



Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

“Aplicación de Métodos en Flujo (FIA y SIA) usando Diseño de Experimentos en la Determinación de Cobre y Manganeso en Vinos ”

Para obtener el título de
DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta
M.C. GERMÁN ADÁN SÁNCHEZ GALLEGOS

Directora de Tesis
DRA. EUGENIA GABRIELA CARRILLO CEDILLO

Codirectora de Tesis
DRA. ROCÍO ALEJANDRA CHAVEZ SANTOSCOY

TIJUANA, B.C

Diciembre 2021

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No. 324

Tijuana, B.C., a 09 de diciembre del 2021

C. German Adán Sánchez Gallegos
Pasante de: Doctorado en Ciencias
Presente.-

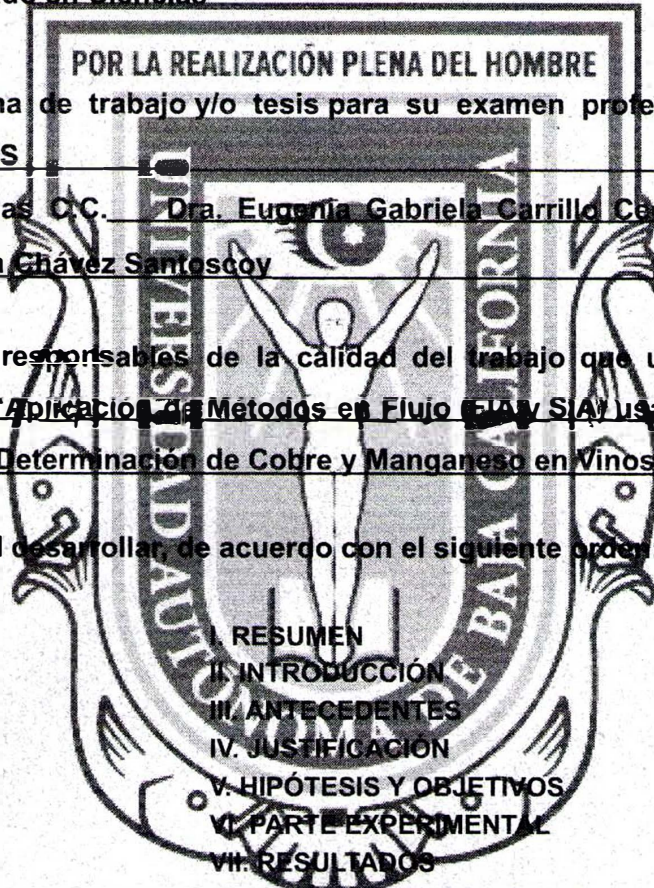
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la

Opción TESIS

Es propuesto por las C.C. Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo y
Dra. Roció Alejandra Chávez Santoscoy

Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema: "Aplicación de Métodos en Flujo ECV y SIAJ usando Diseño de
Experimentos en la Determinación de Cobre y Manganeso en Vinos"

El cual deberá usted desarrollar de acuerdo con el siguiente orden:

- 
- I. RESUMEN
 - II. INTRODUCCIÓN
 - III. ANTECEDENTES
 - IV. JUSTIFICACIÓN
 - V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
 - VI. PARTE EXPERIMENTAL
 - VII. RESULTADOS
 - VIII. ANÁLISIS DE MUESTRAS
 - IX. CONCLUSIONES
 - X. REFERENCIAS
 - XI. ANEXOS


Dra. Ana Alejandra Ramírez Rodríguez
Sub-Directora


Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo
Directora de Tesis


Dra. Roció Alejandra Chávez Santoscoy
Co-Directora de Tesis


M.C. Roberto Alejandro Reyes Martínez
Director Provisional

Contenido

AGRADECIMIENTOS	4
DEDICATORIA.....	6
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABLAS.....	10
I. RESUMEN.....	11
II. INTRODUCCIÓN.....	13
III. ANTECEDENTES.....	15
3.1 El vino	15
3.2 La uva y su morfología.....	16
3.3 Proceso de elaboración del vino	17
3.4 Metales en Vinos	22
3.5 Métodos automáticos de análisis	23
3.5.1 Análisis por Inyección en Flujo (FIA).....	27
3.5.2 Análisis por Inyección Secuencial (SIA)	31
3.6 Diseño de Experimentos.....	33
3.7 Investigaciones relacionadas con cobre y manganeso por sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA) y por inyección secuencial (SIA).	37
IV. JUSTIFICACIÓN	39
V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	40
VI. PARTE EXPERIMENTAL	41
6.1 Equipo, material y reactivos	41
6.1.1 Equipo	41
6.1.2 Material para el sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) e inyección secuencial (SIA).....	43
6.1.3 Reactivos	44
6.1.4 Material de laboratorio	44
6.2 Metodología para Cobre	45
6.2.1 Método para la formación de un complejo de Cu- Porfirina (1 a 210 µg/L Cu)	45

6.2.2 Experimentación por FIA para determinar Cu	45
6.3. Metodología para Manganeseo	48
6.3.1 Método de Oxidación con Periodato (0.2 a 20 mg/L Mn).....	48
6.3.2 Experimentación por FIA para Mn.	50
6.3.3 Experimentación por inyección secuencial para determinar Mn.....	51
VII. RESULTADOS.....	52
7.1 Diseño de Experimentos para Cobre.....	52
7.1.1 Diseño Experimental por FIA para Cu.....	52
Curva de Calibración para la determinación del complejo Cu-porfirina.....	57
Precisión del método como repetibilidad	58
Límites de detección y cuantificación para cobre.....	59
Evaluación de las interferencias en el proceso para cobre por FIA.	59
7.2 Diseño de Experimentos para Manganeseo.....	60
7.2.1 Diseño Experimental por FIA para Mn	60
Diseño Factorial 2 ⁴ para manganeseo por FIA.....	60
Curva de Calibración para Mn por FIA.....	68
Precisión del método como repetibilidad para Mn por FIA	68
Límites de detección y cuantificación para Mn por FIA.....	69
Evaluación de las interferencias en el proceso para Mn por FIA.....	69
7.2.2 Diseño Experimental por SIA para Mn.....	70
Diseño Factorial 2 ⁴ para Mn por SIA	70
Primer Diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.....	74
Segundo Diseño de Box-Behnken para determinación de Mn por SIA.....	78
Curva de Calibración en la determinación de Mn por SIA	82
Precisión del método como repetibilidad para la determinación de Mn por SIA.....	83
VIII. ANÁLISIS DE MUESTRAS.....	84
8.1 Determinación de Cu en muestras de vino por FIA	84
8.2 Determinación de Mn en muestras de vino por FIA	85
IX. CONCLUSIONES.....	87
X. REFERENCIAS.....	89
XI. ANEXOS.....	93

AGRADECIMIENTOS

INSTITUCIONALES

Se hace mención y se agradece el apoyo económico que se recibió por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), para realizar mis estudios de posgrado en el doctorado dentro de los programas de calidad que se ofrecen.

Gracias por la oportunidad que me dio la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (FCQI) por haberme aceptado en su programa educativo de posgrado, así como darme las herramientas y espacio para poder ejercer y enriquecer mis conocimientos en todo el periodo que realice mis estudios del Doctorado.

PERSONALES

Le agradezco a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo llena la felicidad al tener a mis seres queridos, amigos, familia y compañeros que me rodean y están conmigo en todo momento.

Mi mejor amiga Paloma Angelina Díaz Acosta por haber sido una excelente compañera durante mi licenciatura y en el posgrado, por brindarme su confianza, su apoyo inmenso y motivarme a seguir adelante en momentos de inseguridad y desesperación, sobre todo por dejarme formar parte de los mejores momentos de su vida.

Le doy gracias a mi tía Sara Gallegos, mi tío Francisco Gonzales, mi prima Olga Olivia y Ninfa Jazmín por apoyarme en todo momento, los valores que me han inculcado, y por haberme dado consejos y fortaleza cuando más lo necesitaba. Me demostraron que puedo ser emprendedor por la iniciativa que tengo para hacer las cosas y fuerte para

soportar situaciones que se me presenten en la vida y darle solución, siempre dando la mejor cara.

Con mucho cariño a mis hermanos Omar Fernando y Oscar Gabriel por ser parte importante de mi vida y representar la unidad familiar, que a pesar de donde nos encontremos siempre estamos cuidándonos unos a otros y gracias a ustedes pude salir adelante en cada etapa de mi vida escolar y personal.

Estoy muy agradecido por la confianza, el apoyo y la dedicación de tiempo a la Dra. María del Pilar Haro Vázquez, por haber compartido conmigo sus conocimientos dentro y fuera del salón de clases, por su paciencia sobre todo para explicarme temas de clase que no entendía a la primera vez, así como también sus experiencias personales que me hicieron valorar y poner más empeño a cada actividad que haga, y estar al pendiente de mí en todo momento para encontrar una paz interior y reflejar seguridad con las personas que me rodean.

Agradezco el apoyo y la oportunidad que me otorgo la Dra. Rocío Alejandra Chávez Santoscoy de aceptarme en el posgrado y todo el proceso que implicó el trámite de inscripción, así como los consejos brindados en cada evaluación que he tomado en cuenta y ha estado viendo los avances cada vez que hacía defensa de tesis y el seguimiento en todo momento para terminar con la investigación, muchas gracias Doctora seguiré tomando en cuenta todas las palabras que me dijo.

Quedo enormemente agradecido a la Dra. Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo por creer en mí y tener la confianza en brindarme la oportunidad de desarrollar una tesis de doctorado, por el apoyo durante el desarrollo de la investigación, así como los consejos para ser mejor estudiante cada día y crecer profesionalmente como persona al perder mis miedos frente al público, y por compartir momentos de su vida junto a sus alumnos que siempre nos hace sonreír de manera espontánea. ¡Me quedo con lo mejor de su persona y todos los años que tuve la oportunidad de convivir, serán muchos recuerdos que estarán presentes cada día de mi vida!

DEDICATORIA

Le doy gracias a Dios por tener a mi madre María de Jesús Gallegos Flores y mi tutor Abraham Vela H. por apoyarme en todo momento, los valores que me han inculcado, y por haberme dado la oportunidad de tener una educación y llegar hasta este nivel; que no fue fácil el camino pero tampoco imposible, donde hubo muchas situaciones difíciles que parecían no tener salida y que afronte cada una de ellas de la mejor manera para valorarlas y ser un hijo ejemplar ante los demás, que cada día me pongo nuevas metas y siempre están ahí para apoyarme sea cual sea la decisión que tome, recordándome quien soy, de donde vengo y hasta donde quiero llegar... ¡Gracias de todo corazón, los quiero mucho nunca lo olviden... siempre estaré ahí para ti Mama lo eres todo para mí!.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A	Área de pico
ANOVA	Análisis de varianza (por sus siglas en inglés)
BP	Bomba peristáltica
DER	Desviación estándar relativa
EPA	Agencia de Protección del Medio Ambiente de E.U.A.(por sus siglas en inglés)
FIA	Análisis por inyección en flujo (por sus siglas en inglés)
FAAS	Espectroscopia de absorción atómica en flama
gl	Grados de libertad
H	Altura de pico
VI	Válvula de inyección
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
μ	Media aritmética de una población
mm	Milímetros
n	Tamaño de muestra
QL	Quimioluminiscencia
R1, R2	Reactores
r^2	Coeficiente de regresión lineal
r	Coeficiente de correlación lineal
σ^2	Varianza
s	Desviación estándar
SC	Suma de términos cuadráticos
SIA	Análisis por inyección secuencial (por sus siglas en inglés)
t	Tiempo
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
w	Desechos
W	Ancho de pico
$\bar{x}$	Media aritmética de una muestra

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. El vino tinto y las uvas.	15
Figura 2. Estructura de la baya.	16
Figura 3. La enología se define como la ciencia que estudia el vino.	17
Figura 4. Proceso de elaboración de vinos.	21
Figura 5. Esquema general de un sistema analítico automático discontinuo.	25
Figura 6. Esquema general de un sistema analítico automático continuo.	25
Figura 7. Representación esquemática de un sistema FIA.	28
Figura 8. Componentes básicos de un sistema FIA.	29
Figura 9. Señal obtenida de la configuración FIA.	30
Figura 10. Representación de los componentes de un sistema SIA.	32
Figura 11. Ejemplo de sistema SIA en un análisis.	32
Figura 12. Sistema de detección: proporciona información cualitativa y cuantitativa sobre la muestra.	41
Figura 13. Sistema de propulsión: flujo constante, ausente de impulsos y perfectamente reproducibles.	42
Figura 14. Sistema de inyección: volumen de muestra muy preciso y reproducible.	43
Figura 15. Sonificador Branson 2510.	43
Figura 16. Sistema de reacción: permite el proceso de reacciones simultáneamente.	44
Figura 17. Complejo formado para la reacción entre la porfirina y el cobre.	45
Figura 18. Espectro de absorción del complejo Cobre-Porfirina.	46
Figura 19. Configuración FIA para la determinación de cobre.	48
Figura 20. Espectro de absorción para el permanganato formado en la reacción de oxido reducción.	49
Figura 21. Configuración FIA para la determinación de manganeso.	51
Figura 22. Sistema de SIA para determinar Mn.	52
Figura 23. Gráfico de Pareto para Cobre-Porfirina, obtenido del diseño factorial Plackett-Burman $2^{6*3/16}$	55
Figura 24. Gráfico de efectos principales para el complejo de Cobre-Porfirina al aplicar el diseño factorial Plackett-Burman $2^{6*3/16}$	55
Figura 25. Gráfica de superficie de respuesta del complejo de Cobre-Porfirina al aplicar el diseño factorial Plackett-Burman $2^{6*3/16}$	56
Figura 26. FIagrama para la curva de calibración para Cobre-Porfirina.	57
Figura 27. Curva de calibración para cobre.	58
Figura 28. FIagrama de Precisión como Repetibilidad para Cobre-Porfirina.	59
Figura 29. Gráfico de Pareto por la oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial 2^4 por FIA.	62
Figura 30. Gráfico de efectos principales para la absorbancia por oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial 2^4 por FIA.	63
Figura 31. Gráfico de Pareto para la oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial.	65
Figura 32. Gráfico de efectos principales para la absorbancia por la oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial de Box-Behnken.	66

Figura 33. Gráfica de la superficie de respuesta por la oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial Box-Behnken.....	67
Figura 34. FIÁgrama de la oxidación del Mn^{+2}	68
Figura 35. FIÁgrama de Precisión como Repetibilidad para la oxidación de Mn^{+2}	68
Figura 36. Gráfico de Pareto del diseño factorial 2^4 para Mn por SIA.....	72
Figura 37. Gráfico de efectos principales para el diseño factorial 2^4 para Mn por SIA.....	72
Figura 38. Gráfico de superficie de respuesta para el diseño factorial 2^4 para Mn por SIA.....	73
Figura 39. Gráfico de Pareto para el diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.....	76
Figura 40. Gráfico de efectos principales para el diseño de Box-Behnken para Mn para SIA.....	76
Figura 41. Gráfico de superficie de respuesta para el diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.....	77
Figura 42. Gráfico de Pareto para el segundo diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.....	80
Figura 43. Gráfico de efectos principales para el segundo diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.....	81
Figura 44. Gráfico de superficie de respuesta para el 2do. diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.....	81
Figura 45. SIÁgrama de la oxidación del Mn^{+2} de 0.5 a 50 mg/L por SIA.....	82
Figura 46. Curva de calibración de 0.5 a 50 mg/L de Mn^{+2} por el método de oxidación con periodato por SIA.....	83
Figura 47. SIÁgrama de precisión como repetibilidad para la oxidación de Mn^{+2}	83

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Operaciones unitarias en un análisis químico.....	23
Tabla 2. Métodos automáticos continuos.	26
Tabla 3. Tabla comparativa entre FIA y SIA.	27
Tabla 4. Diseño Plackett-Burman geométrico. (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar , 2008).....	33
Tabla 5. Publicaciones relacionadas con cobre y manganeso en vinos por FIA Y SIA.....	37
Tabla 6. Experimentos del Diseño Factorial Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$	53
Tabla 7. Análisis de varianza del diseño factorial Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$	54
Tabla 8. Valores óptimos del complejo Cobre-Porfirina al aplicar el diseño factorial Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$	56
Tabla 9. Criterios estadísticos para la determinación de cobre por FIA.	59
Tabla 10. Interferencias de iones para cobre.	60
Tabla 11. Experimentos del Diseño Factorial 2^4 para Mn por FIA.....	61
Tabla 12. Análisis de varianza del Diseño Factorial 2^4 para Mn por FIA.....	62
Tabla 13. Experimentos del Diseño Factorial de Box-Behnken para Mn por FIA.....	64
Tabla 14. Efectos estimados del diseño factorial Box-Behnken para Mn por FIA	65
Tabla 15. Valores óptimos por la oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial Box-Behnken por FIA	67
Tabla 16. Linealidad de la oxidación del Mn^{+2} por FIA.....	69
Tabla 17. Interferencias de iones para manganeso.....	70
Tabla 18. Experimentos del diseño factorial 2^4 con cuatro variables para Mn por SIA.	70
Tabla 19. Análisis de varianza para el diseño factorial 2^4 para Mn por SIA	71
Tabla 20. Tabla de valores óptimos para el diseño factorial 2^4 para Mn por SIA	73
Tabla 21. Diseño de Box-Behnken con 15 experimentos para Mn por SIA.....	74
Tabla 22. Análisis de varianza para la absorbancia para el diseño de Box-Behnken para Mn.....	75
Tabla 23. Tabla de valores óptimos para el diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.....	77
Tabla 24. Segundo Diseño de Box-Behnken con 15 experimentos para Mn por SIA.....	78
Tabla 25. Análisis de varianza para la absorbancia para el segundo diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.....	79
Tabla 26. Tabla de valores óptimos para el segundo diseño de Box-Behnken para Mn por SIA	82
Tabla 27. Determinación de Cu en vinos por FIA.	84
Tabla 28. Contenido de manganeso en muestras de vino de Baja California.....	85
Tabla 29. Recuperación de Mn agregado al vino por FIA.	86

I. RESUMEN

El vino se define como líquido alcohólico obtenido por la fermentación del jugo del fruto de la uva, *Vitis Vinífera*, es decir, de los frutos frescos o ligeramente pacificadas, resultando una graduación alcohólica mínima de 9°GL que se tiene naturalmente.

El manganeso (Mn) es uno de los metales menores del vino y las concentraciones de este elemento observadas en el vino son generalmente bajas, así como el cobre (Cu), aunque las variedades tintas contenían niveles más altos de Mn y Cu. Los vinos normalmente contienen entre 0.1 y 0.3 mg/L de cobre, el límite de la OIV es de 1 mg/L y para manganeso el límite es de 2 mg/L.

El análisis por inyección en flujo (FIA) tiene la ventaja técnica, sobre las metodologías realizadas en lote, por tener un pequeño consumo de reactivos, bajo costo, poca generación de residuo y alta frecuencia de muestreo, así como la optimización de los parámetros hidrodinámicos y químicos, así como la aplicación directa a muestras reales. La técnica se ha basado en la inyección de muestras líquidas en el movimiento no segmentado, dentro de una corriente portadora continua, la muestra inyectada forma una zona que se dispersa en su camino al detector. El último registra continuamente la absorbancia u otros parámetros físicos, ya que continuamente pasa el material de muestra a través de la celda de flujo.

El análisis por flujo secuencial (SIA) se basa en un flujo programable que permite ingresar las condiciones de reacción de manera secuencial (dilución de la muestra, adición de reactivo y tiempo de reacción) vía manual o por computadora, y como consecuencia ofrece vías aún inexploradas para el desarrollo de nuevas metodologías aplicables a una variedad de analitos. Tiene varias ventajas la técnica SIA, como: la viabilidad de la preparación en línea de reactivos inestables y al mismo tiempo la reducción sustancial de la generación de residuos, así como la minimización del consumo de muestra y reactivos; lo que es agradable para el medio ambiente y una reducción en costos significativa.

Para la determinación de cobre se seleccionó el método de la formación de un complejo Cu-porfirina mediante la medición por espectrofotometría en la región del visible (VIS) acoplado a la metodología de análisis por inyección en flujo (FIA) y el uso de diversos diseños de experimentales.

En el caso de manganeso se seleccionó la reacción de oxidación del ion manganeso $[Mn^{+2}]$ al ion permanganato $[MnO_4]^-$; mediante la medición por espectrofotometría VIS acoplado a las metodologías de análisis en flujo FIA y análisis por inyección secuencial (SIA) para lograr la optimización se realizaron diversos diseños de experimentos.

Se evaluaron ambos elementos en muestras de vinos de tipo tinto, rosado y blanco de la región de Baja California.

II. INTRODUCCIÓN

El vino es una bebida obtenida de la uva, mediante la fermentación alcohólica de su mosto o zumo, con o sin orujo, o la mezcla de mostos de uva concentrados y agua. El contenido de alcohol en el vino es aproximadamente de 8% a 16% de Alc. Vol. y en algunos casos el contenido de alcohol puede ser de hasta 18% de Alc. Vol. para productos que están regulados por una denominación de origen. En el caso de los vinos de cosecha tardía, el contenido de alcohol podría alcanzar el 18% de Alc. Vol por fermentación natural. Los vinos se clasifican por su contenido de azúcares reductores totales (NOM-199-SCFI-2017, 2017).

El vino es una matriz compleja y contiene un bajo nivel de concentración de elementos minerales; como el nivel de los elementos principales, Ca, K, Mg, Na y Mg generalmente oscilaba entre 10 y 1000 mg/L, elementos menores como Al, Fe, Cu, Mn, Rb, Sr y Zn están presentes en el rango de 0.1 a 10 mg/L (Pérez-Alvarez, García , Barrulas, Diaz, & Cabrita, 2019).

En el pasado, la presencia de cobre (II) (Cu), hierro (II) y / o hierro (III) (Fe) en el vino se debía principalmente a la contaminación después del contacto del vino o jugo con equipos de latón o hierro fundido en bodegas (Kontoudakis, Leigh, Marlize, Mark, & Smith, 2019).

Algunos componentes del vino como las macromoléculas también tienen el potencial de interactuar y unirse a los metales, y pueden incluir taninos, polisacáridos, proteínas y combinaciones de complejos o agregados de estas macromoléculas (Kontoudakis, N., Guo, Scollary, & Clark, 2017).

El cobre (Cu) es uno de los metales de mayor preocupación en la industria del vino (X. Sun, y otros, 2018). La fuente de cobre en el vino puede provenir del uso de sprays que contienen cobre y se utilizan en el viñedo y por la contaminación de vinos en el almacenamiento en bodegas (A. Clark, N. Kontoudakis, C. Barril, & L.M. Schmidtke,

2016). El manganeso (Mn) es muy importante en la industria vinícola, porque tiene efectos sobre los índices fisicoquímicos del vino, como en los azúcares solubles totales, ácidos, el peso de la baya, así como la acumulación de compuestos fenólicos. También se ha encontrado una estrecha relación entre el contenido de Mn en el suelo y el contenido de catequinas en las uvas de vinificación (Chen, y otros, 2020).

Por lo tanto, hay una continua necesidad para el desarrollo de un método simple, sensible y selectivo para la cuantificación de cobre con el fin de supervisarlo. Para la determinación de cobre y manganeso se continuo con el trabajo previo de Carrillo Cedillo et.al. (Carrillo Cedillo, Cañizares Macías, Ames López, & Sepúlveda Marqués, 2016) acoplada al análisis en flujo (FIA). Esta técnica se basa en la inyección de muestra líquida en movimiento no segmentado, dentro de una corriente portadora continua de un líquido adecuado. La muestra inyectada forma una zona, que es transportada hacia un detector, el cual registra continuamente la absorbancia u otro parámetro físico, ya que continuamente pasa el material de muestra a través de la celda de flujo (Cañizares Macías, 2002). También se utilizará la técnica de análisis por inyección secuencial (SIA) basado en un análisis bidireccional por una bomba interconectada a una válvula de selección de posiciones múltiples por medio de una válvula de retención, el SIA es bien conocido como un medio eficaz para automatizar pretratamiento de la muestra, incluida la dilución, extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida (SPE) además de ser de bajo costo y requisitos mínimos de mantenimiento (en relación con HPLC) y la compatibilidad de los volúmenes de muestra utilizados en SIA (es decir, rango de μL a mL) con espectroscopia de campo bajo (Trinklein, y otros, 2021).

Estas técnicas serán acopladas a un Diseño de Experimentos (DOE) es una herramienta estadística en la que cada experimento es una prueba y permite a un investigador descubrir cierta información sobre un proceso o sistema (Moreira , Balestrassi, Paiva, Ribeiro, & Bonatto, 2021). El DOE es como un subcampo de la estadística tiene su origen en tratar de comprender los sistemas y tomar decisiones en función de los resultados. Tiene una clara ruta del proceso: definición del problema,

diseño del experimento, ejecución del experimento, así como la recopilación de datos, procesamiento de datos, análisis y continuar experimentando o llegando a conclusiones (Miranda-Ackerman & García-Lechuga, 2020).

III. ANTECEDENTES

3.1 El vino

La palabra vino deriva etimológicamente del sánscrito “vena” formada de la raíz ven (amar, por ello Venus es Diosa del amor, y venéreo). Este término dio lugar a otros como “oinos”, en griego, y “vinum” en latín, “wein” en alemán y “wine” en inglés. Del latín procede el termino en el domino de las lenguas románicas, vino, vinho, vin, vi etc. El término que relaciona el vino con el amor, se debe a que todas las civilizaciones han considerado que es fuente de vida, de gozo, de amor y deseo de vivir (Riera Palmero, 2014).

El vino se puede definir como la bebida que resulta de la fermentación alcohólica del mosto de uvas (*Vitis vinifera*) (ver Figura 1). Existen diferentes factores en el proceso de vinificación, la variedad y el método de cultivo, que marcan diferencias en los atributos de la calidad del vino; sin embargo, el tipo de tierra de trabajo para el cultivo



Figura 1. El vino tinto y las uvas.
(EFE, 2018)

de la uva también es influenciado por la luminosidad, altitud, latitud, régimen pluvial, pendiente, orientación y tipo de suelo, es el que define la tipicidad de la uva y del vino, lo cual se expresa en el contenido de azúcar, acidez, color y aroma, entre otros (Cruz-de Aquino, Martínez-Peniche, Becerril-Román, & Chávaro-Ortiz, 2012).

3.2 La uva y su morfología

La estructura y composición de un racimo de uvas es de dos partes bien diferenciadas: el raspón, o parte leñosa, y las bayas o granos, todo esto se unen al racimo mediante el pedicelo, a través del cual se nutren mediante un sistema vascular compuesto de elementos de la xilema y el floema de la planta. Las bayas, a su vez, están formadas por una película exterior, denominada hollejo o piel, una masa que rellena interiormente la baya y de la que se extrae el mosto, conocida como pulpa y, en el centro de la misma, un número variable de semillas o pepitas (ver Figura 2).

