

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



\* 5 3 0 9 5 3 7 4 1 3 \*

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

*Desarrollo de Métodos Analíticos para la  
Determinación de Seis Especies Químicas de  
Arsénico, en Muestras Medioambientales y Orina,  
mediante Acoplamiento: Cromatografía Iónica de  
Alta Resolución-Horno Microondas-Generación de  
Hidruros-Espectroscopía de Absorción Atómica*

**Directores:**

**Dra M<sup>a</sup> Antonia Palacios Corvillo**

**Dra M<sup>a</sup> Milagros Gómez Gómez**

**M<sup>a</sup> ANGELES LÓPEZ GONZÁLVEZ**

**MADRID, 1995**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALITICA

M<sup>a</sup> ANTONIA PALACIOS CORVILLO, PROFESORA TITULAR DEL  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS DE LA U.C.M.

M<sup>a</sup> MILAGROS GÓMEZ GÓMEZ, PROFESORA AYUDANTE DEL DEPARTAMENTO  
DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA  
U.C.M.

**HACEN CONSTAR:**

Que el presente trabajo titulado "*Desarrollo de  
Métodos Analíticos para la Determinación de Seis Especies Químicas  
de Arsénico, en Muestras Medioambientales y Orina, mediante  
Acoplamiento: Cromatografía Iónica de Alta Resolución -Horno  
Microondas- Generación de Hidruros- Espectroscopia de Absorción  
Atómica*", ha sido realizado en este Departamento por D<sup>a</sup> María  
Ángeles López González, bajo nuestra dirección, constituyendo la  
Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 18 de Octubre de 1995.

M.A. Palacios

Milagros Gómez

Fdo: Dra. M<sup>a</sup> Antonia Palacios Fdo: Dra. M<sup>a</sup> Milagros Gómez.



*A mis padres*  
*A Macarena y Angeles*  
*A Tere y Asun*

*Realizar un trabajo de esta envergadura nunca puede hacerlo uno solo. Por eso tengo mucho que agradecer a las personas que se encuentran a mi alrededor, en especial:*

*A mi familia, ya que sin su apoyo incondicional no hubiera llegado este día. Además, dos personas han sido muy importantes durante este trabajo, Ángeles y Macarena, ya que ellas han conseguido hacerme sonreír en todo momento, haciendo todo más llevadero.*

*A todos mis amigos (incluida la filipina) por su ayuda, colaboración e inestimable amistad. Quiero resaltar entre todos ellos a Jose, por su contribución científica y a Tere y Asun, ya que parte de esta tesis les pertenece a ellas casi tanto como a mi, por otro lado si tuviera que agradecerles su amistad, etc, no tendría bastantes hojas para escribir, así que, tan solo digo, gracias. Quiero hacer una mención especial a Isabel, a la que agradezco su colaboración directa en esta Memoria.*

*Agradezco a mis compañeros de Laboratorio y despacho (incluida Mari Cruz) toda su ayuda, apoyo y sobre todo los momentos con lagrimillas que alguna vez han tenido que soportar. También tengo que mencionar al grupo de investigación de Eléctricos, por los equipos, reactivos y ayuda que me han prestado a lo largo de todo este trabajo, en especial al Dr. Pingarrón, Julio, María, Carolina, Rocío, Araceli y Lourdes.*

*A la Dra Carmen Cámara le agradezco su amistad, colaboración permanente y concesión de una beca del proyecto M&T-930006 del programa "Medidas, Ensayos y Pruebas" de la Comunidad Europea.*

*Por último agradecer a mis directoras de Tesis, M<sup>a</sup> Antonia y Milagros, su inestimable ayuda, dedicación y paciencia.*

# ÍNDICE

**OBJETIVOS Y PLANIFICACIÓN DEL TRABAJO ..... 1**

**INTRODUCCIÓN GENERAL**

**CAPÍTULO I: LOS COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS Y SUS  
ESPECIES INORGÁNICAS EN EL MEDIO AMBIENTE ..... 7**

I.1.- Los compuestos organometálicos en el medio ambiente ..... 7

    I.1.1.- Formación de compuestos organometálicos ..... 10

        I.1.1.1.- La metilación ..... 11

    I.1.2.- La transformación de los compuestos organometálicos ..... 18

    I.1.3.- Principales organometálicos. Toxicidad y aplicaciones ..... 18

        I.1.3.1.- Los compuestos del estaño ..... 19

        I.1.3.2.- Los compuestos del mercurio ..... 21

        I.1.3.3.- Los compuestos del plomo ..... 22

        I.1.3.4.- Los compuestos del selenio ..... 24

        I.1.3.5.- Los compuestos del telurio ..... 26

        I.1.3.6.- Los compuestos del germanio ..... 26

        I.1.3.7.- Los compuestos del antimonio ..... 27

I.2.- Los compuestos orgánicos e inorgánicos del arsénico en el medio  
    ambiente ..... 29

    I.2.1.- Compuestos del arsénico ..... 29

        I.2.1.1.- Combinaciones del arsénico en estado de oxidación (-III) ..... 30

        I.2.1.2.- Combinaciones del arsénico en estado de oxidación (III) ..... 30

        I.2.1.3.- Combinaciones del arsénico en estado de oxidación (V) ..... 30

    I.2.2.- Especies más importantes en el medio ambiente ..... 31

    I.2.3.- Formación natural de los compuestos inorgánicos del arsénico ..... 32

    I.2.4.- Fuentes de introducción y aplicaciones del arsénico en el medio  
        ambiente ..... 35

    I.2.5.- Aspectos tóxicos y biológicos ..... 37

    Referencias bibliográficas del Capítulo I ..... 40

<b>CAPÍTULO II: MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS .....</b>	<b>47</b>
II.1.- Determinación analítica .....	47
II.1.1.- Extracción y derivatización .....	48
II.1.2.- Separación y determinación de las diferentes formas: métodos químicos y técnicas acopladas .....	50
II.1.2.1.- Cromatografía de Gases .....	52
II.1.2.2.- Cromatografía de Líquidos .....	55
II.2.- Métodos analíticos para la determinación de las especies de arsénico ....	65
II.2.1.- Métodos para la determinación diferencial de las especies de arsénico sin acoplamiento de técnicas instrumentales .....	65
II.2.2.- Determinación de especies de arsénico por acoplamiento de técnicas instrumentales .....	68
II.2.2.1.- Cromatografía de gases .....	68
II.2.2.2.- Cromatografía de líquidos .....	69
Referencias bibliográficas del Capítulo II .....	79
 <b>PARTE EXPERIMENTAL</b>	
 <b>CAPÍTULO III: REACTIVOS Y MATERIAL .....</b>	<b>91</b>
III.1.- Preparación de disoluciones .....	92
III.2.- Material .....	92
<b>CAPÍTULO IV: INSTRUMENTACIÓN .....</b>	<b>94</b>
 <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
 <b>CAPÍTULO V: MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN Y SEPARACIÓN DE ESPECIES DE ARSÉNICO .....</b>	<b>99</b>
V.1.- Derivatización a la forma de hidruros .....	99
V.1.1.- Conclusiones de la derivatización a la forma de hidruros .....	108

V.2.- Transformación de especies de arsénico .....	109
V.2.1.- Transformación de las especies de arsénico mediante termo-oxidación .....	109
V.2.1.1.- Optimización de los parámetros experimentales de la termo-oxidación .....	111
V.2.1.2.- Influencia de la termo-oxidación sobre la eficiencia de generación de hidruros .....	114
V.2.2.- Transformación de especies de arsénico mediante oxidación asistida por microondas .....	118
V.2.2.1.- Optimización de los parámetros experimentales que afectan a la oxidación asistida por microondas .....	119
V.3.- Separación de las seis especies de arsénico mediante HPLC .....	126
V.3.1.- Acoplamiento HPLC-MO-HG-AAS .....	127
V.3.2.- Cromatografía líquida en fase reversa modificada .....	128
V.3.2.1.- Estudio de la influencia del pH de la fase móvil .....	129
V.3.2.2.- Estudio de la influencia de la concentración del reactivo formador de pares iónicos .....	131
V.3.2.3.- Conclusiones de la cromatografía líquida en fase reversa modificada .....	132
V.3.2.4.- Características analíticas .....	133
V.3.3.- Cromatografía de cambio aniónico .....	136
V.3.3.1.- Columna aniónica IC-PAK A .....	136
V.3.3.1.1.- Estudio de la influencia del pH de la fase móvil .....	137
V.3.3.1.2.- Estudio de la influencia de la concentración de fosfato .....	138
V.3.3.1.3.- Conclusiones de la cromatografía de cambio aniónico con la columna IC-PAK A .....	139
V.3.3.1.4.- Características analíticas del método .....	141
V.3.3.2.- Columna aniónica Hamilton PRP-X 100 .....	142
V.3.3.2.1.- Estudio de la influencia del pH de la fase móvil .....	142
V.3.3.2.2.- Estudio de la influencia de la concentración de fosfato .....	144



V.3.3.2.3.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC-MO-HG-AAS en base a la diferente separación cromatográfica a pH 6.0 y 10.7 .....	145
V.3.3.2.4.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC-termo-oxidación - HG - AAS en base al diferente comportamiento de estas especies en el proceso de la Termo-oxidación en presencia y ausencia de $K_2S_2O_8$ .....	149
V.3.3.2.5.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC-MO - HG - AAS en base a la exclusión selectiva de especies con cartuchos aniónicos (IC-OH) conectados a la válvula de inyección .....	153
Referencias bibliográficas del Capítulo V .....	158
<b>CAPÍTULO VI: APLICACIONES ANALÍTICAS DIRECTAS</b>	
<b>EMPLEANDO LOS MÉTODOS DESARROLLADOS CON LAS DIFERENTES COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS ...</b>	
VI.1.- Introducción .....	159
VI.2.- Especiación de arsénico en agua residual empleando la cromatografía de fase reversa modificada y detección MO-HG-AAS .....	161
VI.3.- Especiación de arsénico en aguas y extractos de sedimentos por cromatografía de cambio aniónico en columna IC-PAK A y detección por MO-HG-AAS .....	162
VI.4.- Especiación de As en distintos tipos de muestras medioambientales por cromatografía de intercambio aniónico en columna Hamilton PRP-X 100 y detección por MO-HG-AAS .....	164
VI.4.1.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC-MO-HG-AAS en base al diferente comportamiento de estas especies en función del pH .....	164
VI.4.2.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC - termo-oxidación - HG - AAS en base al diferente comportamiento de estas especies en el proceso de termo-oxidación en presencia y	

ausencia de $K_2S_2O_8$ .....	167
VI.4.3.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC-MO-HG-AAS en base a la exclusión selectiva de especies con cartucho aniónico (IC-OH) conectado a la válvula de inyección .....	169
<b>CAPÍTULO VII: PRECONCENTRACIÓN DE ESPECIES TÓXICAS DE ARSÉNICO MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA .....</b>	<b>173</b>
VII.1.- Introducción .....	173
VII.2.- Métodos empleados para la determinación del contenido total de arsénico tóxico e individual de cada especie tóxica .....	175
VII.3.- Optimización de los parámetros que afectan a la retención de las especies tóxicas de arsénico .....	178
VII.4.- Optimización de los parámetros que afectan a la elución de las especies tóxicas de arsénico .....	180
VII.5.- Características analíticas .....	182
VII.6.- Aplicaciones analíticas .....	188
Referencias Bibliográficas del Capítulo VII .....	189
<b>CAPÍTULO VIII: DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMPLEJAS. APLICACIONES ANALÍTICAS .....</b>	<b>191</b>
VIII.1.- Adsorción de las especies de arsénico en humanos .....	191
VIII.2.- Metabolismo del arsénico .....	193
VIII.3.- Eliminación de arsénico .....	196
VIII.4.- Determinación de arsénico total y tóxico en orina .....	197
VIII.4.1.- Optimización de los parámetros que afectan a la descomposición de los compuestos orgánicos de arsénico en muestras de orina .....	199
VIII.4.2.- Características analíticas del método para la determinación de arsénico total en muestras de orina .....	201
VIII.4.3.- Características analíticas del método para la determinación de	

arsénico tóxico en muestras de orina .....	203
VIII.4.4.- Aplicación analítica .....	204
VIII.5.- Determinación individualizada de las especies de arsénico en orina ...	207
VIII.5.1.- Pretratamiento de la muestra ("clean-up") .....	207
VIII.5.2.- Características analíticas del método .....	209
VIII.5.3.- Aplicación .....	213
VIII.6.- Estudio de la estabilidad de las especies de arsénico en agua y orina .	218
VIII.6.1.- Preparación y conservación de las muestras .....	219
VIII.6.2.- Procedimiento analítico .....	221
VIII.6.3.- Tratamiento estadístico .....	221
VIII.6.4.- Resultados y discusión .....	222
Referencias bibliográficas del Capítulo VIII .....	233

## CONCLUSIONES

## OBJETIVOS Y PLANIFICACION DEL TRABAJO

Probablemente Lucrecia Borgia, hija del Papa Alejandro VI, en el siglos XVI fue, al regir los destinos de la Iglesia Romana y la promoción eclesiástica de su familia con unas dosis de arsénico vertidas en el vino del próximo cesado (a perpetuidad), la que decidió el trágico destino de este elemento, y aunque muchas cosas han cambiado desde Lucrecia Borgia, no ha cambiado la visión que se tiene del mismo. No hay duda de que en una encuesta popular, el arsénico, el cianuro y la estriknina (estos últimos popularizados por Agatha Cristie), serán los tres venenos que alcanzarían los primeros puestos de la lista de los posibles.

Sin embargo, el conocimiento que se tiene del arsénico en los ambientes científicos, ha cambiado extraordinariamente en las últimas décadas. Uno de los primeros cambios importantes es que actualmente se cuestiona su posible esencialidad para los organismos vivos y el hombre. De ser elemento esencial, al igual que el resto de ellos, participaría en alguno de los complicados procesos bioquímicos que ocurren en el interior de las células vivas; sin embargo se duda que pueda ratificarse su esencialidad ya que es en dosis tan pequeñas que prácticamente en todos los alimentos se encuentran las cantidades necesarias de la toma diaria.

Otro cambio importante en el conocimiento del arsénico, son las transformaciones a diferentes especies químicas que experimenta en el medio ambiente. Las más conocidas son las transformaciones biológicas a través de los organismos vivos y del SAM (S-adenosilmetionina), sustancia segregada por las bacterias que produce la transformación del arsénico inorgánico a formas orgánicas del mismo. Así, a través del SAM, que posee en su estructura un grupo metilo, se metilan las especies inorgánicas del As, obedeciendo probablemente a un mecanismo de detoxificación. Las metilaciones sucesivas a través

del SAM conducen a formas mono- (monometil As) di- (dimetilarsénico) y trimetiladas (trimetilarsina, óxido de trimetilarsonio), y a compuestos como la arsenobetaína y la arsenocolina, presentes fundamentalmente en los organismos marinos. Sin embargo, no son estos los únicos derivados orgánicos que se originan por reacción con el SAM, ya que su resto orgánico también puede reaccionar con el arsénico inorgánico para formar diferentes compuestos de cadena larga y complicada que son conocidos genéricamente como "arseno azúcares", presentes en las plantas marinas, fundamentalmente en las algas, que sirven de alimento a los peces y al hombre.

Pero estas transformaciones químicas que experimenta el arsénico, no serían muy importantes si no fuera por la diferente toxicidad que presentan las distintas especies; así, mientras que el arsenito y el arseniato son extraordinariamente tóxicos, la toxicidad de los compuestos orgánicos formados a partir de ellos va disminuyendo a medida que aumenta el grado de metilación, siendo la arsenobetaína, la arsenocolina y se cree que los arseno azúcares, las especies menos tóxicas. El NORI, compuesto de algas típico de la alimentación japonesa, posee una concentración de arsénico, en forma de arseno azúcares, de 50 ppm, lo que produciría consecuencias fatales si esa concentración se debiera a cualquiera de las especies inorgánicas del elemento. Por otro lado puede decirse que la dosis normal de AsB en peces sería letal si se encontrara en forma de As(III).

Estos ejemplos ponen de manifiesto la necesidad de conocer no sólo la concentración total de As presente, sino también la especie química en que se encuentra.

El desarrollo de métodos analíticos para conocer las concentraciones reales de las distintas especies que aparecen en las muestras ambientales, presenta grandes dificultades debido a que dichas especies no poseen en su mayoría procedimientos específicos para determinarlas. Hace ya muchos años Gutzeit y colaboradores propusieron la generación de arsina como procedimiento para controlar las concentraciones de arsénico inorgánico en los tejidos biológicos. Hoy en día, la generación de arsina unida a una técnica

de detección elemental, sigue siendo el mejor método para determinar el arsénico cuando se encuentra en bajas concentraciones, como es el caso de las muestras medioambientales.

Con estas bases, el objetivo del trabajo de investigación contenido en esta Memoria ha sido establecer métodos analíticos que permitan, mediante el acoplamiento de la técnica de generación de hidruros con la absorción atómica, determinar las seis especies de arsénico sobre las que se está realizando una investigación más exhaustiva en la actualidad. Dichas especies son As(III), As(V), monometilarsónico (MMA), dimetilarsénico (DMA), arsenobetaina (AsB) y arsenocolina (AsC). Las muestras objeto de estudio han sido, por un lado, de tipo medioambiental, habiéndose utilizado diversas matrices: aguas dulces, agua de mar, sedimentos, etc. y, por otro, algunas muestras biológicas, fundamentalmente de orina.

El trabajo desarrollado puede resumirse esquemáticamente de la manera siguiente:

1) Cuando se aborda el problema de la especiación con una técnica elemental como es la generación de hidruros - absorción atómica, el primer inconveniente que aparece se debe, fundamentalmente, a la necesidad de separar las distintas especies antes de realizar la determinación individualizada. Por otra parte, la AsB y AsC no generan el correspondiente hidruro y el resto de las especies lo generan pero con muy diferente eficiencia. Con estas premisas se ha abordado el desarrollo en línea del procedimiento analítico por acoplamiento de técnicas instrumentales incorporando una técnica de separación de especies, como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y una etapa intermedia de termoxidación de las especies orgánicas (no formadoras de hidruros) a sus formas orgánicas, previas a la técnica de generación de hidruros. Así mismo, se han evaluado las prestaciones de diferentes columnas cromatográficas, en función de los parámetros fisicoquímicos que influyen en la separación. Todos estos estudios han dado lugar a tres publicaciones (López A.(1993), López A,(1994), López A.(1995)).

2) El procedimiento desarrollado por HPLC - OXIDACION MICROONDAS - GENERACION HIDRUROS - ABSORCION ATOMICA (HPLC-MW-HG-AAS), se ha utilizado para la especiación de As en diversas muestras medioambientales. Por otro lado, su aplicación en muestras de orina de individuos expuestos a las distintas especies de As, a través de la alimentación ha permitido conocer la evolución de dichas especies en el organismo y distinguir entre las formas tóxicas y no tóxicas del As, así como abordar el problema de la estabilidad de las especies orgánicas del As en aguas y orina. Dando lugar a una publicación (López A. (1995)).

3) Finalmente, se han tratado de desarrollar métodos de preconcentración de las distintas especies mediante el empleo de cartuchos de intercambio aniónico y técnicas de "clean up" con el fin de mejorar los límites de detección y poder realizar la determinación de las concentraciones a los niveles en que se encuentran en determinadas muestras reales. Dando lugar a una publicación (López A.(1995)).

# INTRODUCCIÓN GENERAL







La formación y degradación de las especies organometálicas en el medio ambiente son procesos que tienen un papel importante en la movilización y el transporte de los metales a través de los diferentes compartimentos del ecosistema terrestre (Thayer, 1989). Además, la formación natural de estas especies a partir de precursores inorgánicos conduce, generalmente, a especies más tóxicas. En efecto, la mayor parte de los compuestos organometálicos estables en medio natural son extremadamente tóxicos. Aunque en general las formas organometálicas son más tóxicas que las formas inorgánicas, esto no es así para el arsénico, antimonio y selenio.

La fuerte toxicidad de los compuestos organometálicos se debe, esencialmente, a que su solubilidad en los tejidos lipídicos es mayor que la de los iones metálicos y a su capacidad para atravesar las membranas biológicas, lo que conduce a un tiempo de residencia mayor en los organismos y a mecanismos de bioconcentración. Estos fenómenos de bioacumulación se suceden a lo largo de toda la cadena alimenticia y pueden conducir a unos niveles de contaminación muy importantes. Así, la proporción de las formas alquiladas en relación con los contenidos totales de los metales no es muy importante en las aguas naturales, pero, por el contrario, aumenta rápidamente a través de los diferentes eslabones de la cadena alimenticia. La *Tabla 1* muestra la abundancia relativa de las formas organometálicas en el medio ambiente acuático para los elementos mercurio, estaño, plomo y arsénico.

La identificación y cuantificación correctas de las especies organometálicas en el medio ambiente tienen una gran importancia, ya que permiten demostrar las diferentes transformaciones (degradación, alquilación) de estos compuestos, comprender mejor el transporte de estas especies a través de los compartimentos del ecosistema terrestre y mejorar el conocimiento de los ciclos bioquímicos de los elementos. En los últimos años ha sido posible estudiar el comportamiento de las especies organometálicas en el ecosistema terrestre, gracias a la evolución de las técnicas analíticas.

Tabla I.- Abundancia relativa de formas organometálicas en el medio ambiente acuático (Pinel y col. 1990). Me = metilo, Et = etilo, Bu = butilo y EtMe = etil-metil.

Muestra	Concentración Total	% formas alquiladas	Formas químicas
<b>Mercurio</b>			
<i>Agua</i> (ng/ml)			
río	0.013	1	Me
mar	0.01-0.03	10	Me
<i>Sedimentos</i> (ng/g)			
naturales	200-400	0	-
polucionados	1000-20000	1-3	Me
<i>Organismos</i> (ng/g)			
pescados(río)	360-1000	70-95	Me
pescados(mar)	10-15000	60-90	Me
<b>Estaño</b>			
<i>Agua</i> (ng/L)			
lago	0.009	53	Me
estuario	0.130-0.385	16-100	Me,Bu
mar	0.004	60	Me
<i>Sedimentos</i> (ng/g)			
naturales	830-1235	65-75	Me
polucionados	7700-25000	3-50	Me,Bu
<i>Organismos</i> (ng/g)			
algas	250-550	20-30	Me,Bu
pescados(mar)	86-260	3-6	Me
ostras (contam.)	3700	97	Bu
<b>Plomo</b>			
<i>Aire</i> (ng/mL)	-	0.3-22	Et,EtMe,Me
<i>Agua</i> (ng/mL)			
lluvia	130-280	<1	Et,EtMe,Me
lixiviación	8	<1	Et,EtMe,Et
<i>Organismos</i> (ng/g)			
pescados	-	10-90	Et
<b>Arsénico</b>			
<i>Agua</i> (ng/mL)			
lago	60	16	Me
mar	1.7-1.9	7-16	Me
<i>Organismos</i> (ng/g)			
algas	33000-57600	1-18	Me
fitoplacton	2000-3400	22-37	Me

Actualmente no existe reglamentación para los valores límite de concentración de los compuestos organometálicos en el medio ambiente. Sin embargo, está claramente indicado en ciertas directrices europeas que estas especies deben ser convenientemente controladas para la protección del medio ambiente marino o la verificación de la calidad de las aguas potables. Los compuestos organoestánnicos y organomercúricos, así como una lista de otros metales y metaloides y sus derivados orgánicos (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Se, As, Sb, Mo, Ba, B, V, Co...), están explícitamente mencionados en las directrices 76/464/EEC "Pollution caused by certain dangerous substances discharged into the aquatic environment" y 80/68/EEC "Protection of ground water against pollution caused by certain dangerous substances".

#### **I.1.1.- Formación de compuestos organometálicos.**

La detección de formas organometálicas que no son compuestos antropogénicos ni productos de su degradación en medios naturales, ha demostrado que la formación de compuestos organometálicos es posible en el medio ambiente por vía química o biológica, esencialmente a partir de precursores inorgánicos (Ridley y col., 1977).

La reacción más simple y rápida que conduce a la formación de compuestos organometálicos es la metilación. Sin embargo, para ciertos metales la formación de compuestos organometálicos en el medio ambiente no proviene de dicha reacción, sino de reacciones que ponen en juego grupos orgánicos más complejos. Así, ciertos metales como el selenio y el arsénico pueden ser metilados y/o formar especies organometálicas de pesos moleculares más elevados en función de las condiciones químicas y biológicas del medio.

La formación de compuestos organometálicos en el medio ambiente se produce, generalmente, por la adición sobre un metal de un grupo orgánico ( $\text{CH}_3$ ), que reacciona bajo forma radical, aniónica o catiónica en función del agente metilante que suministra el grupo metilo. Los mecanismos de formación de dichas especies dependen de la forma

química del grupo orgánico considerado, del grado de oxidación inicial en el que se encuentra el metal y de la forma final que resulta de la reacción.

#### **I.1.1.1.- La metilación**

Los mecanismos de metilación han sido estudiados por numerosos autores para distintos elementos (Craig, 1986a; Rapsomanikis y Weber, 1986). Este fenómeno es particularmente importante en el medio marino y en los estuarios, donde las formas metiladas del estaño pueden alcanzar del 60 al 90% de la masa total de estaño presente en la fase disuelta.

Las reacciones de metilación no conducen únicamente a compuestos monometilados, sino también a especies di, tri o tetrametiladas, algunas de las cuales son especies volátiles que pueden pasar a la atmósfera. El mercurio y el estaño pueden formar así, por metilaciones sucesivas, dimetilmercurio y tetrametilestaño respectivamente. Las reacciones de metilación tienen lugar en diferentes compartimentos del medio ambiente (agua, sedimentos o tejidos biológicos). La cinética de formación de compuestos metilados y la naturaleza de los compuestos formados dependen de numerosos factores, como son la concentración de los metales en el medio considerado (Xun y col., 1987), la cantidad de materia orgánica (Jackson, 1988), la temperatura (Callister y Winfrey, 1986), la naturaleza de los microorganismos presentes y la cantidad de sulfuro (Compeau y Bartha, 1985). Los fenómenos naturales de metilación no conciernen únicamente a los metales en formas inorgánicas, sino que igualmente pueden producirse con especies ya alquiladas.

#### ***Principales agentes metilantes***

Existen numerosos agentes metilantes naturales, si bien no todos están todavía bien identificados. Los agentes metilantes más conocidos actualmente son:

a) Metilcobalamina

La metilcobalamina es una metilcoenzima de la vitamina B12 encontrada en los animales y las bacterias. El enlace metilo-Co en la metilcobalamina es estable pero permite la transferencia del grupo metilo a ciertas especies metálicas.

De todos los agentes biometilantes, la metilcobalamina es única, en el sentido de que es capaz de transferir un grupo metilo en tres grados de oxidación: como carbanión ( $\text{CH}_3^-$ ), como carbocatión ( $\text{CH}_3^+$ ) y como radical metilo ( $\text{CH}_3\cdot$ ). Entre estas posibilidades, los mecanismos de transferencia por carbanión o radical metilo son predominantes. La metilcobalamina es un agente metilante muy conocido para la metilación del mercurio por sustitución directa. En La *Figura 2* se representa la molécula metilcobalamina.

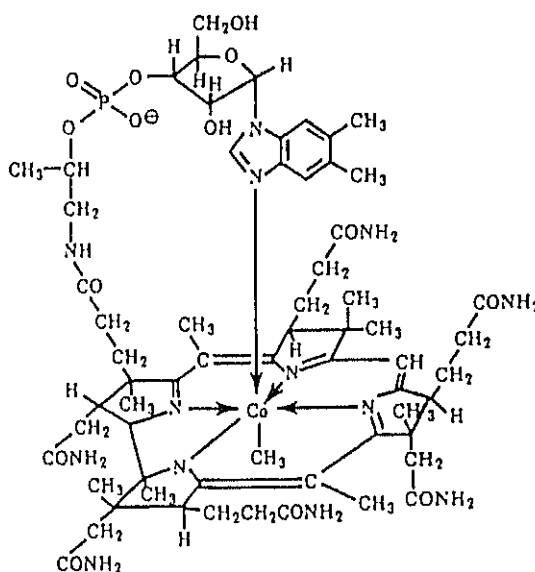


Figura 2.- Molécula de metilcobalamina

b) *S*-adenosilmetionina

La *S*-adenosilmetionina (SAM) es una forma activada de la metionina que transfiere un grupo metilo en forma de carbocatión ( $\text{CH}_3^+$ ). La especie que la recibe debe ser nucleófila, es decir, poseer un par de electrones disponibles. La estructura de este agente metilante está representada en la *Figura 3*.

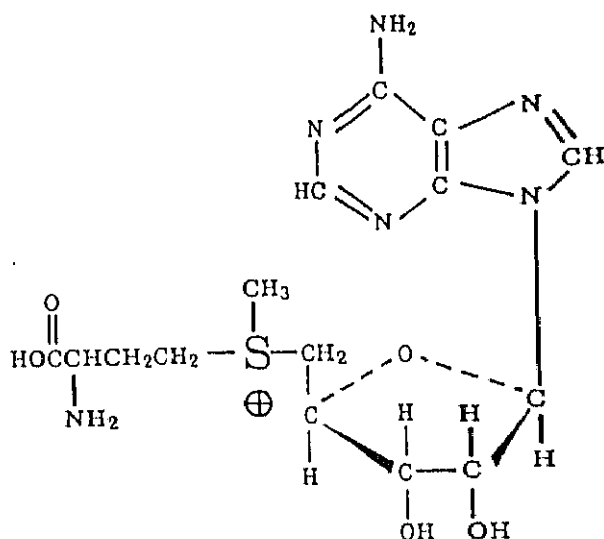


Figura 3.- Estructura de la molécula *S*-adenosilmetionina.

La biometilación del arsénico en trimetilarsina proviene de un intermediario de la *S*-adenosilmetionina. Este mecanismo propuesto por primera vez por Challenger en 1945 está ahora bien establecido para el arsénico y el selenio, donde la biometilación conlleva una desintoxicación, formando compuestos menos tóxicos que las formas inorgánicas.



*c) Otros agentes metilantes.*

La metilación en el medio ambiente puede producirse igualmente a partir de otros agentes metilantes tales como el yoduro de metilo (Craig, 1986a), los productos de la degradación de los ácidos húmicos y fúlvicos (Nagase y col., 1982) y el 3-(dimetilsulfonio) propionato (Reed, 1983). Otros agentes metilantes posibles son los metales metilados que pueden transferir sus grupos metilos a otros metales en forma inorgánica. Este último mecanismo es conocido como transmetilación.

*Mecanismos de metilación*

Los mecanismos de metilación dependen esencialmente del estado de oxidación en el que se encuentra el metal considerado, pero también del agente metilante que suministra el grupo metilo.

Según Ridley y col. (1977), los diferentes mecanismos de metilación dependen de los potenciales estándar de oxidoreducción ( $E^0$ ) de los pares redox considerados (*Tabla II*).

Los elementos para los que los valores de  $E^0$  son superiores a +0.8V, reaccionan en su estado de oxidación más elevado con un carbanión para dar el metal metilado sin modificación de su estado de oxidación inicial (sustitución directa). Estos elementos son aquellos en los que el estado de oxidación más bajo no se oxida fácilmente. Los elementos que se oxidan más fácilmente son metilados por vía radical o por transferencia de un carbanión, con una oxidación concomitante del metal.

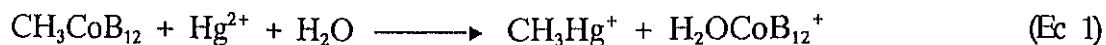
Tabla II: Potenciales estándar de oxidoreducción y mecanismos de metilación (Ridley y col.,1977).

Sistema redox	$E^0$ (V)	Mecanismo
Pb(IV) / Pb(II)	+1,46	Sustitución directa de un grupo metilo ( $\text{CH}_3^-$ )
Tl(III) / Tl(I)	+1,26	
Se(VI) / Se(IV) en medio ácido	+1,15	
Hg(II) / Hg(0)	+0,854	
Sb(V) / Sb(III)	+0,678	
As(V) / As(III) en medio ácido	+0,662	Metilación por ( $\text{CH}_3^+$ ) ó ( $\text{CH}_3\cdot$ ) con oxidación del metal
Sn(IV) / Sn(II)	+0,154	
Pb(II) / Pb(0)	-0,13	
Ge (IV) / Ge(II)	-0,13	
Sn(II) / Sn(0)	-0,14	
Cr(III) / Cr(II)	-0,41	
As(V) / As(III) en medio básico	-0,67	

*a) Sustitución directa*

Para los metales que en su estado de oxidación más elevado no dispongan de un par de electrones disponibles, el grupo metilo es transferido al metal en forma de carbanión ( $\text{CH}_3^-$ ). El carbanión metilo proviene generalmente del agente metilante biológico, la metilcobalamina, pero puede también provenir de otras especies organometálicas presentes en el medio, por ejemplo  $(\text{CH}_3)_3\text{Sn}^+$  o  $(\text{CH}_3)_3\text{Pb}^+$  (transmetilación). En este caso no hay cambio del estado de oxidación del metal.

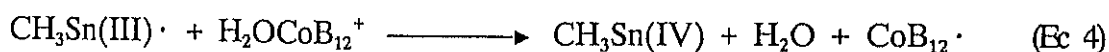
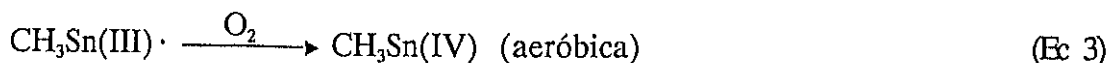
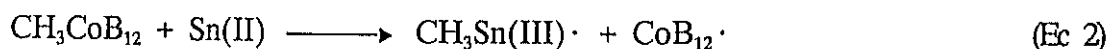
Para el ión mercúrico, en disolución acuosa en presencia de metilcobalamina, la reacción puede escribirse de la siguiente forma:



*b) Adición radical*

Los elementos que tienen un electrón libre y que pueden ser oxidados a un grado de oxidación estable pueden sufrir una metilación por una transferencia del radical metilo. Se conocen varias posibilidades de ataque por vía radical. La metilcobalamina puede perder en ciertas condiciones un grupo metilo en forma de radical  $\text{CH}_3\cdot$  después de la ruptura homolítica del enlace Co-C. Este radical metilo se transfiere rápidamente al metal.

En el caso del estaño, por ejemplo, el mecanismo puede ser esquematizado de la siguiente forma (Fanchiang y Wood, 1981):



*c) Adición oxidante*

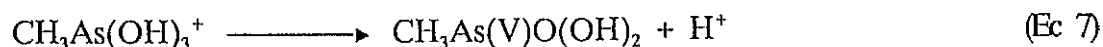
Los metales de potencial de oxidación bajo pueden sufrir este tercer tipo de metilación si el agente metilante es capaz de oxidar el metal. Este mecanismo está relacionado con los procesos anteriores. Así, un elemento inorgánico fácilmente oxidable es transformado, por un proceso de adición oxidante, en una especie metilada con un grado de oxidación dos unidades mayor. En el caso del estaño esquematizado a continuación, el estaño (II) es oxidado a estaño (IV) y metilado simultáneamente.



(acac = enlace bidentado acetilacetona,  $\text{CH}_3\text{COCH-COCH}_3$ )

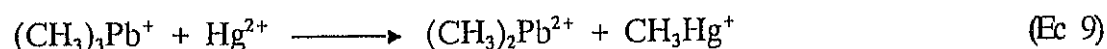
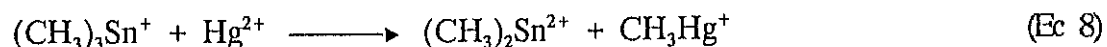
*d) Adición del carbocatión  $\text{CH}_3^+$*

Este mecanismo se llama a menudo el mecanismo de Challenger, ya que este autor fue el primero en formularlo (Challenger, 1945). La adición directa de un carbocatión metilo ( $\text{CH}_3^+$ ) sobre un metal de grado de oxidación bajo proporciona el metal metilado con un grado de oxidación dos unidades mayor. Los cationes metilo pueden provenir de diferentes fuentes, como la S-adenosilmetionina. La transferencia de carbocatión para los procesos enzimáticos de la metilación del arsénico es bien conocida (Challenger, 1978):



*e) Transmetilación*

Para ciertos elementos en determinadas condiciones, la metilación puede producirse por mecanismos abióticos de transmetilación (Chau y col., 1987). Este mecanismo es posible para diferentes metales, pero se conoce sobre todo para el mercurio. El grupo metilo que se transfiere al metal inorgánico proviene de una especie organometálica metilada presente en el medio:



### **I.1.2.- La transformación de los compuestos organometálicos**

Los compuestos organometálicos presentes en el medio ambiente, ya sean de origen antropogénico o resultado de reacciones de alquilación naturales, están en permanente evolución.

Las modificaciones que sufren los compuestos organometálicos en el medio ambiente dependen de numerosos factores, entre los que cabe destacar la concentración de azufre y oxígeno, el pH, la salinidad, la temperatura y la intensidad de las radiaciones UV. Las transformaciones químicas de los compuestos organometálicos más interesantes en el medio ambiente conciernen esencialmente a los grupos orgánicos enlazados al metal. Estas transformaciones se acompañan de un aumento (metilación) o una disminución (degradación) del número de enlaces metal-carbono.

Existe una competencia permanente entre las diferentes reacciones químicas posibles de los organometálicos presentes en base a su cinética. Estas cinéticas no se conocen todavía bien y resulta difícil cuantificar las diferentes transformaciones de las formas químicas de los metales y la distribución de las formas organometálicas en los diferentes compartimientos del ecosistema terrestre. Las transformaciones químicas de los metales controlan muy estrechamente su toxicidad y su cinética de transferencia en los medios naturales.

### **I.1.3.- Principales compuestos organometálicos. Toxicidad y aplicaciones**

Debido a que la toxicidad de los compuestos organometálicos es altamente dependiente de la especie química de que se trate, es importante conocer sus diferentes fuentes antropogénicas y estudiar la influencia que tienen en el medio ambiente. Además, aunque en muchos casos la forma inorgánica del elemento es inocua, en otros casos ocurre lo contrario, siendo las especies inorgánicas las más tóxicas, como por ejemplo el arsénico. Por todo esto, es importante conocer los compuestos de los

elementos capaces de formar organometálicos estables en el medio ambiente y cómo pueden éstos modificar el ciclo biogeoquímico de dichos metales en la biosfera.

### I.1.3.1.- Los compuestos del estaño

La presencia de compuestos organoestánnicos en el medio ambiente debe controlarse cuidadosamente, dado su gran uso industrial y multitud de aplicaciones. Los grados de oxidación que se encuentran generalmente en el medio ambiente son II y IV. Los compuestos orgánicos del estaño poseen las siguientes estructuras:  $R_4Sn$ ,  $R_3SnX$ ,  $R_2SnX_2$ ,  $RSnX_3$ , en las cuales R puede ser alifático (metilo, etilo, butilo, octilo,...) o aromático (fenilo), y X, grupo aniónico, es generalmente un fluoruro, óxido, hidróxido, carboxilato o tioalato. Los compuestos más interesantes son principalmente los di o trisustituidos.

La toxicidad de los compuestos organoestánnicos aumenta proporcionalmente con el número de grupos alquilados ligados al átomo de estaño (Blunden y col. 1985) y depende del tamaño del grupo alquilado:



El estaño en forma inorgánica (mineral o sales) presenta numerosas propiedades y su empleo se sitúa, esencialmente, en los sectores industriales. Las aplicaciones de las formas del estaño orgánico son variadas: catalizadores, agentes estabilizantes (particularmente para los polímeros y el PVC), agentes biocidas y fungicidas para la agricultura, pinturas o protección de la madera (Blunden y Chapman, 1986).

A causa de sus múltiples usos, los organoestánnicos tienen numerosas posibilidades de entrar en el medio ambiente. En el aire, su introducción procede fundamentalmente de tratamientos biocidas, de la incineración de restos de materiales tratados o estabilizados por organoestánnicos, o de la pulverización de organoestánnicos sobre

vidrio a alta temperatura para producir películas de SnO<sub>2</sub>. En el suelo, la presencia de organoestánicos proviene de las utilidades agrícolas, de la conservación de la madera y del enterramiento de residuos. En el agua, se vierten compuestos organoestánicos por las pinturas antisuciedad de los barcos, el lavado de los suelos y de los materiales en PVC. Son bien conocidos los problemas causados por la presencia del tributilestano empleado como aditivo en la pintura de los barcos, en la extinción de moluscos bivalvos tales como ostras, almejas y otros organismos marinos.

Se ha estudiado la metilación del estaño en el medio ambiente ya que se han detectado compuestos metilados de estaño en aguas no contaminadas (Maguire y col., 1986; Donard y col., 1986; Rapsomanikis y col., 1987). El estaño inorgánico en sus diferentes grados de oxidación puede metilarse en el medio ambiente. Las especies formadas no son necesariamente las mismas en función del grado de oxidación de la especie de partida y de las condiciones. Igualmente, parece posible que especies ya alquiladas sean metiladas en el medio ambiente, habiéndose detectado especies mixtas metiladas y butiladas (Maguire, 1984).

Varios autores han demostrado que el Sn(II) y el Sn(IV) pueden transformarse en los sedimentos en derivados metilados, tales como el tetrametilestano (Guard y col., 1981; Chau y col., 1981; Hallas y col., 1982; Rapsomanikis y col., 1987).

Los mecanismos de metilación del estaño pueden producirse por adición oxidante de un grupo CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, ataque nucleófilo por CH<sub>3</sub><sup>-</sup> o por un ataque radical por CH<sub>3</sub>·. El Sn(II) o el Sn(IV) pueden reaccionar con el yoduro de metilo (CH<sub>3</sub>I) en medio acuoso para dar diferentes compuestos (Chau y col., 1981). La biometilación de Sn(II) puede llevarse a cabo por una capa de bacterias puras obtenidas en condiciones naturales (Ashby y Craig (1987)). También pueden metilarse tanto el Sn(II) como el Sn(IV) por procesos de transmetilación en presencia de (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Pb<sup>+</sup>, para dar compuestos monometilados (Chau y col., 1987).

Los mecanismos de metilación del estaño son bastante conocidos, pero es muy difícil evaluar la cinética de estas reacciones. Además, las especies metiladas formadas se pueden recombinar entre ellas o con otros metales o bien desmetilarse de nuevo.

### **I.1.3.2.- Los compuestos de mercurio**

Los compuestos organomercuriales son los organometálicos más estudiados ya que han sido el origen de varias catástrofes ecológicas importantes.

La toxicidad de los compuestos monoalquilados de mercurio de cadenas cortas, y particularmente del metilmercurio, es muy importante por su fuerte tendencia a la bioacumulación y su débil capacidad de ser degradados. El enlace mercurio-metilo es muy estable en la mayor parte de los organismos y sus propiedades de liposubilidad le permiten atravesar las membranas celulares y la barrera sanguínea del cerebro. Además, pueden unirse a enlaces biológicos que conducen a tiempos de vida media de estas especies en el hombre mucho más largos (60-70 días) que para las especies inorgánicas (3-4 días) (Craig, 1986b). El metilmercurio ataca particularmente las funciones motrices del sistema nervioso.

Los usos más importantes del mercurio inorgánico se sitúan en los sectores industriales de fabricación de baterías eléctricas, pinturas y síntesis orgánicas. Las formas organometálicas del mercurio ( $C_2H_5HgX$ ,  $CH_3HgX$ ,  $C_6H_5HgX$ ) se utilizan en el tratamiento de granos de cereales, fungicidas, bactericidas o catalizadores en la producción de productos químicos. Otras formas más complejas de compuestos organomercuriales están contenidas en productos farmacéuticos y medicamentos, ya que poseen características interesantes fundamentalmente como biocidas (Craig, 1986b).

La biometilación del mercurio da lugar a la formación de monometil-Hg cuya toxicidad se demostró dramáticamente en Minamata (Japón) causando la muerte de más de un centenar de personas (Kudo y Miyahara, 1991).



En la bibliografía pueden encontrarse numerosos estudios acerca de este proceso de biometilación. La conversión de mercurio inorgánico en metilmercurio fue descrita por primera vez por Jensen y Jernelov (1969). La metilación del mercurio se produce tanto en medio aeróbico (Masson y Fitzgerald, 1990) como anaeróbico, pero los mejores rendimientos parecen producirse en zonas oxidantes anaeróbicas, donde se encuentran una gran variedad de microorganismos. En condiciones más bien ácidas y neutras se forma el metilmercurio, mientras que el dimetilmercurio se genera en condiciones más básicas (Craig, 1986b). Numerosas moléculas formadas en procesos biológicos, que pueden ceder grupos metilo al mercurio, están disponibles en medio acuoso. La metilcobalamina es la más conocida de estas moléculas. Su reacción con Hg(II) en medio acuoso se presentó en la *Ecuación 1*. El metilmercurio formado puede ser metilado de nuevo por la metilcobalamina para dar dimetilmercurio, pero esta última etapa es mucho más lenta que la formación de metilmercurio (Tanzer y col. 1974). Por otro lado, el dimetilmercurio puede aparecer después de la reacción del metilmercurio por dismutación en presencia de un ión sulfuro (Parris y col. 1977). El dimetilmercurio así formado es volátil y puede por tanto, pasar a la atmósfera.

La transferencia de un carbanión al mercurio inorgánico puede igualmente producirse en zonas contaminadas por procesos de transmetilación de otros metales metilados. Igualmente, se ha propuesto una metilación de mercurio por bacterias sulfato reducidas que son los organismos principales de la biometilación en sedimentos (Compeau y Bartha, 1985).

### **I.1.3.3.- Los compuestos de plomo**

De todos los organoplúmbicos, las formas trialquiladas son las más neurotóxicas para los mamíferos (Grandjean y Nielsen, 1979) y se sabe que las formas tetraalquiladas se degradan rápidamente en especies trialquiladas después de la ingestión. En la *Tabla III* se presentan las dosis letales de los distintos compuestos orgánicos de plomo para las ratas (Grandjean y Nielsen, 1979).

Tabla III.- Dosis letales ( $DL_{50}$ ) de los compuestos plúmbicos para las ratas (Grandjean y Nielsen, 1979).

Compuestos	$DL_{50}$ (mg Pb /Kg)
Tetraetilplomo	15
Trietilplomo	20
Tetrametilplomo	80
Trimetilplomo	<36

Los primeros compuestos organoplúmbicos se prepararon en el siglo XIX por reacción del hidruro de etilo con plomo metálico (Löwig, 1853 y Cahours, 1853). Los diversos estudios sobre la química de estos compuestos han llevado al descubrimiento de las eficaces propiedades antidetonantes del tetraetilplomo (Midgley y Boyd, 1992). Los aditivos antidetonantes de plomo son derivados tetraalquilados, incluyendo el tetraetilplomo, el tetrametilplomo y sus tres derivados mixtos (Radojevic, 1989). Aproximadamente el 98% de este plomo se convierte en plomo inorgánico durante la combustión de la gasolina y el resto se emite sin modificación al medio ambiente (Hewitt y Rashed, 1988). Una vez en la atmósfera, el tetraalquilplomo se descompone fotolíticamente y produce especies tri- di- y monoalquiladas de plomo.

