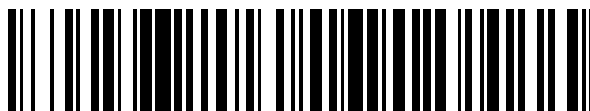


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 171**

51 Int. Cl.:

<b>G01N 21/25</b>	(2006.01)
<b>G01N 21/77</b>	(2006.01)
<b>G01N 21/78</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/18</b>	(2006.01)
<b>G01N 31/22</b>	(2006.01)
<b>G01N 21/80</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2011 PCT/AU2011/000511**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11137484**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2011 E 11777024 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2567215**

54 Título: **Procedimiento analítico colorimétrico**

30 Prioridad:

**05.05.2010 AU 2010901916**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**27.06.2018**

73 Titular/es:

**AQUALYSIS PTY. LTD. (100.0%)  
25 Bennison Street  
Ascot QLD 4007, AU**

72 Inventor/es:

**DAVIS, STEPHEN CHARLES y  
PETTY, JOHN DAVID**

74 Agente/Representante:

**LÓPEZ CAMBA, María Emilia**

ES 2 674 171 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento analítico colorimétrico

5 La presente invención se refiere a reactivos para su uso en la medición colorimétrica de un analito en muestras de líquido, especialmente para análisis de agua, y a un procedimiento de control para regular dichos reactivos cuando se lleva a cabo el análisis. La invención resulta adecuada para analitos en agua medidos comúnmente tales como, entre otros, cloro libre (u otros agentes oxidantes), alcalinidad total, dureza cálcica y pH. Si bien los reactivos y el procedimiento descritos en la presente memoria resultan especialmente adecuados para el análisis en línea, se pueden utilizar con instrumentos de laboratorio, instrumentos portátiles y similares.

#### Antecedentes de la invención

15 Aunque se ha experimentado con una serie de compuestos para medir el cloro libre, la medición del cloro libre en agua en que tiene en cuenta la formación o pérdida de especies coloreadas se ha venido determinando desde hace tiempo mediante tres procedimientos principales:

- 20 (1) valorimetría en la que el cloro libre reacciona estequiométricamente con un agente reductor tal como el ion ferroso hasta un punto final utilizando un indicador de redox tal como *N-N*-dietil-*p*-fenilendiamina (DPD).  
 (2) colorimetría en la que un exceso de un reactivo incoloro reacciona con cloro libre para producir un producto de reacción coloreado proporcional a la concentración de cloro libre. Por ejemplo, la DPD reacciona con el cloro libre para producir un color rosa.  
 (3) decoloración de naranja de metilo.

25 Las reacciones en las que se observa la producción o pérdida de color se pueden monitorizar con precisión midiendo la absorción en una o más longitudes de onda.

El procedimiento (1) tiene el inconveniente de que una solución diluida de ion ferroso se oxida fácilmente por el oxígeno disuelto. Para ello, es necesario utilizar nuevo valorante. Además, a las concentraciones de cloro libre medidas comúnmente de entre 0-5 ppm, el punto final no es muy definido.

30 La DPD, el reactivo más popular del procedimiento (2) resulta nocivo para la salud. En forma sólida puede resultar fatal si es absorbido a través de la piel (ref.: MSDS Oxford University). Este riesgo se reduce para la DPD en disolución, pero es motivo de preocupación cuando un analizador en línea para piscinas o bañeras de hidromasaje utiliza un depósito de DPD. Si el analizador se avería y se vierte una cantidad considerable de DPD en el agua, la salud de los bañistas podría verse afectada, especialmente en el caso de pequeños cuerpos de agua, como el de una bañera de hidromasaje.

40 El naranja de metilo también resulta nocivo para la salud. Los procedimientos de decoloración pueden llegar a medir un intervalo más amplio de concentraciones de cloro, pero se debe añadir la suficiente cantidad del compuesto que se esté decolorando para asegurarse de que reacciona todo el cloro libre presente. También es necesario conocer el volumen que se ha añadido con el fin de calcular la concentración del cloro libre.

45 Debido a que los analizadores en línea que emplean procedimientos colorimétricos consumen parte del cuerpo de agua que miden, se puede producir una pérdida considerable de agua a lo largo del tiempo si la mezcla reactivo/agua se desecha. Este hecho es indeseable en zonas en las que el ahorro de agua es primordial. Además, se debe tener en cuenta la eliminación segura de las mezclas reactivo/muestra usadas.

50 Muchos de los procedimientos de la técnica anterior contemplan el empleo de varios reactivos diferentes que se suministran desde diferentes depósitos de reactivo. Esto requiere un aparato de medición complejo y caro. Por ejemplo, el procedimiento estándar para la medición de cloro libre emplea diferentes soluciones de DPD y un tampón.

55 En la patente europea 762120, se describe un procedimiento de determinación del contenido de cloro mediante un indicador de bencidina que forma una sustancia colorante al reaccionar con el cloro.

En la patente de EE. UU. 4092115, se describe el uso de un indicador de acina para el análisis del cloro.

60 En la patente de EE. UU. 7441472, se describe un procedimiento y un dispositivo para medir el contenido de cloro en piscinas.

En la patente de EE. UU. 7491546, se describe un procedimiento sin necesidad de contacto para el análisis del cloro.

5 En el documento WO2008061315, del presente solicitante, se describe un aparato y un procedimiento para determinar el contenido de cloro en una piscina. En el procedimiento con DPD del documento US2006/073603 A1, el reactivo es efectivamente incoloro y se produce un producto de reacción coloreado. En este caso, es necesario añadir la DPD en exceso para garantizar que haya una cantidad suficiente disponible para reaccionar con todo el cloro libre. En el procedimiento del documento JPS6190059 A, la adición de un colorante inerte a un agente formador de color mejora la discriminación visual. De este modo, el colorante no participa en la reacción.

10 En la presente invención, el reactivo para la medición de cloro libre no resulta nocivo para la salud y se puede verter sin problemas en el agua usada para beber o para nadar, por lo que permite reciclar las mezclas de reactivo/muestra de cloro libre usadas y devolverlas al cuerpo de agua que se está midiendo, con el fin de ahorrar agua.

15 Se proporciona un reactivo concentrado para minimizar el consumo de reactivo y para que la adición del reactivo al volumen fijo de muestra provoque una dilución insignificante de la muestra. La invención también tiene por objeto el uso de reactivos únicos en los cuales todos los componentes requeridos coexistan de manera estable para simplificar el sistema de suministro, y para aumentar la velocidad del procedimiento utilizando un único volumen inyectado, en lugar de un proceso de volumetría en el que se requieren múltiples inyecciones. El objeto de la invención consiste en permitir mediciones precisas de cloro libre a lo largo de un amplio intervalo de concentración sin necesidad de diluir la muestra, normalmente 0 - 25 ppm.

### 20 **Breve descripción de la invención**

25 La presente invención proporciona un procedimiento analítico colorimétrico de acuerdo con la reivindicación 1 para determinar la concentración de agentes oxidantes tales como el cloro libre en una muestra de líquido, mediante el cual, se produce una reacción del agente oxidante con dicho colorante alimentario.

30 Este procedimiento también se puede aplicar a métodos analíticos por vía húmeda de la técnica anterior para otros análisis tales como la conocida medición del pH mediante un indicador de rojo de fenol, y análisis volumétricos para la alcalinidad total y la dureza.

35 En el caso de la medición de cloro libre, la presente invención se basa en la comprensión de que ciertos colorantes alimentarios autorizados por la agencia estadounidense de control de alimentos y fármacos (FDA por sus siglas en inglés) se pueden decolorar mediante cloro libre, o son capaces de actuar como indicadores redox, de manera que el colorante original reacciona con el cloro libre para dar un producto coloreado que posee un espectro de absorción considerablemente diferente al del colorante original. Para que la reacción se produzca con rapidez, la solución se debe acidificar. El uso de un reactivo basado en sustancias autorizadas para su uso en alimentos garantiza que el reactivo es completamente seguro y que incluso se puede devolver al agua potable.

40 Mientras que varios colorantes alimentarios comunes, tales como la cochinilla, se pueden decolorar con cloro libre, el azul brillante FCF (código de colorante alimentario E133) actúa como un indicador redox. La reacción con el cloro libre produce un producto de reacción estable amarillento. A diferencia de la reacción de decoloración, en la que el producto es incoloro, un indicador redox presenta la ventaja de que, además de la pérdida del colorante original, o como alternativa, se puede medir el producto de reacción, si es coloreado. La reacción entre el azul brillante FCF y el cloro libre se lleva a cabo idealmente en el intervalo de pH 1,5 - 2,5, en el que la reacción es instantánea y completa. Se ha descubierto en la práctica que la reacción con cloro combinado se produce, pero de manera mucho más lenta, similar al caso de la DPD. A diferencia de la DPD, la solución de azul brillante FCF permanece estable indefinidamente al aire. La reacción no se ve afectada por el calcio u otras trazas metálicas, ni por la alcalinidad total, siempre que la solución se acidifique o tampona hasta un nivel inferior a un pH máximo (por ejemplo, 2,8).