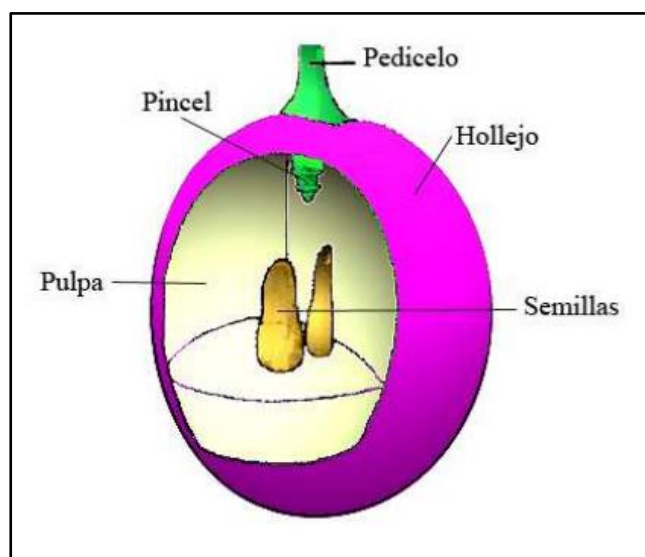


Figura 2. Estructura de la baya.
(Lasanta Melero, 2009)

Los componentes que integran la baya contribuyen de manera diferente a la composición del mosto y del vino, debido a su diferente naturaleza y composición química. Y, por último, el sistema de prensado y cualquier operación dentro de la etapa antes de la fermentación van a determinar la fracción de compuestos del hollejo y las pepitas que pasan al mosto y que le confieren sus características definitivas. Así, la

mayoría de las antocianinas (polifenoles más abundantes y que conceden una serie de características únicas al vino) responsables del color, y los aromas, así como precursores aromáticos de la uva se encuentran en el hollejo, la mayor parte de los azúcares y ácidos están en la pulpa, mientras que en las semillas se encuentran, entre otros, gran parte los taninos responsables de la astringencia de los vinos. Estos puntos son importantes porque nos ayudan a conocer la composición de la uva y así conocer más acerca del vino (Lasanta Melero, 2009).

3.3 Proceso de elaboración del vino

El proceso de elaboración del vino consiste en una fermentación completa o parcial del mosto de uva o de la uva fresca. La uva puede variar con el tiempo; además de ser el resultado de una comunión de factores como el clima y el suelo donde maduraron las uvas, el método de cosecha, los hombres y mujeres que intervinieron en las labores culturales en el viñedo y durante la vinificación, los métodos de conservación, entre otros. Para obtener un buen vino se necesitan uvas sanas, en estado de madurez apropiado. Dado que es un producto natural, es susceptible a diferentes transformaciones, por ello debe ser guiado por la experiencia y cuidado por los técnicos en el tema de la enología. La enología (ver Figura 3) es la ciencia que abarca el conocimiento del vino, su composición y transformaciones incluyendo la investigación y ejecución de tareas enfocadas a obtener el mejor vino que con determinada uva se pueda producir un vino tinto, blanco o rosado (Miranda Galeana, 2020).



Figura 3. La enología se define como la ciencia que estudia el vino.
(Training, 2020)

A continuación, se menciona el proceso clásico de la elaboración de vinos blancos (Figura 4):

Debe ser realizada en forma cuidadosa la cosecha de las uvas, evitando el contacto con metales, pues es posible desatar un proceso que terminaría en sabores y aromas no deseados. Los pasos de elaboración son los siguientes:

1. **Selección de la uva:** se procede a una selección previa de la uva para determinados tipos de vinos. De los racimos depositados en cintas se separan los granos rotos, enfermos o verdes, los restos de hojas u otras partes de la planta o elementos extraños.
2. **Enfriado:** se recomienda cosechar la uva durante la noche o en las primeras horas de la mañana, porque debe llegar fresca a la bodega antes de pasar a las siguientes etapas, siempre la vendimia es enfriada.
3. **Despallado o Descobajado:** todos los granos de uva se separan del escobajo (parte verde del racimo).
4. **Molienda o estrujado:** se colocan los granos pasan por rodillos acanalados que los rompen suavemente para permitir un rápido escurrimiento del jugo durante el proceso de prensado.
5. **Prensado:** la uva es sometida en esta etapa a una presión para extraer la mayor cantidad de jugo o mosto. La presión no debe ser excesiva para no extraer sustancias amargas y astringentes de las semillas y/o del hollejo. Se utilizan prensas neumáticas que trabajan con presión reducida, obteniéndose mostos de gran calidad.
6. **Sulfitado:** en esta etapa una vez que el mosto o jugo de uva y los orujos son colocados en la vasija, se agrega una dosis de anhídrido sulfuroso que cumple con dos funciones principales: antiséptico y antioxidante.
7. **Desborre o desfangado:** los jugos de uva o mostos son llevados a una vasija donde permanecen de 8 a 24 horas a baja temperatura. Dado que los mostos están inmovilizados se produce una decantación de restos de pulpas, semillas, tierra y partículas en suspensión que sedimentan en el fondo de la vasija y se separan luego mediante un trasiego.

8. **Encubado:** hay distintos tipos de vasija para encubar: acero inoxidable, piletas de hormigón armado revestidas con epoxi o barricas de roble.
9. **Fermentación alcohólica:** es el resultado de la actividad de las levaduras que pueden ser seleccionadas, nativas o indígenas (naturales). Las levaduras son microorganismos que pertenecen al grupo de los hongos y que se adhieren al hollejo de la uva en la época de maduración por medio del el aire o los insectos son transportadas, las cuales son las encargadas de transformar los azúcares en alcohol y una larga serie de productos que hacen del vino una bebida única fermentada. Al encontrarse en un medio nutritivo favorable (en el mosto o jugo de uva) se multiplican de manera considerable, lo que favorece su acción. La reacción química esquemática realizada por las levaduras podría ser simplificada de la siguiente manera:



En el hollejo de la uva vienen adheridas las levaduras naturales o indígenas, hoy existen cepas de levaduras (aisladas en laboratorio) que aseguran una fermentación óptima y controlada. Una vez que las levaduras han degradado el azúcar y lo han transformado en alcohol y demás sustancias, mueren y forman un sedimento en el fondo de la vasija llamado *borras*. El azúcar que no se transforma en alcohol es llamado azúcar residual.

10. **Fermentación maloláctica:** en algunos casos los vinos blancos son sometidos a esta fermentación. La uva posee en su mayor parte el ácido tartárico, ácido málico y el ácido cítrico. Este último desaparece rápidamente durante el proceso de fermentación alcohólica. El ácido málico es de suma importancia biológica para el vino, porque durante la fermentación alcohólica el ácido málico comienza a transformarse por las levaduras y ciertas bacterias lácticas, en ácido láctico. Pero terminada la fermentación alcohólica estas bacterias efectúan lo que se conoce como fermentación maloláctica. En ella el ácido málico termina de transformarse en ácido láctico, anhídrido carbónico y una serie de compuestos, que aportan aromas mantecosos a los vinos. En esta etapa el vino debe mantenerse a temperaturas cercanas a los 20°C.

11. **Descube:** cuando se termina la fermentación, toda la materia sólida (levaduras muertas, tártaro, bacterias y cualquier materia sólida) precipitan en el fondo de la vasija, entonces se separa el vino limpio de sus *borras*.
12. **Trasiegos:** terminado del descubado, se realizan trasiegos para separar el vino de los sedimentos más finos que se depositan en el fondo de la vasija. Esta operación consiste en pasar el vino de una vasija a otra, dejando todo el sedimento en la primera.
13. **Clarificación:** esta etapa consiste en agregar al vino una sustancia de naturaleza coloidal (mineral, vegetal o animal) que es capaz de arrastrar hacia el fondo de la vasija aquellos elementos en suspensión no deseados en el vino.
14. **Estabilización tartárica:** consiste en realizar el enfriando del vino a valores por debajo de 0°C para que precipiten las sales tartáricas que se encuentran disueltas en el vino y que de no ser así precipitarían en la botella, luego de la formación de cristales.
15. **Fraccionamiento:** es la etapa final en la que se realiza el embotellado y taponado, mediante líneas de fraccionamiento de mayor o menor complejidad, que pueden estar instaladas en las mismas bodegas o ser móviles.

Fermentación en barricas

Las más utilizadas para la fermentación en barricas son las variedades blancas como Chardonnay, Viognier y un poco menos Sauvignon Blanc. El proceso de elaboración es similar sólo que la fermentación alcohólica y eventualmente la fermentación maloláctica, se realizan en estos recipientes. En esta etapa el vino gana aromas y sabores que le aporta la madera y se produce una interacción entre los taninos del roble y las proteínas de la levadura. Pasada la fermentación maloláctica se trasiega el vino (se separan las borras de las levaduras) y se guarda nuevamente en las barricas donde se procede a su clarificación (Miranda Galeana, 2020).

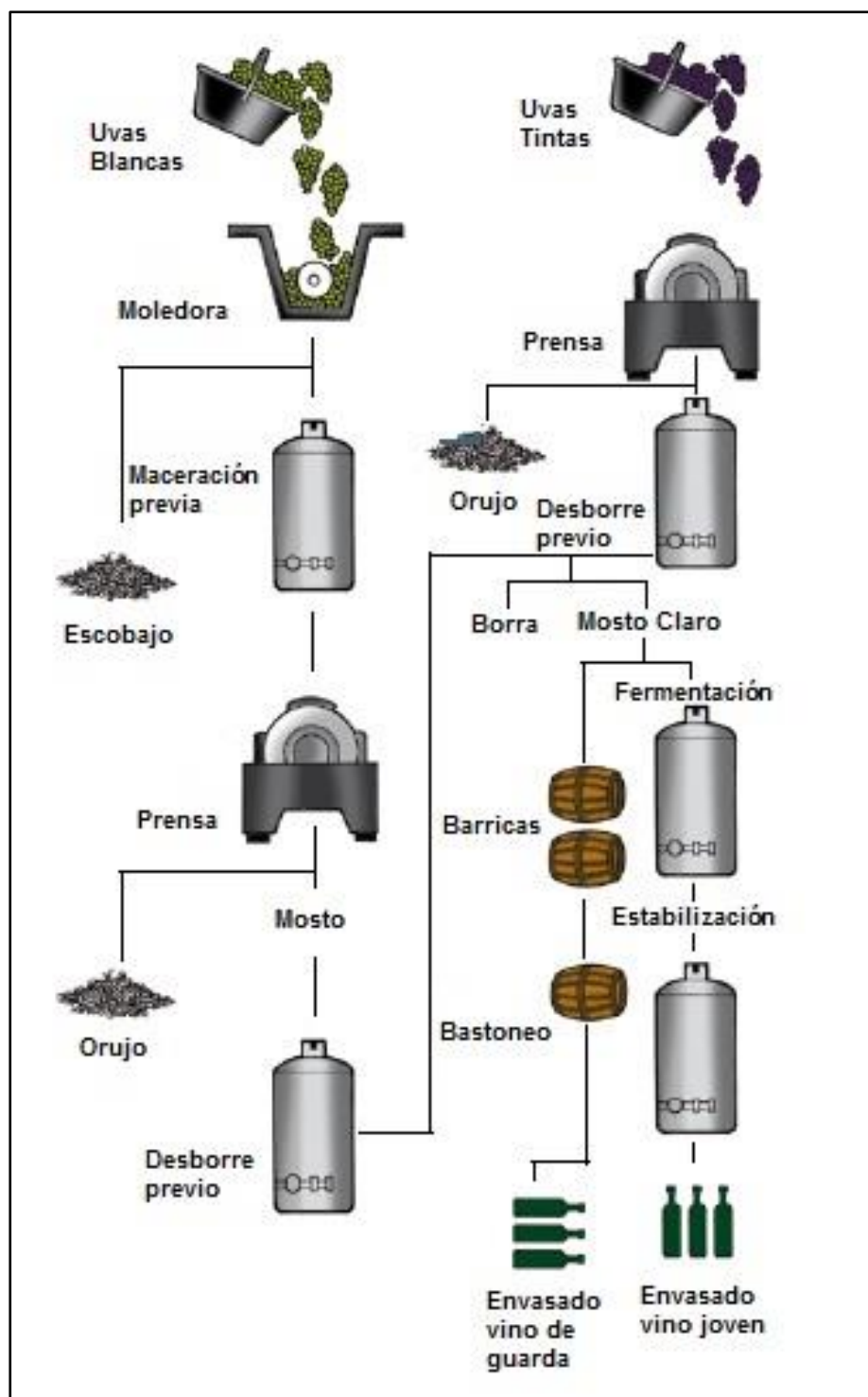


Figura 4. Proceso de elaboración de vinos.
(Miranda Galeana, 2020)

3.4 Metales en Vinos

El consumo del vino ejerce efectos beneficiosos sobre la salud humano, pero el vino también puede contener componentes que tienen efectos negativos sobre la salud humana, como residuos de plaguicidas, sulfitos, micotoxinas y metales tóxicos. También los iones metálicos tienen efectos sobre las propiedades organolépticas del vino (características de envejecimiento, aroma final, sabor, color, etc.), el seguimiento de su contenido durante la elaboración es necesario para conseguir unos parámetros de calidad adecuados del producto final. También es necesario un seguimiento constante de determinados metales en el vino debido a su toxicidad en caso de una ingesta excesiva (Vitali Čepo, y otros, 2018). El consumo moderado de vino (hasta 2 unidades de bebida por día para las mujeres y hasta 3 unidades de bebida por día para los hombres) puede proporcionar una dosis nutricional diaria de muchos metales esenciales, como: Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg , Mn, Mo, Ni, entre otros (Vecchio, et al., 2017).

La ingesta excesiva de metales también puede ser tóxica, ya que en grandes cantidades de Cu pueden hacer que reemplace al Zn o Fe en las metalo-proteínas. La sobreexposición al manganeso puede provocar la acumulación de este elemento en los huesos, el hígado o el páncreas y especialmente en el cerebro. Las altas dosis de metales pueden afectar negativamente la función del cerebro, los pulmones, los riñones y otros órganos cruciales. Exposición a largo plazo a Los metales pesados pueden conducir a una degeneración física, muscular y neurológica que puede resultar en enfermedades graves, incluido el cáncer (Zoroddu, et al., 2019).

El proceso de fermentación alcohólica en el vino es importante considerar los siguientes metales: el calcio (Ca), el potasio (K), el magnesio (Mg) y el sodio (Na) son responsables del mantenimiento del pH y del equilibrio iónico, que regula el metabolismo celular de la levadura. Además, la levadura utiliza cobre (Cu), hierro (Fe), manganeso (Mn) y zinc (Zn) para la activación de metalo-enzimas protésicas. Los metales afectan la conservación del vino debido a la precipitación de tartrato de K y Ca, que a su vez cambia el pH y actúa a favor de la oxidación de Cu y Fe y el enturbiamiento del aluminio (Al), Cu y Fe (Fabjanowicz & Plotka-Wasyłka, 2021).

3.5 Métodos automáticos de análisis

La química analítica ha tenido muchos avances en las últimas tres décadas por la aparición en el mercado de sistemas automáticos para análisis, que proporcionen datos analíticos con la mínima intervención del operador. En un inicio estos sistemas se diseñaron para solucionar las necesidades de los laboratorios clínicos, en los que hay que determinar, de forma rutinaria, unas treinta especies o más, con fines diagnósticos y preventivos. Como anualmente se realizan cientos de millones de análisis clínicos, parece lógico que el costo se mantenga en un nivel razonable. Es por estos motivos que se considera el desarrollo de los primeros sistemas analíticos automáticos, aunque hoy en día estos instrumentos se utilizan en áreas tan distintas como el control de procesos industriales, o en las determinaciones rutinarias de distintas sustancias en el aire, agua, suelos, productos agrícolas y farmacéuticos.

La mayoría de los métodos analíticos se pueden dividir en una serie de ocho etapas, u operaciones unitarias, cada una de las cuales se puede automatizar. En la Tabla 1 se enumeran estas etapas ordenadas como se realizan en un análisis típico.

Tabla 1. Operaciones unitarias en un análisis químico.
(Skoog, Holler, & Nieman, 2001)

Operación	Ejemplos característicos	Tipo de automatización*
1. Preparación de la muestra	Trituración, homogeneización, secado.	D
2. Definición de la muestra	Determinación del peso o volumen de muestra.	D
3. Disolución de la muestra	Tratamiento con disolventes y dilución. Calentamiento, calcinación, fusión.	C, D D
4. Separación	Precipitación y filtración. Extracción, diálisis y cromatografía.	D C, D
5. Medida	Determinación de absorbancia, intensidad de emisión, potencial, intensidad de corriente y conductividad. Valoración y pesada.	C, D D
6. Calibración	Análisis de los patrones.	C, D
7. Tratamiento de datos	Calcular el resultado, analizado la exactitud y precisión de los datos.	C, D
8. Presentación de datos	Imprimir los resultados numéricos, representar gráficamente los datos.	C, D

* D = discontinuo; C = flujo continuo.

Para un método automático, todas estas operaciones unitarias no requieren a una persona para trabajar en ello. En un instrumento totalmente automático se introduce la muestra en el equipo, sin cuantificar y sin tratamiento previo, y al final se obtiene un resultado analítico en forma impresa o gráfica (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

Tipos de sistemas automáticos

Hay dos tipos de sistemas analíticos automáticos: analizadores discontinuos y analizadores de flujo continuo; pudiéndose encontrar, a veces, una combinación de ambos. En un instrumento discontinuo, cada una de las muestras se mantiene como una entidad independiente, colocándose en recipientes separados durante las distintas operaciones unitarias. Por el contrario, en los sistemas de flujo continuo la muestra se va transportando desde el punto de inyección, o introducción, hasta el detector y de aquí al desecho; la muestra forma parte de la corriente en la que va fluyendo y en ella van transcurriendo las diferentes operaciones unitarias. Ambos instrumentos, discontinuos y continuos, suelen controlarse mediante un ordenador.

Los analizadores de flujo continuo modernos, en general son mecánicamente más sencillos y más baratos que sus equivalentes discontinuos. Generalmente, en muchos sistemas continuos, las únicas partes móviles son las bombas peristálticas y las válvulas interruptoras, siendo estos componentes más baratos y fiables (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

Se pueden realizar acciones previamente programadas por el operador en los sistemas automáticos que permiten realizar a cabo análisis en unos momentos determinados del proceso sin intervención humana. Estos sistemas no toman decisiones por sí mismos y siguen siempre la misma secuencia de operación.

En función de cómo ocurre el proceso los métodos automáticos se clasifican en discontinuos y continuos, encontrándose en algunas ocasiones una combinación de ambos:

- **Discontinuos:** en la Figura 5 se observa que la muestra se mantiene separada en una cubeta en el que tienen lugar las distintas etapas analíticas (adición de reactivos, agitación, calentamiento, dilución). Posteriormente se lleva a la unidad de detección donde se obtiene una señal analítica puntual para cada

muestra, después de haber alcanzado el equilibrio químico (o estado estacionario) (Molina García, 2012).

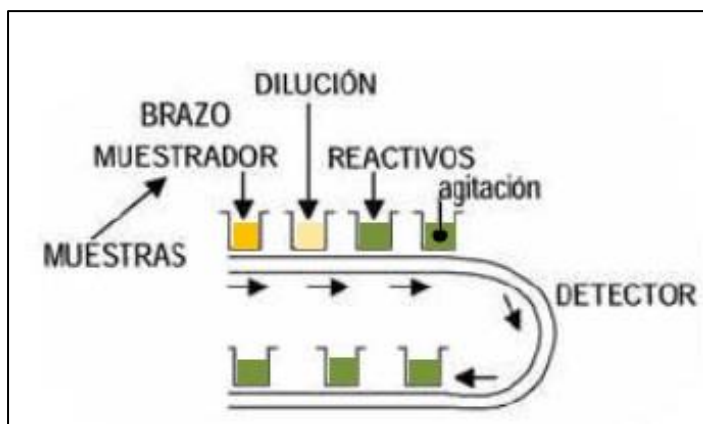


Figura 5. Esquema general de un sistema analítico automático discontinuo.
(Molina García, 2012)

- **Continuos:** la medición analítica se realiza sin interrumpir el flujo de un líquido o gas. Las muestras se van introduciendo directamente, a intervalos regulares de tiempo, en un canal por el que fluye un portador que puede ser el propio reactivo, en caso de ser necesaria una reacción química, o que confluye con éste. El flujo pasa continuamente por la celda situada en la zona de detección de un detector apropiado, en donde se realizan las medidas analíticas, obteniéndose señales analíticas transitorias, como se observa en la Figura 6:

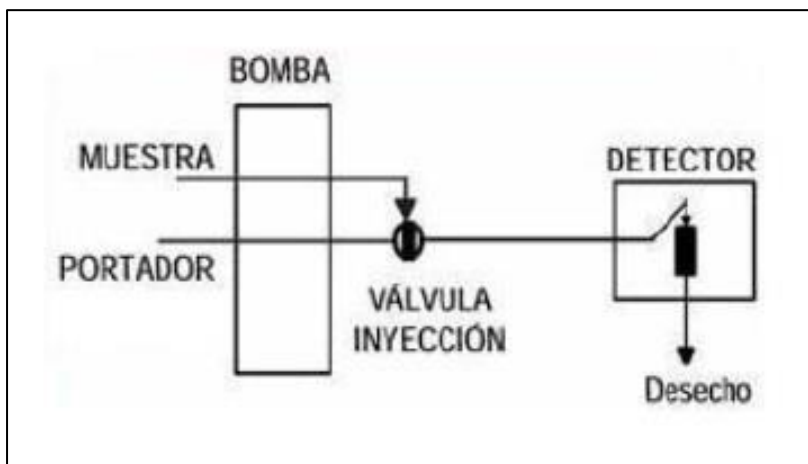


Figura 6. Esquema general de un sistema analítico automático continuo.
(Molina García, 2012)

Los sistemas automáticos continuos incluyen dos grupos fundamentales: sistemas continuos de flujo segmentado y de flujo no segmentado. En la Tabla 2 se muestra una clasificación de los métodos automáticos continuos basada en el modo en que se elimine la mezcla entre las muestras sucesivas.

- **Sistemas continuos de flujo segmentado:** en este tipo de sistemas las muestras son aspiradas secuencialmente y entre ellas se insertan burbujas de aire que segmentan (separan físicamente) el flujo. Estas burbujas evitan la contaminación entre muestras sucesivas, impiden la dispersión del bolo de muestra en el portador y facilitan la mezcla entre la muestra y los reactivos, favoreciendo que se alcance el equilibrio físico y químico antes de la llegada al detector. Estos sistemas generalmente contienen una unidad de eliminación de burbujas antes del detector para impedir la posible interferencia de las mismas en la medida analítica.

Tabla 2. Métodos automáticos continuos.
(Molina García, 2012)

Flujo	Introducción de muestras		Naturaleza del Flujo	Metodología
	Procedimiento	Tiempo		
Segmentado	Aspiración	Secuencial	Continuo	Análisis en flujo segmentado (SFA)
No segmentado	Inyección	Secuencial	Continuo	Análisis por Inyección en Flujo (FIA)
	Aspiración	Secuencial	Discontinuo	Métodos cinéticos a flujo detenido
		Continua	Continuo	Análisis en flujo completamente continuo (CCFA)
		Secuencial	Discontinuo	Análisis en flujo con dispersión controlada (CDFA)

- **Sistemas continuos de flujo no segmentado:** la principal característica de este sistema es la ausencia de burbujas en todas las líneas y una mayor simplicidad técnica. La diferencia fundamental con los sistemas continuos de flujo segmentado es que no se alcanza el equilibrio físico (homogeneización del flujo) ni químico (desarrollo completo de la reacción química). Debido a este hecho, se hace necesario que las medidas se lleven a cabo en condiciones

altamente reproducibles y a un tiempo fijo, ya que pequeñas variaciones pueden afectar significativamente a la señal analítica. La forma en la que se evita la contaminación entre muestras difiere de una a otra metodología. Así en el caso del FIA, las muestras son introducidas secuencialmente mediante inyección o inserción de un volumen, previamente establecido, en una corriente continua de flujo de reactivo o portador (Molina García, 2012).

En base a las características mencionadas de ambos métodos de análisis se puede hacer una comparación de FIA y SIA para una simple manipulación de muestras como se muestra en la siguiente Tabla 3.

Tabla 3. Tabla comparativa entre FIA y SIA.
(García Sarasola, 2018)

Parámetro	FIA	SIA
Sistema de bombeo	Bomba peristáltica	Bureta electrónica automática
Variedad de canales de flujo	Compleja	Simple
Control del sistema	Ordenador opcional	Ordenador necesario
Consumo de reactivo	Alto	Reducido

3.5.1 Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

En su forma actual los métodos de inyección en flujo, fueron descritos por primera vez a mediados de los años setenta por Ruzicka y Hansen en Dinamarca y Stewart y colaboradores en Estados Unidos. Los métodos de inyección en flujo son una consecuencia de los métodos de flujo segmentado, muy utilizados en los laboratorios clínicos entre los años sesenta y setenta, para la determinación rutinaria y automática de distintas especies en sangre y orina, para diagnóstico médico (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

El análisis por inyección en flujo, FIA (en inglés Flow Injection Analysis) se define como un método automático continuo donde el flujo no está segmentado y la muestra es inyectada por lo que no se alcanza ni el equilibrio físico ni químico al momento de la detección (Cañizares Macías, 2002). El sistema en flujo (FIA) se basa en que la muestra es insertada mediante una válvula de inyección en un canal por el que circula una corriente continua de fluido portador (*carrier*). Durante el transporte de la muestra hacia

el detector se incorporan los reactivos necesarios en el canal del portador o mediante canales auxiliares conectados al principal como se muestra en la Figura 7.

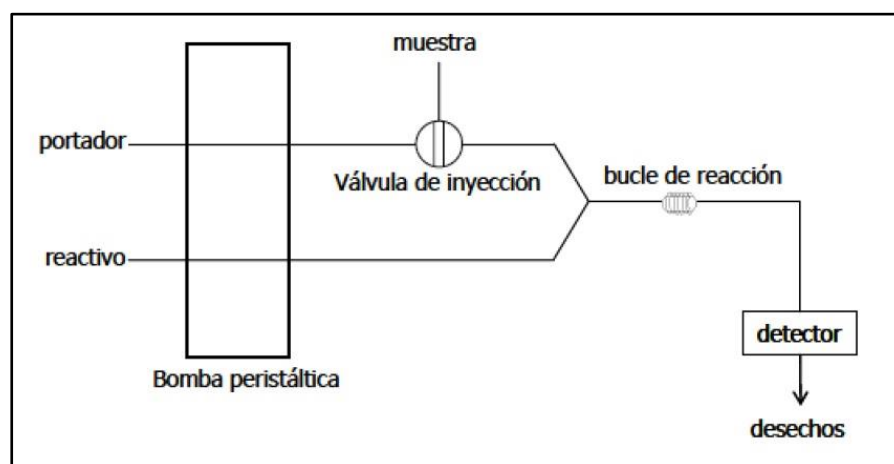


Figura 7. Representación esquemática de un sistema FIA.
(Ayala Quezada, 2010)

La técnica FIA es básicamente monoparamétrica, característica que ha sido superada por otros métodos que permiten la determinación simultánea de diferentes parámetros (Ayala Quezada, 2010).

