

LECCIÓN INAUGURAL

CURSO 2004/2005



UNIVERSIDAD DE ALICANTE

23 de septiembre de 2004

A mi familia
A la memoria de mis padres

Química Analítica y Premio Nobel

Un perfil de su historia común

GUILLERMO LÓPEZ CUETO
Catedrático de Química Analítica
Universidad de Alicante

Es tradición mantenida en la Universidad de Alicante, al igual que, creo, en todas las universidades españolas, incluir, como parte del solemne acto de apertura oficial del curso académico, una lección inaugural, impartida por uno de sus profesores, responsabilidad que, en esta apertura del curso 2004-2005, ha recaído en mi persona. Estimo a este respecto conveniente, en seguimiento de algo que ha devenido también, sí no en tradición, sí al menos en costumbre, recordar que la designación del profesor a quien se encomienda esta tarea se efectúa en esta universidad atendiendo a un criterio de rotación de sus Facultades y Escuelas, y de antigüedad dentro del centro, siendo, por tanto el azar, y no los méritos académicos de quien les habla, la causa de mi presencia ante ustedes.

La elección del tema sobre el que habría de versar esta lección no ha sido decisión tomada a la ligera. En universidades de rancia tradición, la lección inaugural de curso —en tiempos denominada *oración* inaugural, en atención a su naturaleza exclusivamente oral, más tarde acompañada de su edición impresa— solía ser con frecuencia de carácter *exhortativo*, como, al parecer, gustaba de llamarla Unamuno, y tenía como principales, y casi únicos, destinatarios a los estudiantes que se aprestaban a iniciar un nuevo curso. Una lección de estas características iría encaminada, como señalaba el profesor Lamberto de Echevarría en la que él mismo pronunciara en 1977 en la Universidad de Salamanca, “a cantar las excelencias de la Sabiduría y del trabajo intelectual, y a animar a profesores y alumnos en orden a las tareas del nuevo curso”. En otras ocasiones se optaba por un tema rigurosamente científico, una lección “expuesta con la bre-

vedad que la cortedad del tiempo y la heterogeneidad del auditorio exigían” [1].

El tema por mí elegido es mucho más próximo a la segunda de las opciones. No obstante, tampoco he creído que un tema de mi especialidad con un contenido propio, por ejemplo, de las asignaturas de licenciatura o doctorado, pudiese mantener el interés más que, a lo sumo, de los colegas de química analítica u otras materias científicas afines. Tras estas consideraciones, mi pretensión para esta lección no ha sido otra que llevar a cabo una incursión, sustentada más en datos biográficos y hechos curiosos que en áridas disquisiciones científicas, a través del desarrollo que han experimentado algunas técnicas analíticas, principalmente durante el ya pasado siglo XX. La diversidad de las técnicas que configuran la metodología actual de la química analítica hace imprescindible seleccionar aquéllas sobre las que esta lección ha de tratar. He querido llevar a cabo esta selección con un criterio objetivo, como me ha parecido que es la atención que los avances en la metodología analítica han merecido por parte de la comunidad científica internacional, y que se ha materializado en la concesión del galardón más prestigiado universalmente desde el año 1901, como sin duda es el premio Nobel, a algunos de los científicos que han contribuido a la creación de principios y métodos en la disciplina de cuya enseñanza me ocupo.

En la relación de descubrimientos científicos distinguidos por el premio Nobel de química no son frecuentes las contribuciones científicas específicas en química analítica. Una de las razones se encuentra en que muchos de los métodos y técnicas analíticas y de separa-

ción han sido desarrollados dentro de proyectos y programas de investigación en campos diversos de la ciencia, como química inorgánica, química orgánica, bioquímica o fisiología.

El primer científico distinguido con el premio Nobel de química por un trabajo específico en el campo del análisis químico (microanálisis orgánico) fue Fritz Pregl (quien, curiosamente, no era químico, sino médico), en 1923. Por aquel entonces publicaba Jaroslav Heyrovský (un químico físico) sus primeros trabajos sobre polarografía, por lo que sería también galardonado con el premio Nobel bastantes años después, en 1959. Unos años antes, en 1952, los bioquímicos Archer J. P. Martin y Richard L. M. Synge habían recibido conjuntamente el premio Nobel de química por el descubrimiento o invención de la cromatografía de partición.

Además de los anteriormente referidos, habría que citar otros científicos que, aunque no desarrollaron su trabajo con fines analíticos, fueron distinguidos con el premio Nobel de química por contribuciones a la ciencia que han supuesto avances sustanciales en el desarrollo de la teoría o la práctica de la química analítica. Tal sucede, por ejemplo, con Svante Arrhenius, químico sueco a quien fue concedido el premio Nobel de química en 1903 “en reconocimiento de los extraordinarios servicios prestados al avance de la química a través de su teoría de la disociación electrolítica”, contribución que, junto con la del alemán Wilhelm Ostwald en relación con los principios fundamentales del equilibrio químico, por la que mereció el premio Nobel de química en 1909, constituyen las bases teóricas de la química de las disoluciones, presente como es sabido en una gran variedad de técnicas de análisis químico y de separación. El primer científico norteamericano que mereció la distinción del premio Nobel fue Theodor William Richards, en 1914, y lo fue en reconocimiento a sus resultados en la determinación de las masas atómicas de numerosos elementos químicos, lo que constituyó el primer paso para el descubrimiento de los isótopos. Los trabajos de Richards se basaron en el empleo sistemático de métodos clásicos de análisis químico. Una técnica que se aplica desde hace décadas con fines analíti-

cos, pero que en sus inicios fue desarrollada como medio para llevar a cabo trabajos de investigación en otros campos, es la espectrometría de masas, que se basa en la medida precisa de la relación masa/carga de los iones formados en un gas. El primer aparato para llevar a cabo este tipo de medidas fue ideado, diseñado y construido por Francis Aston (Gran Bretaña) en 1919. Aston denominó *espectrógrafo de masas* a este instrumento, y lo utilizó para determinar las masas atómicas de los elementos con mayor precisión de la que hasta entonces se había conseguido, lo que le permitió descubrir un gran número de isótopos, por lo que recibió el premio Nobel de química en 1922. En 1926, Theodor Svedberg (Suecia) fue distinguido con el premio Nobel de química por sus estudios en la química de los coloides. Para conseguir la precipitación de las partículas coloidales, Svedberg tuvo que construir una ultracentrífuga, diseñada por él mismo, cuyos primeros modelos podían trabajar por encima de las 30 000 rotaciones por minuto (velocidad que producía una aceleración varios miles de veces superior a la de la gravedad), siendo considerado por ello el pionero de la técnica de la ultracentrifugación, de reconocida utilidad en la separación de macromoléculas y numerosas sustancias de interés bioquímico. En 1925 Svedberg había admitido como ayudante de investigación al joven químico, también sueco, Arne Wilhelm Kaurin Tiselius, cuyo interés se centró en la separación de proteínas mediante el uso de un campo eléctrico, técnica denominada electroforesis, y que estaba basada en una idea que, aunque propuesta a finales del siglo XIX, no había conducido hasta entonces a resultados relevantes. Los resultados obtenidos por Tiselius le merecieron el premio Nobel de química en 1948, y la consideración de padre de la electroforesis, técnica que ha experimentado un auténtico renacimiento en las últimas dos décadas con el desarrollo de la denominada *electroforesis capilar*.

Centraré, no obstante, el contenido de esta lección en las tres técnicas específicamente analíticas a cuyo desarrollo colaboraron los primeros científicos que he citado: microanálisis elemental orgánico, cromatografía y análisis polarográfico.

1. Microanálisis elemental orgánico

Ya en el siglo XVII se sabía que las sustancias orgánicas contenían carbono e hidrógeno, dado que la combustión de aquéllas producía dióxido de carbono y vapor de agua. Además de los citados elementos, la mayoría de las sustancias orgánicas contienen oxígeno, muchas de ellas nitrógeno y, con menor frecuencia, azufre, fósforo y otros elementos. Consecuentemente, el proceso de analizar un compuesto orgánico desconocido se inicia con la determinación de su contenido en los elementos citados —análisis elemental— como primer paso para el establecimiento de su fórmula empírica. En 1923 se concede el premio Nobel de química a Fritz Pregl “por su invención del método de microanálisis de las sustancias orgánicas”, según figura textualmente en el acta de la Real Academia Sueca de las Ciencias. Estrictamente hablando, Pregl no *inventó* los métodos químicos de análisis elemental orgánico, sino que *adaptó* métodos ya entonces utilizados a una escala de trabajo del orden de 100 veces más pequeña, lo que le permitió partir de muestras de unos pocos miligramos.

Para comprender la evolución del análisis elemental y su situación cuando Pregl comienza sus trabajos, a principios del siglo XX, conviene remontarse a los últimos años del siglo XVIII, en los que el gran químico francés Antoine Laurent Lavoisier, nacido en París en 1743, intentaba analizar cuantitativamente las sustancias orgánicas mediante la determinación de su contenido en carbono e hidrógeno. Lavoisier describió los procedimientos empleados en su libro *Traité élémentaire de chimie* [2], publicado en 1789, y para cuya preparación encontró en su esposa una activa colaboradora (fue Mme. Lavoisier quien dibujó cuidadosamente los complicados montajes experimentales que lo ilustran). A diferencia de los experimentos de análisis de sustancias orgánicas que se habían realizado hasta entonces, cuya etapa inicial era la destilación de la muestra, el método de Lavoisier se iniciaba con su combustión, bien en presencia de aire o de oxígeno, o bien en presencia de clorato potásico u

óxidos metálicos como sustancias suministradoras de oxígeno, para medir a continuación las cantidades de dióxido de carbono y de agua producidas en la combustión. Aunque los resultados obtenidos por Lavoisier fueron satisfactorios sólo en una pequeña parte, sus contribuciones constituyen, ciertamente, las bases químicas del análisis orgánico, cuya metodología habría de desarrollarse a lo largo del siglo XIX, desgraciadamente ya sin el concurso del propio Lavoisier. El rigor del pensamiento científico de Lavoisier, y la superioridad intelectual demostrada en cierta polémica que se desarrolló en el seno de la Academia Francesa de las Ciencias despertaron recelos en algunos académicos que habían alcanzado cierto poder en la recién iniciada Revolución francesa, entre los que se hallaba el radical Marat. A instancias de éste, Lavoisier fue despojado de los cargos políticos y académicos que ocupaba y, cuatro años más tarde, detenido, juzgado, condenado y ejecutado en mayo de 1794, a la edad de 50 años. No resulta fácil decidir qué produce más indignación en el pensamiento científico posterior a Lavoisier, si el hecho de haber truncado brutalmente la vida del científico en su plenitud creadora, o el desprecio con el que, tras su detención, fue tratada su obra científica: cuando alguien quiso interceder ante el tribunal que lo juzgó, señalando que el acusado no era un contrarrevolucionario sino un científico, el juez Coffinhals respondió con la tristemente célebre frase: “La República no necesita sabios”. El matemático Lagrange, contemporáneo de Lavoisier, diría ante este dramático desenlace: “Ha bastado un instante para hacer caer su cabeza, mientras que, tal vez, cien años no serán suficientes para reproducir otra semejante”.

Tras Lavoisier, los también franceses Berthollet [3], Gay-Lussac y Thénard [4] diseñaron diferentes dispositivos para el análisis elemental de sustancias orgánicas, basados también en la combustión de la muestra. Pero fue Jöns Jacob Berzelius (1779-1848), médico y químico sueco, quien introdujo las modificaciones más sustanciales en los métodos de análisis elemental: mejoró la eficacia de la combustión llevándola a cabo en un tubo horizontal (Lavoisier empleaba una campana de vidrio, mientras que Berthollet y Gay-Lussac y

Thénard usaban un tubo en posición vertical) y simplificó notablemente los procedimientos de medida del agua y del dióxido de carbono producidos en la combustión [5], consiguiendo con todo ello resultados mucho más exactos que los que proporcionaban los métodos precedentes.

A pesar de todo, los métodos de Berzelius fueron criticados con cierta aspereza por su contemporáneo Liebig, quien los consideró extremadamente lentos. Justus Liebig (1803-1873) fue un químico alemán cuya actividad destacó principalmente en la química orgánica, pero también en el análisis químico, la agroquímica y la química alimentaria. Aun siendo un científico prestigioso en su tiempo, sus ingresos profesionales no eran muy sustanciosos, por lo que durante la mayor parte de su vida pasó apuros económicos, lo que le causaba depresiones y bruscos cambios de humor. Llegó incluso a pensar en el suicidio, como consta en la correspondencia que mantuvo con sus colegas Berzelius y Wöller. Este último atribuía las crisis anímicas de Liebig a lo que en su particular argot denominaba *hysteria chemicorum* (lo que hoy tal vez sería diagnosticable como ansiedad o *stress*). En la búsqueda de fuentes de ingresos adicionales, Liebig montó, inicialmente sin éxito, algunas pequeñas industrias en el campo alimentario, hasta que encontró aplicación práctica a una idea propia que había sugerido en alguno de sus escritos: la posibilidad de obtener extractos de carne que permitieran su conservación. En cierta ocasión llegó a su conocimiento la existencia de excedentes de vacuno en la Pampa argentina (donde, al parecer, por entonces se apreciaba más la piel que la propia carne), y pronto encontró socios para financiar su proyecto, cuyos resultados fueron excelentes. De hecho, la fabricación y comercialización de extractos de carne con su propio nombre permanece hasta nuestros días. Es muy probable que, a nivel popular, el nombre de Liebig sea más conocido por la sopa “de sobre” que por sus contribuciones a la química orgánica o al análisis químico...

Volviendo al campo del análisis elemental, la principal contribución de Liebig fue el diseño, en 1831, de un aparato para llevar a cabo la combustión de las muestras [6] que mejoraba el sistema de calentamiento de

Berzelius. Asimismo introdujo la determinación del dióxido de carbono mediante pesada, previa retención del gas en hidróxido potásico, en sustitución de la medida del volumen de gas como hasta entonces se había hecho.

La determinación del contenido de nitrógeno en sustancias orgánicas no se consiguió con resultados satisfactorios hasta que Dumas mejoró, en 1831, un complicado y tedioso método que había propuesto Liebig. Jean Baptiste André Dumas (1800-1884) fue primero aprendiz de farmacia en el sur de Francia, estudió química en Ginebra y, tras pasar por la Escuela Politécnica de París como ayudante de Química, llegó a ser nombrado profesor de la Universidad de La Sorbona. Dumas es considerado por muchos químicos orgánicos el fundador de esta rama de la química. Destacó por su escrupuloso trabajo de laboratorio y por la exactitud de los resultados que obtenía en sus experimentos. Intelectual y polifacético, Dumas destacó también en la política (fue ministro de Agricultura y Comercio y alcalde de París), reconociéndosele a su muerte, con un funeral de estado, los servicios que había prestado a su país.