50 Otros ejemplos de colorantes sintéticos autorizados para uso alimentario son: indigotina, verde rápido FCF, rojo allura AC, eritrosina, tartracina y amarillo ocaso FCF. Otros ejemplos de colorantes alimentarios naturales son: colorante de caramelo, anato, betanina, cúrcuma, azafrán, pimentón y zumo de baya de saúco.

55 La invención también incorpora uno de los colorantes mencionados anteriormente u otro colorante o especie coloreada que se decolore o actúe como indicador redox con agentes oxidantes tales como el cloro libre, en un sistema de medición en el que la cantidad de reactivo añadida se puede cuantificar y regular con precisión. Esto resulta especialmente útil en un analizador en línea que monitoriza de forma continua el nivel de cloro libre.

60 En el procedimiento con DPD de la técnica anterior, el reactivo es efectivamente incoloro y se produce un producto de reacción coloreado. En este caso, es necesario añadir la DPD en exceso para garantizar que haya una cantidad suficiente disponible para reaccionar con todo el cloro libre. En el procedimiento de la presente invención, el reactivo es coloreado y la reacción elimina el color del reactivo, o bien transforma parte del reactivo para obtener un color diferente. En cualquier caso, al igual que en la reacción con la DPD, el reactivo se debe añadir en exceso para

asegurarse de que haya reaccionado todo el cloro libre de la muestra.

En el caso en el que el reactivo se decolora para dar lugar a un producto incoloro, la concentración del cloro libre se determina a partir de una pérdida de color. La presencia del color del reactivo indica que hay un exceso de reactivo presente, y para calcular la pérdida de color (y, por tanto, la cantidad de cloro libre) se debe conocer con precisión la cantidad original de reactivo añadida. Se puede añadir una cantidad fija de reactivo, pero debería contener suficiente reactivo para cubrir el intervalo de concentración de cloro libre que interese. Esta estrategia presenta dos inconvenientes principales. En primer lugar, se desperdiciará reactivo; el uso más económico del reactivo consistiría en utilizar únicamente un pequeño exceso con respecto a la cantidad necesaria para reaccionar con la concentración de cloro libre presente. En segundo lugar, a concentraciones muy bajas de cloro libre, la mayor parte del reactivo quedará sin reaccionar y habrá un límite para la cantidad de color de reactivo que se puede medir y, por tanto, habrá un intervalo limitado de concentración que se pueda medir añadiendo un volumen fijo de reactivo. Si se conoce el volumen añadido, se puede regular de manera que se añada únicamente un pequeño exceso con respecto a la cantidad necesaria, y se pueden medir intervalos de concentración más amplios.

En el caso en el que el reactivo se oxida para dar lugar a un producto coloreado diferente, debe quedar parte del reactivo tras la reacción para garantizar que se ha añadido lo suficiente, y la concentración de cloro libre se puede calcular a partir de la cantidad de producto coloreado. De nuevo, se puede añadir un volumen fijo de reactivo suficiente para cubrir el intervalo de cloro libre que interese. En este caso, no es necesario conocer el volumen añadido con tanta precisión, ya que el cloro libre se calcula a partir del producto formado y solo es necesario tener un exceso de reactivo, como indica la presencia de reactivo sin reaccionar. No obstante, nuevamente, no es este el uso más económico de reactivo y sería mejor regular el volumen añadido. En la práctica, generalmente también se dará el caso de que exista un cierto grado de solapamiento de los espectros de absorción del reactivo y el producto de oxidación coloreado y será necesario hallar la cantidad de reactivo presente para realizar las correcciones apropiadas a la hora de calcular las concentraciones de cloro libre.

En otro aspecto, la presente invención contempla la provisión de reactivos únicos con un algoritmo de control para regular el volumen de reactivo añadido a un volumen fijo de muestra para dar un exceso escogido de reactivo más allá de lo necesario para reaccionar estequiométricamente con el analito diana presente en el agua. No obstante, se observará que los reactivos descritos también se pueden aplicar en kits de ensayo manuales u otra instrumentación fuera de línea, y que el algoritmo de control descrito se puede aplicar a otros analizadores en línea que utilizan más de una solución reactiva. Un sistema de control para determinar la concentración de cloro libre cuando un colorante se oxida para dar lugar a un producto incoloro o coloreado se basa en el conocimiento o la obtención del volumen de reactivo añadido y la cantidad de reactivo que queda en exceso tras la reacción. El volumen añadido se puede conocer, por ejemplo, a partir de un mecanismo de dosificación preciso (como una bomba de jeringa u otro dispositivo de suministro) o se puede hallar, por ejemplo, a partir de mediciones ópticas.

En un procedimiento, las etapas incluyen:

- Adición de una cantidad de reactivo concentrado que contiene una concentración conocida del compuesto reactivo a una muestra de agua que se va a analizar en un primer ciclo de análisis.
- Mezcla de dicho reactivo y dicha muestra de agua para formar una solución.
- Medición de la absorbancia de la solución a 2 o más longitudes de onda.
- Determinación, a partir de dichas mediciones de absorbancia, de las concentraciones presentes en la solución de compuesto reactivo sin reaccionar y de producto de reacción.
- Si hay presencia de reactivo sin reaccionar, determinación de la concentración del analito diana presente en la solución a partir de la concentración del producto de reacción.
- Determinación de una concentración "total" de reactivo en la solución (definida como la concentración total de reactivo si no se diera la conversión en producto) a partir de la concentración sin reaccionar, la concentración del producto y la estequiometría de la reacción que produce el producto de reacción a partir del reactivo.
- Determinación de un nuevo volumen  $V_{nuevo}$  a añadir para producir un nivel escogido de exceso de reactivo por encima del necesario para la reacción con la concentración de analito en la muestra de agua.
- Regulación del sistema de suministro para suministrar  $V_{nuevo}$  en un posterior ciclo de análisis.

Un procedimiento alternativo incluye:

- Adición al reactivo de un compuesto coloreado (referencia) que no participa en la reacción y que posee un espectro de absorción considerablemente diferente al de otros compuestos del reactivo y a productos formados cuando se añade a la muestra de agua, y en la que el compuesto de referencia está presente en el reactivo en una relación de concentración conocida con respecto a un compuesto reactivo del reactivo, de manera que la concentración del compuesto reactivo se puede expresar como algún factor  $F$  multiplicado por la concentración del compuesto de referencia.
- Adición de reactivo a la muestra de agua que se está analizando.

- Mezcla de dicho reactivo y dicha muestra de agua para formar una solución.
- Medición de la absorbancia de la solución resultante a 2 o más longitudes de onda.
- Determinación, a partir de dichas mediciones de absorbancia, de la concentración en la solución del compuesto de referencia [ref] y, por tanto, de la concentración de reactivo añadido como  $F \times [ref]$ .
- 5 - Si la concentración del reactivo se considera suficiente para proporcionar un exceso para el intervalo de concentración de analito que interese, determinación de la concentración del analito en la solución a partir de la absorbancia medida.
- Determinación del volumen V de reactivo añadido a partir de la concentración de referencia, la concentración de referencia conocida en el reactivo y el volumen de la cámara de análisis (CV).
- 10 - Determinación de un nuevo volumen  $V_{nuevo}$  a añadir para producir un exceso escogido de reactivo.
- Regulación del sistema de suministro para suministrar  $V_{nuevo}$  en un posterior ciclo de análisis.

Los reactivos y el procedimiento descritos en la presente memoria resultan especialmente adecuados para su uso con el aparato y el procedimiento descritos anteriormente en la solicitud de patente previa WO2008061315 del presente solicitante, pero se puede usar con otro aparato. Se ha escogido el cloro libre como ejemplo de análisis únicamente con fines ilustrativos, pero se entenderá que los principios descritos en la invención se pueden aplicar enteramente o en parte en otros análisis. Un ejemplo también proporciona un procedimiento óptico de análisis de la alcalinidad total mediante un único reactivo y un algoritmo de control de volumen. El reactivo y el procedimiento utilizan un indicador de pH que se muestra coloreado tanto en forma ácida como básica.