Ventajas esenciales de la metodología FIA son:

1. Análisis más rápidos (típicamente entre 100 y 300 muestras/hora).
2. Mejores tiempos de respuesta (a menudo menor de un minuto desde la inyección de la muestra hasta la respuesta del detector).
3. Menor tiempo entre la aparición de la señal y el retorno a la línea base (menos de 5 minutos para cada pico).
4. Equipo mucho más sencillo y versátil, exceptuando el sistema de inyección.

Estas dos últimas ventajas tienen una especial importancia, porque hacen factible y económico aplicar medidas automáticas a un número de muestras, no rutinarias, relativamente pequeño. Por tanto, los métodos de flujo continuo ya no deben de quedarse restringidos por más tiempo a situaciones en las que haya un gran número de muestras y el método analítico sea totalmente rutinario. Como consecuencia de estas ventajas, los sistemas de flujo segmentado han sido prácticamente reemplazados

por métodos de inyección en flujo (y también por sistemas discretos que utilizan robots) (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

En los últimos años, los clásicos métodos FIA han sido mejorados debido al desarrollo de técnicas de análisis en flujo más avanzadas y a nuevos sistemas de detección. Estos avances en la instrumentación, al mismo tiempo, inducen al mejoramiento de las características de las metodologías desarrolladas, como: mayor capacidad de análisis por hora, límites de detección más bajos, intervalos dinámicos lineales más amplios, desviaciones estándar relativas más bajas, entre otras (Maya, Estela, & Cerda, 2010).

Los elementos básicos del FIA se pueden apreciar en la Figura 8, los cuales son (Hansen & Miró, 2007):

- Inyección o inserción de un volumen de disolución de muestra, bien definido, dentro de una corriente de un fluido acarreador en flujo (ya sea inerte o reactivo); los reactivos adicionales deben ser añadidos subsecuentemente.
- Tiempo de manipulación preciso y reproducible de la zona de muestra inyectada cuando es introducida al sistema, desde el punto de inyección hasta el de detección.
- La generación de un gradiente de concentración de la muestra inyectada, obteniendo una señal altamente reproducible de la señal registrada.

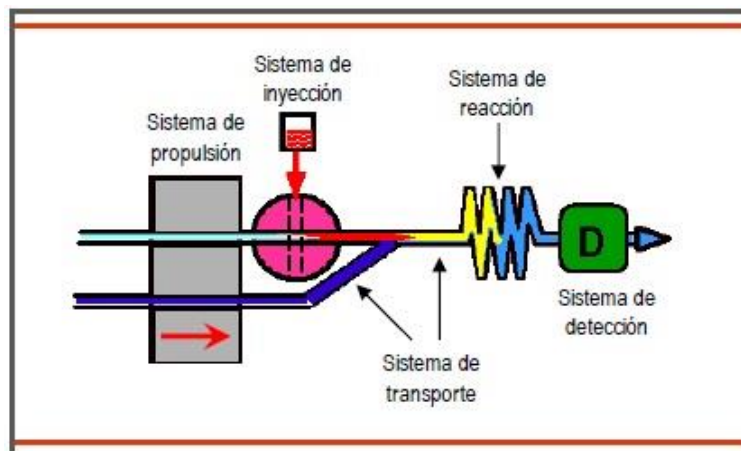


Figura 8. Componentes básicos de un sistema FIA.
(Molina García, 2012).

El proceso físico de dispersión de zona y el proceso químico dan como resultado una señal obtenida de una reacción entre el analito y las especies reactivas (Hansen & Miró, 2007). Debido a la dispersión, la respuesta de detector es la de un pico asimétrico que sigue una distribución de tipo χ^2 . La altura y área de los picos son proporcionales a las concentraciones de la especie detectada, como se puede ver en la Figura 9, generalmente se utiliza el área para obtener las curvas de calibración necesarias para las determinaciones.

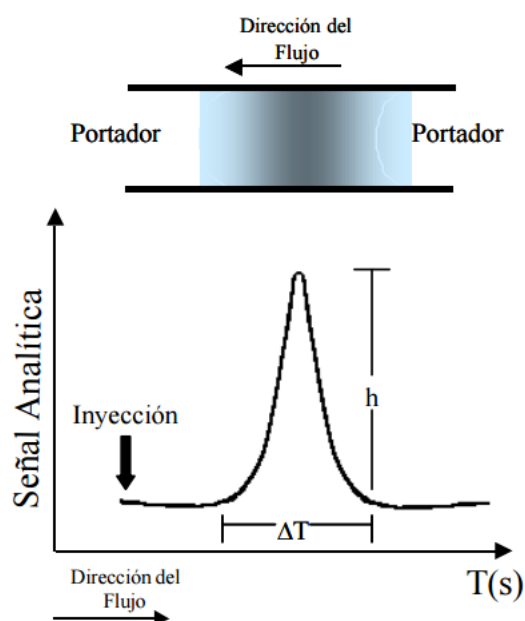


Figura 9. Señal obtenida de la configuración FIA.

En la parte superior se muestra la dispersión que sufre el bolo de muestra en el tubo abierto al pasar a lo largo de la configuración: h = altura, ΔT = ancho de pico (Cañizares Macías, 2002).

En Química Analítica, la mayoría de los programas de investigación, a nivel mundial, están enfocados a mejorar la calidad en los resultados analíticos. El Análisis por Inyección en Flujo es una de las técnicas en la que este objetivo se puede cumplir y es una de las formas más sencillas para automatizar una determinación.

Con el paso de los últimos años se ha ido demostrando que, para la automatización de las etapas preliminares del proceso analítico, las técnicas continuas, particularmente el Análisis por Inyección en Flujo, es la forma más versátil, flexible y de menor costo para

realizar una gran cantidad de operaciones del proceso analítico. Además de la adición de la muestra, dilución, calentamiento, mezclas, adición de reactivos (operaciones que igualmente se pueden realizar con analizadores discontinuos en discreto), con FIA se pueden realizar procesos de diálisis, destilación, extracción con disolvente y otras separaciones con un alto grado de precisión, exactitud y rapidez (Cañizares Macías, 2002).

3.5.2 Análisis por Inyección Secuencial (SIA)

Ruzicka y Marshall introdujeron en 1990 otro tipo de sistemas de flujo no segmentado llamado SIA, considerado como la segunda generación de las técnicas en flujo (Molina García, 2012), fue propuesta inicialmente como una alternativa del FIA, ya que ofrece algunas ventajas con respecto al FIA convencional.

El análisis por inyección secuencial (SIA) se basa en la aspiración secuencial de volúmenes precisos de muestra y reactivos que se conducen, mediante un portador, hacia un bucle de carga donde permanecen en contacto hasta que se envían a través de un bucle de reacción al detector (ver Figura 10). El envío del contenido del bucle de carga al detector se realiza en el sentido inverso del flujo, lo que provoca la mezcla entre la muestra y reactivos para dar lugar a la formación del producto de reacción que permitirá la detección de la propiedad seleccionada. La señal analítica transitoria es en forma de pico, cuya altura o área se relacionan con la concentración del analito en la muestra.

Existen muchas ventajas en el sistema SIA cabe destacar que el conjunto de tuberías ó *manifold* es más simple y universal que el de FIA, ya que generalmente puede permanecer fijo y el control de los tiempos de reacción puede llevarse a cabo a través de una computadora, incluyendo técnicas de flujo detenido. Los tubos son de PTFE (politetrafluoroetileno de 0.8 mm de diámetro interno), material resistente al uso de disolventes y reactivos agresivos. Un aspecto más a considerar es que la técnica SIA puede funcionar en modo multiparamétrico, lo cual es de especial interés para el desarrollo de monitores ambientales. El análisis multiparamétrico se favorece al aumentar los puertos laterales, utilizando válvulas de selección de hasta 20 puertos o

conectando un puerto lateral de la válvula principal con el puerto central de otras válvulas (Ayala Quezada, 2010).

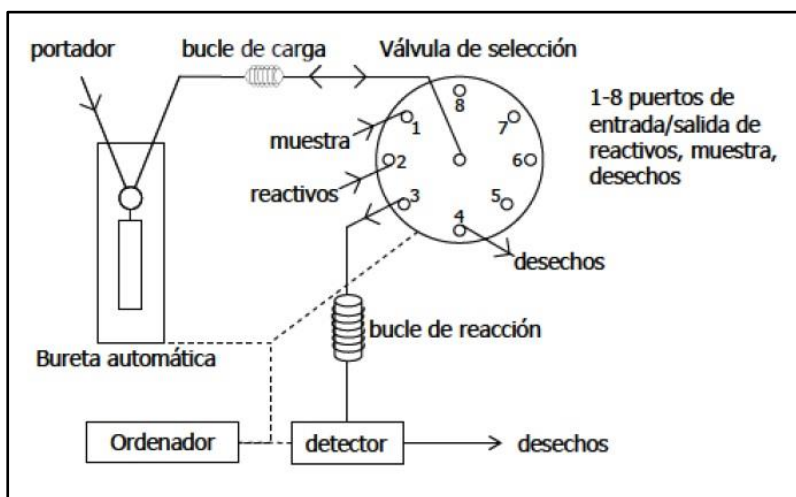


Figura 10. Representación de los componentes de un sistema SIA.
(Ayala Quezada, 2010)

La parte fundamental de un sistema SIA consiste en una válvula de selección multiposición o multiválvula (ver Figura 11), que es la encargada de controlar la dirección del flujo de las disoluciones en el sistema por medio de aspiración y propulsión de las disoluciones (Molina García, 2012).

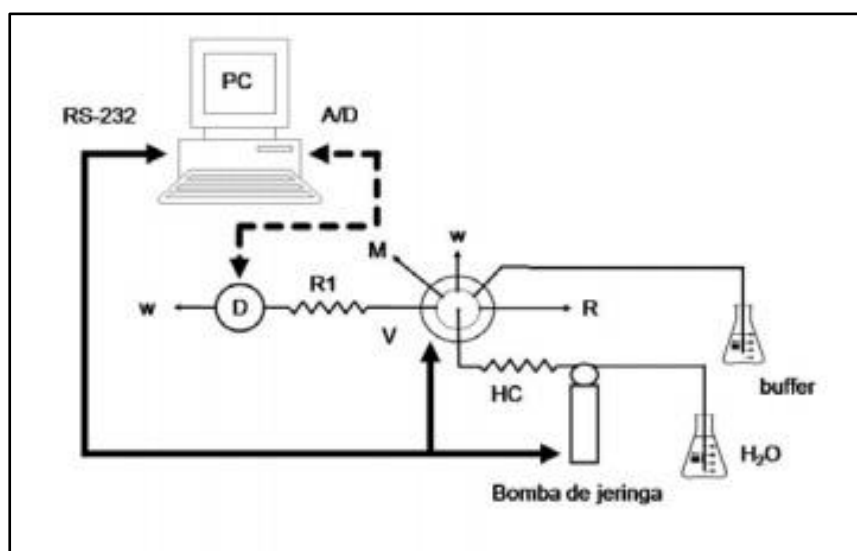


Figura 11. Ejemplo de sistema SIA en un análisis.
V: válvula selectora, R: reactivo de color (zincón), W: descarte, M: muestra, HC: 100 cm, R1: 150 cm.

Ventajas del Análisis por Inyección Secuencial (SIA) (Molina García, 2012):

- La metodología SIA emplea un sistema más robusto y sencillo, utilizando sólo un canal incluso en el caso de necesitar llevar a cabo reacciones químicas.
- El sistema SIA emplea la válvula de multiposición lo que hace el trabajo experimental más preciso y robusto al momento de manipular los reactivos.
- El consumo de muestra y reactivos decrece drásticamente en SIA.
- La configuración monocanal en SIA permite usar el mismo sistema para una gran diversidad de análisis.
- En SIA se aspiran volúmenes diferentes de muestra simplemente estableciendo el volumen requerido mediante el software que controle el sistema.

3.6 Diseño de Experimentos

El diseño de experimentos consiste en planear y realizar un conjunto de pruebas con el objetivo de generar datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas por el experimentador sobre determinada situación, entre los diseños más usados está el de Plackett-Burman (Tabla 4). El objetivo de los métodos estadísticos es lograr que el proceso de generar conocimiento y aprendizaje que sea lo más eficiente posible (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar , 2008).

Tabla 4. Diseño Plackett-Burman geométrico. (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar , 2008)

Corrida	A	B	C	D	E	F	G
1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
2	+1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
3	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
4	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1
5	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
6	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
7	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Diseño Factorial 2^4

Los diseños factoriales tienen como objetivo estudiar el efecto de varios factores sobre una o varias respuestas, cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores. Por ejemplo, uno de los objetivos particulares más importantes que en ocasiones tiene un diseño factorial es determinar una combinación de niveles de los factores en la que el desempeño del proceso sea mejor, por lo que los factores pueden ser de tipo cualitativo (máquinas, tipos de material, operador, la presencia o ausencia de una operación previa, etc.), o de tipo cuantitativo (temperatura, humedad, velocidad, presión, etc.). Para estudiar la manera en que influye cada factor sobre la variable de respuesta es necesario elegir al menos dos niveles de prueba para cada uno de ellos. Con el diseño factorial completo se corren aleatoriamente todas las posibles combinaciones que pueden formarse con los niveles de los factores a investigar (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar, 2008). La metodología del diseño factorial de 2^4 permiten reducir el número total de experimentos, ahorrando esfuerzo y tiempo, ahorrando gasto de insumos y componentes químicos (Perez Huachaca & López-Gonzales, 2017).

En un diseño factorial al aumentar el número k de factores en un diseño 2^k , el número de combinaciones aumenta y resulta económicamente costoso realizar réplicas que permitan estimar el error para poder hacer los contrastes pertinentes. Puesto que lo habitual es que sean los factores principales y las interacciones de bajo orden los que realmente influyen sobre la variable respuesta, se asume que las interacciones de orden alto son nulas, con lo que disminuye el número de parámetros a estimar, lo que permite utilizar parte de las observaciones para estimar el error; en base a esta estimación se ejecutan los contrastes.

En el diseño factorial 2^4 tenemos cuatro factores, cada uno de ellos a dos niveles, a los que llamaremos *inferior* (-1) y *superior* (+1). Las unidades experimentales se obtienen tomando las 16 posibles combinaciones de los cuatro factores. Al no hacer réplicas, asumiremos que las interacciones de orden tres y cuatro son nulas. El objetivo fundamental del experimento consiste en estudiar si los factores principales y sus posibles interacciones de orden dos tienen alguna influencia significativa sobre la variable respuesta (TecnoStats.net, 2016).

Se usó ampliamente los diseños factoriales de dos niveles en la experimentación científica e industrial por varias razones. Los libros de texto estándar abordan este tema de varias maneras: cubren conceptos tales como: Factoriales completos no replicados, Factoriales completos replicados, Bloques, Factoriales fraccionarios, etc. Los profesionales utilizan principalmente los diseños factoriales en una etapa temprana de la experimentación para detectar factores potenciales que están involucrados en el sistema que se está investigando. El efecto de un factor se interpreta como una medida del cambio en la variable de respuesta debido a la variación del factor (bajo a alto), promediado sobre todos los demás niveles de factor (Domagni, Hedayat, & Sinha, 2021).

Diseño Factorial Fraccionado Plackett-Burman

La publicación Plackett y Burman en 1946 acerca de: "El diseño de experimentos multifactoriales óptimos", ha sido ampliamente aplicada desde entonces en los diseños de Plackett-Burman. Los diseños Plackett-Burman son de Resolución III, es decir, los efectos principales de los factores individuales no tienen alias entre sí, sino con combinaciones lineales de efectos de interacción de dos factores. Los diseños Plackett-Burman son especialmente populares en los experimentos de detección porque permiten la detección de grandes efectos principales con diseños pequeños, bajo el supuesto de que todas las interacciones son insignificantes (Shen & Morris, 2016). Plackett y Burman proponen una clase de diseños factoriales de dos niveles que solo requieren corridas $N = 4t$ en lugar de $N = 2^{k-p}$ para un diseño factorial fraccional. Por lo tanto, los diseños de Plackett y Burman a menudo se utilizan para fines de detección cuando hay una gran cantidad de factores. Cuando usamos estos diseños, asumimos que solo un pequeño número de factores están activos y que todos los términos de interacción son insignificantes. Esto se conoce como efecto de escasez. Por ejemplo, un diseño de Plackett y Burman con 36 corridas se puede aplicar a un estudio con 33 factores en lugar de las 64 corridas requeridas para un diseño factorial fraccional normal de 2^{k-p} (Quinlan & Lin, 2015).

Diseño factorial de Box-Behnken

Los diseños de Box-Behnken son un tipo de método de diseño de superficie de respuesta (RSD), estos diseños pueden determinar las relaciones cuadráticas entre los tratamientos continuos y las respuestas. Por lo tanto, son capaces de demostrar la topografía de la superficie de respuesta y pueden realizar la optimización, encontrando los máximos y mínimos de la respuesta dentro del rango experimental. En los diseños de Box-Behnken no se consideran todas las combinaciones de los niveles de factor más alto y más bajo, por lo que disminuyen el número de experimentos. Además, son más eficientes en términos del número de coeficientes en el modelo dividido por el número de experimentos (Unal & Kaya, 2020).

El diseño de Box-Behnken es una clase de diseño giratorio/casi giratorio, basado en diseños factoriales incompletos de tres niveles y aplicable a las variables críticas. Este diseño muestra los puntos seleccionados del modelo a partir de disposiciones factoriales de 3 niveles y también permite la validación eficiente de los coeficientes de primer y segundo orden. Este diseño se ha considerado como más eficiente y económico que el uso de un diseño factorial completo de tres niveles, cuando las variables independientes son superiores a 2 (Salman, y otros, 2020).

El diseño de Box-Behnken se aplica cuando se tienen tres o más factores, y suelen ser eficientes en cuanto al número de corridas. Es un diseño se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental (Gutiérrez Pulido & Vara Salazar , 2008).

3.7 Investigaciones relacionadas con cobre y manganeso por sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA) y por inyección secuencial (SIA).

Muchos investigadores han implementado estas técnicas analíticas que han provocado el desarrollo de nuevas metodologías por FIA y SIA, especialmente en medio ambiente y alimentos. Para 1979 se contaba ya con 80 publicaciones y hoy, a 25 años de los inicios del FIA, el número de publicaciones estimado es de 10,000 así como SIA a partir de 1990 (Cañizares Macías, 2002). En Tabla 5 se muestran publicaciones relacionadas con esta tesis que van del año 2020 hacia atrás.

Tabla 5. Publicaciones relacionadas con cobre y manganeso en vinos por FIA Y SIA.

Año de publicación	Metodología	Matriz	Reacción	Referencia
2020	Análisis por inyección secuencial para determinar manganeso por La voltamperometría de extracción catódica de pulso diferencial	Agua ambiental y de grifo	Oxidación de Mn (II) por voltamperometría de extracción catódica de pulso diferencial	(Lai, y otros, 2020)
2019	Análisis por inyección secuencial monitorean la formación de complejos de hierro y manganeso a 440 nm	Agua subterránea	Formación de complejos con astibilina	(Ganranoo, Chokchaisiri, & Grudpan, 2019)
2017	Análisis por inyección en flujo inverso múltiple (Mr-FIA) integrado con sensor óptico múltiple para determinar Mn (II)	Agua natural	No especificada por el autor.	(Youngvises, Suwannasaroj, Jakmune, & AISuhaimi, 2017)
2016	Determinación de cobre (Cu) por análisis de inyección en flujo (FIA) en procesos de galvanoplastia.	Muestras industriales de agua residual de proceso	Reacción 4,4-Disustituido 2''2-Biquinolina.	(Sanchez-Gallegos & Carrillo-Cedillo, 2016).

Año de publicación	Metodología	Matriz	Reacción	Referencia
2008	Análisis por inyección secuencial para determinar manganeso por FAAS mediante pre-concentración.	Muestras de alimentos: harina de arroz y maíz, así como las hojas de tomate.	Extracciones de enturbiamiento del reactivo 4- (5-bromo-2-tiazolilazo) orcinol (Br-TAO) elaborado en laboratorio y el tensioactivo Triton X-114.	(Azevedo Lemos, y otros, 2008)
2005	Análisis por inyección secuencial para determinar manganeso por FAAS a 279.0 nm.	Vinos de mesa y de Oporto	No especificada por el autor.	(Perez-Olmos, y otros, 2005)
2004	Análisis por inyección en flujo y secuencial para la determinación de ácido ascórbico y manganeso usando calibraciones de adiciones estándar y titulación yodimétrica.	Tabletas de Vitamina C	Quimioluminiscencia a partir de la reacción del permanganato de potasio ácido	(Anastos, Barnett, Hindson, Lenehan, & Lewis, 2004)
2003	Análisis por inyección secuencial para determinar manganeso por espectrofotometría de UV-Vis	Diferentes tipos de agua	Reacción de reducción de Mn (VII) a Mn (II)	(Staden, Mulaudzi, & Stefan, 2003)

IV. JUSTIFICACIÓN

El cobre y el manganeso provienen de diversas fuentes en la obtención y elaboración de los diferentes tipos de vino y al igual que otros metales están regulados por diferentes organismos internacionales y nacionales que regulan la calidad del vino. El proyecto de tesis surge por la necesidad de tener métodos para la determinación de cobre y manganeso mediante análisis en flujo, ya sea por FIA o SIA; se elige el método de porfirina por estar compuestas por un anillo tetrapirrólico con sustituyentes laterales y un átomo metálico en el centro (cobre) lo que provoca una carga tetra-positiva, unido mediante cuatro enlaces de coordinación esto permite que sea muy sensible a las trazas de cobre libre, el método está libre de la mayoría de las interferencias, además no requiere ninguna extracción o concentración de la muestra antes del análisis y las interferencias de otros metales se eliminan con el reactivo de enmascaramiento de cobre, el indicador de porfirina forma un complejo de color amarillo intenso con cualquier cobre libre presente en la muestra y se determinara a una longitud de onda de 425 nm por UV-Vis y para el caso de manganeso se elige el método de oxidación con periodato; el cual se basa en la oxidación del ión de manganeso $[Mn^{2+}]$ al ión permanganato $[MnO_4]^-$ en presencia de periodato $[IO_4]^-$ y este ión de permanganato tiene un color violeta característico que absorbe luz en la región del visible a una longitud de onda de 525 nm por UV-Vis, esta reacción depende de la oxidación en la solución ácida de manganeso a sales de permanganato por periodato de potasio y se afirma que está libre de todas las fallas de los otros métodos para manganeso y produce resultados de un alto grado de precisión, que recientemente se ha aplicado con éxito en agua, tejidos animales y vegetales. Se considerarán los estándares de las regulaciones que existen, y a partir de ello que sea el método sencillo, sensible y eficiente para su cuantificación en diferentes tipos de vinos con la ayuda de los diferentes diseños de experimentos, con la finalidad de tener un consumo pequeño de reactivos y a su vez genere mínimo residuo, ya que los métodos reportados en la literatura, incluyen pre-tratamiento de muestra o detector de absorción atómica, con largos tiempos de análisis y costos elevados.

V. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

“La determinación de cobre y manganeso en diferentes tipos de vinos es posible mediante la aplicación de un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) e inyección secuencial (SIA) acoplado a un detector de UV-Visible, utilizando el método de la formación de un complejo de Cu-porfirina para cuantificar cobre y la reacción de oxidación del ion manganeso $[Mn^{+2}]$ a ion permanganato $[MnO_4]^{-1}$ para cuantificar manganeso mediante el uso de diseño de experimentos”

Objetivo General

Establecer una metodología para la cuantificación de cobre y manganeso en vinos utilizando sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA) e inyección secuencial (SIA) acoplado a un detector de UV-Visible, mediante las reacciones de complejometría y oxido-reducción utilizando la estrategia de diseño de experimentos y finalmente validar ambas metodologías de cuantificación.

Objetivos Específicos

- ✓ Seleccionar las reacciones más adecuadas para la cuantificación de cobre y manganeso de acuerdo a los valores establecidos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV).
- ✓ Utilizar la estrategia de diseño de experimentos, con la finalidad de establecer los valores óptimos de los parámetros hidrodinámicos y químicos en ambas metodologías de análisis en flujo para la cuantificación de cobre y manganeso.
- ✓ Determinar el rango lineal de cuantificación, los límites de detección y cuantificación del método para ambos métodos en flujo.
- ✓ Determinar la precisión como reproducibilidad para ambos métodos en flujo.
- ✓ Determinar los iones interferentes en el método de cuantificación para cobre y manganeso por FIA y SIA.

VI. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Equipo, material y reactivos

6.1.1 Equipo

- Espectrofotómetro DR5000 HACH (Figura 12).
 - ✓ Lámpara de tungsteno (visible) y lámpara de deuterio (UV).
 - ✓ Rango de longitud de onda: 190-1100nm.
 - ✓ Velocidad de escaneado: 900 nm/min en intervalos de 1nm.
 - ✓ Ancho de banda espectral: 2 nm.
 - ✓ DR 5000 UV-Vis Spectrophotometer Sipper Module Marca HACH.



Figura 12. Sistema de detección: proporciona información cualitativa y cuantitativa sobre la muestra.

(Laboratorio de Análisis de Agua FCQI UABC 2016)

- Bomba peristáltica Watson Marlow 400 SCI, 403u/VM4, 50RPM, 110V/1/50/60 HZ, US lead, 4 canales (
 -
 -
-
- **Figura 13).**



Figura 13. Sistema de propulsión: flujo constante, ausente de impulsos y perfectamente reproducibles.
(Laboratorio de Análisis de Agua FCQI UABC 2016)

- Válvula de inyección VICI. Vaco Instruments Co. Inc., 2 posiciones, módulo de control, 11P-0546I, 24 VCD, 8 puertos. (Figura 14)



Figura 14. Sistema de inyección: volumen de muestra muy preciso y reproducible.
(Laboratorio de Análisis de Agua FCQI UABC 2016)

- Computadora con paquete estadístico Statgraphics Centurion XVI.I
- Balanza analítica PB 303-5 Mettler Toledo.
- Sonificador Branson 2510. (Figura 15)



Figura 15. Sonificador Branson 2510

(Laboratorio de Análisis de Agua FCQI UABC 2020)

- Celda de cuarzo de 160 uL.