La determinación de nitrógeno en compuestos orgánicos por el método de Dumas se basa en la reducción de los óxidos de nitrógeno formados en la combustión de las muestras, haciéndolos pasar por un tubo conteniendo cobre metálico a elevada temperatura, para medir después volumétricamente el gas nitrógeno producto de dicha reducción [7]. Este método ha experimentado pocos cambios desde que fue propuesto, pero resultaba tedioso a otros químicos que intentaron aplicarlo.

Como alternativa a la determinación del nitrógeno orgánico por combustión de la muestra, y tras algunos intentos fallidos, el danés Johan Gustav Christoffer Thorsager Kjeldahl (1849-1900) publicó en 1883 un método basado en la conversión del nitrógeno en amoníaco por vía húmeda (digestión con ácido sulfúrico concentrado), seguida de destilación del amoníaco y su determinación volumétrica [8]. Aunque el método de Kjeldahl no es aplicable a muchos compuestos orgánicos nitrogenados debido a la conversión in-

completa del nitrógeno en amoníaco, conduce, no obstante, a resultados exactos cuando se aplica a muestras que contienen nitrógeno protéico.

El primer método para la determinación de azufre en sustancias orgánicas fue propuesto en 1830 por los franceses Henry y Plisson [9], quienes transformaban dicho elemento en dióxido de azufre mediante tratamiento con corriente de oxígeno en presencia de óxido de hierro y arena de cuarzo. Cuatro años después aparecen casi simultáneamente dos publicaciones, una del propio Henry [10] y otra del alemán Zeise [11], en las que, siguiendo tratamientos distintos, se transforma el azufre en sulfato para su posterior determinación gravimétrica, siendo éstas, esencialmente, las bases del método que se sigue actualmente para la microdeterminación de azufre orgánico.

Entre 1860 y 1870, el químico alemán Georg Ludwig Carius (1829-1875) desarrolla un método que permite determinar azufre y halógenos en sustancias orgánicas, basado en la conversión de dichos elementos en sulfato y haluros, respectivamente, mediante un tratamiento común: tratamiento con ácido nítrico en presencia de cloruro de bario y nitrato de plata, como paso previo a las correspondientes determinaciones gravimétricas [12-14].

Coincidiendo con el desarrollo de la bioquímica y la fisiología, los químicos orgánicos de finales del siglo XIX y principios del XX comenzaron a interesarse por la química de los seres vivos, animales y vegetales, y de las sustancias de esta procedencia. El aislamiento y purificación de las sustancias orgánicas presentes en los productos naturales requería costosos y elaborados procedimientos, por lo que no resultaba fácil disponer de cantidades de muestra suficientes para proceder a su análisis elemental mediante los métodos al uso (entre 0.2 y 2 gramos). Resultaba, por tanto, necesario reducir drásticamente la escala de trabajo para poder analizar cantidades de muestra que habrían de ser unas cien veces más bajas. Hubo dos hechos que posibilitaron esta reducción: por una parte, la construcción de balanzas de gran sensibilidad (microbalanzas) y, por otra, la adaptación de los métodos de análisis ele-

mental a la nueva escala de trabajo, lo que se conoce con el nombre de *microanálisis*.

La primera microbalanza fue diseñada en 1903 por el químico-físico alemán Walther Hermann Nernst (1864-1941), más conocido en el ámbito científico por sus trabajos en termoquímica y termodinámica química, por los que le fue concedido el premio Nobel de química en 1920. La microbalanza de Nernst, basada en la torsión de una fina fibra de cuarzo, presentaba una extremada sensibilidad, pero su capacidad o carga estaba limitada a unos cuantos centigramos [15], lo que le restaba utilidad en análisis químico. Unos años más tarde, en 1911, Wilhelm Kuhlmann construyó en Hamburgo una microbalanza destinada al trabajo con metales preciosos que alcanzaba una sensibilidad de 0.01 a 0.02 mg. La microbalanza de Kuhlmann desempeñaría un papel crucial en el desarrollo del microanálisis llevado a cabo por Pregl en Austria.

La microquímica y su faceta analítica, el microanálisis, se inician a principios del siglo XX en las dos universidades de la ciudad austríaca de Graz. La Universidad Técnica de Graz es la más moderna —había sido fundada en 1811— y en ella Friedrich Emich (1860-1940), que ejerció como profesor durante varias décadas, contribuyó decisivamente al desarrollo de las técnicas microquímicas, y particularmente al microanálisis inorgánico. Así, Emich, en colaboración con Donau, había desarrollado en 1909 el primer método de microdeterminación de halógenos [16]. Aunque Emich es considerado uno de los pioneros de la microquímica, el término microanálisis va unido indisolublemente al nombre de Fritz Pregl (Figura 1) y a la antigua y afamada Universidad de Graz, cuya fundación, en 1585, había sido impulsada por los jesuitas, y que había tenido en sus aulas a científicos de enorme prestigio (Johannes Kepler había enseñado en ellas matemáticas y retórica antes de trasladarse a Praga, en 1600, por motivos religiosos).

Pregl había nacido en 1869 en Laibach (la actual Ljubliana), entonces bajo el dominio del imperio austro-húngaro. Estudió medicina en la universidad de Graz, consiguiendo tras su graduación una plaza docente en el



Figura 1. Fritz Pregl (1869-1930).

Instituto de Fisiología de la misma universidad, donde pronto fue conocido por su extraordinaria destreza e ingenio en el trabajo de laboratorio. Tras dos breves estancias en 1903 en Alemania, donde trabajó primero en la universidad de Leipzig con Wilhelm Ostwald, premio Nobel de química en 1909, y después en la universidad de Berlín con Emil Hermann Fischer, quien también había sido distinguido con dicho galardón en 1902, el interés científico de Pregl empezó a desplazarse desde la medicina clínica hacia la fisiología, la bioquímica y el análisis químico. De regreso a Graz, es contratado por el Instituto de Química Médica en 1905, y nombrado médico forense en 1907, puestos que desempeña hasta 1910.

Durante estos cinco años en Graz es cuando Pregl concibe la metodología del microanálisis, como consecuencia de sus propias necesidades en el trabajo de investigación que por entonces desarrollaba, centrado en el análisis de las proteínas extraídas de la bilis y de la orina. El problema con que se enfrentaba era que los métodos tradicionales de análisis elemental para carbono, hidrógeno y nitrógeno (debidos a Liebig y a Dumas) requerían cantidades de muestra muy superiores a las que Pregl podía aislar a partir de los fluidos fisiológicos. No sin cierta dosis de ironía, el propio Pregl describiría sus reflexiones al respecto en el discurso que pronunció en la Academia Sueca

de las Ciencias el 12 de diciembre de 1923 en el acto de recepción del premio Nobel de química que le había sido concedido [17]:

“... durante el tiempo en el que estuve investigando una sustancia que podía obtenerse sólo en cantidades extraordinariamente pequeñas, me vi obligado a decidir entre procesar toneladas de material o buscar nuevos métodos que me permitieran alcanzar resultados analíticos correctos usando cantidades mucho más pequeñas. Decidí que ésta última sería la forma de actuar. El plan más obvio fue aplicar reducciones a todas y cada una de las cosas, es decir, mover el punto decimal uno o dos lugares a la izquierda, no sólo en relación a la cantidad de sustancia, sino también en relación a todos los aparatos implicados, cantidades de reactivos, etc.”

En 1910, Pregl se traslada a la universidad de Innsbruck, donde ha sido nombrado profesor de Química Médica, siendo allí donde, durante tres años, inicia el desarrollo experimental de los métodos de microanálisis que había proyectado en la universidad de Graz. Se interesa por la microbalanza de Kuhlmann y consigue la colaboración de éste para que perfeccione el diseño de la misma siguiendo sus propias sugerencias, tendentes a alcanzar unas mejores prestaciones en el trabajo microanalítico. De esta forma, Pregl consigue disponer de una microbalanza que unía a una capacidad de hasta 20 g una exactitud de 0.001 mg [18]. En 1913 Pregl regresa a la universidad de Graz, también como profesor de química médica, donde continúa cuatro años más con su trabajo experimental, trabajo que lleva a cabo prácticamente solo, con suma dedicación, habilidad e ingenio. Salvo una comunicación sobre su método de microanálisis de carbono, hidrógeno y nitrógeno [19], Pregl no publica los resultados parciales de su investigación. Como un perfeccionista incorregible, prefiere mejorar paciente, sistemática y minuciosamente sus métodos hasta que considera que pueden darse a conocer en su conjunto, lo que hace en 1917 con la publicación de su libro *Die quantitative Mikroanalyse (El microanálisis cuantitativo)* [20], del que se han hecho siete ediciones en alemán (la última en Viena, en 1958), y que ha sido traducido también al francés, inglés y ruso.

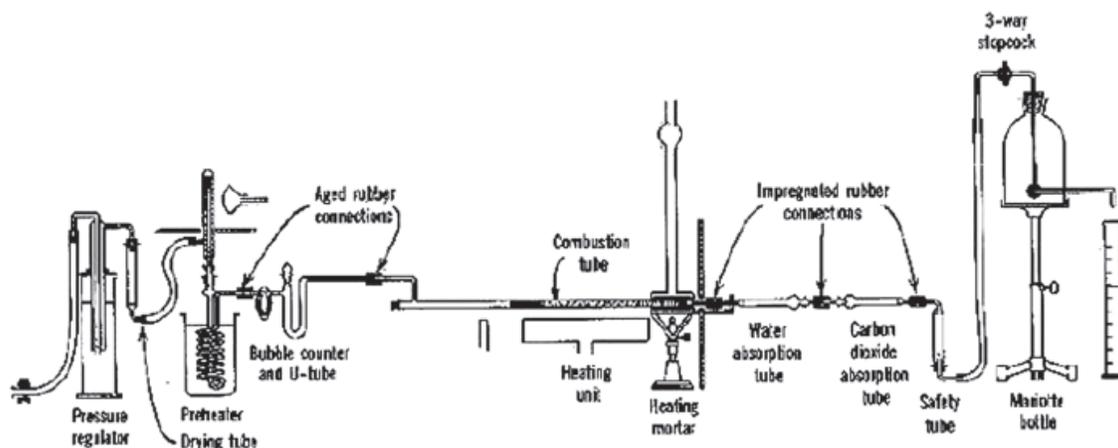


Figura 2. Aparato de combustión de Pregl.

El método de Pregl se basa esencialmente en el procedimiento de Liebig para la determinación de carbono e hidrógeno, el de Dumas para la determinación de nitrógeno y el de Carius para la determinación de azufre y halógenos, incluyendo asimismo procedimientos para la determinación de algunos grupos funcionales, como carboxilo, metoxi y metilimida. La adaptación llevada a cabo por Pregl de estos procedimientos a la escala microanalítica no fue, en contra de los que pudiera parecer, algo trivial: debido a la reducción de la escala de trabajo aparecían errores considerables que habían pasado inadvertidos en la escala macroanalítica, y cuya solución requirió grandes dosis de inventiva (Figura 2). Así, las interferencias a las que daba lugar la presencia de nitrógeno, azufre o halógenos en la microdeterminación de carbono e hidrógeno fueron eliminadas mediante lo que denominó *relleno universal* del tubo de combustión, cuya función era, en palabras del propio Pregl, “retener todo lo que no fuese dióxido de carbono o vapor de agua”. Dicho relleno consistía en óxido de cobre, cromato de plomo, plata metálica y dióxido de plomo, mezcla que aseguraba la retención de los gases de carácter ácido causantes de los errores en la determinación del carbono. También en la microdeterminación de carbono e hidrógeno, Pregl advirtió la aparición circunstancial de errores por exceso, observando después que aquéllos sólo se producían cuando los tubos de caucho que utilizaba para la conducción del oxígeno empleado en la combustión eran nuevos, pero no

cuando habían sido objeto de un uso continuado. Pregl sospechó que el caucho nuevo desprendía sustancias volátiles hidrocarbonadas que eran arrastradas por el oxígeno, por lo que decidió aplicar un tratamiento prolongado con oxígeno a los tubos antes de su uso, con lo cual conseguía un envejecimiento artificial del caucho y, con ello, la desaparición de los errores. Uno de los ejemplos más evidentes de la magnificación que se produce en algunos errores al trabajar en la escala microanalítica lo constituye la medida del volumen de nitrógeno en la microdeterminación de dicho elemento por el procedimiento de Dumas: el volumen de la delgadísima película de disolución que recubre las paredes del recipiente de medida del gas es suficiente para producir errores considerables que, sin embargo, pasan por completo desapercibidos en la escala macroanalítica. En el ya citado discurso pronunciado en el acto de recepción del premio Nobel de química [17], Pregl describió con convicción éstos y otros problemas que se había encontrado a lo largo de sus investigaciones, así como la solución que había hallado a cada uno*.

* La reducción de escala que aplicaba Pregl a sus experimentos por un factor de 100, afectaba a las masas y a los volúmenes, pero no a las superficies, que habrían de resultar reducidas sólo por un factor de 10, como puede deducirse mediante consideraciones geométricas elementales. Como consecuencia de esto, cualquier error asociado a fenómenos de superficie debería de manifestarse, en términos relativos, en una proporción 10 veces mayor trabajando en la escala microanalítica que haciéndolo en la escala macroanalítica.

Aun hoy, después de transcurridos casi noventa años, se sigue reconociendo la extraordinaria valía del trabajo de Pregl: la optimización de los métodos empleados, el diseño y construcción de los aparatos de combustión y medida, el montaje de los equipos, todo ello fue obra de su ingenio y esfuerzo personal. Aunque, como se señaló anteriormente, Pregl no inventó la química del análisis orgánico, la reducción de la escala de trabajo que fue capaz de conseguir sin merma de exactitud en los resultados habría sido sencillamente imposible sin las cualidades y recursos de un verdadero inventor: mente imaginativa, destreza en el trabajo de laboratorio y grandes dosis de paciencia.

Pregl fue un científico cuyo trabajo fue reconocido por sus coetáneos: en 1914 la Academia Imperial de la Ciencia de Viena le concede el premio Lieben de química; en 1920 la Universidad de Göttingen le nombra doctor honorario; en 1921 es elegido miembro correspondiente de la Academia de las Ciencias de Viena y, finalmente, en 1923 la Academia Sueca de las Ciencias le otorga el premio Nobel de química.