El empleo de compuestos tetraalquilados de plomo para otras aplicaciones, industriales o comerciales, que no sea como aditivo de la gasolina, ha sido severamente restringido por consideraciones de salud pública y para la protección del medio ambiente. Sin embargo, estos compuestos se han utilizado como agentes alquilantes en la fabricación de fungicidas mercurícos. Se propusieron igualmente para la conservación de madera y algodón, pesticidas, aditivos de lubricantes, agentes antisuciedad y catalizadores (Shapiro H. y Frey, 1968). El trifetilplomo se utilizó en baja proporción en las pinturas antisuciedad en medio marino. La producción de tetraalquilplomo se consideró responsable de la aparición de elevadas concentraciones de alquilplomo en ciertos

medios acuáticos (Wong y col., 1989). Además, estos compuestos y sus productos de descomposición pueden contaminar el agua después de acumularse en los sedimentos. Si su tiempo de vida media es lo suficientemente largo puede haber incluso bioacumulación en la fauna y flora acuáticas.

La presencia de algunas especies organoplúmbicas en el medio ambiente acuático hace pensar que se producen transformaciones químicas y biológicas de los alquilplomo de origen antropogénico (hidrólisis, fotólisis, dialquilación biológica, metilación) después de la entrada de estos compuestos en el medio natural. Se ha demostrado un claro predominio en el medio ambiente de las formas trialquiladas que proviene de su gran solubilidad en agua y su baja volatilidad (Hewitt y Rashed, 1988). Sin embargo, no existen actualmente pruebas suficientes que permitan afirmar que se produce la metilación de plomo en el medio ambiente.

Chau y col. (1987) demostraron que las especies metiladas de plomo pueden dar lugar a la formación de derivados metilados de Sn(II) y Sn(IV) por transmetilación, pero que el Pb(IV) no puede aceptar un grupo metilo a partir de As, Sn o Hg. Walton y col. (1988) demostraron igualmente que las sales de plomo(II) pueden ser metiladas por sedimentos biológicos activos.

#### **I.1.3.4.- Los compuestos de selenio**

El interés por los compuestos del selenio es más reciente que para las otras especies organometálicas citadas anteriormente.

Al igual que ocurre para el arsénico, las formas inorgánicas de selenio son las más tóxicas, y en especial en su grado de oxidación (IV). Para las especies orgánicas, el ión trimetilselenonio ( $(\text{CH}_3)_3\text{Se}^+$ ) es el que presenta la toxicidad más elevada. Sin embargo, el selenio es un elemento esencial para numerosas especies animales, incluido el hombre. Este elemento es un componente de la glutanamida peroxidasa, que es necesaria para el metabolismo y la reacción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de lípidos peroxidados en la células.

Los organoselénicos sintetizados son utilizados por sus propiedades terapéuticas, antiinflamatorias y antibióticas y en quimioterapia. Sus aplicaciones industriales se sitúan en el campo de los polímeros como materiales semiconductores o fotoeléctricos (Chau, 1986).

Los compuestos orgánicos del selenio que se forman principalmente en medios vivientes, tales como los derivados proteínicos, no tienen aún aplicación comercial o médica significativa.

La biometilación del selenio ha adquirido un interés creciente en los últimos años. Las especies que resultan de la metilación del selenio son principalmente el dimetilselenio ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Se), el dimetildiselenio ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>) y el trimetilselenonio ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Se<sup>+</sup>). Se han propuesto numerosos mecanismos de formación de derivados metilados de selenio (Chau, 1986), ya que es posible que la metilación de este elemento sea un proceso de desintoxicación, dado que las especies inorgánicas son más tóxicas que la mayor parte de los compuestos organoselénicos. Además, se han descrito varios mecanismos de metilación de selenio inorgánico (Se(IV)) por microorganismos (Challenger (1951); Reamer y Zoler (1980)).

La formación de selenometionina, selenocisteína u otras especies organoselénicas tiene lugar en las plantas, pero pueden producirse transformaciones después de la ingestión de estas especies por los animales. La forma dominante del selenio en los tejidos de los mamíferos es la selenocisteína, que resulta de una conversión de la selenometionina. Numerosos estudios muestran que los diferentes compuestos del selenio se metabolizan por dos caminos principales: reducción seguida de metilación o incorporación directa en las proteínas formando directamente ácido amino selénico (Ganther, 1986).

### **I.1.3.5.- Los compuestos de telurio**

El telurio presenta un comportamiento químico parecido al del selenio y se podría esperar que sus efectos biológicos fueran similares a los de éste. Sin embargo, no se conoce que sea esencial para los organismos vivos (Karlson y Frankenberg, 1993).

Se dispone de poca información sobre la presencia de compuestos alquilados de telurio en el medio ambiente, pero parece posible que su devenir sea el mismo que el del selenio (Wood, 1974). En cuanto a los umbrales de toxicidad de los compuestos orgánicos de telurio, son poco conocidos y contrariamente al selenio, la alquilación del telurio no disminuye su toxicidad.

La metilación de telurio se ha estudiado menos que la de selenio. Sin embargo, parece que el telurio puede ser metilado por procesos de transmetilación en presencia de dimetilseleniuro ( $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$ ) antes que por procesos directos de metilación biológica (Fleming y Alexander, 1972). Por otro lado, bacterias y microorganismos capaces de metilar al selenio, pueden producir, en ausencia del mismo,  $(\text{CH}_3)_2\text{Te}$ ,  $(\text{CH}_3)_3\text{Te}_2$  y otro compuesto aún no identificado (Chasteen y col., 1990).

### **I.1.3.6.- Los compuestos de germanio**

Se han identificado tres compuestos de germanio en aguas naturales (germanio inorgánico, monometilgermanio (MMGe) y dimetilgermanio (DMGe)). Las especies metiladas representan el 70% de la cantidad total conocida de germanio en agua de mar, y están repartidas uniformemente a través de todos los océanos. Las especies trimetiladas (TMGe), que se producen en los sedimentos, no se han detectado en aguas dulces o marinas. Estos compuestos son menos estables y pueden ser desmetilados en dimetilgermanio o pueden entrar en la atmósfera (Lewis y Mayer, 1993).

Parece que el metilgermanio se produce en los continentes y pasa a convertirse en germanio inorgánico en medios ambientales anóxicos (Lewis y col. 1989). La posibilidad de metilar el germanio no parece depender únicamente del tipo de bacterias presentes en el medio, sino que más bien se rige por una interacción compleja entre la población bacteriana y varios parámetros físico-químicos tales como el pH, la salinidad, la fuerza iónica, etc. Todos estos factores complican la localización de la producción activa de compuestos metilados de germanio en el medio ambiente, pero las condiciones necesarias se reúnen en zonas contaminadas (Lewis y Mayer, 1993).

#### **I.1.3.7.- Los compuestos de antimonio**

El comportamiento químico del antimonio es parecido al del arsénico; sin embargo, este elemento ha sido menos estudiado y el comportamiento de los compuestos alquilados de antimonio en el medio ambiente es mucho menos conocido que el del arsénico. Las especies que generalmente se encuentran en el medio ambiente son las dos formas inorgánicas (Sb(III) y Sb(V)), y los ácidos mono- y dimetilantimónico ( $(\text{CH}_3\text{SbO}(\text{OH})_2$  y  $(\text{CH}_3)_2\text{SbO}(\text{OH})$ ). En ciertos casos, las cuatro especies citadas anteriormente pueden estar presentes en la misma muestra (Andreae, 1983). En las aguas naturales la proporción de antimonio inorgánico es más importante que la de las formas orgánicas y está principalmente como Sb(V) (Andreae y col., 1981).

Al igual que el arsénico, los compuestos orgánicos del antimonio son menos tóxicos que sus homólogos inorgánicos y la metilación puede servir como proceso de desintoxicación para los organismos marinos.

Aunque la alquilación biológica del antimonio en las algas ha sido descrita por varios autores, la fuente de especies metiladas del antimonio no se conoce verdaderamente. Se han realizado pocas experiencias en laboratorio dirigidas a estudiar los procesos de metilación del antimonio en comparación con las que se han realizado para el arsénico. Sin embargo un trabajo dirigido por Barnard (1947) demostró la

producción de formas volátiles del antimonio a partir de cultivos de "penicillium notatum".

Se han determinado compuestos metilados de antimonio en agua de mar y es posible, basándose en el comportamiento del arsénico, que estén también presentes en las algas, invertebrados marinos y peces. Sin embargo, no hay indicación de que se produzca la alquilación del antimonio orgánico en los mamíferos. Por otro lado, contrariamente al arsénico trivalente, el antimonio no es metilado en vivo. Estudios sobre el comportamiento del Sb(III) y Sb(V) en animales de laboratorio han demostrado que después de la absorción, todo el antimonio se elimina en forma inorgánica (Vahter y Marafante, 1993).

## I.2.- LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS E INORGÁNICOS DEL ARSÉNICO EN EL MEDIO AMBIENTE

El arsénico es un importante agente tóxico del medio ambiente en el que entra a partir de varias fuentes antropogénicas. Desde un punto de vista biológico y toxicológico, es necesario conocer la distribución de las especies químicas del arsénico, ya que sus propiedades tóxicas varían ampliamente en función de dicha forma química.

Muchos organismos, incluido el hombre, transforman químicamente el arsénico inorgánico. Los ácidos metilarsónico (MMA), dimetilarsénico (DMA) y fenilarsónico, varios ésteres orgánicos de los oxiácidos de arsénico y las alquilarsinas volátiles son algunos de los productos conocidos de estas transformaciones biológicas. Es obvio que no es posible una valoración exacta del desarrollo toxicológico del arsénico sin el conocimiento de las concentraciones, formas químicas e interacciones de las distintas especies moleculares implicadas en la carga total de arsénico en el medio ambiente.

### I.2.1.- Compuestos de arsénico

Los estados de valencia normal del arsénico son III y V, como en el  $H_3As$ ,  $AsF_3$  y  $AsF_5$ , mientras que el número de coordinación para el arsénico cubre el rango de 3 ( $AsF_3$ ), 4 ( $As(CH_3)_4^+$ ), 5 ( $AsF_5$ ) y 6 ( $AsF_6^-$ ). El estado de oxidación del arsénico en sus compuestos, como para cualquier elemento, depende de un modelo de distribución de carga en los enlaces. El modo usual de estimación de esta distribución de carga es a través de la electronegatividad relativa de los átomos interesados. Según los valores de electronegatividad de cada elemento el enlace As-X está polarizado  $As^{\delta+} \cdots X^{\delta-}$  cuando  $X = C, O$  y  $S$ .

Dentro de los compuestos de arsénico, en función del estado de oxidación con que participe este elemento, se pueden distinguir tres grupos:



### I.2.1.1.- Combinaciones del arsénico en estado de oxidación (-III)

El compuesto más importante de arsénico en estado de oxidación (-III), desde el punto de vista analítico, es la arsina,  $H_3As$ . Sus puntos de fusión y ebullición son de  $-117$  y  $-55^\circ C$ , respectivamente. La arsina es un agente reductor fuerte, incluso frente a numerosos agentes oxidantes débiles. Otros compuestos conocidos que contienen arsénico en estado de oxidación (-III) son  $Na_3As$ ,  $Ca_3As_2$ ,  $Zn_3As_2$ ,  $AlAs$ . En la naturaleza pueden encontrarse diversos arseniuros o sulfoarseniuros como la niquelina ( $AsNi$ ), el mispíquel ( $SAsFe$ ), etc.

### I.2.1.2.- Combinaciones del arsénico en estado de oxidación (III)

Con este estado de oxidación se forma el trióxido  $As_2O_3$ , los arsenitos y el catión  $AsO^+$  (frecuentemente formulado como  $As^{3+}$ ), todos ellos de gran interés analítico y toxicológico. En disolución acuosa puede existir como catión, hidróxido, oxi-ión negativo e ión negativo sulfarsenito.

El  $As(III)$  tiene una especial tendencia a formar compuestos con ciertos radicales orgánicos. Tienen interés analítico los derivados del ácido arsenioso, entre los que podemos encontrar compuestos de trialquilarsénico y ésteres de ácidos arseniosos. También son importantes el cacodilo  $(CH_3)_2=As-As=(CH_3)_2$  y el óxido de cacodilo  $(CH_3)_2=As-OAs=(CH_3)_2$ .

### I.2.1.3.- Combinaciones del arsénico en estado de oxidación (V)

El más conocido es el pentóxido de arsénico,  $As_2O_5$ , cuya toxicidad es menor que la del  $As_2O_3$ . Además, el efecto tóxico del ácido arsénico disminuye notablemente cuando se sustituyen los grupos  $OH$  por radicales orgánicos que pueden conferir a la molécula resultante interesantes propiedades farmacológicas. Entre estos compuestos tenemos la arsenobetaína ( $AsB$ ), la arsenocolina ( $AsC$ ), el ácido metilarsónico (MMA), ácido dimetilarsénico (DMA) y el ácido tetrametilarsénico (TMA).

I.2.2.- Especies más importantes en el medio ambiente

Las especies más importantes de arsénico identificadas, fundamentalmente en muestras medioambientales de origen marino, son: arsenito, arseniato, MMA, DMA, AsB y AsC. Los parámetros físicos y químicos de estas especies se muestran en la *Tabla IV*.

Tabla IV.- Fórmulas y parámetros físicos y químicos de las especies de arsénico más importantes en muestras medioambientales.

a\* Handbook of Chemistry and Physics

b\* Kortu y col. (1961)

c\* Hansen y col. (1992)

Nombre	Formula Química	Ctes de disociación	$\lambda$	Ref.
Arsenito	$\begin{array}{c} \text{As} - \text{O}^- \\    \\ \text{O} \end{array}$	9.2	197	<b>a</b>
Arseniató	$\begin{array}{c} \text{O}^- \\   \\ \text{O}^- - \text{As} - \text{O}^- \\    \\ \text{O} \end{array}$	2.3 6.9 11.4	192	<b>a</b>
MMA	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{HO} - \text{As} - \text{OH} \\    \\ \text{O} \end{array}$	2.6 8.2	192	<b>b</b>
DMA	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{HO} - \text{As} - \text{CH}_3 \\    \\ \text{O} \end{array}$	1.28 6.2	194	<b>c</b>
Arsenobetaina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{As}^+ - \text{CH}_2\text{COO}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	2.18	<190	<b>c</b>
Arsenocolina	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{As}^+ - \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}, \text{Br}^- \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Desconocido	199	

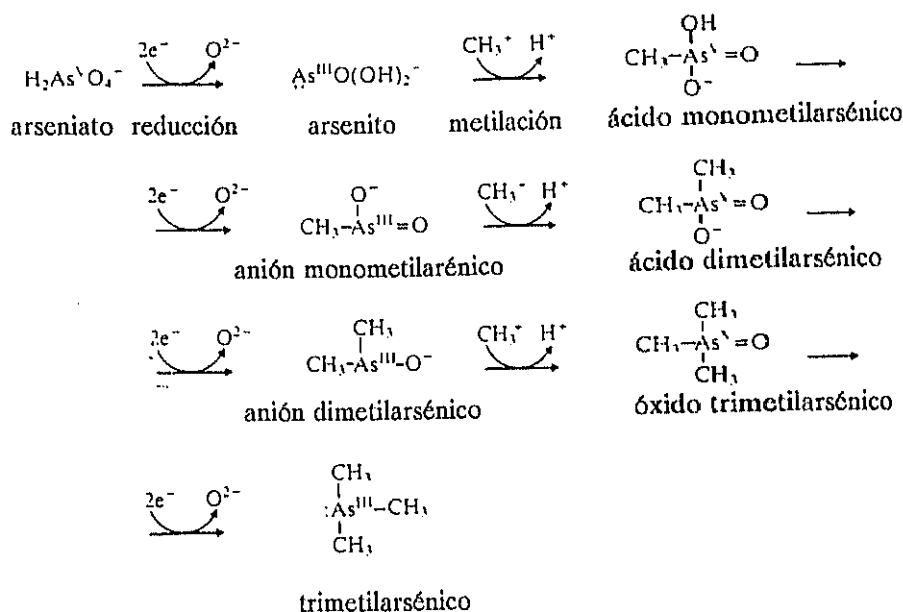
Los ácidos arsenioso, arsénico, MMA y DMA son compuestos capaces de formar el hidruro correspondiente mediante reacción con un reductor fuerte ( $\text{NaBH}_4$ ) en medio ácido. Tanto el ácido arsenioso como el ácido arsénico dan lugar al mismo hidruro, la arsina ( $\text{H}_3\text{As}$ ). El MMA y DMA forman monometilarsina,  $\text{CH}_3\text{-AsH}_2$ , y dimetilarsina  $(\text{CH}_3)_2\text{-AsH}$ , respectivamente. Los puntos de ebullición de los hidruros respectivos se muestran en la *Tabla V*. La arsenobetaína y arsenocolina no forman hidruros.

**Tabla V.- Características de las distintas formas de hidruros de arsénico.**

Compuesto	Hidruro	Punto de ebullición (°C)
$\text{HAsO}_2$	$\text{H}_3\text{As}$	-55
$\text{H}_3\text{AsO}_4$	$\text{H}_3\text{As}$	-55
$\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$	$\text{CH}_3\text{AsH}_2$	2
$(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$	$(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$	35.6

### I.2.3.- Formación natural de los compuestos orgánicos del arsénico

Las transformaciones químicas y biológicas que este elemento puede sufrir en el medio natural son reacciones de oxidación, reducción y metilación, que modifican el comportamiento de las diferentes especies consideradas. La metilación del arsénico no sólo puede producirse en las aguas dulces sino también en medio marino, pudiendo generar especies mono, di o trimetiladas. Las especies inorgánicas de arsénico (arsenito, y arseniato) se transforman en especies metiladas principalmente bajo la acción de la S-adenosilmetionina (SAM) segregada por mohos y bacterias. El mecanismo propuesto por Challenger (1945) para la metilación del arsénico por acción de la SAM comprende diferentes etapas de oxidación y reducción que pueden ser esquematizadas de la siguiente forma:



Los compuestos organoarsenicales formados en el medio ambiente son esencialmente compuestos metilados, pero existen igualmente numerosas especies con grupos orgánicos mucho más complejos. La producción de estas especies más complejas puede ser el resultado de la acción de la S-adenosilmetionina (SAM) que es capaz de transferir a los metales otros grupos distintos a los radicales metilo.

La biometilación del arsénico puede ser producida por numerosos organismos y la naturaleza de los compuestos obtenidos y las proporciones respectivas son muy variables. En los organismos terrestres, la biometilación del arsénico conduce a su eliminación por volatilización (como metilarsina,  $(\text{CH}_3)\text{AsH}_2$ , dimetilarsina  $(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$  o trimetilarsina  $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ ) o por excreción (como ácido monometilarsénico  $(\text{CH}_3)\text{AsO}(\text{OH})_2$  o ácido dimetilarsénico  $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ ). Sin embargo, los organismos marinos eliminan el arsénico bajo formas de especies solubles (azúcares o lípidos) (Thayer, 1993).

Las posibles transformaciones de este elemento en medio marino se presentan en la *Figura 4*. La primera etapa es la metilación del arsénico por el mecanismo Challenger descrito anteriormente. Esta etapa conduce a una serie de arsenoazúcares (Kortu y col.,

1961) tras la adenosilación oxidante por acción de la SAM, seguida de una glucoxidación. Estos arsenoazúcares están presentes en concentraciones muy importantes en las algas (Edmonds y Francesconi, 1987). La siguiente etapa es una degradación anaeróbica de los arsenoazúcares para formar dimetilarsinoetanol (Hansen y col., 1992). Finalmente, la arsenobetaína puede ser sintetizada por dos vías diferentes, a través de procesos de oxidación y metilación del dimetilarsinoetanol (Cullen y Reimer, 1989).

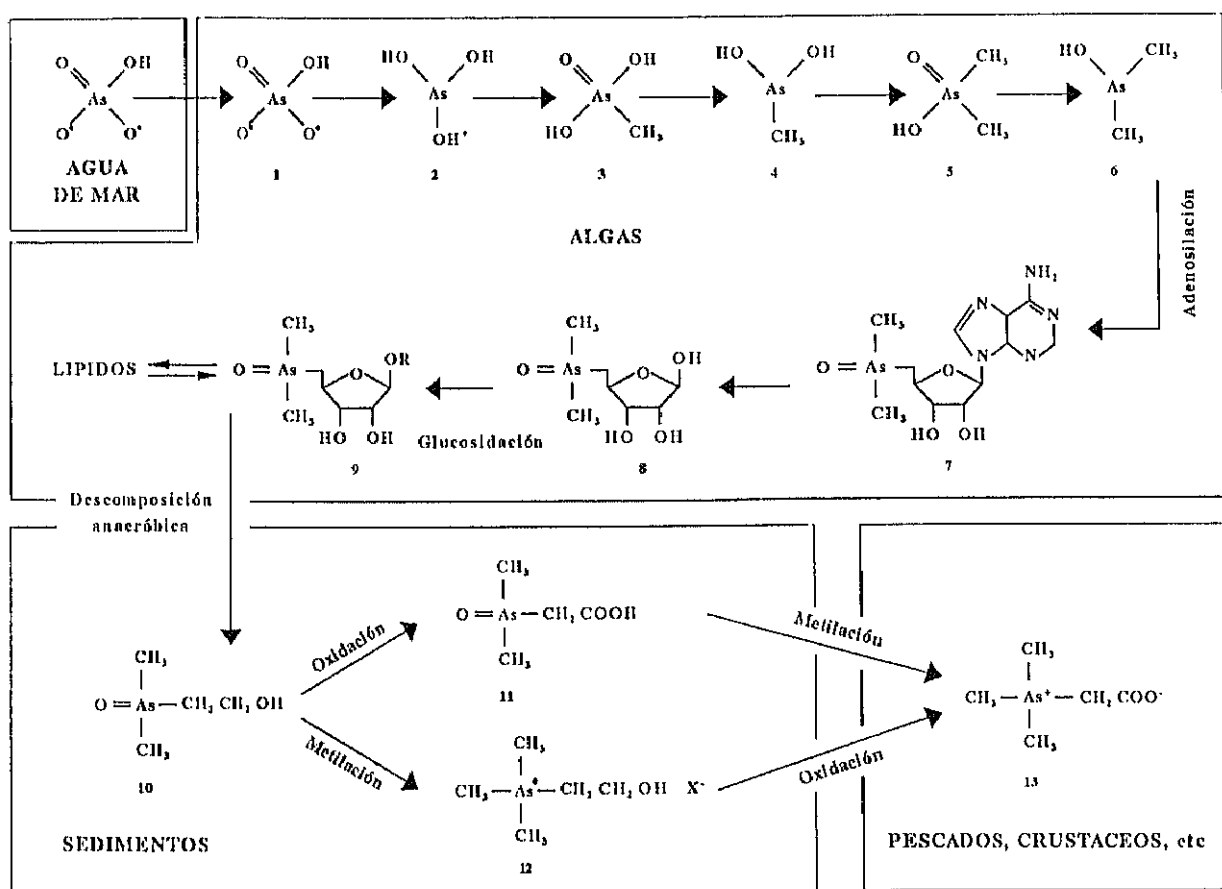


Figura 4.- Formación de distintos compuestos orgánicos del As en medios marinos (Edmonds y Francesconi, 1987).

- 1: Arseniato; 2: arsenito; 3: MMA; 4: dihidróxido de monometilarsénico;
- 5: DMA; 6: monohidróxido de dimetilarsénico; 7, 8: nucleósidos;
- 9: arsenoazúcar; 10: dimetilarsinoetanol; 11: ácido dimetilarsinoacético;
- 12: arsenocolina; 13: arsenobetaína.

#### I.2.4.- Fuentes de introducción y aplicaciones del arsénico en el medio ambiente

La historia química de los compuestos orgánicos de arsénico se remonta a 1760, cuando Cadet y Gassicourt destilaron una mezcla de anhídrido arsenioso y acetato de potasio. Obtuvieron un líquido pesado, inflamable al aire y de olor muy desagradable. Este líquido se conoce ahora con el nombre de "Licor humeante de Cadet". Este producto ha sido estudiado por un gran número de eminentes químicos (Berzelius, Dumas, Bunsen y Bayer), y el elemento principal de esta mezcla ha sido identificado como óxido de bis-dimetilarsénico  $[(\text{CH}_3)_2\text{As}]_2\text{O}$ . El trabajo de Cadet representa, en efecto, la primera síntesis de compuestos organometálicos en laboratorio. La química de los compuestos organoarsenicales tuvo de nuevo interés en el siglo XIX en Inglaterra y Alemania. Numerosas personas se envenenaron a causa de la presencia de arsénico en el yeso que recubría los muros y en los papeles pintados donde los colorantes eran a base de pigmentos de arsénico. El compuesto tóxico fue identificado por Challenger como trimetilarsina  $(\text{CH}_3)_3\text{As}$  (Challenger, 1945). Este químico es considerado como el pionero de la química de los organometálicos en el medio ambiente y de la metilación de los metales por los microorganismos. Los estudios de Ehrlich acerca de las propiedades farmacológicas de los compuestos organoarsenicales han conducido al descubrimiento de una molécula arsenical que llegó a ser un medicamento eficaz contra la sífilis y otras enfermedades infecciosas.

Los compuestos de arsénico son frecuentemente utilizados, de ahí su omnipresencia en el ambiente. Por la acción antropogénica se introducen 124 mil toneladas por año de arsénico al medio ambiente procedente de las minas, las industrias y la combustión de carburantes fósiles. Por medios naturales (volcanes y deriva de continentes) se introducen 2800 toneladas por año. Las fuentes más importantes de partículas en suspensión de arsénico son las fundiciones de metales (principalmente de níquel-cobre), combustión de carbón, volcanes y empleo de pesticidas. Las principales fuentes de arsénico en el medio ambiente proceden de su empleo en:

**Usos industriales:**

- Producción de aceros industriales.
- Fabricación de pinturas, vidrio, esmaltes, cosmética y cerámica.
- Industria textil y de curtido.
- Manufactura de fuegos artificiales.
- Fabricación de semiconductores, circuitos integrados, diodos, detectores de infrarrojos y tecnología láser.

**Usos agrícolas y áreas relacionadas:**

- Herbicidas, fungicidas, alguicidas.
- Insecticidas.
- Fosfatos.
- Conservantes de la madera.
- Desecantes para la recogida mecánica del algodón.

**Suplementación mineral de los piensos:**

- Utilización de ácido arsenílico en la alimentación de cerdos y aves de corral para promover su crecimiento.

**Usos farmacéuticos y terapéuticos:**

- Utilizados en el tratamiento de:
  - Enfermedades parasitarias.
  - Anemia, por la influencia en el metabolismo del zinc y el manganeso.
  - Artritis, reumatismo, asma, infecciones del tripanosoma, tuberculosis y diabetes.
- Tratamiento de la sífilis.
- Estimuladores de la producción de hemoglobina.

### I.2.5.- Aspectos tóxicos y biológicos

Los elementos metálicos juegan un papel primordial en el organismo humano. Por lo tanto, las concentraciones de los elementos metálicos se deben mantener entre límites muy estrechos, variables de uno a otro elemento, pero siempre a niveles de trazas ( $\mu\text{g/g}$ ) o ultratrazas ( $\text{ng/g}$ ), por lo que reciben la denominación genérica de "elementos traza". Existen elementos que en defecto son causantes de diversas enfermedades, mientras que en exceso producen efectos tóxicos.

Los efectos tóxicos del arsénico son ampliamente conocidos. Hoy en día se sabe que su toxicidad depende en gran medida del estado de oxidación en que se encuentre y del radical al que esté unido.

Las especies inorgánicas de arsénico son las más tóxicas siendo la toxicidad de los compuestos, por orden decreciente, la siguiente:



Las formas inorgánicas son las que se retienen preferentemente en los organismos, y son las más tóxicas. Esto justifica la necesidad de controlar la cantidad de arsénico aportado en la dieta alimenticia, así como el gran interés existente en la determinación de las distintas especies de arsénico.

El  $\text{LD}_{50}$  (dosis letal para el 50% de la población) en ratas para las distintas especies de arsénico se muestran en la *Tabla VI* (Kaise y Fukui, 1992).

Las principales vías de acceso del arsénico al organismo humano son la piel, el sistema respiratorio y el digestivo, debido a su presencia en la atmósfera por las emisiones industriales o por la contaminación de las aguas y de los alimentos.



Tabla VI.- Dosis letales de especies de arsénico para ratas.

Compuesto	Fórmula	LD <sub>50</sub> (g Kg <sup>-1</sup> )
Trióxido de Arsénico	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	(32.4 - 37.7) x 10 <sup>-3</sup>
Ácido Metilarsénico	(CH <sub>3</sub> )H <sub>2</sub> O <sub>3</sub> As	1.7 - 1.9
Ácido Dimetilarsénico	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> HO <sub>2</sub> As	1.0 - 1.3
Óxido Trimetilarsina	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> AsO	9.4 - 11.5
Arsenobetaína	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> As	> 10
Arsenocolina	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OHAS <sup>+</sup>	5.8 - 7.2
Yoduro de Tetrametilarsénico	(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> As <sup>+</sup>	0.8 - 1.0

Las especies de arsénico son fácilmente absorbidas en el tracto intestinal. La cantidad total absorbida depende de la especie química de que se trate y de la totalidad de arsénico en la dieta. Una vez absorbido, se distribuye en todos los órganos y tejidos como un complejo proteínico. Los arseniatos tienden a ser rápidamente excretados por los riñones y no se acumulan, pero los arsenitos se unen a las proteínas tisulares y se concentran en los leucocitos, acumulándose finalmente en el pelo, uñas y piel.

En cuanto a la contaminación de los alimentos, los arseniatos y los compuestos organoarsenicales son los que aparecen con mayor frecuencia y en concentraciones más altas. Sin embargo, el compuesto más tóxico del arsénico, la arsina, tiene muy poca relevancia.

El arsénico puede llegar a la cadena alimenticia del hombre a través de su contenido en los suelos, ya que puede ser absorbido por las plantas. Dicha absorción

depende no sólo de la concentración del elemento en el suelo, sino también de la naturaleza de dicho suelo y de la especie de arsénico de que se trate.

Se sabe que los productos derivados de la pesca pueden contener cantidades elevadas de arsénico. Recientemente se ha demostrado que la mayor parte del arsénico detectado en pescados y mariscos se encuentra en forma organoarsenical, fundamentalmente como arsenobetaína o arsenoazúcares. Estas especies no incrementan los niveles de arsénico inorgánico en orina en la especie humana, y son rápidamente excretadas. De esto se desprende, en general, que elevados niveles de arsénico en este tipo de alimentos no son necesariamente peligrosos para la salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DEL  
CAPITULO 1

- Andreae M.O., Asmode J.F., Foster P. and Van't Dack L. (1981)  
Determination of antimony(III), antimony(V), and methylantimony species in natural waters by atomic absorption spectrometry with hydride generation.  
*Anal. Chem.*, 53, 1766.
- Andreae M.O. (1983)  
*In Trace metals in sea water (eds. Wong C.S., Boule E., BRULAND K.W., BURTON J.L. and Golberg E.D.): Plenum Press, New York and London.*
- Ashby J. and Craig P.J. (1987)  
Biomethylation of tin(II) complexes in the presence of pure strains of *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Appl. Organomet. Chem.*, 1, 275.
- Barnard P. (1947)  
*PhD Thesis, University of Leeds, UK.*
- Blunden S.J., Cusack P.A. and Hill R. (1985)  
The industrial use of tin chemicals.  
*The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London W1V, OBN.*
- Blunden S.J. and Chapman A. (1986)  
Organotin compounds in the environment.  
*In Organometallic compounds in the environment, Principles and reactions, (P.J. Craig ed.), Longman Group, Harlow, 364 pp.*
- Cahours C. (1853)  
*Compt. Rend*, 60, 304.
- Callister S.M. and Winfrey M.R. (1986)  
Microbiol methylation of mercury in upper Wisconsin river sediments.  
*Water Air Soil Pollut.*, 22, 453.
- Challenger F., (1945)  
Biological methylation.  
*Chem. Reviews*, 36, 315.
- Challenger F. (1951)  
Biological methylation, dans: *Advances in Enzymology and related areas of molecular biology*, vol. 12, Wiley interscience, New York, pp. 429-491.

**Challenger F. (1978)**

In *Organometals and Organometalloids : Occurrence and Fate in the Environment* (F.E. Brinckman and J.M. Bellama eds.) American Chemical Society, Washington, D.C., pp. 1-20.

**Chasteen T.G., Silver G.M., Birks J.W. and Fall R. (1990)**

Fluorine induced chemiluminescence detection of biologically methylated tellurium, selenium and sulfur compounds.  
*Chromatographia*, 30, 181.

**Chau Y.K., Wong P.T.S., Kramar O. and Benggert G.A. (1981)**

Methylation of tin in the aquatic environment.  
*Internat. Conf. Heavy metals in the environment Amsterdam sept 1981 - CEC WHO* p.641.

**Chau Y.K. (1986)**

Organic group VI elements in the environment.  
*In Organometallic compounds in the environment, Principles and reactions*, (P.J. Craig ed.), Longman Group, Harlow, 364 pp.

**Chau Y.K., Wong P.T.S., Mojesky C.A. and Carty A.J. (1987)**

Transmethylation of metals in aquatic systems.  
*Appl. Organomet. Chem.* 1 235.

**Compeau G.C. and Bartha R. (1985)**

Sulfate reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment.  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 50, 498.

**Craig P.J. (1986a)**

Occurrence and Pathways of organometallic compounds in the environment- General considerations.  
*In Organometallic compounds in the environment, Principles and reactions*, (P.J. Craig ed.), Longman Group, Harlow, 364 pp.

**Craig P.J. (1986b)**

Organomercury compounds in the environment.  
*In Organometallic compounds in the environment*, (P.J.Craig ed.), Longman Group, Harlow, pp. 65-110.

**Cullen W.R. and Reimer J. (1989)**

Arsenic Speciation in the Environment.  
*Chem. Rev.*, 89, 713.

**Donard O.F.X., Rapsomanikis S. and Weber J.H. (1986)**  
Speciation of inorganic tin and alkytin compounds by atomic absorption spectrometry using electrothermal quartz furnace after hydride generation.  
*Anal. Chem.*, 58, 772.

**Edmonds J.S. and Francesconi K.A. (1987)**  
Transformation of arsenic in the marine environment.  
*Experientia*, 43, 553.

**Fanchiang Y.-T. and Wood J.M. (1981)**  
Alkylation of tin by alkylcobalamins. Kinetics and mechanism.  
*J. Am. Chem. Soc.*, 103, 5100.

**Fleming R.W. and Alexander M. (1972)**  
Dimethyl selenide and dimethyl telluride formation by a strain of *Penicillium*.  
*Appl. Microbiol.*, 24, 424.

**Ganther H.E. (1986)**  
Pathways of selenium metabolism including respiratory excretory products.  
*J. Am. Coll. Toxicol.*, 5, 1.

**Grandjean P. and Nielsen T. (1979)**  
Organolead compounds : environmental health sediments.  
*Residue Rev.* 72, 97.

**Guard H.E., Cobet A.B. and Coleman W.M. (1981)**  
Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments.  
*Science*, 213, 770.

**Hallas L.E., Means J.C. and Cooney J.J. (1982)**  
Methylation of tin by estuarine microorganisms.  
*Science*, 215, 1505.

**Handbook of Chemistry and Physics.**  
*Handbook of Chemistry and Physics*, Ed. West. R.C., CRC Press, Cleveland, OH, 54<sup>th</sup> edn., 1973-1974.

**Hansen S., Larsen E., Pritzl G. and Cornatt C. (1992)**  
Separation of seven Arsenic compounds by HPLC with On-line detection by Hydrogen-Argon Flame Atomic Absorption Spectrometry and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.  
*J. Anal. At. Spectrom.*, 7, 629.

**Hewitt C.N. and Rashed M. (1988)**  
Organic lead compounds in vehicle exhaust.  
*Appl. Organomet. Chem.*, 2, 95.

**Jackson T.A. (1988)**

The mercury problem in recently formed reservoirs of northern Manitoba (Canada): effects of impoundment and other factors on production of methyl mercury by microorganisms in sediments.

*Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45, 97.

**Jensen S. and Jernelov A. (1969)**

Biological methylation of mercury in aquatic organisms.

*Nature*, 223, 553.

**Kaise T. and Fukui S. (1992).**

The Chemical form and acute toxicity of arsenic compounds in marine organisms.

*Appl. Organomet. Chem.*, 6, 155-160.

**Karlson U. and Frankenberger W.T.J. (1993)**

Biological alkylation of selenium and tellurium.

*In Metals ions in biological systems*, (H. Sigel and A. Sigel eds.), Marcel Dekker, Inc, pp. 185-228.

**Kortu G., Vogel W. and Andrussov K. (1961)**

*Dissociation Constants of Organic Acids in Aqueous Solutions*, Butterworths, London, 492.

**Kudo A. and Miyahara S. (1991)**

Acse history; Minimata mercury pollution in Japan - From loss of human lives to decontamination.

*Wat. Sci. Technol.*, 23, 283.

**Lewis B.L., Andrae M.O. and Froelich P.N. (1989)**

Sources and sinks of methylgermanium in natural waters.

*Mar. Chem.*, 27, 179.

**Lewis B.L. and Mayer H.P. (1993)**

Biogeochemistry of methylgermanium species in natural waters.

*In Metals ions in biological systems*, (H. Sigel and A. Sigel eds.), Marcel Dekker, Inc, pp. 79-100.

**Löwig C. (1853)**

*Anal. Chem.*, 88, 318.

**Maguire R.J. (1984)**

Butyltin compounds and inorganic tin in sediments in Ontario.

*Environ. Sci. Technol.*, 18, 291.

- Maguire R.J., Tkacz R.J., Chau Y.K., Bengert G.A. and Wong P.T.S. (1986)**  
Occurrence of organotin compounds in water and sediment in Canada.  
*Chemosphere*, 15, 253.
- Masson R.P. and Fitzgerald W.F. (1990)**  
Alkylmercury species in the equatorial Pacific.  
*Nature*, 347, 457.
- Midgley T. Jr and Boyd T.A. (1922)**  
*Ind Eng. Chem.*, 14, 894.
- Nagase H., Ose Y., Sato T. and Ishikawa T. (1982)**  
Methylation of mercury by humic substances in aquatic environment.  
*Sci. Total Environ.*, 24, 133.
- Parris G.E., Blair W.R. and Brinckman F.E. (1977)**  
Chemical and Physical considerations in the use of atomic absorption detectors coupled with a gas chromatograph for determination of trace organometallic gases.  
*Anal. Chem.*, 49, 378.
- Pinel R., Astruc M. and Donard O. (1990)**  
Les organométalliques en traces dans l'environnement aquatique.  
*L'Actualité chimique*, Mai-Juin 1990, p110.
- Radojevic M. (1989)**  
Lead.  
*In Environment analysis using chromatography interfaced with atomic spectroscopy (R.M. Harrison and S. Rapsomanikis, eds.)*, Ellis Harwood, Chichester, p.223.
- Rapsomanikis S. and Weber J.H. (1986)**  
Methyl transfert of environmental significance involving naturally occurring and synthetic reagents.  
*In Organometallic compounds in the environment (Craig P.J. eds) London : Longman's Group : 279.*
- Rapsomanikis S., Donard O.F.X. and Weber J.H. (1987)**  
Methylation of tin(II) and lead(II) in sediment by carbanion donors.  
*Appl. Organomet. Chem.* 1, 115.
- Reamer D.C. and Zoler W.H. (1980)**  
Selenium biomethylation products from soil and sewage sludge.  
*Science*, 208, 500.

**Reed R.H. (1983)**

Measurement and osmotic significance of  $\beta$ -dimethylsulphoniopropionate in marine macroalgae.

*Mar. Biol. Lett.*, **4**, 173.

**Ridley W.P., Dizikes L. and Wood J.M. (1977)**

Biomethylation of toxic elements in the environment.

*Science*, **197**, 329.

**Shapiro H. and Frey F.W. (1968)**

The organic compounds of lead.

*Wiley, New York*, pp. 407-26.

**Thayer J.S. (1987)**

Germapharmaca : some recent studies on biologically active organogermanium compounds.

*Appl. Organomet. Chem.*, **1**, 227.

**Thayer J.S. (1989)**

Methylation : its role in the environment mobility of heavy elements.

*Appl. Organomet. Chem.*, **3**, 123.

**Thayer J.S. (1993)**

Global Biokylation of the Heavy Elements.

*In Metal ions in biological systems (H. Sigel and A. Sigel eds.)*, Marcel Dekker, Inc, pp.1-36.

**Vahter M. and Marafante E. (1993)**

Metabolism of alkyl arsenic and compounds.

*In Metal ions biological systems, vol 20 biological propieties of metal alkyl derivatives, (Sigel H. and Sigel A. Eds)*, Marcel Dekker, INC, p. 161-184.

**Walton A.P., Ebdon L. and Millward G.E. (1988)**

Methylation of inorganic lead by Tamar estuary (UK) sediments.

*Appl. Organomet. Chem.*, **23**, 87.

**Wong P.T.S., Chau Y.K., Yaromich Y., Hodson P. and Whittle M. (1989)**

The analyses of alkyllead compounds in fish and environment samples in Ontario, Canada (1981 - 1987).

*Appl. Organomet. Chem.*, **3**, 59.

**Wood J.M. (1974)**

Biological cycles for toxic elements in the environment.

*Science*, **183**, 1049.



**Xun L., Campbell N.E.R. and Rudd J.W.M. (1987)**  
Measurements of specific rates of net methyl mercury production in the water column and surface sediments of acidified and circumneutral lakes.  
*Can. J. Fish. Sci.*, 44, 750.

## MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA ESPECIACIÓN DE COMPUESTOS ORGANOMETÁLICOS

### II.1.- INTRODUCCIÓN

La determinación de la forma molecular en la cual un elemento está presente en el medio ambiente ha sido un requerimiento básico en muchas investigaciones químicas. Esta información es particularmente crucial debido a que el comportamiento medioambiental de los metales (toxicidad, biodisponibilidad, bioacumulación y transporte geoquímico) a menudo depende críticamente de su forma fisicoquímica. Por lo tanto, la determinación de la cantidad total de metales no es suficiente, siendo necesario, actualmente, identificar y cuantificar las diferentes formas químicas de los elementos. Esto implica que el análisis debe conducir al conocimiento de los distintos grados de oxidación de los metales presentes bajo las formas inorgánicas, pero también al de las especies organometálicas, permitiendo comprender mejor la evolución de los metales en el medio ambiente.

De forma general, en la determinación analítica se efectúan tres tipos de operaciones:

- Extracción del medio de las especies en estudio;
- Separación de las mismas;
- Detección y determinación de cada una de ellas.

## II.2.- Extracción y derivatización

El análisis de especies orgánicas e inorgánicas de metales se lleva a cabo principalmente en tres tipos de matrices que pueden contener estos organometálicos:

- Agua dulce o de mar.
- Medios biológicos: pescados, moluscos, vegetales, etc.
- Sedimentos cuya naturaleza puede ser muy diversa.

Las cantidades de estos compuestos que se encuentran generalmente en estos medios raramente están en concentraciones de los  $\text{mg L}^{-1}$ , si no más a menudo en la de los  $\text{ng L}^{-1}$ ; pero también a bajas concentraciones sus efectos ecotoxicológicos pueden manifestarse.

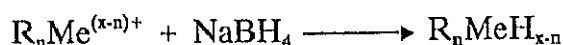
Si la muestra es acuosa, ciertas técnicas pueden permitir un análisis sin más pretratamiento que una acidificación. En el caso de material biológico o sedimentos, la extracción es una fase crucial ya que nunca se está seguro de haber extraído los analitos completamente o de no haber destruido las especies químicas investigadas. Los tejidos biológicos tras la liofilización deben ser triturados y homogeneizados antes de proceder a dicha extracción. Salvo en el caso de un análisis directo en el agua, los organometálicos se extraen con un disolvente. Se utilizan diferentes disolventes, pero los más corrientes son el cloruro de metileno, el agua, el metanol, el cloroformo, el tolueno o el ácido acético, que parece particularmente eficaz en la extracción de tetrabutilestaño (Desauziers y col., 1989). Las recuperaciones para estos extractantes, calculadas sobre muestras preparadas artificialmente, varían según los autores del 90 al 105% (pero en ciertos casos puede ser mucho menor).

La extracción presenta la ventaja de permitir, además, una preconcentración. Por ejemplo, MMA y DMA se pueden extraer en forma de triyoduros con algunos disolventes orgánicos (Vasui y col., 1978). Los extractos así obtenidos muy a menudo no

se pueden utilizar directamente, ya sea porque no son lo suficientemente volátiles o porque no son adecuados para el método cromatográfico empleado, siendo necesario una derivatización previa de la muestra.

Los métodos de derivatización más empleados, debido a su gran eficacia, son:

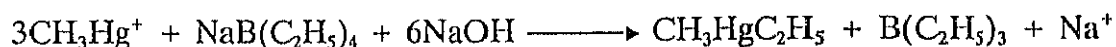
- Transformación en hidruros por reacción con borohidruro sódico en medio ácido según la reacción:



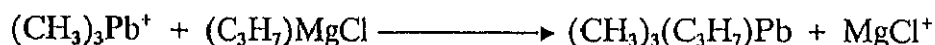
(x = estado de oxidación del metal y R = resto orgánico)

Este procedimiento se ha aplicado con éxito a As, Sb, Bi, Sn, Pb, Se, Te, Ge y a algunos de sus compuestos organometálicos, ya que son capaces de formar hidruros covalentes.

- Alquilación por  $NaBR_4$ , que consiste en la adición de grupos alquilo a un mono, di o trialquilmetal para formar compuestos tetralquil sustituidos, que son más volátiles que los anteriores. La etilación, por  $NaBEt_4$ , de los metilplomos ha sido descrita por Rapsomanikis y col. (1986), obteniendo derivados de la fórmula general  $R_4Pb$ , que son suficientemente volátiles. El mecanismo de alquilación para  $CH_3Hg^+$  es:



- Reacción de Grignard, obtención de productos totalmente alquilados que pueden dar lugar a una mejor separación. Se emplea como reactivo el n-propil, n-butil o n-pentil magnesio. El mecanismo para el trimetilplomo es:



Cai y col. (1993) han realizado un estudio comparativo entre la generación de hidruros y la etilación para compuestos orgánicos de estaño.

### II.3.- Separación y determinación de las diferentes formas: métodos químicos y técnicas acopladas

Hasta hace pocos años, las investigaciones en este campo se centraban fundamentalmente en la determinación diferencial de las especies mediante un control de la química involucrada en el proceso. Los principales procedimientos involucrados en la separación de las especies eran: extracción líquido-líquido o sólido-líquido, formación de complejos, generación selectiva del hidruro, etc..

En la bibliografía pueden encontrarse numerosos trabajos con este enfoque. Por ejemplo:

- Se han estudiado algunos métodos de generación selectiva del hidruro para la especiación de Sb(III) y Sb(V) (De la Calle Guntinas y col., 1992a). El control del pH permite la reducción selectiva del Sb(III) al hidruro correspondiente en presencia de Sb(V), la posterior reducción de Sb(V) a Sb(III) en presencia de KI permite la determinación total de Sb. El Sb(V) se determina por diferencia entre el contenido total y el Sb(III) (De la Calle Guntinas y col. 1992b).

- Sakamoto y col. (1992) describieron un proceso de extracción químico selectivo para la determinación diferencial de Hg orgánico, HgO y HgS en sedimentos mediante CVAAS. Jian y McLeod (1992) han desarrollado un procedimiento FI-CVAFS que incluye la separación de Hg inorgánico y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  en columna. Rezende y col. (1993) extraen selectivamente el metilmercurio del pescado con  $\text{CHCl}_3$ , quedando el Hg inorgánico en la fase acuosa. Ambas fases se analizan por separado empleando CVAAS.

