^{-5}$	-	114313	52089
10	$1,0 \times 10^{-4}$	-	140776	64999
11	-	$1,8 \times 10^{-6}$	1405	723
12	-	$2,2 \times 10^{-6}$	2380	1216
13	-	$4,4 \times 10^{-6}$	4331	2153
14	-	$7,2 \times 10^{-6}$	6937	3847
15	-	$1,1 \times 10^{-5}$	10216	5149
16	-	$2,2 \times 10^{-5}$	21115	11071
17	-	$5,5 \times 10^{-5}$	52087	27519
18	-	$7,4 \times 10^{-5}$	70072	36971
19	-	$1,1 \times 10^{-4}$	102511	53906
20	$6,0 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-5}$	19128	9100
21	$6,0 \times 10^{-6}$	$7,2 \times 10^{-6}$	15658	7562
22	$1,0 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-5}$	64036	33042
23	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$	24846	12064
24	$1,0 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-6}$	21145	10169
25	$5,0 \times 10^{-5}$	$5,4 \times 10^{-5}$	119566	59087
26	$5,0 \times 10^{-5}$	$1,1 \times 10^{-5}$	80448	37826
27	$5,0 \times 10^{-5}$	$7,2 \times 10^{-6}$	78077	36559
28	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-5}$	11535	6055

*: Media de 3 valores.

Tabla II-5. Ecuaciones de calibrado para la determinación de 3HB y/o 3HV.

Analito	Detección	Rango de aplicación (M)/Ecuación ^a
3HB	F	$8 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}$ $\Delta h_F = (2,1 \pm 5,7) \times 10^2 + (1,42 \pm 0,02) \times 10^9$ [3HB] $R^2 = 0,9999$; n=10
	E	$8 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-4}$ $\Delta h_E = (-1,6 \pm 1,8) \times 10^2 + (6,52 \pm 0,04) \times 10^8$ [3HB] $R^2 = 0,9999$; n=10
3HV	F	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$ $\Delta h_F = (2,1 \pm 4,6) \times 10^2 + (9,36 \pm 0,10) \times 10^8$ [3HV] $R^2 = 0,9999$; n=9
	E	$1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-4}$ $\Delta h_E = (0,8 \pm 3,3) \times 10^2 + (4,93 \pm 0,07) \times 10^8$ [3HV] $R^2 = 0,9998$; n=9
3HB y 3HV	F	$1 \times 10^{-6} < [3HB] + [3HV] < 1 \times 10^{-4}$ $\Delta h_F = (3,1 \pm 3,2) \times 10^2 + (1,41 \pm 0,01) \times 10^9$ [3HB] + $(9,30 \pm 0,09) \times 10^8$ [3HV] $R^2 = 0,9998$; n=28
	E	$1 \times 10^{-6} < [3HB] + [3HV] < 1 \times 10^{-4}$ $\Delta h_E = (-0,1 \pm 1,3) \times 10^2 + (6,51 \pm 0,04) \times 10^8$ [3HB] + $(4,94 \pm 0,04) \times 10^8$ [3HV] $R^2 = 0,9999$; n=28

^a: Δh_F y Δh_E en μV ; $1 \times 10^3 \mu V = 1$ unidad de fluorescencia; $4 \times 10^5 \mu V = 1$ unidad de absorbancia; n = número de patrones; los coeficientes de regresión están expresados con un nivel de confianza del 95 %.

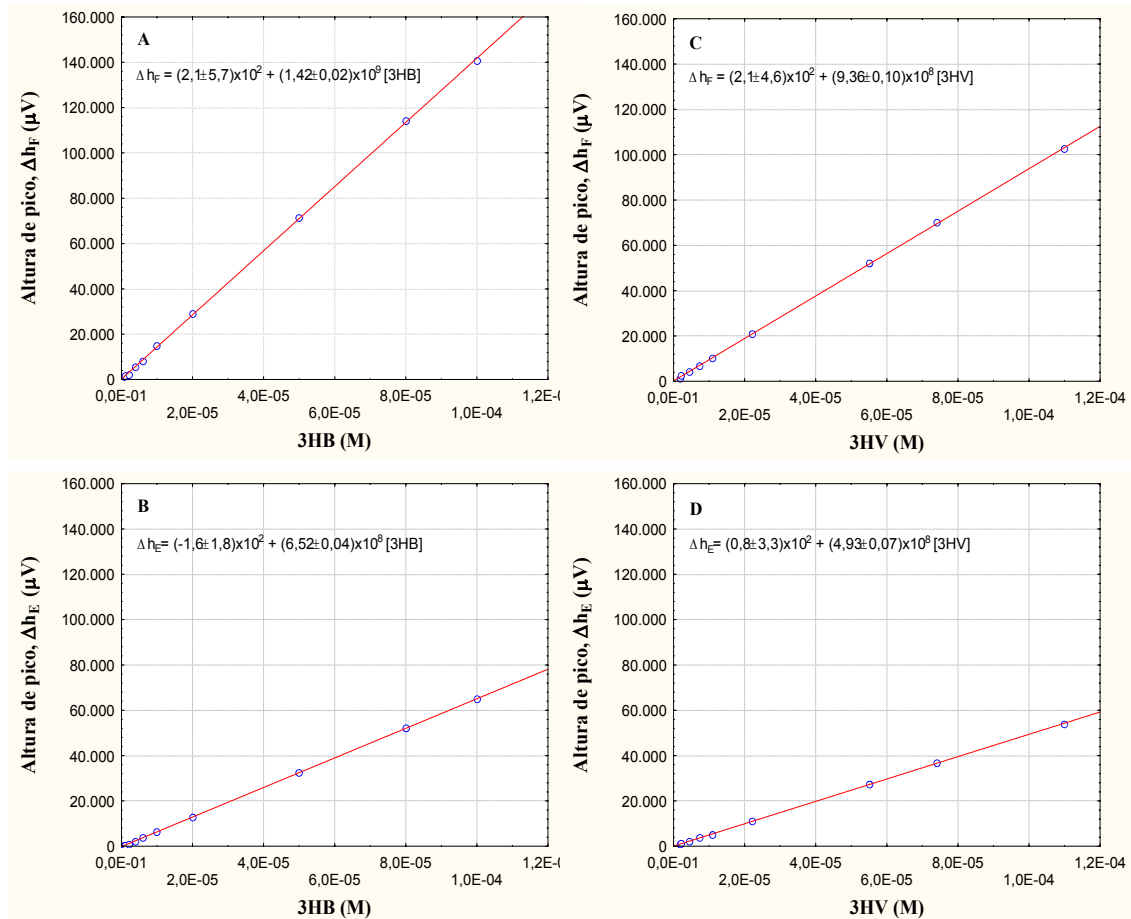


Figura II-5

Rectas de calibrado para la determinación de 3HB o 3HV.

- A)** 3HB con detección fluorimétrica. **B)** 3HB con detección espectrofotométrica.
C) 3HV con detección fluorimétrica. **D)** 3HV con detección espectrofotométrica.

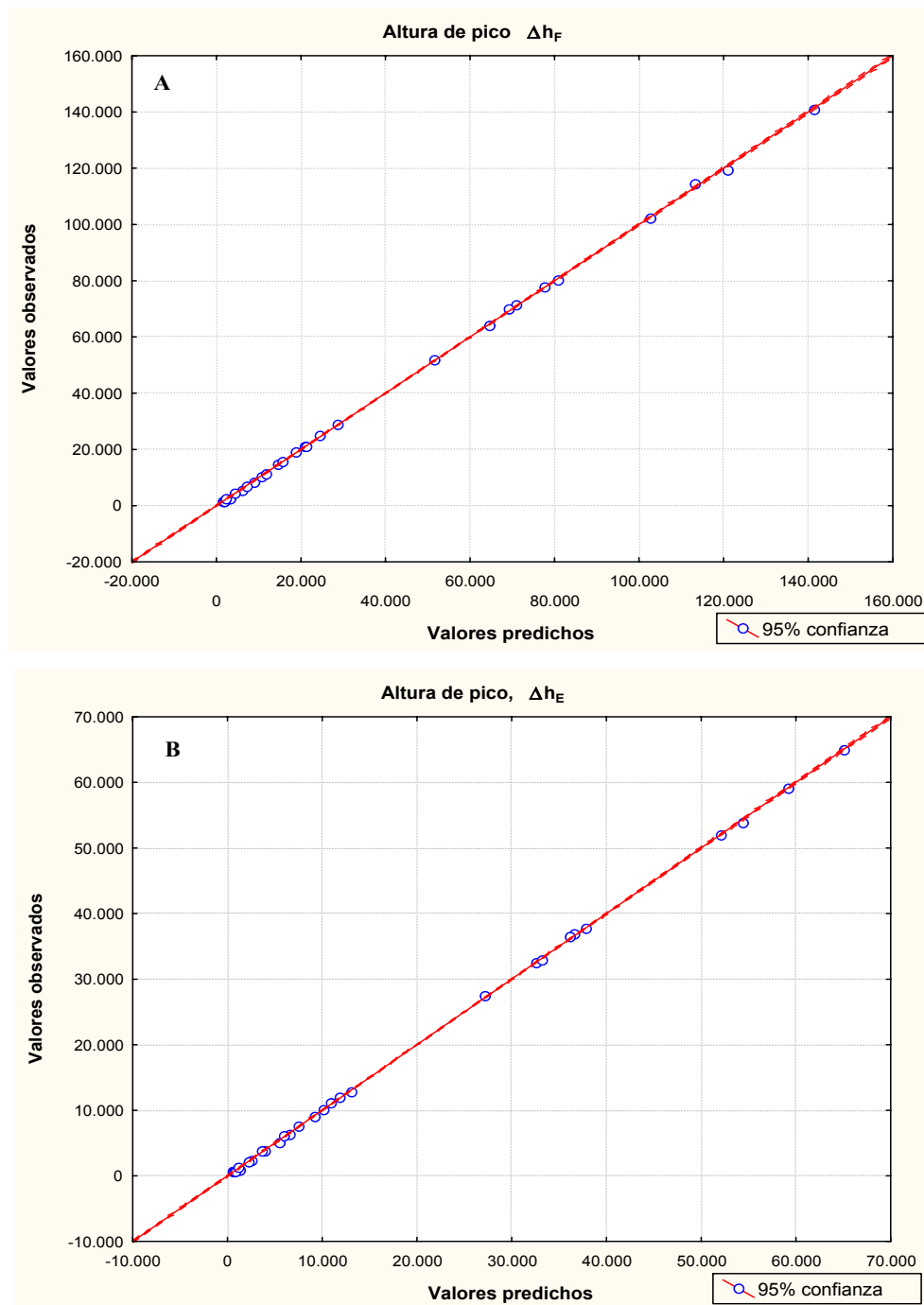


Figura II-6

Valores de altura de pico observados frente a predichos para muestras de 3HB y 3HV.

A) Δh_F ; B) Δh_E .

4. DETERMINACIÓN DE 3HB Y 3HV EN DEGRADADOS DE BIOPOLÍMEROS COMERCIALES

El procedimiento descrito se aplicó a la determinación de 3HB y 3HV en disoluciones procedentes de PHAs degradados mediante digestión propanólica seguida de hidrólisis alcalina.

4.1. Descripción de las muestras

Se utilizaron tres muestras de bioplásticos comerciales suministradas por Goodfellow ([Figura II-7](#)) a las que se denominó BP-1, BP-2 y BP-3:

- Una de las muestras (BP-1), estaba descrita como biopolímero polihidroxibutirato/polihidroxivalerato 12% (PHB88/PHV12) gránulos, 5 mm de tamaño nominal, bolitas plastificadas 10 % (éster cítrico)
- El segundo producto (BP-2) se describía como biopolímero-polihidroxibutirato (PHB), lámina, 1,35 mm de espesor, grado técnico.
- La etiqueta del tercer producto (BP-3) describía un biopolímero-polihidroxibutirato (PHB), tela no tejida, 0,125 mm de espesor, grado investigación.

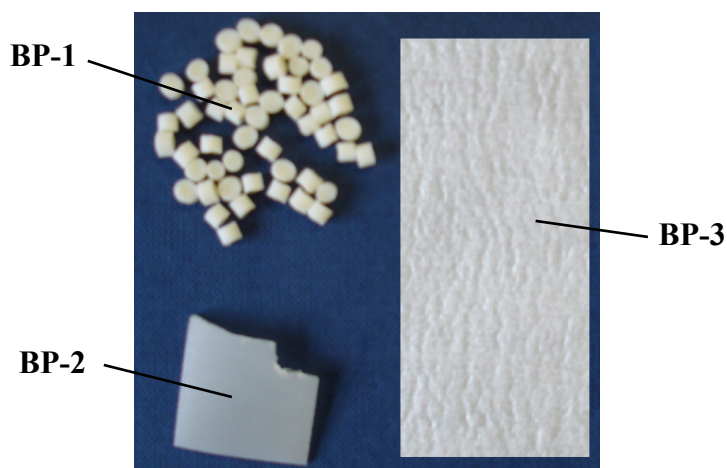


Figura II-7

Muestras comerciales de PHAs.

4.2. Análisis de las muestras mediante RMN

Como la información proporcionada con los productos comerciales era incompleta o ambigua, se procedió a su análisis mediante RMN para estimar su composición. Para ello, se disolvió una pequeña cantidad de cada producto (~ 10 mg) en 1 mL de cloroformo deuterado y se registró el espectro RMN-¹H de las disoluciones resultantes en un espectrómetro Varian 200 VX a 200 MHz. En la [Figura II-8](#) se muestran los espectros correspondientes a las muestras BP-1 y BP-2. El de la muestra BP-3 era similar al de BP-2.

Las señales observadas en los espectros de las tres muestras y su asignación se resumen en la [Tabla II-6](#). En los espectros de las tres muestras se observaron señales correspondientes a los protones a-g de las unidades de hidroxibutirato e hidroxivalerato. Las muestras BP-2 y BP-3 presentaban únicamente estas señales, mientras que en la muestra BP-1 se observaron además otras que se asociaron con la presencia del plastificante. Éste fue identificado como O-acetilcitrate de tributilo (ACTB), un plastificante habitual en los PHAs comerciales. Según los espectros, las muestras BP-2 y BP-3 eran en realidad copolímeros PHB/PHV (o mezclas de los homopolímeros) y no simplemente PHB como aparentemente se desprendía de la descripción comercial de los productos. Utilizando la proporción entre las señales correspondientes a los grupos metilo de PHB y de PHV (protones c y g), se encontró para las muestras BP-2 y BP-3 una relación molar PHB:PHV de 4,2:1 y 4,1:1, respectivamente. Para la muestra BP-1 se encontró una relación molar PHB:PHV de 7,6:1. Esta relación se estimó igualmente a partir de las señales correspondientes a los grupos metilo de PHB y PHV, teniendo en cuenta el solapamiento de estas señales con las del plastificante, solapamiento que fue evaluado a partir de las señales no solapadas del mismo.

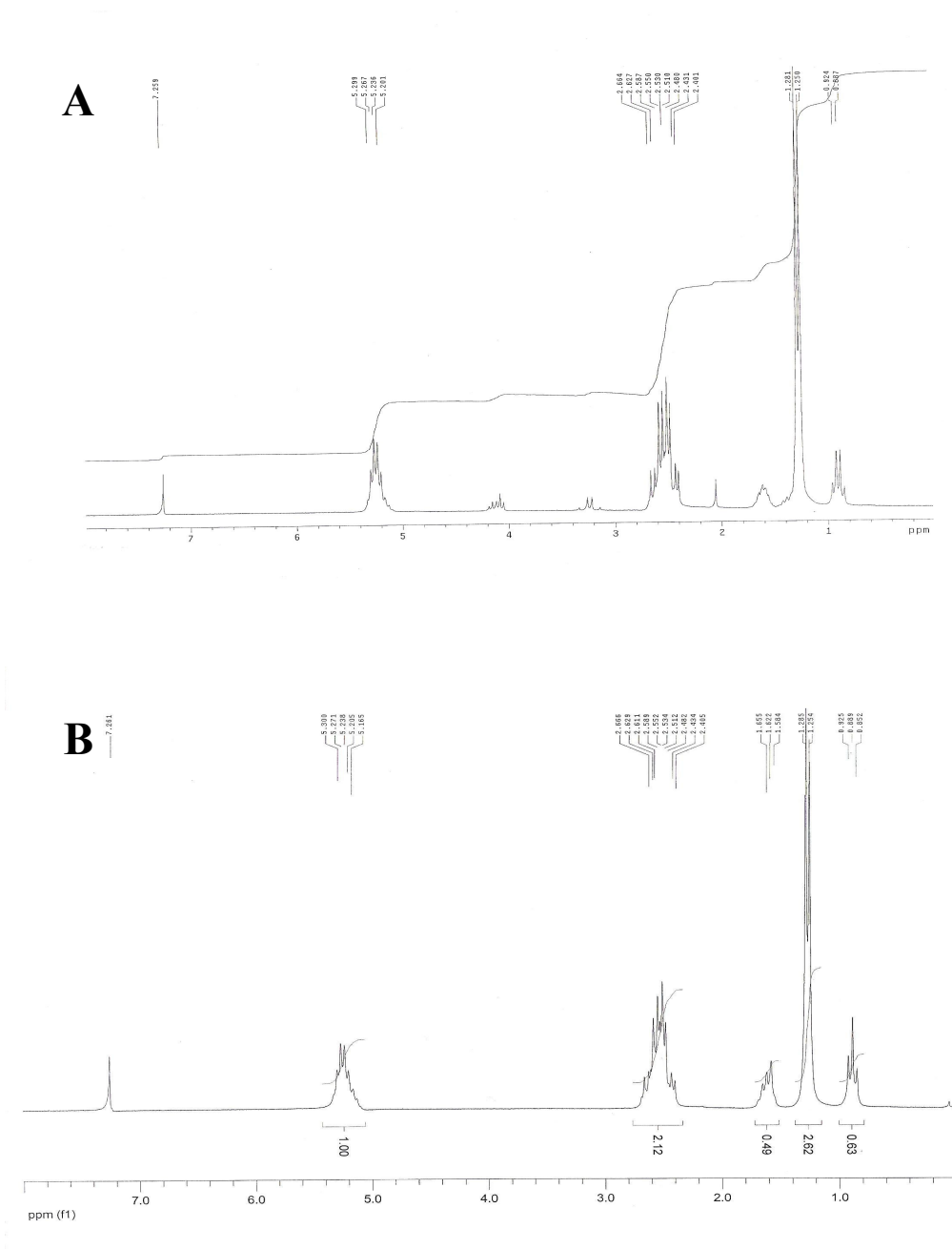


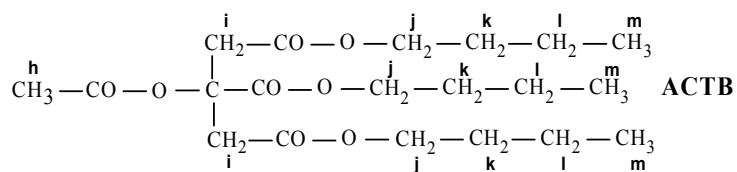
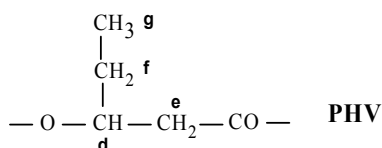
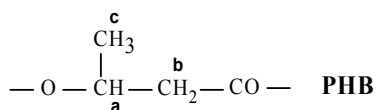
Figura II-8

Espectros RMN-¹H de las muestras.

A) BP-1 y B) BP-2.

Tabla II-6. Asignación de señales de los espectros RMN-¹H de las muestras.

Señal, δ (ppm)	Compuesto	Protones	Muestra
5,16 - 5,30	PHB, PHV	a, d	BP-1, BP-2, BP-3
2,40 - 2,67	PHB, PHV	b, e	BP-1, BP-2, BP-3
1,25 - 1,29	PHB	c	BP-1, BP-2, BP-3
1,58 - 1,66	PHV	f	BP-1, BP-2, BP-3
0,85 - 0,93	PHV	g	BP-1, BP-2, BP-3
2,05	ACTB	h	BP-1
3,18 - 3,32	ACTB	i	BP-1
4,10 - 4,13	ACTB	j	BP-1
1,51 - 1,71	ACTB	k	BP-1
1,26 - 1,40	ACTB	l	BP-1
0,83 - 1,00	ACTB	m	BP-1



4.3. Degradación de las muestras

La degradación de las muestras comerciales de PHAs se realizó mediante digestión propanólica seguida de hidrólisis alcalina. Según algunos trabajos publicados ([149,151](#)), la degradación de los polímeros PHB/PHV mediante propanolisis puede conducir a cantidades estequiométricas de los correspondientes ésteres propílicos de 3HB/3HV. Sin embargo, la cinética de la degradación y los productos generados pueden depender de la composición y cristalinidad de los polímeros (porcentaje de PHV, presencia de plastificantes) o simplemente de las condiciones (medio ácido, tiempo de digestión, temperatura, etc.) aplicadas durante el proceso de degradación ([143,144](#)). Los ésteres producidos en la propanolisis fueron hidrolizados en medio básico originando los correspondientes monómeros 3HB y 3HV.

Procedimiento de degradación

Una cantidad adecuada (20-40 mg) de la muestra comercial se disolvió en 1 mL de cloroformo en un matraz de fondo redondo de 100 mL, evaporando a continuación el cloroformo por calentamiento en baño de agua a 40 °C. Sobre el residuo se añadieron 4 mL de propanol y 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y la mezcla se calentó durante 3 h a 90 °C en un sistema de reflujo para llevar a cabo la propanolisis. Desmontado el reflujo, se añadieron 80 mL de agua para diluir y enfriar el contenido del matraz. A continuación se añadieron 4 mL de hidróxido sódico 5 M y se dejó reposar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente para llevar a cabo la hidrólisis de los ésteres propílicos. Finalmente, la mezcla se neutralizó con ácido clorhídrico hasta pH 7, se traspasó a un matraz aforado de 100 mL y se enrasó con agua.

4.4. Análisis de los degradados

Las disoluciones acuosas obtenidas tras el proceso de degradación descrito fueron analizadas según el procedimiento y condiciones experimentales propuestas para la determinación simultánea de 3HB y 3HV.

Previamente al análisis se investigó la posible interferencia de los ácidos crotonico y cítrico; el primero por ser un producto frecuente en otros procesos de degradación de PHB, y el segundo por tratarse de un componente de la muestra BP-1.

Por un lado, se consideró la posible interferencia de estos compuestos por su contribución a las señales medidas. Con este fin, se prepararon disoluciones hasta $1,5 \times 10^{-4}$ M de ácido cítrico a pH 8,3 y se inyectaron en el sistema con las condiciones propuestas. El mismo experimento se repitió con disoluciones de ácido crotonico. Como en ningún caso se registraron señales medibles, se descartó este tipo de interferencia para ambos compuestos.

Por otro lado, se consideró también la posible interacción de los ácidos cítrico y crotonico con 3HB o 3HV. Para ello se prepararon disoluciones $2,0 \times 10^{-5}$ M de 3HB a pH 8,3 sin y con ($1,5 \times 10^{-4}$ M) ácido cítrico. Las disoluciones recién preparadas se dejaron reposar durante 1 h a temperatura ambiente y después se analizaron según el procedimiento propuesto. El experimento se repitió con disoluciones de 3HB con y sin ácido crotonico y con disoluciones de 3HV. Como no se observaron diferencias significativas entre las señales de muestras sin y con ácido cítrico o ácido crotonico, se descartó también la posible interacción de estos compuestos con 3HB o 3HV.

Dado que el proceso de degradación aplicado no aseguraba la transformación cuantitativa de PHB y PHV en 3HB y 3HV, para validar la aplicación del procedimiento propuesto se llevaron a cabo experimentos con adición estándar. Para ello se mezclaron volúmenes adecuados de los degradados y de disoluciones patrón y la mezcla, una vez diluida con agua se inyectó en el sistema de flujo con las condiciones propuestas. Los experimentos realizados y los resultados obtenidos se resumen en la [Tabla II-7](#). Todos los valores de concentración de esta tabla están referidos a las disoluciones inyectadas. Las concentraciones estimadas se calcularon a partir del análisis inicial de RMN suponiendo una conversión completa de PHB/PHV en 3HB/3HV.

La comparación de las concentraciones encontradas con los valores estimados indica que la conversión de PHV en 3HV es aparentemente completa en todas las muestras, mientras que la de PHB en 3HB es cuantitativa únicamente en la muestra BP-1. La diferente degradación de las muestras se debe seguramente a su diferente composición y estructura; en comparación con BP-1, por ejemplo, BP-2 y BP-3 son polímeros no plastificados y con una proporción más alta de PHV.

Independientemente del grado de conversión o de la posible cinética de degradación, las concentraciones de 3HB y 3HV encontradas en todos los experimentos están en concordancia con las adiciones estándar efectuadas. Por tanto, los resultados indican que el procedimiento propuesto es adecuado para diferenciar las concentraciones de 3HB y 3HV producidas en la degradación de los PHAs analizados.

Tabla II-7. Análisis de PHAs comerciales degradados químicamente. Concentraciones estimadas, añadidas y encontradas en las muestras analizadas.

Muestra	Concentración ^a , Mx10 ⁵					
	Estimada		Añadida		Encontrada ^b	
	HB	HV	HB	HV	HB	HV
BP-1	5,23	0,69	--	--	5,2±0,2	0,8±0,2
BP-1			1,00	--	6,2±0,2	0,7±0,2
BP-1			--	1,47	5,3±0,2	2,1±0,2
BP-2	3,23	0,77	--	--	2,9±0,1	0,7±0,2
BP-2			1,00	--	3,9±0,1	0,6±0,2
BP-2			--	1,47	3,0±0,1	2,0±0,2
BP-2			1,00	1,47	3,9±0,1	2,2±0,2
BP-3	2,56	0,62	--	--	2,1±0,1	0,7±0,2
BP-3			1,00	--	3,0±0,1	0,9±0,2
BP-3			--	1,47	2,3±0,1	2,1±0,2
BP-3			1,00	1,47	3,2±0,1	2,3±0,2

^a: Valores referidos a las disoluciones inyectadas.

^b: Media de 3 determinaciones para un nivel de confianza del 95%.

5. CONCLUSIONES II

El interés del trabajo realizado en el Capítulo II puede resumirse en los siguientes puntos:

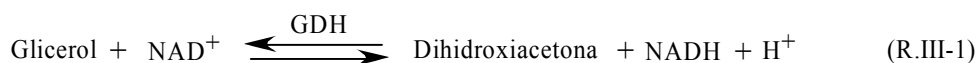
- Se ha puesto a punto un método enzimático que permite la determinación simultánea e individualizada de 3HB y 3HV en concentraciones superiores a 1×10^{-6} M con una frecuencia media de muestreo de 20 h^{-1} .
- A diferencia de los métodos existentes, el que aquí se propone permite la determinación directa, sin separación previa, de 3HB y 3HV en muestras de matriz compleja. El método es una buena alternativa a los métodos cromatográficos y permite evitar los procesos previos de extracción con disolventes organoclorados habituales en estos métodos.
- El método que se propone tiene potencial interés en numerosos campos ya que puede proporcionar información sobre la composición, estructura y degradación (velocidad y mecanismo) de los PHAs, aspectos que suelen condicionar las aplicaciones de estos biopolímeros. La aplicabilidad del método ha sido demostrada a través de la determinación de 3HB y 3HV en los digeridos de algunos PHAs comerciales degradados químicamente.

CAPÍTULO III

Determinación de glicerol

1. OBJETO Y FUNDAMENTO DEL TRABAJO

El objetivo de los trabajos del presente capítulo es el establecimiento de un método para la determinación de glicerol y su aplicación al seguimiento de la concentración de este compuesto en un proceso de fermentación de glucosa por la cepa mutante HC42 de la levadura *Saccharomyces cerevisae*. Esta cepa tiene una elevada capacidad de transformación de glucosa en glicerol (relación molar 1:1, aproximadamente), y esto da lugar a cambios rápidos en la concentración de glicerol, pero también en la composición de la matriz. Se requiere, por tanto, un método de determinación de glicerol rápido y exacto, que evite el efecto de la matriz. Para satisfacer estos requerimientos se propone un método enzimático basado en la siguiente reacción, catalizada por la enzima glicerol deshidrogenasa (GDH):



Se mide espectrofotométricamente la concentración de NADH generada, concentración que, en condiciones adecuadas, es proporcional a la concentración de glicerol.

La reacción se lleva a cabo con la enzima en disolución en un sistema de Análisis por Inyección Secuencial (SIA) portátil en el que las medidas se efectúan en condiciones cinéticas. El uso conjunto de la reacción enzimática, de condiciones cinéticas y de la técnica SIA permite medidas rápidas y selectivas. La utilización de la enzima disuelta permite además superar los inconvenientes de otros métodos similares basados en el uso de biosensores con enzimas inmovilizadas, dispositivos que pueden resultar poco estables y reproducibles cuando se aplican a medias continuadas como es el caso del seguimiento de un proceso de fermentación. En definitiva, el procedimiento que se propone satisface los requerimientos necesarios para el seguimiento "on line" del proceso fermentativo y es además respetuoso con el medio ambiente debido al bajo consumo de reactivos y a la escasa generación de residuos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. ANÁLISIS POR INYECCIÓN SECUENCIAL. COMPARACIÓN FIA/SIA

El Análisis por Inyección en Flujo (FIA) y el Análisis por Inyección Secuencial (SIA) son las metodologías más relevantes de análisis automatizado con flujo controlado (163).

La aparición de la técnica FIA, propuesta por RUZICKA y HANSEN en 1975 (54,55), representó un avance importante en la Química Analítica debido a sus ventajas en comparación con los procedimientos en discontinuo (facilidad de automatización, preparación de las muestras y manipulación, aumento de la frecuencia de muestreo, bajo coste de la instrumentación, etc.). Sin embargo, esta técnica presenta también algunos inconvenientes como son la complejidad de los sistemas de flujo, o los elevados consumo de reactivos y volumen de residuos generados. Estos inconvenientes fueron superados en mayor o menor medida con la introducción en 1990 (164) del SIA, técnica que puede considerarse como la segunda generación de las técnicas basadas en la inyección en flujo (165).

El SIA se basa en un sistema de flujo en el que la muestra y los reactivos son aspirados de forma secuencial, mezclados por difusión y transportados hacia el detector. Un sistema SIA (Fig. III.1) está compuesto básicamente por una bomba peristáltica o una bomba de pistón bidireccional, una válvula de selección o válvula multipuertos, la cual posee un puerto central conectado a la bomba impulsora de líquidos, y puertos laterales conectados a los recipientes de reactivos y muestra y al detector. En el SIA se aspiran de forma secuencial volúmenes precisos de muestra y reactivos que son transportados, mediante una disolución portadora, hacia un bucle de carga donde permanecen en contacto hasta que se envían al detector a través de un bucle de reacción o reactor.