6.1.2 Material para el sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) e inyección secuencial (SIA)

- Tubos de teflón PFA HP plus OD 0.010" x 1/16" para construir el sistema de transporte.
- Reactores de diferente longitud: 50, 100, 150, 200, 350 y 500 cm (Figura 16).



Figura 16. Sistema de reacción: permite el proceso de reacciones simultáneamente.
(Laboratorio de Análisis de Agua FCQI UABC 2016)

- Mangueras de tygon 0.76 I.D
- Loop: 50, 125, 200, 350 y 500 μL .
- Celda de cuarzo para el sistema de inyección en flujo de 160 μL .

6.1.3 Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico reactivo, a menos que se indique lo contrario. Se usó agua desionizada en todos los experimentos.

Reactivos para cobre

- Cobre metálico granular (Sigma-Aldrich).
- Ámpulas de solución estándar de cobre de 75 mg/L de Cu.
- Ácido nítrico ACS 50-70% Mallinckrodt.
- Hidrosulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).
- Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$).
- 5,10,15,20-Tetrakis (1-metil-4-piridinio) porfirina tetra p-toluenosulfonato ($\text{C}_{72}\text{H}_{66}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}_4$) (H_4tmpyp).

Reactivos para manganeso

- Ámpulas de solución estándar de manganeso 250 mg/L de Mn.
- Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)
- Periodato de sodio (NaIO_4)

6.1.4 Material de laboratorio

- Vasos de precipitados (mL)
- Pipetas volumétricas (mL)
- Matraces volumétricos (mL)

- Probetas
- Pizeta
- Espátulas de acero inoxidable
- Agitador magnético
- Micropipetas eppendorf de volumen variable 100-1000 μL
-

6.2 Metodología para Cobre

6.2.1 Método para la formación de un complejo de Cu- Porfirina (1 a 210 $\mu\text{g/L}$ Cu)

La porfirina forma un complejo 1:1 con cobre, el cual es de color amarillo (ver Figura 17) (Ishii & Koh & Bunseki Kagatu, 1979).

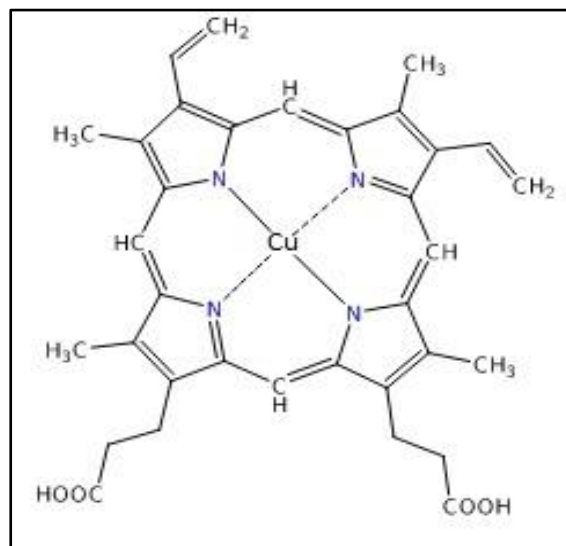


Figura 17. Complejo formado para la reacción entre la porfirina y el cobre.
(Slideshare, 2018)

6.2.2 Experimentación por FIA para determinar Cu

Se tomaron en cuenta las siguientes propuestas de trabajo en base a las investigaciones previas, se proponen 6 variables de estudio: reactor 1 (R1), reactor 2 (R2), volumen de inyección (Loop), porfirina, hidrosulfito y la velocidad de la bomba. Se realiza un diseño de experimentos para optimizar los parámetros del sistema FIA con un diseño factorial fraccionado Plackett-Burman $2^{6*3/16}$ de resolución III, con 3 puntos

centrales y 8 grados de libertad con apoyo del software estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

Preparación de disoluciones para la determinación de Cu

Se prepararon las siguientes disoluciones para llevar a cabo la metodología:

1. Disolución Madre de 200 mg/L de Cu.
2. Disoluciones Estándar de 2.1 mg/L de Cu.
3. Reactivo de porfirina ($3.71\text{E-}5$ mol/L).
4. Ácido ascórbico (0.015 mol/L).
5. Solución de hidrosulfito de sodio (0.034 mol/L).

Formación de complejo Cu-porfirina

Los experimentos confirmaron la formación de complejo Cu-porfirina de color amarillo, y exhibe una absorbancia máxima a 434 nm, a partir de la reacción entre cobre y porfirina, en medio ácido y a temperatura ambiente. El espectro de absorción del complejo formado se ilustra en la Figura 18. Se observó que la absorbancia máxima es a 434 nm del producto final de la reacción, el cual está libre de interferencias espectrales.

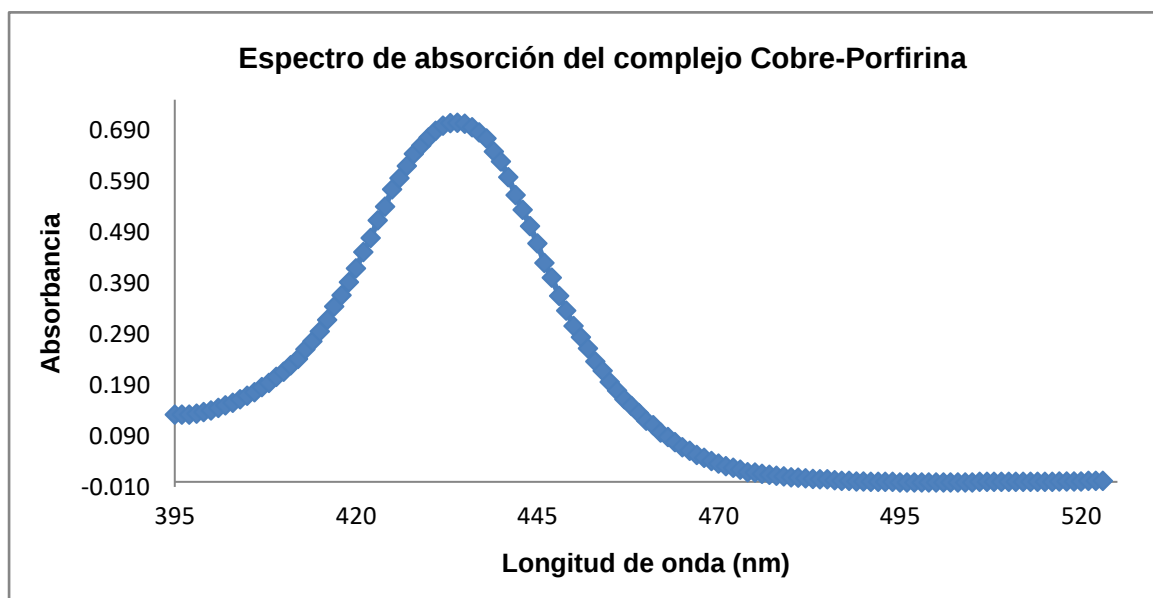
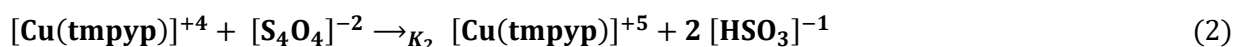


Figura 18. Espectro de absorción del complejo Cobre-Porfirina.

Las probables reacciones entre el cobre y la porfirina (Tabata & Morita, 1997) se muestran esquemáticamente en las ecuaciones 1 y 2. La formación del complejo Cu-porfirina se puede dividir en dos etapas. En el primero, a temperatura ambiente, el cobre reacciona con la porfirina en presencia de ácido ascórbico para formar un complejo intermediario $[\text{Cu}(\text{tmpyp})]^{+4}$. En la segunda etapa, en condiciones ácidas, el intermediario formado reacciona con el hidrosulfito, produciendo un complejo que se puede medir por espectrofotometría en la región del visible a 434 nm.



Configuración del sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) para la determinación de cobre.

La determinación espectrofotométrica del cobre aplicando el análisis por inyección en flujo (FIA) se ilustra en la Figura 19. La válvula de inyección tiene 6 a 8 puertos: muestreo e inyección, en la posición de muestreo el bucle se llenó con la muestra (100 cm de longitud, 200 μL de volumen interno), mientras que el reactivo de porfirina ($3.71\text{E}-5$ mol/L) se bombeó directamente en el sistema a través del tubo Tygon (0.76 mm de diámetro interno) a un caudal de 0.6 mL/min. Simultáneamente, la disolución portadora de ácido ascórbico 0.015 mol/L también se bombeó a la confluencia a través de un tubo Tygon (0.76 mm i.d.) a un caudal de 0.6 mL/min, proporcionando así la señal de referencia (fiagrama). En la posición de inyección, la disolución portadora de ácido ascórbico 0.015 mol/L se desvió al circuito de muestra, transfiriendo una alícuota de 200 μL de patrón o muestra al sistema, donde se mezcló con el reactivo de porfirina. La mezcla luego pasó a través del reactor de reacción (R1, 90 cm), luego se bombeó disolución de 0.034 mol/L de hidrosulfito de sodio al sistema a través de un tubo Tygon (0.76 mm i.d.) a una velocidad de flujo de 0.6 mL/min. La mezcla luego pasó a través de otro reactor de reacción (R2, 50 cm), se mantuvo a temperatura ambiente, y el producto de color amarillo formado se llevó a la celda de flujo con un volumen de 360 microlitros en el detector de UV-Visible, donde la señal de absorbancia en flujo continuo

se monitoreo a 434 nm, como se ilustra en la Figura 18. Después de registrar la señal analítica en el fiagrama, la válvula se restableció a la posición inicial (muestreo) para comenzar otro ciclo. La altura del pico se utilizó como señal analítica, y su magnitud (expresada en unidades de absorbancia) fue proporcional a la concentración de cobre.

Se realizó la siguiente configuración (Figura 19) con el fin de obtener la mejor señal analítica para la reacción entre el manganeso, el citrato de sodio, el periodato de sodio y las interferencias para leer en el espectrofotómetro a 524 nm; el espectro de absorción de la reacción de oxidación de manganeso. Se observó que la absorbancia máxima (524 nm) del producto final de la reacción estaba libre de interferencias espectrales a partir de la reacción entre Mn^{+2} y periodato en presencia de citrato a temperatura ambiente.

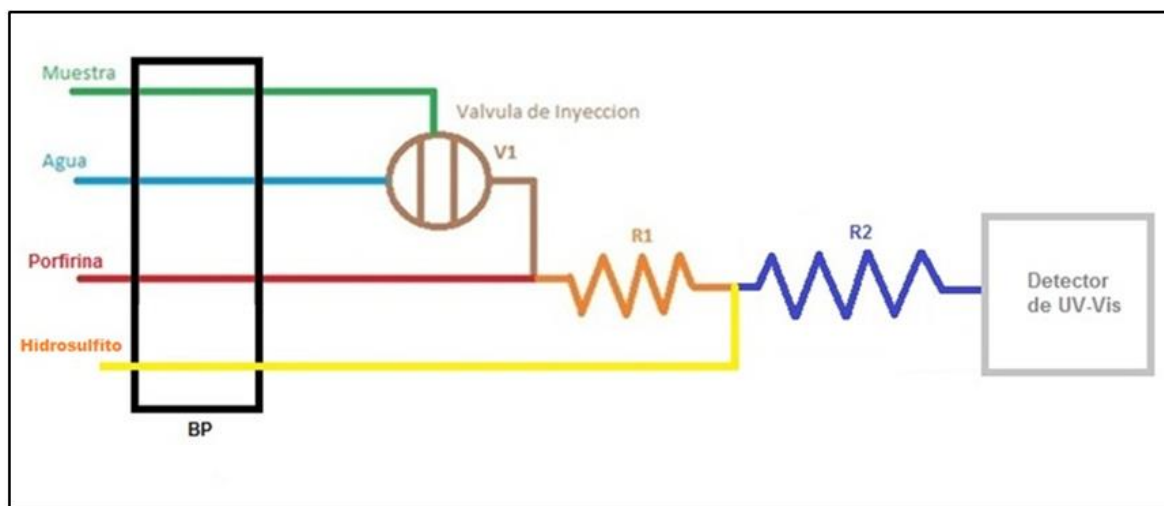


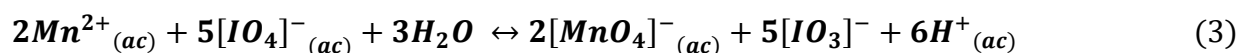
Figura 19. Configuración FIA para la determinación de cobre.

BP: Bomba peristáltica a 0.6 mL/min, V1: Volumen de inyección de 200 μ L, R1: Reactor 1 de 90 cm, Reactor 2 de 50 cm, Detector de UV-Visible a 434 nm.

6.3. Metodología para Manganeso

6.3.1 Método de Oxidación con Periodato (0.2 a 20 mg/L Mn)

El método más usado en la determinación espectrofotométrica de manganeso se basa en la oxidación del ión de manganeso $[Mn^{2+}]$ al ión permanganato $[MnO_4]^-$ en presencia de periodato $[IO_4]^-$, como se puede ver en la ecuación 3:



El ión de permanganato absorbe luz en la región del visible a una longitud de onda de 525 nm. En la disolución acuosa se observa un color violeta que es característico de este ión (Mehlig, 1939).

Reacción oxido reducción para la determinación de manganeso

La reacción entre iones de manganeso y periodato han sido estudiados por un gran número de investigadores con resultados más o menos contradictorios, pero Willard y Greathouse fueron los primeros en aplicar la reacción como base de un método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa del manganeso (ver Figura 20). Su método depende de la oxidación en la solución ácida de manganeso a sales de permanganato por periodato de potasio y se afirma que está libre de todas las fallas de los otros métodos para manganeso y produce resultados de un alto grado de precisión, recientemente se ha aplicado con éxito en agua, tejidos animales y vegetales (Mehlig, 1939).

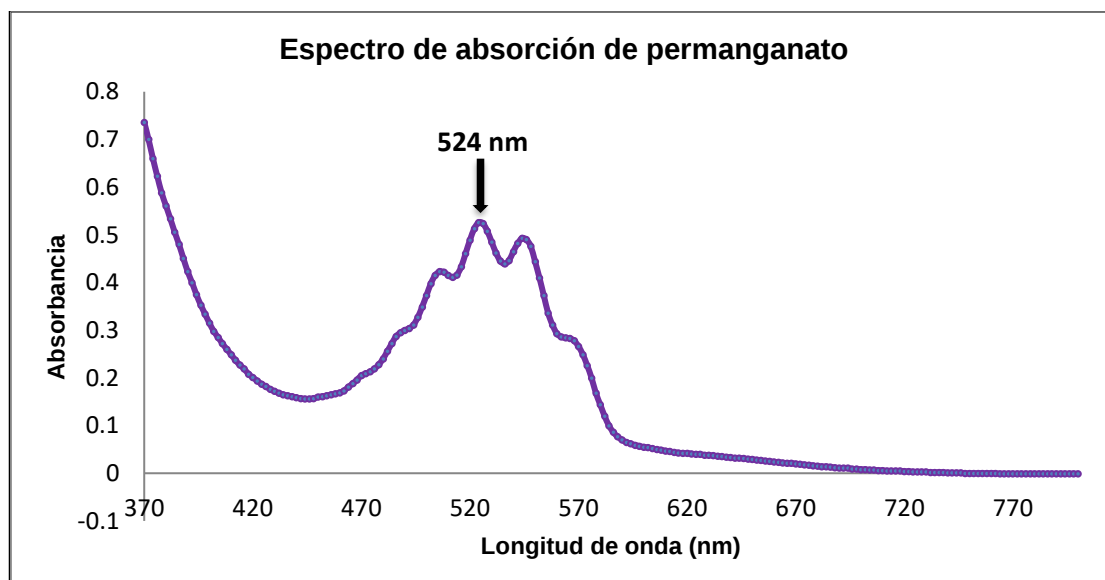


Figura 20. Espectro de absorción para el permanganato formado en la reacción de oxido reducción.

6.3.2 Experimentación por FIA para Mn.

Preparación de disoluciones para determinar Mn por FIA

Se prepararon las siguientes disoluciones para llevar a cabo la metodología:

1. Disolución Madre de 200 mg/L de Mn.
2. Disoluciones Estándar de 50 mg/L de Mn.
3. Citrato de Sodio con diferentes rangos de pH (6, 8 y 10 en unidades de pH).
(Spectrum Lot. No. PG0248, CAS 68-04-2)
4. Periodato de Sodio con diferentes rangos de concentración molar (0.0187, 0.0374 y 0.0561) (Mallinckrodt No. CAS 7790-28-5).

Configuración del Sistema de Análisis por Inyección en Flujo para determinar Mn

La configuración del sistema de análisis por inyección en flujo utilizado para la determinación espectrofotométrica de manganeso se muestra en la Figura 21. La válvula de inyección (VICI. Vaco Instruments Co. Inc) tiene actuadores micro-eléctricos de dos posiciones: muestreo e inyección. En la posición de muestreo, el bucle de muestra (500 μ L de volumen interno) se llenó con la disolución estándar o de muestra, luego el reactivo de citrato de sodio (0.1 mol/L) se bombeó directamente al sistema a través de un tubo Tygon (1.02 mm de diámetro interno) a un flujo de 0.8 mL/min. Simultáneamente, el agua destilada de la disolución portadora también se bombeó al sistema a través de un tubo Tygon (1.02 mm i.d.) a una velocidad de flujo de 1.1 mL/min, por lo tanto, proporcionó la señal de línea base del FIAgrama. En la posición de inyección, la disolución portadora se desvió al circuito de muestra, transfiriendo una alícuota de 500 μ L de patrón o muestra al sistema, donde se mezcló con el reactivo de citrato de sodio. La mezcla pasó a través del reactor de reacción (R1, 50 cm), se bombeó disolución de periodato de sodio 0.1 mol/L al sistema a través de un tubo Tygon (0.76 mm i.d.) a un caudal de 0.6 mL/min. La mezcla pasó a través del reactor de reacción (R2, 100 cm), se mantuvo a temperatura ambiente, y el producto formado de color púrpura se llevó a la celda de flujo con un volumen de 360 microlitros en el detector de UV-Visible, donde la señal de absorbancia transitoria se controló a 524 nm, como se ilustra en la Figura 20. Después de registrar la señal analítica en el FIAgrama, la válvula

de inyección se restableció a la posición inicial (muestreo) para comenzar otro ciclo. La altura del pico se utilizó como señal analítica, y su magnitud (expresada en unidades de absorbancia) fue proporcional a la concentración de manganeso.

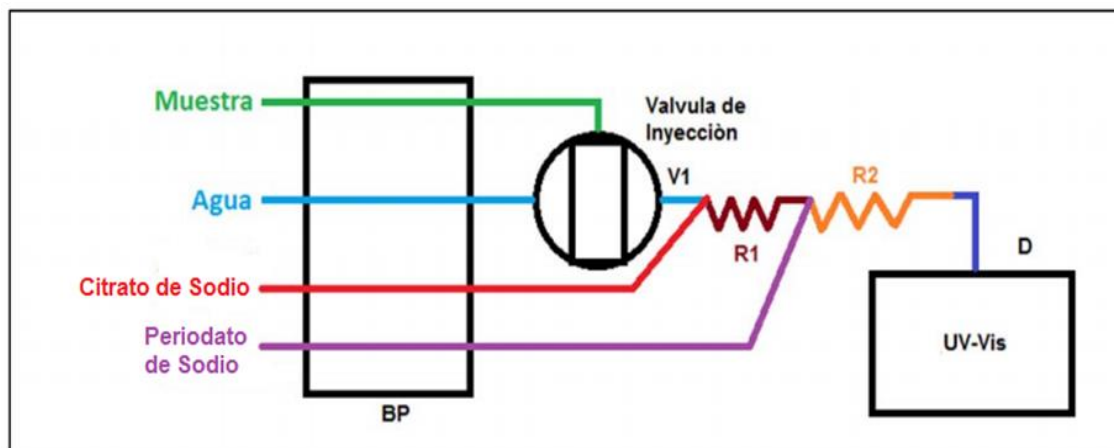


Figura 21. Configuración FIA para la determinación de manganeso.

BP: Bomba peristáltica de 22.5 RPM, V1: Volumen de inyección de 500 μ L (2.5 mL/min), R1: Reactor 1 de 50 cm, Reactor 2 de 100 cm, Detector de UV-Visible a 524 nm.

6.3.3 Experimentación por inyección secuencial para determinar Mn

Se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones de trabajo, en base a investigaciones previas, se proponen 4 variables de estudio: citrato de sodio (citrate), periodato de sodio (periodate), muestra (sample) y la velocidad de la bomba (flow rate). Se realiza un primer diseño de experimentos: Se propone usar un Diseño Factorial 2^4 desarrollado con el apoyo del software estadístico Statgraphics Centurion XVI.I.

Preparación de disoluciones para determinar Mn por SIA

Se prepararon las siguientes disoluciones para llevar a cabo la metodología:

1. Disolución Madre de 200 mg/L de Mn.
2. Disoluciones Estándar de 50 mg/L de Mn.
3. Citrato de Sodio con un pH= 6 de trabajo. (Spectrum Lot. No. PG0248, CAS 68-04-2)
4. Periodato de Sodio de una concentración de 0.1 M.(Mallinckrodt No. CAS 7790-28-5)

Configuración del Sistema de Análisis por Inyección Secuencial para determinar Mn

Las condiciones de trabajo para la configuración SIA se muestran en la Figura 22, con el fin de obtener la mejor señal analítica, para la reacción de oxidación entre el manganeso, el citrato de sodio y el periodato de sodio. El permanganato generado se mide en la región del visible a 524 nm.

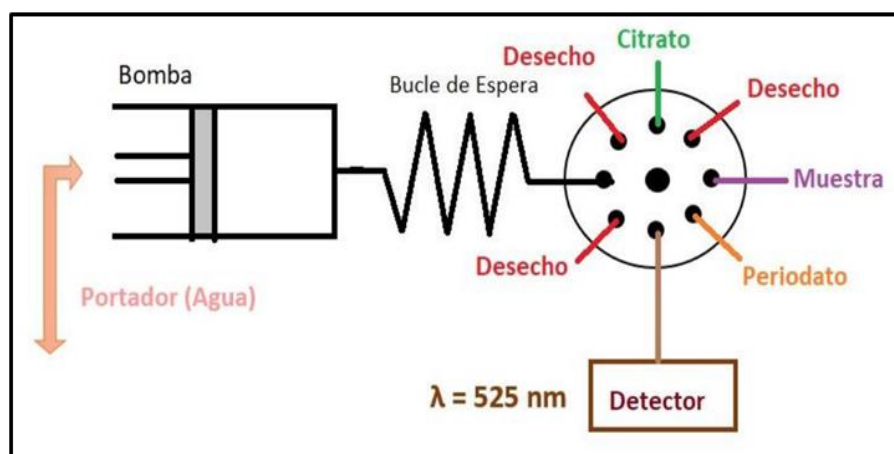


Figura 22. Sistema de SIA para determinar Mn.

VII. RESULTADOS

7.1 Diseño de Experimentos para Cobre

7.1.1 Diseño Experimental por FIA para Cu

Las condiciones analíticas útiles se obtuvieron mediante la optimización de diferentes variables físicas y químicas del sistema FIA utilizando el diseño factorial factorial Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$. Las variables incluidas fueron dos longitudes de la bobina de reacción (R1 y R2), el tamaño del asa de la muestra, la velocidad de flujo y las concentraciones de 5, 10, 15, 20 -Tetrakis (1-metil-4-piridinio) porfirina tetra p-toluenosulfonato ($\text{C}_{72}\text{H}_{66}\text{N}_8\text{O}_{12}\text{S}_4$) (H_4tmpyp) e hidrosulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). El diseño se realizó y los gráficos de optimización se construyeron utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.I.

Diseño Factorial Plackett-Burman 2⁶*3/16

Optimización de variables

El diseño factorial de Plackett-Burman 2⁶*3/16 de resolución III, con tres puntos centrales y 8 grados de libertad, se realizó para establecer las mejores condiciones para el análisis de flujo, permitiendo la evaluación estadística de factores que afectaron significativamente el complejo de formación [Cu (tmpyp)]⁺⁵. Los resultados preliminares obtenidos después de monitorear la absorbancia máxima a 434 nm revelaron picos uniformes y una línea de base estable. Quince experimentos se realizaron al azar, por triplicado, usando una concentración constante de cobre de 160 µg/L.

Condiciones del Diseño Factorial Plackett-Burman 2⁶*3/16

En el diseño se colocaron las siguientes variables con sus los siguientes rangos de trabajo: Reactor 1 de 30 a 150 cm (Reaction coil R1), Reactor 2 de 50 a 200 cm (Reaction coil R2), Volumen de inyección de 50-200 µL (Loop size), Concentración de Porphirina de 1.49E-0.5 a 3.71E-0.5 mol/L (Porphyrin), Concentración de Hidrosulfito de 0.028 a 0.056 mol/L (Hydosulfite) y la Velocidad del Flujo de 0.5 a 1.1 mL/min (Flow rate). Este diseño mostro que se requieren 15 experimentos para las variables seleccionadas los cuales incluyen dos puntos centrales, se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Experimentos del Diseño Factorial Plackett-Burman 2⁶*3/16.

Experimento	R1 (cm)	R2 (cm)	Loop (µL)	Porfirina (mol/L)	Hidrosulfito (mol/L)	Velocidad (rpm)
1	150	50	50	1.49E-0.5	0.056	30.0
2	30	50	50	3.71E-0.5	0.056	30.0
3	150	200	50	3.71E-0.5	0.028	15.0
4	150	50	200	1.49E-0.5	0.028	15.0
5	30	50	200	3.71E-0.5	0.056	15.0
6	30	200	200	3.71E-0.5	0.028	30.0
7	150	200	50	3.71E-0.5	0.056	15.0
8	100	130	125	2.60E-05	0.041	22.5
9	30	200	200	1.49E-0.5	0.056	15.0
10	150	200	200	1.49E-0.5	0.056	30.0
11	30	50	50	1.49E-0.5	0.028	15.0
12	100	130	125	2.60E-05	0.041	22.5
13	30	200	50	1.49E-0.5	0.028	30.0
14	100	130	125	2.60E-05	0.041	22.5
15	150	50	200	3.71E-0.5	0.028	30.0

Análisis de varianza para la absorbancia en la determinación de Cu para el diseño factorial Plackett-Burman 2⁶*3/16.

El ANOVA que se muestra en la Tabla 7 ilustra los efectos de los parámetros individuales. Estos efectos se estandarizaron (cada efecto se dividió por su error estándar). En este caso, cuatro efectos tienen valores de p inferiores a 0.05, lo que indica que son estadísticamente significativos en el nivel de 95.0% confianza.