- Chikuma y col. (1992) preparan una resina que retiene selectivamente Se(IV) y posteriormente inyectan la resina en forma de suspensión en la cámara de grafito para el análisis.

Una quelatación selectiva del Cr(III) seguida de su extracción con disolventes permite la determinación, por un lado, del Cr total y por otro, del Cr(III), utilizando la técnica de ETA-AAS (Becerio-González y col. 1993). Por otro lado, la preconcentración por electrodeposición del Cromo sobre una plataforma L'vov junto con el control del potencial de electrólisis permite determinar independientemente el Cr(VI) y Cr(III) por ETA-AAS (Vidal y col., 1992). Cai y col. (1993) preparan compuestos organoestánnicos volátiles por etilación. Estas especies volátiles son atrapadas en una trampa fría, rellena con material cromatográfico, y posteriormente se liberan térmicamente para el análisis por AAS con célula de cuarzo. Por otro lado, Yoshimura y col. (1993a) estudian nuevas aplicaciones del carbono para favorecer la disociación de varios compuestos de un mismo metal con una extensión diferente para cada uno de ellos. El método se ha aplicado a la especiación de estaño (Yoshimura y col. 1993b), donde se analiza por FAAS con y sin la adición de carbono.

Aunque la determinación de las distintas especies de un elemento se viene abordando por procedimientos químicos desde hace más de 20 años, el verdadero desarrollo de la especiación se ha conseguido con el acoplamiento de técnicas instrumentales. Durante la última década se han desarrollado múltiples sistemas analíticos formados por múltiples composiciones instrumentales. Los más utilizados combinan el poder de separación de la cromatografía (CG, HPLC) o de la electroforesis capilar con la selectividad y sensibilidad de la espectroscopía atómica, tanto en emisión como en absorción ó fluorescencia.

### II.3.1.- Cromatografía de Gases

Para lograr separaciones eficaces, la técnica de cromatografía de gases requiere que las especies a determinar sean volátiles y térmicamente estables a la temperatura programada para el análisis. Generalmente, los metales, no metales y algunos compuestos organometálicos son poco volátiles y, con frecuencia, es necesario formar previamente derivados volátiles de los analitos, siendo la formación de hidruros y la alquilación los dos métodos más utilizados con este fin (Chau y Wong, 1986).

Los detectores más comúnmente utilizados en cromatografía de gases, tales como el de captura electrónica, conductividad térmica, etc., no son totalmente satisfactorios en la determinación de las especies de metales, ya que no son detectores específicos. No obstante, aunque el detector de captura electrónica no tiene la suficiente selectividad como para hacer identificaciones específicas, ha sido aplicado a la determinación de compuestos organometálicos de Pb (Forsyth y Marshall, 1983), Hg (Filippelli, 1987), Se (Uchida y col., 1980) y As (Daughtrey y col., 1975; Andraea, 1977). Pero estas aplicaciones están estrictamente limitadas al análisis de muestras "limpias" debido a su escasa selectividad. Cuando sensibilidad y selectividad son requisitos imprescindibles, la elección está limitada a unos pocos detectores, siendo los detectores atómicos los que ofrecen, en principio, la mejor opción desde el punto de vista analítico.

El acoplamiento GC - AAS se utilizó por primera vez, empleando la llama como sistema atomizador, para la determinación de compuestos de alquilplomo en gasolinas (Kolb y col., 1966), y más tarde en la especiación de metilplomo y otros compuestos de alquilplomo en estudios medioambientales (Chau y col., 1983). La interfase utilizada es extraordinariamente simple y barata. Consiste en un tubo corto caliente, por el que el efluente pasa desde la columna cromatográfica hacia el nebulizador. No obstante, el análisis de la mayoría de las muestras reales no puede realizarse mediante este acoplamiento debido a la escasa sensibilidad obtenida, resultado del corto tiempo de residencia de los átomos en la llama, la dilución por el gas combustible y la temperatura

de la llama. La capacidad de detectar estos compuestos aumentó extraordinariamente cuando se empleó como sistema de atomización un tubo de cerámica (Ebdon y col., 1982), un tubo de sílice calentado en la llama o eléctricamente (Chau y col., 1976) o un horno de grafito (Radziuk y col., 1979). Sin embargo, siguen siendo las células de sílice, calentadas eléctricamente o en la llama del espectrómetro de absorción atómica, los atomizadores por excelencia en este tipo de acoplamiento. Estos atomizadores se han empleado en la determinación de compuestos de alquilplomo (Chau y col., 1976; Chakraborti y col., 1984; Radojecvic y col., 1986), metilselenito (Chau y col., 1975; Van Loon, 1979; Jiang y col., 1982), butilestaño (Chau y col., 1982; Maguire y Tkacz, 1983; Donard y Weber, 1985), metilantimonio (Andreae y col., 1981) y metilgermanio (Andreae y Froelich, 1981). No obstante, cuando se trabaja con células de sílice, generalmente es necesario introducir hidrógeno con el fin de intensificar la atomización de muchos organometálicos, como por ejemplo para compuestos de alquilplomo, alquilestaño y metilseleniuros.

En el acoplamiento GC-AES, el primer detector utilizado fue el fotómetro de llama (FPD), que ha dado buenos resultados en el análisis de compuestos orgánicos de estaño (Waldock y col., 1989; Tolosa y col., 1991). La espectroscopía de emisión atómica (AES) no es una técnica tan selectiva como la absorción atómica, pero las distintas fuentes de plasma, plasma inducido por microondas (MIP), plasma acoplado inductivamente (ICP) y plasma de corriente directa (DCP), poseen temperaturas de excitación muy altas, produciendo líneas de emisión muy intensas, lo que conlleva bajos límites de detección. Durante los últimos años ha habido un auge de la espectroscopía de emisión atómica con plasma en la determinación de especies de metales. A pesar de ser el ICP el más utilizado en química analítica, no es una fuente adecuada para la detección acoplada a cromatografía de gases. La razón esencial es la poca sensibilidad resultante, debido a que se produce una gran dilución del efluente cromatográfico con los gases del plasma (Hill y col., 1993). No obstante, este acoplamiento se ha aplicado a la determinación de compuestos de alquilplomo por Ibrahim y col en 1985. Se obtuvo un mayor éxito empleando el DCP, con el cual se han obtenido límites de detección para



metales en el intervalo de sub-pg (Krull y col., 1989). De todos los plasmas, el MIP es el que ha proporcionado la fuente de excitación más adecuada para el acoplamiento con el cromatógrafo de gases (Lobinski y Adams, 1993; Uden, 1991). Se ha utilizado en la determinación de plomo como tetraalquilplomo en petróleo (Estes y col., 1982), en la determinación de mercurio como dimetil y dietil derivados (Wasik y Schwartz, 1980).

La espectrometría de fluorescencia atómica (AFS), en teoría, parece ser una técnica de detección muy apropiada en combinación con la cromatografía de gases, ya que posee una selectividad similar a la AAS además de la capacidad multielemental del AES y gran simplicidad en el diseño de la interfase, pero, en la práctica, las aplicaciones a la especiación son escasas y no reflejan esas características potencialmente atractivas. La razón es la falta de rendimiento y estabilidad de las fuentes continuas de luz que se requieren para un análisis simultaneo multielemental. Fuentes de radiación de líneas, tales como lámparas de descarga sin electrodo (EDL), son una alternativa pero su intensidad, la cual determina la sensibilidad, suele ser demasiado baja en comparación con las características de detección obtenidas empleando AAS o AES. El acoplamiento GC-FAS se ha utilizado poco en los estudios de especiación desde que Van Loon (1979) y Radziuk y col. (1979) lo emplearan en la especiación de los compuestos de alquilplomo.

La espectrometría de masas de iones moleculares es una técnica de detección muy usada en cromatografía de gases para compuestos orgánicos, pero rara vez ha sido utilizada en el análisis de organometálicos. Por otra parte, la espectrometría de masas de iones atómicos permanece aún en sus inicios como detector acoplado a la cromatografía de gases.

El ICP-MS es una buena técnica de producción de iones atómicos que posteriormente se detectan con un analizador cuadrupolo. En el acoplamiento ICP-MS se obtiene una ganancia de dos ordenes de magnitud en términos de sensibilidad respecto al obtenido con ICP-AES (Hill y col., 1993). Sin embargo, en el caso del MIP-

MS no se produce apenas ninguna mejora con respecto al MIP-AES (Suyani y col., 1989c). La información sobre las aplicaciones del acoplamiento GC-MIP-MS al análisis de organometálicos es escasa debido al alto coste del equipo y su mantenimiento.

El uso del láser para intensificar la producción de iones ha comenzado a ser popular. La ionización electrónica amplificada por láser (LEI) combinada con la espectrometría de masas de tiempo de vuelo se ha aplicado al análisis de organoestánicos obteniendo una gran sensibilidad (Colby y col., 1990).

### **II.3.2.- Cromatografía de Líquidos**

Para muchos compuestos organometálicos cuyos puntos de ebullición no son lo suficientemente bajos como para utilizar cromatografía de gases, la cromatografía líquida de alta resolución se convierte en la elección más adecuada. Las técnicas cromatográficas en fase líquida son interesantes ya que eliminan a menudo la etapa de derivatización de las distintas especies metálicas (necesaria en cromatografía de gases por ser compuestos no volátiles). Esto no solamente reduce el tiempo de preparación de la muestra sino que también reduce las posibles pérdidas durante el proceso de derivatización. Además, hay más parámetros con posibilidad de ser variados; tanto la fase móvil como la fase estacionaria pueden modificarse simultáneamente para lograr una mejor separación. Existe una gran diversidad de fases estacionarias, lo que origina diferentes tipos de cromatografía (permeabilidad, geles, adsorción, cambio iónico, fase normal y fase reversa) que permiten la separación de iones, especies volátiles, organometálicos con alto peso molecular y especies biológicas complejas. La técnica tiene, en conjunto, mayor versatilidad que la cromatografía de gases. Sin embargo, la interfase utilizada entre el cromatógrafo y el detector es mucho más delicada.

En la separación de analitos de especies metálicas u organometálicas, la cromatografía de intercambio iónico es la forma más común y más ampliamente utilizada de la cromatografía líquida, debido a su capacidad para separar especies de

iones libres. La técnica de fase reversa se utiliza también con frecuencia empleando un agente formador de pares iónicos, lo que se conoce como fase reversa modificada.

Los detectores utilizados comúnmente en cromatografía de líquidos carecen de la sensibilidad y selectividad necesaria para la determinación de las formas químicas de los metales en muestras medioambientales. La espectrometría atómica es, actualmente, el sistema de detección más aplicado como detector específico, unido a un cromatógrafo de líquidos, para la determinación de muchos compuestos organometálicos.

Como ya se ha comentado, la espectroscopía de absorción atómica (AAS) brinda la posibilidad de una detección selectiva para gran variedad de metales. La espectroscopía de absorción atómica con llama fue el primer candidato para el acoplamiento con la cromatografía líquida. Generalmente, la velocidad de flujo en cromatografía líquida es de 0.5 - 4 mL min<sup>-1</sup>, que es compatible con la velocidad de flujo del nebulizador del espectrómetro de absorción atómica, por lo que es posible el acoplamiento de las dos técnicas directamente usando un tubo como interfase. Sin embargo, la mayor dificultad está en el equilibrio de flujos debido a que la velocidad óptima de flujo del HPLC es la que proporciona una buena separación, mientras que la velocidad de nebulización óptima es aquella en la que se obtiene mayor sensibilidad usando una solución patrón. En general, las velocidades de flujo de nebulización son mucho mayores que las del HPLC. Para superar estos problemas de descompensación de flujos se puede introducir a la salida de la columna cromatográfica un canal adicional de disolvente (Yoza y Obashi, 1973), pero con este procedimiento se produce una importante disminución de la sensibilidad, debido a que se produce una gran dilución de la muestra. Se han diseñado otras interfases para el acoplamiento HPLC-AAS (Slavin y Schmidt, 1979; Ebdon y col. 1985; Gustavsson y Nygren, 1987), pero se han efectuado pocas aplicaciones al análisis de compuestos organometálicos debido a que la sensibilidad sigue siendo inadecuada para el análisis medioambiental.

Puesto que la eficiencia de transporte del analito en los nebulizadores convencionales de FAAS es del 5 al 10% (Alkemade y Herrmann, 1979), se pueden obtener mejoras significativas, aumentando la eficiencia del sistema nebulizador, mediante el empleo del nebulizador diseñado originalmente para ICP (Gustavsson y Nygren, 1987) como interfase nebulizadora en el FAAS. Esto se traduce en una eficiencia de transporte del analito de casi un 100% como resultado de las mejores características de flujo y de una desolvatación eficiente (Nygren y col., 1989). El diseño incluye una zona de calentamiento, una conexión de gas auxiliar y una entrada cónica para el aerosol. Parte del gas oxidante se usa como gas nebulizador y el resto se añade al flujo del gas auxiliar. Con este diseño, la señal del detector es 10 veces mejor que la obtenida usando un nebulizador convencional. Los recientes desarrollos en interfase directa HPLC-FAAS incluyen un microatomizador de microespray, calentado en una llama, donde el efluente de HPLC se evapora instantáneamente a un aerosol antes de entrar al horno (Blais y Marshall, 1989a). Con este sistema de nebulización los límites de detección para cuatro compuestos iónicos de alquilplomo se mejoran significativamente y están en el margen de 1 a 2 ng.

Muchos grupos de investigación utilizan la espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito debido a sus excelentes límites de detección. Algunas de las principales dificultades del acoplamiento HPLC- GFAAS, se encuentran en la incompatibilidad de las operaciones. Mientras que la cromatografía opera de forma continua, el horno de grafito trabaja de forma discreta, por ello se han ideado diferentes interfases entre estos dos instrumentos. El ejemplo más típico es emplear un muestreador automático para la recogida del efluente a la salida del cromatógrafo y posteriormente su introducción en el horno; sin embargo, esta técnica genera señales pulsadas y su suma da la cantidad de analito presente. La exactitud de la determinación depende del número de pulsos medidos. Este método ha demostrado ser apropiado para la especiación de compuestos de estaño (Brinckman y col., 1977; Vickrey y col., 1980), de plomo (Koizumi y col., 1979; Vickrey y col., 1979) y de arsénico (Brinckman y col., 1980). Los límites de detección en las aplicaciones citadas están en el rango de 0.5-100

ng como organometálicos. Nygren y col. (1988) propusieron una mejora en la interfase HPLC-GFAAS que consiste en la utilización de un tubo de acero inoxidable calentado a 200 °C, donde el efluente es volatilizado a un aerosol que es directamente introducido en un tubo de grafito vitrificado. El disolvente y las disoluciones tampones del eluyente causan algunos problemas, debido a que generan hollín y degradación de la línea base. Esta técnica fue aplicada a la determinación de especies de di- y tributilestaño. A pesar de obtener una total mejora en la sensibilidad de la GFAAS, el acoplamiento HPLC-GFAAS no es deseable debido a la natural discontinuidad del GFAAS y a que no suele operar bien con una gran variedad de disolventes que se utilizan normalmente en HPLC.

Otra interfase muy empleada en HPLC-AAS consiste en utilizar la técnica de generación de hidruros post-columna, lo que proporciona una señal continua. Las especies alquilmetal, después de la separación por HPLC, se convierten en los correspondientes hidruros, los cuales son aislados de los reactivos en un separador de fases gas-líquido e introducidos por medio de un flujo de gas inerte, en la célula de cuarzo calentada, bien por la llama o bien eléctricamente, en un espectrómetro de absorción atómica. La unidad de generación de hidruros no solamente convierte los analitos a formas volátiles, sino que también los aísla de la muestra, minimizando las interferencias. Para superar el problema de detectar todas las especies de los metales, y no solamente las especies capaces de formar hidruros volátiles, Ebdon y col. introducen un reactor de fotólisis UV en línea entre el HPLC y el generador de hidruros (Hill y Ebdon, 1985; Hill y col., 1986; Ebdon y col., 1988; Ebdon y Hill, 1989), donde las especies orgánicas se destruyen a su forma inorgánica, a partir de la cual se forma el hidruro correspondiente. Se puede obtener un límite de detección de 2 ng para tetrabutilestaño utilizando esta combinación post-columna UV-fotólisis-HG. Otra técnica empleada por Blais y col. (1989b) consiste en la etil derivatización post-columna empleando tetraetilborato sódico. Esta técnica está limitada a aquellos compuestos organometálicos que pueden convertirse en sus correspondientes etil derivados.

Blais y col. (1990) han diseñado un sistema de derivatización a la forma de hidruros de modo que el efluente de la columna cromatográfica se nebuliza por termoespray dentro del tubo de sílice y se piroliza en una llama metanol-oxígeno. Los analitos se derivatizan a la forma de los hidruros en presencia de un gran exceso de hidrógeno.

Los compuestos de Mercurio procedentes del HPLC son convertidos a vapor de Hg<sup>0</sup> por calentamiento (Holak, 1982) o por reducción química con cloruro de Sn(II) (Munaf y col., 1990) y el vapor generado pasa a una célula de vidrio alineada en la trayectoria de la radiación de un AAS. Se obtiene un límite de detección de 0.1 ng de Hg por reducción química con cloruro de Sn(II), mientras que con la conversión por calor se alcanza un límite de detección de 0.6 ng. Por otro lado, Sarzanini y col. (1992) separaron y determinaron compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio mediante un sistema en línea HPLC-CVAAS.

En general, la sensibilidad se exalta cuando se emplean detectores atómicos de emisión, tales como los plasmas DCP, MIP y ICP. El acoplamiento no presenta problemas cuando se emplean disoluciones acuosas como eluyentes cromatográficos. Por el contrario, con disolventes orgánicos la estabilidad del plasma se altera frecuentemente con los nebulizadores convencionales.

El acoplamiento del MIP de baja potencia al HPLC está limitado por la velocidad de flujo empleada en HPLC, ya que extingue el plasma. Las nuevas columnas capilares con flujos de  $\mu\text{L min}^{-1}$  pueden ser una solución a este problema pero entonces, la pequeña capacidad de muestra que admite la columna limita la aplicación al análisis de trazas.

El DCP parece ser una propuesta ventajosa al acoplarlo con HPLC, dando lugar a un plasma más estable, especialmente con la introducción de eluyentes mixtos orgánicos/acuosos. La estabilidad del plasma es superior a la obtenida con el plasma

ICP (Krull, 1983). Sin embargo, con interfase DCP directa, existe el problema de límites de detección altos, en el rango de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , así que la aplicabilidad al medio ambiente está limitada.

El ICP fue el primer plasma desarrollado en los años 60 y ahora es la fuente espectroquímica más usada en general (Uden, 1989). Cuando se emplea el acoplamiento HPLC-ICP-AES se alcanzan límites de detección altos, debido a la ineficiente conversión de los efluentes cromatográficos en aerosoles y su transporte al plasma. En general, solo el 1 - 5% de la muestra alcanza la antorcha del plasma. Una observación frecuente ha sido la escasa tolerancia del ICP para las fases móviles usadas comúnmente en HPLC, particularmente en las técnicas de separación de cromatografía líquida de pares iónicos o de exclusión por tamaños. Los métodos propuestos para superar estos problemas están directamente relacionados con el perfeccionamiento de la velocidad de nebulización y de la transmisión del analito al plasma. Se han utilizado diferentes tipos de nebulizadores como interfases HPLC-ICP para mejorar la velocidad de nebulización, siendo los más usados los siguientes:

- Nebulizador concéntrico; recomendado para la mayoría de las disoluciones, pero tiende a obstruirse, especialmente, con flujos bajos de gas, para los cuales el transporte es poco eficiente.
- Nebulizador de flujo cruzado; similar al nebulizador concéntrico.
- Nebulizador de frita de vidrio ("glass-frit"); es capaz de nebulizar disolventes orgánicos comúnmente usados en HPLC de fase reversa. Sin embargo, los disolventes de elevada tensión superficial generan una espuma que afecta a la eficiencia de nebulización (Ibrahim y col., 1985).
- Nebulizador por termoespray; produce un 100% de eficiencia en la producción de aerosol con flujos de alrededor de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  y ofrece condiciones óptimas

para la interfase HPLC-ICP (Denton y col., 1990).

- Nebulizador de rejilla dual de platino; recomendado para muestras con un alto contenido en sales.

El nebulizador concéntrico y el de flujo cruzado se usan comúnmente en sistemas acoplados de HPLC-ICP. Si bien, actualmente están siendo reemplazados por el nebulizador de introducción directa (DIN), nebulizadores termoespray y ultrasónicos que ofrecen grandes mejoras para la introducción de la muestra. Así, el acoplamiento HPLC-ICP-AES ha sido aplicado a la determinación de organoestánicos (Koropchak y Winn, 1987; Suyani y col., 1989a). De cualquier manera los límites de detección obtenidos son altos, oscilando entre 200 y 1770 ng, lo que limita las aplicaciones medioambientales de este sistema.

Como en FAAS, la continua generación de hidruros en línea después de la separación HPLC puede ser usada como interfase para el ICP-AES (Ebdon y col., 1988; Bushee y col., 1984; Rauret y col., 1991; Colon y Barry, 1991). El uso de un separador gas-líquido evita la entrada de la fase móvil y los reactivos de la generación de hidruros al nebulizador, dando como resultado una señal del blanco muy pequeña. Con este sistema Colon y Barry (1991) han obtenido límites de detección del orden de unos pocos nanogramos.

La cromatografía líquida, empleada comúnmente para separar compuestos iónicos, polares y no polares, así como iones complejos y especies neutras, es la técnica más utilizada para la especiación elemental con detección ICP-MS. Sin embargo, no está exenta todavía de problemas de difícil resolución, tales como compatibilizar los eluyentes cromatográficos con el sistema detector y el diseño de interfases apropiadas entre ambos módulos (Carey y col., 1993). La interfase con la que actualmente se trabaja es una línea de transferencia que va desde la salida de la columna cromatográfica al nebulizador del ICP-MS. Esta línea está fabricada generalmente de un material inerte, tal como el teflón. Es muy importante emplear la longitud del tubo lo más corta posible



y optimizar el diámetro interno del mismo, a fin de minimizar el recorrido fuera de la columna y por tanto el ensanchamiento de los picos producidos por la línea de transferencia. Los caudales de muestra típicos en cromatografía (0.5-2 mL/min) pueden emplearse en el plasma con nebulizadores convencionales; sin embargo, estos nebulizadores presentan algunos inconvenientes entre los que se encuentra la baja eficiencia del transporte del analito hacia el plasma. Es siempre deseable, por tanto, una mayor eficiencia de transporte de la muestra, ya que se traduce en una mejora en los límites de detección. El empleo de los nebulizadores ultrasónicos o los de inyección directa, minimizan el ensanchamiento de los picos y aumenta en un 100% la eficiencia del transporte con flujos de fase móvil de aproximadamente 0.5 mL min<sup>-1</sup>. (Montaser, 1992; Shum y col., 1992).

Shum y col. (1992) utilizaron un nebulizador de inyección directa (DIN) como interfase entre el cromatógrafo de líquidos y el ICP-MS. Esta interfase inyecta toda la muestra en el ICP y tiene un volumen máximo de 0.5  $\mu$ L. Los límites de detección absolutos obtenidos están en el rango de 8 - 10 pg, pero los límites de detección relativos son, sin embargo, bastante altos debido al pequeño volumen de inyección de muestra de los analitos.

La generación de vapor frío de mercurio también se ha empleado como interfase entre HPLC y el ICP-MS para la determinación de metilmercurio en tejidos de pescado (Bushee, 1988), produciendo un límite de detección 10 veces mejor que en el análisis directo HPLC-ICP/MS, con una desviación estándar relativa del 6%.

Como ya se ha mencionado previamente, otro problema adicional lo constituyen las fases móviles de la cromatografía líquida. Estas fases consisten, generalmente, en una mezcla de disolventes orgánicos, disoluciones salinas tamponadas, y/o reactivos formadores de pares iónicos. Los disolventes orgánicos pueden disminuir las prestaciones del ICP-MS ya que, frecuentemente, producen inestabilidad en el plasma y deriva instrumental por formación de depósitos carbonosos en los conos muestreadores y en la

antorcha, pudiendo llegar incluso a bloquear el sistema. El empleo de una cámara de nebulización enfriada con agua y el aumento de la energía de radiofrecuencia, puede ayudar a disminuir la inestabilidad del mismo (Suyani y col. 1989c). La adición de oxígeno (1-3%) en el nebulizador ayuda a minimizar los depósitos carbonosos. Sin embargo, esta medida disminuye los tiempos de vida de los conos.

Las fases móviles que contienen elevada concentración de sales disueltas pueden causar derivas en las señales, un espectro de masas complejo, fundamentalmente por encima de  $m/z=80$ , e interferencias isobáricas; además, la deposición de sales en el nebulizador y en los conos muestreadores puede bloquear la entrada de muestra (Heitkemper y col., 1989). La nebulización de ácido nítrico al 2% entre las inyecciones en el cromatógrafo, reduce alguno de los problemas producidos por las sales y aumenta, por tanto, el tiempo útil de la experimentación.

En general, cualquier método de cromatografía líquida acoplado a un ICP-MS requiere una cuidadosa selección de los parámetros instrumentales, tanto del cromatógrafo como del plasma, a fin de tener una separación adecuada, manteniendo en condiciones óptimas las prestaciones del detector.

La determinación de organoestánicos ha sido realizada por HPLC - ICP-MS (Suyani y col., 1989a y 1989b; Shum y col., 1992), usando pares iónicos (IP), cambio aniónico (IE) y cromatografía líquida micelar (MLC). El modo de separación MLC proporciona los mejores límites de detección (27 pg para tetrabutilestaño en comparación con 400 pg obtenidos cuando se emplea IP e IE). No obstante, sólo se obtuvo una buena separación de los compuestos alquilestánicos para los de pequeñas cadenas alquílicas.

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) también ha sido acoplada satisfactoriamente al ICP-MS (Shen y col., 1991). Este acoplamiento posee un alto potencial para la determinación de especies organometálicas a concentraciones medioambientales. Se ha obtenido una buena separación para compuestos

tetraalquilestánnicos, con unos límites de detección de 0.034 y 0.047 pg para tetrabutilestaño y tetrafenilestaño respectivamente, utilizando un volumen de inyección de 10 nL.

La especiación de organometálicos puede, finalmente, abordarse también por combinación del HPLC con algunas otras técnicas de detección, tales como espectrometría de absorción ultravioleta (UV), ionización activada por láser (LEI) y espectrometría de fluorescencia atómica excitada por láser (LEAFS) (Walton y col., 1991; Evans y McKee, 1987; Hempel y col., 1992; Epler y col., 1988; Wilken, 1992). Sin embargo, la sensibilidad más alta puede obtenerse usando la detección LEI. Esta elevada sensibilidad proviene de su gran capacidad para ionizar cualquier átomo irradiado por el láser y a la excelente eficiencia de detección. Esta técnica ha sido aplicada a la determinación de alquilestaño (Epler y col., 1988). Finalmente, el acoplamiento del HPLC al LEAFS permite alcanzar excelentes límites de detección en la determinación de compuestos trialquilestánnicos.

El HPLC puede también acoplarse a detectores electroquímicos, su acoplamiento a la detección electroquímica amperométrica en reducción ha proporcionado buenas sensibilidades para nueve compuestos organomercurícos.

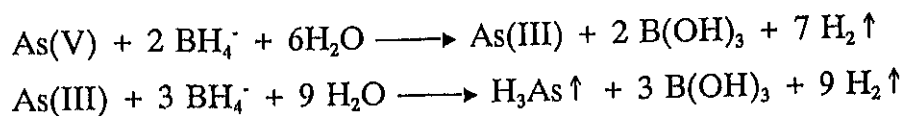
Debido a los niveles tan bajos de concentración de las especies de metales en las muestras medioambientales, se han desarrollado, en los últimos años, métodos en los que se incluye una etapa de preconcentración previa. Esta fase puede realizarse independientemente de la determinación analítica o instrumental. Los límites de detección alcanzados con estos métodos son del orden de picogramos para detectores de espectrometría atómica. La eficiencia en la etapa de preconcentración es extremadamente importante, ya que rige directamente la sensibilidad que se puede alcanzar en las muestras naturales. Otra de las ventajas de los métodos de preconcentración es que aislan al analito de la matriz, lo que evita posibles interferencias en la determinación.

## II.2.- MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO

El arsénico ha sido, desde la antigüedad, un elemento ampliamente estudiado debido a sus propiedades tóxicas. Actualmente, se sabe que el grado de toxicidad depende de la especie o forma química bajo la que se encuentre, de ahí que haya sido y sea uno de los elementos más estudiados y sobre el que se centra un notable número de trabajos de investigación. Desde hace aproximadamente diez años, las investigaciones sobre el arsénico se han orientado no sólo hacia la mejora de las características analíticas en su determinación, empleando cada vez técnicas más sensibles y selectivas, sino también hacia la determinación de la especie química, mediante la combinación de varios métodos y/o técnicas analíticas. Hasta la actualidad se han utilizado, fundamentalmente, dos vías para la determinación de los distintos compuestos de arsénico. La primera está basada en las diferencias observadas en la eficiencia de generación del hidruro correspondiente, a partir de las distintas especies de arsénico, mientras que la segunda se basa en el empleo de técnicas acopladas.

### II.2.1.- Métodos para la determinación diferencial de las especies de arsénico sin acoplamiento de técnicas instrumentales

El control de la química involucrada en el proceso, muchas veces permite la especiación con la técnica de HG-AAS. La eficiencia en la reducción de las distintas especies inorgánicas de arsénico depende, enormemente, del pH, así, mientras a pHs muy ácidos pueden reducirse cuantitativamente ambas formas inorgánicas del As al hidruro correspondiente, a pH superior a 4 solamente el As(III) se reduce completamente. El mecanismo de reducción del As(V) se cree que comprende dos pasos: Primero reducción a As(III) y posterior reducción a la arsina.



Sin embargo, la reducción preliminar de As(V) a As(III) no ocurre a valores de pH superiores a uno. Por tanto, con un control cuidadoso de la acidez de la disolución es posible, en una muestra que contenga las dos especies, inhibir la reducción de As(V) a As(III) y así, producir la arsina a partir de (As(III)) o a partir de ambos estados de oxidación (López y col., 1992).

Los organoarsenicales, ácido monometilarsénico (MMA) y ácido dimetilarsénico (DMA), pueden asimismo generar las correspondientes arsinas a los pHs óptimos. Así, Anderson y col (1986) determinan las formas inorgánicas y metiladas del arsénico por reducción selectiva al hidruro correspondiente en distintos medios ácidos, seguidos por detección por AAS o ICP-AES. Un problema de la especiación por reducción selectiva es que, en la mayoría de los casos, los calibrados univariantes no son adecuados, debido a la distinta eficiencia en la generación del hidruro a partir de cada especie. Por el contrario, si se utiliza una calibración multivariante es posible el procesamiento de datos para la reducción selectiva, permitiendo la determinación simultánea de las diferentes especies en muestras complejas. La calibración multivariante ILS (inverse least squares) ha sido empleada por Torralba y col., (1994) para la determinación de As(V), As(III), MMA y DMA, usando un sistema de generación de hidruros en continuo y AAS.

El atrapamiento criogénico de las especies también se utiliza como método de especiación basado en las distintas propiedades físicas de las especies. Las funciones de éste atrapamiento son la de actuar como preconcentrador cuando se enfría con nitrógeno líquido, y como una columna cromatográfica cuando la trampa cromatográfica se calienta gradualmente. Los distintos hidruros se eluyen secuencialmente en orden creciente de su punto de ebullición. Los límites de detección alcanzados dependen del volumen de muestra y del sistema utilizado para la detección. Generalmente son del orden de  $\text{ng L}^{-1}$ .

El primer método aplicado que utilizó una combinación de éste tipo fue construido por Braman y col. (1977) para la determinación tanto de las especies de arsénico inorgánico como de los compuestos metilados (MMA y DMA). Posteriormente,

se han realizado varias modificaciones de este sistema, incluyendo la semiautomatización (Feldman, 1979), alcanzándose mejores límites de detección y mayor reproducibilidad.

La metodología del atrapamiento criogénico fue extendida significativamente por Andreae (1982, 1983), quien lo acopló a la AAS equipada con una cubeta de sílice. Con este sistema se ha realizado la especiación de arsénico y antimonio en aguas naturales.

En el trabajo de Howard y Arbab-Zabar (1981) se ofrece una alternativa para la especiación de arsénico, en la que el sistema de atrapamiento criogénico se acopló entre el sistema de generación de hidruros y el AAS. Como la interacción de los hidruros con el material de empaquetado (bolas de vidrio) es débil, es posible eluirlos todos en 1 minuto sin que sea necesario calentar. Con este sistema se ha realizado la separación de arsina, monometilarsina y dimetilarsina. Sin embargo, la reproducibilidad depende de las fluctuaciones de la temperatura ambiente. Cuando se combina la generación de hidruros con el atrapamiento criogénico pueden surgir una serie de problemas, que provienen de la contrapresión y la obstrucción de la trampa fría con el agua transportada desde el generador de hidruros. La condensación de agua puede evitarse realizando una etapa de secado después de generar el hidruro, mediante desecantes, agentes químicos o métodos físicos, del tipo de un tubo en U sumergido en un baño de hielo. Sin embargo, este método está limitado a la determinación de especies organometálicas con baja temperatura de ebullición (metilo, etilo, propilo y butilo) y sólo ofrece un bajo nivel de separación.

Por último, también se ha descrito un método, basado en la diferente volatilidad de los cloruros de As(III) y As(V), para la determinación selectiva de ambas especies. Mediante una atomización a 1100°C se elimina totalmente el As(III), mientras que el As(V) es retenido cuantitativamente para su posterior atomización (Chen y col., 1993).

## **II.2.2.- Determinación de especies de arsénico por acoplamiento de técnicas instrumentales**

Se han desarrollado varios métodos que utilizan técnicas instrumentales acopladas para la especiación de los compuestos de arsénico. Estos acoplamientos constan, básicamente, de una técnica de separación combinada con un sistema de detección. Así, para la separación de las especies de arsénico se han utilizado, principalmente, las siguientes técnicas:

- Cromatografía de gases
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- Electroforesis capilar.

### **II.2.2.1.- Cromatografía de gases**

Se han descrito pocos métodos para la determinación de las especies de arsénico empleando la cromatografía de gases como técnica de separación. Esto es debido, principalmente, a la escasez de métodos de derivatización de arsénico, siendo los más utilizados:

- formación de complejos arsenicales con ditiocarbamato (Daughtrey y col., 1975).
- empleo de derivados trimetilsilil (Henry y Thorpe, 1978).
- formación de iododimetilarsina a partir de DMA (Soderquist y col., 1974).
- complejación con 2,3-dimercaptopropanol (Fukui y col., 1983).
- formación de metiltioglicolatos de arsénico (Dix y col., 1987).
- generación de hidruros o etilación (Howard y Comber, 1992; Van Elteren, 1991).

Sin embargo, ninguno de estos métodos, excepto el de generación de hidruros, ha frecido resultados satisfactorios, debido a la escasa estabilidad de los derivados o a su degradación en la columna. Por otro lado, en la derivatización mediante generación de hidruros es necesario que el acoplamiento al cromatógrafo de gases se haga vía atrapamiento criogénico, debido a la gran volatilidad de sus derivados.

La cromatografía de gases se ha acoplado a distintas técnicas atómicas, pero no han sido muy utilizadas para la especiación de los compuestos de arsénico. El acoplamiento GC-AAS se ha utilizado únicamente para la separación de los metiltioglicolatos de monometilarsénico y dimetilarsénico (Ebdon, 1988). El acoplamiento HG-CT-GC-AAS se ha aplicado a la determinación de arsénico inorgánico (As(III) y As(V)), monometilarsénico y dimetilarsénico, alcanzándose límites de detección comprendidos entre 0.2 y 0.5 ng.

#### **II.2.2.2.- Cromatografía de líquidos.**

El acoplamiento HPLC-AAS ha sido empleado, con varios diseños de interfases, para la determinación de las especies de arsénico (Woolson y Aharonson, 1981; Hansen y col., 1992; Larsen y Hansen, 1992). Excepto la generación de hidruros, las interfases utilizadas no han proporcionado buenos límites de detección, por lo que no pueden ser aplicadas al análisis de muestras medioambientales. La generación de hidruros, como interfase entre el HPLC y la AAS, ha sido utilizada por numerosos autores para la determinación de las especies de arsénico (Maitani y col., 1987; Ebdon y col., 1988; Chana y Smith, 1987; Hakala y Pyy, 1992; Mürer y col., 1992), sin embargo, en principio, sólo puede utilizarse para la determinación de especies que sean capaces de formar hidruros volátiles. Para poder determinar también las especies no formadoras de hidruros, tales como la arsenobetaína y la arsenocolina, algunos autores han incorporado una etapa de digestión de la muestra en línea, previa a la generación de hidruros. Dicha digestión puede tener lugar mediante una fotooxidación (Atallah y Kalman, 1991; Cullen y Dodd, 1988; Rubio y col., 1993a, 1993b) o una oxidación en horno microondas (Le y



col., 1992, 1994). Otros autores han descrito un método termoquímico de generación de hidruros basado en una nebulización termoespray seguida por una pirólisis del analito y, por último, generación del hidruro mediante un exceso de hidrógeno. Esta interfase en línea se ha aplicado con éxito a la especiación de compuestos de arsénico, incluyendo AsB, AsC y sales de tetrametilarsénico (Blais y col., 1990, 1991; Momplaisir y col., 1991, 1994; Huyghues-Despointes y col., 1991).

Por otro lado, la ETA-AAS, principalmente con horno de grafito (GFAAS), ofrece la ventaja de su gran sensibilidad para pequeños tamaños de muestra, aunque las etapas de secado y calcinación, previas a la atomización, hacen muy difícil acoplar el cromatógrafo directamente al horno. Generalmente, se trabaja con muestreo en discontinuo, introduciendo en el horno de grafito las distintas fracciones recogidas a la salida de la columna. Este acoplamiento se ha aplicado a la determinación de las especies de arsénico en organismos marinos y sedimentos (Maher, 1981; Woolson y col., 1982; Cullen y Dodd, 1989).

Asimismo, el HPLC ha sido acoplado en un gran número de trabajos al ICP-AES (Rubio y col., 1993c; La Freniere y col., 1987; Low y col., 1986; Spall y col., 1986; Morita y col., 1981; Anderson y col., 1986). Morita y col. (1981) han utilizado este acoplamiento para separar y determinar arsenito, arseniato, MMA, DMA y arsenobetaína en algas marinas. Low y col. (1986) llevaron a cabo la especiación de estos cinco compuestos en muestras de orina. Se ha comprobado, que el empleo de un sistema continuo de generación de hidruros tras la separación cromatográfica, introduce grandes mejoras de sensibilidad en el sistema HPLC-ICP-AES (Rauret y col., 1991; Rubio y col., 1992;). Los límites de detección para cinco compuestos de arsénico, empleando distintas interfases entre el HPLC y el ICP, se muestran en la *Tabla VII*.

Tabla VII.- Límites de detección de cinco compuestos de arsénico obtenidos por un sistema HPLC-ICP-AES. <sup>a</sup> Límite de detección obtenido por inyección en flujo utilizando la fase móvil del sistema cromatográfico. <sup>b</sup> Estimado

	As <sup>III</sup>	As <sup>V</sup>	MMA	DMA	PhAs	Ref.
HPLC-ICP-AES	960	480	4000			Bushee y col. (1984)
convencional	390	126	57	60		
nebulizador	50 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>		50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	Spall y col. (1986)
HPLC-DIN-ICP-AES	19.6		11.2			Roychowdhury y Koropchak (1990)
HPLC-USN-ICP-AES	6	9	3 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>		La Freniere y col. (1987)
HPLC-TS-ICP-AES	234	3.4		31	24	Wang y Jiang (1991)
HPLC-HG-ICP-AES	3	4		3		Roychowdhury y Koropchak (1990)
HPLC-HG-ICP-AES	10	10		21		Colon y Barry (1991)
	51	128	140	112		Bushee y col. (1984)
	0.3	0.9	0.4	2.1		Blais y Marshall (1989b)
						Rauret y col. (1991)

El acoplamiento HPLC-ICP-MS está ampliamente recomendado para los elementos y sus compuestos a nivel traza, ya que el ICP-MS es una técnica que proporciona bajos niveles de detección (sub-nanogramos para la mayoría de los elementos) y detección multi-elemental. Los bajos niveles de arsénico encontrados en

la orina con este acoplamiento, junto con el amplio rango de toxicidad exhibido por sus especies individuales, hacen que la especiación de arsénico en orina por HPLC-ICP-MS sea de considerable interés (Heitkemper y col., 1989; Sheppard y col., 1992; Larsen y col., 1993; Shibata y Morita, 1989) . La generación de hidruros también se ha empleado en este acoplamiento, disminuyendo los límites de detección (Le y col., 1994).

En la *Tabla VIII* se muestra un resumen de los métodos desarrollados para la especiación de arsénico en diferentes muestras, ordenados según la técnica de detección empleada. Como se puede observar, los métodos de separación por HPLC más comúnmente usados para la especiación de arsénico, debido a la naturaleza iónica de las especies, son: los de cambio aniónico, los de cambio catiónico, y la cromatografía de pares iónicos en fase reversa, donde se utiliza un reactivo de pares iónicos.

En la búsqueda de la separación cromatográfica de las especies de arsénico se han usado distintas columnas de cambio aniónico y una variedad de fases móviles: fosfato, carbonato, acetato y ácido sulfúrico, en varias concentraciones y pH. Los mejores resultados se obtuvieron empleando tampón fosfato como fase móvil. Algunos autores indican que a bajas concentraciones de la fase móvil (2-10 mM/l) se produce una buena separación de las especies de arsénico, pero las últimas especies eluidas, MMA y especialmente el As(V), presentan picos anchos debido a los largos tiempos de retención, lo que origina un incremento en los límites de detección. Utilizando una fase móvil más concentrada, se obtienen tiempos de retención más cortos y mejoran los límites de detección para el MMA y As(V). Estas columnas presentan una buena separación del arsenito, MMA, DMA y arseniato, mientras que los compuestos cuaternarios (AsB, AsC, TMA), debido a su naturaleza catiónica, eluyen juntos en el volumen muerto. En la separación de estas especies, el pH es selectivo en base a los  $pK_a$  de los compuestos aniónicos, siendo posible la separación del As(III) y de la AsB a pH básico, donde el arsenito está en forma aniónica. Varios autores coinciden en que la mejor separación de las especies cuaternarias, arsenito, DMA, MMA y arseniato, se obtiene a pH 6.0 con tampón fosfato.

Para la separación cromatográfica por el método de pares iónicos, los distintos autores optan, en la mayoría de los trabajos, por la utilización del ión tetrabutilamonio como agente formador de pares-iónicos. Beauchemin y col. (1989) emplean como agente formador de pares-iónicos hidróxido de tetrabutilamonio 5 mM y como fase móvil agua/metanol a pH 7.0, siendo el tiempo de análisis de 10.10 minutos.

Según Larsen y col. (1992), la cromatografía de cambio aniónico proporciona una mejor separación de los aniones de arsénico comparada con la cromatografía de pares iónicos; hecho que atribuyen a que la retención de las especies de arsénico es sensible a los cambios de pH, la naturaleza del tampón y su concentración. Sin embargo, Beauchemin y col. (1989) resaltan que el método de pares iónicos proporciona mejores resoluciones que el de cambio aniónico.