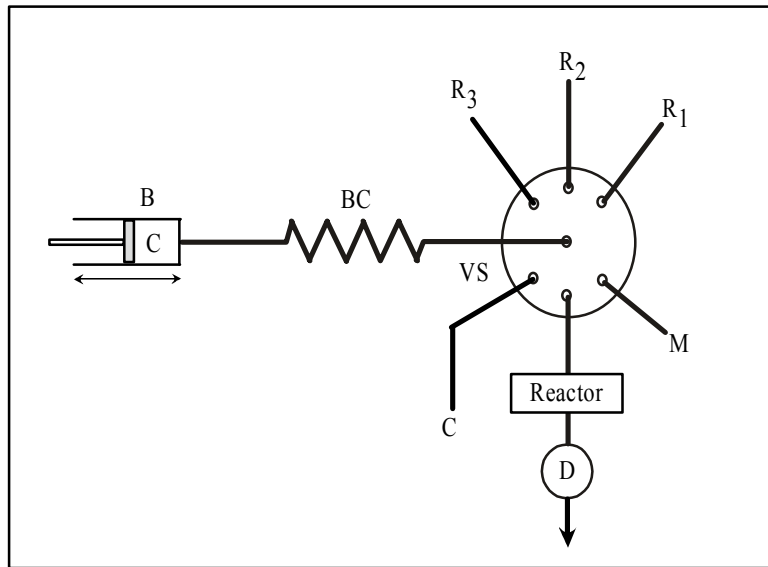


Figura III-1

Esquema general de un sistema SIA.

B: bomba; BC: bucle de carga; VS: válvula de selección; C: portador; M: muestra;
R₁, R₂ y R₃: reactivos; D: detector.

El transporte del contenido del bucle de carga hacia el detector se realiza en el sentido inverso de flujo, lo que provoca la mezcla entre muestra y reactivos para dar lugar a la formación del producto de reacción que permitirá la detección de la propiedad seleccionada. De esta forma se favorece la mezcla mediante dispersión de los reactivos y la muestra, factor que puede influir en la sensibilidad. La zona de penetración de la muestra es el parámetro más importante en el diseño de un sistema SIA. La aspiración de las disoluciones se controla por medio de un programa informático que permite la modificación de las variables operativas sin la necesidad de modificar la configuración del sistema de análisis.

La diferencia principal entre las metodologías FIA y SIA radica en la forma en la que las muestras y los reactivos se mezclan dentro de los tubos ([Figura III-2](#)). Mientras en FIA la mezcla puede ser completa en los puntos de confluencia, en SIA la mezcla eficiente es más difícil de alcanzar. En SIA la mezcla tiene lugar únicamente en la interfase de contacto entre la zona de la muestra y el reactivo. Incluso después de la inversión del sentido de bombeo, la superposición de muestra y reactivo es sólo parcial y esta limitación afecta especialmente a

las aplicaciones con varias disoluciones de reactivos. Por otro lado, la manipulación secuencial de las disoluciones conduce a una disminución del número de determinaciones. En algunos trabajos, estos inconvenientes se han superado incorporando una válvula de inyección y una bomba adicional para aumentar la la frecuencia de muestreo (166).

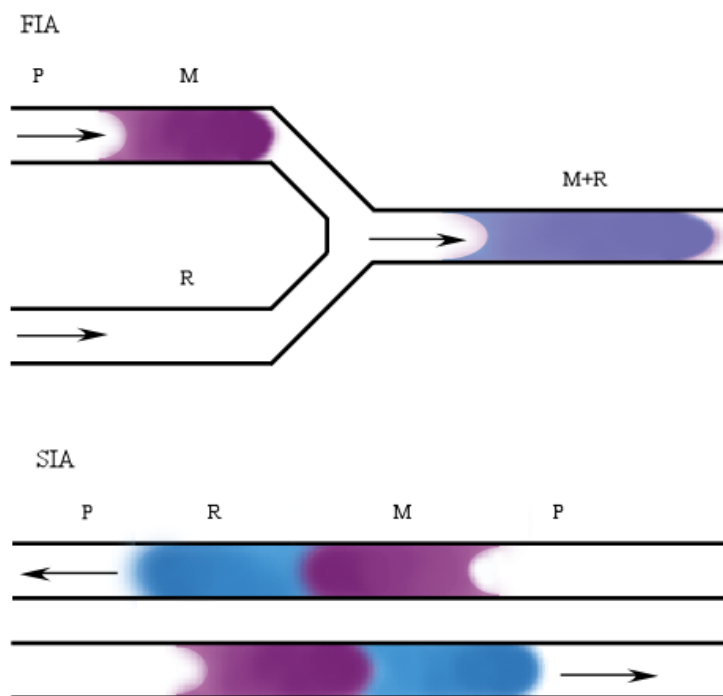


Figura III-2

Modelo de mezcla en sistemas FIA y SIA

P: portador; M: muestra; R: reactivo.

Entre las ventajas del SIA cabe destacar que los sistemas de flujo son más universales que los del FIA ya que en un mismo sistema SIA se pueden llevar a cabo diferentes determinaciones, sin la necesidad de cambiar el diseño del sistema de flujo, simplemente mediante la reconfiguración de la secuencia de introducción de los reactivos (166). Además, dado que en SIA el sistema sólo funciona cuando se llevan a cabo las medidas, el consumo de muestra y reactivos es muy bajo y la generación de residuos mínima. En FIA la frecuencia

de muestreo es más alta pero también lo es la generación de residuos y el consumo de disoluciones de muestra y reactivos debido al bombeo continuo de los mismos.

En la Tabla ([Tabla III-1.](#)) se resumen y comparan las ventajas e inconvenientes de ambas técnicas:

Tabla III-1. Algunas ventajas e inconvenientes de las técnicas FIA y SIA.

SIA		FIA	
Ventajas	Inconvenientes	Ventajas	Inconvenientes
Sistema de flujo simple y universal			Sistemas de flujo complejos
Bajo consumo de muestras y reactivos	Manipulación secuencial: baja frecuencia muestreo	Alta frecuencia de muestreo	Sistema de flujo distinto para cada análisis
Residuos mínimos	Mezcla limitada	Mezcla extensa	Mayor consumo de muestras y reactivos
Automatización total			Mayor volumen de residuos

Numerosos estudios publicados en los que se usa la técnica SIA muestran que es útil para determinar una gran variedad de analitos en diferentes matrices: alimentos, bebidas, bioprocesos, muestras medioambientales, fármacos, procesos industriales, etc. ([163,167,168,169,170,171,172,173](#)).

2.2. GLICEROL: ANTECEDENTES

2.2.1. Propiedades

El glicerol ($C_3H_8O_3$), glicerina, 1,2,3-propanotriol o 1,2,3-trihidroxiopropano, es un líquido incoloro, viscoso y de sabor dulce. Es un compuesto higroscópico muy soluble en medio acuoso en el que se estabiliza por una combinación de enlaces por puentes hidrógeno intramoleculares e intermoleculares de los grupos de hidróxilo (174). En la [Tabla III-2](#) se muestran algunas de sus propiedades físicas. El glicerol es potencialmente peligroso ya que al arder, al contacto con oxidantes fuertes o con superficies calientes (su punto de inflamación es 160 °C) o bajo la influencia de sustancias higroscópicas puede originar acroleína (2-propenol), un compuesto de carácter tóxico. La inhalación de pequeñas cantidades de acroleína produce lagrimeo, ardor de nariz y garganta y reducción del ritmo respiratorio. En dosis elevadas, la acroleína daña los pulmones y puede producir la muerte. Al reaccionar con oxidantes fuertes, el glicerol presenta riesgo de incendio y explosión (175).

Tabla III-2. Propiedades físicas del glicerol

Propiedad	Valor
Masa molecular relativa	92,09 g mol ⁻¹
Color	Incoloro
Olor	Sin olor
Punto de fusión	18,2 °C
Punto de ebullición	290 °C
Densidad a 20 °C	1,261 g mL ⁻¹
Viscosidad a 20 °C	1,5 Pa s

2.2.2. Uso y producción industrial

El glicerol se utiliza ampliamente en campos industriales como la automoción, pinturas, tabaco, papel, cuero y textil (176). En el campo alimentario, este compuesto forma parte de alimentos y bebidas como humectante, disolvente, edulcorante bajo en calorías, espesante y estabilizante. Tiene también usos médicos, farmacéuticos y cosméticos como componente de productos suavizantes, lubricantes o humectantes en laxantes, jarabes, cremas, jabones, tintes y productos de maquillaje. Otras aplicaciones incluyen su utilización en baños calefactores (temperaturas > 250 °C), como anticongelante y como lubricante de máquinas de producción de alimentos y medicamentos por ser una sustancia no tóxica (177).

El glicerol es el punto de partida para la síntesis de compuestos como etanol, acroleína, polioles (principalmente 1,3-propanodiol), mono- y di-glicéridos (emulsionantes), compuestos quirales, epiclorhidrina o nitroglicerina (explosivos), con gran interés en la industria química o médica (178,179).

A nivel de laboratorio, el glicerol es un componente común de los disolventes para reactivos enzimáticos almacenados a temperaturas bajo cero y también en los preparados congelados de organismos de laboratorio (bacterias, nematodos, etc.) en los que reduce el daño causado por los cristales de hielo.

El glicerol es un compuesto natural que se origina como producto secundario de la fermentación alcohólica. Se encuentra además en todos los aceites y grasas animales y vegetales en forma de triglicéridos que son triésteres de ácidos carboxílicos de cadena larga (ácidos grasos). Mediante la hidrólisis de estos ésteres en medio básico se obtiene glicerol y jabón. El glicerol, combinado en forma de fosfolípidos, está presente en todas las células animales y vegetales como parte de su membrana celular.

A nivel industrial, el glicerol se sintetiza a partir de propeno. Éste es clorado para formar cloruro de alilo que, tras un tratamiento con hipoclorito seguido de hidrólisis básica, se transforma en epiclorihidrina, un epóxido que al hidrolizarse origina glicerol.

Otra forma tradicional de producción de glicerol es su recuperación como subproducto en el proceso de fabricación de jabón a partir de grasas.

En la actualidad, y debido al creciente desarrollo de los biocombustibles, existe un exceso de producción de glicerol (180) ya que éste se obtiene como principal subproducto en la fabricación de biodiesel, en concentraciones entre 10-40% (181). El biodiésel es un combustible no contaminante que se obtiene a partir de aceites vegetales y grasas animales originales o recicladas. La transesterificación de estos aceites y grasas por tratamiento con metanol y medio alcalino conduce a una mezcla combustible, el biodiésel, y a glicerol que se separa lentamente por decantación. La presencia de otros productos secundarios mezclados con el glicerol condiciona el uso posterior de éste en diversas aplicaciones y esto puede limitar el interés del proceso global de producción de biodiesel (179).

Una alternativa a la producción industrial de glicerol es la fermentación. En comparación con la síntesis tradicional a partir de propeno, la vía fermentativa era inicialmente poco competitiva, debido principalmente elevado coste y al bajo rendimiento de los procesos, ya que el porcentaje de glicerol producido era muy pequeño. La escasez y encarecimiento de las materias primas procedentes del petróleo, el interés por el cuidado del medio ambiente y el desarrollo de microorganismos genéticamente modificados para mejorar el rendimiento han llevado a que la obtención industrial de glicerol por fermentación sea en la actualidad una alternativa de gran interés.

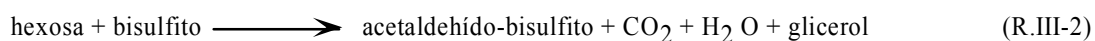
Aunque la producción de glicerol puede involucrar diferentes tipos de microorganismos, incluyendo algas y bacterias, los principales procesos se basan en fermentaciones de azúcares con levaduras, especialmente con cepas modificadas de *Saccharomyces cerevisiae*. El glicerol es el subproducto cuantitativamente más importante de la fermentación de glucosa por medio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (182). Bajo condiciones de fermentación normales, el glicerol se produce vía el exceso de NADH (183). La síntesis de

glicerol permite a la célula el uso del NADH producido en exceso durante la glicólisis para mantener el balance redox, o para hacer frente a las fuertes presiones osmóticas. Los carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa, etc.) son las principales fuentes de carbono y los alcoholes, glicoles y ácidos orgánicos son los principales productos (184). Estos cultivos de fermentación se utilizan en la elaboración de bebidas alcohólicas, de productos bioterapéuticos y de biocombustibles.

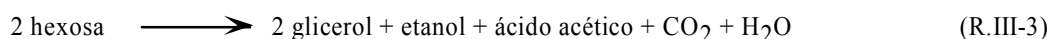
La cantidad de glicerol producida por una cepa natural del *S. cerevisiae* puede alcanzar 10 g L⁻¹ bajo condiciones anaerobias (185). La cepa genéticamente modificada *S. cerevisiae* HC42 utilizada en los trabajos del presente capítulo es capaz de producir cerca de 50 g/l de glicerol a partir de 100 g/l de glucosa.

Para incrementar el rendimiento en la producción de glicerol mediante fermentación con levaduras, naturales o genéticamente modificadas, se sigue alguna de las siguientes estrategias:

1. *Fermentaciones en presencia de bisulfito*. En la ruta de la fermentación alcohólica, el bisulfito forma un compuesto muy estable con acetaldehído. Esto retarda la formación de etanol haciendo que el proceso fermentativo se desvíe hacia la formación de glicerol:



2. *Fermentaciones a pH básico*. En estas condiciones, parte del acetaldehído de la ruta fermentativa se oxida a ácido acético, dando como resultado la siguiente reacción, que se solapa con la fermentación alcohólica y que conduce a una mayor producción de glicerol:



3. *Fermentaciones con levaduras osmotolerantes*. Estudios realizados con estas levaduras, capaces de desarrollarse en medios con elevado contenido de solutos (azúcares),

han demostrado que algunas especies pueden producir concentraciones muy elevadas de glicerol en comparación con las fermentaciones de los dos apartados anteriores.

2.2.3. Métodos de determinación

De lo expuesto en el apartado precedente, se deduce que la determinación de glicerol tiene interés en los siguientes campos:

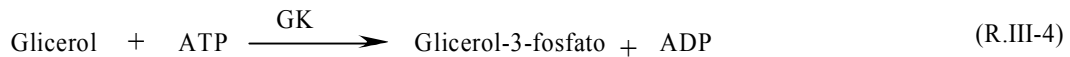
- En química clínica y medicina, en el análisis de triglicéridos, para corregir de la interferencia del glicerol presente en numerosos materiales y suero.
- En alimentación, como aditivo alimentario y parámetro de calidad de bebidas alcohólicas como el vino.
- En las industrias de automoción, pintura, tabaco, papel, cuero, cosmética, textil, explosivos, etc., por su extendido uso como humectante, disolvente, espesante, estabilizante, emulsionante, suavizante y lubricante o como fuente de productos químicos sintéticos.
- En el seguimiento de la producción de glicerol por fermentación, para optimizar el rendimiento de los procesos.
- En el seguimiento de las biotransformaciones de glicerol en dihidroxiacetona, por fermentación con bacterias, para optimizar el rendimiento de los procesos.
- En el seguimiento de los procesos de obtención de biodiesel, en los que la producción de glicerol supone un importante valor añadido como fuente de productos obtenidos a partir de materiales renovables.

El análisis rutinario de glicerol se lleva a cabo mediante diferentes métodos basados en la oxidación de este compuesto con peryodato ([168,186,187,188,189,190,191,192](#)) o su electrooxidación ([193](#)) y con gran variedad de métodos cromatográficos que incluyen cromatografía en capa fina ([194](#)), cromatografía de permeación en gel ([195](#)), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ([196,197,198,199,200,201,202,203](#)), cromatografía de

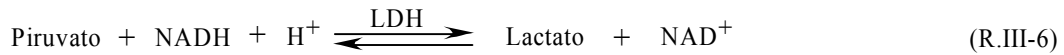
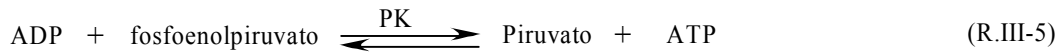
gases con detección por ionización de llama (GC-FID) o espectrometría de masas (GC-MS) ([204,205,206](#)) y cromatografía de fluidos supercríticos ([207](#)). Se ha propuesto también un método de electroforesis capilar con detección UV ([192](#)), y otros basados en espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) ([208](#)) o resonancia magnética nuclear (MNR) ([209](#)).

Sin embargo, cuando las muestras presentan una matriz compleja y altas señales de fondo, se prefieren generalmente los métodos enzimáticos, más selectivos. En la ([Tabla III-3.](#)) se resumen los métodos enzimáticos más representativos utilizados en la determinación de glicerol. Considerando las reacciones utilizadas, estos métodos se pueden clasificar en alguno de los tres grupos siguientes:

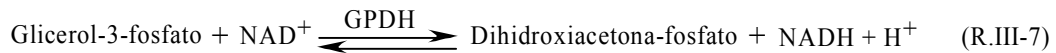
En el primero de ellos ([177,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222](#)), la reacción base es la fosforilación de glicerol, catalizada por la enzima glicerol kinasa (GK). A esta reacción pueden acoplarse otras (opciones a, b y c) que afectan al glicerol-3-fosfato o al adenosina difosfato (ADP) generados y que están catalizadas por las enzimas piruvato quinasa (PK), lactato deshidrogenasa (LDH), glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) o glicerol-3-fosfato oxidasa (GPO). Se mide directa o indirectamente NADH o H₂O₂ con diferentes tipos de detección.



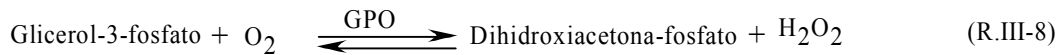
a)



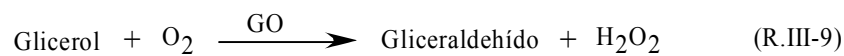
b)



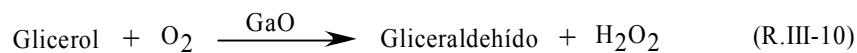
c)



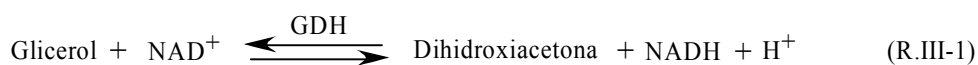
En el segundo grupo de métodos se utiliza la oxidación de glicerol a gliceraldehído, catalizada por la enzima glicerol oxidasa (GO).



Se mide el H_2O_2 generado, directamente por amperometría, o indirectamente por espectrofotometría o con detección por quimiluminiscencia tras el acoplamiento con otras reacciones indicadoras, enzimáticas o no enzimáticas. Estos métodos son escasos ([223](#)) ya que la enzima GO no se produce a nivel comercial. Un método similar se basa en la misma oxidación a gliceraldehído, pero catalizada por la enzima galactosa oxidasa (GaO) ([224](#)).



El tercer grupo es el más numeroso ([166,177,222,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,218,237,238,239,240,241](#)) e incluye los métodos basados en la reacción de oxidación de glicerol con la coenzima NAD^+ , catalizada por la enzima glicerol deshidrogenasa (GDH):



El NADH originado se puede medir de forma directa por espectrofotometría o fluorimetría o indirectamente, tras el acoplamiento con otras reacciones indicadoras, enzimáticas o no enzimáticas.

Tabla III-3. Métodos enzimáticos para la determinación de glicerol

ENZIMA inmovilizada (in) o disuelta (dis)	SISTEMA	APLICACIÓN	REF.
GK/GPO (in)	Biosensor	Suero	210
GK/GPO (in)	Biosensor	Tabaco	211
GDH/NADHO (in)	FIA	Vino	226
GDH/NADHO (in)	FIA	Vino	225
GDH (in)	FIA	Bebidas alcohólicas	227
GDH/NADHO (in)	FIA	Vino	228
GK/GPO (in)	Biosensor/FIA	Fermentación alcohólica	212
GaOD (in)	Biosensor/FIA	Alimentos y sangre	224
GDH (in)	SIA	Vino	231
GDH (in)	Biosensor	Extractos vegetales	229
GDH (in)	FIA	Vino	230
GDH (in)	Biosensor	Bebidas	233
GDH(in)	Biosensor/FIA	Alimentos	232
GK (in)	FIA	Fermentador de glicerol	214
GK/GPO (dis)	SIA	Fermentación	213
GDH (in)	SIA	Vino	166
GDH (in)	Biosensor/FIA	Bebidas alcohólicas	235
GDH (in)	Biosensor/FIA	vino	234
GK/GPO (in)	FIA	Suero	215
GK/GPO (in)		Suero	216
GDH (in)	Sistema de flujo	Vino	236
GK/GPO (in)	FIA	Suero y fermentados	217
GK (in)	Biosensor/FIA	Fermentación de glicerol	221

GDH: glicerol deshidrogenasa; GK: glicerol quinasa; GPO: glicerol 3-fosfato oxidasa; GaO: galactosa oxidasa; NADHO: NADH oxidasa.

Tabla III-3. (Continuación). Métodos enzimáticos para la determinación de glicerol.

ENZIMA inmovilizada (in) o disuelta (dis)	SISTEMA	APLICACIÓN	REF.
GDH (dis)	SIA	Vino y cerveza	237
GK/GPO (dis)		Dializados	220
GK/GPO (in)	Biosensor	Vino	219
GDH/DP (in)	Biosensor/FIA	Fermentación	218
GK/GOP (in)			
GDH (in)	Biosensor/FIA	Zumo de uva	239
GDH/NADHO (in)	Biosensor	Aceites vegetales	238
GDH/DP (in)	Biosensor/FIA	Fermentación	240
GDH/DP (in)			
GK/GPO (in)	Biosensor	Vino	222
GO (in)	Biosensor	Vino	223
GDH (in)	Biosensor	Fermentación	241

GDH: glicerol deshidrogenasa; GK: glicerol quinasa; GPO: glicerol 3-fosfato oxidasa; DP: diaforasa; NADHO: NADH oxidasa; GO: glicerol oxidasa

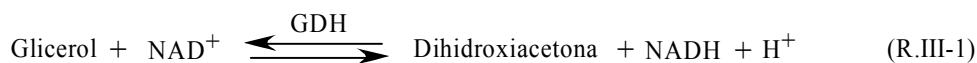
El resumen expuesto en la [Tabla III-3](#), indica que la mayor parte de los métodos enzimáticos recientes se aplican a la determinación de glicerol en bebidas alcohólicas como vino o cerveza o al seguimiento del contenido de este compuesto en procesos de fermentación.

Gran parte de los métodos propuestos se basan además en el uso de biosensores o, de forma más concreta, de electrodos enzimáticos amperométricos en los que una o más enzimas se mantienen inmovilizadas sobre diferentes soportes mediante diversos procedimientos de inmovilización. Estos biosensores pueden ser utilizados como sondas que, en contacto directo con la muestra evalúan la concentración de glicerol o su evolución a lo largo de un proceso de fermentación. Sin embargo, cuando se requieren análisis repetitivos, como es el caso del control continuo de un proceso, la estabilidad de los biosensores y la reproducibilidad de su respuesta es un aspecto clave. Según trabajos publicados ([177](#)), la

estabilidad de los biosensores en condiciones de operación continua puede variar desde unas pocas horas hasta varios días, aunque en condiciones de almacenamiento pueda ser de varios meses. En algunos casos, esta estabilidad resulta insuficiente para el seguimiento de un proceso, de ahí que se hayan propuesto otros métodos en los que las enzimas no forman parte de un biosensor sino que se utilizan inmovilizadas en reactores enzimáticos o, simplemente, en disolución. Por sus características, las técnicas FIA y SIA son especialmente indicadas para estos métodos.

En el trabajo expuesto en este capítulo se plantea el seguimiento de la concentración de glicerol en un proceso de fermentación de glucosa por la cepa mutante HC42 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (242), adaptada a concentraciones altas de glucosa. Esta cepa es el resultado de estrategias en ingeniería genética centradas en el cambio de dirección de flujos metabólicos y en la sobreexpresión de las enzimas dominantes de la ruta del glicerol para alcanzar la producción máxima de este compuesto. La cepa HC42 de *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de convertir 100 g/l de glucosa en 50 g/l de glicerol, lo que corresponde aproximadamente a una relación de transformación molar de 1:1. Esta gran capacidad de transformación dará lugar a cambios rápidos en la concentración de glicerol, pero también a una alta variación temporal de la composición de la matriz. Se requiere, por tanto, un método rápido y exacto, que corrija el efecto de la matriz. Para satisfacer estos requerimientos se ha elegido un método cinético enzimático.

La cuantificación de glicerol se basa en la reacción ya descrita, catalizada por la enzima glicerol deshidrogenasa:



Se mide espectrofotométricamente la concentración de NADH generada, concentración que será proporcional a la concentración de glicerol si NAD⁺ y GDH están en concentración suficientemente alta para mantener la reacción de pseudo-primer orden respecto al sustrato (217).

La reacción se lleva a cabo con la enzima en disolución en un sistema SIA portátil en el que las medidas se efectúan en condiciones cinéticas. El procedimiento propuesto satisface los requerimientos necesarios para el seguimiento “on line” del proceso fermentativo y es además respetuoso con el medio ambiente debido al bajo consumo de reactivos y a la escasa generación de residuos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REACTIVOS, APARATOS Y MATERIAL

3.1.1. Reactivos

- **Dinucleótido de β -nicotinamida adenina**, forma oxidada, NAD⁺, grado II, 98% (Roche).
El reactivo sólido se mantiene refrigerado para evitar su degradación, mientras que la disolución de trabajo de NAD⁺ $1,5 \times 10^{-2}$ M se prepara diariamente.
- **Glicerol deshidrogenasa** (EC 1.1.1.6.) de *Cellulomonas sp.*, 70% proteína, 3,2 mg de sólido, 107 u mg⁻¹ de proteína (Sigma). La enzima es suspendida en 1 mL de sulfato amónico 3,2 M con pH ajustado a 7,5 y se almacena a 4 °C. La disolución de trabajo de la enzima (60 μ g mL⁻¹) se prepara diariamente disolviendo 70 μ L de la disolución refrigerada en 10 mL de fosfato potásico 0,05 M a pH 7,5.
- **Sulfato de amonio**, (NH₄)₂SO₄, PA, 99% (Merck).
- **Dihidrógeno fosfato potásico**, H₂KPO₄, PA, 99,5% (Merck).
- **Glicerol**, C₃H₈O₃, PA, 87%, d=1,23 g cm⁻³ (Merck). Se prepara una disolución stock de glicerol 1,0 M y a partir de esta disolución se preparan diariamente los patrones de trabajo de concentraciones entre 0,5 y 5,0 mM.
- **Bicarbonato sódico**, NaHCO₃, PA, 99% (Merck)
- **Carbonato sódico**, Na₂CO₃, PA, 99,9% (Merck).
- **Disolución tampón carbonato/bicarbonato 0,5 M, pH 10**. Se prepara disolviendo 5,3 g de Na₂CO₃ y 4,2 g de NaHCO₃ en 200 mL de agua y ajustando, si es necesario, el pH final a 10,0.
- **Tetraborato sódico decahidratado** (Borax), Na₂B₄O₇ 10H₂O, PA, 99% (Merck).
- **Azul de bromotimol** (BTB), C₂₇H₂₈Br₂O₅S, PA (Merck).
- **D(+)-Glucosa**, C₆H₁₂O₆, para fines bioquímicos (Merck).
- **Agua ultrapura**. Todas las disoluciones de trabajo se preparan con agua ultrapura hervida.

3.1.2. Muestras del biorreactor de fermentación

Las muestras se adquieren de un fermentador B-Braun modelo Biostat-MD con volumen de trabajo de 2 L, a intervalos regulares de tiempo y son analizadas una vez realizada la dilución adecuada con agua ultrapura hervida. El medio de síntesis utilizado para el cultivo de la levadura contiene, por litro de agua desionizada: 1,7 g de base de nitrógeno para levaduras Bacto (Difco) sin aminoácidos ni $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 g de glucosa, 0,02 g de L-arginina, 0,05 g de treonina, 0,04 g de L-triptófano, 0,06 g L-iso-leucina, 0,04 g de lisina, 0,01 g de metionina, 0,06 g de fenilalanina, 0,05 g de tirosina, 0,01 g de adenina y 0,01 g de uracilo. Los cultivos aeróbicos se realizan por lotes a 30 °C con agitación continua a 150 rpm y con una velocidad de aireación de 0,5 (volumen de aire/volumen de líquido por minuto). El pH se mantiene a 6,5 mediante la adición automática de NaOH 1 M.

3.1.3. Aparatos y material

- **Bomba peristáltica** Minipuls 3 (Gilson) con selector de velocidad de rotación (0-40) y cambio del sentido del flujo. Se equipa con tubos de bomba de cloruro de polivinilo (Tygon) de 0,76 mm de diámetro interno. Esta configuración permite caudales de hasta $42 \mu\text{L s}^{-1}$. Para establecer con precisión el caudal de trabajo a través del selector de velocidad, se realiza un calibrado previo mediante pesada de la cantidad de agua bombeada durante 60 s en diferentes posiciones del selector.
- **Válvula de selección** VICI C15-3118E, de 8 puertos con activación electrónica (Valco).
- **Ordenador** 386 Samsung SD700 conectado a la bomba peristáltica y a la válvula de selección a través de una tarjeta de interfase Advantec PCL 818 L. Con este montaje, y mediante un programa de diseño propio escrito en lenguaje QuickBasic 4.5, se controla la

posición de los puertos en la válvula de selección y el sentido, tiempo y velocidad de rotación de la bomba peristáltica.

- **Tubos de teflón** de 0,8 mm de diámetro interno y conectores normalizados (Omnifit) para las conducciones de los diferentes puertos y para la conexión de la válvula de selección con la célula de flujo.
- **Espectrofotómetro Thermo-Spectronic Helios Gamma UV-Vis** equipado con una célula de flujo de 10 mm de paso óptico y 80 μL de volumen interno (Hellma) y conectado a un registrador Kipp & Zonen BD112.
- **Espectrómetro OceanOptics USB2000** ([Figura III-3.](#)) con CCD Array Detector que permite la medida simultánea a diferentes longitudes de onda. El espectrómetro se conecta mediante fibra óptica de 400 μm (modelo P400-2-UV-VIS) a la célula de flujo de 10 mm de paso óptico y 80 μL de volumen interno (Hellma) situada en un soporte específico Ocean Optics CUV ([Figura III-4.](#)). En combinación con este espectrómetro se utiliza una lámpara de deuterio-halógena Mikropack DH-2000-BAL conectada con el soporte a través de fibra óptica de 400 μm (P400-2-UV-VIS). La adquisición de la señal analítica a tiempo real se lleva a cabo mediante el programa OOIBase32 Spectrometer Operating Software instalado en un ordenador personal HP Compaq dc 5100 MT con sistema operativo XP Professional.



Figura III-3. Espectrómetro OceanOptics USB2000.

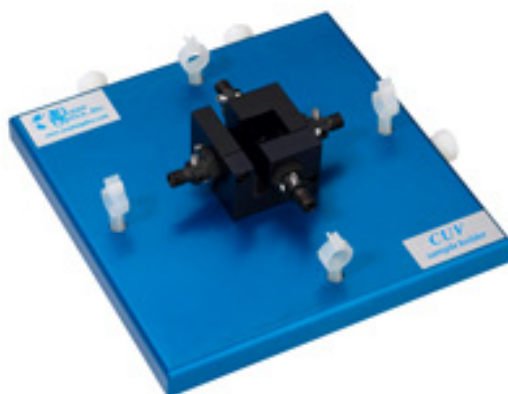


Figura III-4. Soporte de celda Ocean Optics CUV.