Tabla 7. Análisis de varianza del diseño factorial Plackett-Burman 2⁶*3/16.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Media de Cuadrados</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Reaction coil R1	4.98E-07	1	4.98E-07	0.29	0.6026
B:Reaction coil R2	2.45E-04	1	2.45E-04	144.49	0.0000
C:Loop size	1.08E-03	1	1.08E-03	639.25	0.0000
D:Porphyrin	8.53E-05	1	8.53E-05	50.37	0.0001
E:Hydosulfite	2.09E-05	1	2.09E-05	12.31	0.0080
F:Flow rate	3.00E-06	1	3.00E-06	1.77	0.2200
Total error	1.36E-05	8	1.69E-06		
Total (corr.)	1.45E-03	14			

R-cuadrada = 99.0 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98.3 por ciento

Error estándar del est. = 1.3016E-03

Error absoluto medio = 7.72902E-04

Estadístico Durbin-Watson = 2.8267 (p=0.9608)

A continuación, se presenta el modelo de regresión múltiple que se ha ajustado a los datos obtenidos de acuerdo a las respuestas obtenidas al aplicar el diseño factorial Plackett-Burman 2⁶*3/16, se omitió colocar el reactor de reacción R1 debido a que no presenta una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo con la Tabla 7 de ANOVA. La ecuación 4 representa el modelo de regresión múltiple ajustado:

$$\begin{aligned} \text{Absorbance} = & 1.01E^{-1} - 6.02E^{-5} * R_2 + 1.27E^{-4} * \text{Loop size} + 240.24 * \text{Porphyrin} - 9.41E^{-2} \\ & * \text{Hydrosulfite} + 6.67E^{-5} * \text{Flow rate} \end{aligned} \quad (4)$$

El diagrama de Pareto obtenido al realizar el diseño factorial Plackett-Burman 2⁶*3/16 (Figura 23) mostró que las variables con mayor influencia fueron el volumen de inyección y la concentración de porfirina, pero la longitud del reactor (R2) y la concentración de hidrosulfito tienen una influencia negativa en la medición de la

absorbancia. Por lo tanto, los valores de estas variables se fijaron en los niveles más apropiados para la metodología y que ayudaron a reducir el consumo de reactivos.

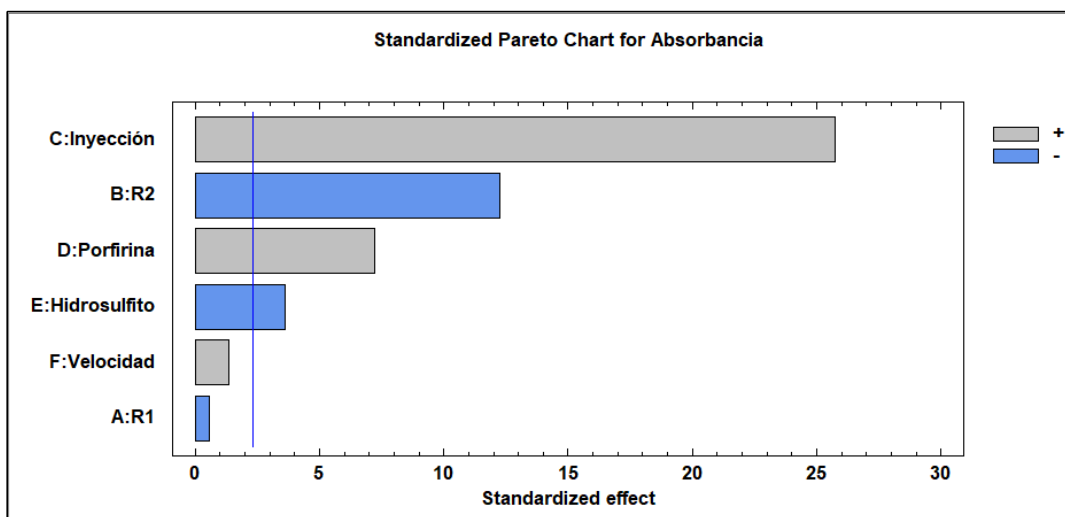


Figura 23. Gráfico de Pareto para Cobre-Porfirina, obtenido del diseño factorial Plackett-Burman $2^{6*3/16}$.

En el siguiente gráfico de efectos principales obtenido al realizar el diseño factorial Plackett-Burman $2^{6*3/16}$ (Figura 24), se pueden observar los cambios que ocurren en las seis variables sobre la absorbancia, el tamaño del reactor R2, el volumen de inyección y la concentración de la porfirina no muestran una curvatura, lo que indica que los valores pueden continuar aumentando para mejorar la medición de la absorbancia. La variable con mayor influencia es el volumen de inyección (Loop size).

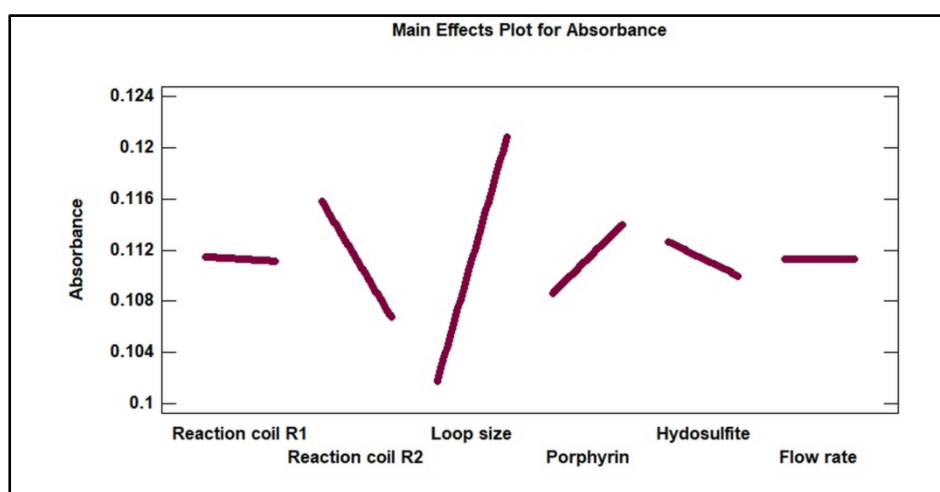


Figura 24. Gráfico de efectos principales para el complejo de Cobre-Porfirina al aplicar el diseño factorial Plackett-Burman $2^{6*3/16}$.

El gráfico de superficie de respuesta tridimensional obtenido al realizar el diseño factorial Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$ ajustado a los datos experimentales se muestra en la Figura 25, donde las variables de influencia son el volumen de inyección y la longitud del reactor R2. El área verde refleja la absorbancia máxima e indica los niveles de concentración de los factores a los que el análisis fue más sensible.

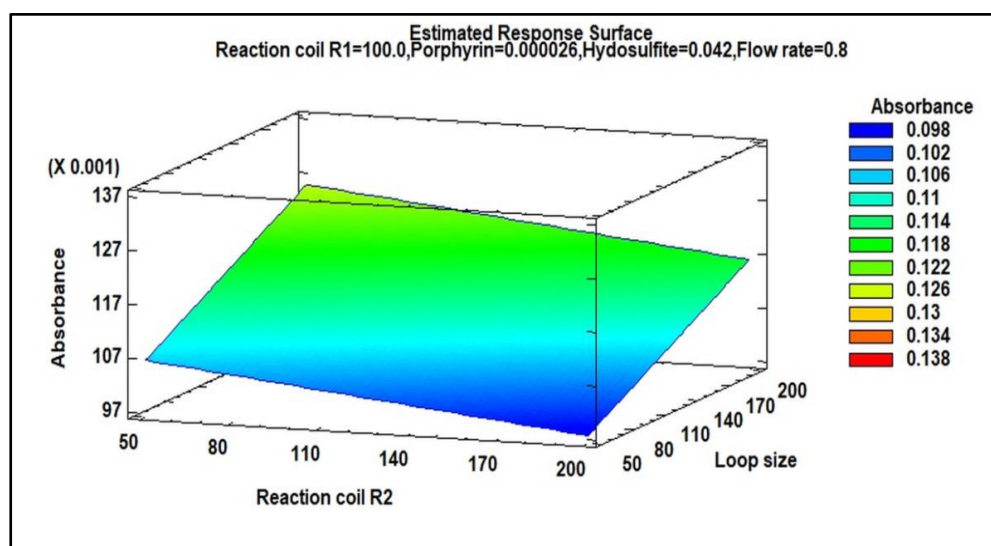


Figura 25. Gráfica de superficie de respuesta del complejo de Cobre-Porfirina al aplicar el diseño factorial Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$.

En la Tabla 8 se muestran los valores optimizados de las variables estudiadas al aplicar el diseño factorial Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$ para la formación del complejo cobre-porfirina.

Tabla 8. Valores óptimos del complejo Cobre-Porfirina al aplicar el diseño factorial Plackett-Burman $2^6 \times 3/16$.

Factor	Bajo	Alto	Optimo
A:Reaction coil R1 (cm)	50	150	90
B:Reaction coil R2 (cm)	50	200	50
C:Loop size (μ L)	50	200	200
D:Porphyrin (mol/L)	1.49E-05	3.71E-05	3.71E-05
E:Hydrosulfite (mol/L)	0.028	0.056	0.034
F:Flow rate (mL/min)	0.5	1.1	0.6

Curva de Calibración para la determinación del complejo Cu-porfirina

En la determinación de cobre se evaluó la linealidad del método FIA propuesto mediante la construcción de curvas de calibración en el intervalo de concentración de 40 a 280 µg/L, bajo las condiciones de operación ya optimizadas. Las señales analíticas se consideraron para una tendencia lineal entre la altura máxima (unidades de absorbancia) y la concentración de analito. El análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados se utilizó para determinar la pendiente, la intersección y el coeficiente de regresión lineal. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) se determinaron de acuerdo con las recomendaciones de IUPAC y la asociación mexicana de QFB (García, y otros, 2002): $LD = 3s/b$ y $LQ = 10s/b$, donde "s" es la desviación estándar de la respuesta analítica y "b" es la pendiente del rango lineal dinámico.

En base en las condiciones experimentales óptimas que se obtuvieron del diseño factorial Plackett-Burman $2^6 \cdot 3/16$, se observan excelentes relaciones lineales entre los valores de absorbancia y las concentraciones del complejo Cobre-Porfirina en un intervalo de 40 a 280 µg/L. El FIagrama se muestra en la Figura 26.

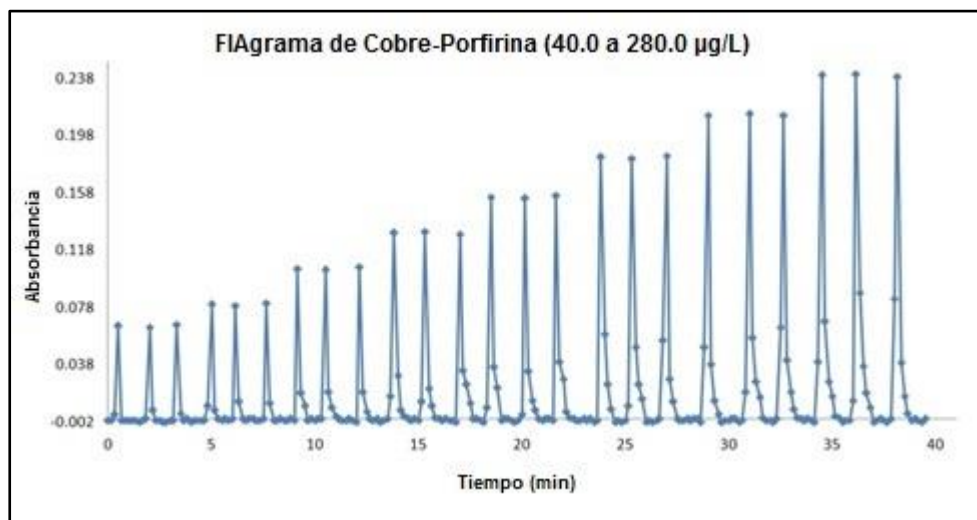


Figura 26. FIagrama para la curva de calibración para Cobre-Porfirina.

La ecuación de regresión lineal para la determinación de cobre es:

$$A = 0.0003 \cdot [\text{ppm Cu}^{+2}] + 0.0018 \quad (5)$$

Los coeficientes de regresión y correlación lineal son 0.9974 y 0.9948 respectivamente los cuales se obtuvieron con las absorbancias mostradas en la Figura 27, las que incluyen mediciones por triplicado de las disoluciones cuya concentración es: 40.0, 80.0, 120.0, 160.0, 200.0, 240.0 y 280.0 $\mu\text{g/L}$ de Cu.

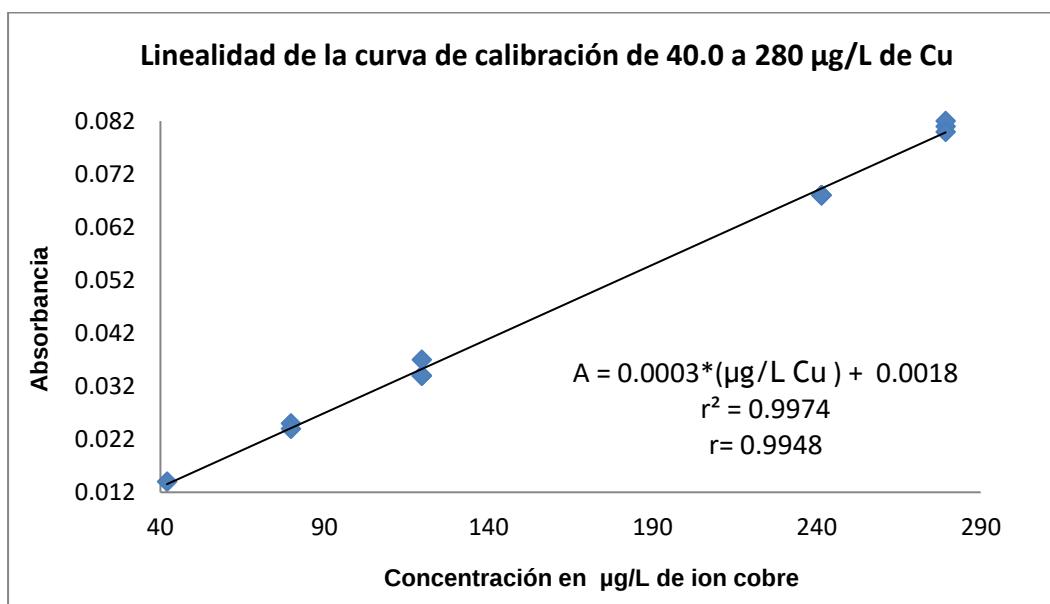


Figura 27. Curva de calibración para cobre.

Precisión del método como repetibilidad

Se determinó la precisión como reproducibilidad de la disolución de cobre estándar, se inyectó siete veces por triplicado un estándar de cobre de 168 $\mu\text{g/L}$ y el FIAGrama obtenido se mostró en la Figura 28. La variabilidad analítica se expresó en términos de desviación estándar relativa (% RSD). Para mayor precisión, los valores aceptables de RSD se consideran menores o iguales al 3%. Los porcentajes de concentración encontrados para las disoluciones fortificadas estaban en el intervalo de 99.8% - 101.6%. Los valores de la distribución t para evaluar la precisión del método propuesto fueron inferiores a los valores de la distribución t crítica. Distribución t = 0.828, gl= 40 $\leq$ t crítica = 2.021, gl = 40.

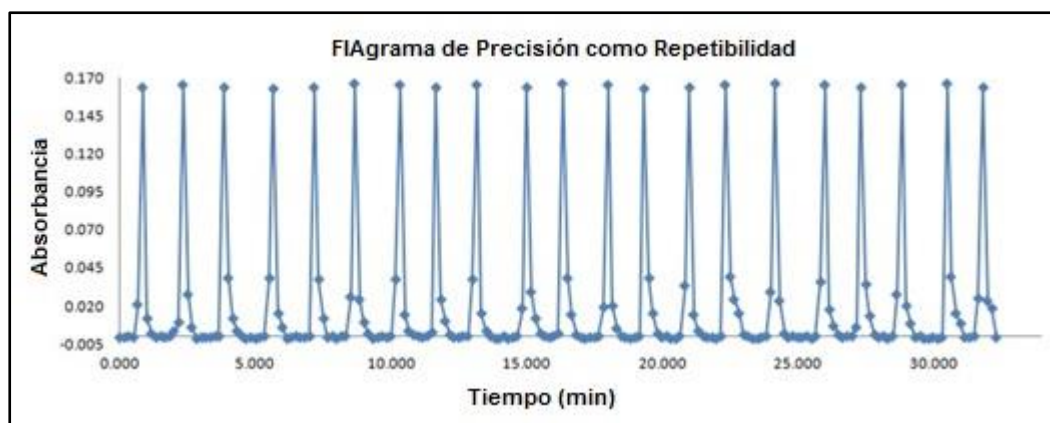


Figura 28. FIAGRAMA de Precisión como Repetibilidad para Cobre-Porfirina.

Límites de detección y cuantificación para cobre.

Las condiciones experimentales óptimas permitieron que se obtuviera excelentes relaciones lineales entre los valores medidos de absorbancia y las concentraciones de cobre en el rango de 40.0 a 280 $\mu\text{g/L}$. Los resultados indicaron que la técnica tenía suficiente sensibilidad y linealidad para la determinación de cobre en vinos como se muestra en la Tabla 9).

Tabla 9. Criterios estadísticos para la determinación de cobre por FIA.

Criterio	Valor
Pendiente (b_1)	6.72 E^{-04}
Ordenada en el origen (b_0)	0.0506
Coefficiente de regresión (r^2)	0.9993
Coefficiente de correlación (r)	0.9996
Intervalo de confianza para la pendiente ($\text{IC}_{\beta 1}$)	$6.62 \text{ E}^{-04} - 6.82 \text{ E}^{-04}$
Intervalo de confianza para la ordenada en el origen ($\text{IC}_{\beta 0}$)	0.0488 - 0.0524
Coefficiente de variación de regresión ($\text{CV}_{y/x}$)	1.0
Límite de detección	7.7 $\mu\text{g/L}$
Límite de cuantificación	23.4 $\mu\text{g/L}$

Evaluación de las interferencias en el proceso para cobre por FIA.

Se determinaron las interferencias para cobre en el método de análisis por flujo continuo indicados en la Tabla 10, las interferencias se seleccionaron de acuerdo a los límites máximos permisibles mencionados en el artículo del Consenso de la Sociedad Española (Consenso de la Sociedad Española de Nutrición, 2013), el cual habla del

valor y composición nutricional del vino, se encontraron en los siguientes valores para cada ion:

Tabla 10. Interferencias de iones para cobre.

Interferencia	Analito en mg/L
Cl ⁻	1,200.0
[SO ₄] ⁻²	1,600.0
Mg ⁺²	10.0
K ⁺	800.0
Fe ⁺²	8.0
Ca ⁺²	120.0
[PO ₄] ⁻³	1200.0

7.2 Diseño de Experimentos para Manganeseo

7.2.1 Diseño Experimental por FIA para Mn

Las condiciones analíticas útiles se obtuvieron mediante la optimización de diferentes variables físicas y químicas del sistema FIA utilizando el diseño factorial 2⁴ de resolución V+, con dos puntos centrales y 7 grados de libertad. Las variables incluidas fueron: la longitud del reactor de reacción (R2), el tamaño del volumen de muestra (Loop), el valor de pH y la concentración del periodato. El diseño se realizó y los gráficos de optimización se construyeron utilizando el software Statgraphics Centurion XVI.I.

Diseño Factorial 2⁴ para manganeseo por FIA

Optimización de variables

Se realizó un diseño factorial 2⁴, con 2 puntos centrales y 7 grados de libertad para establecer las mejores condiciones para el análisis de flujo, permitiendo la evaluación estadística de los factores que afectaron significativamente la reacción de formación permanganato. Los resultados preliminares obtenidos después de monitorear la absorbancia máxima a 524 nm revelaron picos uniformes y una línea base estable. Se realizaron 18 experimentos al azar, por triplicado, usando una concentración constante de 20 mg/L de manganeseo. La solución de citratos de concentración total 0.1 mol/L se usó como base de trabajo, ajustada a pH= 6 con HCl 0.0925 mol/L. Se utilizó una solución de fosfatos con una concentración total de 0.2 mol/L como base de trabajo, ajustada a pH= 8 y pH= 10 con NaOH 0.2 mol/L (FEUM, 2011).

Condiciones del Diseño Factorial 2⁴ para Mn por FIA

En el diseño se colocaron las siguientes variables con sus los siguientes rangos de trabajo: pH de 6 a 10, volumen de muestra de 200 a 1000 µL (Loop size), el reactor de reacción 2 de 400 a 1000 cm (Reaction coil R2) y la concentración del periodato de 0.0187 a 0.0561 mol/L (Periodate). Este diseño mostro que se requieren 18 experimentos aleatorizados para las variables seleccionadas los cuales incluyen dos puntos centrales, se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Experimentos del Diseño Factorial 2⁴ para Mn por FIA

Experimento	pH (unidades de pH)	Loop (µL)	R2 (cm)	Periodato (mol/L)
1	10	1000	400	0.0187
2	6	200	400	0.0561
3	6	200	400	0.0187
4	6	1000	400	0.0561
5	10	200	1000	0.0187
6	8	600	700	0.0374
7	10	200	1000	0.0561
8	10	1000	1000	0.0187
9	6	1000	1000	0.0187
10	10	200	400	0.0561
11	6	1000	1000	0.0561
12	6	1000	400	0.0187
13	10	1000	400	0.0561
14	10	1000	1000	0.0561
15	6	200	1000	0.0187
16	6	200	1000	0.0561
17	10	200	400	0.0187
18	8	600	700	0.0374

La Tabla 12 de ANOVA divide la variabilidad en absorbancia en piezas separadas para cada uno de los efectos. Luego prueba la significación estadística de cada efecto comparando el cuadrado medio con una estimación del error experimental. En este caso, cinco efectos tienen valores de p inferiores a 0.05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95.0%.

Tabla 12. Análisis de varianza del Diseño Factorial 2⁴ para Mn por FIA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Media de Cuadrados</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: pH	2.12E-02	1	2.12E-02	376.49	0.0000
B: Loop size	2.67E-02	1	2.67E-02	475.41	0.0000
C: Reaction coil R2	2.07E-03	1	2.07E-03	36.82	0.0005
D: Periodate	1.37E-03	1	1.37E-03	24.35	0.0017
AB	2.60E-03	1	2.60E-03	46.26	0.0003
AC	1.60E-05	1	1.60E-05	0.28	0.6102
AD	2.50E-07	1	2.50E-07	0.00	0.9487
BC	2.56E-04	1	2.56E-04	4.55	0.0703
BD	2.50E-07	1	2.50E-07	0.00	0.9487
CD	2.72E-04	1	2.72E-04	4.84	0.0637
Total error	3.94E-04	7	5.62E-05		
Total (corr.)	5.49E-02	17			

R-cuadrada = 99.3 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98.3 por ciento

Error estándar del est. = 0.00749868

Error absoluto medio = 0.00375309

Estadístico Durbin-Watson = 2.0793 (p=0.2411)

El análisis de la tabla de Pareto (Figura 29) mostró que las variables con mayor influencia fueron el tamaño del bucle y la concentración de periodato, pero el pH, la longitud de la bobina de reacción R2 y el tamaño del bucle de interacción-pH tienen una influencia negativa en la medición de la absorbancia. Por lo tanto, los valores de estas variables se fijaron en los niveles más apropiados para la metodología y que ayudaron a reducir el consumo de reactivos.

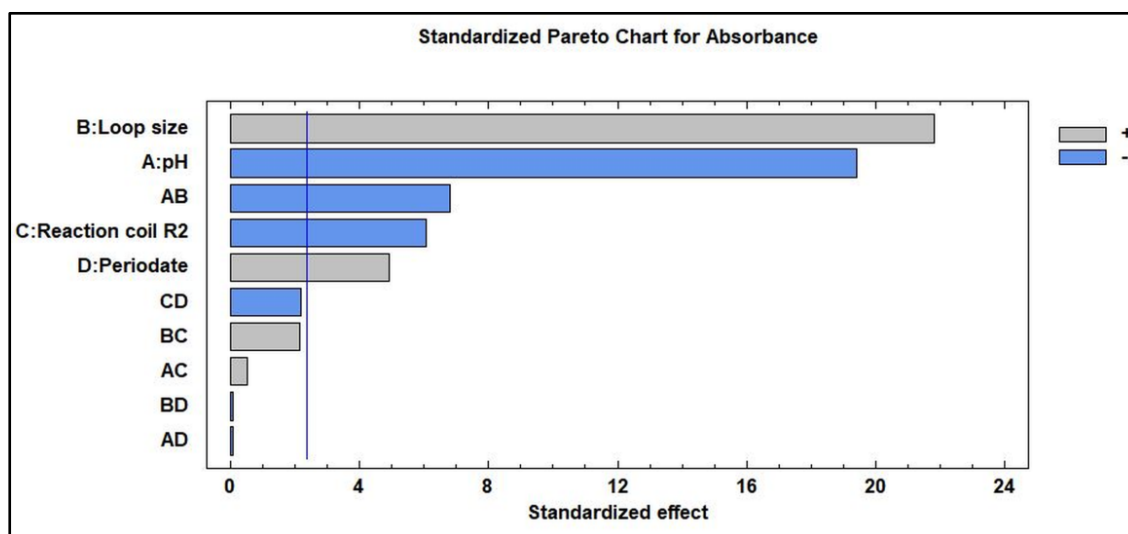


Figura 29. Gráfico de Pareto por la oxidación del Mn⁺² del diseño factorial 2⁴ por FIA.

En la Figura 30 puede ver los efectos de las cuatro variables, y se ha observado que la no curvatura nos dice dónde está el límite para cada una de las variables con los rangos de trabajo que han propuesto.

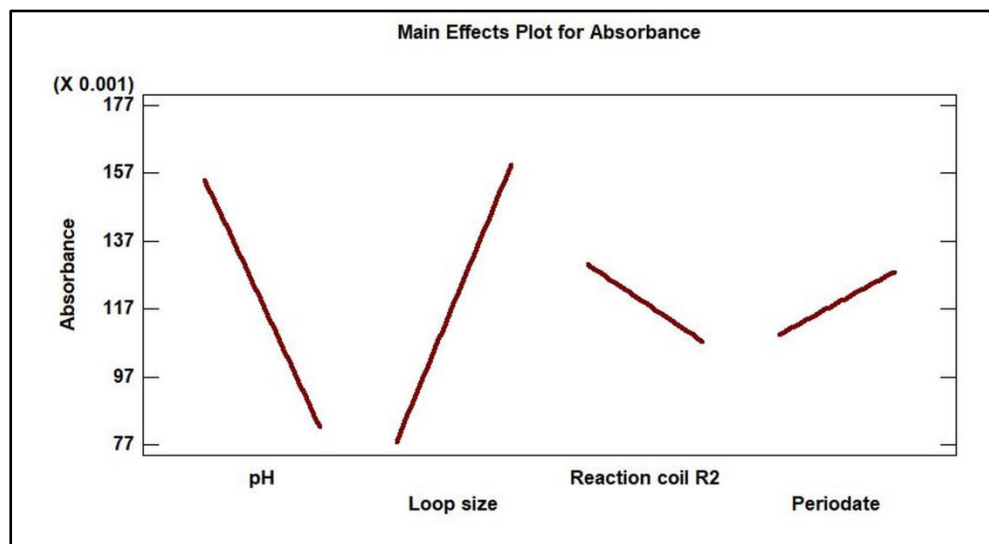


Figura 30. Gráfico de efectos principales para la absorbancia por oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial 2^4 por FIA.