Tabla VIII: Técnicas acopladas para la determinación de compuestos de arsénico

TECNICA	COMPUESTOS	MUESTRA	SEPARACION	CARACT. ANALITICAS	REFERENCIA
IC-FAAS	As(III), As(V), MMA, DMA	Agua y sedimentos	Cambio iónico (resina)	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 10 R(%): 99 - 107 RSD(%): 0.7 - 1.3	Woolson y Aharonson 1981
HPLC-FAAS	As(III), As(V), MMA DMA, AsB, AsC, TMA	Suelos	Cambio aniónico Cambio catiónico	L.D. ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ): 0.3-1.4	Hansen y col. 1992
HPLC-FAAS	As(III), As(V), MMA DMA, AsB, AsC, TMA	-	Par iónico Cambio aniónico	-	Larsen y Hansen 1992
HPLC-GFAAS	As(III), As(V), MMA, DMA	Organismos marinos y sedimentos	Cambio iónico	R(%): no detectado, 94, 96.5, 92	Maher 1981
HPLC-GFAAS	As(III), As(V), MMA, DMA	Suelos	Cambio aniónico	R(%): 65, 65, 80, 90 T.A. (min): 32	Woolson y col. 1982
HPLC-GFAAS	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB	Organismos marinos	Cambio aniónico	RSD (ng): 20 T.A. (min): >60	Cullen y Dodd 1989
HPLC-HG-FAAS	As(III), As(V), MMA, DMA	Hígado de ratón y algas	Cambio aniónico	L.D. (ng): 1, 7, 2, 2 T.A. (min): <20	Maitani y col. 1987
HPLC-HG-AAS	As(III), As(V), MMA, DMA	Agua	Cambio aniónico	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 6, 27, 24, 18	Ebdon y col. 1988
HPLC-HG-AAS	As(III), As(V), MMA, DMA	Agua	Cambio aniónico	L.D. (ng): 1-2	Tye y col. 1985

TECNICA	COMPUESTOS	MUESTRA	SEPARACION	CARACT. ANALITICAS	REFERENCIA
HPLC-HG-AAS	As(III), As(V), MMA, DMA	Orina	Cambio aniónico	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 2 RSD(%): 5.1-7.2 T.A. (min): 11	Chana y Smith 1987
HPLC-HG-AAS	As(III), As(V), MMA, DMA	Orina	Pares iónicos	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 1.0-4.7 R(%): 83.4-91.9 RSD(%): 1.7-2.1 T.A. (min): 3	Hakala y Pyy 1992
HPLC-HG-AAS	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB, AsC	Marisco y orina	Cambio aniónico- catiónico en serie	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 2.86, 3.31, 2.86, 2.86, no determinado T.A. (min): <65	Mürer y col. 1992
HPLC-THG-AAS	AsB, AsC, TMA	-	Par-catiónico	L.D. (ng): 3.8-4.6 T.A. (min): 7	Huyghues-Despointes y col. 1991
HPLC-THG-AAS	AsB, AsC, TMA	Pescado	Cambio catiónico	L.D. (ng): 13.3, 14.5, 7.6 RSD (%): 6.0, 2.3, 6.5 R (%): 85, 85, 83 T.A. (min): 10	Blais y col. 1990
HPLC-THG-AAS	AsB, AsC, TMA	Orina	Cambio catiónico	L.D. (ng): 13.3, 14.5, 7.6 RSD (%): 6.0, 2.3, 6.5 R (%): 97, 85, 94 T.A. (min): 10	Blais y col. 1991
MO-FI-HG-AAS	As(III), As(V), AsB, AsC, TMA	-	-	L.D. (ng): 0.5	Le y col. 1992
Fotooxidación- HG-AAS	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB	-	Cambio aniónico	-	Atallah y Kalman 1991

TECNICA	COMPUESTOS	MUESTRA	SEPARACION	CARACT. ANALITICAS	REFERENCIA
HPLC-ICP-AES	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB	Orina	Cambio aniónico acoplado con fase reversa	T.A. (min): 10	Low y col. 1986
HPLC-ICP-AES	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB	Organismos marinos	Cambio: - aniónico - catiónico	L.D. (ng): 2.6 T.A. (min): <15 T.A. (min): <10	Morita y col. 1981
HPLC-ICP-AES	As(III), As(V), MMA, DMA	Suspensión de células cultivadas	Cambio aniónico	L.D. (µg): 0.390, 0.126, 0.060, 0.057 R(%): 87.4, 97.6, 95.9, 96.5 T.A. (min): 17	Spall y col. 1986
HPLC-ICP-AES	As(III), As(V), MMA, DMA	Agua natural	-	L.D. (µg L <sup>-1</sup> ): 0.2-0.7	Anderson y col. 1986
HPLC-ICP-AES	As(III), As(V), MMA, DMA	Agua residual y orina	Formación de vesículas en una columna C <sub>18</sub>	L.D. (ng): 0.5-1.2 T.A. (min): 10 RSD(%): 2-4	Liu y col. 1993
HPLC-ICP-AES	As(III), As(V), MMA, DMA	-	Par iónico	L.D. (ng mL <sup>-1</sup> ): 61-100 T.A. (min): <20	La Freniere y col. 1987
HPLC-HG- ICP-AES	As(III), As(V), MMA, DMA; AsB, AsC	-	Cambio aniónico (distinta fase móvil) elución: (a) isocrática (b) gradiente	(a) L.D. (mg L <sup>-1</sup> ): 0.22-1.52 T.A. (min): 11 (b) L.D. (µg L <sup>-1</sup> ): 2.1-10.2 T.A. (min): 12	Rubio y col. 1993
HPLC-HG- ICP-AES	As(III), As(V), MMA, DMA	Agua mineral	Cambio aniónico	L.D. (µg L <sup>-1</sup> ): 3.5-21.3 R(%): 83.5-100.8 T.A. (min): 7	Rauret y col. 1991

TECNICA	COMPUESTOS	MUESTRA	SEPARACION	CARACT. ANALITICAS	REFERENCIA
HPLC-HG- ICP-AES	As(III), As(V), MMA, DMA	Extracto de pescado sintético	Cambio aniónico (distinta columna) elución: (a) isocrática (b) gradiente	(a) L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 3.5-21.3 T.A. (min): 8 (b) L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 2.7-11.4 T.A. (min): 9 R(%): n.d., 101-103.	Rubio y col. 1992
HPLC-ICP-MS	As(III), As(V), MMA, DMA	Orina	Cambio aniónico	L.D. (pg): 73, 96, 36, 38 RSD(%): <10 T.A. (min): 10.2	Heitkemper y col. 1989
HPLC-ICP-MS	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB	-	Cambio aniónico	RSD(%): 3.1-15.3 T.A. (min): <6	Branch y col. 1989
HPLC-ICP-MS	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB	Músculo de pescado (DORM-1)	Par aniónico  Cambio aniónico Par-catiónico	T.A. (min): 10.10 (AsB no determ.) T.A. (min): 8.30 T.A. (min): 6.30 (MMA no determ.) L.D. (pg): 50-300	Beauchemin y col. 1989
HPLC-ICP-MS	15 especies	Materiales DORM-1 y DOLT-1	Cambio aniónico	-	Shibata y Morita 1989
HPLC-DIN- ICP-MS	As(III), As(V), MMA, DMA	-	Pares iónicos (gradientes)	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 1.0-1.2 RSD(%): 3.0-3.8 T.A. (min): 15	Shum y col. 1992
IC-ICP-MS	As(III), As(V), MMA, DMA	Orina	Cambio iónico (gradientes)	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 1.2-6.0 RSD(%): 2-8 T.A. (min): <12	Sheppard y col. 1992



TECNICA	COMPUESTOS	MUESTRA	SEPARACION	CARACT. ANALITICAS	REFERENCIA
IC-ICP-MS	As(III), As(V), MMA, DMA	Vino rosado	Cambio iónico (gradientes)	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 0.73-2.6 RSD(%): 4-15	Sheppard y col. 1992
IC-ICP(He)-MS	As(III), As(V), MMA, DMA	Vino rosado	Cambio iónico (gradientes)	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ): 0.63, 0.37, 0.32, 0.80 RSD(%): 7, 4, 14, 12	Sheppard y col. 1992
HPLC-ICP-MS	As(III), As(V), MMA, DMA	Orina	Cambio aniónico	L.D. ( $\text{ng mL}^{-1}$ ): 6.5-10.4 RSD(%): 5.4-8.9 T.A. (min): <5	Larsen y col. 1993
HPLC-ICP-MS	AsB, AsC, TMA, TMAO	Orina	Cambio catiónico	L.D. ( $\text{ng mL}^{-1}$ ): 2.7-6 RSD(%): 5.8-23 T.A. (min): <2	Larsen y col. 1993
HPLC-ICP-MS	15 especies	Orina	Permeación en gel Par-iónico	L.D. (pg): 100 AsB, 150 AsC L.D. (pg): 20 AsB, 50 AsC	Shibata y Morita 1989
HPLC-ICP-MS	AsB, DMA, As(V)	Pescados y DORM-1	Cambio aniónico	Recuperaciones: 85-115%	Branch y col. 1994
HPLC-ICP-MS	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB, AsC, TMA	suelo	Cambio aniónico Par-iónico	L.D. ( $\text{ng mL}^{-1}$ ): 1-7	Hansen y col. 1992
HPLC-MO-HG -ICP-MS	As(III), As(V), MMA, DMA, AsB	Orina	Cambio aniónico y fase reversa	L.D. ( $\text{ng mL}^{-1}$ ): 10-20 T.A. (min): 12	Le y col. 1994
UV	As(III), As(V), MMA, DMA	-	Electroforesis capilar	L.D. (pg): 40 T.A. (min): 6	Morin y col. 1992
Conductividad	MMA, DMA	Pesticidas	Cromatografía líquida	R(%): 10.3, 3.6 T.A. (min): 3.2	Gehrig y Fitzpatrick 1989

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DEL  
CAPITULO 2

- Alkemade C.Th.J. and Herrmann R. (Eds.) (1979)  
*Fundamentals of Analytical Flame Spectroscopy, Sect. 4.5, 4.6. Adam Hilger, Bristol.*
- Anderson R.K., Thomson M. and Culbard E. (1986)  
*Analyst, 111, 1153.*
- Andreae M.O. (1977)  
*Anal. Chem., 49, 820.*
- Andreae M.O., Asmode J.F., Foster P. and Van't Dack L. (1981)  
*Anal. Chem., 53, 1766.*
- Andreae M.O. and Froelich P.N. (1981)  
*Anal. Chem., 56, 287.*
- Andreae M.O. (1982)  
in Grasshof K., Ehrhardt M. and Kremling K. (editors)  
*Methods of Seawater Analysis, Verlag-Chemie, Weinheim. pp. 168-173.*
- Andreae M.O. (1983)  
in Wong E.S., Boyle E., Brulano K.W., Burton ?? and Goldberg E.D. (editors)  
*Trace Metals in Seawater, Plenum Press, New York, Vol. 4.*
- Atallah R.H. and Kalman D.A. (1991)  
*Talanta, 38, 167.*
- Beauchemin D., Siu K.W.M. McLaren J.W. and Berman S.S. (1989)  
*J. Anal. At. Spectrom., 4, 285.*
- Becerio-González E., Bermejo-Barrera P., Bermajo-Barrera A., Barciela-García J., Barciela-Alonso C. (1993)  
*J. Anal. At. Spectrom., 8, 649.*
- Blais J.S. and Marshall W.D. (1989a)  
*J. Anal. At. Spectrom., 4, 271.*
- Blais J.S. and Marshall W.D. (1989b)  
*J. Anal. At. Spectrom., 4, 641.*
- Blais J.S., Momplaisir G.M. and Marshall W.D. (1990)  
*Anal. Chem., 62, 1161.*

- Blais J.S., Monplaisir G.M. and Marshall W.D. (1991)  
*J. Agric. Food Chem.*, 39, 1448.
- Braman R.S., Johnson D.L., Foreback C.C., Ammons J.M. and Bricker J.L. (1977)  
*Anal. Chem.*, 49, 621.
- Branch S., Bancroft K.C.C, Ebdon L. and O'Neill P. (1989)  
*Analytical Proceedings*, 26, 73.
- Branch S., Ebdon L. and O'Neill P. (1994)  
*J. Anal. At. Spectrom.*, 9, 33.
- Brinckman F.E., Blair W.R., Jewett H.L. and Iverson W.P. (1977)  
*J. Chromatogr. Sci.*, 15, 493.
- Brinckman F.E., Jewett K.L., Iverson W.P., Irgolic K.J., Ehrhardt K.C. and Stockton R.A. (1980)  
*J. Chromatogr.*, 31, 191.
- Bushee D.S., Krull I.S., Demko P.R. and Smith S.B. (1984)  
*J. Liq. Chromatogr.*, 7, 861.
- Bushee D.S. (1988)  
*Analyst*, 113, 1167.
- Cai Y., Rapsomanikis S. and Andreae M.O. (1993)  
*Anal. Chim. Acta*, 274, 243.
- Carey J.M., Byrde F.A. and Caruso J.A. (1993)  
*J. Chromatogr. Sci.*, 31, 330.
- Chakraborti D., De Jonghe W.R.A., Van Mol M.O., Cleuvenbergen R.J.A. and Adams F.C. (1984)  
*Anal. Chem.*, 56, 2692.
- Chana B.S. and Smith N.J. (1987)  
*Analytica Chimica Acta*, 197, 177.
- Chau Y.K., Wong P.T.S. and Goulden P.D. (1975)  
*Anal. Chem.* 47, 658.
- Chau Y.K., Wong P.T.S. and Goulden P.D. (1976)  
*Anal. Chim. Acta*, 85, 421.
- Chau Y.K., Wong P.T.S. and Bengert G.A. (1982)  
*Anal. Chem.*, 54, 246.

- Chau Y.K., Wong P.T.S. and Kramer D. (1983)  
*Anal. Chim. Acta*, 146, 211.
- Chau Y.K. and Wong P.T.S. (1986)  
*Sci. Total Environ.*, 49, 305.
- Chen Y., Qi W., Cao J. and Chang M.J. (1993)  
*Anal. At. Spectrom.*, 8, 379.
- Chikuma M., Tanaka T. and Tanaka H. (1992)  
*Biomed. Res. Trace Elem.*, 3, 205.
- Colby S.N., Stewart M. and Reilly J.P. (1990)  
*Anal. Chem.*, 62, 2400.
- Colon L.A. and Barry E.F. (1991)  
*J. High Resolut. Chromatogr.*, 14, 608.
- Cullen W.R. and Dodd M. (1988)  
*Applied Chromatogr.* 2, 1.
- Cullen W.R. and Dodd (1989)  
*Applied Organometallic Chem.*, 3, 401
- Daughtrey E.H., Fitchett A.W. and Mashak P. (1975)  
*Anal. Chim. Acta*, 79, 199.
- De la Calle Guntinas M.B., Madrid Y. and Cámara C. (1992a)  
*Mikrochim. Acta*, 109, 149.
- De la Calle Guntinas M.B., Madrid Y. and Cámara C. (1992b)  
*Fresenius'J. Anal. Chem.*, 343, 597.
- Denton M.B., Freelin J.M. and Smith T.R. (1990)  
in Sneddon J. (editor)  
*Sample Introduction in Atomic Spectroscopy*, Elsevier, Amsterdam, Ch. 4, p. 73.
- Desauziers V., Leguille F., Lavigne R., Astruc M. and Pinel R. (1989)  
*Applied Organomet. Chem.*, 3, 469.
- Dix K., Capan C.J. and Toribara T.Y. (1987)  
*J. Chromatog. Sci.*, 25, 164.
- Donard D.F. and Weber J.H. (1985)  
*Environ. Sci. Technol.*, 19, 1104.

Ebdon L., Ward R.W. and Leathard D.A. (1982)  
*Analyst*, 107, 129.

Ebdon L., Hill S.J. and Jones P. (1985)  
*Analyst*, 110, 515.

Ebdon L., Hill S., Walton P. and Ward R.W. (1988)  
*Analyst*, 113, 1159.

Ebdon L. and Hill S. (1989)  
in Harrison R.M. and Rapsomanikis S. (editors),  
*Environmental Analysis using Chromatography Interfaced with Atomic Spectroscopy*.  
Ellis Horwood, Chichester, UK. Ch. 6, p. 165.

Epler K.S., O'Haver T.C., Turk G.C. and MacCrehan W.A. (1988)  
*Anal. Chem.*, 60, 2062.

Estes S.A., Uden P.C. and Barnes R.N. (1982)  
*J. Chromatogr.*, 239, 181.

Evans O. and McKee G.D. (1987)  
*Analyst*, 112, 983.

Feldman C. (1979)  
*Anal. Chem.*, 51, 664.

Filippelli M. (1987)  
*Anal. Chem.*, 59, 116.

Forsyth D.S. and Marshall W.D. (1983)  
*Anal. Chem.*, 55, 2132.

Fukui S., Hirayama T, Nohara M. and Sakagami Y. (1983)  
*Talanta*, 30, 89.

Gehrig C.C. and Fitzpatrick T.M. (1989)  
*J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 994.

Gustavsson A. and Nygren O. (1987)  
*Spectrochim. Acta*, 42B, 883.

Hakala E., and Pyy L. (1992)  
*J. Anal. Spectrom.*, 7, 191.

Hansen S.H., Larsen E.H., Pritzl G. and Cornett C. (1992)  
*J. Anal. At. Spectrom.*, 7, 629.

Heitkemper D., Creed J., Caruso J. and Fricke F.L. (1989)  
*J. Anal. At. Spectrom.*, 4, 279.

Hempel M., Hintelmann H. and Wilken R.D. (1992)  
*Analyst*, 117, 669.

Henry F.T. and Thorpe T.M. (1978)  
*J. Chromatog.*, 166, 577.

Hill S. and Ebdon L. (1985)  
*Eur. Spectrogr. News*, 58, 20.

Hill S., Ebdon L. and Jones P. (1986)  
*Anal. Proc.*, 23, 6.

Hill S.J., Bloxham M.J. and Worsfold P.J. (1993)  
*J. Anal. At. Spectrom.*, 8, 499.

Holak W. (1982)  
*Analyst*, 107, 1457.

Howard A.G. and Arbab-Zavar M.H. (1981)  
*Analyst*, 106, 213.

Howard A.G. and Comber S.D.W. (1992)  
*Mikrochim. Acta*, 109, 27.

Huyghues-Despointes A., Monplaisir G.M., Blais J.S. and Marshal W.D. (1991)  
*Chromatographia*, 31, 481.

Ibrahim M., Nisamanepong W., Hass D.L. and Caruso J.A. (1985)  
*Spectrochim. Acta*, 40B, 367.

Jian W. and Mcleod C.W. (1992)  
*Talanta*, 39, 1537.

Jiang S., De Jonghe W. and Adams F. (1982)  
*Anal. Chim. Acta*, 136, 183.

Koizumi H., McLaughlin R.D. and Hadeishi T. (1979)  
*Anal. Chem.*, 51, 387.

Kolb B., Kremmer G., Schlessner F.H. and Wiedeking E. (1966)  
*Fresenius'Z. Anal. Chem.*, 221, 166.

**Koropchak J.A. and Winn D.H. (1987)**

*Trends Anal. Chem.*, 6, 171.

**Krull I.S. (1983)**

in Lawrence J.F. (editor)

*Liquid Chromatography in Environmental Analysis, Humana Press, Clifton, NJ. Ch. 5.*

**Krull I.S., Panaro K.W., Noonan J. and Erickson D. (1989)**

*Appl. Organomet. Chem.*, 3, 295.

**La Freniere K.E., Fassel V.A. and Eckels D.E. (1987)**

*Anal. Chem.*, 59, 879.

**Larsen E.H. and Hansen S.H. (1992)**

*Mikrochimica Acta*, 109, 47.

**Larsen E.H., Pritzl G. and Hansen S.H. (1993)**

*J. Anal. At. Spectrom.*, 8, 557.

**Le X.C., Cullen R. and Reimer K.J. (1992)**

*Appl. Organomet. Chem.*, 6, 161.

**Le X.C., Cullen R. and Reimer K.J. (1994)**

*Talanta*, 41, 495.

**Liu Y.M., Fernandez M.L., Blanco E.B. and Sanz-Medel A. (1993)**

*J. Anal. At. Spectrom.* 8, 815

**Lobinski R. and Adams F.S. (1993)**

*Trends Anal. Chem.*, 12, 41.

**Lopez A., Torralba R., Palacios M.A. and Cámara C. (1992)**

*Talanta*, 39, 1343.

**Low G.K.C., Batley G.E. and Buchanan S.J. (1986)**

*Chom*, 18, 964.

**Maguire R.J. and Tkacz R.J. (1983)**

*J. Chromatogr.*, 268, 99.

**Maher W.A. (1981)**

*Anal. Chim. Acta*, 126, 157.

**Maitani T., Uchiyama S. and Saito Y. (1987)**

*J. Chromatogr.*, 391, 161.

- Momplaisir G.M., Blais J.S., Quintero M. and Marshall W.D. (1991)  
*J. Agric. Food Chem.*, 39, 1448.
- Momplaisir G.M., Lei T. and Marshall W.D. (1994)  
*Anal. Chem.*, 66, 3533.
- Montanser A. and Golightly D.W. (1992)  
*Inductively Coupled Plasma in Analytical Spectrometry*; VCH Publishers, New York.
- Morin P., Arman M.B., Favier S., Heimburger R. and Leroy M. (1992)  
*Fresenius J. Anal. Chem.*, 342, 357.
- Morita M., Uehiro T. and Fuwa K. (1981)  
*Anal. Chem.*, 53, 1806.
- Munaf E., Haraguchi D., Ishii D., Takeuchi T. and Goto M. (1990)  
*Anal. Chim. Acta*, 235, 309.
- Mürer A.J.L., Abildtrup A., Poulsen O.M. and Christensen J.M. (1992)  
*Analyst*, 117, 677.
- Nygren O., Nilsson C.A. and Frech W. (1988)  
*Anal. Chem.*, 60, 2204.
- Nygren O., Nilsson C.A. and Gustavsson A. (1989)  
*Spectrochim. Acta*, 44B, 589.
- Radojcevic M., Allen A., Rapsomanikis S. and Harrison R. (1986)  
*Anal. Chem.*, 58, 658.
- Radziuk B., Thomassen Y., Butler L.R., Van Loon J.C. and Chau Y.K. (1979)  
*Anal. Chim. Acta*, 108, 31.
- Rapsomanikis S., Donard O.F.X. and Weber J.H. (1986)  
*Anal. Chem.*, 58, 35.
- Rauret G., Rubio R. and Padró A. (1991)  
*Fresenius' J. Anal. Chem.*, 340, 157.
- Rezende M.C.R., Campos R.C. and Curtius A.J. (1993)  
*J. Anal. At. Spectrom.*, 8, 247.
- Roychowdhury and Koropchak (1990)  
*Anal. Chem.*, 62, 484.
-



- Rubio R., Padró A., Alberti J. and Rauret G. (1992)  
*Mikrochimica Acta*, 109, 39.
- Rubio R., Alberti J. and Rauret G. (1993a)  
*Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 52, 203.
- Rubio R., Padró A., Alberti J. and Rauret G. (1993b)  
*Anal. Chim. Acta*, 283, 160.
- Rubio R., Peralta I., Alberti J. and Rauret G. (1993c)  
*Journal of Liquid Chromatography*, 16, 3531.
- Sakamoto H., Tomiyasu T. and Yonehara N. (1992)  
*Anal. Sci.*, 8, 35.
- Sarzanini C. Sancchero G., Aceto M., Abollino O. and Mentasti E.J. (1992)  
*J. Chromatogr.*, 626, 151.
- Shen W.L., Vela N.P., Sheppard B.S. and Caruso J.A. (1991)  
*Anal. Chem.* 63, 1491.
- Sheppard B., Caruso J.A., Heitkemper D.T. and Wolnik K. (1992)  
*Analyst*, 117, 971.
- Shibata Y. and Morita M. (1989)  
*Anal. Sciences*, 5, 107.
- Shum S.C.K., Nedderson R. and Houk R.S. (1992)  
*Analyst*, 117, 577.
- Slavin W. and Schmidt G.J. (1979)  
*J. Chromatogr. Sci.*, 17, 610.
- Spall W.D., Lynn J.G., Andersen J.L., Valdez J.G. and Gurley L.R. (1986)  
*Anal. Chem.*, 58, 1340.
- Soderquist C.J., Crosby D.G. and Bowers J.B. (1974)  
*Anal. Chem.*, 46, 155.
- Suyani H., Creed J., Davidson T. and Caruso J. (1989a)  
*J. Chromatogr. Sci.* , 27, 139.
- Suyani H., Heitkamper D. Creed J. and Caruso J. (1989b)  
*Appl. Spectrosc.*, 43, 962.

Suyani H., Creed J., Caruso J. and Satzger R.D. (1989c)

*J. Anal. At. Spectrom.*, 4, 777.

Tolosa I., Bayonna J.M., Albaiges J., Alencastro L.F. and Tarradelas J. (1991)

*Fresenius'J. Anal. Chem.*, 332, 646.

Torralba, R., Bonilla M., Pérez-Arribas L.V., Palacios M.A. and Cámara C. (1994)

*Spectrochim. Acta*, 49, 893.

Tye C.T., Haswell S.J., O'Neill P. and Bancroft K.C.C. (1985)

*Analytica Chimica Acta*, 169, 195.

Uchida H., Shimoishi Y. and Toei K. (1980)

*Environ. Sci. Technol.*, 14, 541.

Uden P.C. (1989)

in Harrison R.M. and Rapsomanikis S. (editors)

*Environmental Analysis using Chromatography Interfaced with Atomic Spectroscopy*, Ellis Horwood, Chichester, UK. Ch. 4, p. 96.

Uden P.C. (1991)

*Chromatography element selective detection: interfacing of chromatography with microwave induced plasma detector. In: Trace metal Analysis and Speciation (Krull I.S., ed)*, Elsevier, Amsterdam 1991.

Van Loon J.C. (1979)

*Anal. Vhem.*, 51, 1139a.

Van Elteren J.T. (1991)

*PhD Dissertation, Utrech*, p. 134.

Vasui A., Tsutsumi C. and Toda S. (1978)

*Agric. Biol. Chem.*, 42, 2139.

Vickrey T.M., Howell, H.E. and Paradise M.T. (1979)

*Anal. Chem.*, 51, 1880.

Vickrey T.M., Howell, H.E. Harrison G.V. and Ramelow G.J. (1980)

*Anal. Chem.*, 52, 1743.

Vidal J.C., Sanz J.M. and Castillo J.R. (1992)

*Fresenius'J. Anal. Chem.*, 344, 234.

Waldock M.J., Waite M.Z., Miller D., Smith D.J. and Law R.J. (1989)

The determination of total tin and aorganotin compounds in environmental samples.

*Aguat. Environ. Protect.: Analytical Methods. MAFF Direct. Fish. Res., Lowentoft 1989*, 4, 1.

Walton A.P., Wei G.T., Liang Z., Michel R.G. and Morris J.B. (1991)  
*Anal. Chem.*, 63, 232.

Wang S.R. and Jiang S.J. (1991)  
*J. Chin. Chem. Soc.*, 38, 327.

Wasik S.P. and Schwartz F.P. (1980)  
*J. Chromatogr. Sci.*, 18, 660.

Wilken R.D. (1992)  
*Fresenius' J. Anal. Chem.*, 342, 795.

Woolson E.A. and Aharonson N. (1981)  
*Anal. Chem.*, 53, 966.

Woolson E.A., Aharonson N. and Iadevaia R. (1982)  
*J. Agric. Food Chem.*, 30, 580.

Yoshimura C., Fujino T. and Yamakoshi T. (1993a)  
*Nippon Kagaku Kaishi*, 259.

Yoshimura C., Fujino T. and Yamakoshi T. (1993b)  
*Chem. Express*, 8, 209.

Yoza N. and Obashi S. (1973)  
*Anal. Lett.*, 6, 595.

**PARTE  
EXPERIMENTAL**



## REACTIVOS Y MATERIAL

La realización del presente trabajo se ha llevado a cabo con reactivos de pureza para análisis y agua desionizada obtenida con un sistema Milli-Q (Millipore).

**- *Compuestos de arsénico:***

Arsenito sódico (Carlo Erba), arseniato disódico (Merck), monometilarseniato disódico (Carlo Erba), dimetilarseniato de sodio (Sigma), arsenobetaína (Programa de Ensayos, Medidas y Pruebas (M&T)), arsenocolina (M&T).

**- *Reactivos para HPLC:***

Ácido fosfórico (Carlo Erba), fosfato trisódico (Merck), fosfato de tetrabutilamonio (Carlo Erba), metanol (Carlo Erba).

**- *Reactivos para la oxidación:***

Persulfato potásico (Merck), hidróxido sódico (Merck), grafito en polvo (Ultra F purity, Dicoex)

**- *Reactivos para la generación de hidruros:***

Ácido clorhídrico (Carlo Erba), borohidruro sódico (Aldrich), hidróxido sódico (Merck), Argón C-50 (Carburos Metálicos), cetileno C-26 (Carburos Metálicos).

**- *Reactivos para la preconcentración:***

Ácido fosfórico (Carlo Erba), fosfato trisódico (Merck), ácido clorhídrico (Carlo Erba), hidróxido sódico (Merck), agua oxigenada (Faimter, S.A.), nitrato sódico (Merck), sulfato disódico (Merck), cloruro sódico (Merck).

**- *Reactivos para el pretratamiento de la muestra "clean-up"***

Etanol (Carlo Erba), acetona (Carlo Erba), hielo seco.

### III.1.- PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

Todas las disoluciones utilizadas en la realización experimental de esta memoria se prepararon como se explica a continuación, con agua de calidad Milli-Q, se almacenaron en botellas de polietileno y se conservaron en el frigorífico.

- Disoluciones patrón de As(III), As(V), DMA y MMA: se prepararon mediante pesada directa de 0.1734, 0.4165, 0.0547 y 0.0543 de  $\text{NaAsO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{ONa})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente, y se enrasó a 100 ml con agua desionizada, para obtener en cada una de ellas una concentración final de 1000 mg  $\text{L}^{-1}$  en arsénico. Estas soluciones fueron guardadas a 4°C en botes aislados de la luz. Las disoluciones patrón de menor concentración se obtuvieron diariamente, a partir de las anteriores, mediante la adecuada dilución con agua.

- Disoluciones patrón de AsB y AsC: se prepararon diariamente a partir de las disoluciones de referencia, proporcionadas por el Programa de Ensayos, Medidas y Pruebas (M&T), de 366.4 y 306.4 mg  $\text{L}^{-1}$  de arsénico respectivamente, por dilución conveniente.

- Disoluciones de fosfato: se prepararon disoluciones de 0.5 a 40 mmol  $\text{L}^{-1}$  disolviendo las cantidades adecuadas de  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  en agua desionizada. El pH fue ajustado con ácido fosfórico. Las disoluciones resultantes se filtraron a través de un filtro de membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  y se desgasificaron antes de usarlas.

- Disoluciones de ácido fosfórico: se prepararon disoluciones de 0.5 a 40 mmol  $\text{L}^{-1}$  disolviendo las cantidades adecuadas de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  en agua desionizada.

- Disoluciones de fosfato de tetrabutilamonio (TBAP): se prepararon disoluciones de 1.5 a 15 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pesando una cantidad adecuada de TBAP, y se enrasaron con agua desionizada. El pH fue ajustado con fosfato. Las disoluciones resultantes se filtraron a través de un filtro de membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ .

- Disolución de persulfato potásico ( $K_2S_2O_8$ ) 1 a 5% (M/V) estabilizada con hidróxido sódico (NaOH) 0.5 a 5%: las disoluciones se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de NaOH en 250 mL de agua, se añade la cantidad adecuada de  $K_2S_2O_8$  y se enrasa a 500 mL.

- Disolución de borohidruro sódico ( $NaBH_4$ ) al 3% (M/V) estabilizada con 1% de hidróxido sódico (NaOH): se disuelven 10 g de NaOH en agua y se añade 30 g de  $NaBH_4$ . La disolución se filtra y se enrasa a 1000 mL con agua desionizada.

### **III.2.- MATERIAL**

- Material volumétrico de vidrio de calidad contrastada y recipientes de polietileno y teflón para almacenar disoluciones y muestras.
- pH-metro de precisión Metrohm E510
- Micropipetas "Brand" de volumen variable y fijo.
- Sistema de purificación de agua Milli-Q "Millipore".
- Congelador "Zanussi" (\*\*\*\*\*).
- Frigorífico "Corbero"
- Balanza analítica "Precisa" con sensibilidad 0.01 mg.
- Célula de atomización de cuarzo "Aplitec".
- Soporte para la célula de cuarzo diseñado en el laboratorio de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid



## INSTRUMENTACIÓN

La separación y detección de las especies de arsénico se realizó con la siguiente instrumentación:

**- módulo de separación:**

- \* bomba de alta presión Waters 590 para cromatografía líquida de alta resolución.
- \* válvula de inyección de seis vías Reodyne tipo 50 con un bucle de 100  $\mu$ l.
- \* columnas: IC-PAK A (50 \* 4.5 mm i.d., 10  $\mu$ m)  
Hamilton PRP-X 100 (250 \* 4.1 mm i.d., 10  $\mu$ m)  
Spherisorb 5 ODS1 (150 \* 4.6 mm i.d., 5  $\mu$ m)
- \* Cartuchos aniónicos IC-OH (Supelco)

**- módulo de oxidación:**

- \* Placa calefactora "P-Selecta".
- \* Horno microondas (Balay, modelo BAHM-III) con una potencia máxima de 700 W (variable en nueve posiciones).
- \* Tubos rígidos de teflón de 0.5 mm de diámetro interno.
- \* Tubos flexibles de Tygon (0.60 cc m<sup>-1</sup>) "Gilson".

**- módulo de generación de hidruros:**

Para la generación de hidruros se utilizó un dispositivo, diseñado en el departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid, que consta de una bomba peristáltica de cuatro canales (Gilson HP4), un bucle

de mezcla y otro de reacción (Teflón , d.i. 0.5 mm) y un tubo de vidrio en forma de U como separador de fases gas-líquido (Philips). Los tubos portadores de las distintas disoluciones son tubos flexibles de Tygon (0.60 cc m<sup>-1</sup>) "Gilson" y las uniones de todos los tubos del sistema fueron elaborados con teflón en nuestro laboratorio.

**- módulo de detección:**

El detector es un espectrómetro de absorción atómica modelo Perkin-Elmer 2380, equipado con una lámpara EDL como fuente de excitación y utilizando una rendija de 0.7 nm para aislar la longitud de onda de 193.7 nm del espectro del arsénico. Las señales de absorbancia se registraron en un registrador Perkin-Elmer Modelo 56, operando a 10 mV.

**- módulo de preconcentración**

\* Estación de vacío Visiprep (Supelco) conectado a una bomba de vacío Barna (2 m<sup>3</sup> h<sup>-1</sup>)

\* Cartuchos Accell Plus QMA (Sep-pak VAC 6 cc de 500 mg) con grupos funcionales: -C(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup> Cl<sup>-</sup>.

**- módulo de pretratamiento de las muestras**

\* Centrifugadora P-Selecta meditronic.

\* Rotavapor Heidolph W 2000.



RESULTADOS  
Y  
DISCUSION



## MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN Y SEPARACIÓN DE ESPECIES DE ARSÉNICO

### V.1.- DERIVATIZACIÓN A LA FORMA DE HIDRUROS

Desde hace más de cien años se conoce, y se ha utilizado, el hecho de que el arsénico y otros elementos de los grupos IV, V y VI del sistema periódico forman hidruros covalentes volátiles por reacción con hidrógeno nascente. Sin embargo, esta técnica sólo ha sido ampliamente utilizada con fines analíticos en los últimos años, como consecuencia del gran desarrollo de la instrumentación. La principal ventaja de la volatilización de un elemento como hidruro gaseoso radica en que se consiguen, simultáneamente, la separación de la matriz y el enriquecimiento del analito, lo que supone una considerable reducción de las interferencias. Además, el método puede ser fácilmente automatizado y acoplado a sistemas de flujo continuo, como es el caso de la cromatografía.

No todas las especies de arsénico de mayor relevancia son capaces de generar el hidruro correspondiente. Así, de las seis especies estudiadas en este trabajo, sólo cuatro de ellas son capaces de formarlo: ácido arsenioso, ácido arsénico, MMA y DMA. Los dos primeros dan lugar a la formación del mismo hidruro, arsina ( $H_3As$ ), mientras que el MMA y DMA generan monometilarsina y dimetilarsina, respectivamente. La arsenobetaína y arsenocolina no sufren esta reacción de derivatización y, por tanto, no dan lugar a la formación de ningún hidruro.

En este trabajo se pretende desarrollar métodos analíticos que permitan la determinación de cualquiera de estas seis formas químicas del arsénico que son objeto de nuestro estudio, mediante la técnica de absorción atómica con generación de hidruros

por FIA. Teniendo en cuenta que las especies se separan en un sistema HPLC, las condiciones impuestas por el sistema cromatográfico, tales como la naturaleza, concentración y flujo del eluyente, tienen que estar contempladas en la optimización del sistema de detección. También hay que contemplar la transformación de las especies del arsénico que no forman hidruros a otras formas químicas que sean capaces de generarlos. El hidruro de arsénico a partir de los grados de oxidación (III) o (V) se genera, normalmente con la misma eficiencia, por reacción con borohidruro sódico al 3% (m/v) en medio ácido clorhídrico 6 mol L<sup>-1</sup> (A. López y col., 1992). Como disolución portadora del sistema FIA se ha utilizado el eluyente más empleado en cromatografía de cambio aniónico (tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup>). El hidruro así formado es transportado a la célula de atomización del detector por medio de un gas portador (argón). El esquema del sistema FIA utilizado aparece representado en la *Figura 5*.

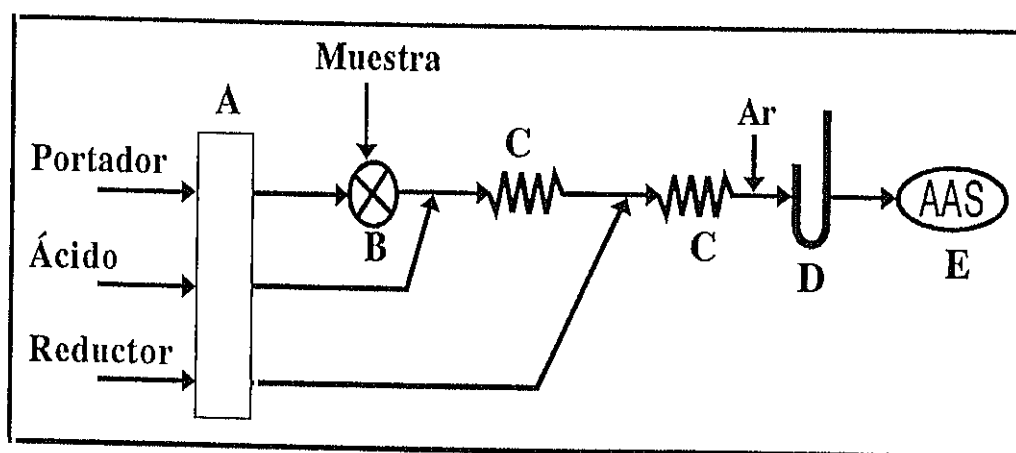


Figura 5.- Esquema del sistema FIA utilizado para la generación del hidruro de arsénico. Siendo A: bomba peristáltica; B: válvula de inyección (100  $\mu$ L); C: bucles de reacción; D: separador de fases gas-líquido; E: espectrómetro de absorción atómica.

Por tanto, los parámetros estudiados fueron: (1) velocidad de flujo de argón (gas portador del hidruro de arsénico), (2) caudal del portador, (3) caudal de los reactivos, (4) influencia de la longitud y forma de los bucles de reacción, (5) concentración del agente reductor (NaBH<sub>4</sub>) y (6) acidez del medio (concentración del ácido clorhídrico). En todos los casos se utilizaron disoluciones independientes de cada compuesto con una concentración de 200  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de arsénico.

**(1) Influencia de la velocidad del flujo de argón**

Para realizar este estudio se varió la velocidad del flujo de argón, utilizado para transportar el hidruro formado a la célula de atomización, en el intervalo de 5-30 mL min<sup>-1</sup>. Los resultados obtenidos se representan en la *Figura 6*. En la gráfica se observa que para todas las especies de arsénico la señal analítica aumenta gradualmente al aumentar el caudal de argón, observándose un valor máximo cuando dicho caudal es de 10 ml min<sup>-1</sup>. Velocidades de flujo de argón mayores dan lugar a una disminución de la señal debido a un efecto de dilución del hidruro en el argón.

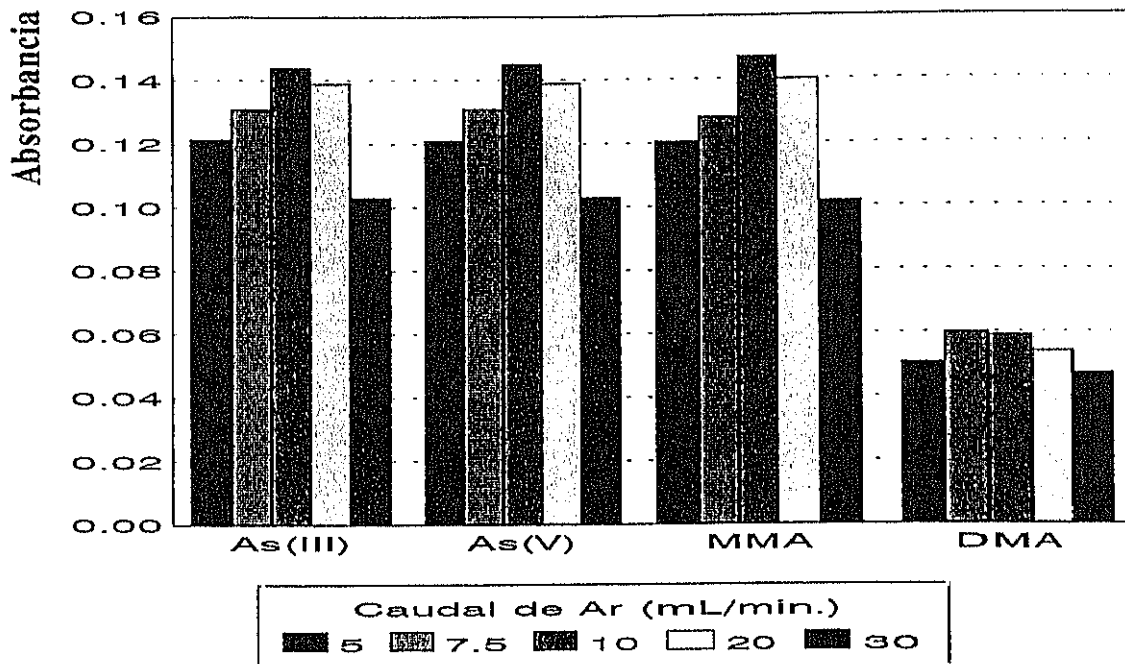


Figura 6.- Influencia del caudal de argón sobre la señal analítica de los hidruros de arsénico formados a partir de As(III), As(V), MMA y DMA. Concentración de arsénico: 200 µg L<sup>-1</sup>.

A la vista de los resultados se puede decir que la velocidad del flujo de argón óptima para transportar los hidruros de arsénico formados a partir de todas las especies es de 10 mL min<sup>-1</sup>. Por tanto, éste es el valor escogido para realizar los restantes estudios.



(2) Influencia del caudal de la disolución portadora del sistema FIA.

Se llevó a cabo un estudio de la influencia del caudal del portador sobre la señal de absorbancia manteniendo constantes los caudales de los reactivos a  $1.6 \text{ mL min}^{-1}$  y variando el caudal del portador entre  $1$  y  $3 \text{ mL min}^{-1}$  (intervalo operativo en HPLC). La disolución portadora utilizada fue tampón fosfato  $17 \text{ mM}$  a  $\text{pH} = 6.0$ , debido a que será el eluyente utilizado en la separación de estas especies mediante cromatografía de cambio aniónico. Los resultados obtenidos se representan en la *Figura 7*.

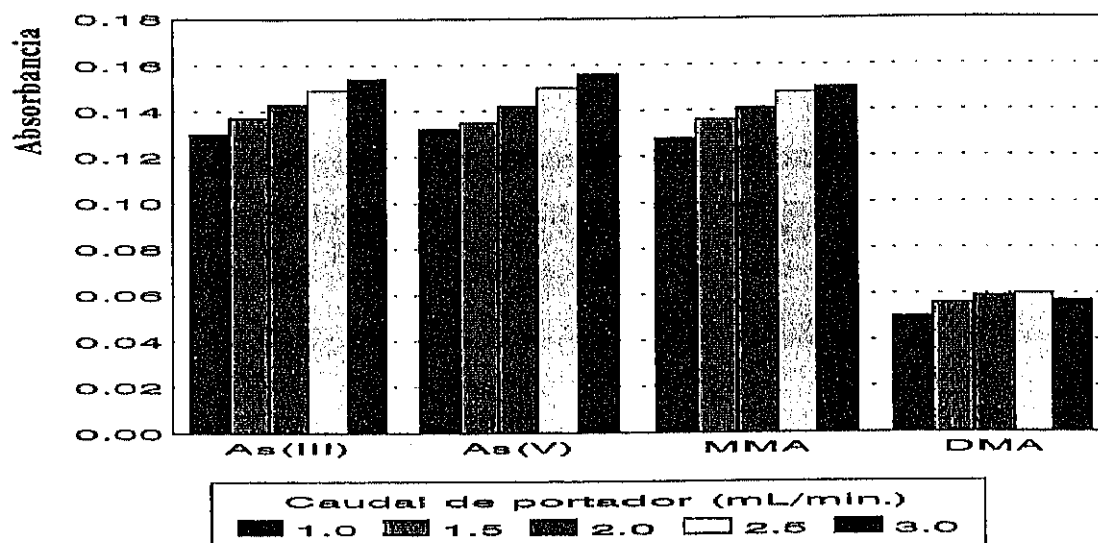


Figura 7.- Influencia del caudal de la disolución portador en la señal analítica de los hidruros de arsénico formados a partir de As(III), As(V), MMA y DMA. Concentración de arsénico:  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Como se puede observar en la *Figura 7*, la señal aumenta ligeramente al aumentar el caudal de portador, para todas las especies de arsénico. Se ha escogido un caudal de  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$  para llevar a cabo la determinación ya que velocidades de flujo más altas ocasionan un consumo de reactivo mayor sin obtenerse mejoras significativas en la sensibilidad.

### (3) Influencia del caudal de los reactivos.

Se llevo a cabo un estudio sobre la influencia del caudal de los reactivos que intervienen en la reacción de formación de los hidruros. Como ya se ha dicho anteriormente, estos reactivos son: el borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ), que es el agente reductor, y el ácido clorhídrico, que proporciona el hidrógeno necesario para formar el hidruro.

Para realizar este estudio se han mantenido constantes el resto de las variables experimentales en aquellos valores que se consideran como óptimos y se ha variado el caudal de uno de los reactivos entre  $0.2$  y  $1.9 \text{ mL min}^{-1}$ , mientras se mantiene la velocidad de flujo del otro reactivo en un valor constante de  $1.9 \text{ mL min}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se representan gráficamente en las *Figuras 8 y 9*.

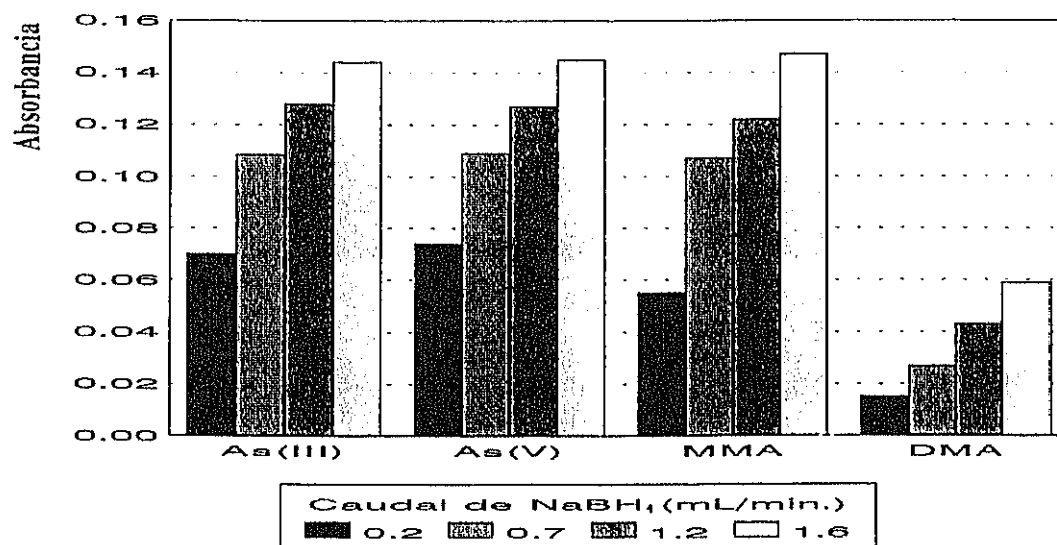


Figura 8.- Influencia del caudal del  $\text{NaBH}_4$  al 3% en la señal de absorbancia de los hidruros de arsénico obtenidos a partir de As(III), As(V), MMA y DMA. Concentración de arsénico:  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

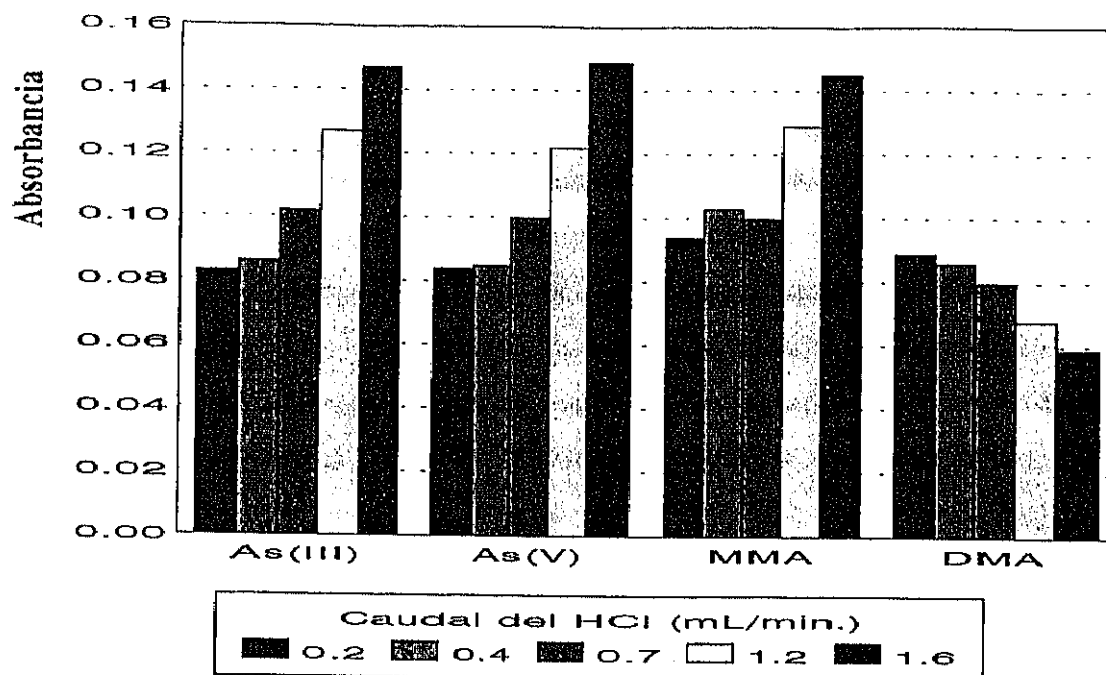


Figura 9.- Influencia del caudal del HCl 6 mol L<sup>-1</sup> en la señal de absorbancia de los hidruros de arsénico obtenidos a partir de As(III), As(V), MMA y DMA. Concentración de arsénico: 200 µg L<sup>-1</sup>.