- **Cromatógrafo líquido de alta resolución** (Knauer) equipado con detector de índice de refracción WellChrom K-2301 y una columna Aminex HPX-87H de 300 mm x 7,8mm (Bio-Rad). Como fase móvil se utiliza H_2SO_4 1 mM con un caudal de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, volumen de inyección se utilizó $20 \mu\text{L}$ y la temperatura de la columna fue $30 \text{ }^\circ\text{C}$.
- **Equipo de fermentación** Biostat-MD, 2 L (B-Braun).
- **Baño termostático** GTR 190 (ISCO).

3.2. SISTEMA DE FLUJO Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El sistema de flujo de trabajo se muestra en la [Figura III-5](#). Mediante la bomba peristáltica (B) Las disoluciones de muestra (S) y reactivos NAD^+ (R_1) y enzima (R_2) son aspiradas secuencialmente y en el orden adecuado hasta el bucle de carga (BC). A continuación se invierte el sentido del flujo y se bombea una disolución tampón (C) de forma que el contenido del bucle da carga es arrastrado hacia el detector (D) a través del reactor de mezcla (RM). Cuando la mezcla de muestra y reactivos se encuentra en la célula del detector, se para el flujo y se mide el valor de absorbancia a 340 nm durante un determinado período de tiempo. Efectuadas las medidas, se reactiva la bomba peristáltica y la célula de flujo se lava con la disolución C quedando así lista para una nueva muestra.

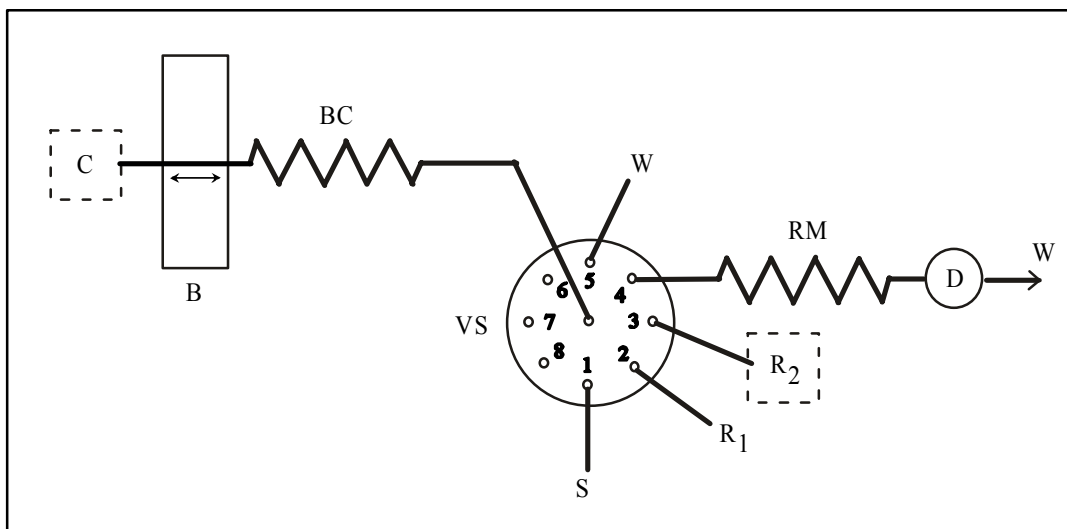


Figura III-5

Sistema de flujo propuesto para la determinación de glicerol.

B: bomba peristáltica; BC: bucle de carga; VS: Válvula de selección; RM: reactor de mezcla;
S: muestra o patrón; R_1 : reactivo NAD^+ ; R_2 : reactivo GDH; C: portador/ tampón; D: detector; W: desecho; los cuadrados punteados indican las disoluciones termostataadas.

En el sistema descrito, las longitudes de BC y de RM se fijaron en 200 cm y 100 cm respectivamente, siendo la longitud de los demás tubos conectados a la válvula de selección de 30 cm, aproximadamente.

Con estos valores prefijados, se estudió en primer lugar la secuencia de inyección, es decir, el procedimiento más adecuado para la aspiración de las disoluciones de muestra y reactivos, propulsión de la mezcla hasta el detector, parada de flujo y medida de la velocidad de reacción y proceso de lavado del sistema en cada determinación.

Una vez establecida la secuencia de inyección, se estudiaron algunas de las variables que afectan a la reacción enzimática (pH, concentraciones de NAD⁺ y de GDH y temperatura) proponiendo un procedimiento para la cuantificación de glicerol con los valores óptimos deducidos para estas variables. Tanto el estudio de variables como la cuantificación de glicerol se basan en la velocidad de formación de NADH, velocidad que se evalúa midiendo la absorbancia a 340 nm durante un periodo predeterminado de parada. Los valores de absorbancia se representan frente al tiempo y se toma como velocidad de formación de NADH el valor de la pendiente del tramo lineal de esta representación.

El estudio de la secuencia de inyección y de las variables que afectan a la reacción se llevó a cabo utilizando como detector un espectrofotómetro convencional (Thermo-Spectronic HeAios Gamma UV-Vis) en el que se colocó la célula de flujo. Para la cuantificación de glicerol, y con el fin de verificar la viabilidad de un sistema de flujo más portable, este detector se sustituyó por otro miniaturizado (OceanOptics USB2000) conectado con la célula de flujo a través de fibra óptica.

Finalmente, y para validar el procedimiento que se propone, el sistema con el detector miniaturizado se aplicó a la determinación de glicerol en muestras tomadas a lo largo de dos procesos de fermentación, comparando los resultados con los obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución.

3.3. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES

3.3.1. Estudio de la secuencia de inyección

Se realizaron experimentos para establecer la secuencia de inyección, es decir, el procedimiento más adecuado para la aspiración de las disoluciones de muestra y reactivos (orden y volumen), propulsión de la mezcla hasta el detector, parada de flujo para la medida de la velocidad de reacción y proceso de lavado del sistema en cada determinación.

En los sistemas SIA, la superposición de las zonas de muestra y reactivos es esencial para lograr una mezcla adecuada. En este sentido, se llevaron a cabo experimentos preliminares para determinar los volúmenes a aspirar y el orden de aspiración de las disoluciones. Estos experimentos se efectuaron con disoluciones de un colorante (azul de bromotimol) ajustando la longitud de onda del detector a 617 nm.

En primer lugar se procedió al estudio de la reproducibilidad de los volúmenes aspirados. Muestra y reactivos se aspiran mediante la bomba peristáltica de forma que los volúmenes aspirados dependen del caudal y del tiempo de aspiración. Utilizando agua destilada como portador y mediante control del tiempo de bombeo, se aspiraron volúmenes entre 30 y 90 μL de una disolución de colorante (4 ppm) con diferentes caudales y tubos de bomba y, tras la inversión del flujo, se midió la reproducibilidad de las medidas de absorbancia manteniendo el flujo ininterrumpido. Se observó que la reproducibilidad era mejor con tubos de bomba de menor diámetro y con caudales de aspiración bajos. Se eligieron tubos de 0,76 mm de diámetro interno con un caudal de aspiración de 10 $\mu\text{L s}^{-1}$. Para estos experimentos y para todos los posteriores el caudal de bombeo hacia el detector se fijó en 30 $\mu\text{L s}^{-1}$.

Para establecer los volúmenes y el orden de aspiración se realizaron experimentos con una disolución de colorante y otra de borax 0,01 M, utilizando agua como portador. Se efectuaron series de experimentos combinando volúmenes de aspiración de 30, 60 y 90 μL a través de los puertos 1, 2 y 3 de forma que en uno de los puertos se introducía la disolución de colorante y en los otros dos la disolución de borax. En cada serie se realizaron 3 experimentos, manteniendo los volúmenes aspirados y el orden de aspiración, pero

cambiando el puerto de introducción del colorante. Tras la inversión del flujo se registraron y compararon las señales obtenidas (Ver [Figura III-6.](#)).

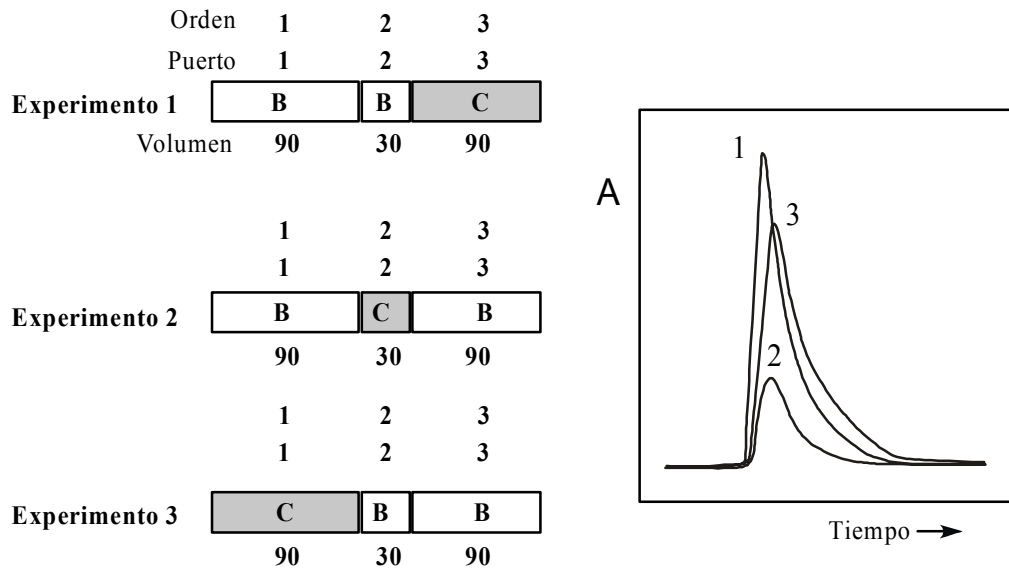


Figura III-6

Secuencia de inyección. Volumen y orden de aspiración.

Esquema de los experimentos de una serie.

C: colorante; B: borax.

En cada experimento, la señal corresponde únicamente a la zona aspirada que contiene el colorante. Por un lado, la altura de la señal es una medida del grado de dispersión del colorante: a mayor altura menor dispersión. Por otro lado, la señal indica el momento en el que la zona pasa por el detector. Si se superponen los registros de las señales de forma que los tiempos de registro sean coincidentes, el solapamiento de señales indica que las zonas correspondientes coinciden en el detector; es decir que en el momento de la medida están mezcladas. El grado de solapamiento entre las señales superpuestas es por tanto una medida de la intensidad de la mezcla o contacto entre las zonas o volúmenes aspirados: mayor solapamiento indica mayor contacto.

Como resultado de los experimentos precedentes, se eligió la siguiente secuencia para la aspiración de muestra y reactivos: 90 μL de muestra - 30 μL de NAD^+ - 30 μL de GDH. Esta secuencia proporcionaba baja dispersión de la muestra, bajo consumo de reactivos y una mezcla adecuada de todas las disoluciones aspiradas en el momento de la medida.

Otro parámetro importante en la secuencia de inyección es el tiempo de bombeo de las disoluciones aspiradas hacia el detector, antes de la parada del flujo. Este tiempo determina la sección de la mezcla de zonas (muestra/ NAD^+ /GDH) presente en la célula de flujo durante la parada y por lo tanto durante la medida de la reacción. Manteniendo los volúmenes y el orden de aspiración indicados en el apartado precedente, con disoluciones de glicerol ($3,0 \times 10^{-3} \text{ M}$), NAD^+ ($1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$) y GDH ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$) y una disolución portadora de pH 10,0, se efectuaron experimentos variando este período de bombeo entre 17,0 y 20,5 s y midiendo en cada caso el incremento de absorbancia (340 nm) durante los primeros 30 s después de la parada. Como los incrementos de absorbancia observados eran máximos y prácticamente iguales para tiempos de bombeo entre 19,1 y 19,9 s, se optó por fijar este parámetro en 19,3 s. El tiempo de parada de flujo y de adquisición de señal se fijó en 30,0 s para todos los experimentos.

Finalmente, se realizaron experimentos para establecer el tiempo que era necesario bombear la disolución portadora tras la parada de flujo para recuperar la señal-base en el detector. Para el caudal preestablecido de $30 \mu\text{L s}^{-1}$, se estimó un tiempo de lavado de 80 s, fijando este valor para todos los experimentos posteriores.

En la [Tabla III-4](#), se resumen los parámetros de programación de la bomba peristáltica y de la válvula de selección para establecer la secuencia de inyección finalmente propuesta. Primero se aspiran alícuotas de las disoluciones de muestra (90 μL), NAD^+ (30 μL) y GDH (30 μL) hasta el bucle de carga (pasos a, b y c). A continuación, se invierte el flujo y el contenido del bucle de carga se bombea hasta el detector (paso d). A los 19,3 s se efectúa una parada del flujo de 30 s durante los cuales se lleva a cabo la adquisición de la señal analítica (paso e). Después se reactiva la bomba para el lavado del sistema (paso f).

Tabla III-4. Procedimiento de inyección secuencial para la determinación de glicerol.

Paso	Puerto válvula	Tiempo (s)	Caudal ($\mu\text{L s}^{-1}$)	Sentido	Volumen (μL)	Descripción
a	1	9,0	10	←	90	Aspiración muestra a BC
b	2	3,0	10	←	30	Aspiración NAD^+ a BC
c	3	3,0	10	←	30	Aspiración GDH a BC
d	4	19,3	30	→	580	Propulsión contenido BC hasta célula de flujo
e	4	30,0	0			Parada de flujo Medida señal analítica
f	4	80,0	30	→	2400	Lavado

3.3.2. Efecto del pH y de las concentraciones de NAD^+ y GDH

Los experimentos para el estudio del efecto de estas variables en la velocidad de reacción se realizaron a la temperatura del laboratorio (20°C , aproximadamente), con la secuencia de inyección y condiciones experimentales descritas en el apartado precedente.

Para el estudio del pH se utilizó una disolución $1,0 \times 10^{-2} \text{ M}$ de NAD^+ , otra de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de GDH y disoluciones de glicerol entre $1,0 \times 10^{-3}$ y $5,0 \times 10^{-3} \text{ M}$. El pH de la disolución portadora (tampón carbonato/bicarbonato $0,5 \text{ M}$) se ajustó a valores comprendidos entre 7,5 y 11,0. Los valores de velocidad de reacción ($\Delta A/\Delta s$) calculados en los diferentes experimentos se muestran en la [Tabla III-5](#). En la representación en función del pH ([Figura III-7](#)) se observa que los valores máximos de velocidad de reacción se alcanzan en el intervalo de pH de 10 a 10,5, cualquiera que sea la concentración de glicerol. Este resultado está en consonancia con el pH de trabajo propuesto en los procedimientos bibliográficos para la determinación de la actividad catalítica de GDH ([243,244](#)). En consecuencia con los resultados, para todos los experimentos posteriores se elige un pH de trabajo de 10,0.

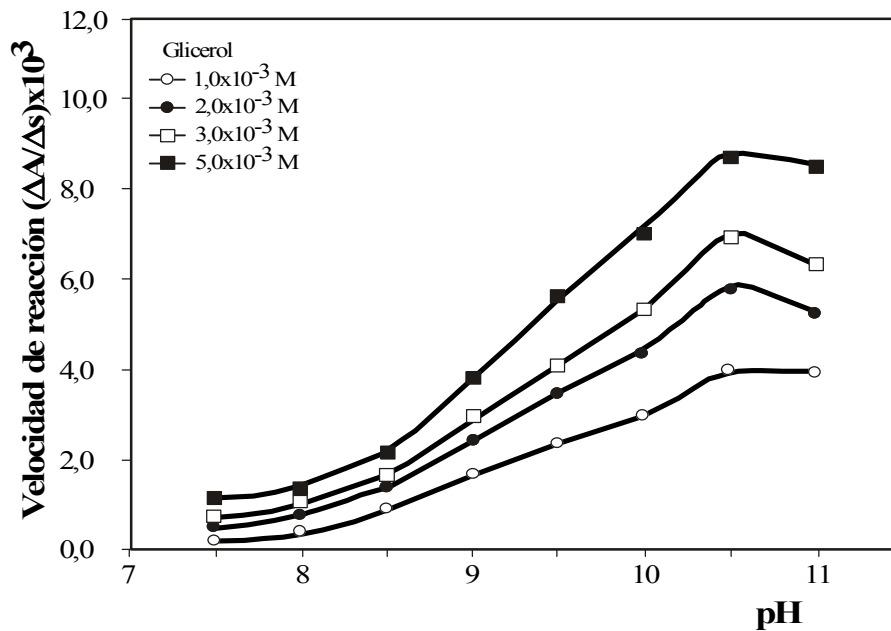
El efecto de la concentración de NAD^+ en la disolución R_1 se estudió entre $5,0 \times 10^{-3}$ y $5,0 \times 10^{-2}$ M, con un portador de pH 10,0, una disolución de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de GDH y concentraciones de glicerol entre $1,0 \times 10^{-3}$ y $5,0 \times 10^{-3}$ M. Los valores de velocidad de reacción obtenidos se muestran en la [Tabla III-6](#). Para cualquiera de las concentraciones de glicerol utilizadas, la velocidad de reacción aumenta con la concentración de NAD^+ ([Figura III-8](#)), aunque por encima de $2,5 \times 10^{-3}$ M el crecimiento es muy pequeño y la velocidad alcanza valores prácticamente constantes. Teniendo en cuenta que en la zona de $1,5 \times 10^{-2}$ a $2,5 \times 10^{-2}$ M el aumento de velocidad es poco acusado, se eligió una concentración de trabajo de NAD^+ de $1,5 \times 10^{-2}$ M, siendo éste un valor de compromiso que permitía reducir el consumo de reactivo sin una pérdida importante de sensibilidad.

El efecto de la concentración de GDH en la disolución R_2 se estudió entre 30 y $120 \mu\text{g mL}^{-1}$, con un portador de pH 10,0, una disolución $1,5 \times 10^{-2}$ M de NAD^+ y concentraciones de glicerol entre $1,0 \times 10^{-3}$ y $5,0 \times 10^{-3}$ M. Los valores de velocidad de reacción obtenidos se muestran en la [Tabla III-7](#). Para cualquiera de las concentraciones de glicerol utilizadas, la velocidad de reacción aumenta con la concentración de GDH ([Figura III-9](#)) siendo el aumento menos acusado por encima de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$. Con concentraciones superiores a $90 \mu\text{g mL}^{-1}$, la velocidad alcanza un valor máximo y prácticamente independiente de la concentración de enzima. Se eligió una concentración de trabajo de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$, siendo éste un valor de compromiso que permitía reducir el consumo del reactivo enzimático sin una pérdida importante de sensibilidad.

Tabla III-5. Valores de velocidad de reacción a diferentes pH y concentraciones de glicerol.

pH	Glicerol ($M \times 10^3$)	Velocidad de reacción* ($\Delta A/\Delta s$) $\times 10^3$			
		1,0	2,0	3,0	5,0
7,5		0,2	0,5	1,0	1,1
8,0		0,4	0,9	1,2	1,4
8,5		0,9	1,4	1,7	2,2
9,0		1,6	2,4	3,1	3,9
9,5		2,3	3,4	4,1	5,7
10,0		3,0	4,4	5,4	6,5
10,5		4,0	5,9	7,0	8,6
11,0		4,0	5,2	6,3	8,4

*: Media de 3 valores.

**Figura III-7****Efecto del pH.**

Variación de la velocidad de reacción con el pH para diferentes concentraciones de glicerol.

NAD⁺: 1,0 x 10⁻² M; GDH: 60 μg mL⁻¹; Temperatura: 20 °C.

Tabla III-6. Valores de velocidad de reacción a diferentes concentraciones de NAD⁺ y de glicerol.

NAD ⁺ (Mx10 ³)	Glicerol(Mx10 ³)	Velocidad de reacción* ($\Delta A/\Delta s$)x10 ³			
		1,0	2,0	3,0	5,0
5,0		2,3	3,5	4,2	5,4
10,0		2,9	4,4	5,3	6,6
15,0		3,1	4,6	5,6	7,1
25,0		3,4	5,3	6,1	7,8
50,0		4,0	5,8	6,8	7,9

*: Media de 3 valores.

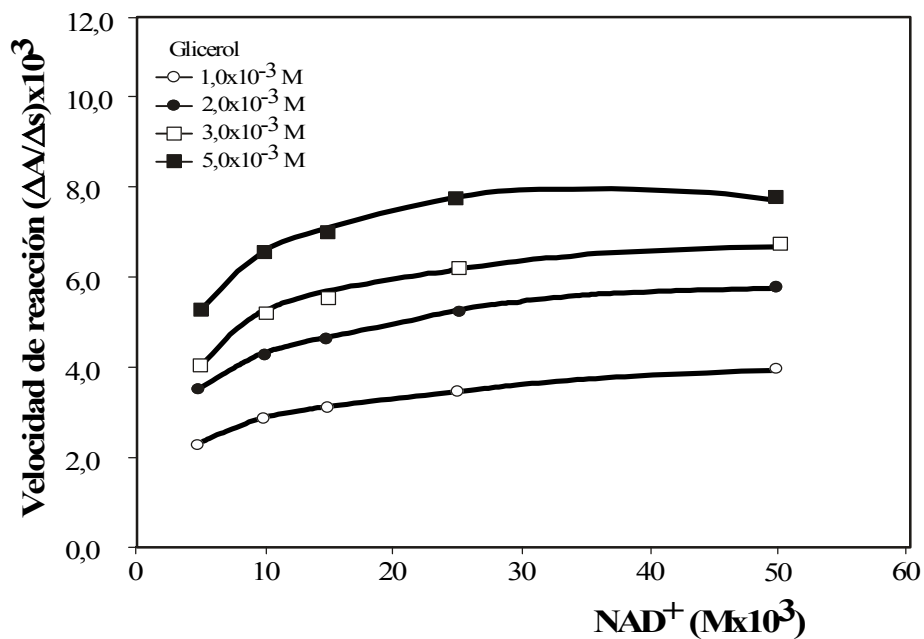
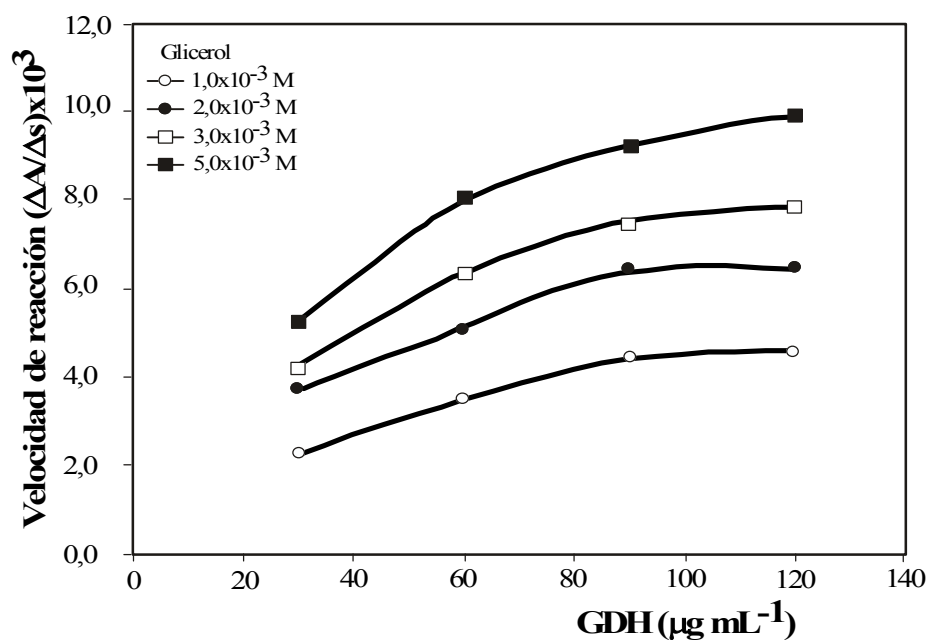
**Figura III-8****Efecto de la concentración de NAD⁺.**Variación de la velocidad de reacción con NAD⁺ a diferentes concentraciones de glicerol.GDH: 60 μg mL⁻¹; pH: 10,0; Temperatura: 20 °C.

Tabla III-7. Valores de velocidad de reacción a diferentes concentraciones de GDH y de glicerol.

GDH ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Glicerol ($\text{M} \times 10^3$)	Velocidad de reacción* ($\Delta A/\Delta s$) $\times 10^3$			
		1,0	2,0	3,0	5,0
30,0		2,3	3,7	4,2	5,3
60,0		3,5	5,1	6,4	8,0
90,0		4,5	6,4	7,5	9,1
120,0		4,6	6,4	7,8	9,9

*: Media de 3 valores.

**Figura III-9****Efecto de la concentración de GDH.**

Variación de la velocidad de reacción con GDH para diferentes concentraciones de glicerol.
 NAD⁺: $1,5 \times 10^{-2}$ M; pH: 10,0; Temperatura: 20 °C.

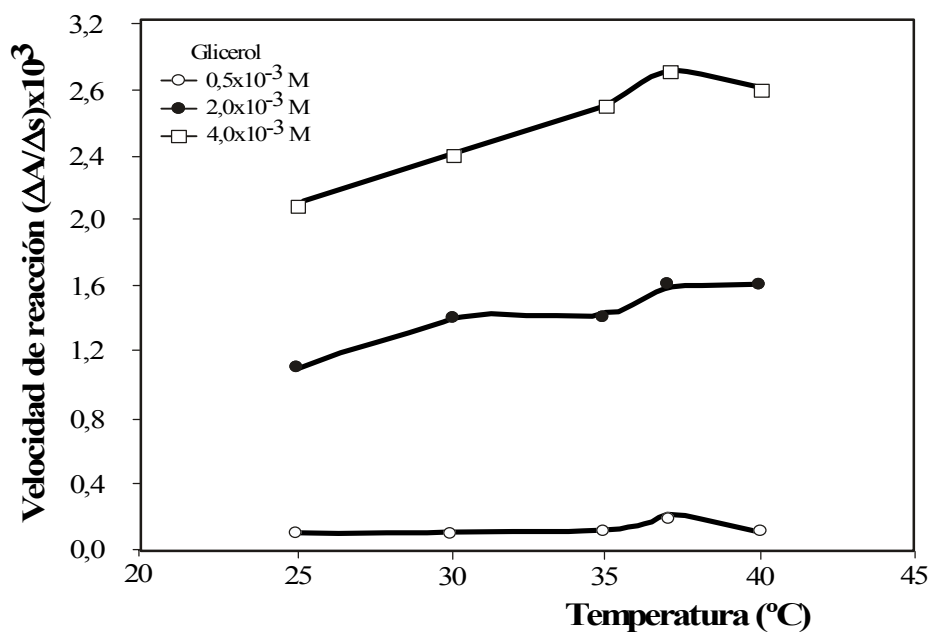
3.3.3. Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura se estudió entre 25 y 40 °C, con un portador de pH 10,0, una disolución $1,5 \times 10^{-2}$ M de NAD⁺, una disolución de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de GDH y concentraciones de glicerol entre $0,5 \times 10^{-3}$ y $4,0 \times 10^{-3}$ M. En los experimentos, la disolución de GDH y la disolución de portador se termostataron a la temperatura de trabajo. Los valores de velocidad de reacción obtenidos se muestran en la [Tabla III-8](#). Como era de esperar, la velocidad aumenta con la temperatura ([Figura III-10.](#)) hasta valores próximos a los 37°C, observándose entonces un ligero descenso debido seguramente a la desnaturalización de la enzima por el calor. Por otro lado, en los experimentos a 40 °C se observó una menor reproducibilidad de las medidas y la presencia frecuente de burbujas. Para reducir estos inconvenientes se eligió una temperatura de trabajo de 37 °C.

Tabla III-8. Valores de velocidad de reacción a diferentes temperaturas y concentraciones de glicerol.

Temperatura °C	Glicerol (Mx10 ³)	Velocidad de reacción* ($\Delta A/\Delta s$)x10 ³		
		0,5	2,0	4,0
25		0,1	1,1	2,1
30		0,1	1,4	2,4
35		0,1	1,4	2,7
37		0,2	1,6	2,9
40		0,1	1,6	2,8

*: Media de 3 valores.

**Figura III-10****Efecto de la temperatura.**

Variación de la velocidad de reacción con la temperatura para diferentes concentraciones de glicerol.

NAD⁺: 1,5x10⁻²M; GDH: 60 μg mL⁻¹; pH: 10,0.

3.4. DETERMINACIÓN DE GLICEROL

3.4.1. Procedimiento propuesto

Como resultado de los estudios precedentes se proponen las siguientes condiciones y procedimiento experimentales para la cuantificación de glicerol:

Condiciones experimentales

- *Bucle de carga (BC)*: 200 cm largo x 0,8 mm d.i..
- *Reactor de mezcla (RM)*: 100 cm de largo x 0,8 mm d.i..
- *Disolución portadora (C)*: Tampón carbonato/bicarbonato, 0,5 M; pH 10,0.
- *Disolución NAD⁺ (R₁)*: $1,5 \times 10^{-2}$ M de NAD⁺ en agua.
- *Disolución GDH (R₂)*: 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en tampón fosfato 0,05 M pH 7,5.
- *Volumen de muestra*: 90 μL .
- *Volumen de NAD⁺*: 30 μL .
- *Volumen de GDH*: 30 μL .
- *Caudal de aspiración*: 10 $\mu\text{L s}^{-1}$.
- *Caudal de propulsión*: 30 $\mu\text{L s}^{-1}$.
- *Temperatura*: 37 °C.
- *Detección*: 340 nm, espectrofotómetro portátil (OceanOptics USB2000-FLG).

Procedimiento

Primero se aspiran consecutivamente los volúmenes indicados de las disoluciones de muestra, NAD⁺ y GDH. A continuación se invierte el flujo y se bombea durante 19,3 s hacia el detector. Se para el flujo durante 30 s y se registra la absorbancia durante este periodo. Reanudado el flujo, se mantiene durante 80 s para el lavado de la célula. Los valores de absorbancia registrados en cada parada se representan frente al tiempo y se toma como velocidad de reacción ($\Delta A/\Delta s$) el valor de la pendiente del tramo lineal de esta representación. Se considera tramo lineal cuando el coeficiente de correlación es igual o superior a 0,995 ($n > 20$). La cuantificación se efectúa mediante la línea de calibrado $\Delta A/\Delta s$ frente a concentración de glicerol.

3.4.2. Características analíticas

En la [Tabla III-9](#), se muestran los valores medios de velocidad de reacción obtenidos para diferentes concentraciones de glicerol con las condiciones y procedimiento propuestos. Como puede observarse en la correspondiente línea de calibrado ([Figura III-11.](#)), la relación entre velocidad de reacción y concentración de glicerol no es lineal, pero se ajusta a un polinomio de orden 2 ($\Delta A/\Delta s = -104,7[\text{glicerol}]^2 + 1,205[\text{glicerol}] + 0,0004$; $R^2 = 0,9996$; $n = 6$). El límite de detección calculado según la IUPAC ([245](#)) es $1,3 \times 10^{-4}$ M.

Considerando los intervalos de tiempo correspondientes a cada paso de la secuencia de inyección ([Tabla III-4.](#)), el tiempo requerido para cada determinación es de 144 s, lo que implica una frecuencia máxima de muestreo de 25 determinaciones por hora.