Un procedimiento para medir la alcalinidad total en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- Adición de una cantidad de un reactivo concentrado a una muestra de agua que se va a analizar, en la que el reactivo contiene una concentración conocida de ácido y una concentración conocida de indicador de pH; y en la que el indicador de pH se muestra coloreado tanto en forma ácida como básica y presenta un cambio considerable de color a valores de pH inferiores al del punto final de la valoración del tampón presente en la muestra de agua; y en la que la concentración de ácido está presente en el reactivo en una relación conocida de concentración con respecto al indicador de pH, de manera que la concentración del ácido se puede expresar como algún factor F multiplicado por la concentración del indicador de pH.
- Mezcla de dicho reactivo y dicha muestra de agua para formar una solución.
- Medición de la absorbancia de la solución resultante a 2 o más longitudes de onda.
- Determinación, a partir de dichas mediciones de absorbancia, tanto de la concentración total (forma ácida + básica) de indicador presente en la solución como del pH de la solución.
- Si el pH se encuentra dentro del intervalo de cambio de color del indicador de pH, determinación de la concentración en exceso de iones hidrógeno presente en la solución a partir del pH.
- 35 - Determinación de la concentración total de ácido añadido a partir de la concentración total del indicador.
- Determinación de la concentración total de ácido consumido en la solución como la diferencia entre la concentración total añadida y el exceso que queda.
- Determinación del volumen V de reactivo añadido a partir de la concentración total del indicador, la concentración conocida del indicador de pH en el reactivo y el volumen de la cámara de análisis (CV).
- 40 - Determinación de un nuevo volumen  $V_{nuevo}$  a añadir para producir un exceso escogido de ácido, es decir, un pH escogido dentro del intervalo de cambio de color del indicador de pH.
- Regulación del sistema de suministro para suministrar  $V_{nuevo}$  en un posterior ciclo de análisis.

Otro ejemplo de análisis que aplica el control contempla el uso de un único reactivo para analizar la dureza cálcica. Este ejemplo proporciona un procedimiento para medir la dureza cálcica, en el que el procedimiento comprende las etapas de:

- Adición de una cantidad de un reactivo concentrado a una muestra de agua que se va a analizar, en la que el reactivo contiene una concentración conocida de un compuesto que se liga fuertemente al calcio en una forma incolora, y una concentración conocida de un compuesto que se liga al calcio, con dos colores diferentes en las formas ligada y no ligada, pero con menos fuerza que el compuesto ligante fuerte incoloro; y en la que la concentración de compuesto ligante incoloro de unión al calcio está presente en el reactivo en una relación conocida de concentración con respecto al compuesto ligante coloreado, de manera que la concentración del compuesto ligante incoloro se puede expresar como algún factor F multiplicado por la concentración del indicador del compuesto ligante coloreado.
- Mezcla de dicho reactivo y dicha muestra de agua para formar una solución.
- Medición de la absorbancia de la solución resultante a 2 o más longitudes de onda.
- Determinación, a partir de dichas mediciones de absorbancia, tanto de la concentración total de compuesto ligante incoloro como de las proporciones del compuesto ligante coloreado de unión al calcio en sus formas ligada y no ligada presentes en la solución.
- 60 - Si hay unas proporciones considerables de formas tanto ligada como no ligada del compuesto ligante coloreado presentes en la solución, determinación de la dureza cálcica a partir de concentraciones del compuesto ligante

coloreado y la concentración de compuesto ligante incoloro.

- Determinación del volumen  $V$  de reactivo añadido a partir de la concentración total del compuesto ligante coloreado.

5 - Determinación de un nuevo volumen  $V_{nuevo}$  a añadir para producir un exceso escogido de compuesto ligante coloreado, es decir, una relación escogida de la forma ligada respecto a la no ligada.

- Regulación del sistema de suministro para suministrar  $V_{nuevo}$  en un posterior ciclo de análisis.

10 El reactivo único comprende un compuesto incoloro que se liga fuertemente al calcio (por ejemplo, EDTA, gluconato sódico), un compuesto que se liga menos fuertemente al calcio y que posee un color diferente en la forma ligada y la no ligada (por ejemplo, rojo alizarina S), un tampón de pH para mantener un estrecho intervalo de pH y también puede contener un agente reductor tal como tiosulfato de sodio para eliminar todo efecto decolorante de los agentes oxidantes sobre el compuesto coloreado que puede estar presente en la solución que se está analizando, y también puede contener otros compuestos tales como glicerol para alterar la viscosidad de la solución reactiva.

15 Se sabe que la EDTA y el gluconato de sodio tienen una gran capacidad de formar complejos con los iones de calcio en disolución y el complejo resultante es incoloro. También se conoce la capacidad del rojo alizarina S para formar complejos con los iones de calcio en disolución, aunque no es tan marcada, por lo que los iones de calcio presentes se ligarán en primer lugar a la EDTA o al gluconato de sodio. El rojo de alizarina S es de color rojo en su forma no ligada y morado cuando se liga al calcio a un pH de aproximadamente 8,5. Es importante mantener el pH dentro de  
20 un intervalo relativamente pequeño, ya que el rojo de alizarina S también funciona como un indicador de pH y puede ser rojo o morado dependiendo del pH. A medida que se añade el reactivo, la sustancia con mayor capacidad ligante (EDTA o gluconato de sodio) se ligará primero al calcio presente y, si la concentración de calcio excede la capacidad del compuesto con mayor capacidad ligante, el rojo alizarina S se ligará al calcio y se volverá morado. Si la  
25 concentración del calcio no supera la capacidad del compuesto de mayor capacidad ligante, el rojo de alizarina S permanecerá rojo.

La esencia de esta metodología se basa en converger en un volumen de reactivo a añadir para dar lugar a un exceso requerido de un compuesto del reactivo y, en dicho punto, se puede determinar el parámetro que se está  
30 analizando. Una vez que se encuentra en el intervalo de volumen que interesa, este volumen se ajusta en función de las concentraciones medidas para mantener este exceso requerido y constituye el volumen de reactivo inyectado en el siguiente ciclo de análisis. Por tanto, cuando las concentraciones que se están analizando cambian lentamente (lo cual sucede a menudo), el sistema suele necesitar únicamente una inyección para obtener un resultado y registrará el volumen requerido que se debe inyectar, a medida que cambia. Esto se traduce en un tiempo de análisis más  
35 corto y un menor uso de reactivo que llevando a cabo una valoración cada vez. Si se produce un gran cambio repentino, entonces se necesita que unos cuantos ciclos vuelvan a converger en la zona de interés. Las concentraciones pertinentes (y a partir de ellas, los volúmenes inyectados) se calculan utilizando compuestos de referencia coloreados en el reactivo que pueden o no participar en la reacción.

Los ejemplos de análisis descritos que encajan en este procedimiento de control son:

40 1. Cloro libre utilizando colorante alimentario azul brillante. Aquí, el procedimiento se afina para que haya un pequeño exceso de azul brillante sin reaccionar para tener la garantía de que se ha añadido lo bastante para reaccionar con todo el cloro presente. El azul brillante sin reaccionar y su producto oxidado se utilizan como referencia óptica para determinar cuánto reactivo se ha añadido.

45 2. Alcalinidad total. Aquí, el procedimiento se afina para que haya un pequeño exceso de ácido más allá del punto final para dar un pH en el intervalo cuantificable mediante azul de bromofenol. Se utilizan ambas formas del azul de bromofenol, ácida y básica, como referencia óptica para determinar cuánto reactivo se ha añadido.

3. pH. El procedimiento utiliza la relación entre la absorbancia a 2 longitudes de onda para determinar el pH, pero el procedimiento utiliza las formas ácida y básica del indicador como referencia óptica para determinar cuánto se ha  
50 añadido (igual que antes con el azul de bromofenol) y regularlo después hasta una cantidad fija (exceso) de reactivo añadido.

4. Dureza. Aquí, el procedimiento utiliza las formas ligada y no ligada del rojo de alizarina S con calcio como referencia óptica para determinar cuánto reactivo se ha añadido, y después se afina para tener un exceso de rojo de alizarina S no ligado, de manera que esté en el intervalo en el que parte de la alizarina está ligada y parte no está  
55 ligada.

### Descripción detallada de la invención

60 Se describirá una realización preferida de la invención haciendo referencia a los dibujos, en los que:

La figura 1 muestra la absorbancia a una longitud de onda concreta del colorante reactivo en función del volumen añadido;

La figura 2 muestra los perfiles de absorción en función del volumen añadido para el colorante reactivo y el producto

coloreado;

la figura 3 ilustra un sistema de control aplicado a la valoración para determinar la alcalinidad total y la figura 4 ilustra un procedimiento para medir la alcalinidad total.