La dedicación de Pregl al trabajo científico fue absoluta; hombre más bien solitario, no llegó a casarse, y había conseguido ahorrar un sustancioso capital que cedió en 1930, poco antes de su muerte, a la Academia de las Ciencias de Viena con la finalidad de crear un fondo con el que se premiase cada año a un científico austríaco distinguido por sus trabajos en microquímica. Pregl murió ese mismo año, a la edad de 61 años. Desde 1931, y hasta la actualidad, la Academia otorga el premio Fritz Pregl.

Muchos de los químicos austríacos distinguidos con el premio Fritz Pregl han alcanzado renombre fuera de sus fronteras, tanto en el campo del microanálisis como en otros de la química analítica. Tal es el caso de Fritz Feigl, que obtuvo el premio en su primera edición (1931), y cuya técnica de ensayos a la gota para la identificación de sustancias inorgánicas y orgánicas [21,22] se conoce y utiliza universalmente, o el de Anton Benedetti-Pichler, premio Pregl en 1933, quien, terminada la guerra

Europea, había sido discípulo de Emich y del propio Pregl en Graz, y que puede considerarse el introductor de la microquímica en Estados Unidos. Benedetti-Pichler se trasladó en 1929 a la Universidad de Nueva York, en la que organizó el laboratorio de microanálisis, disciplina que enseñó primero en la universidad y después en el Queens College, hasta 1964. En 1935 fue uno de los fundadores de la inicialmente denominada *New York-New Jersey Section of the Microchemical Society*, que se convirtió en 1963 en la *American Microchemical Society*. Entre los químicos analíticos actuales que han sido distinguidos con el premio Fritz Pregl se encuentran Robert Kellner (Universidad Técnica de Viena), premiado en 1977, y Hans Malissa (Universidad de Salzburgo), que lo fue en 1965 y 1992.

Después de la publicación de la obra de Pregl han sido numerosos los investigadores que han trabajado en la mejora de sus métodos, principalmente en la eficacia del proceso de combustión. En 1943 Belcher y Spooner, primero en Sheffield y después en Birmingham (Gran Bretaña) introducen en la microdeterminación de carbono e hidrógeno una modificación a la que denominan *empty-tube (tubo vacío)* o de combustión rápida [23], caracterizado por la ausencia de relleno, un mayor flujo de oxígeno y una temperatura de trabajo de 800°C, lo que resulta en un tiempo de combustión cuatro veces más corto que el del método clásico de Pregl. Belcher e Ingram utilizan más adelante un diseño similar para la microdeterminación de azufre y halógenos [24]. Una alternativa sustancialmente diferente a los anteriores métodos de combustión fue desarrollada en 1955 por Schöniger en Graz (Austria), y consiste básicamente en llenar de oxígeno un matraz tipo *erlenmeyer*, que ya contiene la muestra y una disolución de hidróxido potásico y peróxido de hidrógeno, y taponarlo herméticamente después de iniciar la combustión [25]. Este método, conocido con la denominación de *oxygen-flask (matraz de oxígeno)* se ha aplicado también a la determinación de carbono e hidrógeno, y ha sido objeto posteriormente de numerosas modificaciones.

Un componente de las sustancias orgánicas que no podía ser determinado por el

método de Pregl es el oxígeno. En 1939, el alemán Zimmermann desarrolló un procedimiento para la microdeterminación de oxígeno basado en la pirolisis de la muestra en presencia de un gran exceso de carbono empleando platino como catalizador, condiciones en las que el oxígeno es transformado cuantitativamente en monóxido de carbono [26]. A lo largo del siglo XX la determinación de oxígeno en sustancias orgánicas puras o en sus mezclas se ha hecho más y más necesaria en muchos procesos de la industria y la tecnología químicas. Así sucede, por ejemplo, en el control del grado de transformación en ciertas reacciones de polimerización o de condensación, o el control de calidad de los modernos combustibles desde que, hace unos años, el plomo tetraetilo que se empleaba como antidetonante hubo de ser sustituido por compuestos orgánicos oxigenados. Aunque se han propuesto diferentes modificaciones al método de Zimmermann, en esencia es dicho método el que aplica en la actualidad.

En los años sesenta los métodos de microanálisis elemental comienzan a mostrar una clara tendencia a la simplificación y la automatización, introduciéndose la cromatografía de gases como forma de separación de

los gases procedentes de la combustión, y las medidas de conductividad térmica como alternativa a la determinación gravimétrica de los mismos. Pronto aparecen los primeros analizadores automáticos comerciales: Coleman Instruments Inc. (1961-1962), F & M Scientific Corp. (1963), Fisher Scientific Co. (1963) y Technicon Instruments (1963), a los que se incorporarán después American Instruments Co. y Perkin Elmer Corp. (1965), y Hewlett Packard (1970). El procesado de datos mediante acoplamiento del ordenador al analizador elemental tiene lugar en la década de los ochenta.

A pesar de los vertiginosos cambios que se han producido en la metodología del microanálisis elemental en los últimos treinta o cuarenta años, sobre todo con la generalización del uso de los analizadores automáticos, el proceso de mineralización continúa basado esencialmente en el tubo de combustión del método clásico de Pregl. Las modificaciones más sustanciales se han producido en las etapas de separación y cuantificación de los gases. En algunos analizadores automáticos la separación de lleva a cabo, tal como se hace en el método clásico de Pregl, mediante absorción secuencial de los gases (Figura 3), mientras que

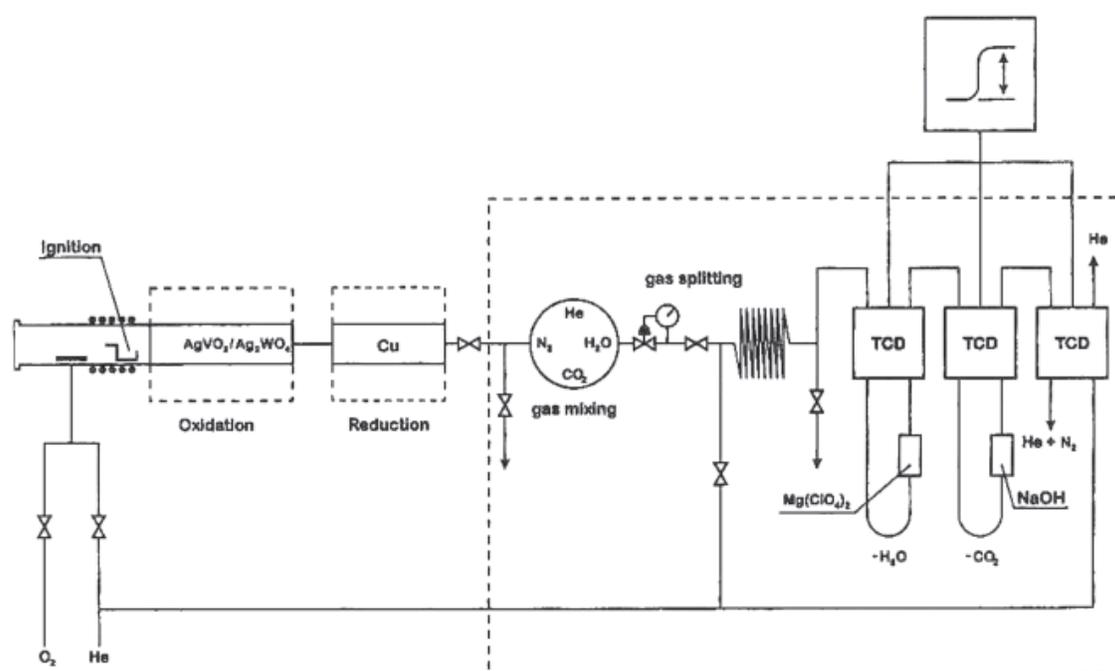


Figura 3. Esquema de un analizador elemental automático con separación secuencial de los gases.

en otros se ha incorporado una columna de cromatografía de gases, con lo que la separación tiene lugar de forma continua (Figura 4). Por lo que se refiere a la cuantificación de los gases, la medida gravimétrica (absoluta) del método clásico ha sido reemplazada por medidas diferenciales de conductividad térmica, siendo ésta la forma de detección que suelen llevar incorporada ambos tipos de analizadores.

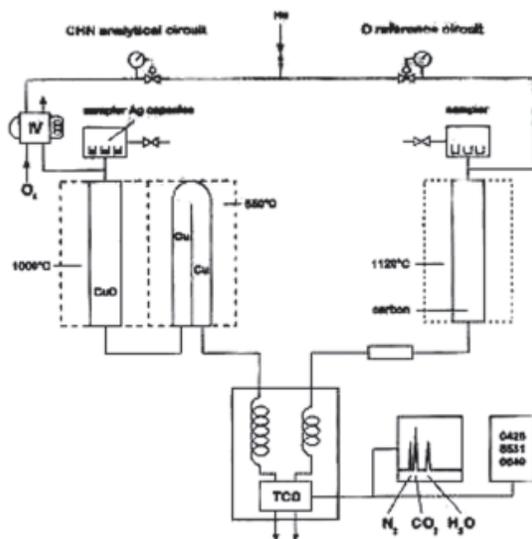


Figura 4. Esquema de un analizador elemental automático con separación continua de los gases mediante una columna cromatográfica.

2. Cromatografía

Cuando de trata de analizar químicamente muestras complejas, pocas veces puede llevarse a cabo la determinación individual de sus componentes directamente en la muestra. Lo habitual es que sea necesario aplicar una o varias etapas previas de separación para evitar interferencias entre unos componentes y otros que puedan dar lugar a la aparición de errores en los resultados. La cromatografía es una técnica de separación, sin duda alguna la más versátil y eficaz de las que dispone el químico, y está basada en las diferencias de movilidad de los componentes de una mezcla (denominados solutos) como consecuencia de las fuerzas relativas que se establecen entre cada uno de los solutos y dos fases no miscibles, denominadas fase móvil y fase estacionaria.

En 1952, los británicos Martin y Synge reciben el premio Nobel de química “por su invención de la cromatografía de partición”. Aunque la contribución de Martin y Synge fue esencial para comprender las bases teóricas de la cromatografía, por aquel entonces dicha técnica distaba mucho de ser una novedad. Es necesario remontarse a los primeros años del siglo XX para encontrar por primera vez el término *cromatografía*, introducido por el botánico ruso Mijail Tsvet* en sus primeras publicaciones. Se pueden hallar referencias a algunos experimentos bastante anteriores que podrían considerarse precursores de la cromatografía, como los del médico alemán Friedrich Runge, publicados entre 1834 y 1850, en los que describe la formación de anillos concéntricos coloreados al depositar una gota de disolución sobre un trozo de papel de filtro [27-30], o los de Christian Friedrich Schönbein y Friedrich Goppelsröder, profesores de química de la Universidad de Basilea, quienes, entre 1861 y 1878 desarrollaron lo que denominaron *análisis capilar* empleando tiras de papel de filtro para la separación de numerosas sustancias orgánicas [31,32]. En el primer *Congreso Internacional del Petróleo*, celebrado en París en 1900, el norteamericano Day presenta los resultados obtenidos en la separación de fracciones del petróleo empleando un lecho de arcilla de batán [33,34]. Los estudios de Day se desarrollaban en Estados Unidos en los mismos años en que Tsvet estudiaba en Polonia la separación de los pigmentos coloreados contenidos en extractos de plantas, muy probablemente sin que ninguno de estos científicos tuviese noticia de los trabajos realizados por el otro. No parece que Day continuase con sus investigaciones en este campo, por lo que actualmente se reconoce a Tsvet como el único y auténtico *padre* de la cromatografía.

* Se han encontrado referencias bibliográficas con las grafías Tswett, Tsvett y Tsvet. Se ha optado por utilizar esta última por ser la transcripción más sencilla del alfabeto cirílico al latino, y porque es también la que suele aparecer en textos escritos originariamente en ruso.



Figura 5. Mijail Semenovitch Tsvet (1872-1919).

Mijail Semenovitch Tsvet (Figura 5), de padre ruso y madre italiana, nació en 1872 en un hotel de Asti, al norte de Italia, durante un largo viaje que sus padres hubieron por ello de interrumpir en dicha ciudad. La madre de Mijail fallece poco tiempo después, y su padre, un alto funcionario del gobierno del Zar, decide enviarlo a Suiza para que reciba una educación adecuada. Tsvet estudia primero en Lausana y luego se traslada a Ginebra, en cuya universidad estudia Química, Física y Botánica, para doctorarse en esta última disciplina en 1896, con una tesis titulada *Investigaciones sobre la fisiología de las células. Contribución al conocimiento del protoplasma, membranas plasmáticas y cloroplastos* [35], trabajo que fue considerado de especial relevancia, debido, según expresara textualmente uno de los componentes del tribunal “a la complejidad de su materia y a la forma en que ha sido desarrollado por su autor”.

A los 24 años Tsvet abandona Suiza y, tras algunas breves estancias en centros de investigación en Italia, regresa a su país con la ilusión de optar a un puesto de profesor en la universidad para proseguir sus estudios sobre fisiología vegetal. Pronto advierte las dificultades casi insalvables que va a encontrar. La política académica de la Rusia de finales del siglo XIX era rígida en extremo, y exigía a un aspi-

rante a profesor universitario haber obtenido los grados de *magister* (licenciado) y doctor en una universidad rusa, sin que se contemplase posibilidad alguna de aplicar convalidaciones: el flamante título de *Ph. D.* en Botánica expedido por la Universidad de Ginebra, en Rusia era papel mojado. Para subsistir, Tsvet acepta en 1897 un contrato temporal en un laboratorio de biología de San Petersburgo. Allí, superando las dificultades idiomáticas —su lengua materna era el francés y su educación, occidental— prepara una nueva memoria de licenciatura, que presentará en 1901, no sin antes superar, en 1899, los exámenes de botánica y química en la Universidad de Kazan. La presentación de la tesis de licenciatura, que dedica a la memoria de su padre, fallecido un año antes, le confiere el grado de *magister*, lo que le permite aceptar un puesto de ayudante en la Universidad de Varsovia (por entonces, el Gran Ducado de Polonia formaba parte del Imperio Ruso). Este trabajo estaba mal remunerado, y carecía de complementos de financiación para la investigación, por lo que Tsvet tuvo que recurrir a impartir clases en una escuela secundaria para poder costearla.