El consumo de reactivos es muy bajo, al igual que el volumen de residuos generados. Por cada determinación se consumen $0,45 \mu\text{mol}$ de NAD^+ y $1,8 \mu\text{g}$ de GDH y se generan 3 mL de residuo.

Tabla III-9. Calibrado. Valores de velocidad de reacción para diferentes concentraciones de glicerol.

Glicerol (Mx10 ³)	Velocidad de reacción* ($\Delta A/\Delta s$)x10 ³
0,5	1,01
1,0	1,51
2,0	2,46
3,0	3,09
4,0	3,56
5,0	3,85

*: Media de 3 valores.

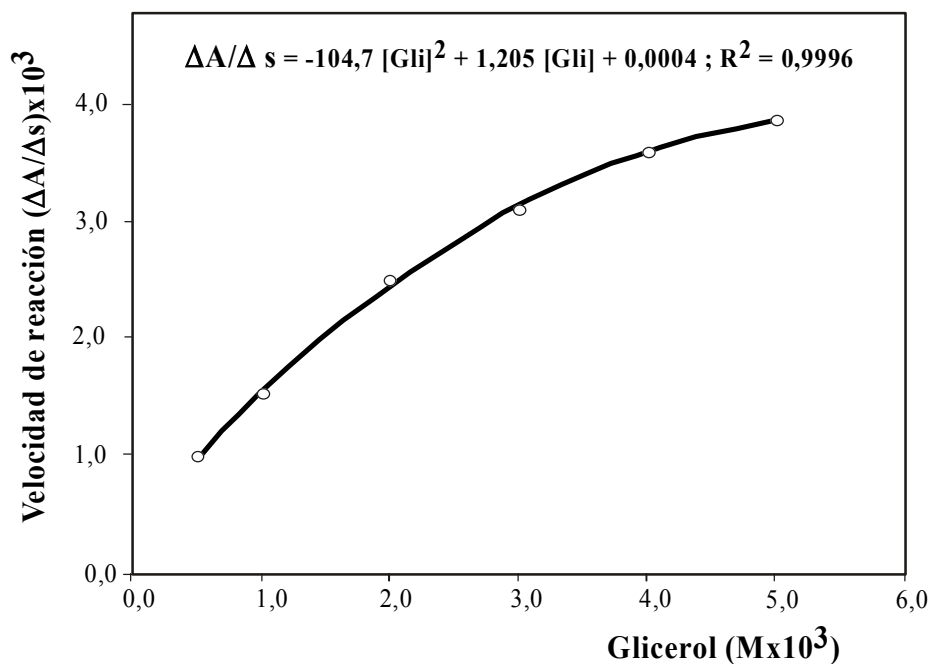


Figura III-11

Determinación de glicerol. Línea de calibrado.

4. APLICACIÓN A PROCESOS DE FERMENTACIÓN

El procedimiento propuesto se aplicó a la determinación de glicerol en muestras tomadas en procesos de fermentación con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Dado el margen de aplicación del procedimiento propuesto y el elevado contenido de glicerol en las muestras (hasta 50 g L⁻¹), éstas fueron adecuadamente diluídas antes de su introducción en el sistema de flujo.

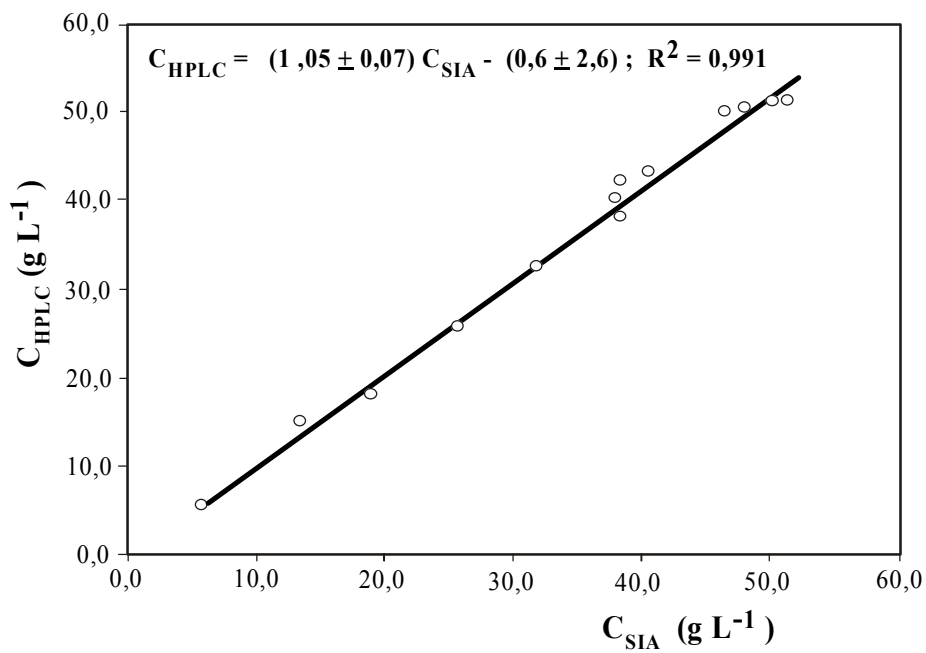
Se analizaron 17 muestras, tomadas a diferentes tiempos a lo largo de dos procesos de fermentación (procesos a y b). Para evaluar la exactitud del procedimiento propuesto, las mismas muestras se analizaron también mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para ello se utilizó un cromatógrafo equipado con detector de índice de refracción y una columna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 mm x 7,8mm) con ácido sulfúrico 1x10⁻³ M a un caudal de 0,5 mL min⁻¹ como fase móvil; se trabajó con un volumen de inyección de 20 µL y una temperatura de 30 °C. Los resultados obtenidos por ambos procedimientos están recogidos en la [Tabla III-10](#).

En los resultados puede observarse que en las muestras recogidas al principio de los procesos de fermentación (muestras 1a-3a y 1b-2b), los valores obtenidos con el procedimiento propuesto presentan altas desviaciones respecto al método de referencia. Para las 12 muestras restantes, los resultados son coincidentes tal como se desprende de la recta de regresión comparativa ([246](#)), representada en la [Figura III-12](#). En la ecuación de la recta ($C_{\text{HPLC}} = (1,05 \pm 0,07)C_{\text{SIA}} - (0,6 \pm 2,6)$; $R^2: 0,991$; con intervalos de confianza del 95 %), los valores estimados de la intersección y de la pendiente no difieren significativamente de 0 y de 1, respectivamente, no habiendo, por tanto, evidencia de errores determinados.

Tabla III-10. Comparación de las concentraciones de glicerol encontradas mediante el procedimiento propuesto (SIA) y el de referencia (HPLC) en muestras tomadas a diferentes tiempos en dos procesos de fermentación (a y b) con *S. cerevisiae*.

Muestra	Tiempo de fermentación (h)	Concentración (g L ⁻¹)		Desviación (%)
		SIA*	HPLC*	
1a	16	2,5±0,1	1,8	38,9
2a	21	5,5±0,2	4,1	34,1
3a	24	6,9±0,3	5,8	18,3
4a	41	18,9±0,4	17,8	6,2
5a	48	25,5±0,2	25,6	-0,4
6a	64	38,3±0,8	37,9	1,1
7a	72	38,3±0,7	42,1	-9,0
8a	88	46,4±0,7	50,0	-7,2
9a	93	51,2±0,3	51,0	0,4
1b	17	2,8±0,1	2,3	21,7
2b	22	6,7±1,4	4,6	45,7
3b	24	5,7±0,3	5,5	3,6
4b	42	13,5±0,2	14,8	-8,8
5b	73	31,8±0,2	32,2	-1,2
6b	89	37,8±1,5	40,0	-5,5
7b	96	40,5±0,2	43,1	-6,0
8b	113	47,8±0,6	50,2	-4,8

*: Media de 3 determinaciones.

**Figura III-12****Determinación de glicerol en procesos de fermentación.**

Comparación de resultados SIA y HPLC.
Número de muestras: 12 (excluidas 1a-3a y 1b-2b).

Para explicar las elevadas desviaciones positivas observadas en las muestras 1a-3a y 1b-2b, se consideró la posible interferencia de alguna de las especies que forman parte del proceso de fermentación en las medidas de la reacción enzimática.

En un proceso normal de fermentación, la evolución de la relación entre nutrientes y productos sigue un modelo definido. Para establecer este modelo, en las fermentaciones estudiadas se realizaba el seguimiento mediante análisis cromatográfico (HPLC) de la concentración de algunos de los compuestos más abundantes (glucosa, glicerol, succinato, acetato, etanol, acetona y acetaldehído) presentes en el cultivo. De estos compuestos, la glucosa es la que experimentaba un cambio de concentración más acusado a lo largo del proceso, motivo por el que se estudió su posible efecto interferente. En la [Figura III-13](#), se muestran los perfiles de glucosa y glicerol en las fermentaciones estudiadas (proceso a), con los datos obtenidos mediante HPLC ([Tabla III-11](#)).

Tabla III-11. Concentraciones de glucosa y glicerol a diferentes tiempos de fermentación (proceso a) determinadas mediante HPLC.

Tiempo de fermentación (h)	Glicerol* (g L ⁻¹)	Glucosa* (g L ⁻¹)
0	0	102,8
16	1,8	100,6
21	4,1	95,8
24	5,8	94,1
41	17,8	67,7
48	25,6	52,3
64	37,8	26,6
72	42,1	17,2
88	50,0	1,8

*: Media de 3 determinaciones.

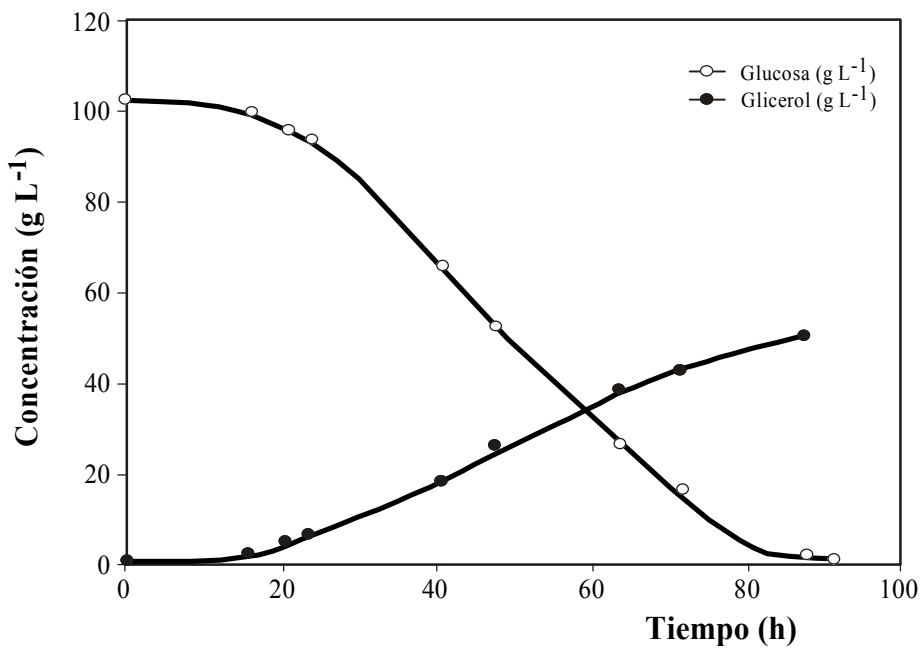
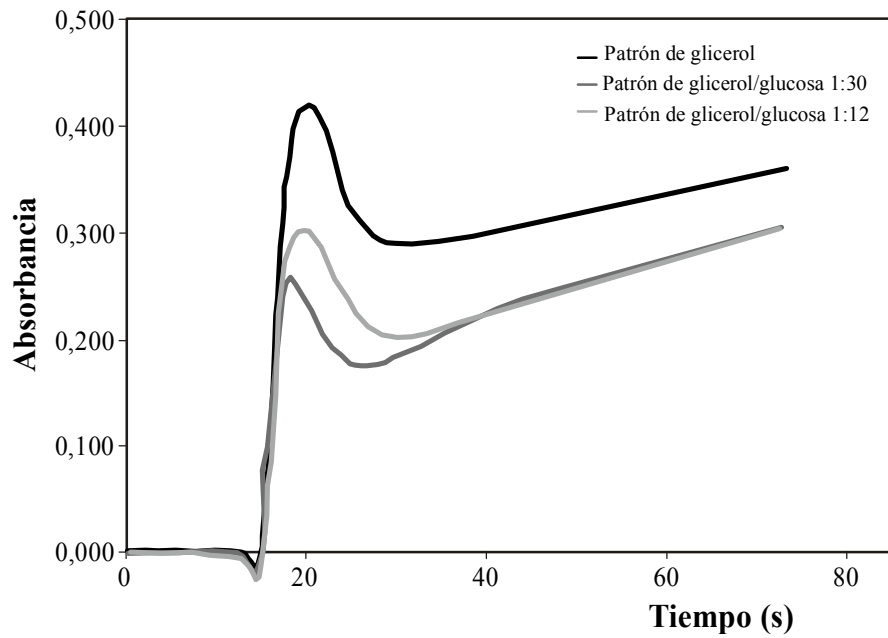


Figura III-13

Evolución de las concentraciones de glucosa y glicerol durante la fermentación.

Proceso a.

Para evaluar el posible efecto interferente se compararon las señales obtenidas al analizar mediante el procedimiento propuesto disoluciones patrón con sólo glicerol o glicerol con glucosa en diferentes proporciones. Se investigaron tres concentraciones diferentes de glicerol, correspondientes a tiempos iniciales, medios y finales en el proceso de fermentación. Para cada nivel de glicerol se evaluaron relaciones molares glicerol: glucosa de 1:0,5, 1:1, 1:2, 1:5, 1:12 y 1:30. Se eligieron estas relaciones en base a las concentraciones encontradas en el seguimiento de las fermentaciones ([Tabla III-11.](#), [Figura III-13.](#)). No se encontró ninguna diferencia importante (desviaciones inferiores al 10%) entre los patrones con sólo glicerol y los patrones de glicerol mezclados con un exceso de glucosa de 0,5 a 5 veces. Sin embargo, para las disoluciones patrón con mayor proporción de glucosa, las desviaciones sí eran significativas (hasta el 50%). Estas desviaciones podrían explicarse por el cambio de forma de la señal analítica con la presencia de glucosa. En la [Figura III-14.](#) se muestra la evolución completa de la señal de la que sólo se utiliza el tramo lineal para la cuantificación. Como puede observarse, los valores de absorbancia absoluta registrados son más pequeños a medida que aumenta el exceso de glucosa, pero la pendiente ($\Delta A/\Delta t$) de la parte lineal de la señal aumenta. Este hecho podría explicar la sobrestimación de los niveles del glicerol encontrados en las muestras 1a-3a y 1b-2b ([Tabla III-10.](#)) ya que éstas están tomadas al principio de la fermentación, cuando la proporción de glucosa es mayor.

**Figura III-14**

Señales de absorbancia para un patrón de glicerol sin y con glucosa en proporciones 1:12 y 1:30.

5. CONCLUSIONES III

- Se propone un sistema de análisis por inyección secuencial portátil para la determinación de glicerol. Este sistema ha sido aplicado al seguimiento *off-line* de la conversión de glucosa en glicerol mediante una modificación genética de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El sistema es potencialmente utilizable para determinaciones *on-line*. Para ello bastaría añadir al sistema una etapa de dilución de las muestras ya que éstas tienen concentraciones de glicerol por encima del margen de aplicación del procedimiento propuesto.
- La estrategia cinética aplicada permite evitar la interferencia de la matriz compleja y proporciona medidas fiables (con resultados contrastados por HPLC) y en tiempo real con un bajo consumo de reactivos (1,8 μg de GDH y 0,45 μmol de NAD^+ por determinación) y una mínima generación de residuos (3,0 mL por determinación).
- La utilización de la enzima en disolución evita los inconvenientes asociados a otros sistemas propuestos basados en el uso de biosensores con enzimas inmovilizadas, dispositivos que pueden resultar poco estables y reproducibles cuando se aplican a medias continuadas como es el caso del seguimiento de un proceso de fermentación.
- Finalmente, como el detector USB2000 con CCD Array permite medidas simultáneas de absorbancia a diferentes longitudes de onda, el sistema propuesto podría aplicarse al seguimiento simultáneo de otros compuestos como substratos, productos o subproductos del proceso de fermentación.

BIBLIOGRAFÍA

DETERMINACIÓN DE ACETONA

1. S.A. RAHIM y W.A. BASHIR
Microdetermination of acetone in aqueous solution.
Microchem. J., 26 (1981) 329-333.
2. http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/chem_profiles/acetone/basic_ace.html
3. Environmental Health Criteria 207, World Health Organization, Geneva, 1998.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc207.htm>
4. R. FRANK SPELLMAN
The exicence of air. Concepts and applications.
CRC press. Taylor & Francis group. 2nd Ed., (2009) p. 245.
5. *The right to healthy indoor air.*
Report on a WHO meeting. Bilthoven, The Netherlands. 15-17 May 2000.
EUROPEAN HEALTH21 TARGET 10,13.
6. A.LANCE WALLACE
The total exposure assessment methodology (TEAM) study.
EPA/600/6-87/002a (1987).
7. X. GUARDINO SOLÁ
Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Calidad del aire interior.
<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/44.pdf>
8. Assessment report on acetona for developing ambient-air quality objectives, Alberta Environment/Toxico-Logic Consulting Inc., Alberta, 2004.
<http://www.environment.gov.ab.ca/info/library/6665.pdf>
9. C.-C. WANG, Y.-C. WENG y T.-C. CHOU
Acetone sensor using lead foil as working electrode.
Sensor Actuat B, 122 (2007) 591-595.
10. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs21.html>
Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).
11. R.L.VEECH, B.CHANCE, Y. KASHIWAYA, H.A. LARDY y G.F. CAHILL
Ketone Bodies: potential therapeutic uses.
IUBMB Life, 51 (2001) 241-247.

- 12. L. LAFFEL**
Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes.
Diabetes Metab. Res. Rev., 15 (1999) 412-426.
- 13. R.J. HENRY, D.C. CANNON y J.W. WINKELMAN**
Química Clínica. Bases y Técnicas.
Ed. Jims, Barcelona, 2ª Ed., (1980) p. 1368.
- 14. N. SHIME, H. ASHIDA, N. HIRAMATSU, K. KAGEYAMA, Y. KATOH, S. HASHIMOTO y Y. TANAKA**
Arterial ketone body ratio for the assessment of the severity of illness in pediatric patients following cardiac surgery.
J. Crit. Care, 16 (2001) 102-107.
- 15. B. LEVY, L.O. SADOUNE, A.-M. GELOT, P.-E. BOLLAERT, P. NABET y A. LARCAN**
Evolution of lactate/pyruvate and arterial ketone body ratios in the early course of catecholamine-treated septic shock.
Critical Care Medicine, 28 (2000) 114-119.
- 16. M.-A. DUGAS, F. PROULX, A. DE JAEGER, J. LACROIX y M. LAMBERT**
Markers of tissue hypoperfusion in pediatric septic shock.
Int. Care Med., 26 (2000) 75-83.
- 17. K.A. YASSEN, H.F. GALLEY, A. LEE y N.R. WEBSTER**
Mitochondrial redox state in the critically ill.
Br. J. Anaesth., 83 (1999) 325-327.
- 18. K. KITABAYASHI, G. J. GORES y R. A. F. KROM**
Arterial ketone body ratio in clinical liver transplantation.
Transplant. Proc., (1998) 4356-4359.
- 19. K. HANAZAKI, M. WAKABAYASHI, H. SODEYAMA, Y. SODE, N. KAWAMURA, T. MIYAZAKI y M. OHTSUKA**
Arterial ketone body ratio during hepatectomy.
Hepato-Gastroenterol., 44 (1997) 1438-1444.
- 20. J. LOMMI, M. KUPARI, P. KOSKINEN, H. NÄVERI, H. LEINONEN, K. PULKKI y M. HÄRKÖNEN**
Blood Ketone Bodies in Congestive Heart Failure.
J. Am. Coll. Cardiol., 28 (1996) 665-672.
- 21. M. REIST, A. KOLLER, A. BUSATO, U. KÜPFER y J. W. BLUM**
First Ovulation and Ketone Body Status in the Early Postpartum Period of Dairy Cows.
Theriogenology, 54 (2000) 685-701.

-
- 22.** T.T. MOTTRAM, P.DOBBELAAR, Y.H. SCHUKKEN, P.J. HOBBS y P.N. BARTLETT
An experiment to determine the feasibility of automatically detecting hyperketonaemia in dairy cows.
Livest. Prod. Sci., 61 (1999) 7-11.
- 23.** G. DIRKSEN, C. HAGERTHEEN, M. ALEXANDERKATZ y A. BERGER
Monitoring of dairy cows for metabolic imbalances during high lactation by means of milk parameters II. Milk acetone, acetoacetate and beta-hydroxybutyrate.
Tieraerztliche Umschau, 52 (1997) 476.
- 24.** P. MARSTORP, L. ANFALT y L. ANDERSSON
Determination of oxidized ketone bodies in milk by flow injection analysis.
Anal. Chim. Acta, 149 (1983) 281-289.
- 25.** C.H. RISNER y P. MARTIN
Quantitation of formaldehyde, acetaldehyde, and acetone in sidestream cigarette smoke by high-performance liquid chromatography.
J Chromatogr Sci. 32 (1994) 76-82.
- 26.** J. LIGGIO y R. MCLAREN
An optimized method for the determination of volatile and semi-volatile aldehydes and ketones in ambient particulate matter.
Int. J. Environ. Anal. Chem., 83 (2003) 819-835.
- 27.** C. KEMPTER, W. PÖTTER, N. BINDING, K. HOLGER, W. UTE y K. UWE
Tailor-made derivatizing agents for carbonyl compounds using liquid chromatography.
Anal. Chim. Acta, 410 (2000) 47-64.
- 28.** I-Z. DONG y S.C. MOLDOVEANU
Gas chromatography-mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine.
J. Chromatogr. A, 1027 (2004) 25-35.
- 29.** Y.-S. FUNG y Y. LONG
Determination of carbonyl compounds in air by electrochromatography.
Electrophoresis, 22 (2001) 2270-2271.
- 30.** S.-L. ZHAO, T.-Y. DAI, Z. LIU, F.-S. WEI, H.-F. ZOU y X.-B. XU
Determination of lower aliphatic carbonyl compounds in stack gas as their 2,4-Dinitrophenylhydrazones by micellar electrokinetic chromatography.
Chemosphere, 35 (1997) 2131-2136.

- 31.** C.C. CAMARASU
Headspace SPME method development for the analysis of volatile polar residual solvents by GC-MS.
J. Pharm. Biomed. Anal., 23 (2000) 197-210.
- 32.** N. SUGAYA, K.SAKURAI, T. NAKAGAWA, N.ONDA, S. ONODERA, M. MORITA y M.TEZUKA
Development of a headspace GC/MS analysis for carbonyl compounds (aldehydes and ketones) in household products after derivatization with o-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)-hydroxylamine.
Analytical Sciences, 20 (2004) 865-870.
- 33.** Y. CHI, Y. FENG, S. WEN, H. LÜ Y Z. YU, W. ZHANG, G. SHENG y J. FU
Determination of carbonyl compounds in the atmosphere by DNPH derivatization and LC-ESI-MS/MS detection.
Talanta, 72 (2007) 539-545.
- 34.** J.E. SZULEJKO, Z. LUO y T. SOLOUKI
Simultaneous determination of analyte concentrations, gas-phase basicities, and proton transfer kinetics using gas chromatography/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (GC/FT-ICR MS).
Int. J. Mass Spectrom., 257 (2006) 16-26.
- 35.** H.W. GAO
Dual-wavelengths spectrophotometry for improving the determination of acetone in waste water.
Asian J. Chem., 11 (1999) 1361-1364.
- 36.** Y. ZHANG, G.W. XU y Q.F. HONG
Research on chromatography assisted Fourier transform infrared spectrometry for in-situ monitoring toxic air aldehydes and ketones pollutants in stack gas emissions.
Chinese J. Anal. Chem., 27 (1999) 616.
FREDERICK W. KOEHLER IV, GARY W. SMALL, ROGER J. COMBS,
- 37.** F.W. KOEHLER, G.W. SMALL Y R.J. COMBS, R.B. KNAPP y R.T. KROUTIL
Calibration transfer in the automated detection of acetone by passive Fourier transform infrared spectrometry.
Appl. Spectrosc., 54 (2000) 706-714.
- 38.** T. KHAYAMIAN, M. TABRIZCHI y N. TAJ
Direct determination of ultra-trace amounts of acetone by corona-discharge ion mobility spectrometry.
Fresen. J. Anal. Chem., 370 (2001) 1114-1116.

- 39.** R. RELLA, J. SPADAVECCHIA, M.G. MANERA, S. CAPONE, A. TAURINO, M. MARTINO, A.P. CARICATO y T. TUNNO
Acetone and ethanol solid-state gas sensors based on TiO₂ nanoparticles thin film deposited by matrix assisted pulsed laser evaporation.
Sensor Actuat. B, 127 (2007) 426-431.
- 40.** A. LEVART y M. VERBER
Determination of aldehydes and ketones in air samples using cryotrapping sampling.
Chemosphere, 44 (2001) 701-708.
- 41.** T. QIN, X.B. XU, V. PACAKOVA y K. STULIK
A simple method for the trace determination of metanol, etanol, acetona and pentane in human breath and in the ambient air by preconcentration on solid sorbents followed by gas chromatography.
Talanta, 44 (1997) 1683-1690.
- 42.** C. DENG, J. ZHANG, X. YU, W. ZHANG y X. ZHANG
Determination of acetone in human breath by gas chromatography–mass spectrometry and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization
J. Chromatogr. B, 810 (2004) 269-275.
- 43.** V. LARROQUE, V. DESAUZIERS y P. MOCHO
Development of a solid phase microextraction (SPME) method for the sampling of VOC traces in indoor air.
J. Environ. Monit., 8 (2006) 106-111.
- 44.** H. YU, L. XU y P. WANG
Solid phase microextraction for analysis of alkanes and aromatic hydrocarbons in human breath.
J. Chromatogr. B, 826 (2005) 69-74.
- 45.** J.A. KOZIEL y I. NOVAK
Sampling and sample-preparation strategies based on solid-phase microextraction for analysis of indoor air.
Trends Anal. Chemi., 21 (2002) 840-850.
- 46.** C. GROTE y J. PAWLISZYN
Solid-phase microextraction for the analysis of human breath.
Anal. Chem., 69 (1997) 587-596.
- 47.** N. TESHIMA, J. LI, K. TODA y P.K. DASGUPTA
Determination of acetone in breath.
Anal. Chim. Acta, 535 (2005) 189-199.

-
- 48.** R.M. CAVALCANTE, C.S. CAMPELO, M.J. BARBOSA, E.R. SILVEIRA, T.V. CARVALHO y R.F. NASCIMENTO
Determination of carbonyl compounds in air and cancer risk assessment in an academic institute in Fortaleza, Brazil.
Atmos. Environ., 40 (2006) 5701-5711.
- 49.** C. HUNG, H. BAI y M. KARTHIK
Ordered mesoporous silica particles and Si-MCM-41 for the adsorption of acetone: A comparative study.
Sep. Purif. Technol., 64 (2009) 265-272.
- 50.** R.J KIEBER y K. MOPPER
Determination of picomolar concentrations of carbonyl compounds in natural waters, including seawater, by liquid chromatography.
Environ. Sci. Technol., 24(1990) 1477-1481.
- 51.** US EPA
Ninety-day gavage study in albino rats using acetone.
Washington, DC, US Environmental Protection Agency,
Office of Solid Waste, (1986) p. 950.
- 52.** NIOSH
Manual of analytical methods - Ketones 1 (acetone); method 1300, 4th ed Cincinnati, Ohio, National Institute for Occupational Safety and Health, 5 pp. (1994)
- 53.** D. O'HARA y H.B. SINGH
Sensitive gas chromatographic detection of acetaldehyde and acetone using a reduction gas detector.
Atmos. Environ., 22 (1988) 2613-2615.
- 54.** C.H. RISNER
High performance liquid chromatographic determination of major carbonyl compounds from various sources in ambient air.
J. Chromatogr. Sci., 33 (1995) 168-176.
- 55.** V.M. BROWN, D.R. CRUMP, D. GARDINER y M. GAVIN
Assessment of a passive sampler for the determination of aldehydes and ketones in indoor air.
Environ. Technol., 15 (1994) 679-685.
- 56.** S. AMLATHE y V.K. GUPTA
Spectrophotometric determination of acetone using vanillin.
Analyst., 115 (1990) 1385-1387.

-
- 57.** S.B. PATIL, P.P. PATIL y M.A. MORE
Acetone vapour sensing characteristics of cobalt-doped SnO₂ thin films
Sensor Actuat. B, 125 (2007) 126-130.
- 58.** M.A.C. GOLLMANN, M.C.R. PERALBA, T.M. PIZZOLATO, J.H.Z. SANTOS y M.J.R. CAVALCANTI
Use of solid phase microextraction for the detection of acetone in cyclohexane effluent.
Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 286 (2006) 134-137.
- 59.** L. TANG, Y. LI, K. XU, X. HOU y Y. LV
Sensitive and selective acetone sensor based on its cataluminescence from nano-La₂O₃ surface.
Sensor Actuat. B, 132 (2008) 243-249.
- 60.** V.C. GAVINO, B. VINET, F. DAVID, M. GARNEAU y H. BRUNENGRABER
Determination of the concentration and specific activity of acetone in biological fluids.
Anal. Biochem., 152 (1986) 256-261.
- 61.** A. BREGA, P.G. VILLA, A. QUADRINI y C. LUCARELLI
High-performance liquid chromatographic determination of acetone in blood and urine in the clinical diagnostic laboratory.
J. Chromatogr., 553 (1991) 249-254.
- 62.** S. FELBY y E. NIELSEN
Determination of ketone bodies in postmortem blood by head-space gas chromatography.
Forensic Sci. Int., 64 (1994) 83-88.
- 63.** G.A. CORDIS, D. BAGCHI, N. MAULIK y D. K. DAS
High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous detection of malonaldehyde, acetaldehyde, formaldehyde, acetone and propionaldehyde to monitor the oxidative stress in heart.
J. Chromatogr. A, 661 (1994) 181-191.
- 64.** V. MIEKISCH, J.K. SCHUBERT, D.A. VAGTS y K. GEIGER
Analysis of volatile disease markers in blood.
Clin. Chem., 47 (2001) 1053-1060.
- 65.** J.P. SPINHIRNE, J.A. KOZIEL y N.K. CHIRASE
A no device for non-invasive non-site sampling of cattle breath with solid-phase microextraction.
Biosyst. Eng., 84 (2003) 239-246.