5 En el caso de que el reactivo se decolore hasta dar lugar a un compuesto incoloro, se pueden añadir volúmenes que aumenten gradualmente hasta que quede un exceso de reactivo, indicado por la persistencia del color del reactivo. La cantidad de reactivo que queda en exceso se puede calcular a partir de la absorción del reactivo a una o más longitudes de onda. La cantidad total de reactivo añadido se puede calcular a partir del volumen total de reactivo añadido y la concentración de la solución del reactivo. La cantidad de reactivo consumida será el total añadido  
10 menos la cantidad que quede en exceso. Después se puede calcular la cantidad de cloro libre presente a partir de la cantidad de reactivo consumido y la estequiometría de la reacción entre el reactivo y el cloro libre. Una vez que se conoce la concentración de cloro libre, se puede calcular el volumen necesario para producir un exceso dado de reactivo y se puede utilizar en un algoritmo de control que utiliza este volumen como punto de partida para el siguiente análisis y ajusta de manera continua este volumen de partida aumentándolo o reduciéndolo en función de  
15 cada medición para mantener este exceso requerido independientemente de la concentración del cloro libre. Esto permite un uso mucho más económico del reactivo y un intervalo de medición más amplio que con la simple adición de un volumen fijo de reactivo suficiente para cubrir el intervalo de concentración que interese, y una respuesta más rápida que si cada vez se lleva a cabo una valoración por etapas. En muchos casos, el nivel de cloro libre cambiará de manera relativamente lenta y, bajo esta estrategia de control, el volumen de reactivo añadido se registrará con el  
20 cambio en el nivel de cloro libre. Solo será necesario llevar a cabo adiciones considerablemente mayores o menores para hallar el nuevo volumen requerido si se produce un cambio rápido en el nivel de cloro libre, como en el caso de una supercloración.

El principio de este control para el caso de la decoloración se muestra en la figura 1, que muestra la absorbancia en una longitud de onda concreta del colorante reactivo en función del volumen añadido para dos concentraciones de cloro libre diferentes (1) y (2), en las que (2) representa una mayor concentración. Al principio, con bajos volúmenes añadidos, todo el colorante reactivo se decolora hasta convertirse en un producto incoloro y no hay una absorbancia apreciable hasta que se ha añadido el suficiente colorante para reaccionar con todo el cloro libre presente, y corresponden a los volúmenes indicados con X1 y X2. En el caso del cloro libre de concentración más baja (1), hay exceso de colorante presente a volúmenes mayores a X1, y a volúmenes mayores a X2 en el caso de la mayor concentración (2). A medida que el exceso aumenta, también lo hace la absorbancia medida del colorante reactivo. Para lograr el nivel de exceso deseado se deben añadir los volúmenes indicados V1 y V2 en los casos de menor y mayor concentración de cloro libre, respectivamente. La cantidad de reactivo requerido en exceso se puede expresar como un volumen (Vexceso\_requerido). Una vez que se detecta el colorante reactivo, se puede calcular la  
30 cantidad en exceso (y el volumen en exceso Vexceso correspondiente) a partir de la absorbancia. El volumen total V añadido, se puede expresar entonces como la suma del volumen del reactivo en exceso y el volumen que corresponde a la cantidad de colorante reactivo oxidado para dar lugar al producto incoloro (Vproducto):

$$\mathbf{V = Vexceso + Vproducto}$$

40 De este modo, el nuevo volumen para regular el siguiente ciclo de análisis de manera que se obtenga el exceso requerido del reactivo (por ejemplo, V1 o V2 de la figura 1) es:

$$\mathbf{Vnuevo = Vproducto + Vexceso\_requerido}$$

45 Para cada medición sucesiva, se repite este ciclo: Vexceso se calcula a partir de la absorbancia del colorante reactivo y, conociendo el volumen total V añadido, se puede calcular Vproducto y Vnuevo. La concentración de cloro libre se puede calcular a partir de Vproducto, que proporciona la cantidad de colorante reactivo que ha reaccionado con el cloro libre.

50 Una alternativa al uso de unos medios mecánicos de suministro de volumen precisos consiste en un procedimiento para hallar la cantidad total de reactivo añadido basado en un compuesto de referencia añadido al reactivo, tal como se describe en nuestra correspondiente patente número WO2008061315. El compuesto de referencia es un compuesto añadido al reactivo que no participa en la reacción con el analito diana y que posee un espectro de absorción considerablemente diferente al de otros compuestos presentes en el reactivo y/o los productos de  
55 reacción formados. La cantidad de reactivo añadido se puede determinar entonces a partir de la absorción (y por tanto la concentración) del compuesto de referencia. En este caso, el compuesto de referencia no debe ser oxidado de manera apreciable por el cloro libre u otro compuesto oxidante que se esté analizando.

60 En el caso del colorante reactivo que se oxida hasta presentar otro color, de nuevo se pueden añadir volúmenes de reactivo que aumenten gradualmente hasta que se mantenga un exceso del reactivo (lo cual también vendrá indicado por no producirse un mayor aumento en el nivel del producto producido). En este caso, la concentración del cloro libre se puede calcular a partir de la cantidad de reactivo consumido, como en el caso de la decoloración, o a

partir de la cantidad de producto producida, que se puede determinar a partir de la absorción del producto coloreado. La figura 2 muestra los perfiles de absorción en función del volumen añadido para el colorante reactivo y el producto coloreado, y los perfiles se medirán habitualmente a una longitud de onda diferente para el colorante reactivo y para el producto oxidado. El perfil para el colorante muestra la misma forma que en el caso de la decoloración, a excepción de que, debido al hecho de que el producto no es incoloro, también puede haber una contribución a la absorbancia medida de las especies del producto, y la absorbancia con un volumen inferior a X puede ser distinta a cero. La absorbancia del producto coloreado tenderá a aumentar y a estabilizarse después, una vez que haya reaccionado todo el cloro libre, y cualquier aumento continuado se debe a una contribución del colorante reactivo en exceso a la absorbancia. Dado que, en la práctica, habrá un cierto solapamiento espectral de la absorbancia entre el colorante reactivo y las especies del producto, es necesario que el algoritmo de control tenga esto en cuenta a la hora de hallar  $V_{exceso}$  y  $V_{producto}$ .

Por ejemplo, si consideramos dos longitudes de onda en las que se puede apreciar una diferencia entre la absorción del colorante reactivo y las especies del producto, como por ejemplo una longitud de onda en el rojo y una longitud de onda en el azul en el caso del azul brillante y su producto de oxidación, entonces las relaciones se pueden expresar como:

$$\text{Absorbancia del rojo (Rabs)} = \text{Absorbancia del rojo de colorante reactivo en exceso (Rexceso)} + \text{Absorbancia del rojo del producto (Rproducto)}$$

$$\text{Absorbancia del azul (Aabs)} = \text{Absorbancia del azul de colorante reactivo en exceso (Aexceso)} + \text{Absorbancia del azul del producto (Aproducto)}$$

Basándose en los espectros de absorción para los compuestos puros, se sabe cuál es la relación entre la absorbancia en cualquier longitud de onda. Por ejemplo, la absorbancia del azul del colorante reactivo se puede expresar como un factor F1 de la absorbancia del rojo, y la absorbancia del rojo del producto se puede expresar como un factor F2 de la absorbancia del azul del producto. Por lo tanto:

$$\text{Rabs} = \text{Rexceso} + \text{F2} \times \text{Aproducto}$$

$$\text{Aabs} = \text{F1} \times \text{Rexceso} + \text{Aproducto}$$

$$\text{Aproducto} = (\text{Aabs} - \text{F1} \times \text{Rabs}) / (1 - \text{F1} \times \text{F2})$$

$$\text{Rexceso} = \text{Rabs} - \text{F2} \times \text{Aproducto}$$

De manera similar, también se pueden usar relaciones entre otras longitudes de onda.

La concentración del producto (y por tanto la concentración del cloro libre) es proporcional a la absorbancia del azul del producto  $A_{producto}$ , y la concentración del colorante en exceso es proporcional a la absorbancia del rojo del colorante en exceso  $R_{exceso}$ .