Superando sus dificultades económicas, Tsvet fue capaz de desarrollar en Varsovia un fructífero trabajo de investigación en el que estableció las bases de lo que más tarde denominaría *cromatografía de adsorción*, y que le mereció una distinción por la Sociedad Alemana de Botánica, de la que fue elegido miembro en 1902, y en cuya revista *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* publicó buena parte de sus trabajos. En 1903, en una reunión de la Sociedad de Científicos Naturales de Varsovia, Tsvet presentó una comunicación preliminar con el título *Sobre una nueva categoría de fenómenos de adsorción y sus aplicaciones en análisis biológico*, en la que se describía por primera vez el método cromatográfico, aunque sería en 1906 cuando el mismo Tsvet propone el término *cromatografía* en dos publicaciones en la revista de la Sociedad Alemana de Botánica [36,37]. En estos dos artículos Tsvet incluía un diagrama con el montaje experimental utilizado y describía el procedimiento que había seguido (Figura 6): depositaba un extracto de hojas verdes en éter de petróleo en la parte superior de una delgada columna

de vidrio rellena de carbonato cálcico y, a continuación, hacía pasar a través de la columna éter de petróleo. Los pigmentos que componían el extracto (diferentes formas de clorofila, xantofila y caroteno) avanzaban a lo largo de la columna con velocidades diferentes, dependiendo de la fuerza con que eran adsorbidos por el relleno de carbonato cálcico. El resultado era espectacular, y consistía en el establecimiento de varias franjas de distintos colores a lo largo de la columna que se podían distinguir con toda nitidez, lo que el propio autor describía de esta forma:

“...los diferentes componentes de la mezcla de pigmentos se distribuyeron en la columna de carbonato cálcico como los rayos luminosos en un espectro, lo que permite su análisis cualitativo y cuantitativo. La preparación obtenida como resultado de este experimento se ha denominado *cromatograma*, y el método, *cromatográfico*...”

“Los fenómenos de adsorción descritos no son, por supuesto, característicos solamente de los pigmentos de la clorofila; obviamente, varios compuestos químicos, sean coloreados o incoloros, pueden también separarse mediante este método.”

Tras contraer matrimonio en 1907 con Helena Trusiewicz, que trabajaba en la Biblioteca de la Universidad de Varsovia, Tsvet pudo satisfacer, un año después, su anhelo de ejercer como profesor universitario: fue nombrado profesor de Botánica y Microbiología en el Instituto Politécnico de Varsovia. En 1910 presentó su (segunda) tesis doctoral, esta vez en la Universidad de Varsovia, trabajo que, al igual que había sucedido catorce años antes con la tesis presentada en la Universidad de Ginebra, mereció elogiosos comentarios por parte del tribunal calificador, y que publicó ese mismo año en forma de monografía, escrita en ruso, con el título *Cromofilas en el mundo vegetal y animal* [38]. En 1911 se le concedió el Gran Premio de la Academia de las Ciencias de San Petersburgo, lo que le supondría, al fin, prestigio en los círculos científicos rusos y... una gratificación económica de mil rublos.

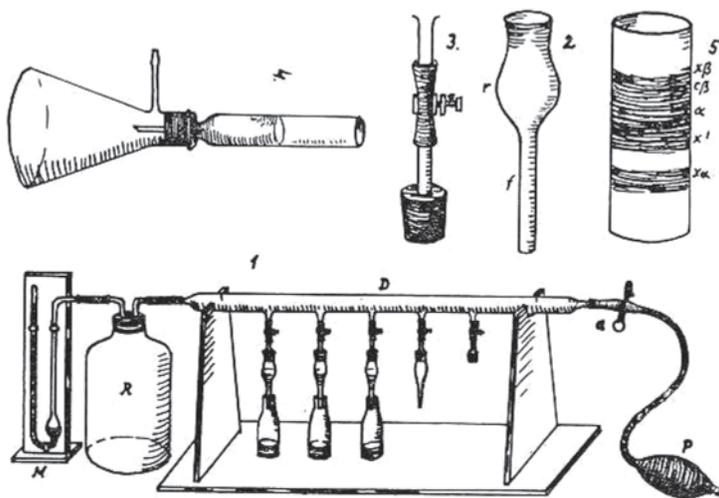


Figura 6. Aparato de Tsvet para separaciones cromatográficas.

Frente a alguna especulación más bien pintoresca (la palabra *tsvet* en ruso significa *color*), no parece que deba albergarse duda alguna de que lo que movió a Tsvet a denominar a su técnica *cromatografía* (del griego *chroma*, color y *graphos*, escritura) fue el hecho de que las sustancias por él separadas podían ser visualizadas debido a sus diferentes colores. Pero esto era una mera circunstancia, y el propio Tsvet así lo advertía en el mismo artículo:

Desafortunadamente, la era de bonanza científica, social y económica de Tsvet no iba a ser muy duradera: en 1912 su salud empieza a deteriorarse, lo que afecta a su ritmo de trabajo. Dos años después estalla la guerra europea, y en 1915 las tropas alemanas llegan a Varsovia, lo que obliga a Tsvet a abandonar la ciudad, trasladándose a Moscú con todos sus libros y archivos. Enfermo ya de tuberculosis, estos acontecimientos aceleran su deterioro físico, del que trata de recuperarse trasladándose una temporada al Cáucaso. En 1917 es propuesto para ocupar una cátedra en la Universidad de Tartu (Estonia) pero, unos meses más tarde, ante la proximidad del ejército alemán, la propia universidad como institución decide trasladar su sede a Voronezh, donde es refundada como Universidad de Voronezh, de cuyo primer

claustro de profesores, debido a estas circunstancias, formó parte Mijail Tsvet. La Gran Guerra terminó ese mismo año, pero Tsvet estaba ya muy enfermo: la tuberculosis se le había declarado abiertamente, y causaba su fallecimiento en el verano de 1919, a los 47 años de edad. Pasados los años, parece como si el destino no permitiera que las tribulaciones de Tsvet cesaran siquiera con su muerte: durante la segunda guerra mundial, el cementerio del monasterio Alekseev, donde reposaban sus restos, fue destruido por los bombardeos, y desde entonces su tumba nunca pudo ser hallada.

Pese a su más bien corta vida, Tsvet fue un investigador prolífico. Entre 1894 y 1919 publicó más de 70 artículos científicos y la citada monografía en la que explicaba el método cromatográfico [38]. Pero el hecho de que ésta estuviese escrita en ruso y nunca fuera traducida a otros idiomas, dificultó sin duda la difusión de su obra científica y retrasó sustancialmente el desarrollo de la técnica cromatográfica.

Tsvet se consideraba un botánico, y así era considerado también por los científicos coetáneos. Su interés científico siempre estuvo enfocado hacia los pigmentos de las plantas, pero el concepto que tenía de la metodología de la investigación le hacía apartarse frecuentemente del empirismo de las meras descripciones para buscar explicaciones teóricas a los resultados que obtenía. Hoy Tsvet sería considerado un bioquímico o un biofísico, o tal vez ambas cosas. En sus trabajos se pueden encontrar no solamente los brillantes resultados de sus investigaciones, sino también ideas y reflexiones sumamente valiosas para el futuro desarrollo de la cromatografía. En sus artículos se advierte un especial interés por las características de la fase móvil empleada en sus separaciones. Así, subrayaba que se puede conseguir una mayor eficacia empleando como fase móvil no un único disolvente, sino varios, bien de forma sucesiva (lo que muchos años después se llamaría *elución en etapas*) o bien en forma de mezcla de composición variable (lo que constituye una clarísima predicción de la técnica que actualmente se conoce como *elución en gradiente*). También reclamaba la atención sobre el tamaño de grano de las par-

tículas del material adsorbente que rellena la columna, haciendo ver el efecto positivo que el uso de partículas de grano muy fino tenía sobre la eficacia de las separaciones, debido a la atenuación de los fenómenos de difusión responsables del ensanchamiento de las bandas, lo que actualmente constituye una de las bases de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), que no comenzaría a ser desarrollada hasta casi cincuenta años después.

Como suele suceder con los hombres de ciencia imaginativos y rupturistas, el quehacer científico de Tsvet fue controvertido, y suscitó polémicas que él nunca rehuyó. En 1905, durante su estancia en Varsovia, aparecieron unas publicaciones de Hans Molisch, profesor de Botánica de la Universidad de Praga, sobre los pigmentos extraídos de las algas. Tsvet comprobó que los resultados de Molisch diferían notablemente de los suyos propios, aún inéditos, por lo que publicó una carta en la misma revista que había recogido las publicaciones de aquél, en la que mostraba las diferencias advertidas en los resultados, aunque no describió la metodología que había empleado. Esto provocó la protesta de Molisch, a quien se unió F.G. Kohl, autor de un libro sobre carotenos. La respuesta de Tsvet no se hizo esperar, y se materializó en la publicación de los dos artículos ya referidos en la revista de la Sociedad Alemana de Botánica, la más prestigiosa de la especialidad, y en los que describía el método empleado y usaba la palabra cromatografía por primera vez para denominarlo [36, 37]. Las críticas de Molisch y Kohl fueron retomadas en 1907 por Leon Marchlewski, profesor en la Universidad de Cracovia, ciudad polaca que por entonces se hallaba bajo el dominio del imperio austro-húngaro. A las diferencias de índole académica que Marchlewski mantenía con Tsvet (a quien tachaba de arrogante, según decía, “por pretender cambiar la química de la clorofila con la ayuda de un simple experimento de filtración”) se sumaban otras de índole política más difíciles de solventar (para Marchlewski, nacionalista polaco, Tsvet era un invasor ruso en la Varsovia ocupada). Otro investigador contemporáneo de Tsvet manifiestamente crítico con los trabajos de éste, fue Richard Willstätter, profesor del Instituto Politécnico de Zürich y tal vez el químico orgá-

nico alemán más prestigiado de su tiempo. Willstätter trabajaba también en pigmentos vegetales, principalmente clorofilas, por lo que se interesó por los trabajos de Tsvet. Como la monografía de éste sólo había sido publicada en ruso, en 1913 encargó particularmente una traducción alemana de la misma para mejor estudiarla. Las discrepancias se centrarían en dos suposiciones de Willstätter: por una parte, que la cromatografía no podía ser una técnica útil con fines preparativos y, por otra, que las sustancias sufrirían necesariamente alteraciones químicas durante el proceso de separación. Ninguna de estas dos suposiciones era cierta, como demostró Tsvet y, según parece, el propio Willstätter reconoció más tarde. Tras incorporar la cromatografía, como método preparativo, a sus propias herramientas de trabajo, Willstätter obtuvo en 1915 el premio Nobel de química por sus investigaciones sobre las clorofilas, siendo así el primero de los más de veinte científicos que han accedido al citado galardón por descubrimientos para cuya consecución se han valido de las técnicas cromatográficas.

Debido, por una parte, a que los trabajos de Tsvet no fueron del todo comprendidos por los bioquímicos y químicos orgánicos de la época, principalmente alemanes, y, por otra, al hecho de que su monografía nunca fue traducida del ruso a otras lenguas, el método cromatográfico fue muy escasamente utilizado por sus contemporáneos, con lo que cayó en un olvido del que no saldría hasta la década de los años treinta. El inicio de este renacimiento tuvo lugar en 1922, gracias a un trabajo relativamente modesto del químico norteamericano Leroy Sheldon Palmer (1887-1944). Palmer había estudiado en la Universidad de Missouri, en el estado de Columbia y, tras un inicio en la investigación en el campo de la ingeniería química, ingresó como colaborador en el Instituto de Investigaciones Lácteas de la universidad de Missouri, para trasladarse en 1919 a la Universidad de Minnesota, donde permaneció hasta su muerte en 1944. Durante su estancia en la Universidad de Missouri, Palmer trabajó en el estudio de los pigmentos de la grasa de la leche, sobre lo que publicó, en 1914, varios artículos, en el primero de los cuales [39] empleó la técnica

cromatográfica de Tsvet, de la que tenía ciertos conocimientos a través de alguno de los artículos de Tsvet escritos en alemán o en francés que habían llegado a su poder. En 1922 Palmer publicó una monografía sobre los carotenoides y otros pigmentos [40], en la que describe algunos de los trabajos de Tsvet y la técnica cromatográfica. Esta monografía fue editada por la American Chemical Society, naturalmente en inglés, y fue por eso el medio a través del cual la cromatografía empezó a ser conocida por químicos de todo el mundo.

Uno de los primeros químicos europeos que tuvieron acceso a la monografía de Palmer era el austríaco Edgar Lederer (1908-1988). Lederer había estudiado química en la Universidad de Viena, donde presentó en 1930 su tesis doctoral sobre los alcaloides del indol, tras de lo cual se incorporó al equipo de Richard Kuhn (1900-1967), en el Instituto de Investigaciones Médicas de la Universidad de Heidelberg (Figura 7). Se daba la circunstancia de que Kuhn se había incorporado recientemente como profesor a dicha universidad, procedente del Instituto Politécnico de Zürich, donde había sido discípulo de Willstätter quien, como antes se ha señalado, se había distinguido como uno de los más furibundos críticos de Tsvet, y conservaba en su poder la traducción alemana de la monografía de éste. Willstätter cedió esta traducción a Kuhn, quien la llevó consigo a la universidad de Heidelberg. Allí Kuhn trabajó sobre los pigmentos presentes en la yema de huevo, pero no utilizó la cromatografía hasta que Lederer se integró en su equipo de trabajo. Cuando Kuhn le encargó que investigue la posibilidad de que la luteína de la yema de huevo sea una mezcla de xantina y xantofila, Lederer le comunica su intención de aplicar el método cromatográfico, que conocía superficialmente a través de la monografía de Palmer, por lo que Kuhn le facilitó la traducción alemana de la monografía de Tsvet. De esta forma, Lederer pudo acceder a las detalladas descripciones contenidas en el libro, y aplicar la técnica cromatográfica a sus estudios sobre la luteína. El resultado que obtuvo confirmaba las sospechas de Kuhn: a partir de una muestra de luteína de huevo se separaron dos bandas cromatográficas que contenían, respectivamente, zeaxantina y xantofila [41]. A par-

tir de entonces, tanto Lederer como otros colaboradores de Kuhn continuaron empleando la cromatografía, tanto a escala analítica en la separación de carotenos [42,43], como a escala preparativa [44].



Figura 7. Richard Kuhn (1900-1967) y Edgar Lederer (1908-1988).