- 66.** C. DENG, W. ZHANG, J. ZHANG y X. ZHANG
Rapid determination of acetone in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry and solid-phase microextraction with on-fiber derivatization.
J. Chromatogr. B, 805 (2004) 235-240.
- 67.** L. DONG, X. SHEN y C. DENG
Development of gas chromatography-mass spectrometry following headspace single-drop microextraction and simultaneous derivatization for fast determination of the diabetes biomarker, acetone in human blood samples.
Anal. Chim. Acta, 569 (2006) 91-96.
- 68.** Z. XIE, S. SIELEMANN, H. SCHMIDT, F. LI y J.I. BAUMBACH
Determination of acetone, 2-butanone, diethylketone and BTX using HSCC-UV-IMS
Anal. Bioanal. Chem., 372 (2002) 606-610.
- 69.** K. MUSA-VELOSO, S.S. LIKHODII, E. RARAMA, S. BENOIT, Y.-M.C. LIU, D.CHARTRAND, R. CURTIS, L. CARMANT, A. LORTIE, F.J. E. COMEAU y S.C. CUNNANE
Breath acetone predicts plasma ketone bodies in children with epilepsy on a ketogenic diet.
Nutrition, 22 (2006) 1-8.
- 70.** Y. SEKINE, S. TOYOOKA y S.F. WATTS
Determination of acetaldehyde and acetone emanating from human skin using a passive flux sampler-HPLC system
J. Chromatogr. B, 859 (2007) 201-207.
- 71.** A. HRYNIUK y B.M. ROSS
Detection of acetone and isoprene in human breath using a combination of thermal desorption and selected ion flow tube mass spectrometry.
Int. J. Mass Spectrom., 285 (2009) 26-30.
- 72.** J.L. PEZZANITI, T.W. JENG, L. MCDOWELL y G.M. OOSTA
Preliminary investigation of near-infrared spectroscopic measurements of urea, creatinine, glucose, protein and ketone in urine.
Clin. Biochem., 34 (2001) 239-246.
- 73.** I.A. McDONALD, L.P. HACKETT y L.J. DUSCI
The identification of acetone and the detection of isopropanol in biological fluids by gas chromatography.
Clin. Chim. Acta, 63 (1975) 235-237.
- 74.** P. HRADECKY y P. JAGOS
Gas chromatographic head-space analysis of clinically interesting ketone bodies.
J. Chromatogr. B, 146 (1978) 327-332.

-
- 75.** C.J.P. ERIKSON
Micro method for determination of ketone bodies by head-space gas chromatography.
Anal. Biochem., 47 (1972) 235-243.
- 76.** I. SARUDI y E. VISI-VARGA
Determination of milk-oxidised ketone bodies as an acetone derivate by electron capture gas chromatography.
Talanta, 46 (1998) 589-593.
- 77.** P.W. HANSEN
Screening of dairy cows for ketosis by use of infrared spectroscopy and multivariate calibration.
J. Dairy Sci., 82 (1999) 2005-2010.
- 78.** C. HEUER, H.J. LUINGE, E.T.G. LUTZ, Y.H. SCHUKKEN, J.H. VAN DER MAAS, H. WILMINK y J.P.T.M. NOORDHUIZEN
Determination of acetone in cow milk by fourier-transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis.
J. Dairy Sci., 84 (2001) 575-582.
- 79.** I. SARUDI, Z. CSAPO-KISS, A. SZABO y E. VARGA-CSERESNYES
A potentiometric method for determination of oxidised ketone bodies in milk.
Microchim. Acta, 143 (2003) 237-239.
- 80.** L. ALONSO, J. FONTECHA y M. JUAREZ
Development of headspace gas chromatographic mass spectrometric method for determining methyl-ketones and secondary alcohols in blue cheese.
J. Chromatogr. Sci., 37 (1999) 108-112.
- 81.** E. PRIEGO-LOPEZ y M.D. LUQUE DE CASTRO
Pervaporation-gas chromatography coupling for shurry-samples. Determination of acetaldehyde and acetone in food.
J. Chromatogr. A, 976 (2002) 399-407.
- 82.** D.R. CARDOSO, S.M. BETTIN, R.V. RECHE, B.S. LIMA-NETO y D.W. FRANCO
HPLC-DAD analysis of ketones as their 2,4-dinitrophenyl-hidrazones in Brazilian sugar-cane spirits rum.
J. Food Compos. Anal., 16 (2003) 563-573.
- 83.** J.M. SCOTTER y D.P.T. ROBERTS
Development and validation of a rapid headspace gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of diethyl ether and acetone residues in Tween extracts of shellfish intended for mouse bioassay for diarrhoeic toxins.
J. Chromatogr. A, 1157 (2007) 386-390.

-
- 84.** G.R. TAKEOKA, P.A. FLATH, M. GUNTERT y W. JENNINGS
Nectarine volatiles: Vacuum steam distillation versus headspace sampling.
J Agric. Food Chem., 36 (1988) 553-560.
- 85.** M. KANSIZ, J.R. GAPES, D. MC NAUGHTON, B. LENDL y K.C. SCHUSTER
Mid- infrared spectroscopy coupled to sequential injection analysis for the on-line monitoring of the acetone-butanol fermentation process.
Anal. Chim. Acta., 438 (2001) 175-186.
- 86.** F. MANGANI y P. NINFALI
Gas chromatographic determination of acetaldehyde and acetone in human blood by purge and trap, using permeation tubes for calibration.
J. Chromatogr., 437 (1988) 294-300.
- 87.** D.L. ASHLEY, M.A. BONIN, F.L. CARDINALI, J.M. McCRAW, J.S. HOLLER, L.L. NEEDHAM y D.G. PATTERSON
Determining volatile organic compounds in human blood from a large population using purge and trap gas chromatography/mass spectrometry.
Anal. Chem., 64 (1992) 1021-1029.
- 88.** N.B. SMITH
Determination of volatile alcohols and acetone in serum by non-polar capillary gas chromatography after direct sample injection.
Clin. Chem., 10 (1984) 1672-1674.
- 89.** S.T. CHEUNG y W.N. LIN
Simultaneous determination of methanol, ethanol, acetone, isopropanol and ethylene glycol in plasma by gas chromatography.
J. Chromatogr. Biomed. Appl., 414 (1987) 248-250.
- 90.** K. KOBAYASHI, M. OKADA, Y. YASUDA y S. KAWAI
A gas chromatographic method for the determination of acetone and acetoacetic acid in urine.
Clin. Chim. Acta, 133 (1983) 223-226.
- 91.** S. HOLM y E. LUNDGRON
A purge-and-tap method for the analysis of acetone in biological tissues.
Anal. Biochem., 136 (1984) 157-160.
- 92.** M.D. TROTTER, M.J. SULWAY y E. TROTTER
The rapid determination of acetone in breath and plasma.
Clin. Chim. Acta, 35 (1971) 137-143.

-
- 93.** N. LI, C. DENG, N. YAO, X. SHEN y X. ZHANG
Determination of acetone, hexanal and heptanal in blood samples by derivatization with pentafluorobenzyl hydroxylamine followed by headspace single-drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry.
Anal. Chim. Acta, 540 (2005) 317-323.
- 94.** T. WANG, P. SPANEL y D. SMITH
Selected ion flow tube mass spectrometry of 3-hydroxybutyric acid, acetone and other ketones in the headspace of aqueous solution and urine.
Int. J. Mass Spectrom., 272 (2008) 78-85.
- 95.** R. GARRIDO-DELGADO, L. ARCE, C.C. PÉREZ-MARÍN y M. VALCÁRCEL
Use of ion mobility spectroscopy with an ultraviolet ionization source as a vanguard screening system for the detection and determination of acetone in urine as a biomarker for cow and human diseases.
Talanta, 78 (2009) 863-868.
- 96.** J. RUZICKA y E. H. HANSEN
Anal. Chim. Acta., 78 (1975)145-147.
- 97.** J. RUZICKA y E. H. HANSEN
Flow Injection Analysis today and tomorrow.
Anal. Chim. Acta, 214 (1988) 1-27.
- 98.** J. RUZICKA y E.H. HANSEN
Retro-review of flow-injection analysis.
Trends Anal. Chem., 27 (2008) 390-393.
- 99.** J. MARTÍNEZ CALATAYUD
Flow Injection analysis of Pharmaceuticals. Automation in the Laboratory.
Ed. Taylor &Francis, Londres, 2nd Ed., (1997).
- 100.** M. VALCÁRCEL y M.D. LUQUE DE CASTRO
Flow –Injection Analysis: Principles and applications.
Ellis Horwood, Chichester, (1987).
- 101.** C. RUIZ-CAPILLAS y F. JIMÉNEZ-COLMENERO
Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: A review
Food Chem., 112 (2009) 487-493.
- 102.** <http://ifs.massey.ac.nz/resources/chemistry/dissociation/orgbases.htm>

103. I.L. FINAR

Química Orgánica I. Principios fundamentales.

Ed. Alhambra, S. A., 3^a Ed., (1975) p. 783.

104. F.A. CAREY y R.J. SUNDBERG

Advanced Organic Chemistry. Part B: Reactions and synthesis.

Plenum Press. New York, 3rd Ed., (1999) p. 589.

105. E. MÁRKI, B. LENTI, G.. VATAI y E. BÉKÁSSY-MOLNÁR

Clean technology for acetone absorption and recovery.

Sep. Purif. Technol., 22-23 (2001) 377-382.

106. <http://www.opti.org/publicaciones/pdf/resumen8.pdf>

DETERMINACIÓN DE 3-HIDROXIBUTIRATO/3-HIDROXIVALERATO

107. <http://www.rae.es>

108. NORMA ASTM D 6400-04
"Standard Specification for Compostable Plastics."

109. I. KYRIKOU y D. BRIASSOULIS
Biodegradation of Agricultural Plastic Films: A Critical Review.
J. Polym. Environ., 15 (2007) 125-150.

110. A. KRZAN, S. HEMJINDA, S. MIERTUS, A. CORTI y E. CHIellini
Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics.
Polym. Degrad. Stabil., 91 (2006) 2819-2833.

111. N. GRASSIE y E.J. MURRAY
The Thermal Degradation of Poly(-D)- β -Hydroxybutyric Acid): Part 3-The Reaction Mechanism.
Polym. Degrad. Stabil., 6 (1984) 127-134.

112. M. ERCEG, T. KOVACIC y I. KLARIC
Thermal degradation of poly(3-hydroxybutyrate) plasticized with acetyl tributyl citrate.
Polym. Degrad. Stabil., 90 (2005) 313-318.

113. A. KHARE y S. DESHMUKH
Studies toward producing eco-friendly plastics.
J. Plastic Film Sheet., 22 (2006) 193-211.

114. I. VROMAN y L. TIGHZERT
Biodegradable Polymers.
Mater., 2 (2009) 307-344.

115. L. AVEROUS y N. BOQUILLON
Biocomposites based on plasticized starch: thermal and mechanical behaviours.
Carbohydr. Polym., 56 (2004) 111-122.

116. L.R. CASTILHO, D.A. MITCHELL y D.M.G. FREIRE
Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation.
Bioresource Technol., 100 (2009) 5996-6009.

117. K. VAN DE VELDE y P. KIEKENS
Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications.
Polym. Test., 21 (2002) 433-442.

-
- 118.** F. MIGNECO, Y.-C. HUANG, R.K. BIRLA y S.J. HOLLISTER
Poly(glycerol-dodecanoate), a biodegradable polyester for medical devices and tissue engineering scaffolds.
Biomaterials, 30 (2009) 6479-6484.
- 119.** Y. IKADA y H. TSUJI
Biodegradable polyesters for medical and ecological applications.
Macromol. Rapid Commun., 21 (1999) 117-132.
- 120.** W. AMASS, A. AMASS y B. TIGHE
A Review of Biodegradable Polymers: Uses, Current Developments in the Synthesis and Characterization of Biodegradable Polyesters, Blends of Biodegradable Polymers and Recent Advances in Biodegradation Studies
Polym. Int., 47 (1998) 89-144.
- 121.** N. ANGELOVA y D. HUNKELER
Rationalizing the design of polymeric biomaterials.
Trends Biotechnol., 17 (1999) 409-421.
- 122.** A. TEINBÜCHEL y B. FÜCHTENBUSCH
Bacterial and other biological systems for polyester production.
Trends Biotechnol., 16 (1998) 419-427.
- 123.** L.L. MADISON y G.W. HUISMAN
Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic.
Microbiol. Mol. Biol. Rev., 63 (1999) 21-53.
- 124.** Y. POIRIER
Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism.
Prog. Lipid. Res., 41 (2002) 131-155.
- 125.** S. TAGUCHI, H. NAKAMURA, T. KICHISE, T. TSUGE, I. YAMATO y Y. DOI
*Production of polyhydroxyalkanoate (PHA) from renewable carbon sources in recombinant *Ralstonia eutropha* using mutants of original PHA synthase.*
Biochem. Eng. J., 16 (2003) 107-113.
- 126.** A. K. MOHANTY, M. MISRA y L.T. DRZAL
Sustainable Bio-Composites from Renewable Resources: Opportunities and Challenges in the Green Materials World.
J. Polymers Environ., 10 (2002) 19-26.

- 127.** B. WITHOLT y B. KESSLER
Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics.
Curr. Opin. Biotechnol., 10 (1999) 279-285.
- 128.** S.Y. LEE y J.-I. CHOI
Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste Environment.
Waste Manage., 19 (1999) 133-139.
- 129.** T. VOLOVA
Polyhydroxyalkanoates-Plastic Materials of the 21st Century: Production, Prop. and Appl.
Nova Science Publishers, Hauppauge, New York (2004).
- 130.** A.J. ANDERSON y E.A. DAWES
Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates.
Microbiol. Rev., 54 (1990) 450-472.
- 131.** A. NATH, S. BHAT, J. DEVLE y A.J. DESAI
Enhanced production of 3-hydroxybutyric acid (3-HB) by in vivo depolymerisation of polyhydroxybutyric acid in 3-hb dehydrogenase mutants of Methylobacterium sp. ZP24
Ann. Microbiol., 55 (2005) 107-111.
- 132.** P.I. NIKEL, M.J. PETTINARI, M.A. GALVAGNO y B.S. MÉNDEZ
Poly(3-Hydroxybutyrate) Synthesis by Recombinant Escherichia coli arcA Mutants in Microaerobiosis.
Appl. Environ. Microb., 72 (2006) 2614-2620.
- 133.** Y. DOI, A. SEGAWA y M. KUNIOKA
Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in Alcaligenes eutrophus.
Int. J. Biol. Macromol., 12 (1990) 106-11.
- 134.** A.A. AMIRUL, A.R.M. YAHYA, K. SUDESH, M.N.M. AZIZAN y M.I.A. MAJID
Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by Cupriavidus sp. USMAA1020 isolated from Lake Kulim, Malaysia.
Bioresource Technol., 99 (2008) 4903-4909.
- 135.** B. HAZER y A. STEINBÜCHEL
Increased diversification of polyhydroxyalkanoates by modification reactions for industrial and medical applications.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 74 (2007) 1-12.

- 136.** H. UEDA y Y. TABATA
Polyhydroxyalkanoate derivatives in current clinical applications and trials.
Adv. Drug Deliver Rev., 55 (2003) 501-518.
- 137.** H. SATO, M. HOSHINO, H. AOI, T. SEINO, Y. ISHIDA, K. AOI y H. OHTANI
Compositional analysis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by pyrolysis-gas chromatography in the presence of organic alkali.
J. Anal. Appl. Pyrolysis 74 (2005) 193-199
- 138.** A. ZINN, B. WITHOLT y T. EGLI
Occurrence, synthesis and medical application of bacterial Polyhydroxyalkanoate.
Adv. Drug Deliver Rev., 53 (2001) 5-21.
- 139.** T. VOLOVA, E. SHISHATSKAYA, V. SEVASTIANOV, S. EFREMOV y O. MOGILNAYA.
Results of biomedical investigations of PHB and PHB/PHV fibers
Biochem. Eng. J., 16 (2003) 125-133.
- 140.** S.Y. LEE y Y. LEE
Metabolic Engineering of Escherichia coli for Production of Enantiomerically Pure (R)-(-)-Hydroxycarboxylic Acids
Appl. Environ. Microb., 69 (6) (2003) 3421-3426
- 141.** S.Y. LEE, S.H. PARK, Y. LEE y S.H. LEE
Production of Chiral and other valuable compounds from microbial polyesters.
Biopolymers, 4 (2003) 375-387
- 142.** G.-Q. CHEN y Q. WU
Microbial production and applications of chiral hydroxyalkanoates.
Appl. Microbiol. Biot., 67 (2005) 592-599.
- 143.** R.P.X. HESSELMANN, T. FLEISCHMANN, R. HANY y A.J.B. ZEHNDER
Determination of polyhydroxyalkanoates in activated sludge by ion chromatographic and enzymatic methods.
J. Microbiol. Meth., 35 (1999) 111-119.
- 144.** J. YU, D. PLACKETT y L.X.L. CHEN
Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions.
Polym. Degrad.Stabil., 89 (2005) 289-299.
- 145.** F. MONTEIL-RIVERA, A. BETANCOURT, H. VAN TRA, A. YEZZA y J. HAWARI
Use of headspace solid-phase microextraction for the quantification of poly(3-hydroxybutyrate) in microbial cells.
J. Chromatogr. A, 1154 (2007) 34-41.

- 146.** S. KARLSSON, C. SARES, R. RENSTAD y A.C. ALBERTSSON
Gas chromatographic, liquid chromatographic and gas chromatographic-mass spectrometric identification of degradation products in accelerated aged microbial polyhydroxyalkanoates.
J. Chromatogr. A, 669 (1994) 97-102.
- 147.** M.-H. YANG y Y.-M. CHOONG
A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C₂–C₁₂) volatile organic acids in foods.
Food Chem., 75 (2001) 101-108.
- 148.** V. RIIS y W. MAI
Gas chromatographic determination of poly-P-hydroxybutyric acid in microbial biomass after hydrochloric acid propanolysis.
J. Chromatogr., 445 (1988) 285-289.
- 149.** P. FURRER, R. HANY, D. RENTSCH, A. GRUBELNIK, K. RUTH, S. PANKE y M. ZINN
Quantitative analysis of bacterial medium-chain-length poly([R]-3-hydroxyalkanoates) by gas chromatography.
J. Chromatogr. A, 1143 (2007) 199-206.
- 150.** S. JAN, C. ROBLLOT, G. GOETHALS, J. COURTOIS, B. COURTOIS, J.E.N. SAUCEDO, J.P. SÉGUIN y J.N. BARBOTIN
Study of parameters affecting Poly(3-hydroxybutyrate) quantification by gas chromatography
Anal. Biochem., 225 (1995) 258-263.
- 151.** A. OEHMEN, B. KELLER-LEHMANN, R.J. ZENG, Z. YUAN y J. KELLER
Optimisation of poly-β-hydroxyalkanoate analysis using gas chromatography for enhanced biological phosphorus removal systems.
J. Chromatogr. A, 1070 (2005) 131-136.
- 152.** Y. CUI, J.P. BARFORD y R. RENNEBERG
Determination of Poly(3-hydroxybutyrate) using a combination of enzymatic spectrophotometry and alkaline hydrolysis.
Anal. Lett., 39 (2006) 2429-2439.
- 153.** Y. CUI, J.P. BARFORD y R. RENNEBERG
Determination of Poly(3-hydroxybutyrate) using a combination of enzyme-based biosensor and alkaline hydrolysis.
Anal. Sci., 22 (2006) 1323-1326.
- 154.** D. SEEBACH y M.G. FRITZ
Detection, synthesis, structure, and function of oligo(3-hydroxyalkanoates): contributions by synthetic organic chemists.
Int. J. Biol. Macromol., 25 (1999) 217-236.

-
- 155.** H.U. BERGMAYER, K. GAWEHN, H. KLOTZSCH, H.A. KREBS y D.H. WILLIAMSON.
Purification and properties of crystalline 3-hydroxybutyrate dehydrogenase from Rhodopseudomonas Spheroides.
Biochem. J., 102 (1967) 423-431.
- 156.** D.H. WILLIAMSON, J. MELLANBY y H.A. KREBS
Enzymic determination of d-(-)- β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood.
Biochem. J., 82 (1962) 90-98.
- 157.** N. KIBA, H. KOEMADO y M. FURUSAWA
Flow-injection determination of 3-hydroxybutyrate in serum with an immobilized 3-hydroxybutyrate dehydrogenase reactor and fluorescence detection.
Talanta, 9 (1994) 1583-1586.
- 158.** N. KIBA, Y. INOUE, M. TACHIBANA, K. TANI y H. KOIZUMI
Simultaneous determination of D-glucose and 3-hydroxybutyrate by chemiluminescence detection with immobilized enzymes in flow injection system.
Anal. Sci., 19 (2003) 1203-1206
- 159.** C.K. PIRES, P.B. MARTELLI, B.F. REIS, J.L. LIMA y M.L. SARAIVA
An automatic flow procedure for the determination of 3-hydroxybutyrate in animal serum and plasma.
J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 2457-2460.
- 160.** R.C.H. KWAN, P.Y.T. HON, W.C. MAK, L.Y. LAW, J. HU y R. RENNEBERG
Biosensor for rapid determination of 3-hydroxybutyrate using bienzyme system.
Biosens. Bioelectron., 21 (2006) 1101-1106.
- 161.** M.E. LEÓN-GONZÁLEZ Y A. TOWNSHEND
Flow-injection determination of paraoxon by inhibition of immobilized acetylcholinesterase.
Anal. Chim. Acta, 236 (1990) 267-272.
- 162.** J.-K. LI y A.E. HUMPHREY
Factors Affecting Culture Fluorescence When Monitoring Bioreactors.
J. Ferment. Bioeng., 2 (1992) 104-111.

DETERMINACIÓN DE GLICEROL

- 163.** K. MERVARTOVÁ, M. POLÁSEK y J.M. CALATAYUD
Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals
J. Pharm. Biomed. Anal., 45 (2007) 367-381.
- 164.** J. RUZICKA y G.D. MARSHALL
Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays.
Anal. Chim. Acta, 237 (1990) 329-343.
- 165.** P. TZANAVARAS, A. ECONOMOU, C. ZACHARIS y D. THEMELIS
SciTopics, Research summaries by experts Sequential Injection Analysis: The second generation of Flow injection techniques.
http://www.scitopics.com/Sequential_Injection_Analysis.html
- 166.** M. A. SEGUNDO y A.O.S.S. RANGEL
Sequential injection flow system with improved sample throughput: determination of glycerol and ethanol in wines.
Anal. Chim. Acta, 458 (2002) 131-138.
- 167.** MANUEL MIRÓ, JOSÉ MANUEL ESTELA y VÍCTOR CERDÀ
Recent Advances in On-line Solvent Extraction Exploiting Flow Injection/Sequential Injection Analysis.
Curr. Anal. Chem., 1 (2005) 329-343.
- 168.** B. HORSTKOTTE, E. WERNER, S. WIEDEMEIER, O. ELSHOLZ y V. CERDÀ, R. LUTTMANN
At-line determination of formaldehyde in bioprocesses by sequential injection analysis.
Anal. Chim. Acta, 559 (2006) 248-256.
- 169.** M. MIRÓ y H.E. HARALD
Solid reactors in sequential injection analysis : recent trends in the environmental field.
TrAC. Trends Anal. Chem., 25 (2006) 267-281.
- 170.** J. MA, D. YUAN y Y. LIANG
Sequential injection analysis of nanomolar soluble reactive phosphorus in seawater with HLB solid phase extraction.
Mar. Chem., 111 (2008) 151-159.
- 171.** P.C.A.G. PINTO, M.L.M.F.S. SARAIVA y J.L.F.C. LIMA
Sequential injection analysis as a tool for implementation of enzymatic assays in ionic liquids.
Talanta, 77 (2008) 479-483.

- 172.** A.R.T.S. ARAUJO, M.L.M.F.S. SARAIVA y J.L.F.C. LIMA
Determination of total and oxidized glutathione in human whole blood with a sequential injection analysis system.
Talanta, 74 (2008) 1511-1519.
- 173.** R.B.R. MESQUITA y A.O.S.S. RANGEL
A review on sequential injection methods for water analysis.
Anal. Chim. Acta, 648 (2009) 7-22.
- 174.** M. PAGLIANO y M. ROSSI
Future of Glycerol. New Usages for a Versatile Raw Material.
The Royal Society of Chemistry. Green Chemistry Series, 2008.
http://books.google.com/books?id=40jS3POb6VYC&pg=PA1&lpg=PA1&dq=glycerol+propiedades&source=bl&ots=7r9AAYBzEO&sig=3IjB4wYRS3XBK3A6IKYtEj6hD2s&hl=es&ei=ptfiSuSqBMz44AaM27GLAg&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3&ved=0CBsQ6AEwAg#v=onepage&q=&f=false
- 175.** <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/601a700/nspn0624.pdf>
- 176.** Z.-X. WANG, J. ZHUGE, H. FANG y B.A. PRIOR
Glycerol production by microbial fermentation: A review
Biotechnol. Adv., 19 (2001) 201-223.
- 177.** I. LAPENAITE, A. RAMANAVICIENE y A. RAMANAVICIUS
Current Trends in Enzymatic Determination of Glycerol
Crit. Rev. Anal. Chem., 36 (2006) 13-25.
- 178.** Á. NÉMETH y B. SEVELLA
Development of a New Bioprocess for Production of 1,3-propanediol I.: Modeling of Glycerol Bioconversion to 1,3-propanediol with Klebsiella pneumoniae Enzymes.
Appl. Biochem. Biotechnol., 144 (2008) 47-58.
- 179.** C.E. NAKAMURA y G.M. WHITED
Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol.
Curr. Opin. Biotechnol., 14 (2003) 454-459.
- 180.** S.S. YAZDANI y R. GONZALEZ
Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry.
Curr. Opin. Biotechnol., 18 (2007) 213-219.

- 181.** M. GONZÁLEZ–PAJUELO, J.C. ANDRADE y J.J. VASCONCELOS
Production of 1,3-propanediol by Clostridium butyricum VPI 3266 using a synthetic medium and raw glycerol.
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 31 (2004) 442- 446.
- 182.** SEHOVIC, V. PETRAVIE Y V. MARIE
Glycerol and Wine Industry. Glycerol Determination in Grape Must and Wine.
Glycerol and Wine Industry:Kem. Ind. 53 (2004) 505-516.
- 183.** K.M. OVERKAMP, B.M. BAKKER, P. KOTTER, M.A. LUTTIK, J.P. VAN DIJKEN y J.T. PRONK
Metabolic Engineering of Glycerol Production in Saccharomyces cerevisiae
Appl. Environ. Microbiol., 68 (2002) 2814-2821.
- 184.** V.P. HANKO y J.S. ROHRER
Determination of Carbohydrates, Sugar Alcohols, and Glycols in Cell Cultures and Fermentation Broths Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection.
Anal. Biochem., 283 (2000) 192-199.
- 185.** F. REMIZE, J.L. ROUSTAN, J.M. SABLAYROLLES, P. BARRE y S. DEQUIN
Glycerol Overproduction by Engineered Saccharomyces cerevisiae Wine Yeast Strains Leads to Substantial Changes in By-Product Formation and to a Stimulation of Fermentation Rate in Stationary Phase.
Appl. Environ. Microbiol., 65 (1999) 143-149.
- 186.** F.M. YONG, K.H. LEE y H.A. WONG
Modifications to Lambert and Neish's method of glycerol determination.
J. Biochem. Biophys. Methods, 6 (1982) 115 – 118.
- 187.** M.C.B.S.M. MONTENEGRO y J.L.F.C. LIMA
Development of a tubular periodate electrode for flow-injection determination of glycerol.
Talanta, 40 (1993) 1563-1568.
- 188.** J.A.G. NETO, A.R.A. NOGUEIRA, H.B. FILHO., E.A.G. ZAGATTO y J.L.F.C. LIMA y M.C.B.S.M. MONTENEGRO
Multi-site detection in flow analysis. Part 3. Periodate tubular electrode with low inner volume as a relocatable detector.
Anal. Chim. Acta, 285 (1994) 293-299.
- 189.** G.C. LUCA, B.F.REIS, E.A.G. ZAGATTO, M. CONCEIC, B.S.M. MONTENEGRO, A.N. ARAUJO y J.L.F.C. LIMA
Development of a potentiometric procedure for determination of glycerol and 2,3-butanediol in wine by sequential injection analysis.
Anal. Chim. Acta, 366 (1998) 193-199.

- 190.** P. BONDIOLI y L.D. BELLA
An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel.
Eur. J. Lipid Sci. Technol., 107 (2005) 153-157.
- 191.** D. NAVIGLIO, R. ROMANO, F. PIZZOLONGO, A. SANTINI, A. DE VITO, L. SCHIAVO, G. NOTA y S.S. MUSSO
Rapid determination of esterified glycerol and glycerides in triglyceride fats and oils by means of periodate method after transesterification.
Food Chem., 102 (2007) 399-405.
- 192.** L.C. GONÇALVES FILHO y G.A. MICKE
Development and validation of a fast method for determination of free glycerol in biodiesel by capillary electrophoresis.
J. Chromatogr. A, 1154 (2007) 477-480.
- 193.** L. MARANGHETTI y N. RAMOS
Determination of free glycerol in biodiesel at a platinum oxide surface using potential cycling technique.
Talanta, 79 (2009) 92-96.
- 194.** K. BANSAL, J. MCCRADY, A. HANSEN y K. BHALERAO
Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in biodiesel.
Fuel, 87 (2008) 3369-3372.
- 195.** W. SCHOENFELDER
Determination of monoglycerides, diglycerides, triglycerides and glycerol in fats by means of gel permeation chromatography [C-VI 5b(02)]
Eur. J. Lipid Sci. Technol., 105 (2003) 45-48.
- 196.** G.P. P ARPINELLO y A. VERSARI
A simple high-performance liquid chromatography method for the analysis of glucose, glycerol, and methanol in a bioprocess.
J. Chromatogr. Sci., 38 (2000) 259-261.
- 197.** M. CASTELLARI, E. SARTINI, U. SPINABELLI, C. RIPONI y S. GALASSI
Determination of carboxylic acids, carbohydrates, glycerol, ethanol, and 5-HMF in beer by high-performance liquid chromatography and UV-Refractive index double detection.
J. Chromatogr. Sci., 39 (2001) 235-238.
- 198.** A. KIYOSHIMA, K. KUDO, N. NISHIDA y N. IKEDA
HPLC simultaneous determination of glycerol and mannitol in human tissues for forensic analysis.
Forensic Sci. Int., 125 (2002) 127-133.