Conociendo el volumen de la cámara de análisis y las concentraciones presentes en el reactivo (o la absorbancia para una proporción dada entre reactivo y agua), tal como se describe anteriormente para el caso de la decoloración, las concentraciones del colorante reactivo en exceso y del producto se pueden expresar como un volumen equivalente de reactivo añadido. De este modo, el volumen añadido que se consume para formar el producto es  $V_{producto}$  y el volumen de reactivo que, si no reacciona, produce la absorbancia  $R_{exceso}$  es  $V_{exceso}$  y, por tanto, como anteriormente, el volumen total  $V$  añadido es:

$$V = V_{exceso} + V_{producto},$$

y, nuevamente, el nuevo volumen a añadir en el siguiente ciclo de medición para mantener el nivel de exceso deseado es:

$$V_{nuevo} = V_{producto} + V_{exceso\_requerido}$$

Al igual que en el caso de la decoloración, se puede añadir al reactivo un compuesto de referencia distinto que posea un espectro de absorción considerablemente diferente al de los compuestos del reactivo y los productos de reacción, y utilizarlo para hallar la cantidad de reactivo añadido. No obstante, cuando se produce un producto de reacción coloreado, la solución resultante se utiliza como su propia referencia para determinar volúmenes de reactivo añadidos. La cantidad total de reactivo añadido se halla a partir de la relación entre los espectros de absorción del reactivo y el producto. El uso de la solución como su propia referencia para hallar la cantidad de reactivo anula la necesidad de una referencia adicional que sea estable ante la oxidación del cloro libre. Si la



absorción a una longitud de onda concreta se satura, se pueden utilizar las relaciones de absorción a otras longitudes de onda. La determinación de los volúmenes añadidos a través de medios ópticos permite utilizar procedimientos de inyección de volumen distintos de los que incluyen mecanismos mecánicos, por ejemplo, un sistema de inyección presurizada basado en el tiempo, como el de nuestra patente correspondiente WO2008061315. La obtención del volumen añadido por medios ópticos también sirve como diagnóstico útil.

Se puede observar que el reactivo y el procedimiento de control de la invención para el análisis del cloro libre presentan varias ventajas. En una realización preferida, el reactivo simplemente incluye una solución de azul brillante FCF junto con unos medios de tamponamiento del reactivo hasta el intervalo de pH preferido de 1,5 a 2,5. El tamponamiento se puede lograr mediante combinaciones de ácidos y bases orgánicos o inorgánicos y sus sales. En una realización preferida, los medios de tamponamiento son ácido cítrico o ácido tartárico junto con aminoácidos tales como la glicina y/o el ácido aspártico. En otra realización preferida, los medios de tamponamiento consisten en un tampón de fosfato que comprende ácido fosfórico y dihidrógeno fosfato sódico. Las anteriores composiciones presentan la ventaja de que no son corrosivas ni tóxicas y no favorecen el crecimiento de algas en el caso en el que el reactivo se devuelva a la piscina. El procedimiento de control se basa en hallar volúmenes a partir de mediciones ópticas del colorante reactivo que queda sin reaccionar y el producto de oxidación coloreado en dos o más longitudes de onda y utilizar estos volúmenes para calcular un nuevo volumen a inyectar en el siguiente ciclo de medición con el fin de mantener un exceso escogido de colorante reactivo sin reaccionar. El procedimiento de control proporciona un uso económico del reactivo y amplía el intervalo de concentraciones que se pueden medir.

De acuerdo con la invención, se puede observar que el uso de un colorante alimentario solventa las preocupaciones acerca de la toxicidad de la DPD y el naranja de metilo, lo cual permite devolver la mezcla de reacción al suministro de agua con el fin de minimizar el consumo de agua. Además, en la práctica, se ha descubierto que la regulación del volumen de colorante alimentario reactivo añadido a la muestra de agua, conforme a los citados valores de absorbancia del colorante alimentario original, el producto de reacción y el compuesto de referencia, si se encuentra presente, o combinaciones de los mismos, permite realizar mediciones precisas del cloro libre a lo largo del intervalo de 0 a 25 ppm.

También se observó que tiene lugar una reacción lenta del azul brillante FCF con cloraminas. La cinética de esta reacción se puede utilizar para determinar el contenido de cloro combinado de la muestra de fluido. Todo el cloro libre presente reaccionará de manera instantánea con el azul brillante FCF y la reacción con cloraminas (y otros agentes oxidantes) se producirá de forma mucho más lenta. En este caso, se puede utilizar la evolución del producto de reacción a lo largo del tiempo para determinar las concentraciones presentes. La reacción se puede monitorizar durante un periodo prolongado hasta que la reacción se haya completado y el nivel de absorción del producto se estabiliza, o bien se puede monitorizar la reacción (nivel de absorbancia del producto) en función del tiempo y una función matemática ajustada a los datos, calculándose la concentración final del producto a partir de la función ajustada.

Los siguientes son ejemplos de formulaciones de reactivo:

A  
 232 gm de ácido fosfórico al 85 % en peso  
 293 gm de dihidrógeno fosfato sódico dihidratado  
 1,8 gm de azul brillante (eritrola), colorante alimentario C133  
 Completado hasta 1l con agua destilada

B  
 232 gm de ácido fosfórico al 85 % en peso  
 293 gm de dihidrógeno fosfato sódico dihidratado  
 1,8 gm de azul brillante (eritrola), colorante alimentario C133  
 0 -300 g de glicerol  
 Completado hasta 1l con agua destilada

C  
 150 gm de glicina  
 700 gm de ácido cítrico  
 1,8 gm de azul brillante (eritrola), colorante alimentario C133  
 Completado hasta 1l con agua destilada

D  
 150 gm de glicina  
 500 gm de ácido tartárico  
 100 gm de ácido aspártico

1,8 gm de azul brillante (eriolglaucina), colorante alimentario C133  
0-300 g de glicerol  
Completado hasta 1l con agua destilada

5 Se pueden utilizar otros tampones, el objeto consiste en producir un pH resultante en el intervalo de 1,5 a 2,5 tras la adición del reactivo en la proporción de 1:100 (reactivo:muestra de agua que se está analizando). También se pueden utilizar otras concentraciones de azul brillante, dependiendo de los requisitos de la electrónica de la absorción.

10 En otro ejemplo, se utiliza una combinación de colorantes alimentarios en un kit de ensayo manual para cloro libre u otros compuestos oxidantes. Si en un reactivo para cloro libre se incluyen dos o más colorantes alimentarios, que se pueden decolorar o transformar en un producto coloreado en proporción a la cantidad de cloro libre presente, será posible generar una gama de colores en la solución resultante, de manera que se pueda crear una escala de color proporcional al cloro libre que sea distinguible a simple vista.

15 Siempre que el compuesto o compuestos del reactivo estén coloreados y el producto o productos de reacción estén coloreados, la solución resultante se podrá utilizar como su propia referencia para hallar el volumen de reactivo añadido, tal como se describe anteriormente. Otro caso particular es el de los indicadores de pH en los que las formas ácida y básica están ambas coloreadas. En este caso, la solución resultante consiste en una mezcla de las formas ácida y básica del indicador, cuya proporción depende del pH. Como antes, las concentraciones de ambas especies se pueden hallar a partir de las relaciones de la absorbancia en dos o más longitudes de onda. La concentración total del indicador será la suma de las dos formas, y la concentración total se puede convertir en un volumen equivalente añadido.

20 Por ejemplo, el pH de una piscina se mide convenientemente utilizando rojo de fenol como colorante indicador. El rojo de fenol cambia de amarillo a rojo a lo largo del intervalo de pH de 6,8 a 8,4. El pH se puede determinar ópticamente utilizando un único reactivo consistente en un colorante indicador de pH y, en el caso del agua de una piscina, un agente reductor adicional (como el tiosulfato de sodio) para neutralizar el cloro libre con el fin de impedir la decoloración del indicador. La concentración total y el volumen añadido durante cualquier medición se pueden hallar a partir de la absorción en dos o más longitudes de onda. El pH se puede calcular a partir de la absorbancia a una longitud de onda una vez que se conoce la cantidad total de indicador añadido, o el pH se puede calcular a partir de la proporción de la absorbancia a dos o más longitudes de onda.

25 En un ejemplo, se proporciona un procedimiento de análisis óptico de la alcalinidad total utilizando un único reactivo y un algoritmo de control de volumen. El reactivo y el procedimiento utilizan un indicador de pH que está coloreado tanto en su forma ácida como la básica. El indicador de pH sirve como su propia referencia para hallar el volumen total añadido. En muchas aplicaciones, la alcalinidad total se regula utilizando bicarbonato sódico. Normalmente, la alcalinidad total (AT) se determina a través de una valoración con ácido para localizar el punto final del ácido carbónico. La AT se calcula a partir de la cantidad de ácido añadida en el punto final. A medida que se añade progresivamente ácido a la solución que se está analizando, el pH disminuye, y cambia con mayor rapidez en las proximidades del punto final, tal como se muestra en la figura 3.