Los trabajos de Kuhn y Lederer, publicados en 1931, fueron el detonante para que las técnicas cromatográficas empezasen a ser utilizadas en Europa de forma generalizada: se había producido el renacimiento de la cromatografía, 25 años después de los primeros artículos de Tsvet y 12 años después de su muerte. No deja de ser curioso que la traducción alemana del libro de Tsvet encargada expresamente por Willstätter para criticar el método cromatográfico sirviera, 18 años más tarde, para propiciar su renacimiento. En 1938, la Academia Sueca de las Ciencias otorgó el premio Nobel de química a Richard Kuhn por sus estudios sobre los carotenoides y las vitaminas. Sin embargo, el gobierno alemán, en poder de los nazis, nunca le concedió el permiso para acudir a Estocolmo. Kuhn recibió el premio en 1945, cuando finalizó la segunda guerra mundial.

En la década de los treinta la cromatografía ya se empleaba habitualmente en Europa, pero no en Estados Unidos, donde la bibliografía en alemán dificultaba su difusión. No obstante, la publicación en 1937 de la primera monografía sobre esta técnica [45] después de la que había publicado el propio Tsvet, de la que se hicieron dos ediciones alemanas en Viena y Berlín, supondría, cuatro

años después, el impulso necesario para que la cromatografía llegase a los laboratorios norteamericanos: uno de los autores de esta monografía, el húngaro Laszlo Zechmeister (1889-1972), emigró en 1940 a los Estados Unidos, donde fue contratado como profesor en el Instituto de Tecnología de California, y desde allí influyó para que la segunda edición alemana de su libro fuese traducida al inglés y editada en 1941 [46]. La edición en lengua inglesa alcanzó una rápida difusión, no sólo en Estados Unidos, sino también en Europa.

La cromatografía, tal como era entendida a principios de la década de los cuarenta, era un proceso basado en la *adsorción* (retención de las sustancias en la superficie de un sólido) y la separación de las mismas con ayuda de un líquido. En 1941, los británicos Martin y Synge publican el primer artículo sobre una nueva técnica cromatográfica: la *cromatografía de partición* proceso basado en la distribución de las sustancias entre dos líquidos en los que se *absorben* o disuelven en un grado que depende de sus propiedades [47]. Este artículo no solamente abría nuevos horizontes a la cromatografía, sino que contenía la teoría de la separación cromatográfica y postulaba la posibilidad de aplicar la técnica a la separación de gases, lo que, 11 años después, constituiría la cromatografía gas-líquido.



Figura 8. Archer J.P. Martin (1910-2002) y Richard L.M. Synge (1914-1994).

Archer John Porter Martin (1910-2002) nació en Londres y estudió en la Universidad de Cambridge, donde se graduó en bioquímica en 1932 y se doctoró en 1936. En 1938 se

trasladó a Leeds, donde fue contratado por un centro de investigación sobre la lana, la *Wool Industries Research Association*. Richard Laurence Millington Synge (1914-1994) nació en Liverpool y estudió física, química, fisiología y bioquímica también en la universidad de Cambridge, obteniendo el doctorado en 1941. En 1939 Synge había realizado un trabajo de investigación en la *Wool Industries Research Association* en Leeds, donde, junto con Martin, comenzaría a trabajar en la separación de los aminoácidos presentes en las proteínas de la lana. Martin había adquirido en Cambridge cierta experiencia en separaciones mediante extracción a contracorriente, y se sentía fuertemente atraído por esta técnica, introducida unos años antes por Lyman C. Craig. La extracción a contracorriente es una técnica de fundamento teórico muy claro, pero cuya puesta en práctica requiere un complicado aparato constituido por un elevado número de tubos mediante los cuales se van desplazando dos líquidos inmiscibles, en sentido contrario, y de forma secuencial.

En 1940, ya en Leeds, y con Synge como colaborador (Figura 8), Martin propuso a éste estudiar la separación de aminoácidos mediante extracción a contracorriente. Synge consideró que el benceno y el agua serían disolventes adecuados para ello, y construyó un aparato de 40 elementos para llevar a cabo los experimentos. La separación resultó satisfactoria, pero el aparato dio muchos problemas y requería una atención continua, por lo que Martin pasó un tiempo diseñando nuevos modelos, que después mostraba a Synge, quien, según palabras del propio Martin, terminó cansado de escuchar sus propuestas. Entonces Martin trató de poner en práctica una idea que había concebido tiempo atrás: la posibilidad de llevar a cabo una separación a contracorriente de forma continua, no secuencial, para lo cual tenía que conseguir desplazar los dos líquidos en sentidos opuestos simultáneamente, como si resbalasen uno sobre el otro. Naturalmente, esta forma de operar permitiría prescindir de la complicada máquina de tubos, pero su puesta en práctica no parecía fácil. Aún así, Martin y Synge prepararon una columna empaquetada con fibras paralelas de algodón y lana de forma que, poniendo agua en un extremo del tubo y

cloroformo en el otro, se produjese un flujo de corrientes paralelas y en sentido contrario de uno y otro disolvente. Los resultados, sin embargo, no fueron los deseados. En busca de nuevas soluciones, Martin decidió que no era necesario que los dos líquidos se movieran, sino que bastaría con que lo hiciera uno de ellos, siempre que se consiguiera fijar el otro convenientemente, por ejemplo reteniéndolo en la superficie de un sólido. En los primeros experimentos que llevaron a cabo con éxito, el líquido que habría de mantenerse inmóvil, o *fase estacionaria* (agua) se fijaba sobre gel de sílice, y esto constituía el relleno de la columna cromatográfica. En la parte superior de la columna se depositaba la mezcla de sustancias que se quería separar (aminoácidos acetilados), y finalmente se hacía pasar a través de la columna un líquido inmiscible con el agua, o *fase móvil* (cloroformo con algo de etanol), que arrastraba los componentes de la mezcla a velocidades distintas, consiguiéndose de esa forma su separación. Como los aminoácidos son incoloros, encontraron una forma de visualizar o revelar las bandas impregnando previamente el relleno de sílice con disolución de un indicador ácido-base (anaranjado de metilo), con lo que el resultado fue la formación de vistosas bandas de color rojo sobre un fondo anaranjado.

Después de presentar sus primeros resultados en una reunión de la *Biochemical Society* británica en junio de 1941, a finales de ese mismo año publicaron el artículo *A new form of chromatogram employing two liquid phases* [47], que presentaba primero la teoría de la cromatografía de partición y después la separación de aminoácidos contenidos en las proteínas. Así nació la cromatografía de partición o cromatografía líquido-líquido, como los autores la denominaron inicialmente. Martin y Synge recibieron en 1952 el premio Nobel de química por la invención de la cromatografía de partición. El trabajo de Martin y Synge mereció el siguiente comentario en la prestigiosa revista científica *Nature* [48]:

“Los métodos desarrollados por Martin y Synge son probablemente únicos en virtud de su sencillez y elegancia de concepción y ejecución, y también por el extenso alcance de su aplicación. Es probable que su invención sea considerada

por las futuras generaciones como una de las más importantes piedras angulares en el desarrollo de las ciencias químicas”.

Martin y Synge, a quienes se unieron después A.H. Gordon y R. Consden, continuaron con el estudio de la separación de otros aminoácidos, cambiando el soporte de sílice por otro de celulosa, para lo cual emplearon trozos de papel de filtro (celulosa casi pura), primero en forma semicircular y después de forma lineal, cortando tiras de dicho material, que podían considerarse como delgadas columnas cromatográficas. Como fase móvil para la separación de valina y leucina emplearon butanol, que avanzaba por capilaridad a lo largo de la tira de papel. El revelado lo llevaban a cabo con ninhidrina, reactivo que forma con los aminoácidos compuestos fuertemente coloreados, lo que permitía localizar la posición alcanzada después de la separación. La técnica fue denominada *cromatografía sobre papel*. Para separar un mayor número de aminoácidos recurrieron al empleo de un trozo de papel de filtro cuadrado en lugar de una tira y, después de la primera separación, repitieron la operación tras cambiar de disolvente y girar el papel un ángulo de 90 grados, de forma que el avance de las nuevas manchas se producía en dirección perpendicular a la de las primeras, por lo que llamaron a esta modalidad *cromatografía bidimensional sobre papel*. En 1943 Synge se había trasladado al *Lister Institute of Preventive Medicine* en Londres, debido a lo cual su participación en este trabajo se redujo a su etapa inicial, y los nuevos resultados fueron publicados por Consden, Gordon y Martin [49].

Aunque el equilibrio de intercambio iónico ya se había usado en 1938 por T.I. Taylor y H.C. Urey como base para la separación de isótopos de litio y potasio [50], el método era complicado, pues hubieron de emplear para ello columnas de unos tres centímetros de diámetro y más de treinta metros de longitud, empaquetadas con zeolita como intercambiador iónico natural. La cromatografía de intercambio iónico sólo comenzaría a emplearse de forma generalizada cuando fue factible disponer de resinas cambiadoras sintéticas, a principios de la década de los cuarenta, y se pudo demostrar su eficacia como método

de separación durante el desarrollo, en plena Segunda Guerra Mundial, del gigantesco y multidisciplinar proyecto Manhattan, cuyo objetivo central, como después se supo, era la fabricación de la bomba atómica. El empleo de la cromatografía de intercambio iónico dentro de dicho proyecto Manhattan estuvo a cargo de Glenn Theodore Seaborg (1912-1999), quien, junto con Edwin Mattison Mac Millan (1907-1991), aisló los 64 kilos de plutonio necesarios para construir la bomba que el 9 de agosto de 1945 sería arrojada sobre la ciudad japonesa de Nagasaki. Por obvias razones de seguridad, el gobierno de los Estados Unidos no permitió que ni la metodología ni los resultados alcanzados en la separación de los elementos transuránicos fuesen dados a conocer hasta después de finalizada la guerra. Seaborg continuó después de la guerra sus investigaciones en la separación de elementos transuránicos, descubriendo los elementos de número atómico entre 94 (plutonio) y 102 (nobelio), que, junto con el 103 (laurencio), descubierto en 1961, completaban la segunda serie de transición. (Se ha dicho de Seaborg que ha sido, después de Mendeleev, el científico que más ha hecho por la tabla periódica de los elementos). Seaborg y Mac Millan recibieron el premio Nobel de Química en 1951 por sus descubrimientos en la química de los elementos transuránicos. A principios de la década de los 70 se desarrolló una nueva modalidad de cromatografía de intercambio iónico: la *cromatografía de iones*, basada también en el uso de una columna separadora rellena con una resina de intercambio iónico con detección principalmente conductimétrica, lo que requiere una segunda columna cuya finalidad es eliminar los iones del fondo, también mediante un proceso de intercambio iónico (columna supresora).

Como se ha señalado anteriormente, Martin y Synge habían considerado ya en 1941, la posibilidad de separar compuestos gaseosos mediante cromatografía de partición. Esta posibilidad fue llevada a la práctica por el propio Martin, quien el 1950 se había trasladado al *National Institute of Medical Research* en Londres, donde se le unió como colaborador un joven científico, Anthony Trafford James (Cardiff, 1922). James, que se había graduado

en Londres en 1943 y doctorado en 1946, trató en un principio, a instancias de Martin, de continuar con el desarrollo de una columna cromatográfica con algún sistema de distribución entre fases distinto a la partición, pero no obtuvo resultados. Ante estos desalentadores inicios, Martin, con el fin (como él mismo reconocería después) de levantar la moral de su colaborador, sugirió a éste que tratase de poner en práctica una idea que ya había incluido en su primer artículo sobre la cromatografía de partición: usar un gas, en lugar de un líquido, como fase móvil. Seis semanas más tarde habían conseguido separar una mezcla de amoníaco con metil, dimetil y trimetilamina, y en 1952 publicaron el primer artículo sobre esta nueva técnica cromatográfica: *Gas-Liquid Partition Chromatography. A Technique for the Analysis of Volatile Materials* [51]. La separación de sustancias volátiles mediante cromatografía de gases no podía servirse del color de las mismas ni del uso de reactivos reveladores para visualizar la posición de las bandas, como se podía hacer en cromatografía de líquidos. James y Martin solucionaron el problema mediante recolección de fracciones del gas a la salida de la columna en distintas porciones de disolución y valoración de cada una de las fracciones, operación que pudo agilizarse empleando un valorador automático que construyó el propio Martin. Más adelante se introdujo el uso de detectores instrumentales, como el de conductividad térmica, el de ionización de llama y el de captura electrónica. En dos años el empleo de la cromatografía gas-líquido se extendió por laboratorios de todo el mundo: prácticamente cualquier muestra orgánica podía ser analizada por esta técnica, siendo en la industria petroquímica donde alcanzó un mayor grado de implantación. Los avances más recientes en cromatografía de gases se han alcanzado en el uso de acoplamiento a sistemas post-columna (detectores de mayor sensibilidad y selectividad como la espectrometría de masas), o bien a sistemas pre-columna, como micro-extracción en fase sólida, espacio en cabeza o cromatografía multidimensional.

El desarrollo de las técnicas cromatográficas en la segunda mitad del siglo XX fue espectacular, no sólo en cuanto al perfeccionamiento de las modalidades ya conocidas, sino

también en cuanto a la introducción de otras nuevas. Con la introducción de la cromatografía gas-líquido por James y Martin parecía que se había alcanzado la máxima versatilidad posible en las técnicas de separación, en tanto que la cromatografía líquido-líquido, por entonces mucho más lenta y de menor resolución, había quedado relegada a una posición muy secundaria. En 1963, John Calvin Giddins, en la Universidad de Utah (USA) propone una modalidad de cromatografía de líquidos claramente inspirada en algunas de las características propias de la cromatografía de gases, y expone las bases de la técnica en su artículo *Liquid Chromatography with Operating Conditions Analogous to those of Gas Chromatography* [52]. Para incrementar la resolución de las separaciones, el tamaño de partícula del relleno de la columna tenía que ser sometido a una reducción drástica en comparación con el empleado en cromatografía de líquidos convencional. En estas condiciones el flujo de fase móvil sólo podrá alcanzar valores útiles si se aplica una presión suficientemente elevada. Esta modalidad, denominada *cromatografía de líquidos de alta resolución* (HPLC) empezó a emplearse de forma generalizada en la década de los 70 en diversas áreas de la bioquímica y la biotecnología, utilizando principalmente detectores fotométricos y electroquímicos, expresamente diseñados y contruidos para este fin.