-
- 199.** M. HAJEK, F. SKOPAL y J. MACHEK
Determination of free glycerol in biodiesel.
Eur. J. Lipid Sci. Technol., 108 (2006) 666-669.
- 200.** H.X. LI, J. DONG, W.X. CHEN, S. WANG, H.B. GUO, Y. MAN, P.S. MO y J.Z. LI
Measurement of serum total glycerides and free glycerol by high-performance liquid chromatography.
J. Lipid Res., 47 (2006) 2089-2096.
- 201.** E. MORO, R. MAJOCCHI, C. BALLABIO, S. MOLFINO y P. RESTANI
A rapid and simple method for simultaneous determination of glycerol, fructose, and glucose in wine.
Am. J. Enol. Vitic., 58 (2007) 279-282.
- 202.** R.A. FRIELER, D.J. MITTENESS, M.Y. GOLOVKO, H.M. GIENGER, T.A. ROSENBERGER y A. THAD
Quantitative determination of free glycerol and myo-inositol from plasma and tissue by high-performance liquid chromatography.
J. Chromatogr. B, 877 (2009) 3667-3672.
- 203.** A.I. CABANERO, CABANERO, J.L. RECIO y M. RUPEREZ
Simultaneous Stable Carbon Isotopic Analysis of Wine Glycerol and Ethanol by Liquid Chromatography Coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry.
J. Agric. Food Chem., 58 (2010) 722-728
- 204.** A.J. DE KONING
Determination of glycerol by gas chromatography using meso-erythritol as internal standard.
Analyst, 129 (2004) 352-354.
- 205.** L. WANG, J. QIAN, Z. HU, Y. ZHENG y W. HU
Determination of dihydroxyacetone and glycerol in fermentation broth by pyrolytic methylation/gas chromatography.
Anal. Chim. Acta, 557 (2006) 262-266.
- 206.** M. THEVIS, S. GUDDAT, U. FLENKER y W. SCHANZER
Quantitative analysis of urinary glycerol levels for doping control purposes using gas chromatography-mass spectrometry.
Eur. J. Mass Spectrom., 14 (2008) 117-125.
- 207.** J. COLE, J. LEFLER y R. CHEN
Fast separation of FFA, FAME, and glycerol for biodiesel analysis by Supercritical fluid chromatography.
LC GC North America, (2008) 40-41.

- 208.** V. DIXIT, J.C. TEWARI, B.K. CHO y J.M.K. IRUDAYARAJ
Identification and quantification of industrial grade glycerol adulteration in red wine with Fourier transform infrared spectroscopy using chemometrics and artificial neural networks.
Appl. Spectrosc., 59 (2005) 1553-1561.
- 209.** D. GRONE, H.J. METTERNICH y W. SCHOENFELDER
Quantitative NMR-spectroscopic analysis of the compounds of glycerol esters of fatty acids.
Fett-Lipid, 100 (1998) 64-69.
- 210.** B. MERCHIE, A. GIRARD, B. MAISTERRENA, P. MICHALON y R. COUTURIER
Reliable amperometric determination of glycerol and glycerol-3-phosphate with a bienzymatic nylon membrane electrode.
Anal. Chim. Acta, 263 (1992) 85-91.
- 211.** A. MONTOYA, C. MARCH, A. MOCHOLÍ, A. ABAD, J.J. MANCLÚS y J.M. FERRERO
Electrochemical assays based on enzyme-electrode systems to determine glycerol and propylene glycol in tobacco casing.
Sensors and Actuators B: Chemical, 16 (1993) 429-434.
- 212.** D. COMPAGNONE, M. ESTI, M.C. MESSIA, E. PELUSO y G. PALLESCHI
Development of a biosensor for monitoring of glycerol during alcoholic fermentation.
Biosens. Bioelectron., 13 (1998) 875-880.
- 213.** C.-H. WU, L. SCAMPAVIA, J. RUZICKA y B. ZAMOST
Micro sequential injection: fermentation monitoring of ammonia, glycerol, glucose, and free iron using the novel lab-on-valve system.
Analyst, 126 (2001) 291-297.
- 214.** M. NAVRATIL, J. TKAC, J. SVITEL, B. DANIELSSON y E. STURDIK
Monitoring of the bioconversion of glycerol to dihydroxyacetone with immobilized Gluconobacter oxydans cell using thermometric flow injection analysis.
Process Biochem., 36 (2001) 1045-1052.
- 215.** M. YAQOOB y A. NABI
Flow injection chemiluminescent assays for glycerol and triglycerides using a co-immobilized enzyme reactor.
Luminescence, 18 (2003) 67-71.
- 216.** V. KALIA y C.S. PUNDIR
Determination of serum triglycerides using lipase, glycerol kinase, glycerol-3-phosphate oxidase and peroxidase co-immobilized onto alkylamine glass beads
Indian J. Biochem. Biophys., 41 (2004) 326-328.

- 217.** L.-C. WU y C.M. CHENG
Flow-injection enzymatic analysis for glycerol and triacylglycerol
Anal. Biochem. 346 (2005) 234-240.
- 218.** J. KATRLÍK, V. MASTIHUBA, I. VOSTIAR, J. SEFCOVICOVA, V. STEFUCA y P. GEMEINER
Amperometric biosensors based on two different enzyme systems and their use for glycerol determination in samples from biotechnological fermentation process
Anal. Chim. Acta, 566 (2006) 11-18.
- 219.** M.E. GHICA y C.M.A. BRETT
Development and applications of a bienzymatic amperometric glycerol biosensor based on a poly(neutral red) modified carbon film electrode.
Anal. Lett., 39 (2006) 1527-1542.
- 220.** H. BELHADJ-TAHAR, B.B. NASSAR, N. SADEG y Y. COULAIS
Monitoring of adipocyte responsiveness by in situ microdialysis in lipodystrophy tissue: Adjustment of a glycerol quantification method in small samples.
Acta Clin. Belg., 61 (2006) 143-146.
- 221.** V. ŠTEFUCA, I. VOŠTIAR, J. ŠEFCOVIČOVÁ, J. KATRLÍK, V. MASTIHUBA, M. GREIFOVÁ y P. GEMEINER
Development of enzyme flow calorimeter system for monitoring of microbial glycerol conversion
Appl. Microbiol. Biotechnol., 72 (2006) 1170-1175.
- 222.** M. GAMELLA, S. CAMPUZANO, A.J. REVIEJO y J.M. PINGARRON
Integrated multienzyme electrochemical biosensors for the determination of glycerol in wines.
Anal. Chim. Acta, 609 (2008) 201-209.
- 223.** T.B. GORIUSHKINA, L.V. SHKOTOVA, G.Z. GAYDA, H.M. KLEPACH, M.V. GONCHAR, A.P. SOLDATKIN y S.V. DZYADEVYCH
Amperometric biosensor based on glycerol oxidase for glycerol determination
Sens. Actuators B: Chem., 144 (2010) 361-367.
- 224.** F.A. VEGA, C.G. NUNEZ, B. WEIGEL, B. HITZMANN y J.C.D. RICCI
On-line monitoring of galactoside conjugates and glycerol by flow injection analysis.
Anal. Chim. Acta, 373 (1998) 57-62.
- 225.** H. UKEDA, Y. FUJITA, M. SAWAMURA y H. KUSUNOSE
Flow Injection Analysis of Glycerol Based on Oxygen Consumption Using Glycerol Dehydrogenase and NADH Oxidase.
Anal. Sci., 10 (1994) 445-448.

- 226.** S. KONDRUWEIT, B.A.A. DREMEL y R.D. SCHMID
A new Chemiluminometric Method for the Determination of Glycerol in Wine by Flow Injection Analysis with Immobilised Glycerol Dehydrogenase in Combination with NADH Oxidase.
Analytical Letters, 27 (1994) 1489-1505.
- 227.** M.I. PRODRAMIDIS, C.D. STALIKAS, SM. TZOUWARA-KARAYANNI y M.I. KARAYANNIS
Determination of glycerol in alcoholic beverages using packed bed reactors with immobilized glycerol dehydrogenase and an amperometric FIA system.
Talanta, 43 (1996) 27-33.
- 228.** N. KIBA, N. AZUMA y M. FURUSAWA
Chemiluminometric method for the determination of glycerol in wine by flow-injection analysis with co-immobilized glycerol dehydrogenase/NADH oxidase.
Talanta, 43 (1996) 1761- 766.
- 229.** M. ALVAREZ-GONZALEZ, S.A. SAIDMAN, M.J. LOBO-CASTANON, A.J. MIRANDA-ORDIERES y P. TUNON-BLANCO
Electrocatalytic detection of NADH and glycerol by NAD(+)-modified carbon electrodes.
Anal. Chem., 72 (2000) 520-527.
- 230.** E. MATAIX y M.D. LUQUE DE CASTRO
Simultaneous determination of ethanol and glycerol in wines by a flow injection-pervaporation approach with in parallel photometric and fluorimetric detection.
Talanta, 51 (2000) 489-496.
- 231.** A.O.S.S. RANGEL y I.V. TÓTH
Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection
Anal. Chim. Acta, 416 (2000) 205-210.
- 232.** A. EFTEKHARI
Glycerol biosensor based on glycerol dehydrogenase incorporated into polyaniline modified aluminium electrode using hexanocyanoferrate as mediator.
Sensors Actuat. B, 80 (2001) 283-289.
- 233.** I. LAPENAITE, B. KURTINAITIENE, L. MARCINKEVICIENE, I. BACHMATOVA, V. LAURINAVICIUS y A. RAMANAVICIUS
An enzymatic sensor for the analysis of glycerol in beverages.
Chem. Pap-Chem. Zvesti, 55 (2001) 345-349.
- 234.** M. NICULESCU, R. MIELIAUSKIENE, V. LAURINAVICIUS y E. CSOREGI
Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors.
Food Chem., 82 (2003) 481-489.

- 235.** M. NICULESCU, S. SIGINA y E. CSOREGI
Glycerol Dehydrogenase Based Amperometric Biosensor for Monitoring of Glycerol in Alcoholic Beverages.
Anal. Lett., 36 (2003) 1721-1737.
- 236.** E.N. FERNANDES, M.N. DE CAMPOS MOURA, J.L.F.C. LIMA y B.F. REIS
Automatic flow procedure for the determination of glycerol in wine using enzymatic reaction and spectrophotometry
Microchem. J., 77 (2004) 107-112.
- 237.** H.M. OLIVEIRA, M. A. SEGUNDO, J.L.F.C. LIMA, V. GRASSI y E. A.G. ZAGATTO
Kinetic Enzymatic Determination of Glycerol in Wine and Beer Using a Sequential Injection System with Spectrophotometric Detection
J. Agric. Food Chem., 54 (2006) 4136-4140.
- 238.** I.B. REJEB, F. ARDUINI, A. AMINE, M. GARGOURI y PALLESCHI
Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination.
Anal. Chim. Acta, 594 (2007) 1-8.
- 239.** A. RADOI, D. COMPAGNONE, M. BATIČ, J. KLINČAR, LO GORTON y G. PALLESCHI
NADH screen-printed electrodes modified with zirconium phosphate, Meldola blue, and Reinecke salt. Application to the detection of glycerol by FIA.
Anal. Bioanal. Chem., 387 (2007) 1049-1058.
- 240.** J. SEFCOVICOVÁ, J. KATRLIK, V. STEFUCA, V. MASTIUBA, I. VOSTIAR, G. GREIF, M. BUCKO, J. TKAC y P. GEMEINER
A filtration probe-free on-line monitoring of glycerol during fermentation by a biosensor device
Enzyme Microb. Technol., 42 (2008) 434-439.
- 241.** E.V. IVANOVA, W. SCHUHMAN y A.D. RYABOV
Reagentless enzymatic sensors based on carbon-paste electrodes containing ruthenium mediators for the on-line determination of glycerol.
J. Anal. Chem., 64 (2009) 404-409.
- 242.** H. CORDIER, F. MENDES, I. VASCONCELOS y J. M. FRANÇOIS
A metabolic and genomic study of engineered Saccharomyces cerevisiae strains for high glycerol production.
Metab. Eng., 9 (2007) 364-378.
- 243.** Sigma-Aldrich (1997)
Enzymatic Assay of Glycerol Dehydrogenase, SPGLYC01.
http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/glycerol_dehydrogenase_ph_10.Par.0001.File.dat/glycerol_dehydrogenase_ph_10.pdf

244. Toyobo Enzymes. Glycerol Dehydrogenase from *Cellulomonas* sp. GYD-301.
<http://www.toyobo.co.jp/e/seihin/xr/enzyme>.

245. LLOYD A. CURRIE
International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).
Pure Appl. Chem., 67 (1995) 1699-1723.

246. J.C. MILLER y J.N. MILLER.
Statistics for Analytical Chemistry.
Ellis Horwood, 3rd ed., (1993).

ARTÍCULOS PUBLICADOS

ARTÍCULO I

Flow-injection determination of acetone with diazotized anthranilic acid through a fluorescent reaction intermediate.

Analytica Chimica Acta, 600 (2007) 172–176

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Flow-injection determination of acetone with diazotized anthranilic acid through a fluorescent reaction intermediate

C. García de María^{a,*}, K.B. Hueso Domínguez^a, N. Martín Garrido^b

^a Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, University of Salamanca, Plaza de la Merced s/n, E-37008 Salamanca, Spain

^b Dpto. de Química Orgánica, University of Salamanca, Plaza de la Merced s/n, E-37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 December 2006

Received in revised form

22 February 2007

Accepted 23 February 2007

Published on line 4 March 2007

Keywords:

Acetone

Flow injection

Fluorimetry

Anthranilic acid

ABSTRACT

Acetone and diazotized anthranilic acid react in alkaline solution, giving a fluorescent intermediate that can be measured at excitation and emission wavelengths of 305 and 395 nm, respectively. Based on this, a fluorimetric flow-injection method is proposed for the determination of acetone in aqueous solution. Under the proposed conditions, acetone can be detected at concentrations higher than 8×10^{-7} M, with a linear application range from 1×10^{-6} to 2×10^{-4} M and an R.S.D. of 2.7% (1.0×10^{-5} M, $n = 10$). A sampling frequency of 24 h^{-1} is achieved. Some potentially interfering species are investigated.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Acetone is a highly volatile compound that is commonly investigated both in biological and environmental samples. The determination of acetone is usually performed by gas chromatography with flame ionization or mass spectrometry detectors (GC-MS), or by liquid chromatography with ultraviolet detection after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) [1,2]. Other chromatographic methods include electrochromatography [3], micellar electrokinetic chromatography after derivatization with DNPH [4], liquid chromatography with photometric or fluorimetric detection after derivatization with tailor-made reagents such as CAZTH (4-chloro-6-(4-phenylazoanilino)-1,3,5-triazine-2-hydrazine) [5], gas chromatography with electron capture detection after reaction with bromine [6] and GC-MS after derivatization with DNPH [7] or PFBHA (o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine) [8,9].

Non-chromatographic methods are scarce. Anthranilic acid [10], vanillin [11] and salicylaldehyde [12] have been used for the photometric determination of acetone. Other methods based on FTIR spectroscopy [13,14], ion mobility spectrometry [15,16] or potentiometry with a bromide-selective electrode [17] have also been reported.

Here, a new approach to the determination of acetone in aqueous solutions was considered. The photometric method based on the reaction of acetone with diazotized anthranilic acid [10] was revisited from a fluorimetric point of view. From our experiments, the final red compound described in that method was not fluorescent, although fluorescence was temporarily observed during the first minutes of reaction. Transitory fluorescence was also detected in the background reaction between diazotized anthranilic acid and the hydroxyl ions. Once the conditions for measuring the fluorescent intermediates were established, the fluorescence intensity was found to be proportional to the concentration of acetone, this

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294483; fax: +34 923 294574.

E-mail address: cgardem@usal.es (C. García de María).

being the basis for the fluorimetric method proposed here. Flow-injection analysis was used to achieve kinetic measurements.

2. Experimental

2.1. Apparatus and materials

Batch experiments were performed with a RF-5000 spectrofluorimeter (Shimadzu, Madrid, Spain) fitted with a high-sensitivity holder. A computerized RF-10AXL fluorescence detector with SCL-10AVP System Controller and LC Solution software (Shimadzu) was used for the flow experiments. Reagents were propelled through the flow system with a Minipuls 2-HP4 peristaltic pump (Gilson, Madrid) with calibrated vinyl pump tubes (0.60 cc m^{-1}). Samples were injected with a V-1451 injection valve (Upchurch Scientific, Barcelona, Spain) provided with loops of different volume; the sample loop was fed with another peristaltic pump. A V-1101D 4-way diagonal-flow switching valve (Upchurch Scientific) was also used. Both valves were controlled by the computer. Flangeless fittings, unions and tees (Upchurch Scientific) and 0.5 mm i.d. PTFE tubing were used in the flow system. The working temperature was controlled with a Lauda E-103 circulation thermostat (Huco-Erlöss, Madrid).

2.2. Reagents

All main chemicals were supplied by Scharlab, S.L. (Barcelona). Anthranilic (2-aminobenzoic) acid, sodium hydroxide, hydrochloric acid and sodium nitrite were of analytical grade; acetone was of HPLC grade. Stock solutions of $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ diazotized anthranilic acid were prepared daily by dissolving 0.343 g of anthranilic acid and 0.216 g of sodium nitrite in 250 mL of cold 0.25 M hydrochloric acid; working solutions were obtained by proper dilution with cold 0.25 M hydrochloric acid. All these solutions were stable for at least 12 h when kept refrigerated. Other chemicals, used to investigate interferences, were also of analytical grade and were supplied by Scharlab, Panreac (Barcelona), Carlo Erba (Madrid) or Merck (Madrid). Distilled-deionized water was used throughout.

2.3. Main and background reactions. Fluorimetric features

In preliminary semiquantitative experiments, the reaction of acetone with diazotized anthranilic acid (ABA-DIA) was conducted under the experimental conditions reported earlier [10]. Aqueous acetone was first mixed with ABA-DIA in 0.25 M hydrochloric acid and then sufficient 5 M sodium hydroxide was added to afford a final strongly alkaline solution. The fluorescence spectra of the acidic or alkaline solutions of ABA-DIA with and without acetone were recorded and compared. The solutions containing ABA-DIA and acetone in 0.25 M hydrochloric acid were colourless; their fluorescence spectra were stable and showed maximum excitation and emission at 350 and 385 nm, respectively. When these solutions were rendered alkaline, they gradually began to show a pale yellow colour, which later became increasingly red.

The alkaline solutions were initially not fluorescent but fluorescence appeared and increased in parallel with the yellow colour described. The excitation spectra then showed a maximum at 305 nm, the maximum emission being at 395 nm (Fig. 1). After several minutes, the maximum emission shifted to 425 nm while fluorescence faded out. No spectral differences were observed between acidic solutions of ABA-DIA with and without acetone. When the solutions without acetone were rendered alkaline, they also became increasingly yellow, but no red colour was observed. Their maximum excitation and emission wavelengths were identical to those of the solutions with acetone, but the changes in fluorescence intensity were slower and less pronounced (Fig. S1). Both the speed of change and the maximum value of fluorescence intensity depended on the concentrations of ABA-DIA, sodium hydroxide and acetone. In all cases, fluorescence intensity began to decline within the first 5 min of the reaction and disappeared completely in less than 30 min. Optimal detection of the fluorescent intermediates was achieved as fluorescence increased, at excitation and emission wavelengths of 305 and 395 nm, respectively.

2.4. Flow system and experimental procedure

The working flow system is depicted in Fig. 2. A cold acidic solution of ABA-DIA (C_1) merged first with water (C_2), and later with sodium hydroxide (C_3). The final flow entered a four-way diagonal-flow switching valve, where two of the ports were interconnected with the reactor R. Samples were injected with the flow passing through R. Then, at a certain time after the injection (deviation time, t_D), the valve was actuated so that the reacting sample was trapped and retained in R for a certain period of time (retention time, t_R) until the valve was returned back to its original position. The contents of R were then carried to the detector, giving a positive peak signal. A blank

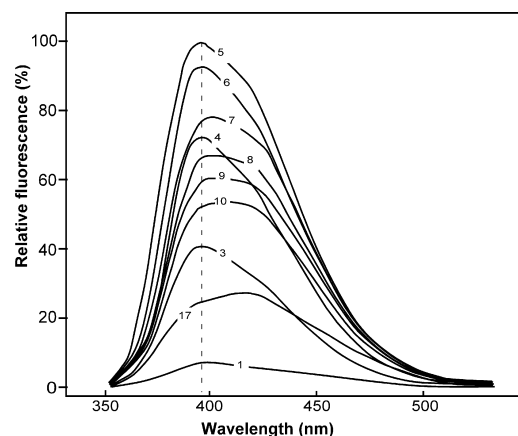


Fig. 1 – Sequential fluorescence emission spectra of a solution containing ABA-DIA and acetone after alkalization. Excitation wavelength: $\lambda_{ex} = 305 \text{ nm}$; scan speed: 60 nm s^{-1} ; scan interval: 18 s (numbers on spectra indicate the scan order); acetone = $6.5 \times 10^{-4} \text{ M}$; ABA-DIA = $6.5 \times 10^{-4} \text{ M}$; excess of sodium hydroxide = 0.15 M.

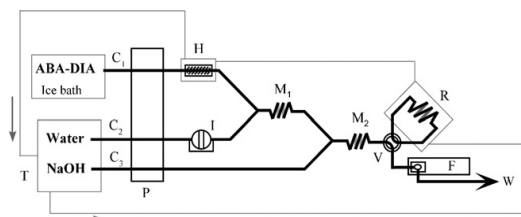


Fig. 2 – Proposed flow system for the determination of acetone. C₁, C₂, C₃: channels; T: circulation thermostat; P: peristaltic pump; H: heating coil; I: injection valve; M₁, M₂: mixing coils; R: reaction coil; V: four-way diagonal-flow switching valve; F: fluorimeter; W: waste.

signal was obtained when water was injected instead of acetone. The reaction temperature was controlled by keeping R, H, and the containers of water and sodium hydroxide at constant temperature by means of a circulation thermostat. The flow rates and the size of R, H, M₁ and M₂ were fixed (Table 1), while the sample volume and the deviation time were optimised to achieve minimum dispersion and maximum trapping of the injected samples. With this configuration and procedure, the reaction time was determined directly by the retention time and this was fixed at will, without need of changing the rest of the working conditions. In fact, with the proposed flow rates, the difference between these two parameters was a constant value of only a few seconds. The effects of ABA-DIA, sodium hydroxide, acetone, temperature and retention time on the background and main reactions were evaluated through the absolute (F) and relative ($\Delta F = F_{\text{acetone}} - F_{\text{blank}}$) peak heights, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Optimisation of sample volume and deviation time

Samples of quinine (1 mgL^{-1}) in 0.05 M sulphuric acid were injected into a stream of 0.05 M sulphuric acid (C₂) while water was pumped through C₁ and C₃. The fluorimeter was

Table 1 – Experimental variables fixed or investigated

Variable	Experimental range	Fixed/proposed value
Flow rate (mL min^{-1})		
C ₁ , C ₂ , C ₃		1.00
Reactor size and shape		
H		500 cm, coiled tube
M ₁ , M ₂		25 cm, coiled tubes
R		125 cm, knotted tube
Sample volume (μL)	35–240	115
Deviation time, t_D (s)	5–20	9
NaOH (M)	0.28–2.5	0.5
ABA-DIA (M)	3.0×10^{-4} – 1.0×10^{-2}	2.0×10^{-3}
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	25–40	35
Retention time, t_R (s)	0–300	120

set for the detection of quinine ($\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$). Experiments were performed in series corresponding to fixed sample volumes. Within each series, an initial injection was made with the flow passing continuously through R. The height of the peak recorded ($F_{V_i}^0$) was a measure of sample dispersion and was taken as the reference value of the series. In subsequent injections, different deviation times were used. In each of these experiments, a first peak was obtained due to the fraction of sample not retained in R. This peak was discarded, but once the baseline was regained, the four-way valve was switched back to its original position and a second peak due to the retained fraction was recorded. The degree of proximity between the height of this second peak (F) and $F_{V_i}^0$ was taken as a measure of the trapping effectiveness. The results (Fig. S2) indicate that maximum $F_{V_i}^0$, and therefore minimum sample dispersion, was obtained with sample volumes of $115 \mu\text{L}$ or higher. For this volume, a deviation time between 8 and 11 s provided optimum trapping. A sample volume of $115 \mu\text{L}$ and a deviation time of 9 s were thus used for all subsequent experiments.

3.2. Influence of sodium hydroxide, ABA-DIA and acetone

The concentrations of sodium hydroxide and ABA-DIA were varied within the ranges shown in Table 1. Experiments were conducted in series, each series with fixed concentrations of sodium hydroxide and ABA-DIA. Acetone solutions and water were injected and retained in R for times varying from 0 to 300 s, with intervals of 15 s. For a given retention time, the background signal fell upon increasing the concentration of sodium hydroxide, a minimum constant level being reached for concentrations of 1 M or higher. For retention times shorter than 60 s, the background signal increased slightly with the concentration of ABA-DIA over the whole experimental range, but a maximum signal was observed at intermediate concentrations, close to $2 \times 10^{-3} \text{ M}$, when longer retention times were considered. The effects of sodium hydroxide and ABA-DIA on the net signal of acetone are shown in Fig. 3. Maximum signals were observed at concentrations of sodium hydroxide close to 0.5 M, whatever the concentration of acetone or ABA-DIA. For this concentration of sodium hydroxide, the signals were maximum with concentrations of ABA-DIA close to $2 \times 10^{-3} \text{ M}$. At fixed concentrations of sodium hydroxide and ABA-DIA, the net signal of acetone changed with time as shown in Fig. 4. A maximum was observed, such that the higher the concentration of acetone, the shorter the time necessary for the maximum to be reached.

3.3. Influence of temperature

Fig. 5 shows the effect of temperature on the net signal for $1.0 \times 10^{-4} \text{ M}$ acetone. The signal increased continuously with temperature, but only for short or intermediate retention times. With longer times, the maximum net signal was obtained at intermediate temperatures. Low signal reproducibility was observed in the experiments at temperatures close to or higher than 40°C , especially in those with long retention times, this apparently being due to the generation of bubbles in reactor R.

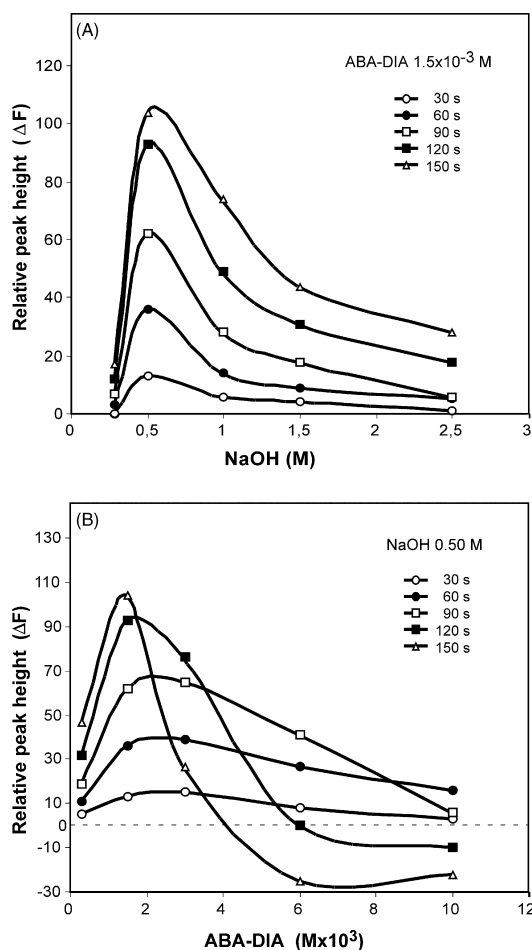


Fig. 3 – Effects of (A) sodium hydroxide and (B) ABA-DIA on the net signal of 6.0×10^{-4} M acetone for different retention times.

3.4. Mechanism

According to the reactivity of aryl diazonium compounds [18,19], the background reaction would proceed through nucleophilic attack by the hydroxyl ions on the diazonium group of ABA-DIA. A similar mechanism is suggested (Fig. S5) for the main reaction, which would proceed through nucleophilic attack by acetone. These reactions would compete with each other and, as anionic acetone is more nucleophilic than the hydroxyl ion, the main reaction would prevail, provided the solution is sufficiently alkaline for acetone to be in its basic form. Although the suggested mechanism needs verification, it matches and complements the earlier proposal by Rahim and Bashir [10] and it would explain the parallelism observed between the background and the main reactions.

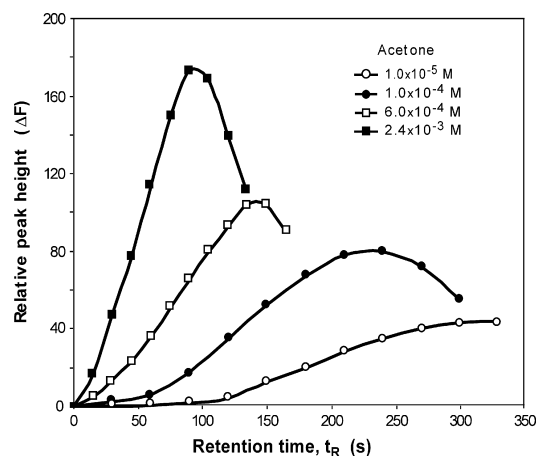


Fig. 4 – Effect of retention time on the net signal of different concentrations of acetone, NaOH = 0.5 M; ABA-DIA = 2.0×10^{-3} M.

3.5. Determination of acetone. Analytical features

With the flow system and procedure described in Section 2.4 and the working conditions proposed in Table 1, concentrations of acetone $\geq 8 \times 10^{-7}$ M can be detected (the limit of detection is considered as the minimum concentration of acetone injected that affords a ΔF of $3\sigma_B$, σ_B being the standard deviation ($n=10$) of the blank peak height). The relationship between the concentration of acetone injected and the measured ΔF is linear in the 1.0×10^{-6} to 2.0×10^{-4} M range ($\Delta F = (4.70 \pm 0.04)10^5[\text{acetone}] + (0.4 \pm 0.4)$; $r = 0.9995$; $n = 9$). The relative standard deviation ($n = 10$) for 1.0×10^{-5} M acetone is 2.7%. A sampling frequency of 24 h^{-1} is achieved. Some inorganic and organic compounds (Table 2) have been found to interfere because under the proposed working conditions they give fluorescence signals. As in the case of the limit of detec-

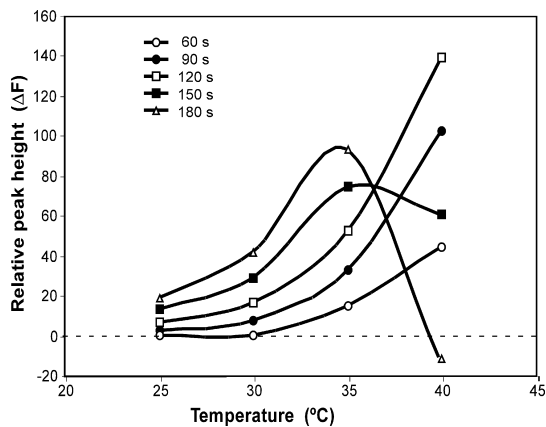


Fig. 5 – Effect of temperature on the net signal of 1.0×10^{-4} M acetone for different retention times, NaOH = 0.5 M; ABA-DIA = 2.0×10^{-3} M.

Table 2 – Interferences

Compound	Interference level (M)
Acetaldehyde	$\geq 7 \times 10^{-6}$
Acetate	$\geq 2 \times 10^{-2}$
Acetoacetate	$\geq 7 \times 10^{-6}$
Ammonia	$\geq 3 \times 10^{-3}$
Ethyl alcohol	$\geq 2 \times 10^{-2}$
Formaldehyde	$\geq 2 \times 10^{-3}$
Hydrazine	$\geq 5 \times 10^{-7}$
Methyl alcohol	$\geq 5 \times 10^{-2}$
Phenol	$\geq 7 \times 10^{-7}$
Sulphide	$\geq 3 \times 10^{-6}$
Sulphite	$\geq 3 \times 10^{-5}$

tion, the interference level is considered as the minimum concentration of interfering species injected that affords a ΔF of $3\sigma_B$.