En ambos casos se observa que la señal de absorbancia aumenta gradualmente, para la mayoría de las especies, a medida que se incrementa la velocidad de flujo del reactivo correspondiente, como era de esperar, ya que al disminuir el tiempo de residencia de la muestra en el sistema se produce una menor dilución de la misma en la corriente de portador, aumentando al mismo tiempo la eficiencia del proceso. En el caso del DMA, la eficiencia, sin embargo, disminuye ligeramente a medida que aumenta el caudal de HCl. Por tanto, con objeto de conseguir la mayor sensibilidad posible, considerando a todas las especies en su conjunto, se ha escogido como caudal óptimo, tanto de borohidruro sódico como de ácido clorhídrico, el mayor de los valores estudiados, es decir, 1.9 mL min<sup>-1</sup>.

**(4) Influencia de la longitud y la forma del bucle de reacción.**

Se estudiaron distintas longitudes del bucle de reacción sin que se observase ninguna influencia de este parámetro sobre la sensibilidad, ni sobre la forma de las señales de absorbancia proporcionadas por los hidruros correspondientes a cada especie de arsénico. En cuanto a la forma de dicho bucle, se estudiaron dos tipos: lineal y anudado, sin que se observase tampoco ninguna variación en la señal. En los restantes estudios se ha utilizado un bucle de reacción de tipo lineal de 20 cm de longitud.

**(5) Concentración del agente reductor ( $\text{NaBH}_4$ ).**

Para elegir la concentración óptima de borohidruro sódico necesaria para conseguir una mayor eficiencia en la generación de los hidruros de arsénico formados a partir de las distintas especies, se estudió la influencia de la concentración de dicho reactivo en el intervalo entre 1 - 9 % (m/v). El resto de los parámetros o variables experimentales, que influyen sobre la sensibilidad del método, se han mantenido en aquellos valores considerados como óptimos y que se han establecido previamente. Los resultados obtenidos se representa en la *Figura 10*.

Se observa que, para todas las especies de arsénico estudiadas, el valor de absorbancia obtenido es máximo cuando se utiliza una concentración de  $\text{NaBH}_4$  del 3% (m/v). Por consiguiente, esta es la concentración de agente reductor seleccionada para llevar a cabo la determinación de estos compuestos empleando este sistema de generación de hidruros en continuo.

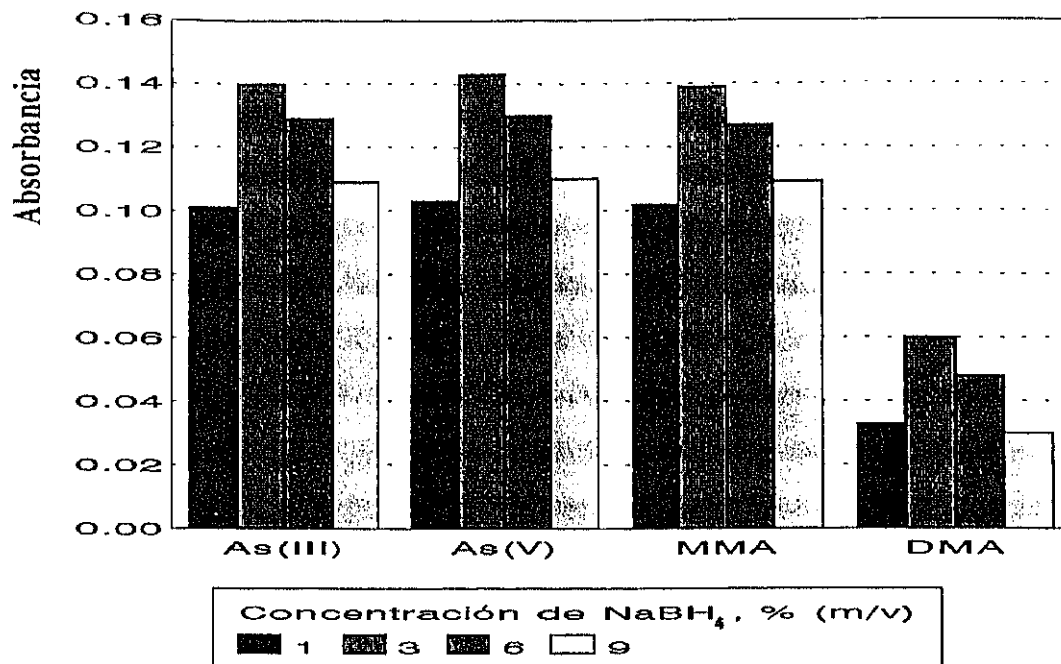


Figura 10.- Influencia de la variación de la concentración de  $\text{NaBH}_4$  en la señal de absorbancia de los hidruros de arsénico formados a partir de  $\text{As(III)}$ ,  $\text{As(V)}$ , MMA y DMA. Concentración de arsénico:  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

(6) *Influencia de la acidez del medio (concentración de HCl).*

Al igual que en el apartado anterior, se ha estudiado la influencia de la concentración de HCl sobre la eficiencia de la reacción de generación de hidruros en continuo. Para ello, se ha variado la concentración de ácido en el intervalo entre 1 - 6 mol  $\text{L}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se representa en la *Figura 11*.

Como puede apreciarse en la *Figura 11*, se obtienen señales de absorbancia prácticamente iguales para el  $\text{As(III)}$ ,  $\text{As(V)}$  y MMA, en todo el intervalo de concentraciones de HCl estudiado, obteniéndose un valor máximo y constante a partir de una concentración de ácido de 3 mol  $\text{L}^{-1}$ .

Por otro lado, en el caso del DMA, los valores de absorbancia obtenidos no siguen la misma tendencia, es decir, no sufren la misma variación al modificar la concentración de HCl que el resto de las especies estudiadas. Se observa cómo para este compuesto la señal disminuye a medida que aumenta la concentración de ácido, por lo que la mayor sensibilidad se consigue utilizando HCl 1 mol L<sup>-1</sup>. Ante esta situación, la concentración de HCl, a lo largo de nuestras experiencias posteriores, se ha variado entre 1 y 5 mol L<sup>-1</sup>, dependiendo de los objetivos y del resto de las condiciones experimentales; así, cuando se necesitó una sensibilidad alta para el DMA, se llegó a una situación de compromiso sacrificando la sensibilidad para el resto de las especies. Una concentración de HCl de 1 y 2 mol L<sup>-1</sup>, prácticamente iguala la eficiencia de generación para las cuatro especies.

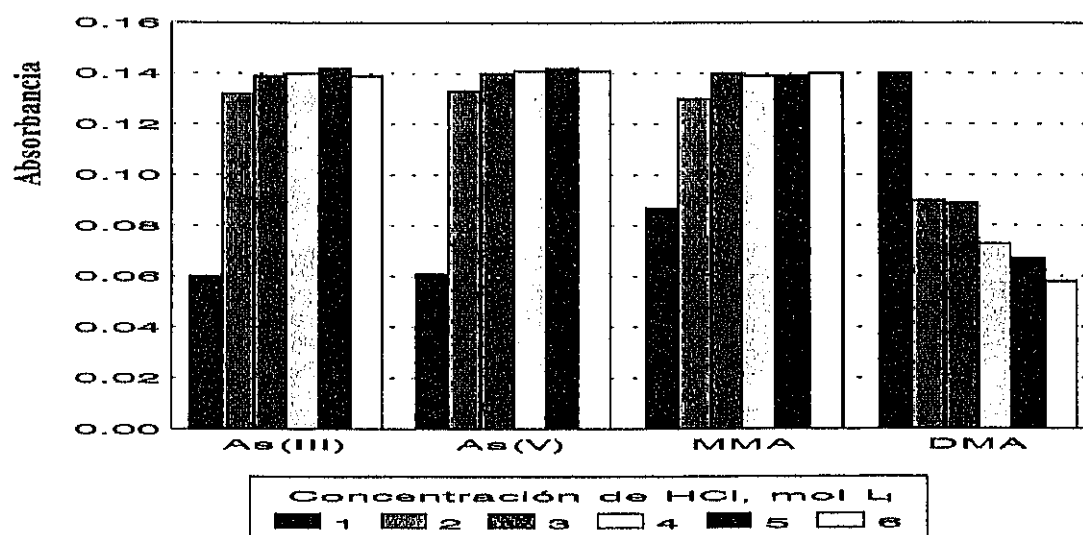


Figura 11.- Influencia de la concentración de HCl en la señal de absorbancia de los hidruros de arsénico formado a partir de As(III), As(V), MMA y DMA. Concentración de arsénico: 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### V.1.1.- Conclusiones de la derivatización a la forma de hidruros

En la tabla XIX se muestra un resumen de las mejores condiciones del estudio de los parámetros que afectan a la generación de hidruros de arsénico.

Tabla XIX.- Resumen de las condiciones experimentales óptimas para la derivatización del As(III), As(V), MMA y DMA a la forma de sus hidruros

---

---

Velocidad del flujo de Ar	10 mL min <sup>-1</sup>
Caudal de la disolución de portador (Tampón fosfato 17 mmol L <sup>-1</sup> a pH 6.0)	2.0 mL min <sup>-1</sup>
Caudal de NaBH <sub>4</sub>	1.9 mL min <sup>-1</sup>
Concentración de NaBH <sub>4</sub>	3 % (m/v)
Caudal de HCl	1.9 mL min <sup>-1</sup>
Concentración de HCl	entre 1 y 5 mol L <sup>-1</sup> (dependiendo del objetivo)
Longitud del bucle de reacción	20 cm

---

---

## V.2.- TRANSFORMACIÓN DE ESPECIES DE ARSÉNICO

Como ya se ha comentado en el apartado anterior, tanto los ácidos arsénico y arsenioso como el MMA y el DMA son capaces de formar los hidruros correspondientes por reacción con un reductor fuerte ( $\text{NaBH}_4$ ) en medio ácido. Sin embargo, la arsenobetaina (AsB) y arsenocolina (AsC), en estas mismas condiciones, no dan lugar a la formación de ningún hidruro (Rauret y col., 1991), siendo necesaria una transformación previa de estos compuestos, normalmente mediante una oxidación enérgica, a otras especies capaces de experimentar dicha reacción. Por otro lado, estos compuestos organoarsenicales (AsB, AsC, etc.) son bastante resistentes a la acción de los ácidos concentrados, agentes oxidantes y mezclas de ambos, tales como ácido nítrico, agua oxigenada, etc. (Stringer y Attrepm, 1979). En la bibliografía disponible al principio de este trabajo, algunos autores (Atallah y Kalman, 1991) empleaban la acción conjunta de un oxidante y de radiación ultravioleta, a una longitud de onda de 235 nm, para transformar las especies no formadoras de hidruros en especies derivatizables. Sin embargo, el empleo de lámparas ultravioleta para favorecer la oxidación de la materia orgánica presenta algunos inconvenientes, tales como que la muestra necesita estar sometida largos períodos de tiempo a la acción de la radiación ultravioleta y el hecho de que la eficacia de la oxidación es muy dependiente del estado físico de la lámpara. En este trabajo se ha pretendido desarrollar un sistema (o sistemas) de transformación de AsB y AsC a especies derivatizables, que obviara las dificultades de las lámparas ultravioleta. Debido a que es necesario un aporte exterior de energía para que tenga lugar la transformación de estos compuestos (AsB y AsC) a especies formadoras de hidruros, en este trabajo se han desarrollado un método de termo-oxidación y otro de oxidación asistida con microondas.

### V.2.1.- Transformación de las especies de arsénico mediante termo-oxidación

Este método consiste en la transformación de las especies orgánicas de arsénico a As(V) mediante reacción, a elevada temperatura, de dichos compuestos con persulfato potásico en medio alcalino.



Las primeras experiencias se realizaron en discontinuo con disoluciones acuosas de arsenobetaína y arsenocolina, en distintos medios oxidantes y temperaturas. Se observó que, trabajando a una temperatura en torno a los 100°C con disoluciones de  $K_2S_2O_8$  entre el 2 y el 3%, en medio básico, se producían eficiencias de generación del hidruro, a partir de estas especies, superiores al 70%. Ante las buenas perspectivas de la transformación de AsB y AsC a formas generadoras de hidruros, se procedió a optimizar los diferentes parámetros de oxidación en continuo para estas especies, así como para las especies metiladas del As (MMA y DMA), que en presencia del agente oxidante pueden descomponerse a As(V) generando el hidruro de la especie inorgánica y no de la especie metilada.

Por consiguiente, se diseñó un método en línea que se encuentra representado esquemáticamente en la *Figura 12*, donde el portador arrastra a la muestra, inyectada en el sistema a través de una válvula de seis vías, y se hace reaccionar con persulfato potásico, en medio básico, en un reactor que se encuentra introducido en un horno de polvo de grafito a una temperatura de 140 °C. Una vez completada la reacción, se enfría la mezcla haciéndola pasar por un baño de hielo antes de proceder a la formación de hidruros.

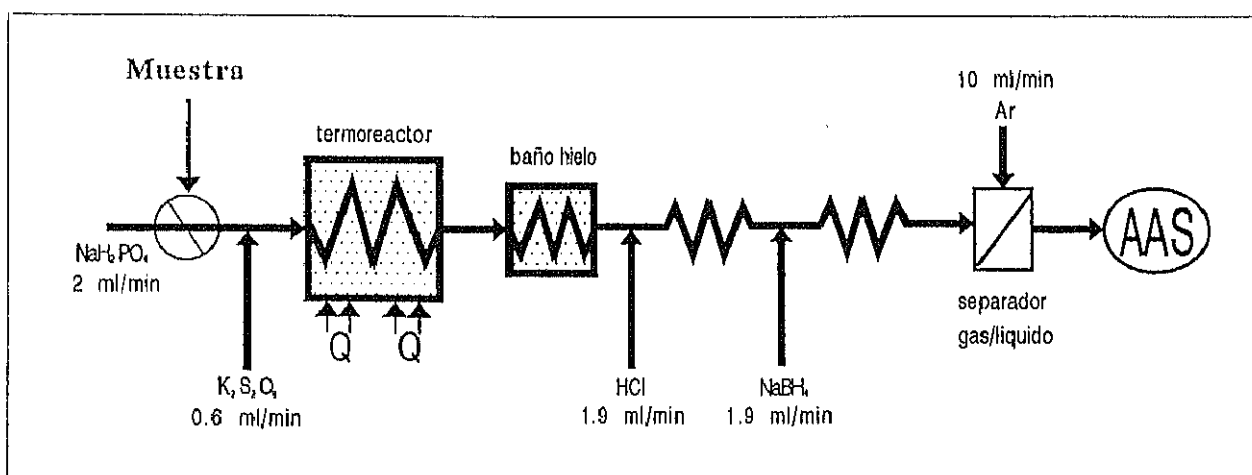


Figura 12.- Esquema FI - termo-oxidación - HG - AAS, empleado para la transformación y determinación de los compuestos organometálicos de arsénico

### V.2.1.1.- Optimización de los parámetros experimentales de la termo-oxidación

Los parámetros estudiados fueron: (1) temperatura del horno de grafito, (2) concentración del reactivo oxidante y (3) caudal del oxidante. La generación de hidruros se llevó a cabo en las condiciones óptimas establecidas en el *Apartado V.1.*

#### *(1) Influencia de la temperatura del horno de grafito sobre la eficacia de la termo-oxidación*

Se ha comprobado que la eficiencia de la transformación de AsB y AsC en una especie capaz de generar el hidruro de arsénico depende, en gran medida, de la temperatura. Esto es debido a que la reacción de estas especies con persulfato potásico en medio básico es endotérmica y, por lo tanto, necesita una cierta cantidad de energía para que ésta tenga lugar. Con el fin de establecer la temperatura óptima de trabajo, se estudió la eficiencia de conversión de AsB y AsC (concentración de arsénico  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  para cada especie) en especies generadoras de hidruros con persulfato potásico al 3% (m/v) en hidróxido sódico al 1.5% (m/v), para distintas temperaturas en el horno de grafito. En la *Tabla X* se muestra el tanto por ciento de transformación conseguido para ambas especies, siempre referido a la señal obtenida a partir de As(V), en las mismas condiciones.

De los datos reflejados en la *Tabla X* se puede deducir que a  $100^{\circ}\text{C}$  la conversión de la AsC a una especie formadora de hidruros es completa, mientras que la AsB sólo se ha transformado en un 74%. Para la transformación total de ambas especies es necesario utilizar una temperatura en el horno de grafito de  $140^{\circ}\text{C}$ . Por lo tanto, se ha utilizado este valor para realizar los estudios de optimización de los restantes parámetros experimentales.

Tabla X.- Eficiencia de la transformación de AsB y AsC en especies generadoras de hidruros con la temperatura empleando  $K_2S_2O_8$  3% (m/v) en NaOH al 1.5% (m/v). Concentración de arsénico  $200 \mu g L^{-1}$ .

Temperatura (°C)	% Transformación	
	AsC	AsB
95	90	30
100	101	74
140	100	102

(2) Influencia de la concentración de persulfato potásico en la eficacia de la termo-oxidación.

Se llevaron a cabo estudios variando la concentración de  $K_2S_2O_8$  entre el 1 y el 5% (m/v) en soluciones de NaOH en proporción 2:1. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 13.

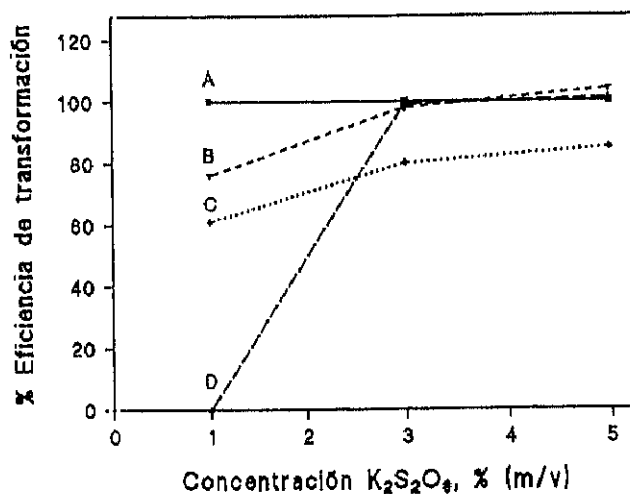


Figura 13.- Influencia de la concentración de  $K_2S_2O_8$  sobre la señal analítica de los hidruros de arsénico formados a partir de (A) As(III), As(V) y MMA; (B) AsC; (C) DMA; (D) AsB. Concentración de arsénico:  $200 \mu g L^{-1}$ .

Como se puede observar se obtuvieron conversiones próximas al 100%, para AsB y AsC, cuando la concentración de  $K_2S_2O_8$  era igual o superior al 3% (m/v). Aunque la señal obtenida a partir del DMA fué estable a partir del 3%, el valor obtenido es un 20% inferior que para el resto de especies. Se ha escogido como reactivo oxidante, para llevar a cabo las experiencias restantes, una mezcla de persulfato potásico al 3 % (m/v) en presencia de hidróxido sódico al 1.5 % (m/v).

### **(3) Influencia del caudal del persulfato potásico en medio alcalino sobre la eficiencia de la termo-oxidación.**

Para realizar este estudio se ha variado la velocidad de flujo del reactivo oxidante en el intervalo comprendido entre 0.2 - 1.6 mL min<sup>-1</sup>, para una concentración de  $K_2S_2O_8$  del 3% (m/v). La modificación de este parámetro afecta, de manera directa, al tiempo de residencia de la mezcla (muestra más reactivo oxidante) en el bucle de reacción, dado que se mantienen constantes la velocidad de flujo de la disolución portadora ( 2.0 mL min<sup>-1</sup>) y el volumen del reactor ( 4.5 m de longitud x 0.5 mm de diámetro interno). En consecuencia, en este estudio se evalúa la eficiencia de la termo-oxidación en función del tiempo de residencia de la mezcla de reacción en el horno de grafito, en el intervalo entre 16 y 24 s.

Los resultados obtenidos se representan en la *Figura 14*.

A la vista de estos resultados, se puede decir que un tiempo de residencia de 20 s es suficiente para lograr la transformación total de todos los compuestos estudiados. Sin embargo, y al igual que en el apartado anterior, la señal del DMA es entre un 15 - 20 % menor que la obtenida para el resto de las especies. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Atallah y col., 1991) empleando el método de fotooxidación descrito anteriormente (*Apartado V.2*).

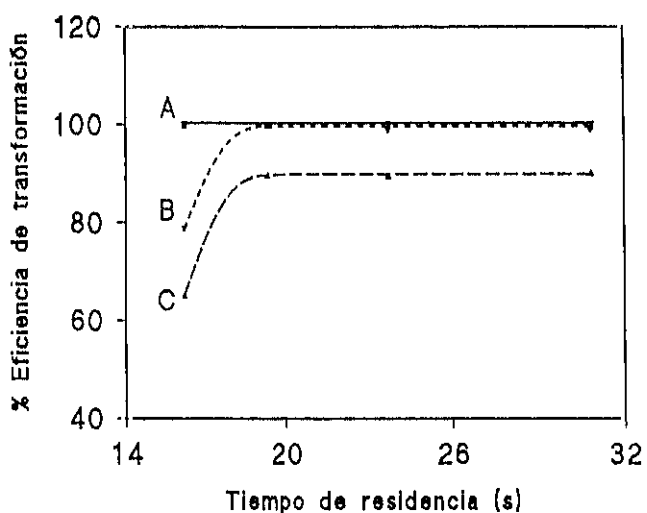


Figura 14.- Eficiencia de la transformación de las especies de arsénico en función del caudal del reactivo oxidante (tiempo de residencia en el termoreactor). (A) As(V), As(III) y MMA; (B) AsB y AsC; (C) DMA. Concentración de arsénico de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$

#### V.2.1.2.- Influencia de la termo-oxidación sobre la eficiencia de generación del hidruro.

Se ha observado que el proceso intermedio de termo-oxidación cambia la acidez del medio de generación de hidruros debido a la basicidad del reactivo oxidante, por lo que se ha procedido a optimizar nuevamente la influencia de este parámetro, empleando el sistema en línea FI - termo-oxidación - HG - AAS anteriormente desarrollado. Dicho estudio se llevó a cabo variando la concentración de ácido clorhídrico entre 1 - 6 mol  $\text{L}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla XI*.

Tabla XI.- Influencia de la concentración del HCl sobre la eficiencia de generación del hidruro con termo-oxidación a partir de As(V), As(III), MMA, DMA, AsB y AsC, empleando el sistema FI - Termo-oxidación - HG - AAS. Concentración de arsénico: 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Concentración de HCl (mol L <sup>-1</sup> )	Absorbancia					
	As(III)	As(V)	MMA	DMA	AsB	AsC
1	0.078	0.080	0.081	0.082	0.078	0.080
2	0.142	0.140	0.144	0.130	0.143	0.141
3	0.151	0.152	0.151	0.132	0.149	0.152
4	0.150	0.150	0.151	0.130	0.151	0.151
5	0.152	0.151	0.151	0.131	0.152	0.150
6	0.152	0.152	0.150	0.132	0.151	0.150

En la *Figura 15* se compara el efecto de esta variable con el observado en ausencia de termo-oxidación.

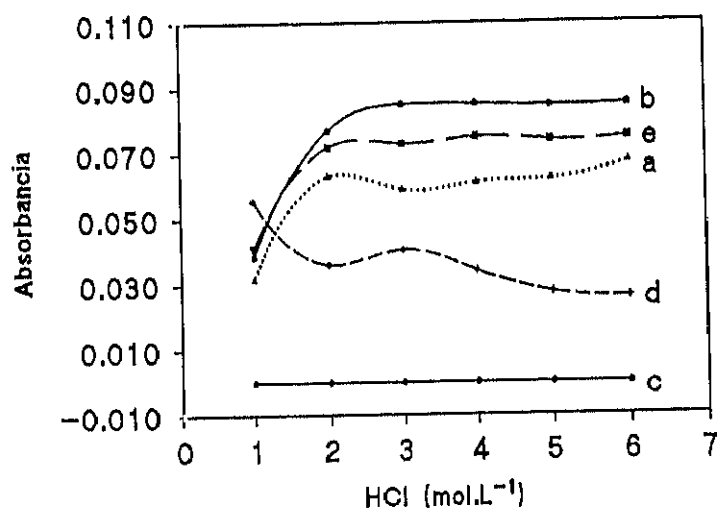


Figura 15.- Influencia de la concentración del HCl sobre la eficiencia de generación del hidruro sin termo-oxidación a partir de: (A) As(V), As(III), MMA; (D) DMA; (C) AsC y AsB; y con termo-oxidación a partir de: (B) As(V), As(III), MMA, AsB y AsC; (E) DMA. Concentración de arsénico: 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Por un lado, se puede apreciar que las señales de As(III), As(V) y MMA, sin termo-oxidación (curva 4a), son aproximadamente un 20 % menores que las obtenidas con termo-oxidación (curva 4b), lo que puede ser debido al ligero aumento de temperatura que experimenta la muestra con relación a la que tenía cuando se trabajaba en ausencia de termo-oxidación. Las experiencias realizadas sin utilizar un baño de hielo tras la etapa de termo-oxidación, dieron lugar a resultados poco reproducibles, debido a que la inevitable condensación de agua en el separador gas-líquido perjudica al transporte de los hidruros hacia la célula de cuarzo. Sin embargo, aunque la mezcla pase a través de un baño de hielo antes de reaccionar con el  $\text{NaBH}_4$ , la caída de temperatura es suficiente como para evitar este fenómeno, así como la descomposición del borohidruro, pero no lo suficientemente baja como para completar el enfriamiento. Por lo tanto, el incremento de la señal puede ser atribuido a que este ligero aumento de temperatura favorece la reacción de generación de hidruros.

Por otro lado, arsenobetaína y arsenocolina, que no proporcionaban señal en ausencia de termo-oxidación (curva 4c), dan lugar a señales prácticamente iguales a las de As(III), As(V) y MMA para cualquier concentración de HCl, cuando se introduce la etapa intermedia de termo-oxidación (curva 4b), lo que indica la total transformación de estos compuestos a especies formadoras de hidruros.

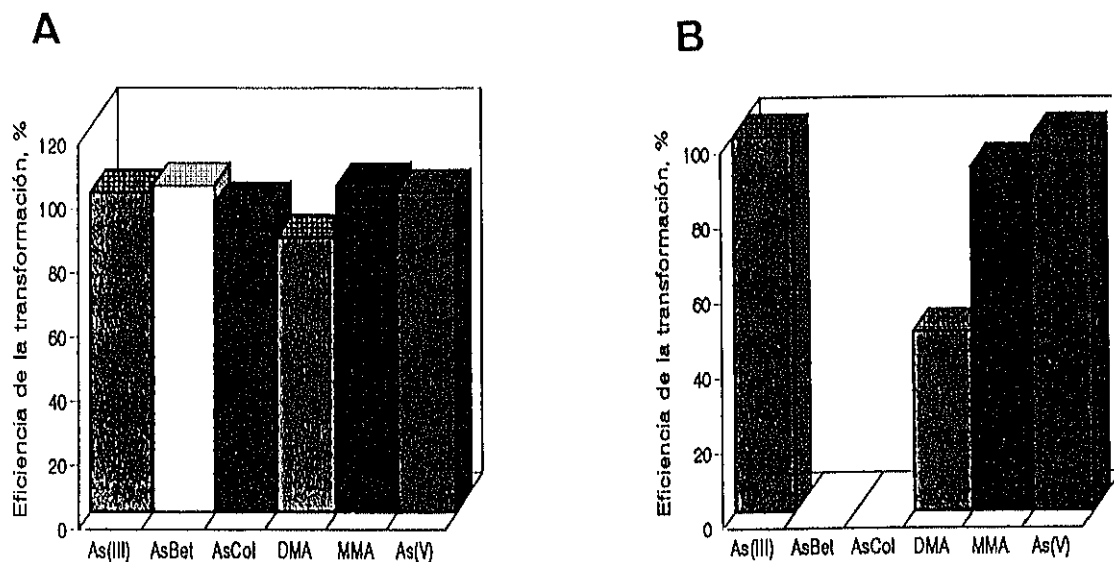
Por último, cabe destacar el cambio de comportamiento del DMA. En ausencia de termo-oxidación se observaba una disminución de la señal de absorbancia proporcionada por esta especie, a medida que aumentaba la concentración de HCl (curva 4d). Sin embargo, con termo-oxidación se aprecia una tendencia similar a la obtenida para las demás especies, si bien su señal es aproximadamente un 15 - 20 % menor. Esto sugiere que puede haber ocurrido una transformación, al menos parcial, de DMA en alguna otra especie cuya eficiencia de generación del hidruro es mayor.

A partir de todos estos resultados se ha optado por elegir, como concentración óptima de HCl para llevar a cabo la reacción de generación de hidruros, un valor de  $4 \text{ mol L}^{-1}$ , ya que ahora no se produce la pérdida de sensibilidad observada para el DMA

cuando se trabajaba en ausencia de termo-oxidación al aumentar la concentración de HCl (ver *Figura 7*).

Una vez optimizados todos los parámetros experimentales, se ha aplicado el método a las seis especies de arsénico estudiadas y se han comparado los resultados con los obtenidos utilizando H<sub>2</sub>O en lugar del reactivo oxidante. Los resultados se representan en la *Figura 16*.

Como se puede observar en la *Figura 16*, cuando no se utiliza el agente oxidante, las especies orgánicas AsB y AsC no son capaces de formar los hidruros y, por otro lado, la eficiencia de generación del hidruro para el DMA es mucho menor. Por lo tanto, se puede concluir que, el empleo de un reactivo oxidante como etapa previa, da lugar a un aumento del rendimiento de la reacción de generación de hidruros para todas y cada una de las especies analizadas.



**Figura 16.-** Eficiencia en la generación de hidruros para As(III), As(V), MMA, DMA, AsB y AsC, (A) con termo-oxidación y (B) sin termo-oxidación. Concentración de As: 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ .



### **V.2.2.- Transformación de especies de arsénico mediante oxidación asistida por microondas**

Aunque el método de la termo-oxidación, desarrollado en el apartado anterior, ofrece grandes ventajas con respecto a otros métodos ya establecidos, tales como la gran eficacia en la destrucción de la materia orgánica con bucles de reacción pequeños, debido a la elevada temperatura en que se puede trabajar, no está exento de algunos inconvenientes de tipo práctico. Estos inconvenientes son, fundamentalmente, la manipulación del polvo de grafito y la aparición de puntos preferenciales de alta temperatura, que si bien pueden favorecer el proceso de la termo-oxidación, también pueden producir que el reactor se funda dentro del horno. Teniendo en cuenta el gran potencial analítico que ha mostrado la radiación de microondas para el tratamiento de muestras, se pensó en la posibilidad de sustituir el horno de termo-oxidación por un horno de microondas acoplado al sistema. En este apartado se contemplan los estudios realizados con este nuevo diseño análogo al representado en la *Figura 12*. La

### V.2.2.1.- Optimización de los parámetros experimentales que afectan a la oxidación asistida por microondas

Para realizar este estudio se ha utilizado el sistema descrito anteriormente y los parámetros estudiados han sido: (1) potencia de la radiación de microondas, (2) concentración del reactivo oxidante y (3) tiempo de residencia de las muestras dentro del horno.

En todos los casos se ha empleado un microondas de uso doméstico (Balay, modelo Bahm-III), con un máximo de potencia de 700 W (con ciclos de encendido/apagado variables en 9 posiciones) y una frecuencia de 2450 MHz. Como reactor se empleó un tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) introducido en el interior del microondas a través de las ranuras de ventilación. La salida del reactor, una vez fuera del horno, se acopla a un baño de hielo y posteriormente, al sistema de generación de hidruros.

#### *(1) Influencia de la potencia de la radiación de microondas sobre la eficacia de la oxidación.*

El estudio de este parámetro se llevó a cabo manteniendo constantes el resto de condiciones experimentales en los valores considerados como óptimos, tanto para la termo-oxidación como para la generación de hidruros (apartados V.2.1 y V.1), y variando la potencia del microondas entre las posiciones 6 y 9. En la *Figura 18* se muestra el tanto por ciento de transformación conseguido a partir de AsB y AsC, siempre referido a la señal obtenida para el As(V), a cada potencia.

Como se puede observar, sólo se obtuvieron transformaciones próximas al 100%, para las dos especies, cuando se trabajó a la máxima potencia, es decir, a 700 W (posición 9). Por lo tanto, se ha utilizado este valor para realizar los estudios de optimización de los restantes parámetros experimentales.

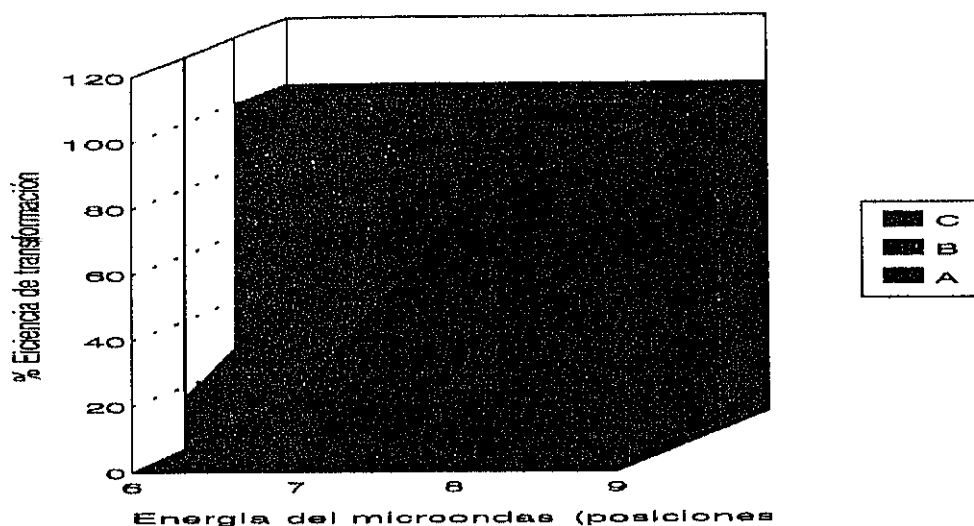


Figura 18.- Eficiencia de la transformación de: (A) AsB, (B) AsC y (C) As(V) en función de la potencia del microondas, empleando como reactivo oxidante persulfato potásico al 3% (m/v) en hidróxido sódico al 1.5% (m/v). Concentración de arsénico:  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

*(2) Influencia de la concentración del reactivo oxidante en la eficiencia de la oxidación asistida por microondas (MO) para todas las especies del As.*

Se llevaron a cabo estudios variando la concentración de persulfato potásico entre el 1 y el 5% (m/v), en presencia de hidróxido sódico en proporción 2:1 ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8:\text{NaOH}$ ), manteniendo constantes el resto de las condiciones experimentales. Los resultados obtenidos se representan en la *Figura 19*.

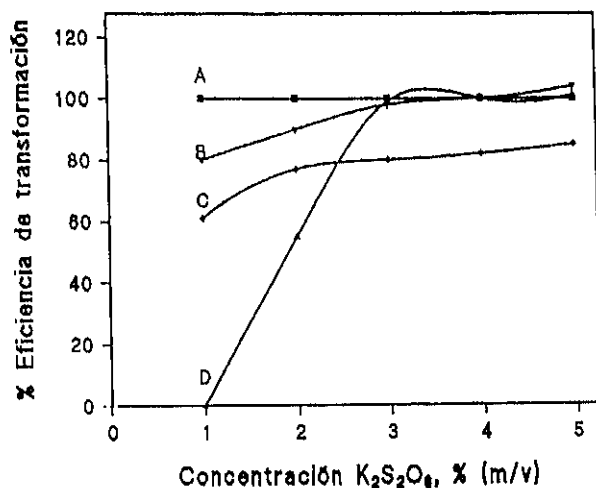


Figura 19.- Influencia de la concentración de persulfato potásico sobre la eficiencia de transformación de los hidruros de arsénico formados a partir de: (A) As(III), As(V) ó MMA; (B) AsC; (C) DMA y (D) AsB. Concentración de arsénico: 200  $\mu\text{g L}^{-1}$

Estos datos muestran que este parámetro afecta a la eficacia de la conversión de la misma manera que cuando se utiliza el procedimiento de termo-oxidación (*Apartado V.2.1.1 (2)*). Por consiguiente, se podría deducir que, en ambos sistemas, una concentración de persulfato potásico del 3% en hidróxido sódico al 1.5% es óptima para llevar a cabo la determinación de estas seis especies de arsénico. Sin embargo, con objeto de identificar los productos de descomposición de las especies de arsénico, una vez efectuada la transformación, se recogió el efluente a la salida del reactor del microondas y se inyectó en un sistema HPLC-MO-HG-AAS para su separación y determinación.

Este estudio se realizó utilizando tres concentraciones distintas de agente oxidante (1%, 3% y 5%), e identificando los productos de descomposición de las seis especies de arsénico objeto de nuestro trabajo. Los resultados se muestran en la *Tabla XII* y se representan en la *Figura 20*.

Tabla XII.- Porcentaje de compuestos de arsénico que forman la mezcla de reacción tras la etapa de transformación asistida por microondas, partiendo de As(III), As(V), MMA, DMA, AsB ó AsC, en función de la concentración de agente oxidante. Concentración de arsénico: 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Especies Inyectadas	Concentración de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	Especies obtenidas				
		As(III)	AsB	DMA	MMA	As(V)
AsC	1%	85	-	14	1	-
	3%	-	-	-	2	98
	5%	2	-	-	-	98
As(III)	1%	-	-	-	-	100
	3%	-	-	-	-	100
	5%	-	-	-	-	100
AsB	1%	-	100	-	-	-
	3%	3	-	5	29	63
	5%	5	-	-	-	95
DMA	1%	-	-	95	5	-
	3%	3	-	5	33	59
	5%	9	-	-	-	91
MMA	1%	-	-	-	100	-
	3%	-	-	-	29	71
	5%	3	-	-	-	97
As(V)	1%	-	-	-	-	100
	3%	-	-	-	-	100
	5%	-	-	-	-	100

Nota: No se encontró AsC a partir de ninguna especie.

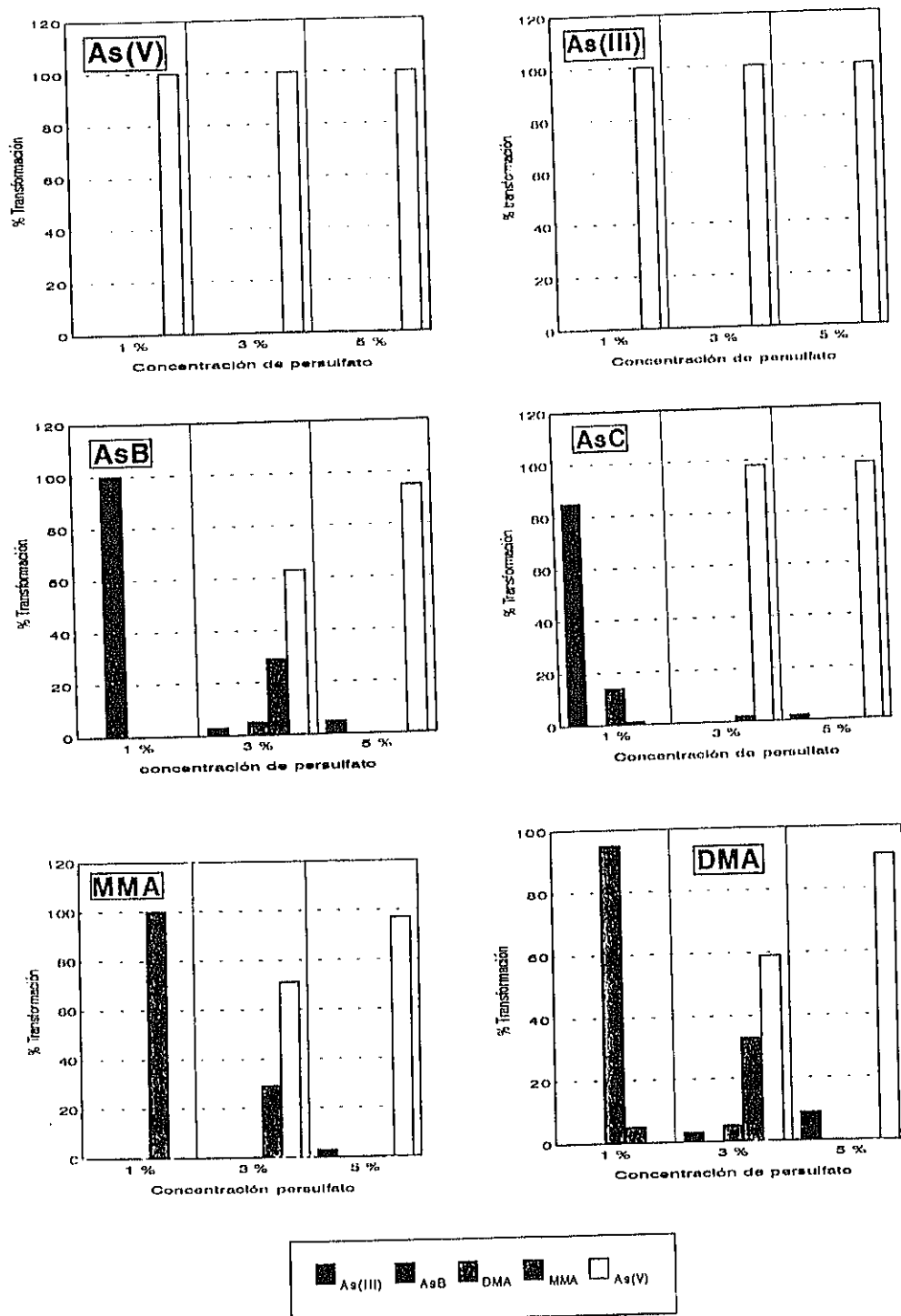


Figura 20.- Porcentaje de compuestos de arsénico que forman la mezcla de reacción tras la etapa de transformación asistida por microondas de las especies inyectadas, en función de la concentración de agente oxidante. Concentración de As:  $200 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Como se puede observar, empleando persulfato potásico al 1%, todas las especies orgánicas permanecen en su forma original, a excepción de la arsenocolina, que se transforma en su mayor parte en arsenito y parcialmente en DMA. Estos resultados explican el hábito de las curvas de la *Figura 19*, en la que se puede apreciar que, a esta concentración de persulfato, la arsenobetaína no da lugar a la formación del hidruro (curva 19D) y la eficacia en la conversión de arsenocolina es menor del 100% (curva 19B).

Por otro lado, cuando la concentración de  $K_2S_2O_8$  es del 3 %, todas las especies dan lugar a especies capaces de formar el hidruro pero, aunque la arsenocolina ya se ha transformado cuantitativamente a arseniato, la arsenobetaína ha pasado en un 65 % a arseniato y en un 30% a MMA.

Por lo tanto, es preciso utilizar una concentración de persulfato potásico al 5 % para lograr la oxidación total de todas las especies orgánicas estudiadas a As(V). En consecuencia, esta es la concentración de reactivo oxidante escogida para llevar a cabo los restantes experimentos.

### ***(3) Influencia del caudal del agente oxidante sobre la eficiencia de la oxidación asistida por microondas.***

Para realizar este estudio se ha variado la velocidad de flujo del reactivo oxidante en el intervalo comprendido entre 0.2 - 1.6 mL min<sup>-1</sup>. Al igual que ocurría en el método de termo-oxidación, la modificación de este parámetro afecta, de manera directa, al tiempo de residencia de la mezcla (muestra más reactivo oxidante) en el bucle de reacción, dado que se mantienen constantes la velocidad de flujo de la disolución portadora y el volumen del reactor. En consecuencia, en este estudio se evalúa la eficiencia de la oxidación asistida por microondas en función del tiempo de residencia de la mezcla de reacción en el horno.

Los resultados obtenidos se representan en la *Figura 21*.

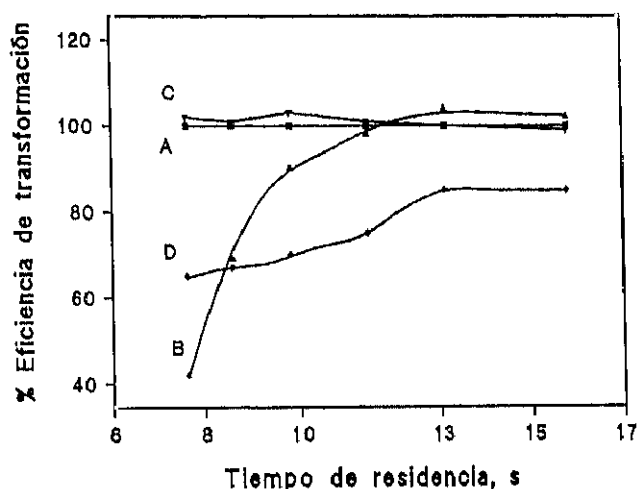


Figura 21.- Eficiencia de la transformación de las especies de arsénico en función del caudal del reactivo oxidante (tiempo de residencia en el termoreactor). (A) As(V), As(III) y MMA; (B) AsB; (C) AsC y (D) DMA. Concentración de arsénico de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$

Como se puede observar, utilizando la radiación de microondas, es posible transformar totalmente los compuestos en un tiempo máximo de 13 s, en lugar de los 20 s que eran necesarios cuando se empleaba el método de termo-oxidación. Por consiguiente, para el mismo caudal de reactivo oxidante que en dicho procedimiento, es decir,  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ , es posible acortar el bucle de reacción del interior del microondas, siendo necesario una longitud final del mismo de 3.0 m, en lugar de los 4.5 m originales.



### V.3.- SEPARACIÓN DE LAS SEIS ESPECIES DE ARSÉNICO MEDIANTE HPLC

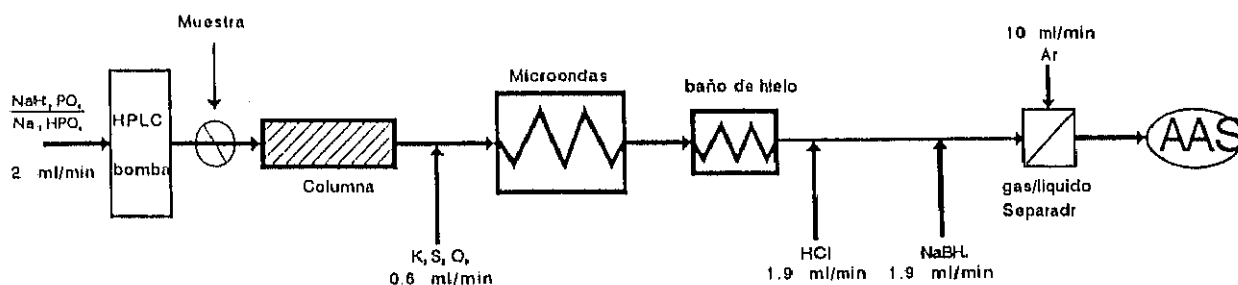
Si se trata de evaluar cuales son las columnas de HPLC más apropiadas para separar las especies de arsénico aniónicas y catiónicas en estudio en un solo cromatograma, se llega a la conclusión de que los métodos más utilizados son, por un lado, la cromatografía de cambio aniónico y por otro, la cromatografía de pares iónicos. En el primer caso, la retención de las especies aniónicas en la columna depende de su carga efectiva al pH de trabajo utilizado y las especies orgánicas catiónicas de arsénico, pueden retenerse ligeramente en una columna aniónica mediante fuerzas de Van der Waals, o por interacción con el contraión en la resina, pero, si no existe interacción se eluyen en el volumen muerto.