Una de las técnicas cromatográficas que aparecieron después de la cromatografía gas-líquido es la *cromatografía de capa fina*, una modalidad de cromatografía plana introducida en 1956 por Ergon Stahl en la Universidad de Mainz (Alemania) [53]. Stahl comprobó que el tamaño de poro del papel de filtro empleado en cromatografía sobre papel era excesivamente grande para ciertas separaciones que tenía que llevar a cabo, por lo que preparó unas placas de vidrio sobre las que pulverizó finas suspensiones de alúmina o sílice. Después de homogeneizar y secar cuidadosamente la capa así formada, el soporte quedaba dispuesto para operar de forma semejante a como se hacía en cromatografía sobre papel. El mecanismo de retención de los solutos consistía esencialmente en un proceso de *adsorción* sobre una fase estacionaria sólida, por lo que, como el mismo

Stahl reconocería, su dispositivo equivalía esencialmente a la vieja columna cromatográfica de Tsvet, pero en forma abierta.

A finales de los años 50 y principio de los 60 se propone una nueva modalidad de separación cromatográfica basada en el uso de geles porosos como relleno de la columna, que permite separaciones en función del tamaño de los solutos: la cromatografía de *exclusión molecular*, desarrollada por Jerker Olof Porath en la Universidad de Upsala y Per Flodin en los laboratorios de la empresa farmacéutica *Pharmacia* de la misma ciudad sueca. Esta técnica es de especial eficacia en la separación de macromoléculas, por lo que se aplica en biotecnología y química de los polímeros. La separación de muchas macromoléculas de origen biológico como proteínas, polisacáridos o ácidos nucleicos, difícil de conseguir con sistemas convencionales, puede hacerse mediante *cromatografía por afinidad*, basada en interacciones soluto-fase estacionaria altamente selectivas (como enzima-sustrato, enzima-inhibidor, antígeno-anticuerpo, etc.). A partir de los años 80 comenzaron a emplearse los fluidos supercríticos (fluidos sometidos a condiciones de presión y temperatura por encima de su punto crítico, con lo que adquieren un estado diferente del líquido y del gaseoso) con fines analíticos. La *cromatografía de fluidos supercríticos* presenta algunas ventajas definidas sobre la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos de alta resolución, pero su uso no ha llegado a generalizarse.

Han transcurrido cien años desde que Mijail Tsvet llevara a cabo los experimentos que dieron lugar a la cromatografía. Durante ese tiempo las técnicas cromatográficas han sido sometidas a procesos de instrumentación, automatización, miniaturización y computerización, y el conocimiento y control de los procesos físico-químicos que rigen las interacciones entre soluto, fase estacionaria y fase móvil han alcanzado niveles en muchos casos difícilmente superables. No obstante, las bases de la separación cromatográfica han cambiado esencialmente muy poco respecto a las primeras descripciones que hizo Tsvet. En circunstancias menos desfavorables que las que concurrieron en la vida de Tsvet, éste habría

sido, sin duda, un digno candidato al premio Nobel de química. No fue así, pero la veintena de científicos que alcanzaron tal galardón valiéndose de la cromatografía para llevar a cabo sus investigaciones constituyen una prueba fehaciente de la trascendencia de su invento.

3. Análisis polarográfico

La polarografía es una técnica electroquímica de análisis basada en la medida de la intensidad de la corriente que fluye por un circuito como consecuencia de la reacción electroquímica que se produce en un electrodo de gotas de mercurio al aplicar a éste un potencial determinado. La importancia de la polarografía como método de análisis cuantitativo radica en que la intensidad de la corriente (intensidad límite de difusión) resulta ser proporcional a la concentración de la especie química que reacciona en la superficie del electrodo. En 1959 la Real Academia Sueca de las Ciencias concedió el premio Nobel de química “por el descubrimiento y desarrollo de los métodos de análisis polarográfico”, al químico checo Jaroslav Heyrovský casi cuarenta años después de que éste diera a conocer sus primeros resultados en 1922 [54]. La contribución que con la polarografía hacía Heyrovský a la electroquímica supuso la introducción de una técnica instrumental que impulsaría de forma espectacular la química analítica, iniciándose con ello la era de la moderna electroquímica analítica o electroanálisis.

Los fenómenos electroquímicos asociados a la interacción entre la electricidad y la materia empezaron a ser estudiados a finales del siglo XVIII, siendo probablemente el famoso experimento del médico italiano Galvani con las ancas de una rana, en 1791, el primero del que se tiene noticia, y el que serviría de germen para el posterior desarrollo de la electroquímica. Luigi Galvani (1737-1798) fue profesor de Anatomía y Obstetricia en la Universidad de Bolonia hasta que fue destituido de su cátedra en 1797 por mostrar su oposición a la creación de la República Cisalpina, tras la ocupación de Italia por las tropas de Napoleón. En su laboratorio de anatomía,

Galvani observó en 1791 que las ancas de una rana que mantenía suspendidas de un gancho de cobre, que a su vez pendía de una barra de hierro, experimentaban bruscas sacudidas cuando se las tocaba con ambos metales Galvani, más interesado por la anatomía que por la electricidad, interpretó este fenómeno suponiendo que los tejidos animales contenían una especie de fuerza vital a la que denominó *electricidad animal*, y que era la que provocaba los movimientos de los músculos cuando éstos al contactaban con un metal. Parece ser que el experimento de Galvani se hizo tremendamente popular en Europa, siendo raro el muchacho que no trataba de cazar alguno de esos animalitos para reproducir tan espectacular *milagro*. Tres años después el físico también italiano Alejandro Volta (1745-1827) demostró que el único elemento prescindible del experimento de Galvani era, precisamente, la rana y, con ello, la inexistencia de la electricidad animal: la electricidad se generaba como consecuencia del contacto entre el cobre y el hierro, y el papel de las ancas de la rana era meramente el de sensor de la electricidad producida. Volta logró generar electricidad entre dos discos de metales distintos (plata y cinc) separados por un trozo de tela impregnado en disolución de sal. Comprobó, además, que el fenómeno era tanto más sensible cuanto mayor era en número de elementos metal-disolución-metal, por lo que construyó un dispositivo generador de corriente constituido por varas decenas de dichos elementos apilados, al que denominó por ello pila, término que se sigue empleando en la actualidad, asociado indistintamente a los nombres de los dos científicos mencionados (pila galvánica o pila voltaica). Volta llegó a construir una pila de grandes dimensiones, con el apoyo de Napoleón, quien, fascinado por el invento, instauró el premio Volta para científicos que se distinguieran en sus trabajos sobre electricidad, premio que alcanzó gran prestigio en la Europa de principios del siglo XIX.

El primer premio Volta fue concedido al químico británico Sir Humphrey Davy (1778-1829) quien en 1807 había conseguido aislar varios metales (sodio, potasio, calcio, estroncio y bario) mediante el empleo de la corriente eléctrica, y publicó además una teo-

ría de la electrolisis [55]. Unos años antes los también británicos Anthony Carlisle (1768-1840) y William Nicholson (1753-1815) habían demostrado que el agua puede descomponerse por medio de la corriente eléctrica, y otro británico, William Cruickhanks (1745-1800) que durante la electrolisis los metales reaccionan en el polo negativo y los elementos no metálicos lo hacen en el positivo. Cruickhanks fue también el primero en emplear la electrolisis con fines analíticos cualitativos: la formación de un depósito de cobre servía para identificar la presencia de dicho elemento en la disolución electrolizada. Más adelante el método electrolítico se aplicaría a la identificación de otros metales, como arsénico, plomo y manganeso.

La relación cuantitativa entre la cantidad de electricidad invertida en la electrolisis y el peso de sustancia reaccionada fue establecida por el británico Faraday entre 1832 y 1834, cuando enunció las leyes de la electrolisis. Michel Faraday (1791-1867) nació en Newington, Surrey, al sur de Inglaterra y comenzó a trabajar muy joven como ayudante de Davy, en cuyo laboratorio de Londres pudo experimentar con la electrodeposición de los metales alcalinos y alcalinotérreos en forma de amalgamas. Construyó un culombímetro de gases con el que podía medir la cantidad de electricidad a través del volumen de hidrógeno y de oxígeno obtenidos en la electrolisis del agua, y sus observaciones le permitieron enunciar sus famosas leyes, según las cuales el peso de sustancia que reacciona durante un experimento de electrolisis es proporcional a la cantidad de corriente y al equivalente químico de la sustancia. Se debe también a Faraday la introducción de los términos electrolisis, electrodo, ánodo, cátodo, anión y catión.

La primera aplicación de la electrolisis con fines analíticos cuantitativos se debe al norteamericano Wolcott Gibbs (1822-1908)* graduado en Medicina en Nueva York aunque,

* No debe confundirse con el científico coetáneo y también norteamericano Josiah William Gibbs (1839-1903), químico teórico, profesor de la Universidad de Yale, y a quien se debe el enunciado de la *regla de las fases*.

a su regreso a los Estados Unidos después de una estancia en Europa durante la que trabajó con Liebig y con Dumas comenzara a enseñar Física y Química y llegase después a ser profesor de Ciencias Naturales en la Universidad de Harvard. Gibbs determinó cuantitativamente cobre mediante electrolisis, pesando el depósito que se formaba en un crisol de platino que utilizaba como cátodo, determinó también níquel de forma similar, y denominó *electrogravimetría* a este método de análisis cuantitativo [56]. El método resultaba ser muy exacto, y en los años siguientes se propusieron métodos electrogravimétricos para la determinación de otros metales, como plata, cinc, plomo, mercurio, cadmio y manganeso, y se publicó la primera monografía sobre esta técnica: *Quantitative analyse auf electrolytischen Wege (Análisis cuantitativo por medios electrolíticos)*, con el que su autor, el alemán Alexander Classen (1843-1934), profesor de Química Analítica en la Universidad de Aachen, hacía importantes aportaciones a la teoría y la práctica de la electrogravimetría.

Durante unos treinta años las determinaciones electrogravimétricas se llevaron a cabo manteniendo la corriente aproximadamente constante. Esta forma de operar no permite controlar el potencial del electrodo, por lo que, en caso de la presencia de varios iones metálicos en la disolución, el depósito formado durante la electrolisis estará constituido no por un metal puro, sino por una mezcla de metales, lo que impide la determinación individual de cada uno de ellos. Este problema pudo solucionarse gracias a los avances que se produjeron en la electroquímica teórica en las dos últimas décadas del siglo XIX, y que permitieron conocer la importancia del control del potencial del electrodo durante los procesos de electrolisis. Uno de los avances más significativos se debe a Nernst, quien en 1889 publicó su famosa ecuación [57], mediante la que se establecía la dependencia entre el potencial de equilibrio y las actividades de las especies químicas en la disolución. Walther Hermann Nernst (1864-1941) fue primero ayudante de Ostwald, luego profesor de la Universidad de Göttingen y finalmente director del Instituto de Física Experimental de la Universidad de Berlín entre 1924 y 1933, año en que fue des-

tituido debido a su manifiesta oposición al nazismo. Nernst había sido distinguido con el premio Nobel de Química en 1920, y se le considera, junto con Arrhenius y Ostwald, fundador de la química física. Después de que Le Blanc midiera experimentalmente el *potencial de descomposición* de numerosos compuestos metálicos en disolución [58], las determinaciones electrogravimétricas comenzaron a efectuarse a potencial constante, lo que permitía determinar selectivamente unos metales en presencia de otros (*electroseparación*) [59]. La introducción del *electrodo auxiliar* en 1908 por el alemán Henry Julius Salomon Sand (1873-1944) permitió controlar con gran precisión el potencial del electrodo durante las determinaciones electrogravimétricas [60].

A principios del siglo XX el uso de las reacciones electroquímicas en análisis estaba limitado a las determinaciones electrogravimétricas y a las electroseparaciones. En los primeros años veinte, Jaroslav Heyrovský (Figura 9) introduciría una nueva y decisiva línea en los métodos de electroanálisis con la medida de la intensidad de la corriente producida en la electrolisis cuando se usa un electrodo de gotas de mercurio, lo que constituiría el principio del *análisis polarográfico*.



Figura 9. Jaroslav Heyrovský (1890-1967)

Jaroslav Heyrovský nació en Praga en 1890. Su padre, Leopold Heyrovský, era profesor de Derecho Romano en la Universidad *Karlova* (Carolina) de Praga*, de la que llegaría a ser rector. El ambiente de estudio que se vivía en la familia propició las inquietudes del joven Jaroslav, que se interesó en su adolescencia por la botánica, la zoología, la mineralogía, la astronomía, la música y el deporte. En el *Akademické Gymnasium* (escuela secundaria) de Praga estudió matemáticas, física, química, latín y griego y, después de superada la *prueba de madurez*, en 1910 ingresó en la Facultad de Filosofía de Praga, donde estudió física, química y matemáticas. Interesado por los estudios de química-física, que por entonces no podía cursar en Praga, consiguió ingresar en 1910 en el University College de Londres, donde estudió con Sir William Ramsay, profesor de química general y premio Nobel de química en 1904 por el descubrimiento de los gases nobles. En 1913 Heyrovský obtiene el grado de *bachelor* (licenciado) en Ciencias. Ese mismo año se retira el profesor Ramsay, siendo sustituido por Frederick George Donnan, que reorienta las líneas de investigación hacia el campo de la electroquímica, asignando a Heyrovský un proyecto de tesis sobre la medida del potencial de electrodo del aluminio. Pronto advierte Heyrovský las dificultades, tanto experimentales como de interpretación, que surgen como consecuencia de los fenómenos superficiales de pasivación y de desprendimiento de gas hidrógeno, por lo que, a instancias de Donnan, comienza a utilizar una amalgama líquida de aluminio con la ayuda de un capilar de vidrio para poder renovar convenientemente la superficie del metal. Pero sus trabajos son bruscamente interrumpidos: en 1914, durante una visita a su familia en Praga, estalla la primera Guerra

Mundial, lo que le impide regresar a Londres, al ser reclutado por el ejército austro-húngaro. Heyrovský no es destinado al frente, sino a un hospital en Austria, cerca de Innsbruck, como ayudante de radiología, donde dispone de tiempo para ultimar el trabajo experimental y redactar la memoria de su tesis *Electroafinidad del Aluminio* que, una vez finalizada, remite a la Facultad de Filosofía de la Universidad Checa de Praga, en la que, después de terminada la guerra, obtiene el título de doctor en 1918.