4. Conclusions

A fluorimetric method was developed for the rapid and sensitive quantitation of acetone in aqueous solution. The method was based on the measurement of a reaction intermediate, this being a new approach to the determination of acetone and a possible alternative to other already existing methods.

Acknowledgment

This work was supported by the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (Ref.: BQU2002-02332).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.aca.2007.02.065.

REFERENCES

- [1] Environmental Health Criteria 207, World Health Organisation, Geneva, 1998
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc207.htm>.
- [2] Assessment report on acetone for developing ambient-air quality objectives, Alberta Environment/Toxico-Logic Consulting Inc., Alberta, 2004.
<http://www.environment.gov.ab.ca/info/library/6665.pdf>.
- [3] Y.-S. Fung, Y. Long, *Electrophoresis* 22 (2001) 2270.
- [4] S.L. Zhao, T.Y. Dai, Z. Liu, F.S. Wei, H.F. Zou, X.B. Xu, *Chemosphere* 35 (1997) 2131.
- [5] C. Kempter, W. Pötter, N. Binding, H. Klänning, U. Witting, U. Karst, *Anal. Chim. Acta* 410 (2000) 47.
- [6] I. Sarudi, E. Visi-Varga, *Talanta* 46 (1998) 589.
- [7] I.Z. Dong, S.C. Moldoveanu, *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 25.
- [8] N. Sugaya, K. Sakurai, T. Nakagawa, N. Onda, S. Onodera, M. Morita, M. Tezuka, *Anal. Sci.* 20 (2004) 865.
- [9] L. Dong, X.Z. Shen, C.H. Deng, *Anal. Chim. Acta* 569 (2006) 91.
- [10] S.A. Rahim, W.A. Bashir, *Microchem. J.* 26 (1981) 329.
- [11] S. Amlathe, V.K. Gupta, *Analyst* 115 (1990) 1385.
- [12] N. Teshima, J.Z. Li, K. Toda, P.K. Dasgupta, *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 189.
- [13] M. Kansiz, J.R. Gapes, D. McNaughton, B. Lendl, K.C. Schuster, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 175.
- [14] Y. Li, J.D. Wang, Z.H. Huang, H.Q. Xu, X.T. Zhou, *J. Environ. Sci. Heal. A* 37 (2002) 1453.
- [15] Z. Xie, S. Sielemann, H. Schmidt, F. Li, J.I. Baumbach, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (2002) 606.
- [16] T. Khayamian, M. Tabrizchi, N. Taj, *Fresen. J. Anal. Chem.* 370 (2001) 1114.
- [17] I. Sarudi, Z. Csapo-Kiss, A. Szabo, E. Varga-Cseresnyes, *Microchim. Acta* 143 (2003) 237.
- [18] I.L. Finar, *Química Orgánica I. Principios fundamentales*, third ed., Alhambra, Madrid, 1975, 783.
- [19] F.A. Carey, R.J. Sundberg, *Advanced Organic Chemistry. Part B: Reactions and Synthesis*, third ed., Plenum Press, New York, 1999, 589.

ARTÍCULO II

Simultaneous kinetic determination of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate in biopolymer degradation processes.

Talanta, 80 (2010) 1436–1440



Simultaneous kinetic determination of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate in biopolymer degradation processes

C. García de María*, K.B. Hueso Domínguez

Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, University of Salamanca, Plaza de la Merced s/n, E-37008 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 June 2009
Received in revised form
21 September 2009
Accepted 25 September 2009
Available online 3 October 2009

Keywords:

Biopolymer
3-Hydroxybutyrate
3-Hydroxyvalerate
Flow injection
Immobilised enzyme
3-Hydroxybutyrate dehydrogenase

ABSTRACT

A new kinetic method is proposed for the simultaneous determination of 3-hydroxybutyrate (3HB) and 3-hydroxyvalerate (3HV) based on the different rate of the 3-hydroxybutyrate dehydrogenase-catalysed reactions of these compounds with coenzyme NAD⁺. A flow injection system with two reactors of immobilised 3-hydroxybutyrate dehydrogenase and dual detection is used. The concentrations of NADH produced after two different reaction times are measured by fluorometry or spectrophotometry and multivariate linear calibration is applied for quantification. Concentrations of 3HB and 3HV between 1×10^{-6} and 1×10^{-4} M can be determined at an average sampling frequency of 20 h^{-1} . In contrast to usual methods, the proposed here makes possible the discrimination of 3HB and 3HV without previous separation so that usual extraction with chlorinated solvents and/or chromatographic separation is not required. The method is of interest in a wide variety of fields concerning PHAs, as it can provide information on the degradation rate and mechanism, composition and structure of these polymers. Its applicability has been proved through the determination of 3HB and 3HV in the digests of some chemically degraded commercial PHAs.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) [1,2] are a large group of natural polymers that are synthesized by numerous bacteria under unfavourable growth conditions. Tailor-made PHAs, with controlled composition, structure and properties, are industrially produced with genetically modified bacteria. PHAs have thermoplastic properties but unlike synthetic plastics, they are biodegradable and biocompatible. Most current applications of PHAs are based on these features and are effected in the environmental and medical fields [3,4]. PHAs are ecological plastics that are used in packaging and coating as substitutes for non-biodegradable petrochemical polymers. Their main medical applications are the fabrication of biodegradable body implants and the control of drug delivery, this being used also in pharmacy, agriculture and veterinary. Moreover, the degradation of PHAs is a source of optically active monomers of hydroxyalkanoic acids [5] that can be used to synthesize chiral compounds such as aminoacids, vitamins, antibiotics, pheromones, perfumes or biodegradable solvents. PHAs can be degraded by enzymes (biodegradation) but also by chemical or thermal processes. From an applicative point of view, the degradation kinetics is essential since the degradation rate or the resultant products can determine the potential applications. Chem-

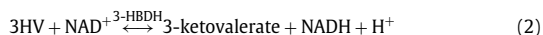
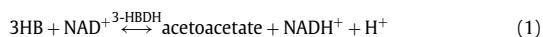
ical hydrolysis is also a crucial stage of methods for indirect analysis of PHAs.

Although more than 150 different monomers of hydroxyalkanoic acids can be combined to give PHAs, only very few of them are actually used. The commonest PHA is poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), a homopolymer of (R)-3-hydroxybutyric acid (3HB). The high cost and some disadvantages of PHB have led to the production of copolymers of 3HB and other hydroxyalkanoic acids. The most widespread commercial products are the copolymers of 3HB and (R)-3-hydroxyvaleric acid (3HV) with variable properties depending on the percentage of poly(3-hydroxyvalerate) (PHV). Experimental products include also blends of PHAs (homopolymers, copolymers or both) and blends of PHAs with other biodegradable polymers. As PHB and PHV are by far the commonest components of PHAs, 3HB and/or 3HV are generally among the ultimate degradation products. The quantification of these monomers can provide information not only on the degradation rate and mechanism but also on the composition and structure of PHAs. Indirect quantification of PHB, PHV and their copolymers is commonly performed after alcoholysis with methanol, ethanol or propanol in sulphuric or hydrochloric acids. The polymers are quantitatively transformed into the esters of 3HB and/or 3HV which can be extracted with chloroform or other solvents and determined by gas chromatography with flame ionization (GC-FID) or mass spectrometry (GC-MS) detection [6,7]. In these methods, the recoveries of PHB and PHV are not complete, due to the partition of the esters between the aqueous and organic phases. Alternatively, the

* Corresponding author. Tel.: +34 923294483.

esters can be hydrolysed to their respective hydroxyacids which are then determined directly in aqueous solution by ion-exchange chromatography with conductivity detection [8]. In concentrated sulphuric acid, PHB is quantitatively converted into crotonic acid that can be analysed by HPLC with ultraviolet detection [9]; this is not applicable to PHV [10]. Alkaline hydrolysis of PHB gives a mixture of crotonic acid and 3HB while PHV is converted into 3HV; these products are then usually determined also by chromatographic methods [9,11]. Whatever the degradation process, the 3HB formed can be determined directly in aqueous solution by enzymatic analysis, this being a rapid alternative to chromatographic methods. Enzymatic determinations are based on the selective action of the enzyme (R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase (3-HBDH) which catalyses the oxidation of 3HB with NAD^+ to give acetoacetic acid and NADH. First described by Williamson et al. [12], this reaction is also the basis of a wide variety of methods for the determination of 3HB in biological samples such as blood, serum, urine or milk for clinical or veterinary purposes [12–16]. In its biopolymer applications, the NADH produced is measured directly by photometry at 340 nm [17] or after coupling with other enzymatic reactions using photometric [8] or amperometric detection [18]. The catalytic action of 3-HBDH is highly selective, but not specific for the R-isomer of 3HB. Although the S-isomer does not react, other (R)-3-hydroxyacids, such as (R)-3-hydroxyvaleric or (R)-3-hydroxyhexanoic acids, can also be transformed at slower rates [19]. The existing enzymatic methods are based on measurements under equilibrium conditions (i.e., when the enzymatic reaction is complete) and the quantification of 3HB is only possible if other interfering hydroxyacids are not present. An enzymatic method has been proposed [8] for the determination of the total sum of 3HB and 3HV although these compounds cannot be individually quantified.

In this article, an enzymatic method is described which makes possible the individual determination of 3HB and 3HV in mixtures of these compounds. It is based on the different rate of the about mentioned 3-HBDH-catalysed reactions:



The total NADH produced is measured under two different kinetic conditions and the concentrations of 3HB and 3HV are calculated by mathematical computation using multivariate linear calibration. Highly reproducible measurements are achieved using flow injection analysis with immobilised 3-HBDH. The proposed procedure is applied to the determination of 3HB and 3HV in chemically degraded commercial PHAs.

2. Experimental

2.1. Apparatus and materials

A RF-10AXL fluorescence detector and a SPD 6AV UV–vis spectrophotometric detector were used. Both detectors were simultaneously connected to a SCL-10AVP System Controller and a computer with LC Solution software (all from Shimadzu, Madrid) for data acquisition. Reagents were propelled with a Minipuls 2-HP4 peristaltic pump (Gilson, Madrid) with calibrated vinyl pump tubes ($0.60 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-1}$). Samples and standards were injected with a V-1451 injection valve (Upchurch Scientific, Barcelona, Spain) electronically actuated and provided with loops of different volume; the sample loop was fed with another peristaltic pump. Flangeless fittings, unions and tees (Upchurch Scientific) and 0.5 mm i.d. PTFE tubing were used in the flow system. The working temperature was controlled with a Lauda E-103 circulation thermostat (Huco-Erlöss, Madrid). Statistica 6 software (StatSoft, Tulsa, USA) was used for statistical computation.

2.2. Reagents

The following chemicals were supplied by Sigma–Aldrich (Madrid): controlled-pore glass PG 240–120, pore size 240, mesh size 80–120; 3-aminopropyltriethoxysilane; glutaraldehyde, 50% (w/v), aqueous solution; (R)-(–)-3-hydroxybutyric acid, sodium salt; (R)-3-hydroxybutyrate dehydrogenase (E.C. 1.1.1.30); (–)-methyl (R)-3-hydroxyvalerate, >98%; crotonic acid (trans-2-butenoic acid), 98%; Trizma[®] hydrochloride (Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride), reagent grade, >99%. Oxidized β -nicotinamide-adenine dinucleotide, NAD^+ , free acid, grade I, 100%, was from Roche Diagnostics (Barcelona). All other chemicals were of analytical-reagent grade. Working solutions of 3-hydroxybutyrate were prepared from a stock solution ($5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$) that was renewed daily. Stock solutions of 3-hydroxyvalerate ($1.8 \times 10^{-3} \text{ M}$) were freshly prepared by the hydrolysis of the methyl-ester in 0.05 M sodium hydroxide (30 min at room temperature).

2.3. Enzyme reactors

The enzyme 3-HBDH (100 U) was immobilised on controlled-pore glass (CPG, 0.1 g) by indirect covalent binding, as described earlier [20]. The immobilised enzyme was stored wet (in deoxygenated 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0) and refrigerated (4°C) in sealed bottles. Under such conditions, 3-HBDH was very stable: after more than 2 years, the stored immobilised enzyme showed about 55% of its initial activity (activities were compared under the proposed working conditions with newly made enzyme reactors). Enzyme reactors were made by packing the CPG-immobilised enzyme into PTFE tubes (1 mm i.d., 5–6 cm long) with $10 \mu\text{m}$ frits (Upchurch Scientific) at the ends. The reactors showed no measurable loss of activity after at least 150 injections under the proposed working conditions.

2.4. Samples and sample preparation

Three commercial PHAs were used (Goodfellow, Huntingdon, England). One of them (sample BP-1) was described as polyhydroxybutyrate/polyhydroxyvalerate 12%-biopolymer (PHB88/PHV12), granule, 10% plasticised pellets (citric ester). The second product (sample BP-2) was described as polyhydroxybutyrate-biopolymer (PHB) sheet, technical grade. The label of the third product (sample BP-3) described a polyhydroxybutyrate-biopolymer (PHB), non-woven fabric, research grade. Since the information given was ambiguous or incomplete, the samples were analysed by NMR to estimate their composition. The commercial products were dissolved in deuterated chloroform and their ^1H NMR spectra were registered in a Varian 200 VX spectrometer at 200 MHz. In sample BP-1, the molar ratio PHB:PHV was found to be 7.6:1 and the plasticiser was identified as tributyl O-acetylcitrate. The NMR analysis indicated that both BP-2 and BP-3 were in fact copolymers of 3HB and 3HV with an approximate molar ratio PHB:PHV of 4.2:1 and 4.1:1, respectively.

An adequate amount (20–40 mg) of commercial product was dissolved in 1 mL of chloroform in the 100 mL round bottom flask of a reflux setup. After chloroform was evaporated by heating at 40°C , 4 mL of propanol and 1 mL of concentrated hydrochloric acid were added and reflux was applied for 3 h at 90°C to perform propanolysis. After diluting and cooling with 80 mL of water, 4 mL of 5 M sodium hydroxide was added to hydrolyse the propyl esters. The mixture was left for 30 min at room temperature and then it was neutralized (pH 7) with hydrochloric acid and made up to 100 mL with water. The resultant sample solutions were analysed for 3HB and 3HV according to the proposed flow injection procedure.

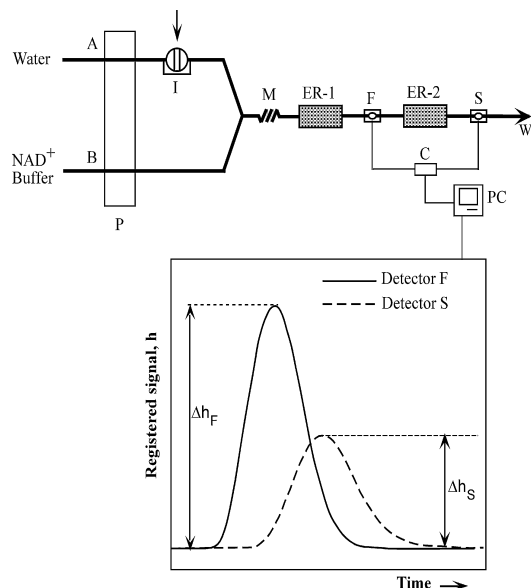


Fig. 1. Diagram of the flow injection system and registered signals. A and B = channels; P = peristaltic pump; I = injection valve; M = mixing coil; ER = enzyme reactors; F = fluorometer; S = spectrophotometer; W = waste; C = control module; PC = computer; Δh_F = fluorescence peak height; Δh_S = absorbance peak height.

2.5. Flow system

The working system is depicted in Fig. 1. It consisted of a flow injection manifold with two enzyme reactors (ER-1, ER-2) containing immobilised 3-HBDH, and two detectors, a fluorometer (F) and a spectrophotometer (S). Both detectors were set for the determination of NADH and were simultaneously connected to a multi-channel data acquisition system where a double real-time signal was registered. Solutions containing 3HB, 3HV or both were injected into a carrier stream (A), merged with the reagent (B, NAD⁺ buffered solution) and reacted for two sequential periods as they passed through the enzyme reactors. Every injected solution gave a peak at each detector. The fluorescence peak height (Δh_F) was proportional to the concentration of NADH produced in the first enzyme reactor according to reactions (1) and/or (2). The absorbance peak height (Δh_S) was proportional to the total NADH accumulated after the second enzyme reactor (i.e., after the two reaction periods). With the proposed configuration, the lower sensitivity of the spectrophotometer in comparison with that of the fluorometer was partly compensated by the higher concentrations of NADH to be measured after the second enzyme reactor. The working temperature was controlled by keeping all the solutions (carrier, reagent and injected samples), the mixing coil (M), and the enzyme reactors at constant temperature by means of a circulation thermostat.

2.6. Experimental procedure

The working conditions for the flow system were first established. Some of them (flow rates, sample volume, size of the enzyme reactors and temperature) were fixed after preliminary experiments. The variables of the reagent solution (pH and concentration of NAD⁺) were studied and set to get maximum signals. Under the proposed conditions, standard samples containing 3HB, 3HV or both were used to establish the calibration equations for the independent or simultaneous determination of these compounds.

Quantifications were based on Δh_F , on Δh_S or on both. The proposed procedure was applied to the determination of 3HB and 3HV in the digests of chemically degraded commercial PHAs.

3. Results and discussion

3.1. Effect of variables

The variables studied and their experimental ranges are summarized in Table 1. The size of the enzyme reactors, the flow rates and the injected sample volume were fixed after preliminary experiments. In the proposed flow system, the registered signals increased on increasing the reaction periods, these being determined by the size of the enzyme reactors and the flow rate through them. Short enzyme reactors were observed to give poor signals unless slow flow rates were used, this giving low sampling frequencies. On the other side, long reactors gave better sensitivity and sampling frequency at moderate flow rates but they produced leaks and became finally obstructed. Predictably, for fixed flow rate and reactors, higher signals but lower sampling frequencies were obtained on increasing the sample volume. The proposed reactors, flow rate and sample volume provided acceptable signals and sampling frequency without flow drawbacks. These conditions can obviously be modified depending on the analytical requirements.

Also predictably, higher fluorescence and absorbance signals were obtained on increasing the working temperature as a result of the increased enzyme activity. However, the rising of temperature produced also less and less reproducible fluorescence peaks. This effect, that was not significant for the absorbance signals, was probably due to the temperature-dependence of the fluorescence of NADH [21] since the flow cell at the fluorometer was not thermostatable. To minimize this effect, a working temperature close to that of the laboratory was proposed.

Once the above mentioned variables were fixed, the influence of pH on the catalytic activity of 3-HBDH for reactions (1) and (2) was first considered. The pH of the reagent solution (1.5×10^{-3} M NAD⁺, 0.10 M Trizma[®]) was varied in the 7.0–9.0 range and 5.0×10^{-5} M solutions of 3HB or 3HV were injected for each pH value. The peak heights obtained at the fluorescence detector are compared in Fig. 2 (a similar graph was obtained from the spectrophotometric detector). The pH profiles indicate that the maximum catalytic activity of 3-HBDH took place at pH close to 8.3 for both 3HB and 3HV. The profiles also indicate that, as expected, 3HV was transformed at lower rate than 3HB.

Table 1
Experimental variables fixed or investigated.

Variable	Experimental range	Fixed/proposed value
Fluorometric detection		
Excitation wavelength		340 nm
Emission wavelength		460 nm
Spectrophotometric detection		340 nm
Flow rates (mL min ⁻¹)		
A and B	0.10–0.75	0.20
Reactor size (cm)		
M		125
ER-1	1–10	5
ER-2	1–10	6
Sample volume (μL)	35–250	115
Temperature (°C)	20–40	25
pH	7.0–9.0	8.3
NAD ⁺ (M)	1.5×10^{-4} to 5.0×10^{-3}	1.5×10^{-3}

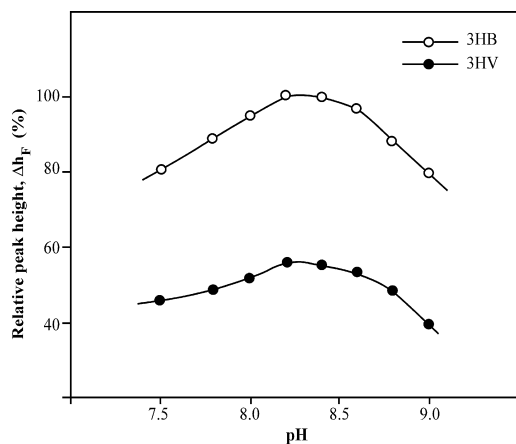


Fig. 2. Effect of pH on the catalytic activity of 3-HBDH. Fluorescence signals for 5.0×10^{-5} M 3HB and 3HV at different pHs.

The concentration of NAD^+ in the reagent solution (0.10 M Trizma®, pH 8.3) varied between 1.5×10^{-4} and 5.0×10^{-3} M. The heights of the peaks registered for both 3HB and 3HV were observed to increase gradually with increasing the concentration of NAD^+ , this effect being less pronounced for concentrations higher than 1.5×10^{-3} M. This value was chosen for all subsequent experiments as it provided reduced NAD^+ consumption without a significant loss of sensitivity.

3.2. Quantification of 3HB and 3HV

The calibration equations for these compounds in aqueous solution are summarized in Table 2. For samples containing only 3HB or 3HV, both Δh_F and Δh_S were linearly related with the concentrations of 3HB or 3HV injected. The slope values of equations in Table 2 indicate that the detection of 3HV was less sensitive than that of 3HB, this being an expected result because of the lower reaction rate of 3HV. The calculated limits of detection were in the range from 2×10^{-8} to 5×10^{-8} M (the limits of detection were calculated from the expression $\text{LOD} = 3\sigma_B/b$, where σ_B was the standard deviation ($n = 10$) of the blank peak height that was obtained when water

was injected, and b was the slope of the proposed equation). Relative standard deviations ($n = 10$) between 0.8% and 1.5% were found for the peak heights of samples 1.0×10^{-5} M. The average sampling frequency was 20 h^{-1} .

For samples containing both 3HB and 3HV, the peak heights Δh_F and Δh_S were predicted by multiple linear regression, this being only valid when the total concentration of 3HB+3HV was below 1×10^{-4} M, approximately. The partial regression coefficients of the multilinear equations (Table 2) were coincident with the individual coefficients found for samples of only 3HB or 3HV. This indicated that the signals of 3HB and 3HV were additive so that the fluorometric or spectrophotometric signals of any mixture of 3HB and 3HV could be calculated by the addition of the signals given by the equivalent individual samples containing only 3HB or 3HV. Apart from not being predictable by multiple linear regression, negative deviations from the additivity were observed for the signals of mixtures with concentrations of 3HB+3HV higher than 1×10^{-4} M, particularly when the 3HB:3HV molar ratio was close to unity. This suggested some kind of interaction between 3HB and 3HV, probably due to the competition of both substrates for the catalytic site on the immobilised enzyme.

4. Application to PHAs

The above proposed procedure was applied to the determination of 3HB and 3HV in solutions produced by propanolic digestion of commercial PHAs. Propanolysis can convert PHB/PHV stoichiometrically into the propyl esters of 3HB/3HV [6,7] although the degradation kinetics and products may depend on the composition and crystallinity of the polymer or just on the applied degradation conditions (digestion time, temperature, etc.) [8,9].

The possible interferences of citrate and crotonic acid were considered. Citrate was a component of sample BP-1 while crotonic acid is usually produced in chemical degradations of PHB. The injection of solutions up to 1.5×10^{-4} M citrate or crotonic acid gave no measurable peaks, so the interference of these compounds by their contribution to the measured signals was discarded. Their possible interference by reaction with 3HB or 3HV was also investigated. To this end, freshly prepared 2.0×10^{-5} M solutions of 3HB or 3HV with or without 1.5×10^{-4} M citrate or crotonic acid at pH 8.3 were left for 1 h at room temperature and then analysed according to the proposed procedure. As no significant

Table 2
Calibration equations for the determination of 3HB and/or 3HV.

Analyte	Detection	Application range (M)/equation ^a
3HB	F	8×10^{-7} to 1×10^{-4} $\Delta h_F = (2.1 \pm 5.7) \times 10^2 + (1.42 \pm 0.02) \times 10^9$ [3HB] $R^2 = 0.9999$; $n = 10$
	S	8×10^{-7} to 1×10^{-4} $\Delta h_S = (-1.6 \pm 1.8) \times 10^2 + (6.52 \pm 0.04) \times 10^8$ [3HB] $R^2 = 0.9999$; $n = 10$
3HV	F	1×10^{-6} to 1×10^{-4} $\Delta h_F = (2.1 \pm 4.6) \times 10^2 + (9.36 \pm 0.10) \times 10^8$ [3HV] $R^2 = 0.9999$; $n = 9$
	S	1×10^{-6} to 1×10^{-4} $\Delta h_S = (0.8 \pm 3.3) \times 10^2 + (4.93 \pm 0.07) \times 10^8$ [3HV] $R^2 = 0.9998$; $n = 9$
3HB and 3HV	F	$1 \times 10^{-6} < [3HB] + [3HV] < 1 \times 10^{-4}$ $\Delta h_F = (3.1 \pm 3.2) \times 10^2 + (1.41 \pm 0.01) \times 10^9$ [3HB] + $(9.30 \pm 0.09) \times 10^8$ [3HV] $R^2 = 0.9998$; $n = 28$
	S	$1 \times 10^{-6} < [3HB] + [3HV] < 1 \times 10^{-4}$ $\Delta h_S = (-0.1 \pm 1.3) \times 10^2 + (6.51 \pm 0.04) \times 10^8$ [3HB] + $(4.94 \pm 0.04) \times 10^8$ [3HV] $R^2 = 0.9999$; $n = 28$

^a Δh_F and Δh_S in μV ; $1 \times 10^3 \mu\text{V} = 1$ fluorescence unit; $4 \times 10^5 \mu\text{V} = 1$ absorbance unit; n = number of standards; regression coefficients are expressed with 95% confidence limits.

Table 3

Analysis of chemically degraded commercial PHAs. Concentrations estimated, added and found in the analysed samples.

Sample	Concentration ^a , M × 10 ⁵					
	Estimated		Added		Found ^b	
	HB	HV	HB	HV	HB	HV
BP-1	5.23	0.69	–	–	5.2 ± 0.2	0.8 ± 0.2
BP-1			1.00	–	6.2 ± 0.2	0.7 ± 0.2
BP-1			–	1.47	5.3 ± 0.2	2.1 ± 0.2
BP-2	3.23	0.77	–	–	2.9 ± 0.1	0.7 ± 0.2
BP-2			1.00	–	3.9 ± 0.1	0.6 ± 0.2
BP-2			–	1.47	3.0 ± 0.1	2.0 ± 0.2
BP-2			1.00	1.47	3.9 ± 0.1	2.2 ± 0.2
BP-3	2.56	0.62	–	–	2.1 ± 0.1	0.7 ± 0.2
BP-3			1.00	–	3.0 ± 0.1	0.9 ± 0.2
BP-3			–	1.47	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.2
BP-3			1.00	1.47	3.2 ± 0.1	2.3 ± 0.2

^a Values refer to the injected solutions.

^b Mean values of three determinations with 95% confidence limits.

differences were observed between the signals of samples with and without citrate or crotonic acid, the possible interference of these compounds by interaction with 3HB or 3HV was also discarded.

Since the degradation was not certain to yield stoichiometric amounts of 3HB and 3HV, standard addition experiments were performed to validate the procedure. To this end, adequate volumes of sample and standard solutions were mixed, properly diluted with water and finally injected into the flow system. Results are summarized in Table 3. All the concentration values in this table refer to the injected solutions. The estimated concentrations were calculated from the initial NMR analysis supposing full conversion of PHB/PHV into 3HB/3HV. The comparison of the concentrations found with the estimated values indicates that the conversion of PHV into 3HV was seemingly complete in all the samples while that of PHB into 3HB was quantitative only in sample BP-1. The different degradation of samples was undoubtedly due to their different composition and structure; in comparison with BP-1, for example, BP-2 and BP-3 were not-plasticised polymers with higher proportion of PHV.

Whatever the conversion degree or the degradation kinetics, the concentrations of 3HB and 3HV found in all the experiments were in agreement with the effected standard additions. Results therefore indicate that the proposed procedure was adequate to discriminate the concentrations of 3HB and 3HV produced in the degradation of the commercial PHAs.

5. Conclusions

The described enzymatic method makes possible the direct determination and discrimination of 3HB and 3HV. In contrast to the methods commonly used for these compounds, previous separation by extraction with chlorinated solvents and/or chromatography is not required. The method is of interest in a wide variety of fields concerning PHAs, as it can provide information on the degradation rate and mechanism, composition and structure of these polymers. Its applicability has been proved through the determination of 3HB and 3HV in the digests of some chemically degraded commercial PHAs.

Acknowledgments

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Ref.: BQU2002-02332). Karina B. Hueso Domínguez thanks the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación for the grant BES-2003-1012.

References

- [1] T. Volova, Polyhydroxyalkanoates—Plastic Materials of the 21st Century: Production, Properties and Application, 1st edition, Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, 2004.
- [2] I. Vroman, L. Tighzert, Biodegradable Polymers, Materials, vol. 2, 2009, doi:10.3390/ma2020307, p. 307.
- [3] B. Hazer, A. Steinbüchel, Appl. Microbiol. Biotechnol. 74 (2007) 1.
- [4] H. Ueda, Y. Tabata, Adv. Drug Deliv. Rev. 55 (2003) 501.
- [5] G.-Q. Chen, Q. Wu, Appl. Microbiol. Biotechnol. 67 (2005) 592.
- [6] A. Oehmen, B. Keller-Lehmann, R.J. Zeng, Z. Yuan, J. Keller, J. Chromatogr. A 1070 (2005) 131.
- [7] P. Furrer, R. Hany, D. Rentsch, A. Grubelnik, K. Ruth, S. Panke, M. Zinn, J. Chromatogr. A 1143 (2007) 199.
- [8] R.P.X. Hesselmann, T. Fleischmann, R. Hany, A.J.B. Zehnder, J. Microbiol. Methods 35 (1999) 111.
- [9] J. Yu, D. Plackett, L.X.L. Chen, Polym. Degrad. Stabil. 89 (2005) 289.
- [10] D. Seebach, M.G. Fritz, Int. J. Biol. Macromol. 25 (1999) 217.
- [11] S. Karlsson, C. Sares, R. Renstad, A.-C. Albertsson, J. Chromatogr. A 669 (1994) 97.
- [12] D.H. Williamson, J. Mellanby, H.A. Krebs, Biochem. J. 82 (1962) 90.
- [13] N. Kiba, H. Koemado, M. Furusawa, Talanta 41 (1994) 1583.
- [14] N. Kiba, Y. Inoue, M. Tachibana, K. Tani, H. Koizumi, Anal. Sci. 19 (2003) 1203.
- [15] C.K. Pires, P.B. Martelli, B.F. Reis, J.L. Lima, M.L. Saraiva, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 2457.
- [16] R.C.H. Kwan, P.Y.T. Hon, W.C. Mak, L.Y. Law, J. Hu, R. Renneberg, Biosens. Bioelectron. 21 (2006) 1101.
- [17] Y. Cui, J.P. Barford, R. Renneberg, Anal. Lett. 39 (2006) 2429.
- [18] Y. Cui, J.P. Barford, R. Renneberg, Anal. Sci. 22 (2006) 1323.
- [19] H.A. Krebs, K. Gawehn, D.H. Williamson, H.U. Bergmeyer, Methods Enzymol. 14 (1969) 222.
- [20] M. Masoom, A. Townshend, Anal. Chim. Acta 171 (1985) 185.
- [21] R.V. Hull, P.S. Conger III, R.J. Hoobler, Biophys. Chem. 90 (2001) 9.