Diseño Factorial de Box-Behnken para Mn por FIA

Optimización de variables

Se propone un segundo diseño de experimentos de Box-Behnken, con tres puntos centrales y 5 grados de libertad para establecer las mejores condiciones para el análisis de flujo, permitiendo la evaluación estadística de los factores que afectaron significativamente la reacción de formación permanganato en el primer diseño factorial 2^4 por flujo continuo. Los resultados preliminares se van a seguir monitoreando a una absorbancia máxima a 524 nm, como en el primer diseño. Se realizaron 15 experimentos al azar, por triplicado, usando una concentración constante de 20 mg/L de manganeso. Se utilizaron las mismas soluciones del primer diseño factorial 2^4 .

Condiciones del Diseño Factorial de Box-Behnken para Mn por FIA

En el diseño se colocaron las siguientes variables con sus los siguientes rangos de trabajo: concentración del periodato de 0.02 a 0.1 mol/L (Periodate), tamaño de volumen de muestra de 100 a 600 μL (Loop size) y la velocidad de la bomba de 16 a 22 rpm (Flow rate). Este diseño mostro que se requieren 15 experimentos aleatorizados para las variables seleccionadas los cuales incluyen tres puntos centrales, se muestran en la).

Tabla 13).

Tabla 13. Experimentos del Diseño Factorial de Box-Behnken para Mn por FIA

Experimento	Periodato (mol/L)	Loop (μL)	Velocidad (cm)
1	0.10	100	19
2	0.02	350	22
3	0.06	350	19
4	0.02	600	19
5	0.02	100	19
6	0.10	600	19
7	0.06	100	16
8	0.06	350	19
9	0.10	350	16
10	0.06	100	22
11	0.06	600	16
12	0.10	350	22
13	0.06	350	19
14	0.02	350	16
15	0.06	600	22

En la Tabla 14 de ANOVA divide la variabilidad en absorbancia en piezas separadas para cada uno de los efectos. Luego prueba la significación estadística de cada efecto comparando el cuadrado medio con una estimación del error experimental. En este caso, 4 efectos tienen valores de p inferiores a 0.05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero en el nivel de confianza del 95.0%.

El análisis de la tabla 14 mostró que las variables con mayor influencia fueron el tamaño de volumen de muestra y las concentraciones de periodato, pero el tamaño de volumen de muestra de interacción-tamaño de volumen de muestra y la concentración de periodato interacción-concentración de periodato tienen una influencia negativa en la medición de la absorbancia.

Tabla 14. Efectos estimados del diseño factorial Box-Behnken para Mn por FIA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Media de Cuadrados</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Periodate	5.62E-03	1	5.62E-03	123.38	0.0001
B: Loop size	1.25E-02	1	1.25E-02	274.13	0.0000
C: Flow rate	5.00E-07	1	5.00E-07	0.01	0.9206
AA	1.24E-03	1	1.24E-03	27.13	0.0034
AB	1.23E-05	1	1.23E-05	0.27	0.6261
AC	1.32E-04	1	1.32E-04	2.90	0.1491
BB	5.41E-03	1	5.41E-03	118.90	0.0001
BC	2.03E-05	1	2.03E-05	0.44	0.5344
CC	2.71E-05	1	2.71E-05	0.59	0.4754
Total error	2.28E-04	5	4.55E-05		
Total (corr.)	2.50E-02	14			

R-cuadrada = 99.1 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 97.4 por ciento

Error estándar del est. = 0.00674784

Error absoluto medio = 0.00348889

Estadístico Durbin-Watson = 1.89943 (p=0.5661)

En el diagrama de Pareto (Figura 31) se muestran los efectos de los parámetros individuales y sus interacciones. La longitud de cada factor es proporcional al valor absoluto del coeficiente de regresión asociado o efecto estimado. Los efectos de todos los parámetros e interacciones se estandarizaron (cada efecto se dividió por su error estándar).

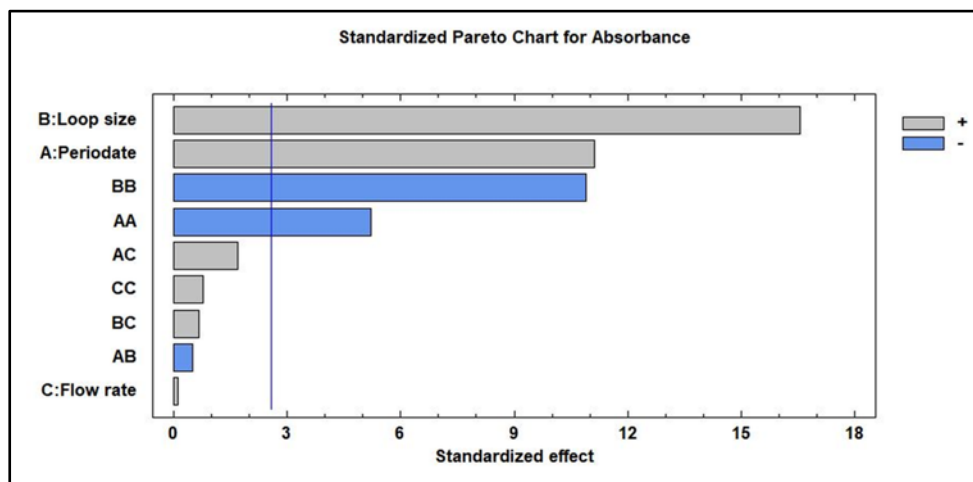


Figura 31. Gráfico de Pareto para la oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial Box-Behnken por FIA.

En el Diagrama de Pareto (Figura 31), se observó que el tamaño de volumen de muestra y el periodato tienen una influencia positiva en la oxidación de Mn^{+2} .

El modelo de regresión se ha estado ajustado a los datos. En la ecuación 6, se omitieron las interacciones: periodato-volumen de muestra (AB), periodato-velocidad de flujo (AC), volumen de muestra-velocidad de flujo (BC) y velocidad de flujo-velocidad de flujo (CC), no existe una diferencia estadísticamente significativa según la tabla 14 de ANOVA. La ecuación del modelo ajustado es:

$$Absorbance = -2.20E^{-2} + 2.05 * Periodate + 5.892E^{-4} * Loop\ size - 11.562 * Periodate^2 - 6.127E^{-7} * Loop\ size^2 \quad (6)$$

Se puede observar en el siguiente gráfico (Figura 32) los efectos principales de las tres variables, que nos muestran una curvatura y nos indica que los valores ya no pueden aumentar para mejorar la medición de la absorbancia. La variable con mayor influencia es el tamaño de volumen de muestra.

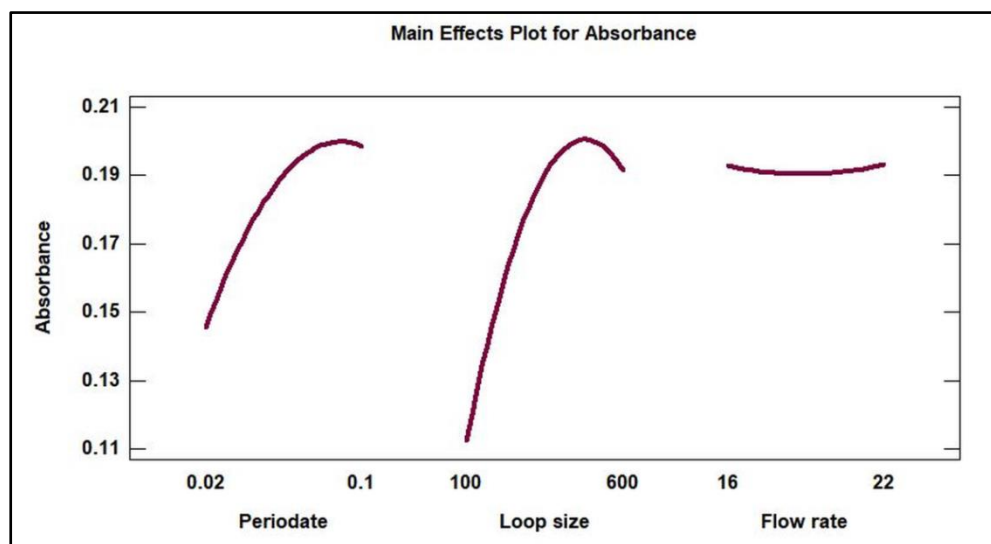


Figura 32. Gráfico de efectos principales para la absorbancia por la oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial de Box-Behnken.

Se muestra el gráfico de superficie de respuesta tridimensional (Figura 33) obtenido de los datos experimentales, el área más oscura (roja) refleja la absorbancia máxima e indica los niveles de concentración de los factores a los que el análisis fue más sensible para la oxidación del Mn^{+2} y el color azul la absorbancia mínima obtenida en el diseño experimental.

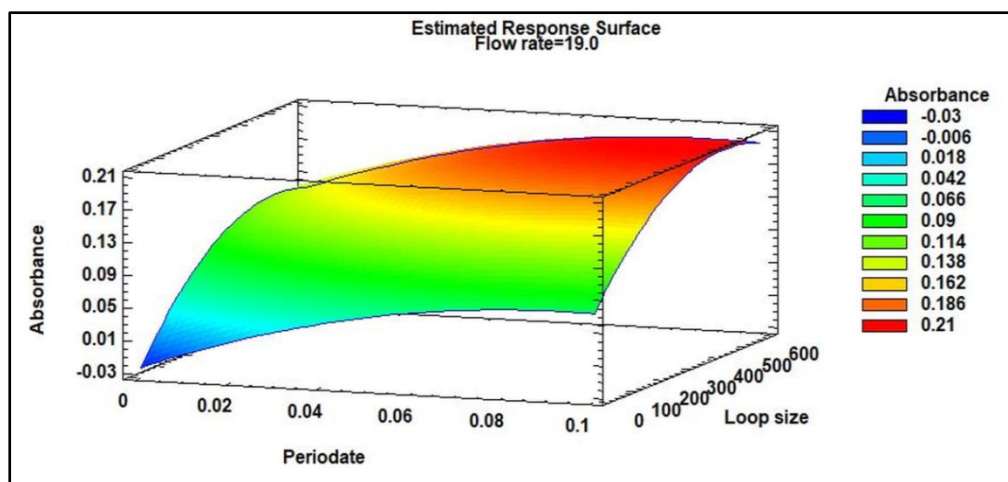


Figura 33. Gráfica de la superficie de respuesta por la oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial Box-Behnken.

En la Tabla 15 se muestra la combinación de niveles de factores que maximizan la absorbancia en la región indicada. Para cada factor se muestra el límite bajo y alto, así como el resultado óptimo del diseño experimental, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 15. Valores óptimos por la oxidación del Mn^{+2} del diseño factorial Box-Behnken por FIA

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Optimo</i>
A: Periodate (mol/L)	0.02	0.1	0.1
B: Loop size (μL)	100.0	600.0	500
C: Flow rate (rpm)*	16.0	22.0	22.0

* 16 rpm equivalen a 0.6 mL/min y 22 rpm equivalen a 0.8 mL/min.

Curva de Calibración para Mn por FIA

A partir de los valores óptimos sugeridos por el diseño de Box-Behnken, se realizó una curva de calibración para la oxidación del Mn^{+2} en un rango de 0.5 a 50 mg/L, y el FIAGrama se muestra en la Figura 34:

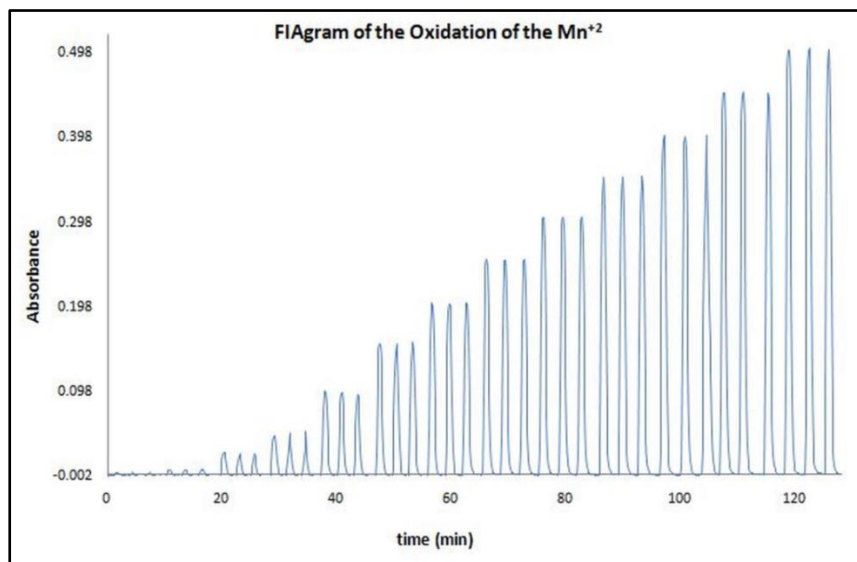


Figura 34. FIAGrama de la oxidación del Mn^{+2} .

Precisión del método como repetibilidad para Mn por FIA

Se aplicó en el método de FIA para determinar la precisión como reproducibilidad de la disolución de manganeso estándar, se inyectó un estándar de manganeso de 22 mg/L siete veces por triplicado, y el fiagrama obtenido se mostró en la Figura 35.

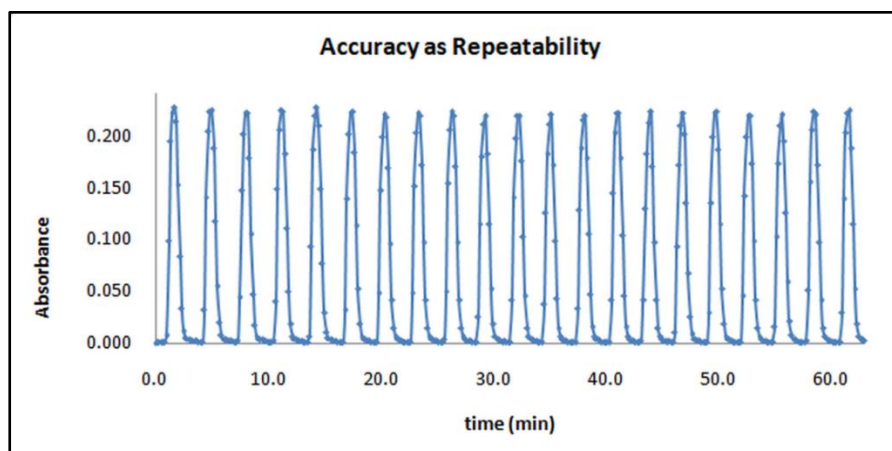


Figura 35. FIAGrama de Precisión como Repetibilidad para la oxidación de Mn^{+2} .

La variabilidad analítica se expresó en términos de desviación estándar relativa (% RSD). Para mayor precisión, los valores aceptables de RSD se consideran menores o iguales al 3%. Los porcentajes de concentración encontrados para las soluciones fortificadas estaban en el intervalo de 99.2 - 100.6%. Los valores para la distribución t determinados para evaluar la precisión del método propuesto fueron inferiores a los valores la distribución t críticos. La distribución t determinada= 0.562, $gl= 40 \leq t \text{ critica} = 2.021$, $gl= 40$.

Límites de detección y cuantificación para Mn por FIA

Se obtuvieron excelentes relaciones experimentales bajo las condiciones óptimas entre los valores medidos de absorbancia y las concentraciones de manganeso en el rango de 0.5 a 50 mg/L. Los resultados indicaron que la técnica tenía suficiente sensibilidad y linealidad para la determinación de manganeso en vinos (Tabla 16).

Tabla 16. Linealidad de la oxidación del Mn^{+2} por FIA

Criterio	Valor
Pendiente (b_1)	0.0101
Ordenada en el origen (b_0)	-3.33 E ⁻⁰⁴
Coeficiente de regresión (r^2)	0.9998
Coeficiente de correlación (r)	0.9999
Intervalo de confianza para la pendiente ($IC_{\beta 1}$)	9.97 E ⁻⁰³ – 1.02 E ⁻⁰²
Intervalo de confianza para la ordenada en el origen ($IC_{\beta 0}$)	-0.0029 - 0.0023
Coeficiente de variación de regresión ($CV_{y/x}$)	1.2
Límite de detección	0.9 mg/L
Límite de cuantificación	2.7 mg/L

Evaluación de las interferencias en el proceso para Mn por FIA

Se determinaron las interferencias para manganeso en el método de FIA indicados en la Tabla 17, las interferencias se seleccionaron de acuerdo a los límites máximos permisibles mencionados en el artículo del Consenso de la Sociedad Española (Consenso de la Sociedad Española de Nutrición, 2013), el cual habla del valor y composición nutricional del vino, se encontraron en los siguientes valores para cada ion:

Tabla 17. Interferencias de iones para manganeso.

Interferencia	Analito en mg/L
Cl ⁻	1200
[SO ₄] ⁻²	2000
Cu ⁺²	1.2
K ⁺	1200
Fe ⁺²	8
Ca ⁺²	120
[PO ₄] ⁻³	1200

7.2.2 Diseño Experimental por SIA para Mn

Diseño Factorial 2⁴ para Mn por SIA

Condiciones del Diseño Factorial 2⁴ por SIA

En el diseño se colocaron las siguientes variables con los siguientes intervalos de trabajo: Citrate (40-170 µL), Periodate (40-170 µL), Sample (40-170 µL) y Flow rate (16-26 rpm). Este diseño mostro que se requieren realizar 18 experimentos, los cuales incluyen dos puntos centrales, se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Experimentos del diseño factorial 2⁴ con cuatro variables para Mn por SIA.

Experimento	Citrate (µL)	Periodate (µL)	Sample (µL)	Flow rate (rpm)
1	40	40	170	26
2	40	170	40	16
3	170	170	170	26
4	170	40	40	16
5	170	170	40	16
6	40	40	40	16
7	40	170	170	16
8	40	40	40	26
9	170	170	40	26
10	105	105	105	21
11	170	170	170	16
12	40	40	170	16
13	170	40	40	26
14	170	40	170	26
15	40	170	40	26
16	105	105	105	21
17	40	170	170	26
18	170	40	170	16

Análisis de varianza para la absorbancia para la determinación de Mn por SIA

En la Tabla 19 se muestra el resultado del análisis de varianza en el cual el factor influyente es el volumen de inyección porque su valor de P es menor a 0.05 indicando que tiene significancia estadística.

Tabla 19. Análisis de varianza para el diseño factorial 2⁴ para Mn por SIA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Media de Cuadrados</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Citrate	9.51E-05	1	9.51E-05	2.63	0.1356
B:Periodate	2.98E-04	1	2.98E-04	8.25	0.0166
C:Sample	6.20E-03	1	6.20E-03	171.86	0.0000
D:Flow rate	7.56E-06	1	7.56E-06	0.21	0.6569
AB	2.76E-05	1	2.76E-05	0.76	0.4026
AC	7.66E-05	1	7.66E-05	2.12	0.1759
CD	4.56E-05	1	4.56E-05	1.26	0.2874
Error total	3.61E-04	10	3.61E-05		
Total (corr.)	7.11E-03	17			

R-cuadrada = 94.9265 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 91.3751 por ciento

Error estándar del est. = 0.006007

Error absoluto medio = 0.00359182

Estadístico Durbin-Watson = 1.58138 (p=0.1943)

Se muestra en la ecuación 7 el modelo de regresión, que se ha ajustado a los datos. En la ecuación, se omitieron las interacciones de: (AD), (BC) y (BD) por no existir una diferencia estadísticamente significativa según la tabla 19 de ANOVA. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\begin{aligned} \text{*Absorbance} = & 0.00564503 - 0.0000157544 \cdot \text{Citrate} - 0.0000989645 \cdot \text{Periodate} + 0.000466287 \cdot \text{Sample} + \\ & 0.000407692 \cdot \text{Flow rate} + 3.10651\text{E-}7 \cdot \text{Citrate} \cdot \text{periodate} - 5.17751\text{E-}7 \cdot \text{Citrate} \cdot \text{Sample} - \\ & 0.00000519231 \cdot \text{Sample} \cdot \text{Flow rate} \end{aligned} \quad (7)$$

En el diagrama de Pareto (Figura 36) se muestran los efectos de los parámetros individuales y sus interacciones. Las variables con mayor influencia fueron el volumen de muestra y la concentración de periodato, pero el volumen de muestra tiene una influencia positiva en la medición de la absorbancia, como resultado de los 18 experimentos realizados, mostrando cuales son las variables críticas y las variables que no influyen en el diseño.

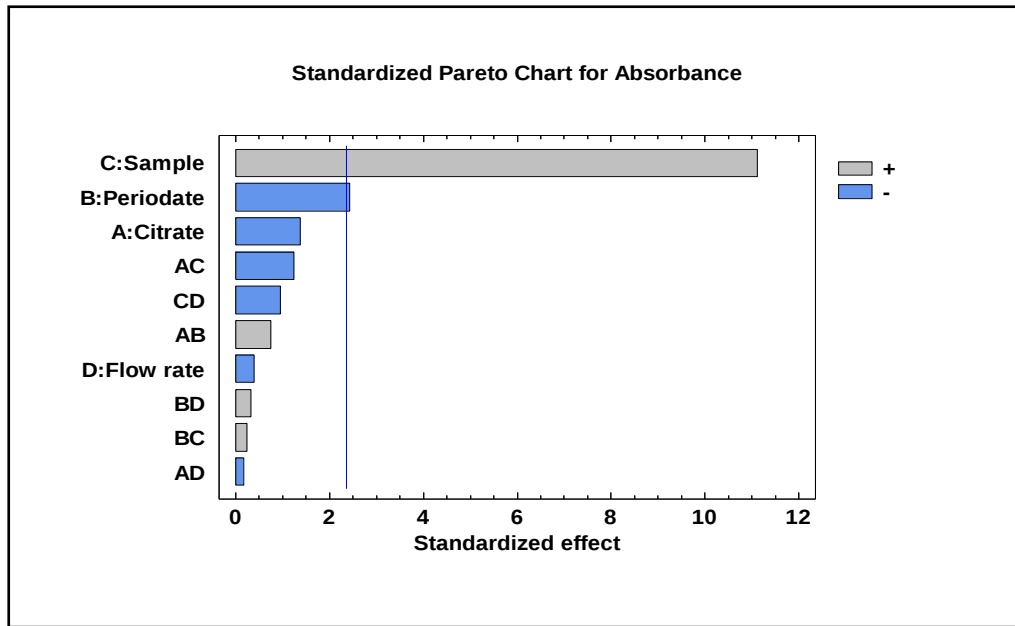


Figura 36. Gráfico de Pareto del diseño factorial 2^4 para Mn por SIA

En el siguiente gráfico (Figura 37) se pueden observar los efectos de las cuatro variables y al mostrar una curvatura nos indica que los valores ya no pueden aumentar para mejorar la medición de la absorbancia. La variable con mayor influencia es el volumen de muestra ya que se requiere mayor volumen para incrementar la absorbancia y así poder ver el límite de esta variable.

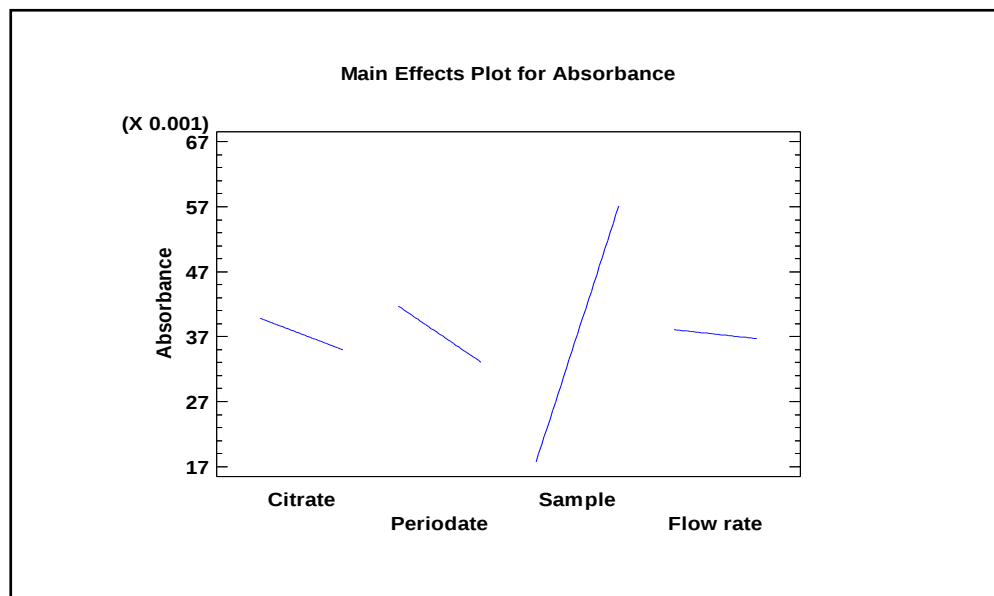


Figura 37. Gráfico de efectos principales para el diseño factorial 2^4 para Mn por SIA.

El gráfico de superficie de respuesta tridimensional obtenido y ajustando (Figura 38) con los datos experimentales muestra el área más oscura (roja), refleja la absorbancia máxima e indica los niveles de concentración de los factores a los que el análisis fue más sensible para la oxidación del Mn^{+2} . Se puede ver la interacción entre el periodato y el volumen de muestra que fueron variables influyentes.