Uno de los miembros del tribunal de doctorado que juzgó los méritos de Heyrovský, el profesor Bohumil Kucera, propuso al nuevo doctor trabajar en un proyecto ya iniciado sobre el efecto del potencial eléctrico sobre la tensión superficial del mercurio. Kucera había tratado de sustituir el uso del electrómetro capilar *estático* —en el que no había flujo de mercurio— construido a tal efecto por el físico francés Gabriel Lippmann en 1887, por el de un capilar *dinámico* en el que la variable medida sería el peso de las gotas de mercurio desprendidas. Los resultados obtenidos por Kucera mostraban ciertas anomalías en algunas de las curvas electrocapilares, cuyo estudio encomendó a Heyrovský. El trabajo experimental de éste consistía en recoger sucesivas porciones de 50 gotas de mercurio cada una para, después de secadas convenientemente, pesarlas y representar este peso frente al voltaje aplicado. Esta tarea era hartamente tediosa, y Heyrovský introdujo una modificación que conducía a resultados mucho más rápidos, consistente en medir el tiempo de goteo, igualmente influenciado por el potencial, por lo que constituía una alternativa ventajosa para obtener las curvas electrocapilares. De esta manera reprodujo las *anomalías* que había observado Kucera, consistentes en la aparición de pequeños picos en las curvas obtenidas en presencia de iones metálicos como cinc, cadmio, manganeso o bario. Pensaba Heyrovský en un principio que este efecto podría ser utilizado para medir los potenciales de electrodeposición de los distintos metales, pero la convicción de que los fenómenos más interesantes eran los asociados a las reacciones de electrolisis en la superficie del mercurio le hizo cambiar de estrategia.

* La Universidad *Karlova* de Praga, la más antigua de la Europa central, fue fundada por el rey Carlos IV en 1348. A finales del siglo XVIII se había impuesto el alemán como lengua oficial de la universidad, pero los movimientos nacionalistas durante el siglo XIX obligaron al gobierno de Viena en 1882 a dividir la universidad *Karlova* en otras dos, una alemana y otra checa, la *Universidad Checa de Praga*. Después de la fundación del estado checoslovaco en 1918, la Universidad Checa recuperó el antiguo nombre de Universidad *Karlova* de Praga.

En 1919 Heyrovský se había incorporado como profesor ayudante al departamento de Química Inorgánica y Analítica donde, un año después, fue habilitado como profesor asociado de Química Física. Heyrovský no había olvidado los años pasados en Inglaterra*, y decidió enviar un resumen de sus trabajos sobre las propiedades del aluminio y los aluminatos a la Universidad de Londres, donde los había iniciado bajo la dirección del profesor Donnan, para optar al grado de doctor por esa universidad, lo que obtuvo en 1921. Ese mismo año fallecía el profesor Kucera, por lo que Heyrovský prosiguió el trabajo en electroquímica según su propia iniciativa, lo que le llevó a medir la corriente eléctrica que se producía a diferentes voltajes aplicados al electrodo. Para llevar a cabo estos experimentos hubo de pedir prestados un galvanómetro suficientemente sensible y un potenciómetro. Heyrovský obtuvo sus primeros resultados el 10 de febrero de 1922, según consta en su cuaderno de laboratorio. En el experimento usó una disolución de hidróxido sódico, un electrodo de gotas de mercurio como cátodo y una cierta cantidad de mercurio introducida en el fondo del recipiente como contraelectrodo (ánodo) y leía en el galvanómetro la intensidad de corriente producida a diferentes valores del voltaje aplicado. En el cuaderno de laboratorio aparecen todas estas anotaciones, incluyendo las rítmicas oscilaciones producidas por la caída de las gotas de mercurio (Figura 10). La representación de la intensidad de la corriente frente al potencial dio lugar a la primera curva intensidad-potencial, en la que se aprecian dos aumentos consecutivos de la corriente correspondientes a la reducción del oxígeno disuelto —más adelante Heyrovský comprendería la conveniencia de eliminarlo— y un tercero debido a la reducción del ion sodio para formar amalgama (Figura 11). Estos resultados fueron publicados ese mismo año en la revista checa *Chemické listy* [55], y constituyen el nacimiento de la polarografía. En expe-

* Los cuatro años que Heyrovský estuvo en Londres imprimieron ciertos rasgos en su comportamiento: hasta el final de su vida escribió en inglés las anotaciones en su libro de laboratorio, mantuvo siempre un trato extremadamente cortés con sus subordinados... y conservó la costumbre de tomar el té a diario.

perimentos posteriores Heyrovský procedió a eliminar previamente el oxígeno disuelto mediante una corriente de hidrógeno que generaba en un aparato de *Kipp*, lo que le permitió, durante los dos años siguientes, obtener las curvas intensidad-potencial producidas en la reducción de otros iones metálicos, así como de algunas sustancias orgánicas.

Voltage v	Galvanometer Amperes	E + W during Kipping	E + W after Kipping	Notes
0.500	45.4-44.5 44.95	51.70	51.85	
0.600	44.15-45.2 44.60 <small>no more mercury added in this pot.</small>	51.65	51.80	
0.700	43.8-44.9 44.35	51.70	51.80	
0.800	43.4-44.5 43.95	"	"	
0.900	42.8-43.9 43.35	"	"	
1.000	42.2-43.3 42.75	52.05 almost +:	marked	
1.100	41.7-42.6 42.15	52.15	52.00 51.90 51.90	Mark above 51.90 51.90

Now let more mercury
for the second.

Figura 10. Página del cuaderno de laboratorio de Heyrovský con anotaciones de potenciales e intensidades.

Friday, February 10th 1922 afternoon

In NaCl open to air

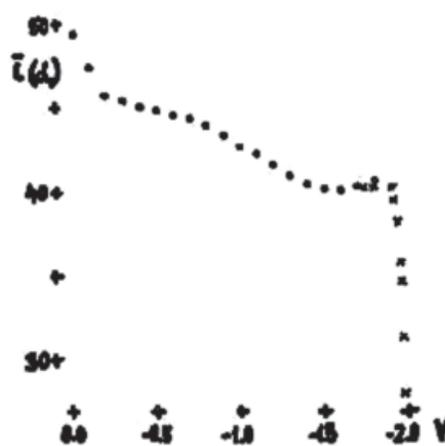


Figura 11. Primera curva intensidad-potencial, obtenida punto a punto por Heyrovský el 10 de febrero de 1922.

El trabajo manual de obtención de las curvas intensidad-potencial punto a punto resultaba extremadamente lento y tedioso. En 1923 Heyrovský conoce al químico-físico japonés Masuzo Shikata (1895-1964), que había trabajado dos años en Berlín sobre química de superficies. La colaboración entre Heyrovský y Shikata consistió en el diseño y construcción de un aparato que permitía variar el potencial automáticamente y registrar la intensidad de la corriente. El primer aparato de estas características, construido en 1925 [61], empleaba un ingenioso aunque laborioso dispositivo fotográfico para registrar la intensidad de la corriente (Figura 12). El aparato fue denominado *polarógrafo*, y la técnica que estudiaba los procesos de electrolisis en el electrodo de gotas de mercurio *polarografía*. En 1933 Heyrovský había viajado a Londres para participar en la *General Discussion of the Faraday Society* sobre las reacciones y equilibrios en los electrodos, en la que informó detalladamente sobre sus resultados en polarografía e introdujo el término *wave* (ola u onda)* para referirse a la morfología típica de las curvas intensidad-potencial.

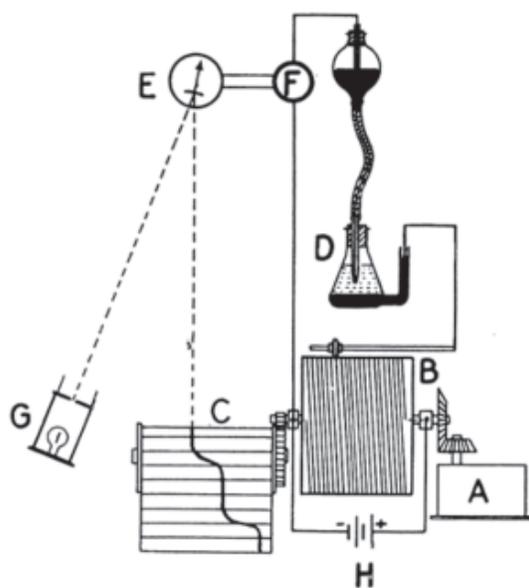


Figura 12. Esquema del primer polarógrafo, con registro fotográfico, construido por Heyrovský y Shikata en 1925.

* Aunque en las publicaciones en castellano se suele utilizar el término *onda*, parece que la acepción *ola* representaría mejor la morfología sigmoide de las curvas intensidad-potencial.

En 1926 Heyrovský es nombrado profesor *ordinarius* (catedrático) de Química Física en la Universidad Karlova de Praga, y en los años siguientes colaboran en el departamento científicos que alcanzarían renombre en el campo de la polarografía, tanto en Checoslovaquia como en otros países europeos. Así sucedió, entre otros, con Wiktor Kemula (1902-1985), quien diseñaría el primer electrodo de gota de mercurio suspendida (HMDE) en la Universidad de Varsovia, o con Rudolf Brdicka (1906-1970), que estudió, en el Instituto de Polarografía de Praga, las denominadas ondas polarográficas cinéticas y catalíticas, o con Dionýz Ilkovic (1907-1980), primero ayudante de investigación de Heyrovský en Praga y finalmente profesor en la Universidad de Bratislava, a quien se debe la deducción, en 1934, de la ecuación fundamental de la intensidad de difusión polarográfica, conocida por *ecuación de Ilkovic*.

Heyrovský mantuvo siempre la convicción de que los resultados de la investigación han de ser objeto de pronta difusión entre la comunidad científica. En 1929 fundó, junto con el profesor Emil Votocek, de la Universidad Técnica de Praga, la revista *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, cuya política era fomentar la publicación de los trabajos de científicos checos en otros idiomas europeos, principalmente en inglés. El primer libro sobre polarografía se publicó en 1932, pero curiosamente no fue escrito por Heyrovský, sino por uno de sus primeros colaboradores, G. Semerano [62], que fundaría un instituto de polarografía en Padua. En 1933 aparece el primer libro de Heyrovský, en checo [63], del que cuatro años más tarde se editaría una traducción rusa. Heyrovský viajó por primera vez a los Estados Unidos en 1933, impartiendo cursos y seminarios en las universidades de Berkeley y Stanford en California, en el Instituto de Tecnología de California, en las universidades de Minnesota y Wisconsin, en la *Ohio State University* y en las universidades de Princeton y Cornell, lo que contribuiría sustancialmente a la difusión de las técnicas polarográficas en aquel país.

Con la ocupación de Checoslovaquia por el ejército alemán en 1939 la Universidad

Karlova de Praga fue clausurada, aunque el laboratorio de Heyrovský fue respetado debido a la influencia de un colega alemán. Durante la segunda Guerra Mundial, Heyrovský se dedicó a preparar su nuevo libro, que se publicaría en Viena en 1941 [64] y cuya versión inglesa se publicaría en Estados Unidos en 1944 [65].

Finalizada la guerra, la Universidad *Karlova* de Praga reanuda sus actividades académicas, con lo que el departamento de Química Física vuelve a ser el principal núcleo de la investigación en polarografía. En 1950 se funda en Praga el Instituto Polarográfico Central, cuyo primer director es Heyrovský quien, por motivos de salud, había limitado sus actividades académicas en la universidad, a la que permanecía vinculado, no obstante, como profesor honorario. Durante los dos años siguientes a su creación, el Instituto Polarográfico Central experimenta una fuerte expansión y en 1952 se convierte en el Instituto Polarográfico de la Academia Checoslovaca de las Ciencias. El progreso de la polarografía en todo el mundo era ya una realidad en los años 50, y su empleo como método de análisis cuantitativo, principalmente de iones metálicos, se había generalizado en las industrias metalúrgica, química, farmacéutica y alimentaria. En 1951 se celebraba en Praga el primer Congreso Internacional de Polarografía.

El impacto causado por la polarografía en la comunidad científica había llegado también a la Real Academia Sueca de las Ciencias: en los años 1938, 1939 y 1948 Heyrovský figuraba entre los científicos propuestos para la concesión del premio Nobel de química, pero al final el premio fue para otros científicos (R. Kuhn, A.F.J. Butenandt y L. Ruzicka, y A. Tiselius, respectivamente)*. Heyrovský habría de esperar aun once años: en septiembre de 1959 se dio a conocer oficialmente la concesión del premio Nobel de Química a Jaroslav Heyrovský, quien lo recibió el 11 de diciembre de ese mismo año. En su discurso ante la

Academia Sueca, Heyrovský presentó de forma sistemática los trabajos que había desarrollado durante los últimos treinta y ocho años, desde las características de los capilares empleados, el concepto e importancia de la intensidad límite de difusión y la ecuación de Ilkovic, hasta las aplicaciones más recientes de las técnicas polarográficas.

El reconocimiento oficial de las aportaciones de Heyrovský a la electroquímica y el electroanálisis durante casi cuarenta años de trabajo había llegado finalmente, pero las facultades físicas del científico estaban ya muy mermadas y su creatividad muy limitada. Jaroslav Heyrovský murió en Praga siete años más tarde, el 27 de marzo de 1967, y fue enterrado en el cementerio Vysehrad de Praga, donde antes lo habían sido los músicos Biedrich Smetana y Antonin Dvorak, entre otros artistas y escritores.

Como anteriormente se ha señalado, la visita de Heyrovský a los Estados Unidos en 1933 despertó el interés por la polarografía en muchos investigadores de aquél país, donde uno de los que contribuyó de forma más activa al desarrollo de las técnicas polarográficas fue Kolthoff en la Universidad de Minnesota. Izaak Maurits Kolthoff (1894-1993) había nacido en Almelo (Holanda), y ya en sus estudios elementales comenzó a mostrar su interés por la química. En 1911 se matriculó en la Escuela de Farmacia de la Universidad de Utrech, donde adquirió los primeros conocimientos de química analítica, una materia por entonces casi totalmente empírica. Después de obtener su diploma de farmacéutico en 1915, cursó asignaturas de química física y química coloidal en la Universidad de Utrech, y preparó una tesis que, con el título *Fundamentos de Iodimetría*, presentó en 1918 para obtener el título de doctor en Química. En la Universidad de Utrech, donde había conseguido un nombramiento de *privaat docent* (ayudante) en electroquímica, publicó numerosos artículos sobre temas diversos de química, como química de los coloides o el concepto de pH (que había sido definido en 1909 por el danés Sorensen), muchos de ellos en inglés, lo que hizo que sus trabajos fuesen conocidos rápidamente en Europa y en Estados Unidos.

* Parece que el hecho de que durante la guerra Heyrovský hubiera podido continuar su trabajo en la Universidad *Karlova* de Praga, clausurada por los nazis, fue interpretado en algunos círculos como un signo de colaboracionismo.