30 Un indicador de pH solo permite calcular el pH con precisión dentro del intervalo de pH en el que cambia de color. Fuera de este intervalo, el indicador estará predominantemente en la forma ácida o en la básica y se mantendrá del mismo color a medida que el pH varía. Para un indicador que cambie de color en la zona de pH del punto final (por ejemplo, verde de bromocresol), el pH calculado utilizando el color del indicador durante la valoración aparece como la línea discontinua que se muestra en la figura 3. Para determinar el punto final, se debe añadir ácido hasta que el pH atraviese la zona de cambio de color del indicador. Se podría añadir ácido de manera continua, siempre que se produzca una mezcla adecuada y rápida durante la adición, o bien por etapas. En cada punto, es necesario conocer el volumen de reactivo añadido para determinar el volumen añadido en el punto final representado por el punto de inflexión de la curva de valoración. Si se añade el indicador al reactivo, la concentración del indicador presente aumenta en proporción a la cantidad de reactivo añadido. Se pueden utilizar indicadores con formas ácida y básica coloreadas como su propia referencia para calcular la cantidad de indicador presente y, por tanto, el volumen de reactivo añadido. Una vez que se conoce la AT, se puede calcular el volumen de reactivo necesario para alcanzar la zona de pH cercana al punto final y utilizarlo como punto de partida para el siguiente ciclo de análisis. La realización de este cálculo en cada ciclo de análisis permitirá a la rutina de control centrarse rápidamente en la zona de interés y registrar los cambios en la AT.

35 En otro ejemplo, se proporciona un único reactivo para el análisis de la alcalinidad total consistente en un ácido, un indicador de pH que presenta formas tanto ácida como básica coloreadas, y en el que el cloro libre u otro agente oxidante están presentes en el agua que se va a analizar, un agente reductor para neutralizar el agente oxidante con el fin de impedir la decoloración del colorante indicador de pH. Es necesario que todos los compuestos coexistan de manera estable en la solución única. En una realización preferida, el agente reductor es incoloro y se oxida para dar

lugar a un producto incoloro. El reactivo único también puede contener otros compuestos para otros fines, como alterar la viscosidad del reactivo. Un ejemplo consiste en no llevar a cabo una valoración para determinar la AT, sino una única adición de un volumen del reactivo único de AT para añadir un exceso de ácido más allá del punto final, y calcular la AT a partir del exceso de ácido presente. La ventaja de esta estrategia es que solo se requiere un único punto pasado el punto final y no es necesario determinar el punto de inflexión de la curva de valoración. Además, debido a que se requiere un exceso de ácido, se puede utilizar un reactivo concentrado y solo se requiere añadir pequeños volúmenes, con lo que se minimiza el uso del reactivo y se minimiza cualquier efecto de dilución producido por la adición del reactivo. En este procedimiento, se escoge un indicador de pH (por ejemplo, azul de bromofenol) que cambia de color a valores de pH por debajo del punto final, tal como se muestra en la figura 4. La velocidad de cambio de la curva del pH frente al volumen de reactivo añadido es también mucho más pequeña más allá del punto final, por lo que se puede añadir un volumen de reactivo en un intervalo mucho más amplio para producir un pH que quede dentro del intervalo que se puede medir mediante el indicador (indicado como "intervalo de volumen útil" en las figuras 3 y 4). El volumen añadido se puede calcular utilizando el azul de bromofenol como su propia referencia, y también se calcula el pH utilizando los valores de absorbancia del indicador.

La cantidad total de ácido añadido se calcula a partir de la cantidad total de reactivo añadido. En el análisis de la AT, el exceso requerido es un exceso de ácido más allá del necesario para convertir completamente todo el bicarbonato en ácido carbónico, de forma análoga al análisis del cloro libre, en el que el exceso requerido consistía en colorante reactivo sin reaccionar más allá del requerido para reaccionar con todo el cloro libre. En este caso, la concentración del exceso de ácido se puede calcular directamente a partir del pH. La AT se calcula a partir de la cantidad de ácido consumido. La concentración del ácido consumido es la diferencia entre la concentración total añadida y la concentración que queda en exceso. La cantidad de ácido consumido se puede expresar como un volumen añadido, que es el volumen de reactivo añadido cuando se alcanza el punto final (VAT).

El azul de bromofenol cambia de amarillo a azul a lo largo del intervalo de pH de 3 a 4,4. El algoritmo de control de la realización preferida regula el volumen añadido para lograr un pH en el medio de este intervalo, es decir, pH 3,7. La cantidad de reactivo requerida para producir un pH de 3,7, que constituye un exceso particular de ácido más allá del punto final (es decir, en una solución no tamponada), se puede expresar como un volumen de reactivo (Vexceso). De este modo, el nuevo volumen de reactivo a añadir para lograr un pH de 3,7 es:

$$\mathbf{Vnuevo = VAT + Vexceso}$$

De nuevo, este valor se vuelve a calcular tras cada ciclo de análisis y el algoritmo registrará los cambios en la AT. Solo será necesario realizar cambios más significativos del volumen inyectado si se produce un acontecimiento que cambie rápidamente la AT en gran medida. En este caso, se aumentará o disminuirá el volumen añadido para volver a localizar la zona de cambio de color del azul de bromofenol. La dirección del cambio (aumento o disminución en el volumen añadido) es evidente a partir del valor de pH calculado. Tal como se explica anteriormente, el pH calculado mediante el indicador cuando el pH está fuera del intervalo de cambio de color del indicador será un valor relativamente constante, ya que el indicador estará presente, principalmente, todo en forma básica o todo en forma ácida. De este modo, si el pH calculado a partir del indicador es próximo o superior a 4,4, es necesario añadir más reactivo, y si el pH calculado a partir del indicador es próximo a 3 o es inferior, entonces, es necesario añadir menos reactivo (tal como se ilustra mediante las posiciones de la figura 4 marcadas con estrellas).

Ejemplos de formulaciones de reactivo para la alcalinidad total

E  
 10 – 30 % de agua  
 0 – 40 % de glicerol  
 0,02 - 0,5 concentración molar final de HCl (normalmente, 0,1 M)  
 0,1 - 5 g/litro de tiourea  
 1 - 4 g/l azul de bromofenol  
 Etanol hasta equilibrio

F  
 10 – 30 % de agua  
 0 – 40 % de glicerol  
 0,02 - 0,5 concentración molar final de HCl (normalmente, 0,1 M)  
 0,1 - 5 g/litro de glutatión  
 1 - 4 g/l azul de bromofenol  
 Etanol hasta equilibrio

G  
 10 – 30 % de agua

0 – 40 % de glicerol  
 0,02 - 0,5 concentración molar final de HCl (normalmente, 0,1 M)  
 0,1 - 5 g/litro de cisteína  
 1 - 5 g/l azul de bromofenol  
 5 Etanol hasta equilibrio  
 El HCl (ácido clorhídrico) se puede sustituir por otros ácidos fuertes como el sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) o hidrógeno sulfato de sodio (NaHSO<sub>4</sub>)

Una formulación de reactivo para pH  
 10 H  
 0,05 - 0,5 g/litro de rojo de fenol (u otro indicador para el intervalo de pH apropiado)  
 0 – 50 % de etanol  
 0 – 50 % de glicerol  
 0,1 – 5 g/litro de tiosulfato de sodio  
 15 Agua hasta equilibrio

Otro ejemplo contempla el uso de un único reactivo para analizar la dureza cálcica.  
 El procedimiento incluye la determinación del volumen de reactivo a añadir de manera que la concentración de ligante fuerte más rojo de alizarina S excede ligeramente la necesaria para unirse a todo el calcio presente. El  
 20 volumen añadido se ajustará para alcanzar el punto en el que la mitad del rojo de alizarina S se liga al calcio (forma morada) y la mitad queda sin ligar (forma roja). Por tanto, el procedimiento es análogo al procedimiento descrito para la alcalinidad total, ya que la cantidad de rojo de alizarina S en exceso que queda sin ligar y la cantidad total de reactivo añadido se determinan a partir de la absorción del rojo de alizarina S en dos o más longitudes de onda (véase indicador de pH). Una vez que se ha añadido un volumen de reactivo que da lugar a una mezcla con  
 25 presencia de formas ligadas y no ligadas del rojo de alizarina S, se puede calcular la dureza cálcica a partir de la proporción de rojo de alizarina S ligado (calculado a partir de la relación entre las dos formas de color) y la cantidad total de rojo de alizarina S añadida (calculada a partir de las magnitudes de absorción en dos o más longitudes de onda). Debido a que el rojo de alizarina S y el ligante fuerte están presentes en una proporción fija en el reactivo, la cantidad total de rojo de alizarina S añadida está relacionada con la cantidad de ligante fuerte añadido. La  
 30 concentración de calcio estará relacionada entonces con la concentración de ligante fuerte más la concentración de rojo de alizarina S ligado.