Por otro lado, si se trabaja con cromatografía de pares iónicos, se utiliza una fase estacionaria neutra apolar en combinación con una fase móvil que contiene un reactivo formador de pares iónicos. Como contraión de las especies aniónicas de arsénico suelen utilizarse compuestos de amonio cuaternario (Morin y col., 1992; Beauchemin y col., 1989). Recientemente, se ha propuesto un nuevo método basado en el empleo de reactivos capaces de formar vesículas, tales como el bromuro de di-dodecil-di-metil-amonio (DDAB) (Liu y col., 1993).

En este trabajo se ha realizado un estudio sistemático de diferentes métodos cromatográficos: (1) cromatografía de intercambio aniónico y (2) cromatografía de fase reversa modificada, con el fin de establecer las mejores condiciones para efectuar la separación de las seis especies de arsénico objeto de estudio. La detección se ha llevado a cabo acoplando, en línea, la salida de la columna cromatográfica al sistema MO-HG-AAS, ya optimizado.

### V.3.1.- Acoplamiento HPLC - MO - HG - AAS

En la *Figura 22* se representa esquemáticamente el acoplamiento HPLC - MO - HG - AAS utilizado para la separación y detección de todas las especies de arsénico estudiadas.



**Figura 22.-** Representación esquemática del sistema HPLC - MO - HG - AAS empleado para la separación y determinación de las especies de arsénico.

Como se puede observar en dicho esquema, el sistema está compuesto por tres módulos diferentes que se describen a continuación.

**Módulo cromatográfico:** la muestra se inyecta en la correspondiente columna cromatográfica a través de una válvula de inyección de seis vías (Reodyne), empleando un bucle de 100  $\mu\text{L}$ . La separación de las especies se consigue en función de su interacción con la fase estacionaria, utilizando una fase móvil apropiada. Una vez fuera de la columna, las distintas especies pasan al módulo de oxidación.

**Módulo de oxidación asistida por microondas:** mediante una bomba peristáltica (Gilson) se añade al eluato, que procede de la columna cromatográfica, el reactivo oxidante, persulfato potásico al 5% (en medio básico), empleando un caudal de 0.6  $\text{mL min}^{-1}$ . La mezcla pasa al reactor que está situado en el interior del horno microondas. Como ya se ha comentado anteriormente, el reactor es de PTFE (3.0 m x 0.5 mm i.d.),

y la entrada y salida del mismo del microondas se efectúa a través de los orificios de ventilación. Durante el ciclo de medida se introdujo un recipiente con agua en el horno para prevenir posibles sobrecalentamientos del mismo.

Después de la etapa de oxidación asistida por microondas se hace pasar la muestra a través de un baño de hielo antes de entrar en el módulo de detección.

*Módulo de detección:* donde se generan los hidruros gaseosos de los distintos compuestos de arsénico utilizando las condiciones óptimas establecidas en el *apartado V.1*, y se detectan mediante AAS a una longitud de onda de 193.7 nm.

### **V.3.2.- Cromatografía líquida en fase reversa modificada**

El estudio de las prestaciones de la cromatografía líquida en fase reversa modificada se ha llevado a cabo mediante separación isocrática en una columna de sílice de base octadecil ( $C_{18}$ ) (Spherisorb 5 ODS1, 5  $\mu\text{m}$ , 150 x 4.6 mm), usando un reactivo formador de pares iónicos como fase móvil, con el fin de que las especies iónicas de arsénico estudiadas formen pares iónicos con dicho reactivo y así, puedan ser retenidas por la fase de sílice octadecil enlazado.

La concentración del reactivo formador de pares iónicos, que en este caso es fosfato de tetrabutilamonio (TBAP), y la naturaleza y composición de la fase móvil (pH, fuerza iónica y polaridad) determinarán la eficacia de la separación cromatográfica. Por tanto, estos han sido los parámetros optimizados para obtener una mejor separación de las seis especies de arsénico.

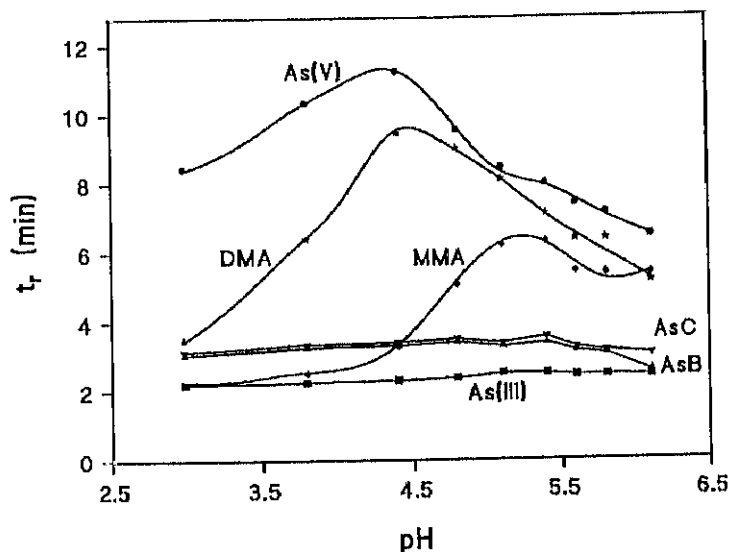
Estudios preliminares de la influencia del caudal de fase móvil, en el intervalo de 0.5 - 2.0 mL min<sup>-1</sup>, sobre la resolución de los cromatogramas de estas seis especies, mostraron como óptimo un caudal de 1.0 mL min<sup>-1</sup>, habiéndose utilizado este valor para realizar los restantes estudios. Esta reducción a la mitad del caudal del eluyente cromatográfico nos permite disminuir, en igual medida, la longitud del reactor del

microondas, por lo que se empleó un reactor de 1.5 m en lugar de los 3 m utilizados hasta ahora.

La influencia de la polaridad de la fase móvil sobre la separación de las especies se estudió adicionando pequeñas cantidades de metanol a la disolución que actúa como portador. Se observó una disminución en la resolución de los cromatogramas a medida que iba aumentando el porcentaje de metanol, debido a que disminuyen los tiempos de retención de cada analito. Por consiguiente, la fase móvil seleccionada para llevar a cabo la separación de estas especies consiste en una disolución acuosa de fosfato de tetrabutilamonio, en ausencia de metanol.

### V.3.2.1.- Estudio de la influencia del pH de la fase móvil

Dado que la columna empleada es de base de sílice, se puede trabajar en un intervalo de pH de 2.0 a 8.0 sin peligro de deterioro de la misma. Así pues, el pH de la fase móvil, fosfato de tetrabutilamonio (TBAP) 2.5 mM en tampón fosfato, se ha variado entre 3.0 y 6.5. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 23*.



**Figura 23.-** Influencia del pH de la fase móvil TBAP 2.5 mmol L<sup>-1</sup> en cromatografía líquida en fase reversa modificada para la separación de As(III), As(V), MMA, DMA, AsB y AsC, para una concentración de 500 µg L<sup>-1</sup> de arsénico en cada especie, empleando el sistema HPLC-MO-HG-AAS. Caudal: 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

Como se puede observar, los tiempos de retención de las diversas especies dependen, en gran medida, del pH de la disolución portadora. En el intervalo de pH de 4.5 a 5.5, las especies tóxicas, As(V), MMA, DMA y As(III), pueden separarse de las especies altamente metiladas y no tóxicas, AsB y AsC, si bien estas dos últimas eluyen juntas. Sin embargo, el ácido arsenioso ( $pK_a = 9.2$ ) no se ioniza en todo el intervalo de pH estudiado, por lo que no queda en absoluto retenido y se eluye en el volumen muerto.

La ligera retención de AsB y AsC, que presentan un comportamiento catiónico en todo el intervalo de pH, puede deberse a interacciones con el soporte no polar de las cadenas de  $C_{18}$ , eluyéndose inmediatamente después del As(III), pero con una resolución suficiente como para permitir, por un lado, la cuantificación de las especies tóxicas individualmente, y por otro, de las especies no tóxicas conjuntamente.

El ácido arsénico ( $pK_a = 2.3, 6.9$  y  $11.4$ ) se encuentra en forma aniónica en todo el intervalo de pH estudiado, por lo que presenta la mayor interacción electrostática con el  $TBA^+$  y, por tanto, los mayores tiempos de retención.

El orden de elución de las dos especies metiladas de arsénico, DMA ( $pK_a = 1.28$  y  $6.2$ ) y MMA ( $pK_a = 2.6$  y  $8.2$ ), se explica a través de la carga efectiva y su interacción con el contraión.

Con objeto de diferenciar las especies tóxicas y no tóxicas, se ha escogido como pH de trabajo óptimo un valor de 5.2. En estas condiciones se obtiene la mejor separación posible, observándose cinco señales que corresponden, en este orden, a As(III), AsB + AsC, DMA, MMA y As(V), no siendo posible mejorar esta separación a ningún otro valor de pH.

### V.3.2.2.- Estudio de la influencia de la concentración del reactivo formador de pares iónicos

El estudio de la influencia de la concentración del reactivo formador de pares iónicos en la separación de las especies de arsénico se realizó variando la concentración de fosfato de tetrabutilamonio (TBAP) en el intervalo de 1.5 a 15 mmol L<sup>-1</sup>, en medio acuoso, a pH 5.2. Los resultados experimentales de los tiempos de retención, en función de la concentración de TBAP, se representan en la *Figura 24*.

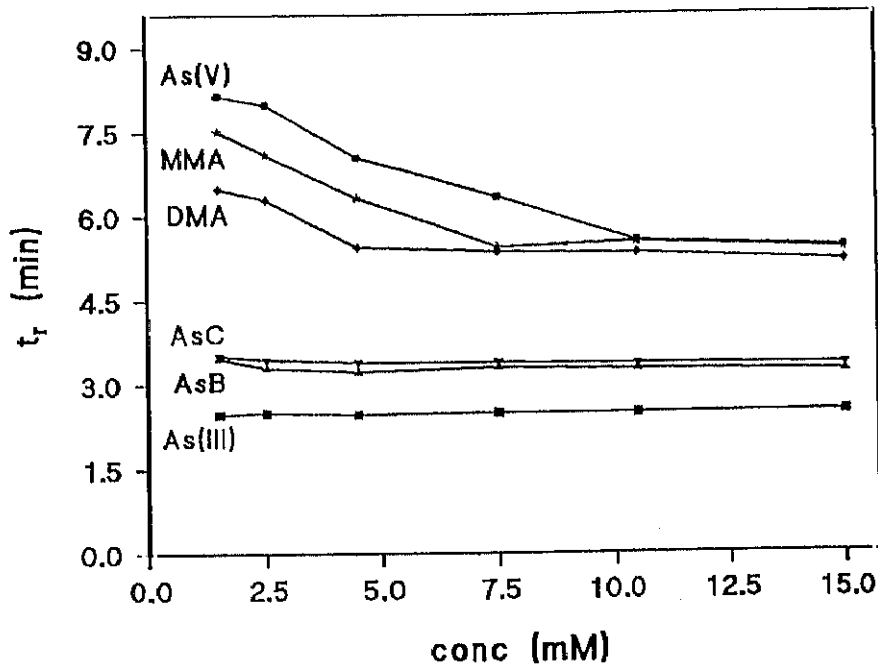


Figura 24.- Influencia de la concentración de TBAP, a pH 5.2, en cromatografía líquida en fase reversa modificada, sobre la separación de los seis compuestos de arsénico, empleando el sistema HPLC-MO-HG-AAS. Concentración de arsénico: 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  en cada especie. Caudal: 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

Se observa que, a medida que aumenta la concentración del reactivo, disminuyen los tiempos de retención de arseniato, MMA y DMA, de forma que, para concentraciones de TBAP de 7.5 mmol L<sup>-1</sup> o superiores, empiezan a solapar algunas de

sus señales. Sin embargo, para As(III), que se eluye en el volumen muerto, y para AsC y AsB, especies que interaccionan débilmente con la fase estacionaria, el tiempo de retención no se modifica en todo el intervalo de concentraciones estudiado.

A la vista de estos resultados, se ha escogido como concentración óptima de reactivo formador de pares iónicos para llevar a cabo la separación, un valor de  $2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ .

### V.3.2.3.- Conclusiones de la cromatografía líquida en fase reversa modificada.

En la *Figura 25* se muestra el cromatograma obtenido con una mezcla de las seis especies de arsénico estudiadas.

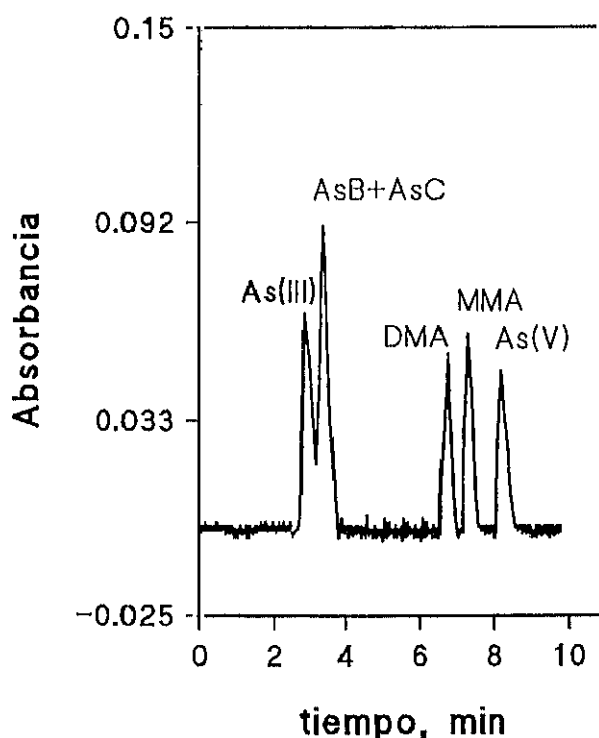


Figura 25.- Cromatograma de una mezcla de seis compuestos de arsénico ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie) empleando cromatografía en fase reversa modificada-MO-HG-AAS. Fase móvil: TBAP  $2.5 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 5.2. Caudal de fase móvil:  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ .

En dicho cromatograma se observan cinco picos en un tiempo máximo de análisis de, aproximadamente, 8 minutos. Estos picos corresponden, como se indica en la figura, a As(III), AsB + AsC, DMA, MMA y As(V), aunque se puede apreciar que el pico correspondiente a As(III) no llega a recuperar la línea base antes de que aparezca la señal correspondiente a la mezcla de las especies no tóxicas.

El solapamiento de las señales de AsB y AsC no permite la cuantificación de los seis compuestos individualmente, pero es posible determinar, por un lado, las especies no tóxicas conjuntamente, y por otro, cada uno de los compuestos tóxicos por separado. Esta distinción es importante cuando se trata de realizar la determinación de las especies de arsénico en muestras biológicas.

Uno de los principales inconvenientes que presenta la cromatografía líquida en fase reversa modificada es que el agente formador de pares iónicos afecta, permanentemente, a la selectividad de la columna, lo que a menudo dificulta la reproducibilidad.

#### **V.3.2.4.- Características analíticas**

En las condiciones citadas anteriormente, se han obtenido calibrados lineales, para las seis especies, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 400-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico. Cada punto del calibrado se ha medido por triplicado y la señal analítica considerada ha sido la altura de pico. Los valores de la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de los calibrados obtenidos para cada especie se recogen en la *Tabla XIII*.



Tabla XIII.- Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las seis especies de arsénico estudiadas, en el intervalo de concentración 400-1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico para cada especie, empleando cromatografía líquida de fase reversa modificada-MO-HG-AAS. Fase móvil: TBAP 2.5 mmol  $\text{L}^{-1}$  a pH 5,2. Caudal: 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ .

Especie	Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ ( $\times 10^5$ )	Ordenada en el origen, u.A.	Coefficiente de correlación
As(III)	6.9 $\pm$ 0.1	0.037 $\pm$ 0.002	0.9995
AsB + AsC	6 $\pm$ 1	0.046 $\pm$ 0.015	0.994
DMA	4.9 $\pm$ 0.6	0.024 $\pm$ 0.004	0.9992
MMA	4.7 $\pm$ 0.3	0.031 $\pm$ 0.002	0.9998
As(V)	4.2 $\pm$ 0.4	0.023 $\pm$ 0.003	0.9996

Los valores de la desviación estándar relativa (R.S.D.) se han calculado para las seis especies, a partir de las medidas correspondientes a 10 disoluciones mezcla con un contenido de arsénico de 600  $\mu\text{g L}^{-1}$  en cada especie, empleando la expresión:

$$\text{R.S.D.} = (\text{S} / \text{C}_m) \times 100$$

donde  $\text{C}_m$  es la concentración media de arsénico, calculada a partir de las diez medidas, y S es la desviación estándar de dichas medidas, expresada en unidades de concentración.

Como criterio para establecer los límites de detección (L.D.) de las especies de arsénico se ha utilizado el sugerido por la IUPAC, empleando la expresión:

$$\text{L.D.} = 3 (\text{Sb} / \text{m})$$

donde Sb es el valor de la desviación estándar del blanco (en unidades de absorbancia) y m es la pendiente del calibrado.

Los resultados obtenidos para cada especie se encuentran recogidos en la *Tabla XIV*.

Tabla XIV.- Características analíticas de la cromatografía líquida de fase reversa modificada-MO-HG-AAS para la determinación de las seis especies de arsénico.

Especie	$t_r$ (min.)	R.S.D.(%)	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
As(III)	2.83	10	97
AsB+ AsC	3.70	5	100
DMA	6.50	7	122
MMA	7.17	7	128
As(V)	8.00	12	143

Los altos valores de los límites de detección y de las desviaciones estándar relativas obtenidos para todas las especies se atribuyen al eluyente utilizado, ya que debido a su carácter de tensoactivo, interacciona con el borohidruro sódico, dando lugar a la formación de espumas en la etapa de generación de hidruros, lo que provoca una disminución de las señales y de la reproducibilidad. La adición de un antiespumante (silicona) mejoró la reproducibilidad, pero las señales siguieron siendo bajas, ya que este agente también causa un impedimento en la reacción de formación del hidruro correspondiente. Las aplicaciones analíticas con este tipo de cromatografía, vienen dadas en el capítulo VI.

### **V.3.3.- Cromatografía de cambio aniónico**

Como ya se hizo patente en los antecedentes bibliográficos, existen varios métodos para la separación de estas seis especies de arsénico utilizando distintas columnas de cambio aniónico, pero en ninguno de ellos se llega a la resolución total de las mismas.

En este trabajo se realizaron estudios con dos columnas de cambio aniónico de base fuerte de:

- resina de polimetacrilato con grupos funcionales de amonio cuaternario (IC-PAK A); 10  $\mu\text{m}$ , 50 x 4.5 mm i.d.
  
- cambiador de poli(estireno-divinilbenceno) trimetilamonio (Hamilton PRP-X100); 10  $\mu\text{m}$ , 250 x 4.1 mm i.d.

En ambos casos se utilizó como fase móvil un tampón fosfato, ya que como se ha comprobado en la bibliografía, es el eluyente que mejores resultados aporta cuando se trabaja con este tipo de columnas.

Los parámetros que más influyen en la separación cromatográfica de cambio aniónico, y que por tanto se han estudiado, han sido el efecto de la concentración del eluyente y el pH del mismo.

#### **V.3.3.1.- Columna aniónica IC-PAK A**

El estudio del caudal del eluyente, empleando una concentración de fosfato 1 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0 mostró que, para velocidades de flujo mayores de 1.0 mL min<sup>-1</sup>, los tiempos de retención de las distintas especies tendían a ser más cortos, empeorando la resolución. Sin embargo, para velocidades de flujo menores, los tiempos de retención son excesivamente largos y no se obtiene ninguna mejora significativa en la separación. Por esta razón, todos los estudios realizados con esta columna se hicieron con un caudal

constante de  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ . Este caudal por otra parte, ofrece condiciones idóneas de trabajo en los módulos de oxidación y detección.

### V.3.3.1.1.- Estudio de la influencia del pH de la fase móvil

El tipo de empaquetamiento de esta columna permite trabajar en un amplio intervalo de valores de pH, de 1.0 a 13.0, sin que se produzca un deterioro de la misma, lo que se traduce en una gran flexibilidad para el estudio de la separación cromatográfica.

El intervalo de pH de la fase móvil estudiado fue de 3.0 a 11.0, empleando una concentración de fosfato en la fase móvil de  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Los resultados de los tiempos de retención obtenidos al variar el pH, para cada una de las seis especies de arsénico estudiadas, se muestran en la *Figura 26*.

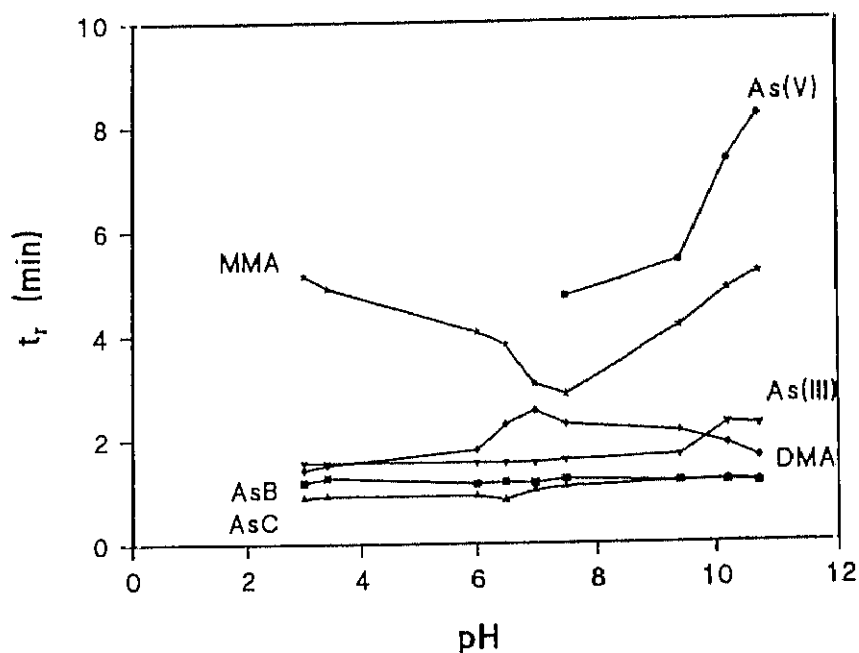


Figura 26.- Influencia del pH de la fase móvil (fosfato  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) en cromatografía líquida de cambio aniónico (columna IC-PAK A)-MO-HG-AAS, para la separación de seis especies de arsénico ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de As en cada especie). Caudal:  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$

La influencia del pH de la fase móvil sobre el tiempo de retención de cada analito está directamente relacionada con sus valores de  $pK_a$ . Como se puede apreciar en la *Figura 26*, cuando se trabaja a pH ácido la especie catiónica AsC y las neutras AsB, As(III) y DMA, prácticamente no quedan retenidas y eluyen muy próximas, dando lugar a un solapamiento de sus señales. Sin embargo, a valores de pH básicos (mayores de 9.5) el arsenito se encuentra en forma aniónica, por lo que el tiempo de retención para esta especie empieza a ser algo mayor.

Se puede observar también que, a pH neutro, se separan aparentemente todas las especies pero, en la práctica, la resolución de los picos no es suficiente como para permitir la cuantificación.

Por último, cuando el pH es mayor de 10.7 se observa que las señales correspondientes a As(III) y DMA se separan completamente de las de AsB y AsC que, por su parte, aparecen completamente solapadas debido a que, a este valor de pH, la AsC deja de estar como catión y se encuentra también en forma neutra. En consecuencia, utilizando un pH en la fase móvil de 10.7 es posible separar completamente las especies tóxicas (arsenito, arseniato, DMA y MMA) y, por otro lado, detectar conjuntamente las no tóxicas (AsB y AsC), de forma análoga al método cromatográfico desarrollado previamente. Como ya se dijo allí, esta separación desde el punto de vista medioambiental es muy importante.

#### **V.3.3.1.2.- Estudio de la influencia de la concentración de fosfato**

A la vista de los resultados obtenidos en el apartado anterior, se optimizó la concentración de fosfato en la fase móvil variando dicha concentración entre 0.5 y 10.0 mmol L<sup>-1</sup>, utilizando un valor de pH de 10.7 y un caudal de fase móvil de 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Los resultados de los tiempos de retención obtenidos, para cada una de las especies de arsénico en función de este parámetro, se muestran en la *Figura 27*.

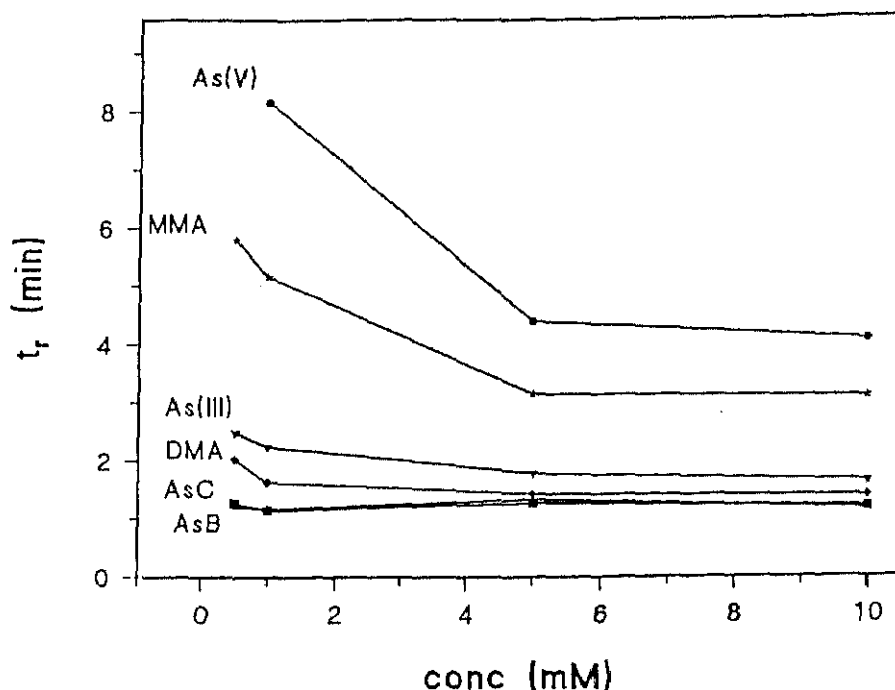


Figura 27.- Influencia de la concentración de fosfato, a pH 10.7, sobre la separación de las seis especies de arsénico ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de As en cada especie) empleando cromatografía líquida de cambio aniónico (columna IC-PAK A)-MO-HG-AAS. Caudal:  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$

Se observa que, como era de esperar, para bajas concentraciones de fosfato, las especies presentan mayores tiempos de retención. Sin embargo, al incrementar la concentración de tampón en el eluyente, se obtienen unos tiempos de retención más bajos, pero con menor resolución, llegando incluso a eluirse simultáneamente cuatro de las especies estudiadas. Por lo tanto, se eligió una concentración de fosfato de  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  como eluyente de baja fuerza iónica, con el fin de obtener una mejor resolución.

#### V.3.3.1.3.- Conclusiones de la cromatografía de cambio aniónico con la columna IC-PAK A.

El cromatograma obtenido empleando como eluyente una disolución acuosa de tampón fosfato de concentración  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 10.7, y un caudal de fase móvil de  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ , para una mezcla de los seis compuestos, con un contenido de arsénico de  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  en cada especie, se muestra en la *Figura 28*.

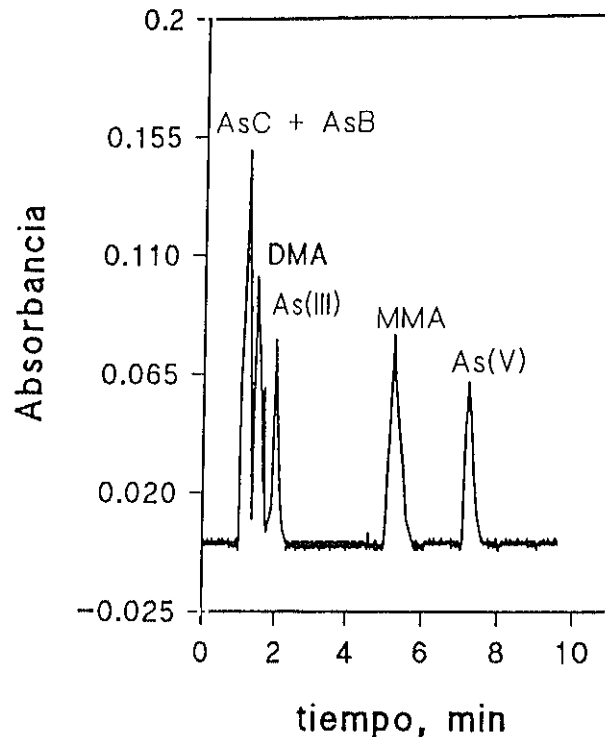


Figura 28.- Cromatograma obtenido a partir de una mezcla de seis especies de arsénico ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de As) empleando cromatografía de cambio aniónico (columna IC-PAK A)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 10.7. Caudal de fase móvil:  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ .

Como se puede observar, es posible separar, en un tiempo de análisis de 8.30 minutos, las cuatro especies tóxicas del arsénico: As(III), DMA, MMA y As(V), de las no tóxicas (AsB y AsC, cuyos picos solapan), tal como ocurriría cuando se trabajaba con cromatografía líquida de fase reversa modificada, si bien hay que destacar que en la cromatografía de cambio aniónico la resolución de los picos es mejor y además, se ha producido una inversión en el orden de elución de los analitos, lo que se debe, principalmente, a la diferencia entre los valores de pH de trabajo utilizados en ambos casos.

## V.3.3.1.4.- Características analíticas del método.

Se han obtenido calibrados lineales para las seis especies en el intervalo de concentración comprendido entre 50-200  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico. Al igual que en el método anterior, cada punto del calibrado es la media de tres determinaciones y las medidas analíticas se han realizado en altura de pico. Los valores de la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de las curvas de calibrado obtenidas para cada especie se recogen en la *Tabla XV*.

Tabla XV.- Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las seis especies de arsénico estudiadas en el intervalo de concentración de 50 - 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico, empleando cromatografía de cambio aniónico (columna IC-PAK A)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 1.0 mmol  $\text{L}^{-1}$  a pH 10.7. Caudal: 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ .

Especie	Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ ( $\times 10^4$ )	Ordenada en el origen, u.A.	Coficiente de correlación
AsB + AsC	$6.4 \pm 0.2$	$0.005 \pm 0.005$	0.99996
DMA	$7.3 \pm 0.1$	$0.011 \pm 0.006$	0.99998
As(III)	$3.8 \pm 0.4$	$0.009 \pm 0.006$	0.9993
MMA	$3.8 \pm 0.4$	$0.008 \pm 0.006$	0.9992
As(V)	$3.0 \pm 0.4$	$0.009 \pm 0.005$	0.9992

El R.S.D. y el L.D. para cada una de las seis especies de arsénico estudiadas, se han calculado empleando los mismos criterios que en el *Apartado V.3.2.4*. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la *Tabla XVI*.



Tabla XVI.- Características analíticas del método para las seis especies de arsénico, mediante cromatografía de cambio aniónico (columna IC-PAK A)-MO-HG-AAS.

Especie	$t_r$ (min.)	R.S.D.(%)	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
AsB+AsC	1.17	1	9
DMA	1.63	2	8
As(III)	2.25	5	16
MMA	5.17	4	16
As(V)	8.17	5	20

Aunque se pueden determinar las especies tóxicas individualmente y las no tóxicas conjuntamente, utilizando tanto esta cromatografía como la de fase reversa modificada, los límites de detección y los valores de desviación estándar relativa obtenidos en este caso son mejores que cuando se trabaja en cromatografía de fase reversa (ver *Tabla XIV*), por lo que es posible determinar estas especies en muestras que contengan niveles de concentración más bajos.

#### V.3.3.2.- Columna aniónica Hamilton PRP-X 100

Estudios preliminares del caudal óptimo de la fase móvil, tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0, en el intervalo de 0.5 - 3.0 mL min<sup>-1</sup>, mostraron que el caudal óptimo de trabajo era de 2.0 mL min<sup>-1</sup>. Este valor ha sido utilizado para llevar a cabo el resto de los estudios, ya que a velocidades de flujo menores los tiempos de retención son muy elevados y el tiempo de análisis muy largo.

##### V.3.3.2.1.- Estudio de la influencia del pH de la fase móvil

El intervalo de pH de la fase móvil estudiado fue de 3.0 a 11.0, empleando una concentración de tampón fosfato de 17 mmol L<sup>-1</sup>. Los resultados de los tiempos de retención medidos para cada una de las especies de arsénico estudiadas, se representan en la *Figura 29*.

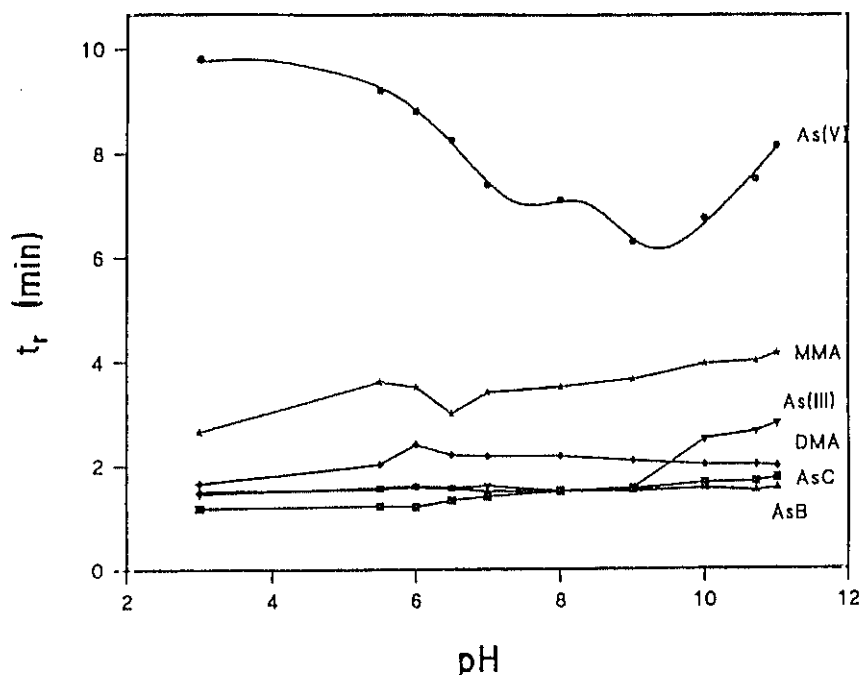


Figura 29.- Influencia del pH de la fase móvil (tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup>) en cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100) empleando el sistema HPLC-MO-HG-AAS, para la separación y detección de seis especies de arsénico (200 µg L<sup>-1</sup> de As en cada especie). Caudal: 2.0 mL min<sup>-1</sup>.

Se observa que, a valores de pH inferiores a 3.5, las especies neutras: AsB, As(III) y DMA, y la catiónica, AsC, no quedan retenidas en absoluto, por lo que ocurre un solapamiento de sus señales. MMA y As(V), al estar cargados negativamente, quedan retenidos, eluyendo a tiempos más elevados que las anteriores especies.

A valores de pH cercanos a 6.0, eluye en primer lugar la AsC (especie catiónica), y a continuación se observa un pico correspondiente al solapamiento de las especies As(III) y AsB (especies neutras). Posteriormente, eluyen en este orden, DMA, MMA y As(V), ya que a ese pH se encuentran en forma de especies aniónicas.

Por otro lado, a pH superiores a 9.5, la AsC y la AsB eluyen conjuntamente, saliendo de la columna en primer lugar, debido a que a ese valor de pH, ambas especies se encuentran en su forma neutra. A continuación se eluyen DMA, As(III), MMA y As(V), que se encuentran en sus formas aniónicas. Por consiguiente, a pH 10.7 se pueden separar las especies no tóxicas (AsB y AsC) del resto de los compuestos tóxicos, al igual que ocurre cuando se trabaja con una columna IC-PAK A a ese mismo pH o con la Spherisorb 5 ODS1 a pH 5.2.

#### **V.3.3.2.2.- Estudio de la influencia de la concentración de fosfato**

Se ha realizado el estudio de la influencia de la concentración de fosfato en la fase móvil, en el intervalo 10 - 22 mmol L<sup>-1</sup>, a pH 6.0, empleando un caudal de 2.0 mL min<sup>-1</sup>. Los resultados de los tiempos de retención obtenidos para cada una de las seis especies de arsénico, en función de dicha concentración, se muestran en la *Figura 30*.

Se observa que, para bajas concentraciones de tampón fosfato en la fase móvil, se produce una buena separación de las señales, pero la última especie eluída, As(V), presenta un gran ensanchamiento de pico debido a su elevado tiempo de retención, a la vez que se incrementa considerablemente el tiempo de análisis. Al aumentar la concentración del regulador en el eluyente se obtienen tiempos de retención más bajos con la misma resolución. Se eligió una disolución de tampón fosfato de concentración 17 mmol L<sup>-1</sup> como eluyente, con el fin de obtener una separación efectiva en un tiempo máximo de análisis de 8 minutos.

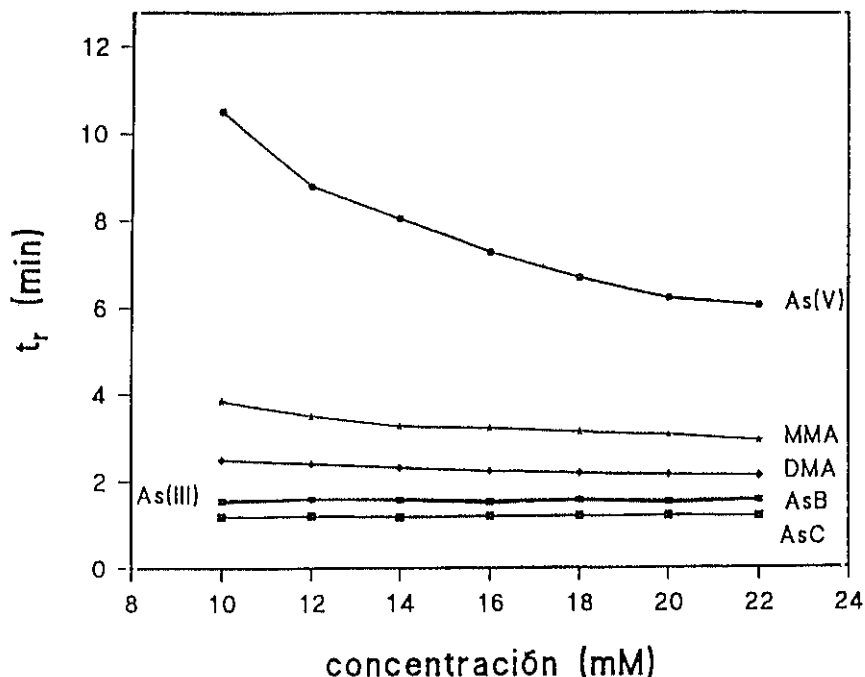


Figura 30.- Influencia de la concentración de fosfato en la fase móvil, a pH 6.0, sobre la separación de las seis especies de arsénico ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de As en cada especie) empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100) - MO - HG - AAS. Caudal de la fase móvil:  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### V.3.3.2.3.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC (columna Hamilton PRP-X 100) - termo-oxidación - HG - AAS en base a la diferente separación cromatográfica a pH 6.0 y 10.7

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios de optimización de los parámetros cromatográficos (caudal, concentración y pH de la disolución eluyente), se llega a la conclusión de que es posible realizar la determinación de las seis especies de arsénico estudiadas por medio de la obtención de dos cromatogramas, uno a pH 6.0 y otro a pH 10.7. En la *Figura 31* se muestran ambos cromatogramas, cada uno de ellos correspondiente a una mezcla con un contenido de arsénico de  $120 \mu\text{g L}^{-1}$  en cada especie, a dichos valores de pH, empleando una concentración de fosfato en la fase móvil de  $17 \text{ mmol L}^{-1}$  y un caudal de  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$ .

A pH 6.0 (Figura 31A), se podrían determinar individualmente las especies AsC, DMA, MMA y As(V), y la concentración total de la mezcla de AsB y As(III), debido al solapamiento de sus señales. Sin embargo, cuando se registra el cromatograma a pH 10.7 (Figura 31B) se pueden detectar por separado As(III), DMA, MMA y As(V), solapando las señales de AsC y AsB. Por tanto, la concentración de AsB se puede determinar por diferencia entre la concentración total de AsB y AsC, valor obtenido a pH 10.7, y la concentración de AsC obtenida a pH 6.0, o bien, por diferencia entre la concentración total de As(III) y AsB, que se obtiene a pH 6.0 y la concentración de As(III) medida a pH 10.7.

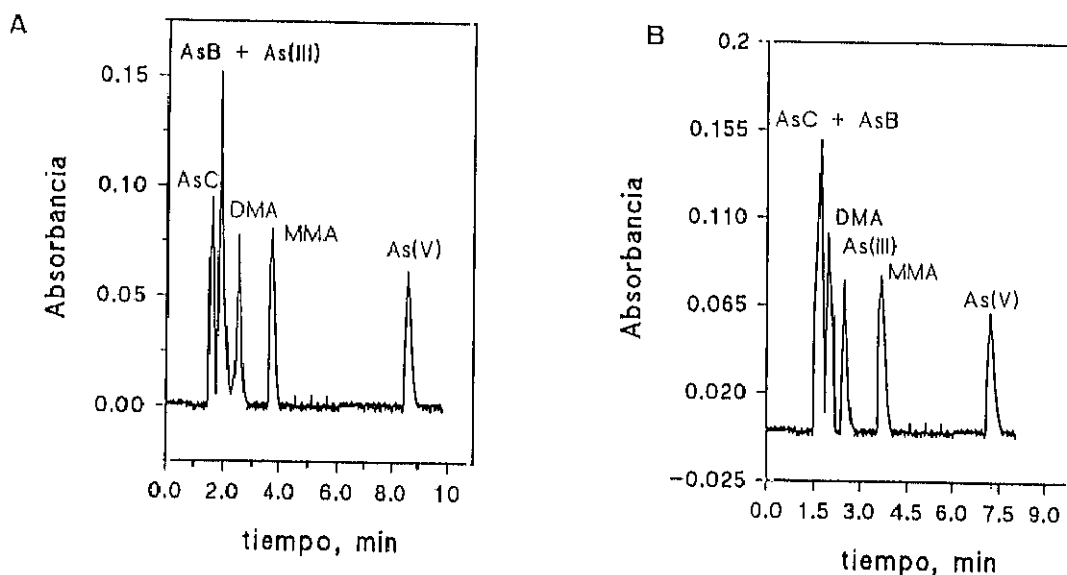


Figura 31.- Cromatograma de una mezcla de seis especies de arsénico ( $120 \mu\text{g L}^{-1}$  de As en cada especie): A) pH 6.0 y B) pH 10.7, en cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato  $17 \text{ mmol L}^{-1}$ . Velocidad de flujo de  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$ .

De cualquier manera, al igual que en la cromatografía líquida en fase reversa modificada y en la cromatografía de cambio aniónico con columna IC-PAK A, a pH 10.7, se pueden determinar individualmente cada una de las especies tóxicas: As(III), DMA, MMA y As(V), y por otro lado, la mezcla de especies no tóxicas, AsB y AsC, conjuntamente.

*Características analíticas*

Con una fase móvil acuosa de tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup>, a pH 10.7 o a pH 6.0, y un caudal de 2.0 mL min<sup>-1</sup>, se han obtenido calibrados lineales para las seis especies en el intervalo de concentración comprendido entre 50-250 µg L<sup>-1</sup> de arsénico. Al igual que en los trabajos anteriores, cada punto del calibrado se ha medido por triplicado y la señal analítica considerada ha sido la altura de pico. Los valores de la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de los calibrados obtenidos para cada especie, empleando el eluyente a pH 10.7 o a pH 6.0, se recogen en la *Tabla XVII* y *XVIII*, respectivamente.

**Tabla XVII.-** Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las seis especies de arsénico estudiadas en el intervalo de concentración de 50-250 µg L<sup>-1</sup> de arsénico, empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 10.7. Caudal: 2.0 mL min<sup>-1</sup>.

Especie	Pendiente, u.A. µg <sup>-1</sup> L ( x 10 <sup>4</sup> )	Ordenada en el origen, u.A.	Coefficiente de correlación
AsB + AsC	6.9±0.2	-0.001±0.006	0.9998
DMA	7.1±0.1	0.018±0.003	0.99995
As(III)	5.2±0.2	0.001±0.003	0.99990
MMA	5.4±0.3	0.010±0.004	0.9996
As(V)	3.2±0.2	0.011±0.003	0.9997

Tabla XVIII.- Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las seis especies de arsénico estudiadas en el intervalo de concentración de 50-250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol  $\text{L}^{-1}$  a pH 6.0. Caudal: 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ .

Especie	Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ ( x 10 <sup>4</sup> )	Ordenada en el origen, u.A.	Coefficiente de correlación
AsC	9.1±0.4	0.006±0.007	0.9990
AsB+As(III)	5.9±0.5	-0.01±0.01	0.9995
DMA	6.3±0.2	0.005±0.004	0.9993
MMA	5.8±0.2	0.004±0.003	0.9997
As(V)	3.5±0.1	0.009±0.002	0.9998

El R.S.D. y el L.D., para cada una de las seis especies de arsénico estudiadas, se han calculado empleando los criterios descritos en el apartado V.3.2.4. Los resultados obtenidos en ambos pH se encuentran recogidos en la *Tabla XIX y XX*.

Tabla XIX.- Características analíticas del método para las seis especies de arsénico mediante cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100, pH 10.7)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol  $\text{L}^{-1}$  a pH 10.7. Caudal de la fase móvil: 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ .

Especie	t <sub>r</sub> (min.)	R.S.D.(%)	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
AsB+AsC	1.60	2	6
DMA	2.00	5	6
As(III)	2.65	3	8
MMA	4.00	5	7
As(V)	7.50	4	12

Tabla XX.- Características analíticas del método para las seis especies de arsénico mediante cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100, pH 6.0)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0. Caudal de la fase móvil: 2.0 mL min<sup>-1</sup>.