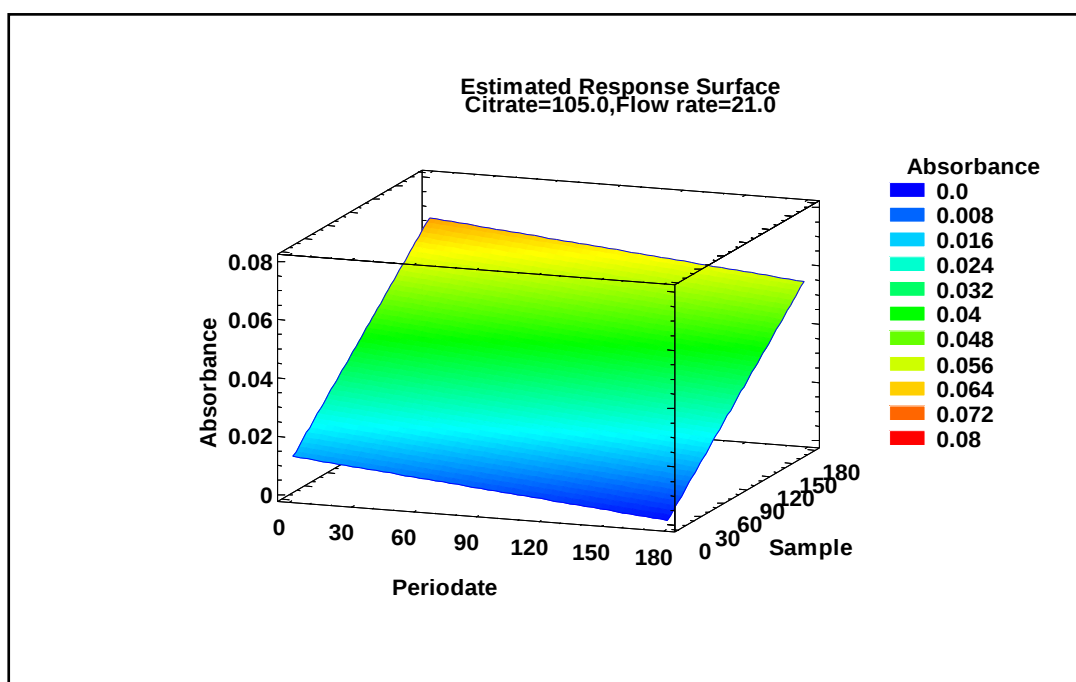


Figura 38. Gráfico de superficie de respuesta para el diseño factorial 2^4 para Mn por SIA

En la Tabla 20 se muestran las combinaciones de niveles de factores que maximizan la absorbancia en la región indicada. Se puede establecer el valor de uno o más factores en una constante estableciendo los límites alto y bajo para ese valor como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 20. Tabla de valores óptimos para el diseño factorial 2^4 para Mn por SIA

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Valor Optimo</i>
Citrate	40.0	170.0	40.0
Periodate	40.0	170.0	40.0
Sample	40.0	170.0	170.0
Flow rate	16.0	26.0	16.0

Primer Diseño de Box-Behnken para Mn por SIA

En el diseño Box-Behnken se colocaron las siguientes variables con sus los siguientes intervalos de trabajo: citrato (Citrato 20-100 μL), periodato (Periodate 20-100 μL) y muestra (Sample 150-280 μL). Este diseño mostro que se requieren 15 experimentos para las variables seleccionadas los cuales incluyen tres puntos centrales, se muestran en la Tabla 21.

Tabla 21. Diseño de Box-Behnken con 15 experimentos para Mn por SIA

Experimento	Citrato (μL)	Periodate (μL)	Sample (μL)
1	20	60	150
2	20	60	280
3	100	100	215
4	60	60	215
5	60	100	150
6	100	60	150
7	100	60	280
8	100	20	215
9	20	20	215
10	60	100	280
11	60	20	280
12	60	60	215
13	60	60	215
14	20	100	215
15	60	20	150

Análisis de varianza para absorbancia en la determinación de Mn por SIA

En la Tabla 22 se muestran las variables que influyen en análisis, así como las interacciones entre las variables para el diseño de Box-Behnken, el cual el factor influyente es el volumen de muestra (Sample), el periodate (Periodate) y la interacción cuadrática del periodate (BB) porque su valor de P es menor a 0.05 indicando que tiene significancia estadística.

Tabla 22. Análisis de varianza para la absorbancia para el diseño de Box-Behnken para Mn.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Media de Cuadrados	Razón-F	Valor-P
A:Citrate	7.20E-05	1	7.20E-05	3.37	0.1038
B:Periodate	6.66E-04	1	6.66E-04	31.16	0.0005
C:Sample	2.21E-03	1	2.21E-03	103.43	0.0000
BB	2.04E-04	1	2.04E-04	9.52	0.0150
BC	2.50E-05	1	2.50E-05	1.17	0.3110
CC	9.46E-06	1	9.46E-06	0.44	0.5246
Error total	1.71E-04	8	2.14E-05		
Total (corr.)	3.37E-03	14			

R-cuadrada = 94.9188 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 91.1079 por ciento

Error estándar del est. = 0.00462357

Error absoluto medio = 0.00258846

Estadístico Durbin-Watson = 1.52677 (P=0.1511)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.213286

Se muestra el modelo de regresión, que se ajusta a los datos. En la ecuación 8, se omitieron las interacciones de: (AA), (AB) y (AC), no existe una diferencia estadísticamente significativa de acuerdo a la tabla 22 de ANOVA. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\begin{aligned} \text{*Absorbance} = & 0.0335656 - 0.000075 \cdot \text{Citrate} - 0.000990144 \cdot \text{Periodate} + 0.000360526 \cdot \text{Sample} + \\ & 0.0000046274 \cdot \text{Periodate}^2 + 9.61538\text{E-}7 \cdot \text{Periodate} \cdot \text{Sample} - 3.77788\text{E-}7 \cdot \text{Sample}^2 \end{aligned} \quad (8)$$

En el diagrama de Pareto muestra los efectos de los parámetros individuales y sus interacciones. Se muestra en la Figura 39 como el volumen de la muestra afecta de manera influyente y positiva el valor de la absorbancia, aumentado el valor de respuesta en el diseño de experimentos y se considera en segundo lugar la concentración del periodato afecta de manera negativa el valor de la absorbancia.

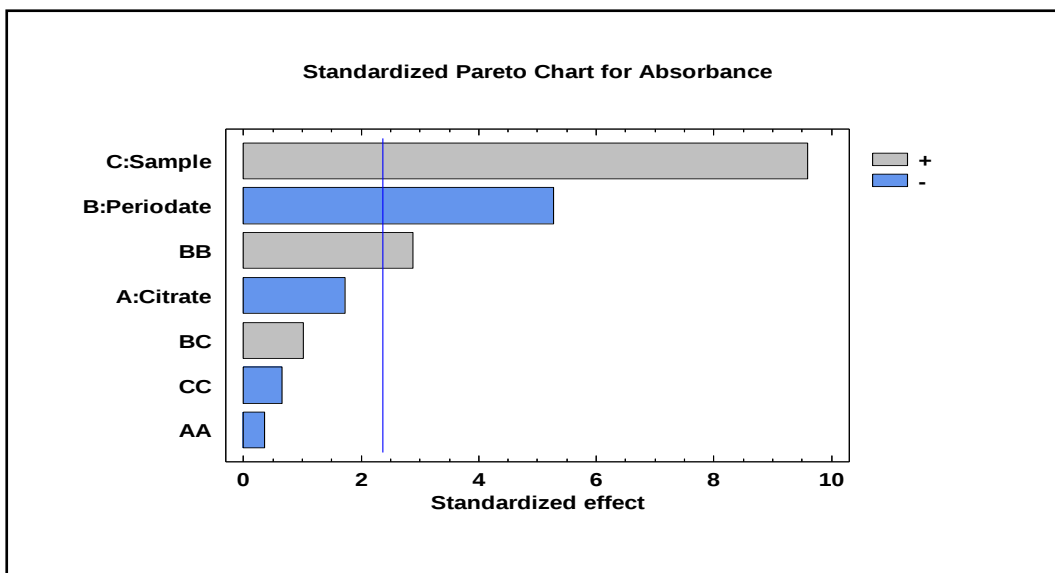


Figura 39. Gráfico de Pareto para el diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.

En el siguiente gráfico (Figura 40) se pueden observar los efectos de las 3 variables y al mostrar una curvatura nos indica que los valores ya no pueden aumentar para mejorar la medición de la absorbancia como se ve en la variable de periodato, pero se observa que no hay curvatura en el valor del volumen de muestra, lo que nos indica que no hay límite para esta variable con los rangos de trabajo que se han propuesto.

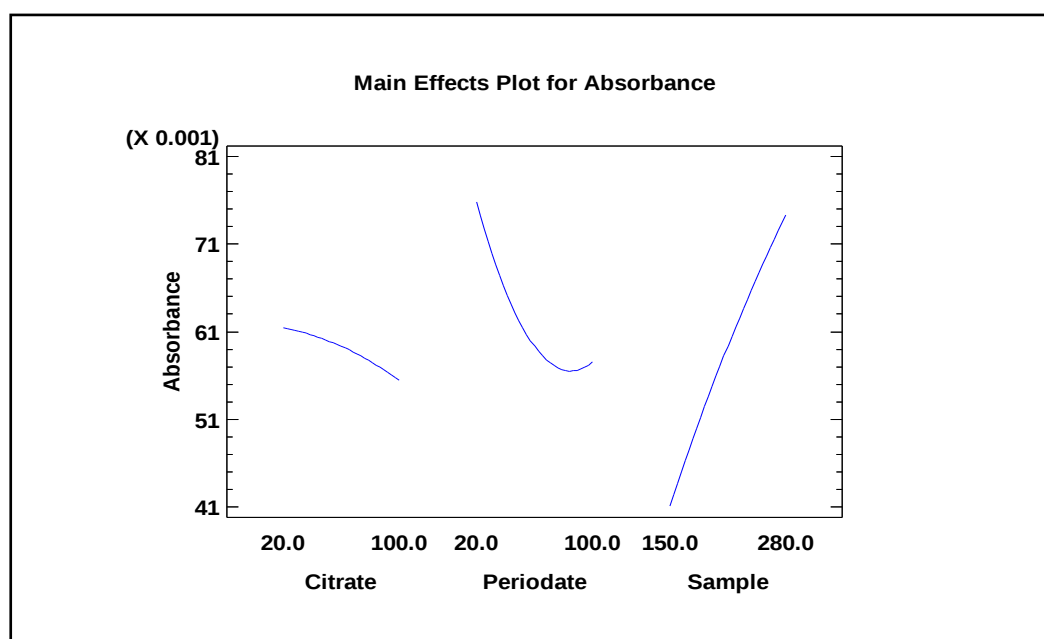


Figura 40. Gráfico de efectos principales para el diseño de Box-Behnken para Mn para SIA

El gráfico de superficie de respuesta (Figura 41) muestra el área más oscura (roja) como la absorbancia máxima e indica los niveles de concentración de los factores a los que el análisis fue más sensible para la oxidación del Mn^{+2} . Se puede ver la interacción entre el periodato y el volumen de muestra que fueron variables influyentes.

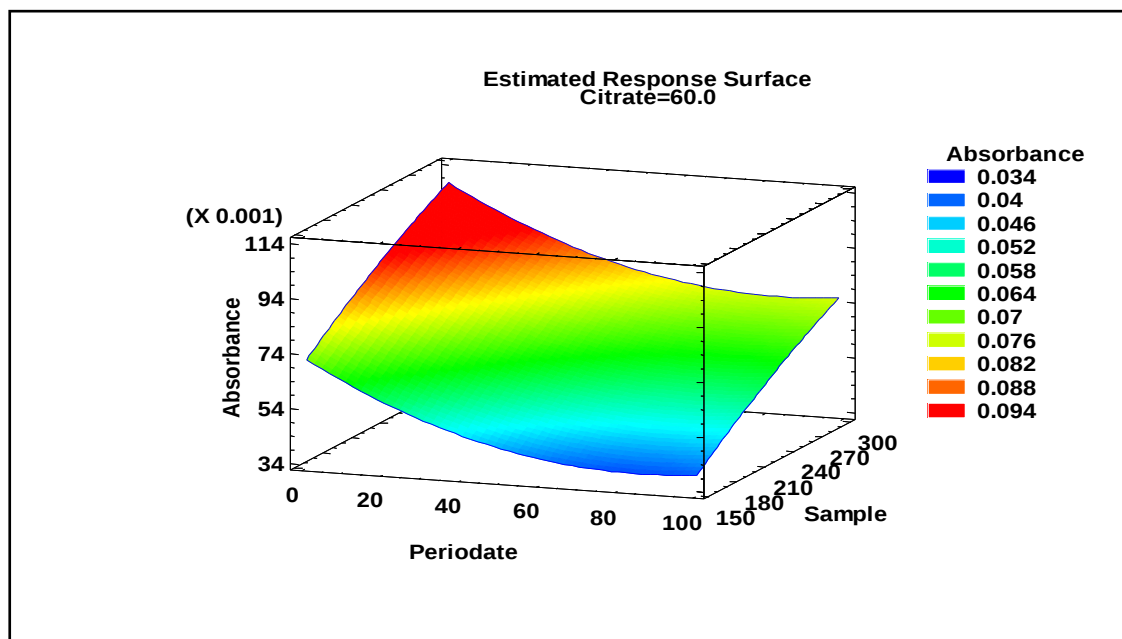


Figura 41. Gráfico de superficie de respuesta para el diseño de Box-Behnken para Mn por SIA

En la Tabla 23 se muestran las combinaciones de niveles de factores que maximizan la absorbancia en la región indicada, considerando los valores altos y bajos de los tres factores.

Tabla 23. Tabla de valores óptimos para el diseño de Box-Behnken para Mn por SIA

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Valor Optimo</i>
Citrate	20.0	100.0	20.0
Periodate	20.0	100.0	20.0
Sample	150.0	280.0	280.0

Segundo Diseño de Box-Behnken para determinación de Mn por SIA

En el diseño Box-Behnken se colocaron las siguientes variables con sus los siguientes rangos de trabajo: citrato (Citrato: 20-80 μL), periodato (Periodate: 200-350 μL), muestra (Sample: 20-80 μL) y velocidad de la bomba (Flow rate: 14 a 24 rpm). Este diseño mostro que se requieren 27 experimentos para las variables seleccionadas los cuales incluyen tres puntos centrales, se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Segundo Diseño de Box-Behnken con 15 experimentos para Mn por SIA.

Experimento	Citrato (μL)	Periodate (μL)	Sample (μL)	Flow rate (rpm)
1	20	350	50	19
2	20	275	50	24
3	80	275	20	19
4	20	275	80	19
5	50	200	20	19
6	80	275	50	14
7	50	275	50	19
8	50	350	20	19
9	50	275	80	14
10	50	275	80	24
11	50	275	50	19
12	20	275	50	14
13	50	200	50	24
14	80	350	50	19
15	50	275	20	14
16	50	275	50	19
17	50	200	80	19
18	80	275	80	19
19	50	200	50	14
20	20	200	50	19
21	80	200	50	19
22	80	275	50	24
23	20	275	20	19
24	50	350	50	24
25	50	275	20	24
26	50	350	80	19
27	50	350	50	14

Análisis de varianza para el segundo diseño de Box-Behnken en la determinación de Mn por SIA

En la Tabla 25 se muestran las variables que influyen en análisis, así como las interacciones entre las variables para el segundo diseño de Box-Behnken, el cual el factor influyente es el volumen de muestra (Sample), el periodate (Periodate) y la interacción cuadrática del periodate (BB) porque su valor de P es menor a 0.05 indicando que tiene significancia estadística.

Tabla 25. Análisis de varianza para la absorbancia para el segundo diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Media de Cuadrados</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Citrate	3.31E-04	1	3.31E-04	1.10	0.3156
B:Sample	3.14E-03	1	3.14E-03	10.40	0.0073
C:Periodate	5.25E-03	1	5.25E-03	17.41	0.0013
D:Flow rate	3.63E-04	1	3.63E-04	1.20	0.2941
AA	24.9E-04	1	24.9E-04	0.83	0.3813
AB	9.00E-06	1	9.00E-06	0.03	0.8657
AC	12.3E-05	1	12.3E-05	0.04	0.8436
AD	21.2E-03	1	21.2E-03	7.02	0.0212
BB	3.17E-04	1	3.17E-04	1.05	0.3255
BC	2.81E-03	1	2.81E-03	9.32	0.0100
BD	6.76E-04	1	6.76E-04	2.24	0.1601
CC	1.12E-04	1	1.12E-04	0.37	0.5535
CD	4.00E-04	1	4.00E-04	1.33	0.2718
DD	6.38E-05	1	6.38E-05	0.21	0.6538
Error total	3.62E-03	12	3.01E-04		
Total (corr.)	1.92E-02	26			

R-cuadrada = **81.1104** porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **59.0725** porciento

Error estándar del est. = **0.0173636**

Error absoluto medio = **0.00894753**

Estadístico Durbin-Watson = 1.68562 (P=0.2383)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.15347

Se muestra el modelo de regresión que se ha estado ajustando a los datos. En la ecuación 9, se omitieron las interacciones de: Citrato-Citrato (AA), Citrato-Muestra (AB), Citrato-Periodato (AC), Muestra-Muestra (BB), Muestra-Velocidad de flujo (BD), Periodato-Periodato (CC), Periodato-Velocidad de flujo (CD) y Velocidad de flujo-

Velocidad de flujo (DD), no existe una estadística diferencia significativa según la tabla 25 de ANOVA. La ecuación del modelo ajustado es:

$$\begin{aligned} \text{*Absorbance} = & -0.0615267 + 0.00405389 \text{* Citrate} + 0.000451778 \text{* Sample} + 0.00312333 \text{* Periodate} - \\ & 0.00355333 \text{* Flow rate} - 0.00000819444 \text{* Citrate * Flowrate} - 0.00000131111 \text{* Sample * Periodate} \end{aligned}$$

(9)

En el diagrama de Pareto muestra los efectos de los parámetros individuales y sus interacciones. Las variables de mayor influencia fue la concentración de periodato y el volumen de muestra, pero el periodato tiene una influencia positiva en la medición de la absorbancia como se puede ver en la Figura 42.

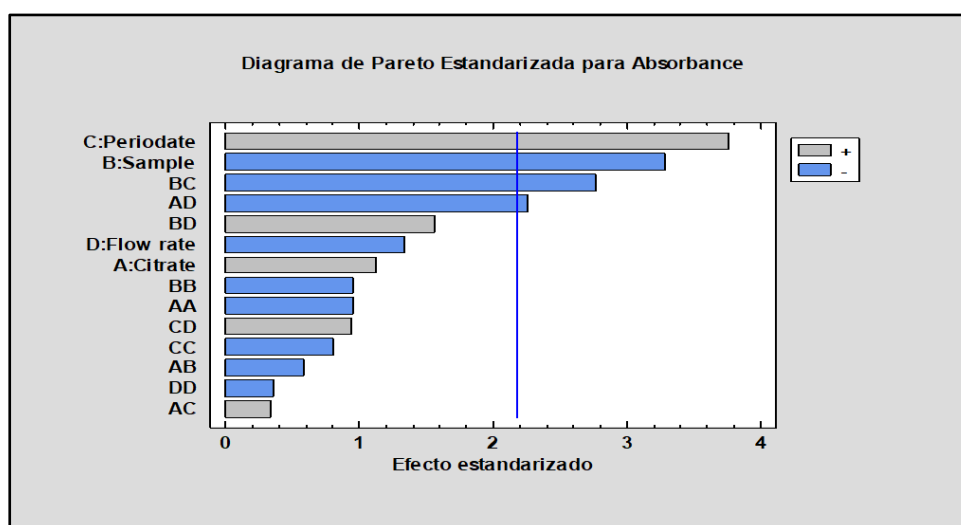


Figura 42. Gráfico de Pareto para el segundo diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.

En el siguiente gráfico (Figura 43) se pueden observar los efectos de las cuatro variables y al mostrar una curvatura nos indica que los valores ya no pueden aumentar para mejorar la medición de la absorbancia. La variable con mayor influencia es la concentración de periodato ya que se requiere mayor volumen para incrementar la absorbancia y así poder ver el límite de esta variable.

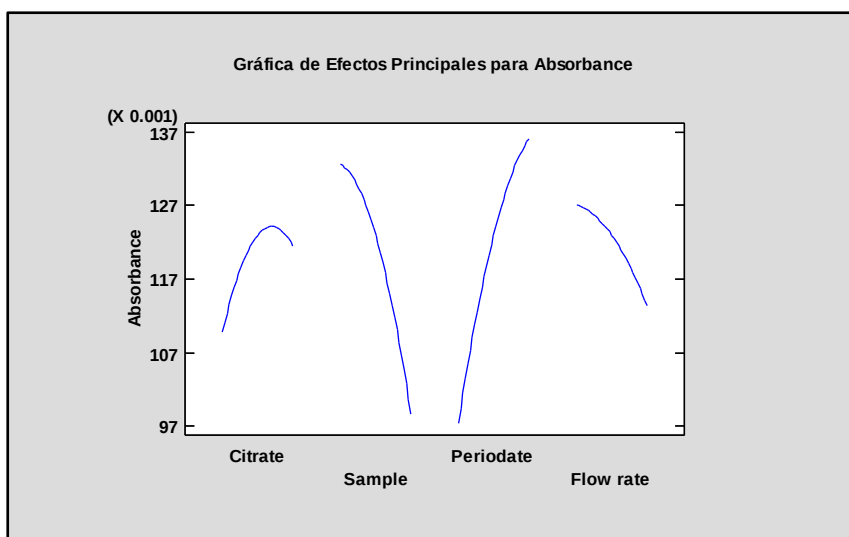


Figura 43. Gráfico de efectos principales para el segundo diseño de Box-Behnken para Mn por SIA.

El gráfico de superficie de respuesta tridimensional obtenido y ajustado con los datos experimentales muestra el área más oscura (roja), refleja la absorbancia máxima e indica los niveles de concentración de los factores a los que el análisis fue más sensible para la oxidación del Mn^{+2} . Se puede ver en la Figura 44 se observa la interacción entre la concentración de periodato y el volumen de muestra que fueron variables influyentes.

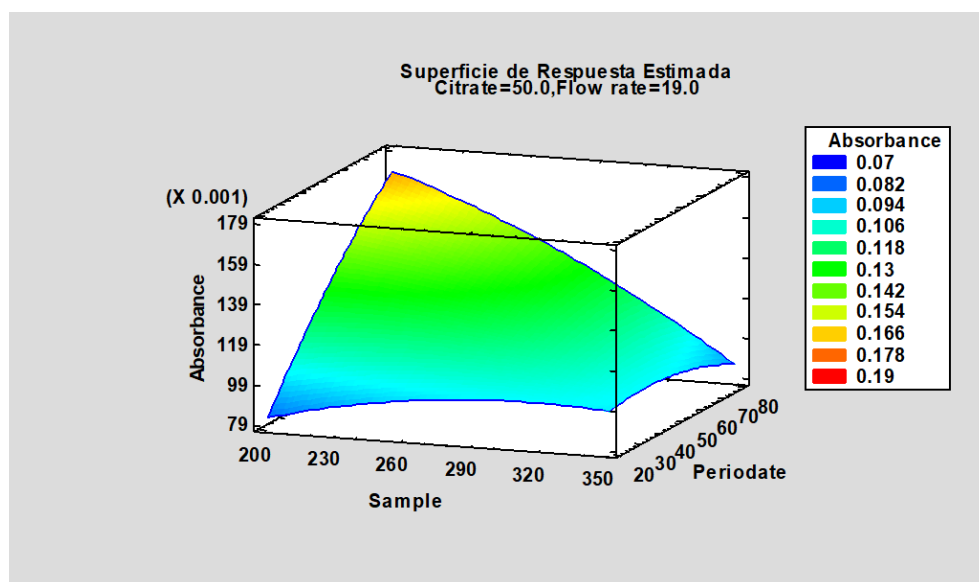


Figura 44. Gráfico de superficie de respuesta para el 2do. diseño de Box-Behnken para Mn por SIA

En la Tabla 26 se muestran las combinaciones de niveles de factores que maximizan la absorbancia en la región indicada, considerando los valores altos y bajos de los cuatro factores.

Tabla 26. Tabla de valores óptimos para el segundo diseño de Box-Behnken para Mn por SIA

Factor	Bajo	Alto	Valor Óptimo
Citrate	20.0	80.0	78.0
Sample	200.0	350.0	200.0
Periodate	20.0	80.0	75.0
Flow rate	14.0	24.0	14.0

Curva de Calibración en la determinación de Mn por SIA

A partir del segundo diseño de Box-Behnken y los valores óptimos obtenidos, se realizó una curva de calibración para la oxidación del Mn^{+2} en un intervalo de 0.5 a 50 mg/L y en la siguiente Figura 45 se muestra el SIagrama obtenido:

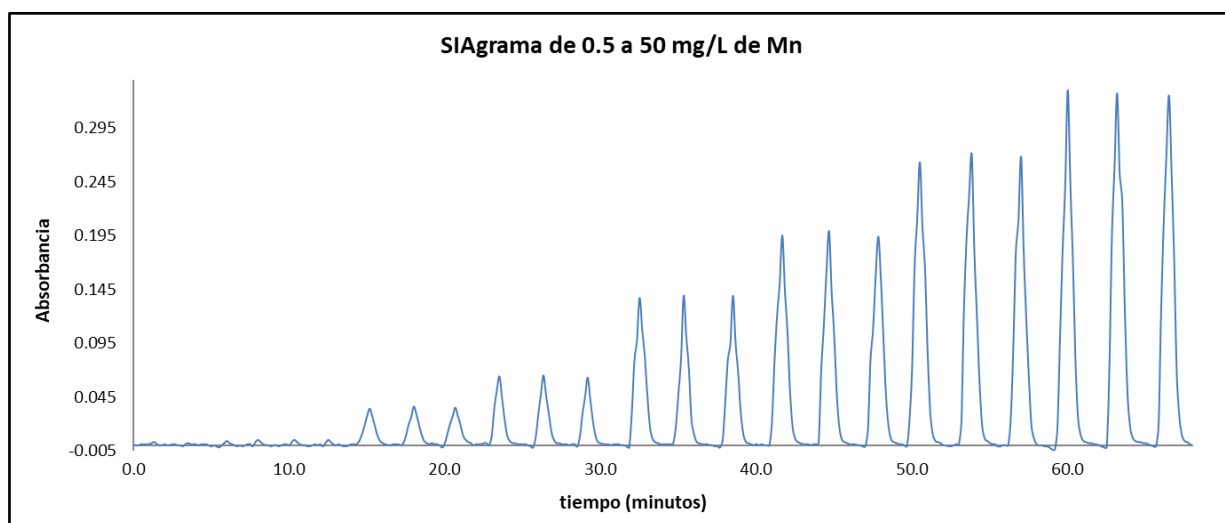


Figura 45. SIagrama de la oxidación del Mn^{+2} de 0.5 a 50 mg/L por SIA

Después se recomienda realizar 3 curvas de calibración en diferentes días, se obtuvo la siguiente curva (Figura 46), ya con las 3 curvas en una sola:

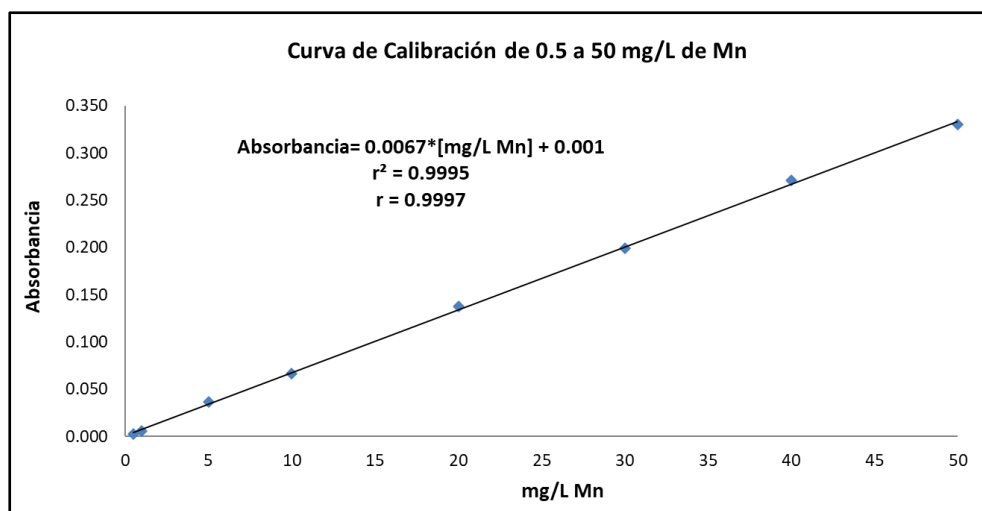


Figura 46. Curva de calibración de 0.5 a 50 mg/L de Mn^{+2} por el método de oxidación con periodato por SIA.