Para converger en el intervalo de volumen requerido, la indicación de si añadir más o menos reactivo viene señalada por la absorción del rojo de alizarina S en la solución. Si todo el rojo de alizarina S se encuentra en la forma roja, es  
 35 necesario añadir más reactivo, ya que está todo en la forma no ligada, y si está todo en la forma morada, es necesario añadir menos reactivo, ya que está todo en la forma ligada. Una vez que se ha determinado el intervalo de volumen requerido, este volumen se utiliza en el siguiente ciclo de análisis, de manera que registrará los cambios lentos en la dureza.

40 Formulaciones de reactivo preferidas para la dureza cálcica:

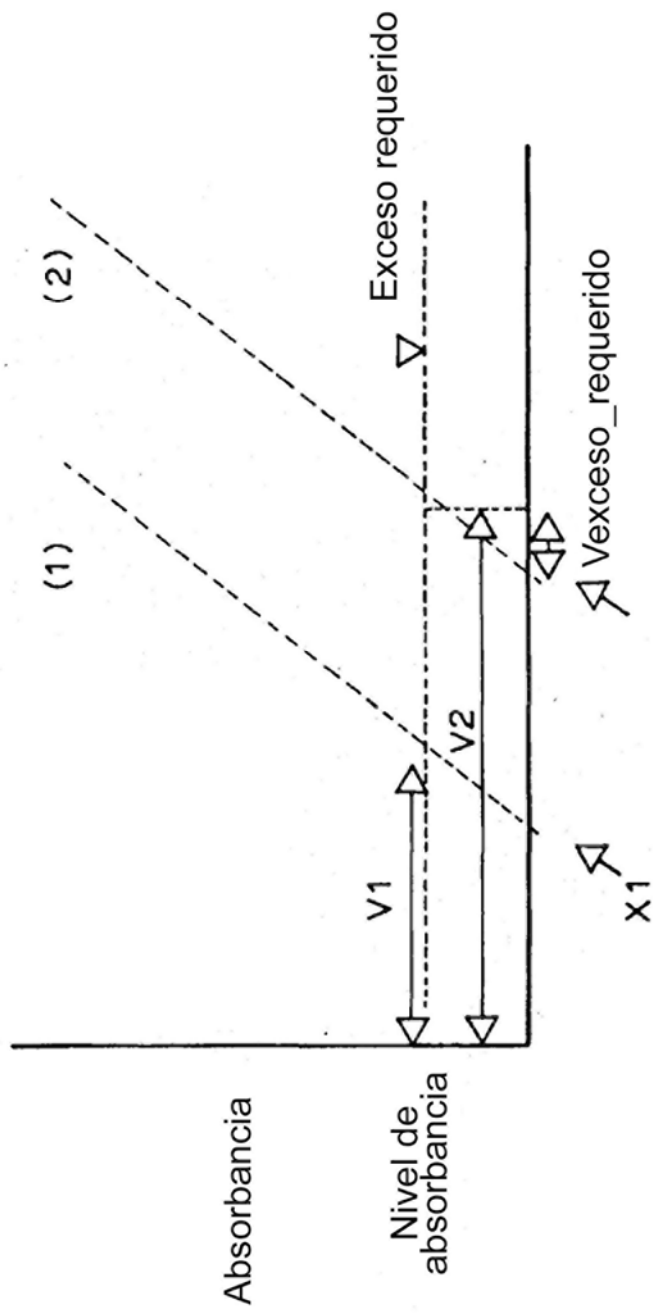
I  
 10 - 200 g/litro de TRIS  
 3,5 – 70 ml/l de HCl concentrado (por ejemplo, 40 g/L de TRIS, 14 ml/L HCl concentrado)  
 45 0,5 – 5 g/litro de rojo de alizarina S  
 1 - 15 g/litro de EDTA  
 0 – 50 % de glicerol

J  
 50 10 - 200 g/litro de TRIS  
 3,5 – 70 ml/l de HCl concentrado  
 0,5 – 5 g/litro de rojo de alizarina S  
 1 - 50 g/litro de gluconato de sodio  
 0 – 50 % de glicerol  
 55

A partir de lo expuesto anteriormente, se puede observar que la presente invención proporciona una estrategia única y segura para medir el cloro, el pH, la alcalinidad total y la dureza cálcica. Los expertos en la materia entenderán que la presente invención se puede implementar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento analítico colorimétrico para determinar la concentración de un analito oxidante presente en una muestra de líquido, y dicho procedimiento **se caracteriza por** las siguientes etapas:
- 5
- a) mezcla de un volumen de reactivo con un volumen de dicha muestra de líquido para formar una solución, en la que dicho reactivo contiene un colorante alimentario capaz de reaccionar con dicho analito oxidante de manera que el producto de reacción en dicha solución posee unas características de longitud de onda de absorbancia diferentes a las del colorante alimentario sin reaccionar;
- 10
- b) medición de las características de absorbancia de dicha solución a dos o más longitudes de onda, en la que al menos una de las longitudes de onda corresponde al colorante alimentario sin reaccionar y otra de las longitudes de onda corresponde al colorante alimentario que ha reaccionado;
- 15
- c) determinación, a partir de dichas mediciones de absorbancia, de la concentración de dicho producto de reacción de dicho colorante alimentario y la concentración del colorante alimentario sin reaccionar en dicha solución; y
- d) determinación de la concentración de dicho analito oxidante a partir de la concentración de dicho producto de reacción y dicha concentración del colorante alimentario sin reaccionar.
- 20
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el analito oxidante es cloro o bromo.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dichas etapas de adición de un volumen de reactivo, mezcla, medición de la absorbancia y determinación de las concentraciones de dicho producto de reacción de dicho colorante alimentario y dicho colorante alimentario sin reaccionar se repiten hasta que hay una concentración de colorante alimentario sin reaccionar distinta de cero para indicar que se ha añadido un exceso de reactivo más allá del requerido para la reacción estequiométrica entre dicho colorante alimentario y dicho analito oxidante, y la determinación de la concentración de dicho analito oxidante a partir de la concentración de dicho producto de reacción y dicha concentración distinta de cero de colorante alimentario sin reaccionar.
- 25
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el reactivo también incluye un compuesto o compuestos para limitar el pH de dichas soluciones a un valor o intervalo de valores deseado.
- 30
5. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho colorante alimentario es azul brillante FCF.
- 35
6. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que dicho compuesto o compuestos limitadores del pH incluyen ácido tartárico o un tampón de fosfato.
- 40
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se incluye en el reactivo un compuesto de referencia coloreado que no reacciona con dicho compuesto oxidante en dicha muestra de líquido.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el volumen de reactivo determinado para producir una concentración en exceso escogida de colorante alimentario sin reaccionar en dicha solución se utiliza como volumen de partida de reactivo añadido en el siguiente análisis de dicha concentración de compuesto oxidante.
- 45
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que, para reacciones que no son instantáneas, la reacción se monitoriza en función del tiempo para determinar la concentración de dicho analito oxidante.
- 50