Especie	t <sub>r</sub> (min.)	R.S.D.(%)	L.D. (μg L <sup>-1</sup> )
AsC	1.45	3	4
AsB + As(III)	1.70	4	7
DMA	2.40	3	6
MMA	3.60	4	6
As(V)	7.30	5	11

#### V.3.3.2.4.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC (columna Hamilton PRP X100) - termo-oxidación - HG - AAS en base al diferente comportamiento de estas especies en el proceso de la termo-oxidación en presencia y ausencia del K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

El método consiste en la obtención de dos cromatogramas a pH 6.0. La diferencia entre ambos cromatogramas es el empleo o no del agente oxidante (persulfato potásico al 5% en NaOH al 2.5%) para producir la termo-oxidación de las especies orgánicas de arsénico en el horno microondas. Como ya se estudió en el *Apartado V.2.1*, cuando se emplea el sistema con persulfato potásico al 5%, se obtiene el cromatograma representado en la *Figura 32A*. En estas condiciones, se pueden determinar, como ya se ha visto, las especies AsC, DMA, MMA y As(V) individualmente y mezcla de As(III) y AsB. Sin embargo, cuando el persulfato potásico es sustituido por agua, se obtiene el cromatograma representado en la *Figura 32B*. Como era de esperar, en estas condiciones las especies AsC y AsB no son formadoras de hidruros y, por tanto, no se detectan, por lo que se observa una señal que corresponde únicamente a As(III), además de los picos de DMA, MMA y As(V). La concentración de AsB se puede determinar por diferencia entre la concentración de la mezcla de As(III) y AsB, obtenida trabajando con



persulfato potásico, y la concentración de As(III), medida en el cromatograma obtenido sin utilizar el reactivo oxidante.

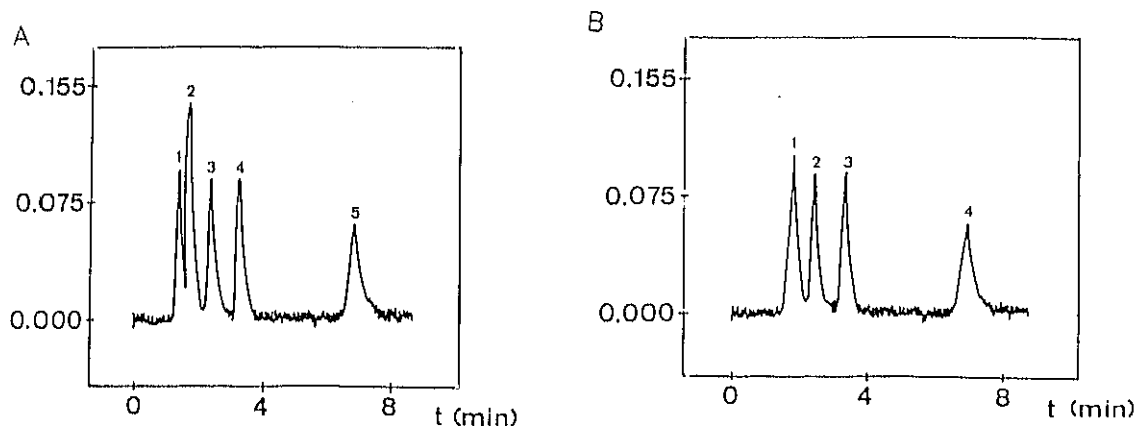


Figura 32.- Cromatograma de una mezcla de las seis especies de arsénico ( $120 \mu\text{g L}^{-1}$  de As en cada especie): A) con persulfato potásico y B) sin persulfato potásico, en cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X100) - termo-oxidación - HG - AAS. Fase móvil: tampón fosfato  $17 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 6.0. Velocidad de flujo de  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$ .

### *Características analíticas del método empleando persulfato potásico*

Utilizando como fase móvil una disolución acuosa de tampón fosfato  $17 \text{ mmol L}^{-1}$ , a pH 6.0 y un caudal de  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$ , y realizando la etapa intermedia de termo-oxidación con agente oxidante, se han obtenido calibrados lineales para las seis especies en el intervalo de concentración comprendido entre  $50 - 250 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico. Cada punto del calibrado ha sido medido por triplicado y la señal analítica considerada ha sido la altura de pico. Los valores de la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de los calibrados obtenidos para cada especie se recogen en la *Tabla XXI*.

Tabla XXI.- Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las seis especies de arsénico estudiadas en el intervalo de concentración de 50-250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie, empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton) - termo-oxidación (con oxidante)-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17  $\text{mmol L}^{-1}$  a pH 6.0. Caudal: 2.0  $\text{mL min}^{-1}$ .

Especie	Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ ( $\times 10^4$ )	Ordenada en el origen, u.A.	Coefficiente de correlación
AsC	$9.0 \pm 0.2$	$0.016 \pm 0.001$	0.9995
As(III) + AsB	$6.18 \pm 0.07$	$0.021 \pm 0.002$	0.9998
DMA	$6.5 \pm 0.2$	$0.010 \pm 0.002$	0.9991
MMA	$5.6 \pm 0.2$	$0.012 \pm 0.001$	0.9990
As(V)	$3.43 \pm 0.03$	$0.013 \pm 0.001$	0.9998

Además, se ha calculado el R.S.D. y el L.D., para cada una de las seis especies de arsénico estudiadas, tal como se describe en el Apartado V.3.2.4. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la *Tabla XXII*.

Tabla XXII.- Características analíticas del método para las seis especies de arsénico mediante cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100) - termo-oxidación (con oxidante)-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17  $\text{mmol L}^{-1}$  a pH 6.0. Caudal de fase móvil: 2.0  $\text{mL min}^{-1}$ .

Especie	$t_r$ (min.)	R.S.D.(%)	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
AsC	1.50	5	4
AsB + As(III)	1.85	3	4
DMA	2.45	5	6
MMA	3.70	4	6
As(V)	7.20	6	8

**Características analíticas del método sin termo-oxidación**

En las mismas condiciones iniciales, sustituyendo el agente oxidante por agua en la etapa de termo-oxidación, se han obtenido calibrados lineales para las cuatro especies de arsénico formadoras de hidruros en el intervalo de concentración comprendido entre 50-250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico. Cada punto es la media de tres determinaciones y las medidas se han realizado en altura de pico. Los valores de la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de dichos calibrados se recogen en la *Tabla XXIII*.

**Tabla XXIII.-** Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las cuatro especies de arsénico formadoras de hidruros en el intervalo de concentración de 50-250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie, empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100) - termo-oxidación (sin oxidante) - HG - AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol  $\text{L}^{-1}$  a pH 6.0. Caudal: 2.0 mL  $\text{min}^{-1}$ .

Especie	Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ ( x $10^4$ )	Ordenada en el origen, u.A.	Coefficiente de correlación
As(III)	9.93 $\pm$ 0.04	0.0013 $\pm$ 0.004	0.9998
DMA	3.5 $\pm$ 0.4	0.006 $\pm$ 0.004	0.992
MMA	6.87 $\pm$ 0.07	0.003 $\pm$ 0.001	0.99994
As(V)	4.75 $\pm$ 0.07	0.002 $\pm$ 0.001	0.9998

El R.S.D. y el L.D., para cada una de las cuatro especies de arsénico detectadas, se ha calculado empleando los criterios descritos en el apartado V.3.2.4. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la *Tabla XXIV*.

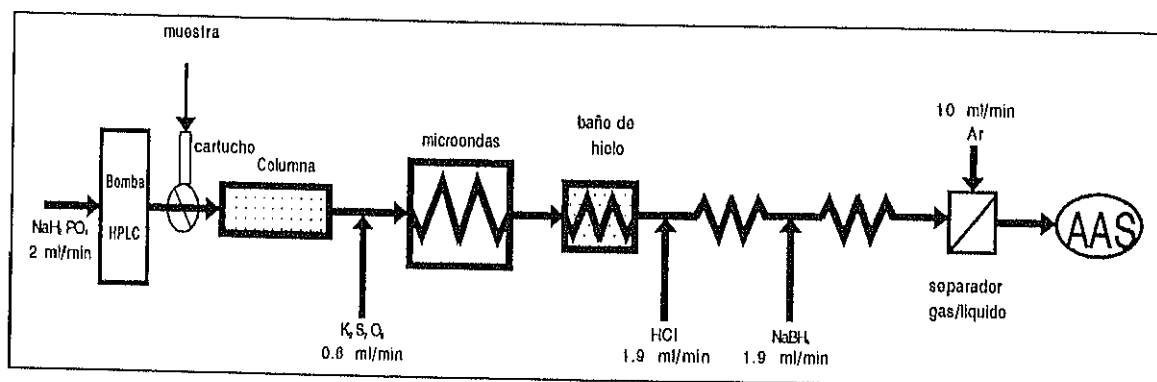
Tabla XXIV.- Características analíticas del método para las cuatro especies de arsénico formadores de hidruros mediante cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100) - termo-oxidación (sin oxidante) - HG - AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0. Caudal de fase móvil: 2.0 mL min<sup>-1</sup>.

Especie	t <sub>r</sub> (min.)	R.S.D.(%)	L.D. (µg L <sup>-1</sup> )
As(III)	1.85	3	3
DMA	2.45	5	9
MMA	3.70	4	4
As(V)	7.20	4	6

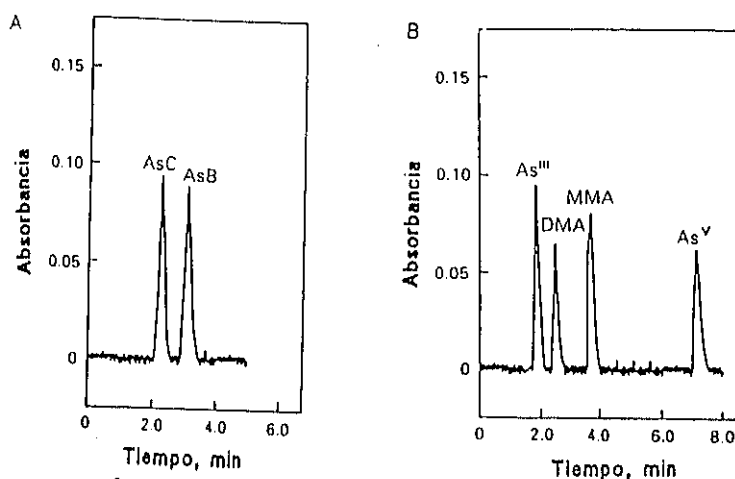
V.3.3.2.4.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC (columna Hamilton)-MO-HG-AAS en base a la exclusión selectiva de especies con cartuchos aniónicos (IC-OH) conectados a la válvula de inyección.

Los cartuchos aniónicos (IC-OH) conectados a la válvula de inyección cromatográfica, permiten abordar la determinación diferenciada de las seis especies objeto de estudio. Para ello, en un mismo paso, se introduce la muestra en el sistema haciéndola pasar a través de un cartucho aniónico (IC-OH), acondicionado previamente (10 mL de NaOH al 10% y lavado con 20 mL de H<sub>2</sub>O), colocado a la entrada de la válvula de inyección ( ver *Figura 33*). De esta forma, las especies aniónicas As(III), DMA, MMA y As(V), quedan retenidas en dicho cartucho y sólo las especies catiónicas AsC y AsB pasan al inyector, siendo separadas posteriormente en la columna Hamilton PRP-X 100, empleando tampón fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0 como fase móvil y una velocidad de flujo de 1.0 mL min<sup>-1</sup>, en estas condiciones el cromatograma contiene sólo las especies AsB y AsC, como dos picos cromatográficos perfectamente resueltos. Por otro lado, se obtiene un segundo cromatograma eliminando el cartucho aniónico y sustituyendo el agente oxidante, de la etapa asistida por microondas, por agua. De esta forma, como ya se vió previamente, sólo se obtienen las señales correspondientes a las

especies formadoras de hidruros, As(III), DMA, MMA y As(V), con un tiempo máximo de análisis de 8 minutos. En la *Figura 34* se muestran los cromatogramas correspondientes a una mezcla de  $120 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie, inyectando la muestra al sistema HPLC-MO-HG-AAS a través de un cartucho aniónico (*Figura 34A*) o sin emplear dicho cartucho y sustituyendo el agente oxidante por agua (*Figura 34B*). De esta forma, no es necesario hallar la concentración de ninguna especie por diferencia entre dos señales obtenidas en distintas condiciones, sino que se determinan las seis especies por interpolación directa de una sola señal en las curvas de calibrado correspondientes.



**Figura 33.-** Representación esquemática del sistema HPLC-MO-HG-AAS, situando un cartucho aniónico (IC-OH) a la entrada de la válvula de inyección.



**Figura 34.-** Cromatogramas de una mezcla de las seis especies de arsénico ( $120 \mu\text{g L}^{-1}$  de As): A) inyectando la muestra a través de un cartucho aniónico, fase móvil: tampón fosfato  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 6.0 y un caudal de  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$  y B) sin cartucho y sin persulfato potásico, fase móvil: tampón fosfato  $17 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 6.0 y un caudal de  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$ , empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton)-MO-HG-AAS.

*Características analíticas del método con inyección a través del cartucho*

En las condiciones ya establecidas, se han obtenido calibrados lineales para las dos especies que no quedan retenidas en el cartucho, AsB y AsC, en el intervalo de concentración comprendido entre 50 - 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico. Al igual que en los casos anteriores, cada punto del calibrado ha sido medido por triplicado y la señal analítica considerada ha sido la altura de pico. Los valores de la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de los calibrados obtenidos para ambas especies se recogen en la *Tabla XXV*.

**Tabla XXV.-** Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para AsC y AsB en el intervalo de concentración de 50 - 250  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico, empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X100)-MO-HG-AAS, inyectando la muestra a través de un cartucho aniónico. Fase móvil: tampón fosfato 5 mmol  $\text{L}^{-1}$  a pH 6.0. Caudal: 1.0 mL  $\text{min}^{-1}$ .

Especie	Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ ( $\times 10^4$ )	Ordenada en el origen, u.A.	Coefficiente de correlación
AsC	9.0 $\pm$ 0.1	0.002 $\pm$ 0.001	0.9994
AsB	7.1 $\pm$ 0.1	0.010 $\pm$ 0.002	0.998

Además, se ha calculado el R.S.D. y el L.D. para las dos especies de arsénico que atraviesan el cartucho, tal como se describe en el Apartado V.3.2.4. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla XXVI*.

Tabla XXVI.- Características analíticas del método para la determinación de las dos especies no retenidas en el cartucho mediante cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton)-MO-HG-AAS, inyectando la muestra a través de un cartucho aniónico. Fase móvil: tampón fosfato 5 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0. Caudal de fase móvil: 1.0 mL min<sup>-1</sup>.

Especie	t <sub>r</sub> (min.)	R.S.D.(%)	L.D. (µg L <sup>-1</sup> )
AsC	2.20	4	3
AsB	3.00	5	4

#### V.3.4.- Estudio comparativo de las condiciones óptimas encontradas con cada una de las columnas cromatográficas

La Tabla XXVII muestra, comparativamente, un resumen de las condiciones óptimas encontradas con cada una de las columnas cromatográficas ensayadas, para la determinación individualizada de las seis especies del arsénico, que son objeto de nuestro estudio.

**Tabla XXVII.- Resumen de las condiciones óptimas obtenidas en la separación de seis especies de arsénico, empleando cromatografía de fase reversa modificada (columna spherisorb 50DS1) y cambio aniónico (columna IC PAK A y Hamilton PRP-X 100)**

PARÁMETROS	HPLC FASE REVERSA	HPLC-IC PAK A	HPLC-HAMILTON PRP-X 100	
COLUMNA	Sílice en base octadecil (spherisorb 50DS1)	Polimetacrilato con grupos $\text{NH}_4^+$ (10 $\mu\text{m}$ )	Poli(estireno-dibutilbenceno) trimetilamonio (10 $\mu\text{m}$ )	
DIMENSIONES COLUMNA	150 x 4.6 mm	50 x 4.5 mm	250 x 4.1 mm	
FASE MÓVIL	TBAP 2.5 mmol L <sup>-1</sup> a pH 5.2	Tampón fosfato 1.0 mmol L <sup>-1</sup> a pH 10.7	Tampón fosfato 17.0 mmol L <sup>-1</sup> a pH 6.0	Tampón fosfato 17.0 mmol L <sup>-1</sup> a pH 10.7
VELOCIDAD FUJO FASE MÓVIL	1.0 mL min <sup>-1</sup>	1.0 mL min <sup>-1</sup>	2.0 mL min <sup>-1</sup>	2.0 mL min <sup>-1</sup>
DETERMINACIONES INDIVIDUALIZADAS (LD, $\mu\text{g L}^{-1}$ )	As(III) (97) DMA (122) MMA (128) As(V) (143)	As(III) (16) DMA (8) MMA (16) As(V) (20)	AsC (4) DMA (6) MMA (6) As(V) (11)	As(III) (8) DMA (6) MMA (7) As(V) (12)
DETERMINACIÓN CONJUNTA (LD, $\mu\text{g L}^{-1}$ )	AsB + AsC (100)	AsB + AsC (9)	AsB + As(III) (7)	AsB + AsC (6)



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DEL  
CAPÍTULO V

Atallah R.H., Kalman D. (1991)  
*Talanta*, 38, 167.

Beauchemin D., Siu K.W.M., McLaren J.W. and Berman S.S. (1989)  
*Analytical Proceedings*, 4, 285-289.

Liu Yi Ming, Fernandez M.L., Blanco E. and Sanz A. (1993)  
*J. Anal. At. Spectrom.*, 8, 815.

López A., Torralba R., Palacios M.A. and Cámara C. (1992)  
*Talanta*, 39, 1343.

Morin P., Amran M.B., Lakkis M.D. and Leroy M. (1992)  
*Chromatographia*, 33 (11/12), 581-585.

Rauret G., Rubio R. and Padró A. (1991)  
*Fresenius J. Anal. Chem.*, 340, 157.

Stringer C.E. and Attrep M. (1979)  
*Anal. Chem.*, 51, 731.

## APLICACIONES ANALÍTICAS DIRECTAS EMPLEANDO LOS MÉTODOS DESARROLLADOS CON LAS DIFERENTES COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS.

### VI.1.- INTRODUCCIÓN

Las aplicaciones analíticas a que han dado lugar los métodos establecidos en el anterior capítulo, están directamente relacionadas con la bondad de los mismos. Así, los principales inconvenientes que presenta la cromatografía líquida en fase reversa (columna Spherisorb 5ODS1, reactivo iónico TBAP 2.5 mmol L<sup>-1</sup> a pH 5.2) son: a) el solapamiento de las especies AsB y AsC en todos los casos, lo que no permite la cuantificación individualizada de las seis especies, b) altos límites de detección como consecuencia de la presencia del tensoactivo en la etapa de la generación del hidruro, y c) el agente formador del par iónico, que afecta permanentemente a la selectividad de la columna, lo que dificulta la reproducibilidad. Sin embargo, el método propuesto puede aplicarse directamente a muestras acuosas con altos contenidos en las especies inorgánicas, así como a la determinación conjunta de las especies no tóxicas, AsB y AsC.

La columna aniónica IC-PAK A no mejora, en ningún caso, las condiciones de separación de especies con respecto a la columna de fase reversa modificada, ya que al igual que aquella, sólo se obtiene separación de las especies aniónicas, solapando las especies catiónicas, hecho que no permite su determinación individualizada. Sin embargo, se mejoran extraordinariamente las prestaciones analíticas en cuanto a la reproducibilidad y límites de detección, lo que ya permite abordar la especiación de arsénico en muestras medioambientales con bajos contenidos en las diferentes especies estudiadas.

La columna aniónica Hamilton PRP-X 100 ha proporcionado las mejores condiciones cromatográficas, aunque tampoco es posible la separación de las seis especies en un solo cromatograma. Con esta columna se han propuesto tres métodos para la determinación de las especies de arsénico en muestras medioambientales.

El primero se basa en el hecho de que la separación cromatográfica es distinta si se emplea como eluyente tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 10.7 o a pH 6.0, ya que a ambos pH se produce un solapamiento en el que están involucradas diferentes especies (a pH 10.7, AsB y AsC, y a pH 6.0, As(II) y AsB). Se puede así, determinar la concentración de AsC, As(III), DMA, MMA y As(V) individualmente y calcular por diferencia la de AsB.

El segundo método se basa en que AsB y AsC no generan ningún hidruro de arsénico si no se aplica el procedimiento de termo-oxidación. Así, en presencia del agente oxidante se obtendrán los picos correspondientes a As(V), MMA, DMA, AsC y un pico conjunto de As(III) y AsB, mientras que en ausencia del agente oxidante se obtendrán los picos correspondientes a As(III), MMA, DMA y As(V). La concentración de AsB se calcula por diferencia entre ambos cromatogramas.

El tercer método se basa en el empleo o no de un cartucho aniónico acoplado al sistema HPLC-MO-HG-AAS. Así, en presencia del cartucho se cuantificarán las especies catiónicas, AsB y AsC, y en ausencia del mismo y omitiendo el reactivo oxidante, As(III), As(V), MMA y DMA.

Por otra parte, los límites de detección y la reproducibilidad alcanzados en los tres métodos, permiten abordar la determinación directa de muestras medioambientales sin necesidad de pretratamientos especiales.

## VI.2.- ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN AGUA RESIDUAL EMPLEANDO LA CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA MODIFICADA Y DETECCIÓN MO-HG-AAS.

Los altos límites de detección del método propuesto hacen que no sea adecuado para su aplicación en la mayoría de las muestras medioambientales. Los niveles de arsénico en un agua de sondeo y en un extracto de sedimentos obtenidos del Programa de Ensayos, Medidas y Pruebas (M&T), se encuentran por debajo de los límites de determinación del método. Sin embargo, el método se ha aplicado a la determinación de las seis especies en un agua residual (de cloaca), cuyo contenido en arsénico total era extraordinariamente elevado. La concentración de cada compuesto de arsénico en la muestra se calculó por lectura directa de la señal obtenida, en cada caso, en el calibrado correspondiente a cada una de las especies.

Los resultados obtenidos para cinco determinaciones se resumen en la *Tabla XXVIII*.

**Tabla XXVIII.- Especiación de arsénico en un agua residual empleando cromatografía de fase reversa modificada-MO-HG-AAS. Fase móvil: TBAP 2.5 mmol L<sup>-1</sup> a pH 5.2. Caudal de la fase móvil: 1.0 mL min<sup>-1</sup>**

Especie	Concentración de As (mg L <sup>-1</sup> )
AsB + AsC	9.7 ± 0.6
DMA	n.d.
As(III)	n.d.
MMA	n.d.
As(V)	n.d.

n.d = no detectado

En esta muestra de agua sólo se ha obtenido señal correspondiente a la mezcla de compuestos no tóxicos, AsC y AsB, con el inconveniente de que este método no permite distinguir entre ambas especies. El nivel de concentración obtenido, del orden de  $\text{mg L}^{-1}$ , puede ser atribuído a la alta actividad biológica que se registra en este tipo de aguas.

### V.3.- ESPECIACIÓN DE AS EN AGUAS Y EXTRACTOS DE SEDIMENTOS POR CROMATOGRAFÍA DE CAMBIO ANIÓNICO EN COLUMNA IC-PAK A Y DETECCIÓN POR MO - HG - AAS.

El método desarrollado con esta columna se aplicó a la determinación de las seis especies de arsénico estudiadas en agua de sondeo del Cabril (Córdoba), en un agua residual (de cloaca) y en un extracto sintético de sedimentos suministrado por el Programa de Ensayos, Medidas y Pruebas (M&T). La concentración de cada compuesto de arsénico en la muestra se calculó por lectura directa de la señal obtenida en cada caso, en el calibrado correspondiente a cada una de las especies. Los resultados obtenidos para cinco determinaciones de cada muestra se recogen en la *Tabla XXIX*.

Tabla XXIX.- Especiación de arsénico en aguas y extracto de sedimentos, por cromatografía de cambio aniónico (columna IC-PAK A)-MO-HG-AAS. Resultados expresados en concentración de arsénico. Fase móvil: tampón fosfato  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 10.7. Caudal:  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$

Especie	Agua sondeo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Agua residual ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Extrac. sedim. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
AsB+AsC	n.d.	$10.3 \pm 0.5$	n.d.
DMA	n.d.	n.d.	$51 \pm 2$
As(III)	n.d.	n.d.	n.d.
MMA	n.d.	n.d.	$181 \pm 6$
As(V)	$86 \pm 9$	n.d.	$113 \pm 8$

n.d. = no detectado

Como se puede observar, en el agua de sondeo sólo se ha detectado la presencia de As(V), como cabía esperar, ya que, al ser aguas subterráneas, no existe la suficiente actividad biológica necesaria para transformar el arsénico inorgánico en los distintos derivados orgánicos. En el agua residual, al igual que en el método anterior, sólo aparece la señal correspondiente a las especies no tóxicas, AsB y/o AsC, no siendo posible, mediante este método, distinguir cuál de ellas está presente. Sin embargo, en el extracto sintético de sedimento se han encontrado DMA, MMA y As(V). El resto de las especies, en cada caso, si se encuentran presentes, están a niveles de concentración por debajo del límite de detección de este método.

Con el fin de evaluar la exactitud del método propuesto, se han realizado estudios de recuperación en la muestra de extracto sintético de sedimento, añadiendo  $60 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico, en cada especie, a una alícuota de dicho extracto. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la *Tabla XXX*.

**Tabla XXX.- Recuperación de las seis especies de arsénico en el extracto sintético de sedimento, empleando cromatografía de cambio aniónico (columna IC-PAK A)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato  $1.0 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 10.7. Caudal:  $1.0 \text{ mL min}^{-1}$ .**

Especie	$\mu\text{g L}^{-1}$ totales	$\mu\text{g L}^{-1}$ encontrados	% recuperación
AsB + AsC	60	$61 \pm 3$	$102 \pm 3$
DMA	111	$114 \pm 2$	$102 \pm 2$
As(III)	60	$59 \pm 2$	$99 \pm 2$
MMA	241	$237 \pm 2$	$98 \pm 2$
As(V)	173	$179 \pm 8$	$103 \pm 8$

Se observa que, para todas las especies, la recuperación está próxima al 100%, lo que confirma la validez del método propuesto para la determinación de los compuestos de arsénico estudiados en este tipo de muestras.

#### **VI.4.- ESPECIACIÓN DE AS EN DISTINTOS TIPOS DE MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES POR CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO ANIÓNICO EN COLUMNA HAMILTON PRP-X 100 Y DETECCIÓN POR MO-HG-AAS**

En base a los resultados obtenidos en la separación de las especies utilizando la cromatografía de cambio aniónico con columna Hamilton PRP-X 100 y en las conclusiones extraídas de los estudios realizados sobre la transformación de las especies, tanto en microondas como en termo-oxidación, se proponen diferentes métodos para la determinación de las seis especies de arsénico estudiadas.

##### **VI.4.1.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS en base al diferente comportamiento de estas especies en función del pH**

El método desarrollado se aplicó a la determinación de las seis especies de arsénico en agua de sondeo del Cabril, en un agua residual y en el extracto sintético de sedimentos suministrado por el Programa de Ensayos, Medidas y Pruebas (M&T). La concentración de cada compuesto de arsénico en la muestra se calculó por interpolación directa de la señal obtenida, en cada caso, en el calibrado correspondiente a cada una de las especies.

Los resultados obtenidos para cinco determinaciones en cada muestra, se resumen en las *Tablas XXXI* y *XXXII*, que corresponden a las medidas realizadas a pH 10.7 y a pH 6.0, respectivamente.

Tabla XXXI.- Especiación de arsénico en aguas y extracto de sedimento empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 10.7. Caudal de fase móvil: 2.0 mL min<sup>-1</sup>. Resultados expresados en concentración de arsénico.

Especie	Agua sondeo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Agua residual ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Extrac. sedim. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
AsB+AsC	n.d.	9.4±0.4	n.d.
DMA	n.d.	n.d.	53±7
As(III)	n.d.	n.d.	n.d.
MMA	n.d.	n.d.	179±4
As(V)	86±4	n.d.	105±9

n.d. = no detectado

Tabla XXXII.- Especiación de arsénico en aguas y extracto de sedimento empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0. Caudal de fase móvil: 2.0 mL min<sup>-1</sup>. Resultados expresados en concentración de arsénico.

Especie	Agua sondeo ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Agua residual ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Extrac. sedim. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
AsB+As(III)	n.d.	9.6±0.4	n.d.
DMA	n.d.	n.d.	54±3
AsC	n.d.	n.d.	n.d.
MMA	n.d.	n.d.	183±3
As(V)	80±4	n.d.	111±4

n.d. = no detectado



Comparando los datos de las *Tablas XXXI y XXXII*, se puede deducir que en el agua residual, la concentración suma de AsB y AsC, obtenida a pH 10.7, ( $9.4 \text{ mg L}^{-1}$ ), corresponde exclusivamente a AsB ya que la concentración de AsC detectada a pH 6.0 es nula. Este dato concuerda con los que se obtienen si se considera la concentración suma de AsB y As(III) ( $9.6 \text{ mg L}^{-1}$ ), obtenida a pH 6.0, y la de As(III) medida a pH 10.7 (no detectada). Para el extracto de sedimento sólo se detecta contenido en arsénico, a ambos valores de pH, en forma de las especies DMA, MMA y As(V), y los resultados obtenidos son similares a ambos pH. Por otro lado, estos resultados coinciden con los obtenidos en el método cromatográfico desarrollado con la columna IC-PAK A.

Con el fin de comprobar la exactitud del método, se han realizado estudios de recuperación añadiendo  $60 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico, en cada especie, a una alícuota del extracto sintético de sedimento. Los resultados obtenidos a pH 10.7 y 6.0 se muestran en las *Tablas XXXIII y XXXIV*, respectivamente.

**Tabla XXXIII.- Recuperación de las seis especies de arsénico en el extracto sintético de sedimento empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato  $17 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 10.7. Caudal de fase móvil:  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$ .**

Especie	$\mu\text{g L}^{-1}$ totales	$\mu\text{g L}^{-1}$ encontrados	% recuperación
AsB+AsC	60	$58 \pm 4$	$97 \pm 4$
DMA	113	$109 \pm 7$	$96 \pm 7$
As(III)	60	$61 \pm 3$	$102 \pm 3$
MMA	239	$229 \pm 4$	$96 \pm 4$
As(V)	165	$176 \pm 4$	$107 \pm 4$

Tabla XXXIV.- Recuperación de las seis especies de arsénico en el extracto sintético de sedimento, empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0. Caudal de fase móvil: 2.0 mL min<sup>-1</sup>.

Especie	$\mu\text{g L}^{-1}$ totales	$\mu\text{g L}^{-1}$ encontrados	% recuperación
AsB+As(III)	60	59 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2
DMA	114	113 $\pm$ 5	99 $\pm$ 5
AsC	60	63 $\pm$ 6	105 $\pm$ 6
MMA	243	238 $\pm$ 5	98 $\pm$ 5
As(V)	171	165 $\pm$ 8	96 $\pm$ 8

Se observa que, para todas las especies de arsénico y, a ambos valores de pH, las recuperaciones están próximas al 100%, lo que confirma la validez del método propuesto para llevar a cabo la especiación de arsénico en este tipo de muestras.

#### VI.4.2.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC (columna Hamilton PRP-X 100) - termo-oxidación - HG - AAS en base al diferente comportamiento de estas especies en el proceso de termo-oxidación en presencia y ausencia de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>

El método desarrollado se aplicó a la determinación de las seis especies de arsénico en agua mineral, en un agua de desecho (alcantarilla) y en el extracto sintético de pescado suministrado por el Programa Ensayos, Medidas y Pruebas (M&T). La concentración de cada compuesto de arsénico en la muestra se calculó por lectura directa de la señal obtenida, en cada caso, en el calibrado correspondiente a cada una de las especies. La concentración de AsB se obtiene por diferencia entre la concentración suma de AsB y As(III), obtenida empleando agente oxidante, y la concentración de As(III), medida cuando se sustituye dicho reactivo por agua.

Los resultados obtenidos para cinco determinaciones en cada muestra se resumen en la *Tabla XXXV*.

**Tabla XXXV.- Especiación de arsénico en aguas y extracto de pescado empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100) - termo-oxidación - HG - AAS. Resultados expresados en concentración de arsénico. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0. Caudal de fase móvil: 2.0 mL min<sup>-1</sup>.**

Especie	Agua mineral ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Agua de desecho ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Extrac. pescado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
AsC	n.d.	n.d.	76 $\pm$ 7
As(III)	n.d.	7.4 $\pm$ 0.2	n.d.
DMA	n.d.	n.d.	157 $\pm$ 9
MMA	n.d.	n.d.	108 $\pm$ 9
As(V)	51 $\pm$ 6	n.d.	350 $\pm$ 20
AsB	n.d.	33 $\pm$ 1	500 $\pm$ 20

n.d. = no detectado

Como era de esperar, y según lo comentado en el método anterior, en la muestra de agua mineral sólo se ha detectado arsénico inorgánico, en forma de As(V). Sin embargo, en el agua de desecho se han encontrado tanto formas inorgánicas (As(III)) como orgánicas (AsB). Esta última especie puede aparecer como resultado de biotransformaciones o bien puede haber sido introducida por la acción del hombre (herbicidas, etc.).

Por último, los resultados obtenidos en la muestra de pescado demuestran que la mayor parte del contenido de arsénico se encuentra en forma de derivados orgánicos, aunque también es posible encontrar cantidades de As(V).

Con el fin de evaluar la exactitud del método propuesto, se han realizado estudios de recuperación en el extracto de pescado añadiendo una cantidad de arsénico de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ , en cada especie, a una alícuota de dicho extracto. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla XXXVI*.

**Tabla XXXVI.- Recuperación de las seis especies de arsénico en el extracto de pescado empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100)- t e r m o - oxidación - HG - AAS. Fase móvil: tampón fosfato  $17 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 6.0. Caudal de fase móvil:  $2.0 \text{ mL min}^{-1}$ .**

Especie	$\mu\text{g L}^{-1}$ totales	$\mu\text{g L}^{-1}$ encontrados	% recuperación
AsC	133	$135 \pm 5$	$102 \pm 5$
As(III)	60	$64 \pm 4$	$107 \pm 4$
DMA	217	$230 \pm 9$	$106 \pm 9$
MMA	168	$163 \pm 5$	$97 \pm 5$
As(V)	410	$394 \pm 9$	$96 \pm 9$
AsB	560	$560 \pm 6$	$100 \pm 6$

Se observa que, para todas las especies de arsénico, los valores de recuperación están próximos al 100%, lo que confirma la validez del método propuesto para la determinación de las especies estudiadas en este tipo de muestras.

#### VI.4.3.- Determinación de las especies de arsénico por HPLC (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS en base a la exclusión selectiva de especies con cartucho aniónico (IC-OH) conectadas a la válvula de inyección

El método desarrollado se aplicó a la determinación de las seis especies de arsénico en agua mineral, en un agua de desecho (alcantarilla), en agua de mar (puerto),

en el extracto sintético de pescado (suministrado por el Programa de Ensayos, Medidas y Pruebas (M&T)) y en el extracto sintético de sedimento (suministrado por el Programa de Ensayos, Medidas y Pruebas (M&T)). La concentración de cada compuesto de arsénico en la muestra se calculó por lectura directa de la señal obtenida, en cada caso, en el calibrado correspondiente a cada una de las especies.

Los resultados obtenidos para cinco determinaciones en cada muestra se resumen en la *Tabla XXXVII*.

**Tabla XXXVII.- Especiación de arsénico en aguas y extracto de pescado y sedimento empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS a pH 6.0, con y sin cartucho aniónico. Resultados expresados en concentración de arsénico.**

Especie	Agua mineral ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Agua de desecho ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Agua de mar (puerto) ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Extrac. sedimento ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Extrac. pescado ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
AsC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	106 $\pm$ 7
As(III)	n.d.	7.4 $\pm$ 0.2	n.d.	n.d.	n.d.
DMA	n.d.	n.d.	n.d.	83 $\pm$ 3	140 $\pm$ 10
MMA	n.d.	n.d.	n.d.	182 $\pm$ 8	110 $\pm$ 8
As(V)	51 $\pm$ 6	n.d.	n.d.	340 $\pm$ 10	347 $\pm$ 20
AsB	n.d.	30 $\pm$ 2	47 $\pm$ 1	n.d.	450 $\pm$ 30

n.d. = no detectado

Al igual que en el caso anterior, en la muestra de agua mineral sólo se ha detectado la presencia de As(V), debido a la ausencia de actividad biológica. Sin embargo, en el agua de desecho aparecen, de nuevo, tanto especies inorgánicas (As(III)) como orgánicas (AsB), por las mismas razones comentadas anteriormente.

Por otro lado, el análisis de agua de mar portuaria muestra que la mayor parte del arsénico presente se encuentra en forma de AsB, hecho que puede deberse a una gran actividad biológica. El resto de las especies, si existen, están en concentraciones que quedan por debajo del límite de detección del método.

Como se puede observar en la *Tabla XXXVII*, el extracto de sedimento contiene principalmente arsénico inorgánico, en forma de As(V), si bien aparecen también las especies metiladas, MMA y DMA, aunque en menor proporción.

Por último, las especies encontradas en el extracto de pescado son, esencialmente, los derivados orgánicos, a excepción del As(V), cuyo contenido es también considerable.

Además, con el fin de evaluar la exactitud del método propuesto, se han realizado estudios de recuperación, añadiendo una cantidad de arsénico de  $60 \mu\text{g L}^{-1}$ , en cada especie, a una alícuota del extracto sintético de pescado. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla XXXVIII*.

**Tabla XXXVIII.- Recuperación de las seis especies de arsénico en el extracto sintético de pescado empleando cromatografía de cambio aniónico (columna Hamilton PRP-X 100)-MO-HG-AAS, con y sin cartucho aniónico, a pH 6.0.**

Especie	$\mu\text{g L}^{-1}$ totales	$\mu\text{g L}^{-1}$ encontrados	% recuperación
AsC	166	$158 \pm 6$	$95 \pm 6$
As(III)	60	$66 \pm 5$	$110 \pm 5$
DMA	200	$216 \pm 9$	$108 \pm 9$
MMA	170	$178 \pm 8$	$105 \pm 8$
As(V)	407	$391 \pm 10$	$96 \pm 10$
AsB	510	$551 \pm 12$	$108 \pm 12$

Se observa que, para todas las especies de arsénico, los valores de recuperación están próximos al 100%, lo que confirma la validez del método propuesto para la determinación de las especies estudiadas en este tipo de muestra.

## PRECONCENTRACIÓN DE ESPECIES TÓXICAS DE ARSÉNICO MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

### VII.1.- INTRODUCCIÓN

El daño producido por la ingestión o exposición a una cantidad relativamente alta de arsénico depende de las especies químicas que se encuentren presentes en los alimentos o en las muestras medioambientales. Como ya se ha comentado, las especies de arsénico tóxicas son las especies inorgánicas, As(III) y As(V), y las orgánicas MMA y DMA, mientras que las especies no tóxicas o prácticamente inocuas son AsB y AsC. Por tanto, es importante cuantificar la concentración total de arsénico tóxico y, por otro lado, es esencial poder determinar individualmente cada especie tóxica, ya que el grado de toxicidad varía de una a otra.

En los últimos años, el desarrollo de la metodología para la diferenciación de las especies de arsénico ha sido el proyecto principal de algunos grupos de investigación, y se ha centrado en el acoplamiento de técnicas de separación con diversas técnicas de detección. Sin embargo, incluso con las técnicas más desarrolladas, los límites de detección se encuentran por encima de la concentración de estas especies en la mayoría de las muestras reales. Esta limitación se está intentando superar mediante una etapa previa de preconcentración de las especies, como paso previo a la separación y detección de las mismas. Este estudio se ha centrado en el desarrollo de un método capaz de preconcentrar las especies tóxicas de arsénico y cuantificar, tanto su contenido total, como la concentración de cada una de las especies, mediante los métodos anteriormente desarrollados, FI-HG-AAS y HPLC-HG-AAS, respectivamente.



En el apartado VI.4.3 se mostró la capacidad de la extracción en fase sólida, empleando cartuchos aniónicos (IC-OH) a través de los cuales se inyectaba la muestra en el sistema HPLC-MO-HG-AAS para eliminar las especies aniónicas de arsénico (que quedaban retenidas en la fase sólida) y así, poder determinar las especies catiónicas AsB y AsC. Basándose en los resultados obtenidos en dicho capítulo, se ha investigado la posibilidad de emplear este tipo de cartuchos aniónicos con objeto de preconcentrar las especies de arsénico tóxicas, antes de su cuantificación.

La extracción en fase sólida utiliza el mismo principio de retención selectiva que caracteriza la técnica de separación en HPLC. Los cartuchos de extracción se asemejan al cuerpo de una jeringuilla de plástico y están rellenos con cierta variedad de absorbente de sílice, químicamente ligada a determinados grupos funcionales. En este trabajo se han empleado cartuchos Accell Plus QMA (Sep-pak VAC 6cc de 500 mg) con grupos funcionales:  $-C(O)NH(CH_2)_3N(CH_3)_3^+ Cl^-$ . Mediante esta fase ligada es posible retener compuestos con grupos funcionales que tengan carga negativa, a partir de una disolución de reducida fuerza iónica. El procedimiento se muestra esquematizado en la Figura 35.

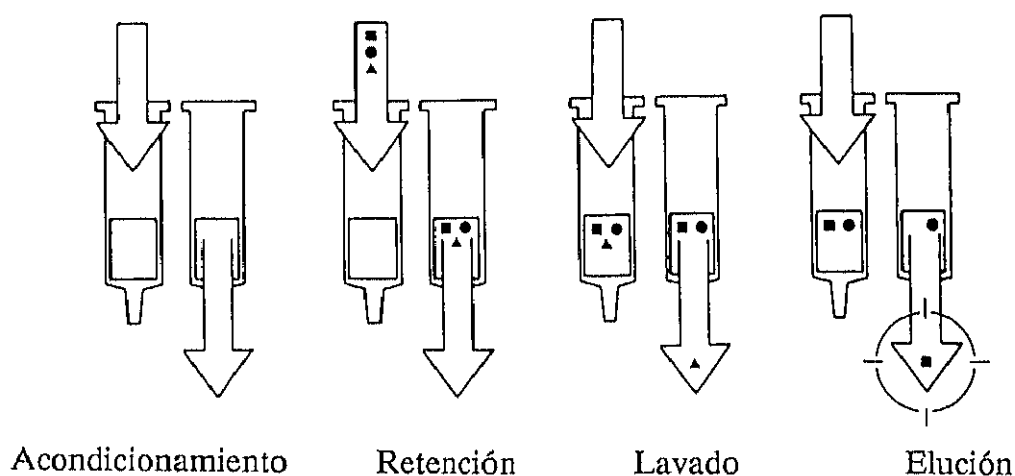


Figura 35.- Representación esquemática de un procedimiento de preconcentración en cartuchos.

La primera etapa consiste en el *ACONDICIONAMIENTO* de la fase estacionaria, con el fin de asegurar una retención reproducible de los componentes de interés. A continuación, se procede a la *RETENCIÓN* de los analitos de interés, haciendo pasar la muestra a través del cartucho. Esta etapa, además de servir para la preconcentración de los compuestos que se van a analizar, puede aprovecharse para eliminar algún otro componente de la muestra no deseado que atravesase la fase estacionaria sin quedar retenido. Sin embargo, si alguno de los compuestos que no son de interés quedaran retenidos en el cartucho, puede introducirse una etapa de *LAVADO*, con algún disolvente capaz de extraerlos sin arrastrar los analitos. Por último, se procede a la *ELUCIÓN* de los componentes de interés, utilizando la mínima cantidad necesaria de eluyente con el fin de obtener el mayor factor de preconcentración posible.

Por tanto, los parámetros a optimizar son: en el proceso de preconcentración, naturaleza y concentración de la disolución acondicionadora y pH de la muestra y en el proceso de elución, naturaleza, concentración y pH del eluyente.

## VII.2.- MÉTODOS EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE ARSÉNICO TÓXICO E INDIVIDUAL DE CADA ESPECIE TÓXICA

Como ya se estudio en el *apartado V.1.(6)*, la eficiencia de la generación de hidruros a partir de las especies tóxicas de arsénico, As(III), As(V), DMA y MMA, es idéntica cuando se utiliza HCl 1 mol L<sup>-1</sup>. Por lo tanto, el contenido total de las especies tóxicas de arsénico se ha determinado trabajando con una concentración de HCl 1 mol L<sup>-1</sup> y NaBH<sub>4</sub> al 3% (m/v). El sistema empleado para este fin es un acoplamiento en línea FI-HG-AAS, que se representa esquemáticamente en la *Figura 36A*.

Para determinar individualmente las especies de arsénico tóxicas, se ha empleado el sistema HPLC-HG-AAS y se encuentra representado en la *Figura 36B*.

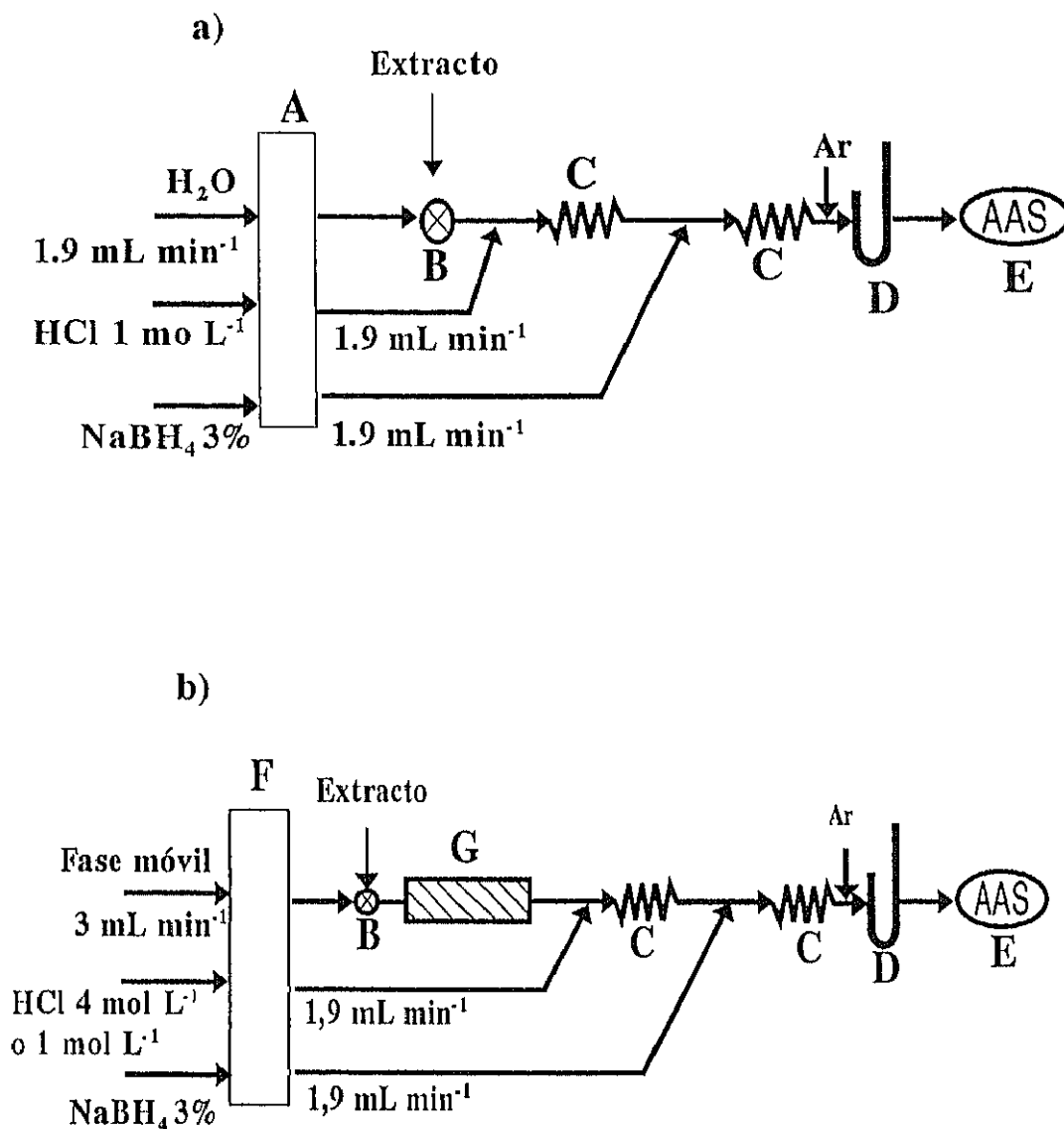
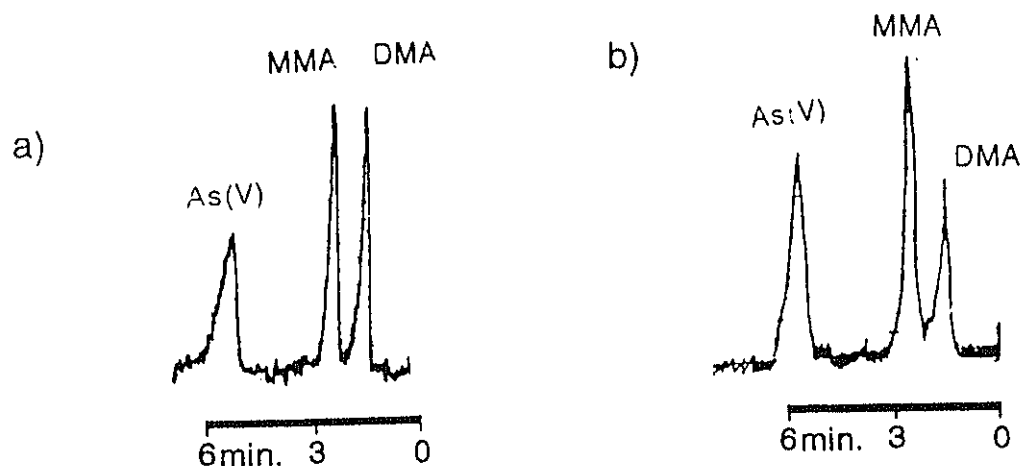


Figura 36.- Representación esquemática del sistema A) FI-HG-AAS para la determinación del arsénico tóxico total y B) HPLC-HG-AAS para la determinación individual de arsénico inorgánico, MMA y DMA.