ARTÍCULO III

**Sequential Injection Kinetic Flow Assay for Monitoring Glycerol
in a Sugar Fermentation Process by *Saccharomyces cerevisiae*.**

Applied Biochemistry and Biotechnology, 160 (2010) 1664–1673

Sequential Injection Kinetic Flow Assay for Monitoring Glycerol in a Sugar Fermentation Process by *Saccharomyces cerevisiae*

Karina B. Hueso Domínguez · Ildikó V. Tóth · M. Renata S. Souto · Filipa Mendes · Cándido García De María · Isabel Vasconcelos · António O. S. S. Rangel

Received: 17 February 2009 / Accepted: 18 May 2009 /
Published online: 29 May 2009
© Humana Press 2009

Abstract A sequential injection system to monitor glycerol in a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation process was developed. The method relies on the rate of formation of nicotinamide adenine dinucleotide in its reduced form (NADH, measured spectrophotometrically at 340 nm) from the reaction of glycerol with NAD⁺ cofactor, catalysed by the enzyme glycerol dehydrogenase present in solution. This procedure enables the determination of glycerol between 0.046 and 0.46 g/l, (corresponding to yeast fermentation samples with concentrations up to 50 g/l) with good repeatability (relative standard deviation for $n=10$ lower than 2.2% for three different samples) at a sampling frequency of 25/h. The detection and quantification limits using a miniaturised spectrophotometer were 0.13 and 0.44 mM, respectively. Reagent consumption was of 0.45 μmol NAD⁺ and 1.8 μg enzyme per assay, and the waste production was 2.8 ml per determination. Results obtained for samples were in agreement with those obtained with a high-performance liquid chromatography method.

Keywords Sequential injection analysis · Glycerol · Glucose fermentation · *Saccharomyces cerevisiae* · Kinetic method · Enzymatic assay

Introduction

During a fermentation process, monitoring and control of substrates and/or products is usually carried out to assure the quality of the final product. This is generally done by

K. B. H. Domínguez · C. García De María
Facultad de Ciencias Químicas, Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología,
Universidad de Salamanca, Plaza de la Merced, s/n, Salamanca 37008, Spain

I. V. Tóth · M. R. S. Souto · F. Mendes · I. Vasconcelos · A. O. S. S. Rangel (✉)
CBQF/Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa, Rua Dr. António
Bernardino de Almeida, Porto 4200-072, Portugal
e-mail: aorangel@esb.ucp.pt

M. R. S. Souto
Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia, 296,
Porto 4200-150, Portugal

offline procedures—samples are taken at different time intervals and analytical measurements are performed in a laboratory environment using conventional instruments. This approach inhibits fast access to information about the state of the bio-process and prevents possible feedback actions to improve the quality of the process [1, 2].

Glycerol is one of the major by-products of sugar fermentation by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Glycerol synthesis enables the cell to use the excess of NADH produced during glycolysis in order to maintain its redox balance. Under normal fermentative conditions, glycerol is produced via the excess of NADH [3] or as a response to osmotic stress. The amount of glycerol produced by a wild strain of *S. cerevisiae* can reach 10 g/l under anaerobic conditions [4]. In the application presented in this study, glucose fermentation was carried out by the *S. cerevisiae* mutant strain HC42 [5] adapted to high glucose concentrations. This strain is the result of genetic engineering strategies focused on the redirection of metabolic fluxes and overexpression of the key enzymes of the glycerol pathway. The primary objective of the genetic engineering process was to achieve the maximum glycerol yield. Therefore, accurate and fast measurement of the amount of glycerol produced during the fermentation process is fundamental throughout these optimisation studies.

The produced glycerol can be used as a raw material for the production of 1,3 propanediol with great interest for the chemical and medical industry [6, 7]. Nowadays, with the exponential increase of bio-fuel production, raw glycerol is produced in excess [8]; however, the quality and the quantity of other compounds present in the raw glycerol can compromise the success of a further bio-process aiming for the “green” production of fine chemicals [6]. Therefore, the production of glycerol via sugar fermentation from D-glucose source has potential interest.

Routine methods for glycerol analysis include oxidation, esterification, ether formation, dehydration reaction and chromatographic procedures. However, when samples have a high matrix complexity and high background absorption signals, enzymatic methodologies are usually preferred. Kinetic assessment (continuous monitoring of the concentration change as a function of time) of glycerol in this type of samples presents clear advantages in overcoming potential matrix interferences and achieving adequate selectivity: being relative measurements, the background interference from the sample matrix is reduced, and as the reaction exhibits increased selectivity towards the target analyte, it results in more reliable analytical data. The interferences can be substances that are present in the sample and can cause over- or underestimation of the true analyte concentration. These species can be structurally related to the analyte, and interact with the assay reagents in similar way to the analyte or/and can produce spectral interference at the applied monitoring wavelength.

The genetically modified strain of the yeast *S. cerevisiae* used in the fermentation process analysed in this study, is capable of converting 100 g/l of glucose to around 50 g/l of glycerol, corresponding to approximately a 1:1 molar ratio. This striking capacity will result in a high temporal variation of the sample matrix composition. Therefore, the use of a kinetic method would be a valuable alternative.

Several works were recently reviewed [9] on the use of automatic glycerol biosensor procedures for different applications. Most of them are focused on monitoring of glycerol content in wine and beer samples. Nevertheless, glycerol is a biologically active compound, and glycerol biosensors have also been used for biomedical, clinical and pharmaceutical purposes. In most of these procedures, the biocatalyst (single or multienzyme system) is immobilised on various supports using different immobilisation techniques [10]. However, when repeated analyses are necessary (as is the case of continuous monitoring of a compound), enzyme stability is an essential issue. According to the literature [9], the

continual operation stabilities of these biosensors vary from few hours up to several days, and the storage stabilities were up to several months. In the approach presented in this study, this situation is avoided using enzyme in solution as a fresh aliquot of this reagent is applied in each determination [11].

In this study, a sequential injection analysis (SIA) [12] system based on kinetic measurements is proposed. This computer-controlled flow network has high portability and enables precise control of volume delivery, flow rates and operation time. Compared to flow injection analysis systems, SIA is an attractive alternative because of its increased simplicity, flexibility and robustness and also because it is an environment-friendly analytical procedure due to its low reagent consumption and generation of less wastes [13].

The quantification involves the NAD^+ -dependent enzyme glycerol dehydrogenase (GDH) and relies on the spectrophotometric monitoring at 340 nm of the NADH produced in the assay mixture. This enzyme catalyses the oxidation of glycerol to dihydroxyacetone, with simultaneous reduction of the cofactor NAD^+ to NADH (Eq. 1). The concentration of NADH is thus proportional to the glycerol concentration if NAD^+ and GDH are in sufficiently high concentration to keep the reaction pseudo-first order relative to the substrate [14].



In this work, a SI system for the kinetic determination of glycerol was designed and applied to samples of a fermentation process.

Materials and Methods

Reagents and Chemicals

All chemicals were of analytical reagent grade quality, and solutions were prepared with boiled ultrapure water.

Liophilized NAD^+ -dependent GDH from *Cellulomonas* sp. (ref G3512, Sigma, 70% protein, 3.2 mg of solid, 107 units/mg protein) was used. The enzyme was suspended in 3.2 M ammonium sulphate solution with the pH adjusted to 7.5 and stored at 4 °C. The enzyme working solution (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was prepared daily by dissolving 70 μl of the commercial enzyme in 10 ml of 50 mM potassium phosphate pH 7.5.

The β -nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) approximately 98% (grade III, ref. 10621650001) was obtained from Roche. To avoid its degradation, the solid reagent was maintained refrigerated, while the working solution of the 15 mM NAD^+ in water was prepared daily before use.

Glycerol standard solution (ref. 104094, 87%, $d=1.23$) was acquired from Merck. The 1 M glycerol stock solution was prepared in water. Working standards within the 0.5–5.0 mM concentration range were also prepared in water.

As carrier stream (C, Fig. 1), a buffer consisting of 0.5 M sodium carbonate/bicarbonate solution was prepared by dissolving 5.3 g of Na_2CO_3 and 4.2 g of NaHCO_3 in 200 ml of deionised water where the final pH was adjusted to 10 if necessary.

Bioreactor fermentation samples were taken from the 2-l fermenter vessel (B-Braun, Biostat-MD, Melsungen, Germany) in regular intervals of time and analysed after adequate sample dilution with boiled ultrapure water. The synthetic medium used for the yeast cultivation contained, per litre of deionized water: 1.7 g Bacto yeast nitrogen base (Difco)

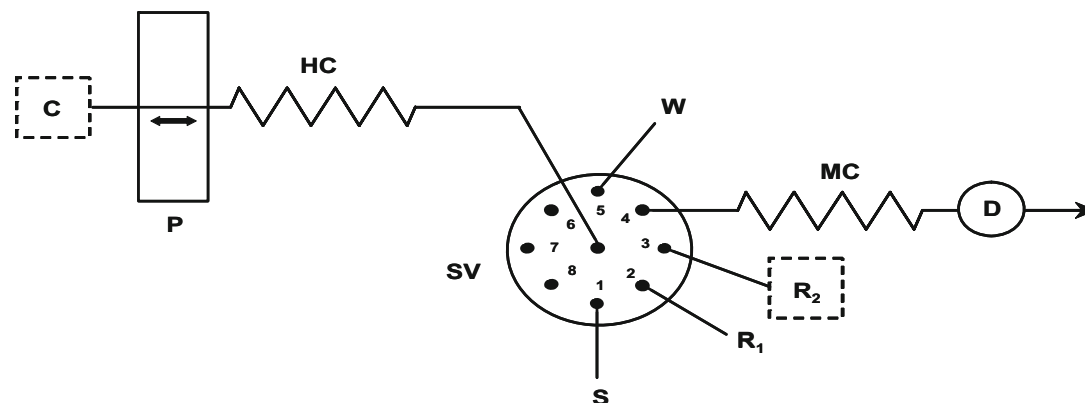


Fig. 1 Flow diagram of the SIA system: *SV* selection valve, *P* peristaltic pump, *HC* holding coil, *MC* knotted mixing coil, *D* spectrophotometric detection system, *S* sample or standard, *R₁* NAD^+ reagent, *R₂* GDH enzyme solution, *C* buffer/carrier stream, *W* waste. Dotted squares represents thermostated solutions

without amino acids and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100 g glucose, 0.02 g L-arginine, 0.05 g threonine, 0.04 g L-tryptophan, 0.06 g L-isoleucine, 0.04 g lysine, 0.01 g methionine, 0.06 g phenylalanine, 0.05 g tyrosine, 0.01 g adenine and 0.01 g uracil. Aerobic batch cultures at 30 °C with continuous stirring at 150 rpm and with an aeration rate of 0.5 vvm were carried out. The pH was maintained at 6.5 by automatic addition of 1 M NaOH.

Apparatus

Solutions were propelled by a Gilson (Middleton, Wisconsin, USA) Minipuls 3 peristaltic pump, equipped with Tygon (Paris, France) polyvinyl chloride pumping tubes (d.i., 0.76 mm) to impel the solutions. In this setup, variable flow rates can be achieved up to 42 $\mu\text{l/s}$. Manifold was built up with 0.8-mm i.d. Omnifit (Cambridge, U.K.) polytetrafluoroethylene tubing. The pump was connected to the central channel of an eight-port electrically actuated selection valve (Valco, Houston, Texas, USA; model VICI C15-3118E). For temperature control, a thermostatic bath (ISCO. Srl, Milano), Model GTR 190 was used.

A Thermo (Waltham, Massachusetts, USA) Spectronic Heλios γ UV-Vis spectrophotometer equipped with a Hellma (Jena, Germany), model 178.712-QS flow cell (10-mm light path; inner optical volume, 80 μl), connected to a Kipp & Zonen (Delft, The Netherlands) BD112 flatbed chart recorder was initially used.

Subsequently, an OceanOptics (Dunedin, FL, USA) USB2000-FLG spectrometer was connected via a 400- μm fibre optical cable (model P400-2-UV-VIS) to the flow cell, placed in an Ocean Optics CUV cell support. A Mikropack (Ostfildern, Germany) Deuterium-Halogen light source, model DH-2000-BAL was used with a 400- μm illumination optical fibre (model P400-2-UV-VIS). Analytical signal acquisition was carried out using the OOIBase32 Spectrometer Operating Software. Wavelength was set at 340 nm.

A 386 Samsung (Seoul, Korea) SD700 personal computer with an Advantec PCL 818 L interface card running a home-made software written in QuickBasic 4.5 controlled the eight-port selection valve positions, the rotation direction and speed of the peristaltic pump. An HP Compaq (Palo Alto, California, USA) dc 5100 MT personal computer running the OOIBase32 Spectrometer Operating Software with Windows XP Professional was used for data acquisition.

Sequential Injection Procedures

The system components were arranged as shown schematically in Fig. 1. The holding coil (HC) was 200 cm long, whereas the mixing coil (MC), located between the selection valve and the detector, was 100 cm long. Other tubes connected to the selection valve were 30 cm long.

The protocol sequence for the determination of glycerol is presented in Table 1. First, aliquots of sample/standard solution, NAD⁺ cofactor and enzyme solution were loaded into the HC. After flow reversal, the string of solutions inside the HC was sent through the MC toward detection. After a preset period of time, the flow was stopped, and acquisition of the analytical signal was performed during an established time interval. Thereafter, the peristaltic pump was reactivated, and the flow cell was washed by the buffer/carrier solution.

Glycerol quantification was based on the rate of formation of NADH, assessed by monitoring the increase in absorbance at 340 nm for a given period of time, after the flow stop. Absorbance values were plotted as a function of time, and the slope value reflected the rate of NADH formation. The linearity of the absorbance versus time function of the obtained graphs was assessed and considered to exist when the correlation coefficient was equal or superior to 0.995 ($n > 20$). Analytical calibration curves were obtained by plotting the rate of NADH formation versus concentration of glycerol.

Accuracy Assessment—HPLC Analysis

High-performance liquid chromatography (HPLC) analyses were run on a high-performance liquid chromatograph (Knauer, Germany) equipped with WellChrom K-2301 refractive index detector (Knauer, Germany). The analytical conditions were as follows: column, Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm; Biorad, Richmond, CA, USA); mobile phase, 1 mM sulphuric acid; flow rate, 0.5 ml/min; injection volume, 20 µl; and temperature, 30 °C.

Results and Discussion

Development of the Sequential Injection System—Preliminary Kinetic Studies

In SIA systems, zone overlap is essential to attain suitable mixing conditions. As a consequence, preliminary studies were made to determine solution aspiration sequence,

Table 1 Sequential injection flow protocol for the determination of glycerol.

Step	Valve position	Operation time (s)	Flow rate (µl/s)	Volume (µl)	Description
a	1	9	10	90	Sample/standard aspiration into HC
b	2	3	10	30	NAD ⁺ aspiration into HC
c	3	3	10	30	Enzyme aspiration into HC
d	4	19.3	30	580	Propulsion of HC content toward the flow cell
e	4	30			Stop period, acquisition of analytical signal
f	4	80	30	2,400	System washing

volumes to be inserted and the time interval during which the pump should propel solutions towards the detection system before a flow stop period. These experiments were carried out using the classical bench-top spectrophotometric detection system with dye solutions and, later on, confirmed with the analytical reagents. It was determined that solutions should be drawn into the HC in the following order: 90 μl of sample/standard, 30 μl of NAD^+ , and 30 μl of enzyme. This sequence allowed reduced enzyme dilution and suitable overlap of the three zones.

The time interval during which the pump was activated before reaction monitoring (Table 1, step d) was also an important parameter to assign in the system design. It defined the portion of the overlapped zones (sample/ NAD^+ /enzyme) present in the flow cell during the flow stop period (Table 1, step e). Time intervals between 17 and 20.5 s were tested (3.0 mM glycerol, 10 mM NAD^+ , and 60 $\mu\text{g/ml}$ GDH solutions, pH 10.0 carrier solution). Absorbance signal acquisition was performed during the first 30 s. Thereafter, the peristaltic pump was reactivated, and the flow cell was washed by the buffer/carrier solution. The interval was fixed at 19.3 s as the absorbance increase was similar for periods within 19.1 and 19.9 s.

Optimization Studies

In order to achieve adequate analytical features for the SIA methodology, several physical and chemical parameters were studied: the effect of pH, enzyme and NAD^+ concentrations and reaction temperature.

The set of experiments described below was carried out at laboratory temperature (approximately 20 °C), using glycerol reference solutions between 0.5 and 5.0 mM and initial NAD^+ and GDH concentrations of 10 mM and 60 $\mu\text{g/ml}$, respectively. This application range was selected to maintain the quantity of the enzyme in excess relative to the substrate concentration without increasing the enzyme consumption and compromising the assay costs. Other parameters were set to values used in previous assays.

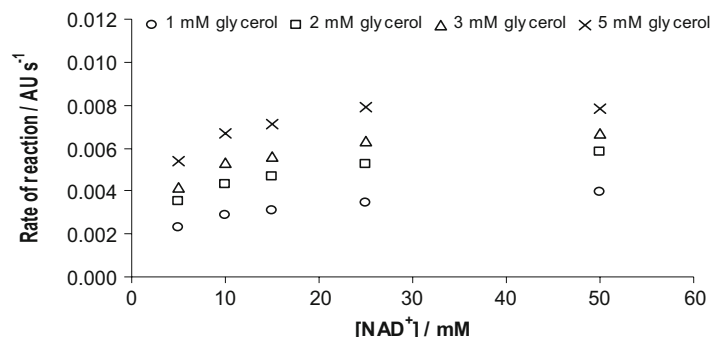
The influence of pH on the reaction rate was studied by varying the pH of the sodium carbonate/bicarbonate carrier solution between 8.0 and 11.0. Similar reaction velocities were reached for pH values between 9.5 and 10.5. The optimum pH reported for GDH is between 10.0 and 10.5, and the pH recommended by bibliography for the activity measurement of this enzyme is pH 10.0 [15, 16]. Therefore, a pH of 10.0 was chosen for further experiments.

The concentration of NAD^+ was studied between 5 and 50 mM. Maximum reaction rate was obtained for the 25 mM NAD^+ . For all NAD^+ concentrations tested, the reaction rates corresponding to each of the glycerol solutions, showed a similar pattern, and reaction rates were a 60%, 75%, 80% and 93% of those obtained for 25 mM NAD^+ . However, considering that maximum reaction rate value (Fig. 2) obtained for 15 mM NAD^+ was only approximately 13% lower, this concentration was chosen as a compromise between sensitivity and reagent consumption.

GDH concentrations between 30 and 120 $\mu\text{g/ml}$ were studied. The concentration of the enzyme was chosen to be 60 $\mu\text{g/ml}$ because, when compared to the highest tested concentration, the rate of reaction was similar ($\approx 10\%$ lower) with a 50% reduction in enzyme consumption.

The influence of temperature was studied by varying the temperature of the enzyme and carrier solutions between 20 and 40 °C with increments at 25, 30, 35 and at 37 °C. As expected, an increase in the rate of the enzymatic reaction was noticed. However, to avoid occasional formation of air bubbles, the temperature was set at 37 °C.

Fig. 2 Rates of reaction (absorbance units per second) obtained with different NAD^+ solutions for several glycerol solutions



The analytical performance of the SIA system coupled to a classical bench top and to a miniaturised charge-coupled device (CCD) array spectrophotometer was assessed. Detection and quantification limits were calculated as proposed by IUPAC [17]. Using the classical spectrophotometric detector, values of 0.01 and 0.15 mM for the detection and quantification limits were obtained, respectively. With the miniaturised CCD array spectrophotometer, the detection limit was 0.13 mM, and the quantification limit was 0.44 mM. Although both limits were higher for the CCD array spectrophotometer, detector portability and the fact that it allows simultaneous monitoring of several wavelengths, enabling multiple detection and background correction, are important advantages to be considered.

Figures of Merit and Application to Samples

The performance of the proposed sequential injection system for the determination of glycerol was evaluated regarding application range, accuracy, repeatability, reagents consumption and determination frequency. The standard concentrations varied between 0.5 and 5.0 mM. This range was only applicable for determination in samples with 0.05–0.5 g/L of glycerol. Therefore, appropriate dilutions were made prior to introduction in the flow system.

The analytical curve was obtained by plotting the reaction rate versus glycerol concentration. As this relationship was not linear for the concentration range defined, the analyte concentration was calculated through the second-order polynomial curve.

Repeatability was estimated for both standard solutions and fermented samples by calculating the relative standard deviation from ten consecutive injections. For three different samples with representative glycerol concentration levels—1.95, 2.63 and 3.85 mM—values of 1.1%, 2.2% and 1.7% were obtained.

Reagent consumption was only 0.45 μmol of NAD^+ and 1.8 μg of the enzyme per assay, and the waste production was around 3 ml per assay for both detectors.

The sampling frequency was calculated by considering the time intervals inherent to each step of the protocol sequence (Table 1). The time required for all of these operations was 144 s, meaning 25 assays per hour.

To evaluate the accuracy of the proposed system, 17 samples taken at different times from two, otherwise identical, fermentation processes were analysed according to the proposed method (C_{SIA}) and by a chromatographic HPLC reference method (C_{Ref}). Results obtained are presented in Table 2.

Samples taken at the beginning of the fermentation processes (1a–3a and 1b–2b) presented high relative deviations from the reference procedure. To assess the accuracy for the other 12 samples, a linear relationship was established between the obtained

Table 2 Glycerol concentrations for samples collected at different fermentation times from two processes (a and b) by the developed SI procedure (C_{SIA}) and an HPLC (C_{Ref}) methodology and corresponding relative deviations (RD).

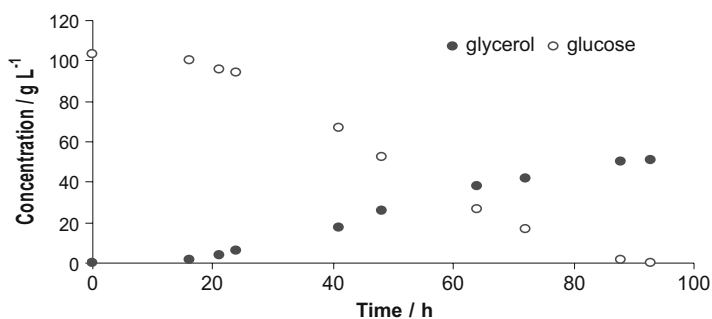
Sample	Fermentation time (h)	C_{SIA} (g/l)	C_{Ref} (g/l)	RD (%)
1a	16	2.5±0.1	1.8	38.9
2a	21	5.5±0.2	4.1	34.1
3a	24	6.85±0.03	5.79	18.3
4a	41	18.9±0.4	17.8	6.2
5a	48	25.5±0.2	25.6	-0.4
6a	64	38.3±0.8	37.9	1.1
7a	72	38.3±0.7	42.1	-9.0
8a	88	46.4±0.7	50.0	-7.2
9a	93	51.2±0.3	51.0	0.4
1b	17	2.8±0.1	2.3	21.7
2b	22	6.7±1.4	4.6	45.7
3b	24	5.7±0.3	5.5	3.6
4b	42	13.5±0.2	14.8	-8.8
5b	73	31.8±0.2	32.2	-1.2
6b	89	37.8±1.5	40.0	-5.5
7b	96	40.5±0.2	43.1	-6.0
8b	113	47.8±0.6	50.2	-4.8

concentrations with the developed method (C_{SIA}) and by the reference HPLC method (C_{Ref}) [18]. The equation $C_{SIA}=1.0536 (\pm 0.0646) C_{ref}-0.577 (\pm 2.401)$, with a correlation coefficient of 0.9906 was obtained. Values between brackets represent the limits of the 95% confidence intervals for the regression parameters. From these figures, it can be concluded that the estimated intercept and slope values do not differ significantly from 0 and 1, respectively, and therefore, no evidence of systematic errors was noticed.

In a normally occurring fermentation process, the development of the nutrients to products ratio follows a defined pattern. Throughout the fermentation process, some of the compounds (glucose, glycerol, succinate, acetate, ethanol, acetoin and acetaldehyde) present in the broth were monitored by HPLC. Considering that along the bioprocess, within these components, glucose is the one that suffers the highest temporal variation, the effect of several glycerol to glucose concentration ratios on the analytical signal were assessed. Three different glycerol concentrations—initial, medium and final glycerol concentrations in the fermentation media—were chosen. For these three glycerol levels, molar ratios between glycerol and glucose of 1:0.5, 1:1, 1:2, 1:5, 1:12 and 1:30 were tested. These ratio values were chosen based on the concentrations found by HPLC procedures in the samples (Fig. 3).

No statistical difference was found between pure glycerol standards and the mixed standards for 0.5 to 5 time excess of glucose (relative deviation lower than 10% were obtained). However, for mixed standard solutions having a large excess of glucose, higher relative deviations were found (up to 50%). This fact can be attributed to the change in the shape of the analytical signal (Fig. 4). On this figure, the absorbance change during the whole analytical cycle can be followed. However, for quantification purposes, only the portion of the curve corresponding to the linear increase in the monitored signal is used. As it can be observed, the registered absolute absorbance values are lower when the excess of glucose increases, but the slope

Fig. 3 Glucose and glycerol concentrations determined by HPLC procedures in fermented samples



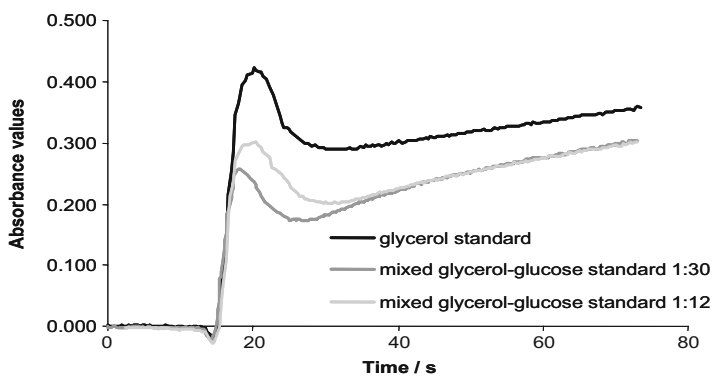
($\Delta A/\Delta t$) of the linear portion of the curves in fact increases, and this finding can explain the overestimation of the glycerol levels in the samples taken in the beginning of the fermentation curves (Table 2, samples 1a–3a and 1b–2b).

Conclusion

The proposed sequential injection system was used for the offline monitoring of biotechnological conversion of glucose to glycerol by a genetically modified strain of *S. cerevisiae*. The main advantages offered by biosensors over conventional analytical techniques are the possibility of portability, of miniaturisation and working onsite and the ability to measure target analytes in complex matrices with minimal sample preparation. Fast and reliable data (consistent with those obtained with HPLC reference procedure) together with low reagent consumption (1.8 μg of enzyme; 0.45 μmol of NAD^+) and minimum waste generation (3.0 ml) were attained.

The present biosensing system holds promise for online detection of glycerol in fermentation processes. As in most of the samples, if glycerol concentration is over the response range of this enzymatic procedure, an online sample dilution would be necessary. This could be accomplished by including an additional step in the SI protocol. Moreover, the applied kinetic strategy can be extended to other substrates, products or by-products of diverse biotransformation processes enabling to surpass background absorption.

Fig. 4 Analytical signals obtained for a pure glycerol standard and mixed glycerol–glucose standards with molar ratios of 1:12 and 1:30



Acknowledgements K. Hueso thanks the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia for the grant BES-2003-1012/Project BQU2002-02332. Ildikó Tóth thanks Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) and FSE (III Quadro Comunitário) for the grant SFRH/BPD/5631/2001.

References

1. Schügerl, K. (2001). *Journal of Biotechnology*, 85, 149–173. doi:10.1016/S0168-1656(00)00361-8.
2. Mello, L. D., & Kubota, L. T. (2002). *Food Chemistry*, 77, 237–256. doi:10.1016/S0308-8146(02)00104-8.
3. Overkamp, K. M., Bakker, B. M., Kotter, P., Luttik, M. A., van Dijken, J. P., & Pronk, J. T. (2002). *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2814–2821. doi:10.1128/AEM.68.6.2814-2821.2002.
4. Remize, F., Roustan, J. L., Sablayrolles, J. M., Barre, P., & Dequin, S. (1999). *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 143–149.
5. Cordier, H., Mendes, F., Vasconcelos, I., & François, J. M. (2007). *Metabolic Engineering*, 9, 364–378. doi:10.1016/j.ymben.2007.03.002.
6. Nakamura, C. H., & Whited, G. M. (2003). *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 454–459. doi:10.1016/j.copbio.2003.08.005.
7. Németh, Á., & Sevela, B. (2008). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 144, 47–58. doi:10.1007/s12010-007-0040-5.
8. Yazdani, S. S., & Gonzalez, R. (2007). *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 213–219. doi:10.1016/j.copbio.2007.05.002.
9. Lapenaite, I., Ramanaviciene, A., & Ramanavicius, A. (2006). *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36, 13–25. doi:10.1080/10408340500451973.
10. Katrlík, J., Mastihuba, V., Vostiar, I., Sefcovicová, J., Stefuca, V., & Gemeiner, P. (2006). *Analytica Chimica Acta*, 566, 11–18. doi:10.1016/j.aca.2006.02.063.
11. Oliveira, H. M., Segundo, M. A., Lima, J. L. F. C., Grassi, V., & Zagatto, E. A. G. (2006). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4136–4140. doi:10.1021/jf060229j.
12. Ruzicka, J., & Marshall, G. D. (1990). *Analytica Chimica Acta*, 237, 329–343. doi:10.1016/S0003-2670(00)83937-9.
13. Segundo, M. A., & Rangel, A. O. S. S. (2002). *Journal of Flow Injection Analysis*, 19, 3–8.
14. Wu, L. C., & Cheng, C. M. (2005). *Analytical Biochemistry*, 346, 234–240. doi:10.1016/j.ab.2005.08.031.
15. Sigma-Aldrich (1997) *Enzymatic assay of glycerol dehydrogenase, SPGLYC01*. St. Louis, MO: Sigma-Aldrich
16. Toyobo Enzymes. Glycerol Dehydrogenase from Cellulomonas sp. GYD-301. <http://www.toyobo.co.jp/e/seihin/xr/enzyme>. Accessed May 30, 2008.
17. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). (1995). *Pure and Applied Chemistry*, 67, 1699–1723. doi:10.1351/pac199567101699.
18. Miller, J. C., & Miller, J. N. (1993). *Statistics for analytical chemistry* (3rd ed.). Chichester, UK: Horwood.



VNIVERSIDAD
DE
SALAMANCA