Precisión del método como repetibilidad para la determinación de Mn por SIA

Se aplicó en el método de flujo secuencial la precisión como repetibilidad que ha sido determinante como reproducibilidad en la solución de manganeso estándar, se inyectó un estándar de manganeso de 25 mg/L siete veces por triplicado, y el SIAGrama obtenido se mostró en la Figura 46. La variabilidad analítica se expresó en términos de desviación estándar relativa (% RSD). Para mayor precisión, los valores aceptables de RSD se consideran menores o iguales al 3%. Los porcentajes de concentración encontrados para las soluciones fortificadas estaban en los rangos 99.2 - 100.6%.

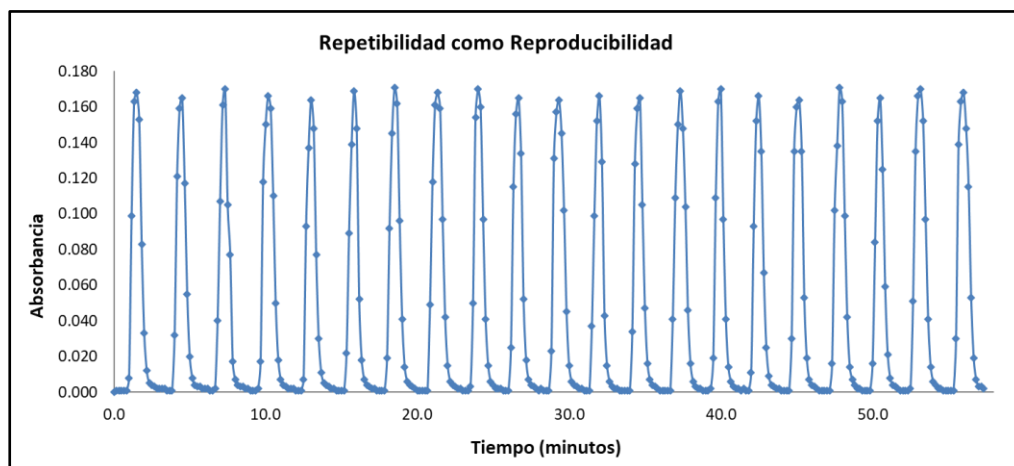


Figura 47. SIAGrama de precisión como repetibilidad para la oxidación de Mn^{+2} .

VIII. ANÁLISIS DE MUESTRAS

8.1 Determinación de Cu en muestras de vino por FIA

El método de análisis por flujo continuo (FIA) propuesto se aplicó en muestras de vinos de diferente denominación de origen (México, Chile e Italia) que tienen cobre en su contenido para ser evaluados mediante el diseño experimental. Se confirmó la efectividad de la nueva técnica de análisis considerando los criterios de precisión y exactitud, los valores calculados de F y t no excedieron los valores teóricos (a un 95% nivel de confianza), lo que indica que no hubo una diferencia significativa entre el estándar agregado y el valor encontrado. Los resultados obtenidos por el método propuesto se compararon estadísticamente con los obtenidos mediante el método estándar de adición, como se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27. Determinación de Cu en vinos por FIA.

Muestra de Vino	Sin estándar (µg/L)	Adición estándar (µg/L)	Valor encontrado ^a (µg/L)	*CV (%)	Recuperación (%)	Distribución t	Distribución F
Blanc of Zinfandel Mexico	64	100	162.3 ± 3.21	2.0	101.0	0.814	0.221
Merlot Central Valley Viña Estefamyar Chilean Red Wine	40	100	141.3 ± 3.21	2.3	99.1	0.651	0.141
Dulzino White Moscato Sweet Wine	80	100	184.0 ± 2.00	1.1	97.8	2.771	2.560
Lambrusco Dulce Amore Rose Italy	62	100	167.0 ± 2.65	1.6	99.4	0.569	0.108

^a Promedio ± desviación estándar (SD), n= 3.

^b Valores críticos del estadígrafo de contraste de la distribución t al 95% de confianza (dist. t = 4.303).

^c Valores críticos del estadígrafo de contraste de la distribución F al 95% de confianza (dist. F=19).

* CV: Coeficiente de variación.

8.2 Determinación de Mn en muestras de vino por FIA

Se determinó con el método optimizado de flujo continuo los diagramas para analizar el manganeso en diferentes presentaciones de vinos de Valle Guadalupe de la compañía vinícola LA CETTO en sus diversas presentaciones de vino tinto y blanco, para luego realizar los análisis correspondientes con la curva de calibración

El método propuesto se evaluó y se aplicó en varias muestras de vinos de Baja California, México, que contienen manganeso. Los resultados obtenidos por el método propuesto se compararon estadísticamente con los obtenidos usando el método de adición estándar, como se muestra en la Tabla 28. Considerando los criterios de precisión y exactitud, los valores calculados de F y t no excedieron los valores teóricos (a un 95% nivel de confianza), lo que indica que no hubo una diferencia significativa entre el estándar agregado y el valor encontrado. Esto confirma la efectividad de la nueva técnica analítica de flujo continuo al determinar contenido de manganeso en diferentes presentaciones de vinos de la región del Valle de Guadalupe de Baja California, México; los resultados se muestran en la Tabla 28:

Tabla 28. Contenido de manganeso en muestras de vino de Baja California.

Vino	Concentración de Mn (mg/L)
Vino Rojo LA Cetto Cabernet Sauvignon 2016 13.5 % Alc. Vol. Cont. Net. 187 mL	2.04
Vino Blanco LA CETTO Blanc of Zinfandel 11.5 % Alc. Vol. Cont. Net. 187 mL	1.24
Vino Rojo LA Cetto Petite Sirah 2016 13.8 % Alc. Vol. Cont. Net. 187 mL	3.13
Vino Blanco LA CETTO Blanc of Blancs 12.0 % Alc. Vol. Cont. Net. 187 mL	0.64

Se evaluó la aplicabilidad del método propuesto mediante el análisis de varias muestras de vinos de la región del Valle de Guadalupe de Baja California, México; que contienen manganeso. Los resultados obtenidos por el método propuesto se compararon estadísticamente con los obtenidos mediante el método estándar de adición, como se muestra en la Tabla 29. Considerando los criterios de precisión y exactitud, los valores F y t calculados no superaron los valores teóricos (al 95% de nivel de confianza), lo que

indica que no hubo diferencia significativa entre el estándar agregado y el valor encontrado. Esto confirma la efectividad de la nueva técnica de análisis.

Tabla 29. Recuperación de Mn agregado al vino por FIA.

Muestra de Vino	Sin estándar (µg/L)	Adición estándar (µg/L)	Valor encontrado ^a (µg/L)	*CV (%)	Recuperación (%)	Distribución t	Distribución F
Vino Rojo Cabernet Sauvignon	2.04	15	17.25 ± 0.31	1.8	101.2	1.046	0.365
Vino Blanco Blanc of Zinfandel	1.24	15	16.15 ± 0.31	1.9	99.4	0.469	0.073
Vino Rojo Petite Sirah	3.13	15	17.81 ± 0.32	1.8	98.2	1.588	0.841
Vino Blanco Blanc of Blancs	0.64	15	15.45 ± 0.39	2.5	98.8	0.805	0.216

^a Promedio ± desviación estándar (SD), n= 3.

^b Valores críticos del estadígrafo de contraste de la distribución t al 95% de confianza (dist. t = 4.303).

^c Valores críticos del estadígrafo de contraste de la distribución F al 95% de confianza (dist. F=19).

* CV: Coeficiente de variación.

IX. CONCLUSIONES

Conclusión del Diseño Factorial Plackett-Burman $2^{6*3/16}$ para Cu por FIA

Mediante el diseño factorial Plackett-Burman $2^{6*3/16}$ se logró la determinación de cobre evaluando la linealidad del método de flujo continuo propuesto, mediante la construcción de curvas de calibración en el intervalo de concentración de 40 a 280 $\mu\text{g/L}$, bajo las condiciones de operación ya optimizadas por el diseño. Las señales analíticas se consideraron para una tendencia lineal entre la altura máxima (unidades de absorbancia) y la concentración de analito.

Conclusión del Diseño Factorial 2^4 para Mn por FIA

Se realizó un diseño factorial 2^4 para establecer las mejores condiciones, en el cual encontramos que el valor de $\text{pH} = 6$ y la longitud del reactor $R_2 = 100 \text{ cm}$, por el método de FIA en la oxidación del ion Mn^{2+} al ion $[\text{MnO}_4]^-$. Las variables como el volumen de inyección y la concentración de periodato no se encuentran definidas, ya que no presentan curvatura de acuerdo a la gráfica de efectos principales (Figura 13), para encontrar su valor óptimo se propuso realizar un diseño factorial de Box-Benken. Adicionalmente anexamos una nueva variable a nuestra matriz de datos para darle seguimiento a la velocidad de la reacción, por tanto, se incluyó la velocidad de flujo.

Conclusión del Diseño Factorial 2^4 para Mn por SIA

El resultado de este diseño nos ayuda a comprender el comportamiento de las variables de trabajo en el sistema de flujo secuencial, pero se puede ver que aún queda por determinar el valor influyente del volumen de la muestra; no se ve un límite por lo que se propone hacer un nuevo diseño cambiando los valores de las variables que pueden afectar el diseño y descartando variables que no afecten el proceso en este caso la velocidad de flujo.

Se propone evaluar los resultados experimentales obtenidos con un segundo diseño factorial de Box-Benken para encontrar los valores óptimos, teniendo la seguridad de que se ha llegado a diseño fiable para proponer posteriormente una estrategia experimental óptima y así mejorar la respuesta del trabajo.

Conclusión del 1er. Diseño Box-Behnken para Mn por SIA

Se puede ver en este segundo diseño de experimentos un nivel de respuesta óptimo para el valor del periodato y el citrato, en el caso de la variable del volumen de muestra se observa que aún no se alcanzado un valor óptimo que nos indique hasta donde es el límite de trabajo ideal para el diseño experimental.

Se propone un tercer diseño de experimentos para mejorar esta respuesta, así como estudiar el efecto de varios factores del diseño sobre la respuesta de la absorbancia y obtener una estrategia de optimización.

Conclusión del 2do. Diseño Box-Behnken para Mn por SIA

Se puede ver en este tercer diseño de experimentos por SIA para manganeso; un nivel de respuesta alto para el valor del periodato y el citrato que serían los más óptimos para trabajar, en el caso de la variable del volumen de muestra se observa que hay un valor bajo ideal para el diseño experimental, ya que en los dos primeros diseños fue el factor más influyente para obtener una mejor absorbancia.

El método de FIA propuesto se aplicó en muestras de vinos de diferente denominación de origen (México, Chile e Italia) para la cuantificación de cobre.

Los métodos propuestos tanto el de FIA como de SIA se aplicaron para determinar la concentración de Mn en varias muestras de vinos de Baja California, México. Se utilizaron diferentes presentaciones de vino tinto y blanco del Valle Guadalupe de la compañía vinícola LA CETTO.

Encontramos que todos los vinos se encuentran dentro de los parámetros establecidos o sugeridos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino.

X. REFERENCIAS

- Ganranoo, L., Chokchaisiri, R., & Grudpan, K. (2019). Simple simultaneous determination of iron and manganese by sequential injection spectrophotometry using astilbin extracted from Smilax china L. root. *Talanta*, 307-312.
- Perez Huachaca, W., & López-Gonzales, J. L. (2017). Application of a Factorial design in the Rímac River Turbidity Removal by Coagulation and Flocculation using Tara Gum. *Revista de Investigación Ciencia, Tecnología y Desarrollo*, 3(1), 1-11.
- Zoroddu, M., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., & Nurchi, V. (2019). The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 120-129.
- A. Clark, N. Kontoudakis, C. Barril, & L.M. Schmidtke. (2016). Measurement of Labile Copper in Wine by Medium Exchange Stripping Potentiometry Utilising Screen Printed Carbon Electrodes. *154*, 431-447.
- Anastos, N., Barnett, N., Hindson, B., Lenehan, C., & Lewis, S. (2004). Comparison of soluble manganese(IV) and acidic potassium permanganate chemiluminescence detection using flow injection and sequential injection analysis for the determination of ascorbic acid in Vitamin C tablets. *Talanta*, 130-134.
- Ayala Quezada, A. (2010). Sistema de análisis por inyección secuencial para el monitoreo automatizado de nitrito, nitrato y sulfato en aguas. *Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S.C.* , 1-71.
- Azevedo Lemos, V., Xavier Baliza, P., Lago de Carvalho, A., Vasconcelos Oliveira, R., Gomes Teixeira, L., & Almeida Bezerra, M. (2008). Development of a new sequential injection in-line cloud point extraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of manganese in food samples. *Talanta*, 388-393.
- Cañizares Macías, M. (2002). Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 46(2), 167-174.
- Carrillo Cedillo, E., Cañizares Macías, M., Ames López, A., & Sepúlveda Marqués, R. (2016). Aplicación de Diseño Factorial Plackett-Burman en la Optimización de Parámetros para Determinar Cobre. *Aportaciones Científicas en Química Analítica. XXIX Congreso Nacional de Química Analítica*, 464-469.
- Chen, H., Yang, J., Deng, X., Lei, Y., Xie, S., Guo, S., & Xu, T. (2020). Foliar-sprayed manganese sulfate improves flavonoid content in grape berry skin of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) growing on alkaline soil and wine chromatic characteristics. *Food Chemistry*, 1-11.
- Consenso de la Sociedad Española de Nutrición. (2013). Vino. *Bebidas*, 1-2.

- Cortés Carvajal, P. D. (2013). Diseños Factoriales Fraccionarios y Metodología del Diseño Robusto de Parámetros. *Universidad de Granada: Departamento de Estadística e Investigación Operativa*, 1-123.
- Cruz-de Aquino, M., Martínez-Peniche, R., Becerril-Román, A., & Chávaro-Ortiz, M. (2012). PHYSICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF RED WINES PRODUCED IN QUERÉTARO. *Fitotec*, 35(5), 61-67.
- Domagni, K., Hedayat, A., & Sinha, B. (2021). On the nature of saturated 2k- factorial designs for unbiased estimation of non-negligible parameters. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 33-40.
- EFE. (abril de 2018). *Vino tinto y frutos rojos pueden ayudar en lucha contra enfermedades mentales*. Recuperado el agosto de 2020, de <https://elnuevodiario.com.do/vino-tinto-y-frutos-rojos-pueden-ayudar-en-lucha-contra-enfermedades-mentales/>
- Fabjanowicz, M., & Plotka-Wasyłka, J. (2021). Metals and metal-binding ligands in wine: Analytical challenges in identification. *Trends in Food Science & Technology*, 382-390.
- FEUM, C. (2011). Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *México: Secretaría de Salud*.
- García Sarasola, P. (2018). Optimización de un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA) multisensor totalmente automatizado. *Universitat Politècnica de Catalunya*, 1-105.
- García, M., Soberón, E., Cortés, M., Rodríguez, R., Herrera, J., & Alcántara, A. (2002). Guía de Validación de Métodos Analíticos. *Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos*.
- Gutiérrez Pulido, H., & Vara Salazar, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda ed.). McGraw-Hill Interamericana.
- Hansen, E., & Miró, M. (2007). How flow injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses. (26), 18-26.
- Ishii & Koh, & Bunseki Kagatu. (1979). 28(473).
- Kontoudakis, N., Guo, A., Scollary, G., & Clark, A. (2017). The impact of aging wine in high and low oxygen conditions on the fractionation of Cu and Fe in Chardonnay wine. *Food Chemistry*, 229, 319-328.
- Kontoudakis, N., Leigh, M., Marlize, Z., Mark, S., & Smith, P. (2019). Analytical strategies for the measurement of different forms of Cu and Fe in wine: Comparison between approaches in relation to wine composition. *Food Chemistry*(274), 89-99.
- Lai, Z., Lin, F., Qiu, L., Wang, Y., Chen, X., & Hu, H. (2020). Development of a sequential injection analysis device and its application for the determination of Mn(II) in water. *Talanta*, 1-7.
- Lasanta Melero, C. (2009). Estudio y aplicación de nuevos procesos para la mejora de la elaboración de vinos tintos en zonas de clima cálido. *Universidad de Cádiz*, 1-304.

- Maya, F., Estela, J., & Cerda, V. (2010). Flow analysis techniques as effective tools for the improved environmental analysis of organic compounds expressed as total indices. *EL Sevier*(81), 1-8.
- Mehlig, J. (1939). Colorimetric Determination of Manganese with Periodate. *Industrial & Engineering Chemistry*, 11(5), 274-278.
- Miranda Galeana, A. (abril de 2020). *El Vino: Jugo Divino*. Recuperado el 25 de agosto de 2020, de http://www.fondovitivinicola.com.ar/upload_file/8b75ddc52198a6b547f16c6a426306d7.pdf
- Miranda-Ackerman, M., & García-Lechuga, A. (2020). An Overview of the Design of Experiment Workflow: Applications in Food Production Systems. *I. Global: Design of Experiments for Chemical, Pharmaceutical, Food and Industrial Applications*, 204.
- Molina García, L. (18 de mayo de 2012). Análisis de principios activos y constituyentes naturales o contaminantes de alimentos mediante sensores luminiscentes en flujo. 246.
- Moreira , M., Balestrassi, P., Paiva, A., Ribeiro, P., & Bonatto, B. (2021). Design of experiments using artificial neural network ensemble for photovoltaic generation forecasting. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 1-14.
- NOM-199-SCFI-2017. (2017). Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. *Norma Oficial Mexicana, Diario Oficial de la Federeación*, 1-37.
- Pérez-Alvarez, E., García , R., Barrulas, P., Diaz, C., & Cabrita, M. (2019). Classification of wines according to several factors by ICP-MS multi-element analysis. *Food Chemistry*, 270, 273-280.
- Perez-Olmos, R., Soto, J., Zarate, N., Araujo, A., Lima, J., & Saraiva, M. (2005). Application of sequential injection analysis (SIA) to food analysis. *Food Chemistry*, 471-490.
- Quinlan, K., & Lin, D. (2015). Run order considerations for Plackett and Burman designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 56-62.
- Riera Palmero, J. (2014). WINE AND CULTURE . *ANALES DE LA REAL ACADEMIA DE MEDICINA Y CIRUGÍA DE VALLADOLID* , 201-240.
- Salman, M., Shahid, M., Sahar, T., Naheed, S., Rahman, M., Arif, M., . . . Nazir, A. (2020). Development of regression model for bacteriocin production from local isolate of *Lactobacillus acidophilus* MS1 using Box-Behnken design . *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* , 101542.
- Sanchez-Gallegos, G., & Carrillo-Cedillo, E. (2016). Determinacion de cobre por analisis de inyeccion en flujo en procesos de galvanoplastia. *UABC*, 1-88.
- Shen, L., & Morris, M. (2016). Augmented Plackett–Burman designs with replication and improved bias properties. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 15-21.

- Skoog, D., Holler, F., & Nieman, T. (2001). *Principios de Análisis Instrumental* (Quinta ed.). Madrid, España: Mc Graw Hill.
- Slideshare. (2018). *Compuestos de coordinación*. Recuperado el 20 de Junio de 2020, de <https://es.slideshare.net/mnilco/compuestos-de-cordinadinacion-2>
- Staden, J., Mulaudzi, L., & Stefan, R. (2003). Speciation of Mn(II) and Mn(VII) by on-line spectrophotometric sequential injection analysis. *Analytica Chimica Acta*, 129-137.
- Tabata, M., & Morita, H. (1997). Spectrophotometric determination of a nanomolar amount of ascorbic acid using its catalytic effect on copper (II) porphyrin formation. *Talanta*(44), 151-157.
- TecnoStats.net. (2016). *Diseños factoriales 2k sin réplicas*. Recuperado el 14 de Julio de 2020, de http://riotorto.users.sourceforge.net/R/doe_2ksin/index.html
- Training, C. (25 de agosto de 2020). ¿Dónde estudiar enología? Todas las opciones formativas.
- Trinklein, T., Thapa, M., Lanphere, L., Frost, J., Koresch, S., & Aldstadt III, J. (2021). Sequential injection analysis coupled to on-line benchtop proton NMR: Method development and application to the determination of synthetic cathinones in seized drug samples. *Talanta*, 231, 2-3.
- Unal, F., & Kaya, F. (2020). Modelling of relation between synthesis parameters and average crystallite size of Yb₂O₃ nanoparticles using Box-Behnken design. *Ceramics International*, 1-9.
- Vecchio, R., Decordi, G., Gresillon, L., Gugenberger, C., Maheo, M., & Jourjon, F. (2017). European consumers' perception of moderate wine consumption on health. *Science Direct*, 14-22.
- Vitali Čepo, D., Pelajić, M., Vinković Vrček, I., Krivohlavek, A., Žuntar, I., & Karoglan, M. (2018). Differences in the levels of pesticides, metals, sulphites and ochratoxin A between organically and conventionally produced wines. *Food Chemistry*, 394-403.
- X. Sun, T. Ma, J. Yu, W. Huan, Y. Fang, & J. Zhan. (2018). Investigation of the Copper Contents in Vineyard Soil, Grape Must and Wine and the Relationship Among them in the Huaizhuo Basin Region. En *China: A preliminary study* (Vol. 241, págs. 40-50).
- Youngvises, N., Suwannasaroj, K., Jakmunee, J., & AlSuhaimi, A. (2017). Multi-reverse flow injection analysis integrated with multi-optical sensor for simultaneous determination of Mn(II), Fe(II), Cu(II) and Fe (III) in natural waters. *Talanta*, 369-374.
- Zoroddu, M., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., & Nurchi, V. (2019). The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 120-129.

Chapter 8

Optimization of a Spectrophotometric Flow Injection: Method for Determination Copper and Manganese in Wines by Design Experiments

Germán Adán Sánchez Gallegos

Universidad Autónoma de Baja California, México

Maria del Pilar Haro Vazquez

Universidad Autónoma de Baja California, Mexico

José Manuel Cornejo-Bravo

 <https://orcid.org/0000-0002-0013-8937>

Universidad Autónoma de Baja California, Mexico

Eugenia Gabriela Carrillo-Cedillo

 <https://orcid.org/0000-0003-4239-5904>

Universidad Autónoma de Baja California, Mexico

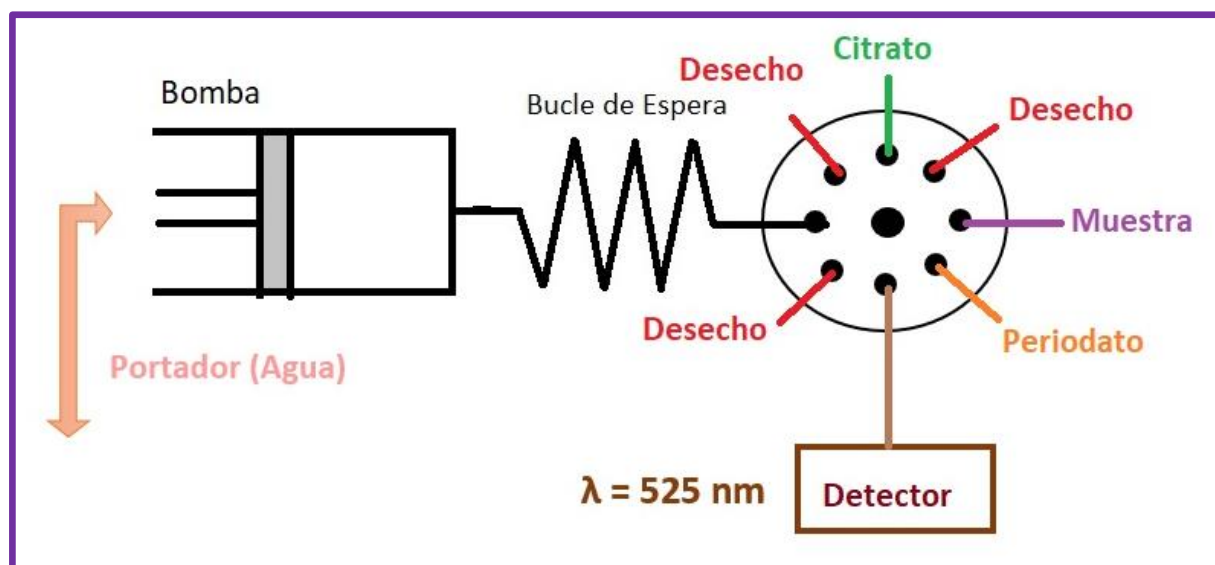
ABSTRACT

This chapter presents the optimization of the hydrodynamic and chemical parameters of the FIA system in the determination of copper and manganese in wine samples by VIS spectrophotometry. This technique has been based on the injection of liquid samples in the non-segmented movement, within a continuous carrier current of a suitable liquid. The injected sample forms a zone that disperses on its way to a detector. The later continuously records the absorbance or other physical parameters, since it continuously passes the sample material through the flow cell, using the factorial designs Plackett-Burman, Box-Behnken, and the factorial design 2^4 . The methods have the advantages of low-cost, easy availability of chemicals, and instrumentation and straightforward application to real samples.

DOI: 10.4018/978-1-7998-1518-1.ch008

Aplicación de análisis por inyección secuencial en la determinación de manganeso en vino de Baja California

Application of analysis by sequential injection in the determination of manganese in wine from Baja California



Fuente: Elaboración propia

Germán Adán Sánchez-Gallegos, Eugenia Gabriela Carrillo-Cedillo*,
María del Pilar Haro-Vázquez

Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería
Calzada Universidad No.14418 Parque Industrial Internacional
C.P 22390, Tijuana B.C. México.

*Correspondencia para autor: Eugenia Gabriela Carrillo Cedillo
Universidad Autónoma de Baja California
Correo electrónico: gaby@uabc.edu.mx