Después de una breve estancia en Norteamérica (Canadá y USA) en 1924, Kolthoff regresó allí de forma que sería definitiva en 1927, contratado como profesor de la División Analítica de la Escuela de Química de la Universidad de Minnesota, donde permaneció hasta 1962, año en que se retiró *oficialmente*, ya que, de hecho, nunca abandonó el mundo académico hasta su muerte, a los 99 años, acaecida en 1993. Kolthoff fue un investigador que se interesó por materias muy diversas en química analítica, tanto clásica como instrumental. Una de ellas fue el electroanálisis. Inmediatamente después de la visita de Heyrovský a la Universidad de Minnesota en 1933, Kolthoff encomendó proyectos de investigación en electroanálisis a sus discípulos J.J. Lingane (con el electrodo de gotas de mercurio) y H. Laitinen (con electrodo sólido de platino). En 1941 Kolthoff y Lingane publican su libro *Polarography*, del que aparecería en 1952 una segunda edición ampliada, en dos volúmenes [66]. En 1940 Kolthoff introdujo el término *voltammetry* (voltamperometría) para referirse a la técnica de obtención de curvas intensidad-potencial empleando electrodos sólidos en sustitución del electrodo de gotas de mercurio.

Estando en desacuerdo con la situación de la química analítica cuando empezó a investigar (a principios del siglo XX era considerada más un arte que una ciencia), Kolthoff ha sido el químico que más ha contribuido a transformarla. Para ello tomó como base los fundamentos que habían incorporado a la teoría de la química científicos como J.W. Gibbs, J.H. Van't Hoff, S. Arrhenius, W. Nernst y N.J. Bjerrum, y edificó sobre aquéllos las bases teóricas de los métodos analíticos. La investigación de Kolthoff abarcó prácticamente la totalidad de los campos de la química analítica, en cada uno de los cuales solía publicar, además de los artículos originales, una monografía en la que se presentaban las bases teóricas y sus principales aplicaciones. Kolthoff siempre trataba de mantener un equilibrio entre la teoría y la práctica en el trabajo científico. Entendía que la investigación en química analítica tenía que buscar objetivos de utilidad pero que, al mismo tiempo, era necesario que la metodología tuviese una firme base teórica en la que

sustentarse. Una frase suya que llegó a hacerse famosa resume esta filosofía: *Theory guides, experiment decides*. (La teoría guía, el experimento decide).

El desarrollo de la polarografía a partir de los años 50 estuvo marcado por la búsqueda de límites de detección más bajos (en polarografía clásica el límite de detección, impuesto por la corriente capacitiva, se halla entre 10^{-4} y 10^{-5} M). Para conseguir este objetivo se desarrollaron, entre otras, las técnicas de *polarografía de impulsos normal* (NPP) y *diferencial* (DPP), mediante las que se consigue incrementar la corriente faradaica y disminuir la corriente capacitiva [67].

La voltamperometría con electrodos sólidos en condiciones de difusión convectiva o *voltamperometría hidrodinámica* llegó a adquirir un uso generalizado a partir de la comercialización de los electrodos rotatorios para los que el ruso Veniamin Levich había desarrollado entre 1942 y 1944 un riguroso tratamiento matemático que conduce a la ecuación de la intensidad límite en condiciones hidrodinámicas conocida como *ecuación de Levich* [68]. La voltamperometría con electrodos sólidos adquirió una nueva perspectiva cuando empezaron a diseñarse detectores amperométricos para cromatografía de líquidos de alta resolución [69].

La tendencia de la instrumentación analítica a la miniaturización se manifiesta en el campo de los sensores. El biólogo norteamericano Leland C. Clark, diseñó un sensor para la determinación de oxígeno disuelto basado en la medida de la intensidad de la corriente producida en la reducción del oxígeno en un electrodo de platino. Este sensor se popularizó con el nombre de *electrodo de Clark*, y constituye la base de los modernos biosensores amperométricos, basados en la inmovilización de enzimas que catalizan una reacción bioquímica y el empleo de mediadores redox que catalizan la transferencia de electrones.

Desde que, hace más de ochenta años, Heyrovský realizara los primeros experimentos que darían lugar al desarrollo de la polarografía, la forma de llevar a cabo las de-

terminaciones ha experimentado cambios sustanciales: el electrodo de gotas de mercurio ha sido drásticamente modificado o, alternativamente, sustituido por electrodos sólidos de platino o carbono, la instrumentación ha sido objeto de mejoras tendentes a alcanzar mayor sensibilidad, precisión, rapidez y automatismo, y la terminología ha tenido que incorporar elementos inexistentes (e innecesarios) en la polarografía clásica: voltamperometría, impulsos, muestreo, detectores, sensores... Pero la eficacia actual de la metodología electroanalítica no habría sido posible sin el *¿invento o descubrimiento?* de Heyrovský. Petr Zuman, uno de los más destacados discípulos de Heyrovský, elude responder a la anterior disyuntiva aplicando la reflexión:

“Como con otros descubrimientos, el de la polarografía se produjo porque la persona adecuada se hallaba en el lugar adecuado en el momento adecuado” [70].

Referencias

- Echeverría, L., *De oratoria Universitaria Salamantina*, lección inaugural del curso 1977-78. Universidad de Salamanca.
- Lavoisier, A.L., *Traité élémentaire de chimie*, París, 1789.
- Berthollet, C.L., *Mem. soc. Arcueli.*, **3**, 64.
- Gay-Lussac, J.L.; Thénard, L.J., *Reserches physico-chimiques*, París, **2**, 265 (1810).
- Berzelius, J.J., *Neues Journal der Pharmazie*, **1**, 130 (1815).
- Liebig, J., *Anleitung zur Analyse organischer Körper*, Braunschweig, 1837.
- Dumas, J.B., *Compt. rend.*, **11**, 287 (1840).
- Kjeldahl, J.G., *Z. Anal. Chem.*, **22**, 366 (1883).
- Henry, E.O.; Plisson, A., *Journal de Pharmacie*, 249 (1830).
- Henry, E.O., *Journal de Pharmacie*, 29 (1834).
- Zeise, W., *J. prakt. Chem.*, **1**, 458 (1834).
- Carius, G.J., *Lieb. Ann.*, **116**, 128 (1860).
- Carius, G.J., *Lieb. Ann.*, **136**, 129 (1865).
- Carius, G.J., *Ber.*, **3**, 697 (1870).
- Nernst, W., *Z. f. Elektrochem.*, **9**, 622 (1903).
- Emich, F.; Donau, J., *Monatshefte*, **30**, 745 (1909).
- Pregl, F., *Quantitative Micro-Analysis of Organic Substances*, Nobel Lecture, <http://www.nobel.se/chemistry/laureates/1923/pregl-lecture.html>
- Emich, F., *Lehrbuch der Mikrochemie*, München, **73** (1926).
- Pregl, F., *Abderhaldens Handbuch biochemischer Arbeitsmethoden*, Vol. V, Urban & Schwarzenberg, Berlin, 1912.
- Pregl, F., *Die quantitative mikroanalyse*, J.Springer, Berlin, 1917.
- Feigl, F.; Anger, V., *Spot Tests in Inorganic Analysis*, 6th Ed., Elsevier, 1972.
- Feigl, F., *Spot Tests in Organic Analysis*, 7th Ed., Elsevier, 1983.
- Belcher, R.; Spooner, C.E., *Ind. Chemist*, **19**, 653 (1943).
- Belcher, R.; Ingram, G., *Anal. Chim. Acta*, **7**, 319 (1952).
- Schöniger, W., *Mikrochim. Acta*, **1955**, 123.
- Zimmermann, W., *Z. Anal. Chem.*, **118**, 258 (1939).
- Runge, F.F., *Farbenchemie*, I-II (1834, 1843).
- Runge, F.F., *Ann. Phys. Chem.*, XVII, **31**, 65 (1834).
- Runge, F.F., *Ann. Phys. Chem.*, XVIII, **31**, 78 (1834).
- Runge, F.F., *Farbenchemie*, III (1850).
- Schönbein, C.F., *Pogg. An.*, **114**, 275 (1861).
- Goppelsröder, F., *Z. Anal. Chem.*, **7**, 195 (1868).

33. Day, D.T., First International Petroleum Congress, Paris, 1900.
34. Day, D.T., *Science*, **17**, 1007 (1903).
35. Tswett, M.S., *Bull. Lab. Bot. Gen., Université de Genève*, **1**, 125-206 (1896).
36. Tswett, M.S., *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **24**, 316 (1906).
37. Tswett, M.S., *Ber. Deutsch. Bot. Ges.*, **24**, 384 (1906).
38. Tswett, M.S., *Khromofilly v Rastitel'nom i Zhivotnom Mire*, Izd. Karbasnikov, Warsaw, 1910.
39. Palmer, L.S.; Eckles, C., *J. Biol. Chem.*, **17**, 191 (1914).
40. Palmer, L.S., *Carotenoids and related pigments: The Chromolipids*, Am. Chem. Soc. Monograph Series, Chemical Catalog Co. New York, 1922.
41. Kuhn, R.; Lederer, E., *Z. Physiol. Chem.*, **197**, 141 (1931).
42. Kuhn, R.; Lederer, E., *Z. Physiol. Chem.*, **200**, 246 (1931).
43. Kuhn, R.; Brockmann, H., *Ber*, **64**, 1859 (1931).
44. Kuhn, R.; Lederer, E., *Naturwissenschaften*, **19**, 306 (1931).
45. Zechmeister, L.; Cholnoky, L., *Die Chromatographische Adsorptions-methode*, Springer, Wien, 1937.
46. Zechmeister, L.; Cholnoky, L., *Principles and Practice of Chromatography*, 2nd Ed., Chapman & Hall, London and Wiley & Sons, New York, 1941.
47. Martin, A.J.P.; Synge, R.L.M., *Biochem. J.*, **35**, 1358 (1941).
48. *Nature (London)*, **170**, 826 (1952).
49. Consden, R., Gordon, A.H.; Martin, A.J.P., *Biochem. J.*, **38**, 2244 (1941).
50. Taylor, T.I.; Urey, H.C., *J. Chem. Phys.*, **6**, 429 (1938).
51. James, A.T.; Martin, A.J.P., *Biochem. J.*, **50**, 679 (1952).
52. Giddins, J.C., *Anal. Chem.*, **35**, 2215 (1963).
53. Stahl, E., *Pharmazie*, **11**, 633 (1956).
54. Heyrovský, J., *Chem. Listy*, **16**, 256 (1922).
55. Davy, H., *Philos. Trans.*, **97**, 1 (1807).
56. Gibbs, W., *Z. Anal. Chem.*, **3**, 327 (1864).
57. Nernst, W., *Z. phys. Chem.*, **4**, 129 (1889).
58. Le Blanc, M., *Z. phys. Chem.*, **8**, 299 (1889).
59. Freudenberg, H., *Z. phys. Chem.*, **12**, 97 (1891); *Chem. Ber.*, **25**, 2492 (1892).
60. Sand, H.J.S., *J. Chem. Soc.*, **93**, 1572 (1908).
61. Heyrovský, J.; Shikata, M., *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **44**, 496 (1925).
62. Semerano, G., *Il Polarografa, sua teoria e applicazioni*, A. Draghi, Padova, 1932.
63. Heyrovský, J., *Application of Polarography in Practical Chemistry* (in Czech), Praga, 1933.
64. Heyrovský, J., *Polarographie*, Springer, Vienna, 1941.
65. Heyrovský, J., *Polarography, theoretical foundations, practical execution and applications of the electrolysis with the dropping mercury electrode*, Alien Custodian Property, Edward Brothers, Ann Arbor, Michigan, 1944.
66. Kolthoff, I.M.; Lingane, J.J., *Polarography*, Interscience, New York-London, 1952.
67. Parry, E.P.; Osteryoung, R.A., *Anal. Chem.*, **36**, 1336 (1964).
68. Levich, V.G., *Acta Physicochim. USSR*, **17**, 257 (1942); **19**, 133 (1944).
69. Weber, S.G.; Purdy, W.C., *I & EC Product Research & Development*, **20**, 593 (1981).
70. Zuman, P., *Analyst*, **117**, 1803 (1992).

Bibliografía consultada

- Babor, J.A.; Ibarz, J, *Química General Moderna*, 6ª Ed., Marín, Barcelona, 1963.
- Bard, A.J.; Zoski, C.G., *Anal. Chem.*, **72**, 346 A (2000).
- Berezkin, V.G., *Chomatographic Adsorption Analysis. Selected Works. Mikhail Semenovich Tswett*, Ellis Horwood, New York, 1990.
- Bond, A.M., *Broadening electrochemical horizons. Principles and Illustrations of voltammetric and related techniques*, Oxford University Press, New York, 2002.
- Delahay, P., *New Instrumental Methods in Electrochemistry. Theory, Instrumentation and applications in Analytical and Physical Chemistry*, Interscience, New York, 1966.
- Ettre, L.S., *LC-GC*, **19**, 506 (2001).
- Ettre, L.S., *J. Chromatogr. Science*, **41**, 225 (2003).
- Ettre, L.S., *LC-GC Europe*, **16**, 632 (2003).
- Ettre, L.S.; Horvath, C., *Anal. Chem.*, **47**, 422 A (1975).
- Ettre, L.S.; Zlatkis, A. (Eds.), *75 Years of Chromatography. A historical Dialogue*, Elsevier, Amsterdam, 1979.
- Grob, R.L., *Modern Practice of Chromatography*, Wiley, Nueva York, 1985.
- Hargittai, I., *The Road to Stocholm. Nobel Prizes, Science and Scientists*, Oxford University Press, New York, 2002.
- Heyrovský, J.; Kuta, J., *Principles of Polarography*, Academic Press, New York, 1966.
- Irving., H.M.N.H., *Analyst*, **99**, 787 (1974).
- Kellner, R., Mermett, J.M., Otto, M.; Widmer, H.M. (Eds.), *Analytical Chemistry*, Wiley, Weinheim, 1998.
- Leroy, F. (Ed.), *A Century of Nobel Prize Recipients. Chemistry, Physics and Medicine*, Marcel Dekker, New York, 2003.
- Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Wiley, New York, 2000.
- Sabine, D.B., *Chemistry*, **42**, 12 (1969).
- Snell, F.D.; Hilton, C.L., *Encyclopedia of Industrial Analysis*, Interscience, New York, 1974.
- Szabadváry, F., *History of Analytical Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1966.
- Townshend, A. (Ed.), *Encyclopedia of Analytical Science*, Academic Press Limited, New York, 1995.
- Vohra, S.K., *Trends in Analytical Chemistry*, **2** (3), 57 (1983).