Volumen de reactivo añadido

Fig. 1

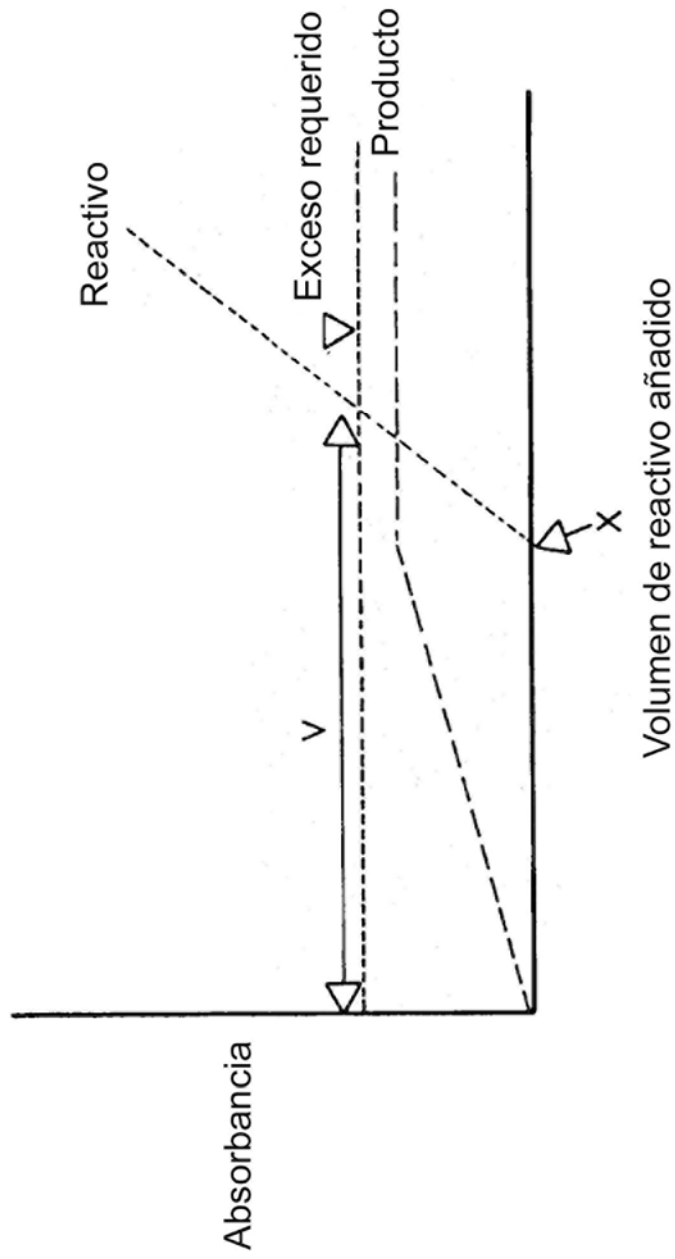
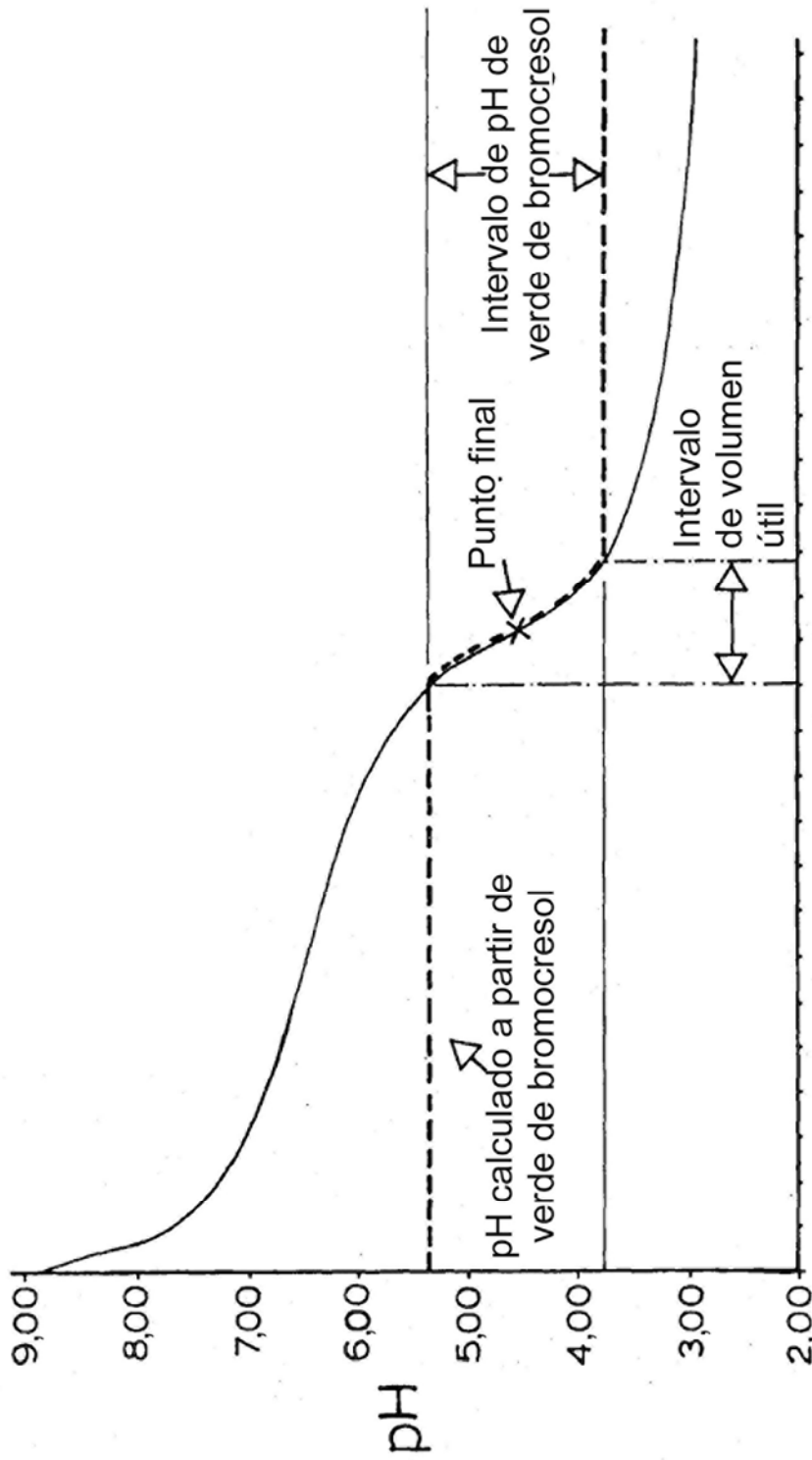


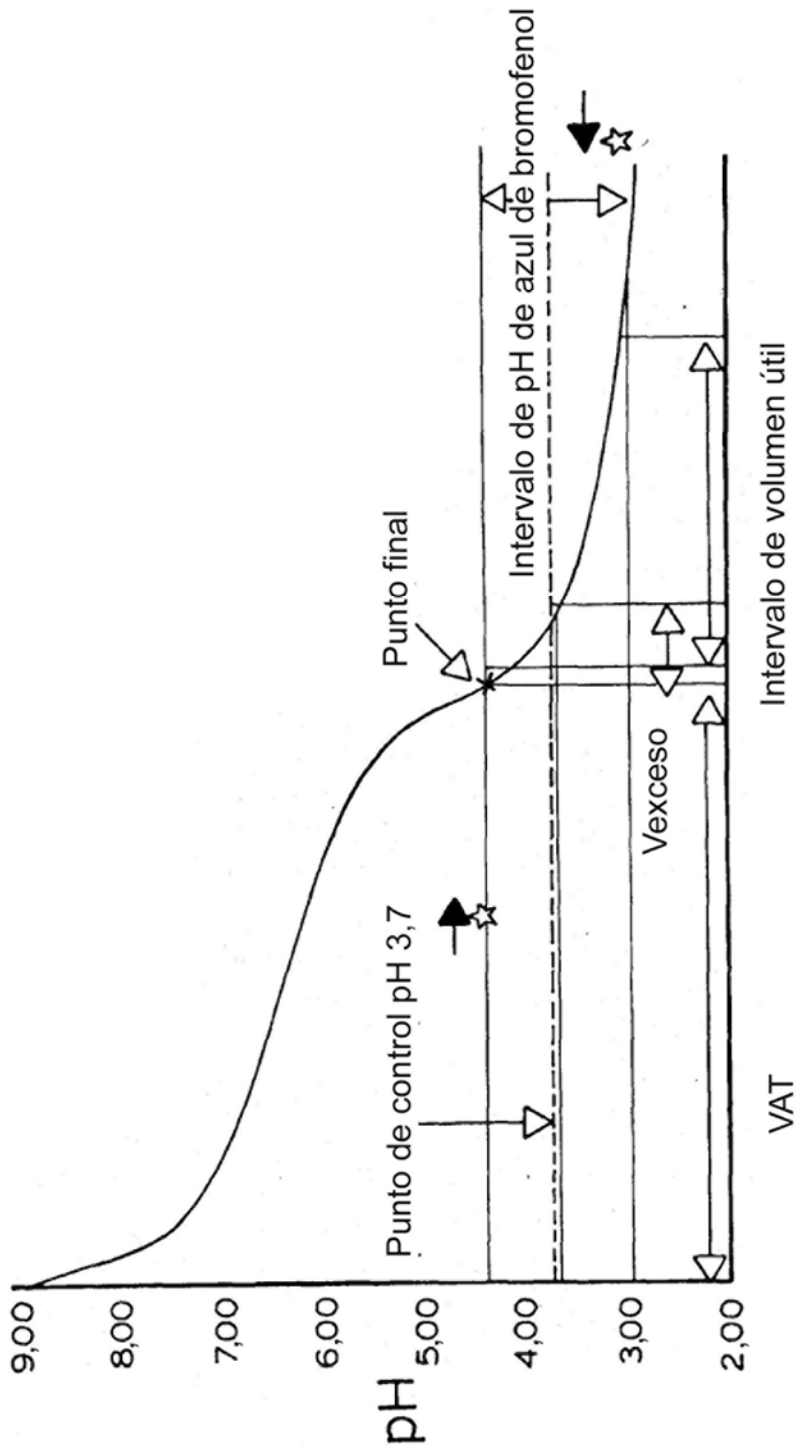
Fig. 2.



Volumen de ácido

Fig. 3.-





Volumen de ácido

Fig. 4