- A- Bomba peristáltica de 4 canales
- B- Válvula de inyección de 6 vías, con un bucle de  $100 \mu\text{L}$
- C- Bucles de mezcla y reacción
- D- Separador gas-líquido
- E- Espectrofotómetro de absorción atómica
- F- Bomba de HPLC
- G- Columna Aniónica (Hamilton PRP-X100, 250 mm x 4.1 mm i.d.)

Como se puede observar en el esquema, la concentración de HCl empleada no es la misma en ambos sistemas ya que, como se ha comentado anteriormente, para poder cuantificar el contenido total de arsénico tóxico es necesario obtener la misma eficiencia de formación del hidruro a partir de todas las especies consideradas como tóxicas, y esto se cumple cuando se emplea una concentración de HCl 1 mol L<sup>-1</sup>. Sin embargo, para realizar la determinación individual de estas especies, mediante el sistema HPLC-HG-AAS, no es necesario obtener la misma sensibilidad para todas ellas y, además, la eficiencia de generación del hidruro a partir de As(V) y MMA es mayor empleando una concentración de HCl 4 mol L<sup>-1</sup>. Este efecto se puede observar en los cromatogramas que se muestran en la *Figura 37*, obtenidos a partir de una mezcla de As(V), MMA y DMA que contiene 150 µg L<sup>-1</sup> de cada especie, empleando ambas concentraciones de HCl. Con el fin de obtener la máxima sensibilidad para todas las especies, se empleó una concentración de HCl 4 mol L<sup>-1</sup> para la determinación de As(V) y MMA y 1 mol L<sup>-1</sup> para DMA.



**Figura 37.-** Cromatogramas obtenidos a partir de una mezcla de As(V), MMA y DMA de 150 µg L<sup>-1</sup> de arsénico en cada especie, empleando el sistema HPLC-HG-AAS con una concentración de HCl A) 1 mol L<sup>-1</sup> B) 4 mol L<sup>-1</sup>.

### VII.3- OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA RETENCIÓN DE LAS ESPECIES TÓXICAS DE ARSÉNICO.

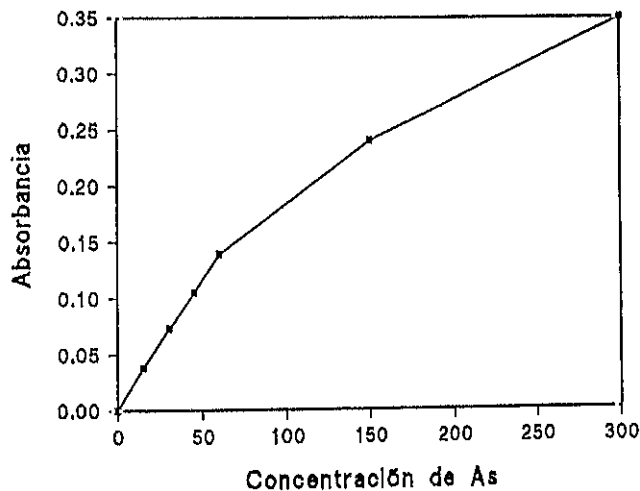
Con el fin de conseguir una preconcentración eficiente, fue necesario acondicionar estos cartuchos con una solución cuyo pH fuera superior al mayor  $pK_a$  de las especies a preconcentrar. Además, el anión de esta disolución acondicionador, que por otra parte es el que se une al radical activo del cartucho, tenía que intercambiarse fácilmente por el de las especies de arsénico. Debido a que la fase móvil empleada para la separación cromatográfica de las especies de arsénico es fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> de pH 6.0 y al gran intervalo de pH con el que puede trabajarse con este eluyente, se estudiaron distintas concentraciones de este eluyente como disolución acondicionadora, obteniéndose los mejores resultados para una disolución de Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20 mmol L<sup>-1</sup> de pH 12.

De forma similar, se ha estudiado el efecto que produce el pH de la muestra sobre la preconcentración de estas especies de arsénico. Este estudio se llevó a cabo en el intervalo de pH de 7 - 12, usando disoluciones reguladoras de fosfato. Los mejores resultados se obtienen, como era de esperar, para pH superiores al mayor valor de  $pK_a$  de estas especies, que corresponde al As(III) ( $pK_a=9.3$ ) y, por lo tanto, se ha seleccionado pH 12.0 como óptimo para acondicionar la muestra, antes de proceder a su retención en el cartucho.

Se observó que cuando se emplean volúmenes de muestra superiores a 25 mL, la retención de As(III), independientemente de la concentración de la disolución, oscila entre 60-80%, probablemente debido a que el arsenito es una base débil y es eluido por efecto lavado, lo que hace que el método no sea operativo para esta especie. Por lo tanto, en lugar de cuantificar individualmente las dos especies de arsénico inorgánico, se ha optado por realizar la determinación global de As(V) y As(III). Para ello es necesario realizar una transformación previa del As(III), que pudiera encontrarse en la muestra, a As(V). Esta oxidación se ha llevado a cabo empleando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 110 volúmenes en proporción 1:200 con respecto a la muestra (0.5 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 110 vol. por cada 100 mL de muestra). Como consecuencia, al no haber As(III), que es la especie

que presenta el  $pK_a$  más alto (9.3), no es necesario que el pH de la muestra sea tan básico. Por tanto, para el resto de los experimentos el pH de la muestra se ha ajustado a pH 10. En estas condiciones, se obtuvo una eficiencia de preconcentración del 98-100% para el As(III), una vez oxidado a As(V), y del 96-100% para el As(V) original, DMA y MMA. Se ha estudiado la capacidad de retención de estos cartuchos para As(V), MMA y DMA variando, por un lado, el volumen de muestra, manteniendo constante la concentración de las especies, y por otro, variando la concentración de arsénico a la vez que se mantiene constante el volumen de disolución que atraviesa el cartucho.

El primero de estos estudios se llevó a cabo variando el volumen de muestra en el intervalo de 100 - 1000 mL para una concentración de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de As en cada especie. Las especies retenidas se eluyeron con 10 mL de ácido fosfórico de concentración  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 2.0. Los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 38*.



**Figura 38.-** Influencia del volumen de muestra sobre la capacidad de retención de estos cartuchos para As(V), MMA y DMA. Concentración de arsénico:  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada especie. Volumen de elución: 10 mL de ácido fosfórico  $40 \text{ mmol L}^{-1}$  a pH 2.0.

Se observa un cambio brusco de pendiente alrededor de 500 mL. Con el fin de comprobar si el cambio brusco de pendiente se debía a la saturación del cartucho o a la saturación del detector, se realizaron la correspondiente dilución de los puntos que no cumplían la linealidad, observando que la no linealidad se debe a la saturación del

detector. Por tanto, se obtuvieron recuperaciones próximas al 100% para todas las especies, en todos los volúmenes estudiados.

De forma análoga se realizó el segundo estudio, variando la concentración de cada una de las especies de arsénico en la muestra, entre 0.1 - 1.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , manteniendo el volumen constante en 500 mL. En todos los casos se observan eficiencias de retención del 100%. No se ensayaron cantidades de arsénico superiores porque carece de interés analítico para el fin que pretende esta investigación, que es aplicarlo a muestras medioambientales.

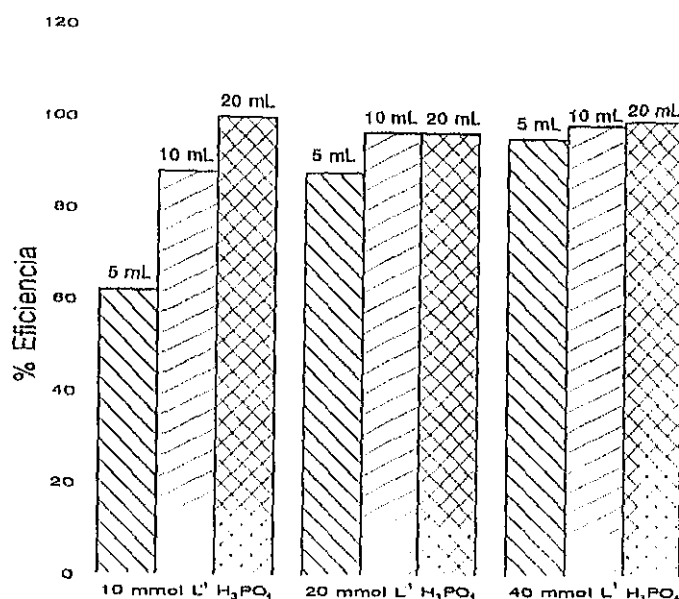
#### **VII.4.- OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS QUE AFECTAN A LA ELUCIÓN DE LAS ESPECIES TÓXICAS DE ARSÉNICO**

Los parámetros de elución mas importantes son el pH, el volumen y la naturaleza de la disolución eluyente.

Para que se liberen del cartucho los compuestos aniónicos de arsénico, retenidos previamente, es necesario que se produzca una protonación de los mismos y a su vez, que los centros activos del cartucho queden ocupados por otro anión. Un pH de 2.0 asegura la protonación del As(V) que es el ácido más fuerte en su última protonación. Por otra parte y considerando que la fase móvil del módulo cromatográfico es fosfato 17 mmol  $\text{L}^{-1}$  de pH 6.0, y que el eluyente del cartucho ha de ser compatible con la posterior separación cromatográfica, se ha estudiado para la elución una disolución reguladora de fosfato 17 mmol  $\text{L}^{-1}$ , variando el pH entre 2.0 - 7.0. Para ello, se hace pasar a través del cartucho 100 mL de una disolución mezcla que contiene 100 ng de arsénico en cada especie. Los mejores resultados se obtuvieron trabajando con la disolución de pH 2.0.

Por otro lado, se estudió el volumen y concentración de la disolución reguladora de fosfato de pH 2.0 necesarios para obtener una recuperación cuantitativa de todas las especies. Para ello, se hace pasar a través del cartucho 100 mL de una disolución mezcla

que contiene 100 ng de arsénico en cada especie. Los volúmenes de elución estudiados fueron de 5, 10 y 20 mL de ácido fosfórico de concentraciones 10, 20 y 40 mmol L<sup>-1</sup>, a un pH fijo de 2.0. Los resultados obtenidos se representan en la *Figura 39*.



**Figura 39.-** Influencia del volumen y concentración de ácido fosfórico a pH 2.0 sobre la eficiencia de elución de As(V), MMA y DMA (100 ng de cada especie), empleando para su determinación el sistema FI-HG-AAS.

Como se puede observar, la eficiencia en la elución de las especies objeto de estudio depende, tanto del volumen de elución como de la concentración del eluyente. Para una concentración de fosfato de 10 mmol L<sup>-1</sup>, sólo se obtiene una eficiencia de elución total cuando se emplea un volumen de 20 mL. Por otro lado, cuando se utiliza una concentración de fosfato de 20 mmol L<sup>-1</sup>, la eficiencia es total con un volumen de 10 mL y de 20 mL. Sin embargo, cuando se emplea fosfato 40 mmol L<sup>-1</sup>, la eficiencia es total para un volumen de 10 mL y de, aproximadamente, el 95% con 5 mL. Por tanto, con el fin de eluir con seguridad todas las especies estudiadas, se han escogido como volumen de elución y concentración óptimos 10 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> de 40 mmol L<sup>-1</sup>.



## VII.5.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

### *Curvas de calibrado*

Para un volumen de muestra de 100 mL y en las condiciones de trabajo previamente optimizadas, se han obtenido calibrados lineales para las especies estudiadas, en el intervalo de concentración comprendido entre 5 - 15 ng L<sup>-1</sup> de arsénico en la muestra original. Además, se han comparado las pendientes de estas curvas de calibrado con las obtenidas a partir de disoluciones patrón, sin realizar la etapa de preconcentración, de concentraciones de arsénico comprendidas en el intervalo de 50 - 150 ng L<sup>-1</sup> en cada especie (concentración equivalente a la de la muestra tras la preconcentración suponiendo una eficiencia en el proceso de preconcentración/elución del 100%). La determinación se ha realizado empleando el sistema HPLC-HG-AAS, anteriormente expuesto, y trabajando con dos concentraciones de HCl, 1 y 4 mol L<sup>-1</sup>. Las medidas analíticas se han realizado en altura de pico. Los valores de la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de las curvas de calibrado obtenidas, con y sin preconcentración, para cada especie se recogen en la *Tabla XXXIX*.

Como se puede observar, las pendientes de las curvas de calibrado para cada especie empleando preconcentración son similares a las obtenidas con los patrones sin preconcentrar, lo que permite calcular la concentración de cada compuesto interpolando la señal obtenida a partir del extracto del cartucho en la curva de calibrado sin preconcentración correspondiente, lo cual hace el método más rápido para su aplicación a muestras de agua (mineral o de río) reales.

Tabla XXXIX.- Parámetros de las curvas de calibrado para la determinación de arsénico inorgánico, DM MMA en el intervalo de concentración de 50 - 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie, empleando HPLC-HG-AAS.

		DMA		MMA		Arsénico inorgánico	
		A	B	A	B	A	B
HCl 4 mol/L	Pendiente ( $10^4$ ) u.A. $\mu\text{g}^{-1}$ L	5.4 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.1	10.5 $\pm$ 0.2	10.7 $\pm$ 0.2	5.38 $\pm$ 0.06	5.4 $\pm$ 0.4
	Ord. Orig. u.A.	0.013 $\pm$ 0.002	0.012 $\pm$ 0.001	0.019 $\pm$ 0.002	0.020 $\pm$ 0.002	0.017 $\pm$ 0.001	0.015 $\pm$ 0.002
	Coef. corr.	0,9992	0,9998	0,9997	0,9997	0,99990	0,9992
HCl 1 mol/L	Pendiente ( $10^4$ ) u.A. $\mu\text{g}^{-1}$ L	11.8 $\pm$ 0.8	12 $\pm$ 1	7.8 $\pm$ 0.2	7.7 $\pm$ 0.5	2.52 $\pm$ 0.03	2.56 $\pm$ 0.06
	Ord. Orig. u.A.	0.009 $\pm$ 0.007	0.002 $\pm$ 0.002	0.010 $\pm$ 0.002	0.010 $\pm$ 0.006	0.022 $\pm$ 0.001	0.010 $\pm$ 0.008
	Coef. corr.	0,993	0,994	0,9991	0,996	0,9998	0,9995

A: con preconcentración

B: sin preconcentración

De la misma forma se compararon los parámetros de las curvas de calibrado con y sin preconcentración para la determinación total de arsénico tóxico por FI-HG-AAS. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla XL*.

**Tabla XL.-** Parámetros de las curvas de calibrado para la determinación global de las especies tóxicas de arsénico en el intervalo de concentración de 5 - 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico, empleando FI-HG-AAS.

	Arsénico Tóxico	
	A	B
Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ ( $\times 10^3$ )	1.91 $\pm$ 0.05	1.87 $\pm$ 0.07
Ordenada en el origen, u.A.	0.003 $\pm$ 0.001	0.005 $\pm$ 0.003
Coefficiente de correlación	0.9994	0.9997

A: con preconcentración

B: sin preconcentración

A la vista de los resultados, se puede concluir que ambas pendientes son prácticamente iguales, por lo que la concentración de arsénico tóxico total, tras la preconcentración, puede calcularse, por interpolación directa de la señal medida inyectando el extracto del cartucho, en la curva de calibrado de As(V) obtenida sin la etapa previa de preconcentración.

**Reproducibilidad**

Con el fin de evaluar la reproducibilidad del método propuesto para la preconcentración y determinación de arsénico tóxico total empleando el sistema FI-HG-AAS, se ha aplicado dicho método a cinco disoluciones de cada compuesto (As(V), MMA ó DMA), a dos niveles de concentración, 3 y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Por otro lado, se ha estudiado la reproducibilidad del método para la determinación individual de las especies tóxicas, aplicándolo a cinco disoluciones mezcla que contienen 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada compuesto, empleando el sistema HPLC-HG-AAS, para un volumen de muestra de 100 mL.

Los resultados de ambos estudios se recogen en la *Tabla XLI*.

**Tabla XLI.- Reproducibilidad del método para la determinación del contenido global de arsénico tóxico y de arsénico inorgánico, MMA y DMA individualmente, empleando preconcentración y el sistema FI-HG-AAS o HPLC-HG-AAS, respectivamente. (n=5)**

	Concentración	As(V) [% R.S.D.]	MMA [% R.S.D.]	DMA [% R.S.D.]
FI-HG-AAS	3 $\mu\text{g L}^{-1}$	5.7	5.2	4.2
	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	1.7	1.4	2.0
HPLC-HG-AAS	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	4.8	4.3	4.5

Se observa que, en todos los casos, el % R.S.D. está próximo al 5%, lo que indica la buena reproducibilidad de los métodos propuestos para la preconcentración y determinación de los compuestos tóxicos de arsénico, ya sea de manera global o individual.

### *Límites de detección*

Se han calculado los límites de detección para cada una de las tres especies de arsénico preconcentradas y detectadas mediante HPLC-HG-AAS, y para la determinación del contenido total de arsénico tóxico, para un volumen de muestra de 100 mL y un volumen de elución de 10 mL, que corresponde a un factor de preconcentración de 10. Los valores así obtenidos se recogen en la *Tabla XLII*.

**Tabla XLII.- Límite de detección de la determinación de arsénico total y arsénico inorgánico, MMA y DMA, mediante FI-HG-AAS y HPLC-HG-AAS, respectivamente.**

	L.D. ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Arsénico inorgánico	0.6
DMA	0.2
MMA	0.3
Arsénico total	0.1

### *Estudio de interferencias*

Por último, se han estudiado las posibles interferencias que pueden presentarse en el proceso de preconcentración. Los compuestos que pueden interferir en esta etapa tienen que tener carácter aniónico, ya que son los que pueden competir con las especies de arsénico por los centros activos de la resina de intercambio. Las especies aniónicas que pueden aparecer en mayor concentración, normalmente, en muestras de agua son  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  ó  $\text{SO}_4^{2-}$ , por lo que estas han sido las interferencias estudiadas. Para ello, se preconcentraron 100 mL de disoluciones que contenían  $4 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico, en forma

de As(V), y concentraciones variables del anión interferente, comprendidas en el intervalo de 0 - 100 mg L<sup>-1</sup>. Estas disoluciones están preparadas a partir de NaNO<sub>3</sub>, NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, respectivamente. Los resultados obtenidos se representan en la *Figura 40*.

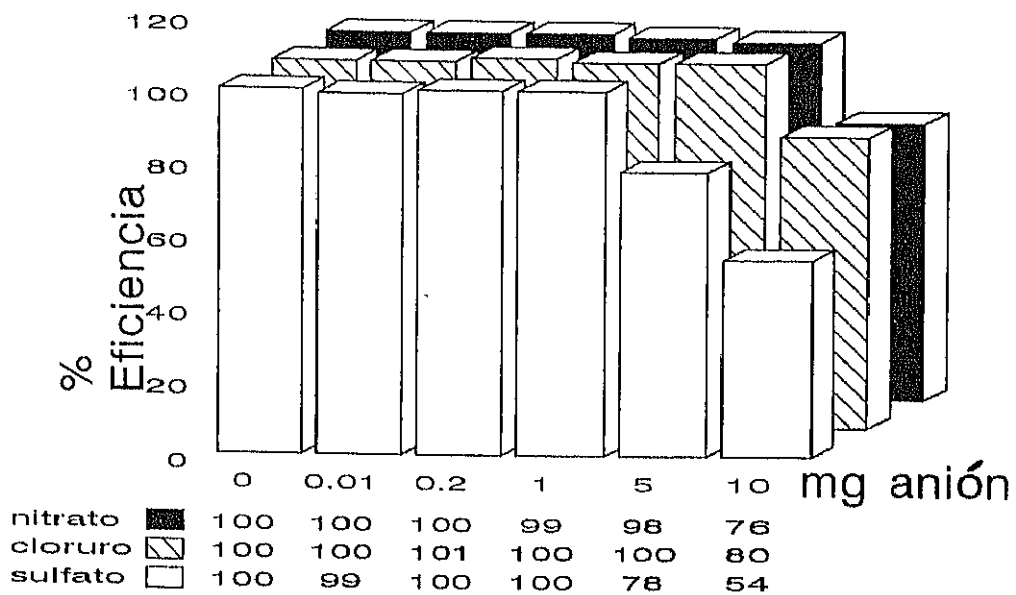


Figura 40.- Eficiencia de la preconcentración de 4 µg L<sup>-1</sup> de As(V) en presencia de cantidades variables de Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

Como se puede observar, la eficiencia de la preconcentración de arsénico es del 100% en disoluciones de contenido salino no muy elevado, hasta 5 mg de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y Cl<sup>-</sup>, preconcentrados en el cartucho, y de 1 mg para SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Por tanto, el método propuesto puede ser aplicado a la determinación de arsénico tóxico en agua mineral o agua dulce natural, pero no puede utilizarse para preconcentrar arsénico tóxico a partir de agua de mar, debido a la gran concentración de aniones que contiene este tipo de muestra.

## VII.6.- APLICACIONES ANALÍTICAS

El método desarrollado se aplicó a la determinación de arsénico tóxico total o de las especies tóxicas individualmente, en agua mineral y agua de río. Como era de esperar, en este tipo de muestras no se encontró arsénico tóxico en concentraciones por encima del límite de detección del método. Por tanto, con el fin de evaluar la exactitud del método propuesto, se han realizado estudios de recuperación en ambas muestras, añadiendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada especie de arsénico tóxico (As(V), MMA y DMA) a tres alícuotas de cada muestra para realizar la determinación individual, y  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada especie, a otras tres alícuotas, para la determinación de arsénico tóxico total. En ambos casos se preconcentraron 100 mL de muestra. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en la *Tabla XLIII*.

Tabla XLIII.- Recuperación de cada una de las especies de arsénico tóxicas y del contenido de arsénico tóxico total en agua mineral y agua de río, empleando preconcentración y el sistema HPLC-HG-AAS y FI-HG-AAS, respectivamente.

	% Recuperación	
	Agua de río	Agua mineral
Arsénico total	$98 \pm 3$	$99 \pm 2$
MMA	$101 \pm 2$	$100 \pm 2$
DMA	$99 \pm 3$	$97 \pm 4$
Arsénico Inorgánico	$96 \pm 5$	$97 \pm 4$

Se observa que, para todas las especies, la recuperación está próxima al 100%, lo que confirma la validez del método propuesto para la preconcentración y determinación individual de las especies tóxicas de arsénico y del contenido de arsénico tóxico total, en este tipo de muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DEL  
CAPÍTULO VI

Anderson R.K., Thompson M. and Culbard E. (1986)  
*Analyst*, 11, 1143.

Welz B. and Sucmanová M. (1993)  
*Analyt*, 118, 1417.





**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE  
ARSÉNICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS COMPLEJAS.  
APLICACIONES ANALÍTICAS**

**VIII.1.- ABSORCIÓN DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO EN HUMANOS**

La ingesta de arsénico en humanos se puede producir a través del consumo de alimentos y/o por exposición, principalmente en individuos dedicados a ciertos trabajos, tales como la fabricación de vidrio, industrias del papel pintado, etc. Se sabe que la toma dietética de derivados de arsénico proviene, fundamentalmente, de los alimentos de origen marino (pescados y mariscos), como se puede deducir a partir de los datos reflejados en la *Tabla XLIV*.

Numerosos estudios han mostrado que la principal especie de arsénico en muestras biológicas marinas es la arsenobetaína (Maher y Butler, 1988), pero también se han determinado otros compuestos en menor proporción, tales como el ión tetrametilarsénico en pescados (Shibata y Morita, 1989), arsenocolina en camarones (Lawrence y col., 1986) y DMA (Shibata y Morita, 1989) y arsénico inorgánico (Shinagawa y col., 1983) en músculo de pescado.

La absorción del arsénico proveniente de los alimentos depende de la especie química en que se encuentre, y se sabe que las especies de arsénico como As(III) y As(V) son bien absorbidas por el tracto gastro-intestinal (>95%). La velocidad de absorción es función de la solubilidad de las especies administradas, por lo que un compuesto de baja solubilidad, como el  $As_2S_3$ , no produce un aumento de arsénico en orina, mientras que la velocidad de absorción de las formas metiladas, MMA y DMA

es alta (>75%) y la AsB es absorbida completamente. Esta velocidad de absorción ha sido estimada estudiando el grado de excreción o por medida de <sup>74</sup>AsB marcado en orina (Brown y col., 1990).

Tabla XLIV.- Concentración media de arsénico ingerido en la dieta de la población danesa (National Food Agency of Denmark, 1990).

Grupo de alimentos	Consumo ((g día <sup>-1</sup> ))	Arsénico (μg g <sup>-1</sup> )	Arsénico ingerido	
			(μg día <sup>-1</sup> )	% del total
Leche y productos lácteos	426	0.007	2.8	2.4
Queso y derivados	50	0.021	1.1	0.9
Cereales y derivados	227	0.037	8.3	7.0
Vegetales y derivados	270	0.019	5.1	4.3
Frutas y derivados	154	0.007	2.2	0.9
Carnes	107	0.024	2.6	2.2
Pescados y derivados	26	3.3	86	72
Aves de corral	13	0.090	1.2	1.0
Bebidas	1653	0.006	9.7	8.2
<i>Total</i>			<i>118</i>	

## VIII.2.- METABOLISMO DEL ARSÉNICO

El metabolismo del arsénico en mamíferos, incluido el hombre, depende de las especies en cuestión. Los principales procesos implicados son dos:

(a) reacciones redox que interconvierten As(III) y As(V) y (b) procesos de metilación que conducen a la formación de MMA, DMA y TMAO.

En la *Figura 41* se presenta un esquema del metabolismo para arsenito y arseniato en humanos (Vahter y Marafante, 1988). Éste muestra que el arsénico inorgánico ingerido es transportado por la sangre al hígado, donde tiene lugar la metilación y el As(V) es, probablemente, reducido a As(III) en la sangre. El mecanismo de metilación sugerido es el de Challenger (1945), descrito en el *Apartado 1.2.3*.

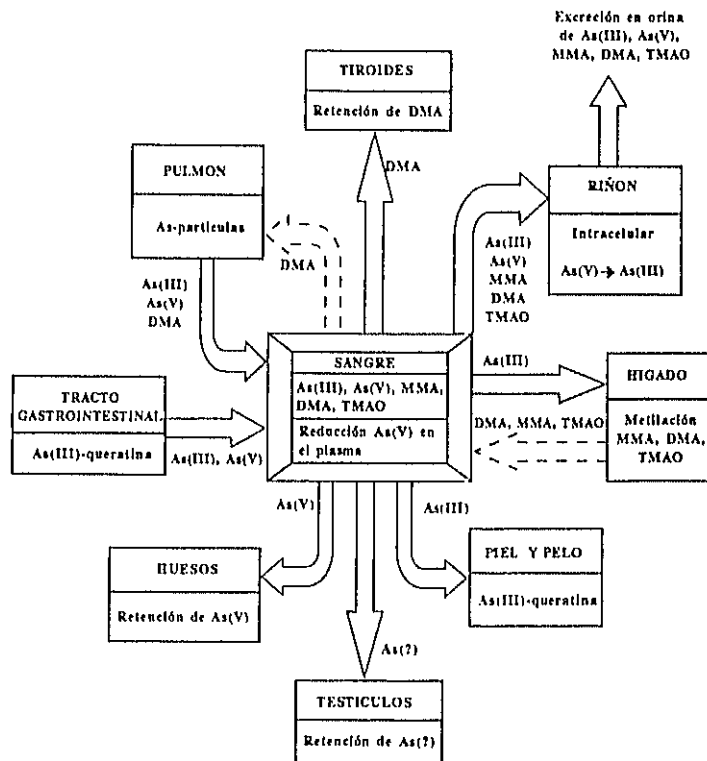


Figura 41.- Biotransformación y retención de arsenito y arseniato en tejidos de mamíferos (Vahter y Marafante, 1988).

Por otro lado, el DMA absorbido es excretado en la orina casi en su totalidad, sin transformación, como se muestra en la *Figura 42* (Marafante y Vahter, 1989). Una pequeña fracción del DMA (<5%) puede ser metilada para formar TMAO.

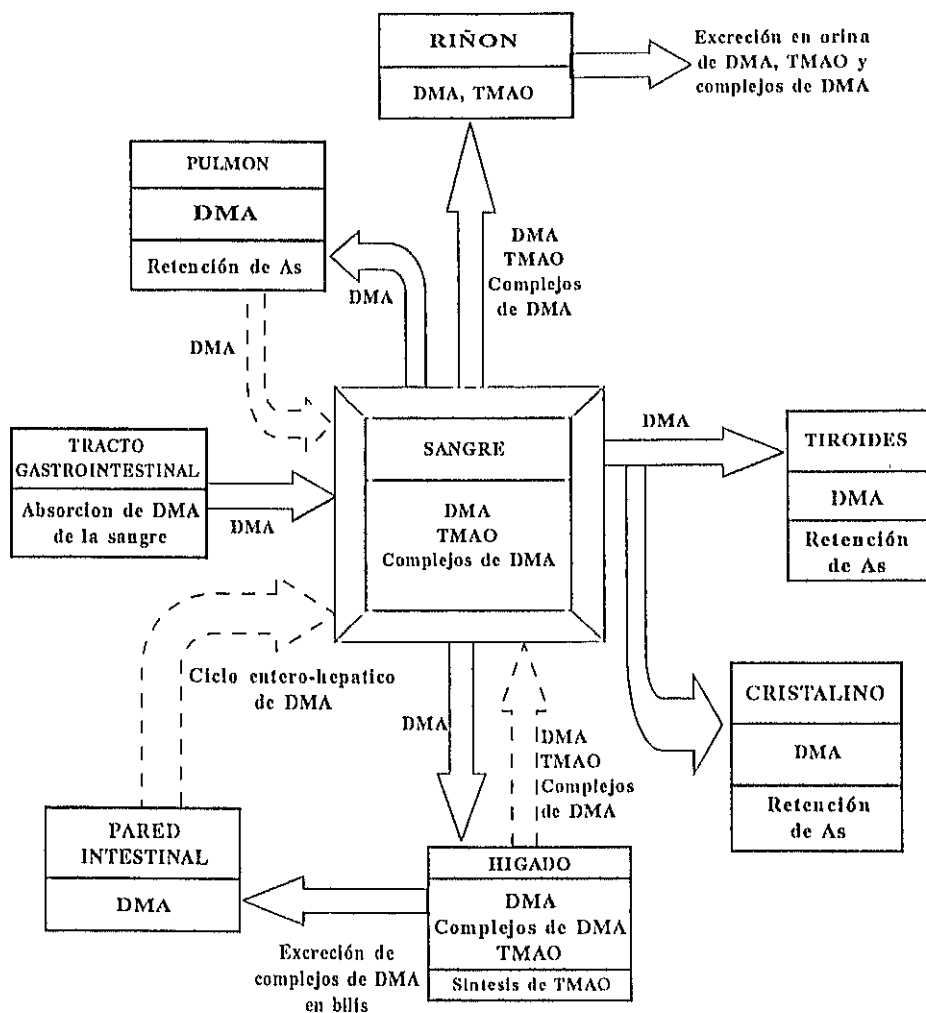


Figura 42.- Biotransformación y retención de DMA en tejidos de mamíferos.

No se ha encontrado ningún trabajo en el que se demuestre que la AsB sufra algún tipo de transformación en mamíferos. Sin embargo, la AsC ingerida es oxidada a AsB, tal y como se muestra en la *Figura 43* (Marafante y Vahter, 1989). Además, la AsC se incorpora a los arsenofosfolípidos y estos son retenidos en los tejidos grasos.

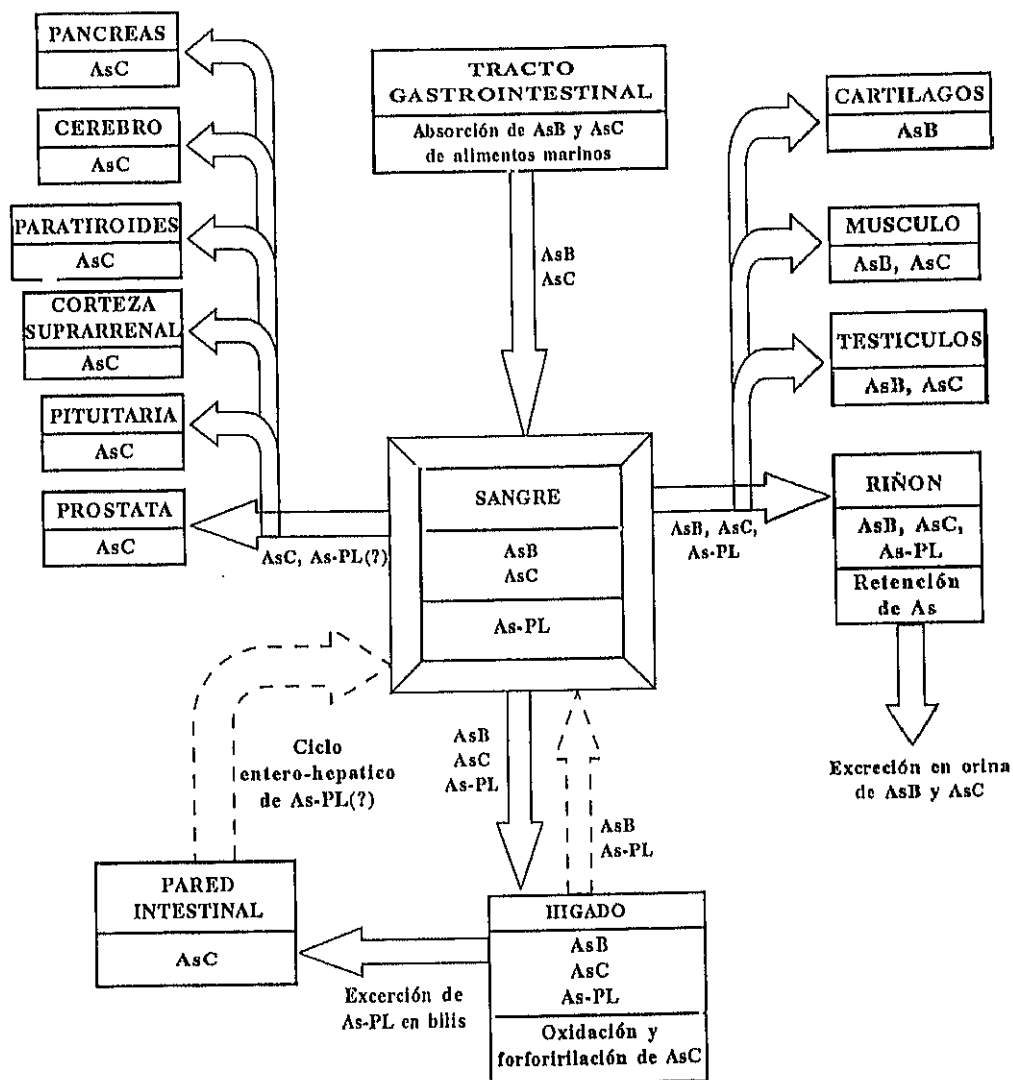


Figura 43.- Biotransformación y retención de AsB y AsC en tejidos de mamíferos.

### VIII.3.- ELIMINACIÓN DE ARSÉNICO

Los diagramas de las *Figuras 41, 42 y 43* muestran que la eliminación de las especies de arsénico se produce a través de la orina, mientras que la eliminación en las heces fecales sólo es significativa para compuestos de arsénico de baja solubilidad, que por otra parte, no han sido detectadas como componentes de alimentos. Del 45-85% del arsénico inorgánico ingerido es excretado en la orina entre el primer y el tercer día a partir de su ingestión, con un tiempo medio de 40-60 horas en la especie humana. Las formas metiladas sufren una eliminación similar a la de las formas inorgánicas. Como ya se ha dicho, el estudio de la eliminación de AsB en humanos ha sido llevado a cabo empleando <sup>74</sup>AsB marcada (Brown y col., 1990). Estos estudios dieron como resultado que, pasado un día, quedaba un 33% de la cantidad administrada en el cuerpo humano y, después de 24 días, sólo permanecía el 1%. En este caso, no se indica la forma química bajo la que se elimina el arsénico marcado ingerido, pero otros estudios (Cannon y col., 1979) sugieren que la AsB no sufre ninguna transformación en el organismo humano. Sin embargo, la AsC se incorpora a los arsenofosfolípidos y éstos son retenidos en los tejidos grasos. La forma de eliminación de estos compuestos en el hombre no es aún conocida.

#### VIII.4.- DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL Y TÓXICO EN ORINA.

Como se ha mostrado anteriormente, el arsénico inorgánico se convierte parcialmente en el organismo en las especies menos tóxicas MMA y DMA mediante mecanismos destoxicadores de metilación, previamente a su eliminación. Mientras que las especies consideradas no tóxicas (AsB y AsC) procedentes de pescados y mariscos sufren la transformación de AsC en AsB, sin embargo, el contenido de especies no tóxicas permanece constante.

Considerando que la orina es la principal vía de eliminación de los compuestos de arsénico para el hombre, y que no se produce transformación en el organismo entre los compuestos tóxicos (As(III), As(V), MMA y DMA) y los no tóxicos (AsB y AsC), la determinación por separado de estos dos grupos de compuestos podría revelar la fuente del arsénico, por exposición (compuestos tóxicos) o por la dieta (compuestos no tóxicos).

Considerando los resultados obtenidos al trabajar con el sistema en línea FI-MO-HG-AAS para efectuar la descomposición cuantitativa y determinación de los organoarsenicales AsB y AsC en aguas (*Apartado V.2.2*), se investigó la conveniencia de emplear este sistema para la determinación por separado de arsénico total y tóxico (As(III), As(V), MMA y DMA) en muestras de orina de individuos que hubieran ingerido pescado y marisco. El sistema empleado para llevar a cabo este estudio está representado en la *Figura 44*.

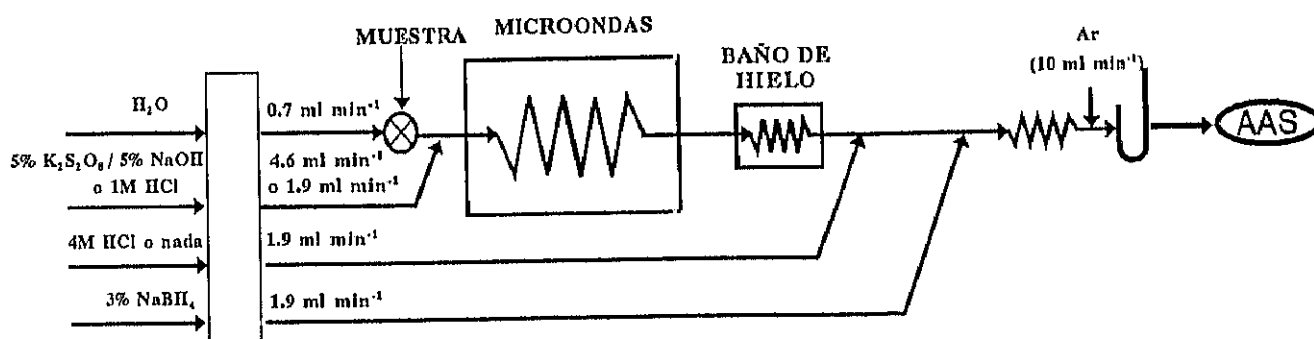


Figura 44.- Representación esquemática de un sistema FI-MO-HG-AAS para la determinación de arsénico total y tóxico en orina.



Los procedimientos seguidos para realizar ambas determinaciones se describen a continuación.

***A) Sistema para la determinación de arsénico total en orina***

Se inyectan 100  $\mu\text{L}$  de muestra en una corriente de agua que fluye a 0.7  $\text{mM min}^{-1}$  y se hace reaccionar con el reactivo oxidante, 5% (m/v)  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  en 5% (m/v)  $\text{NaOH}$  a una velocidad de flujo de 4.6  $\text{mL min}^{-1}$ , en un reactor de 1.5 m que se encuentra situado dentro de un horno microondas encendido a la máxima potencia (700 W). Una vez completada la reacción, la mezcla se enfría haciéndola pasar a través de un tubo sumergido en un baño de hielo, y se procede a la reacción de formación del hidruro (por reacción con  $\text{HCl}$  4  $\text{mol L}^{-1}$  y  $\text{NaBH}_4$  al 3% (m/v)). A continuación se hace pasar la mezcla a través de un separador gas-líquido, donde la fase líquida es desechada y la fase gas, que contiene la arsina, se introduce en una célula de cuarzo (17cm x 12 mm), donde se atomiza, a una temperatura de 900 $^\circ\text{C}$ , con una llama de aire-acetileno.

***B) Determinación de arsénico tóxico (As(III), As(V), MMA y DMA) en orina***

Este sistema es el mismo que el descrito anteriormente para la determinación de arsénico total, y debido a que las cuatro especies a determinar son capaces de formar hidruros, no es necesario introducir el agente oxidante por lo que, en este caso, ha sido sustituido por una corriente de  $\text{HCl}$  1  $\text{mol L}^{-1}$  que, como se demostro en el *Apartado V.I.(6)*, es la necesaria para que la eficiencia de generación de hidruros a partir de las cuatro especies tóxicas sea la misma. Además, se cierra el canal de  $\text{HCl}$  4  $\text{mol L}^{-1}$ , ya que la acidez necesaria para la derivatización a la forma de hidruros ha sido suministrada anteriormente.

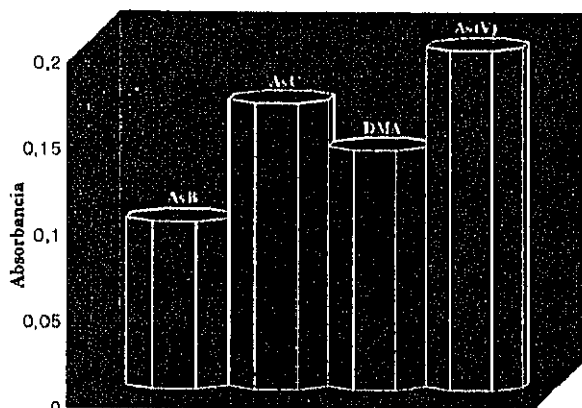
#### VIII.4.1.- Optimización de los parámetros que afectan a la descomposición de los compuestos orgánicos de arsénico en muestras de orina

Se realizó la descomposición de los compuestos organoarsenicales AsB, AsC y DMA, en muestras blanco de orina enriquecidas con estas especies, empleando las condiciones establecidas en el *Apartado V.2.2* como óptimas para muestras acuosas (5%  $K_2S_2O_8$  en 2.5% NaOH a una velocidad de flujo de  $0.6 \text{ mL min}^{-1}$ , longitud del reactor de 1.5 m y potencia del microondas de 700 W). Los resultados obtenidos mostraron que la descomposición de estas especies era incompleta, observándose una eficiencia de generación del 48% para una muestra de orina enriquecida con AsB, con respecto a la que se obtiene empleando una muestra de la misma orina a la que se ha adicionado As(V). Esto nos lleva a sugerir que son necesarias condiciones mas drásticas para transformar la AsB y demás compuestos organoarsenicales cuando se trabaja con matrices complejas, tal como la orina, que contiene cantidades significativas de proteínas, sales minerales, etc.

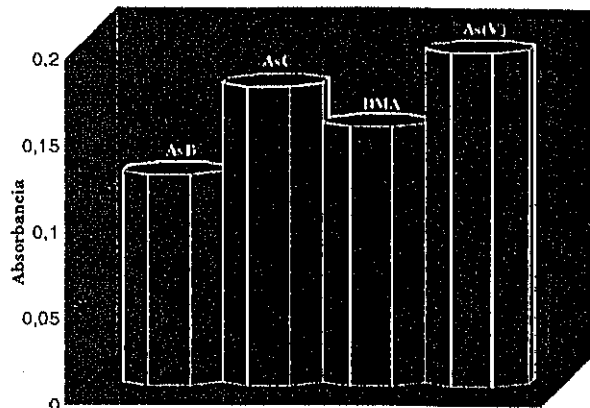
La concentración del agente oxidante, 5% (m/v) de  $K_2S_2O_8$  en 2.5% (m/v) de NaOH, empleada en los estudios anteriores, está próxima a la saturación, por lo que no puede considerarse este parámetro en la optimización, ya que se podrían producir problemas de obturación de tubos con partículas sólidas.

Por consiguiente, se ha llevado a cabo un estudio de la eficiencia de transformación de AsB en muestras de orina, variando la longitud del bucle del reactor desde 1.5 m hasta 5 m. Sin embargo, el 20% de aumento de la eficiencia de generación con respecto al menor tamaño del bucle está lejos de la transformación cuantitativa de la AsB a una especie formadora del hidruro, además, el ruido de fondo aumenta extraordinariamente y el perfil de las señales empeora. A la vista de estos resultados, se estudió el efecto de la velocidad de flujo del reactivo oxidante sobre la eficiencia de descomposición de las especies de arsénico, por lo que se varió dicha velocidad de flujo en el intervalo comprendido entre  $1.6$  y  $4.6 \text{ mL min}^{-1}$ . Los resultados obtenidos en muestras de orina enriquecidas individualmente con AsB, AsC, DMA o As(V) se representan en la *Figura 45*.

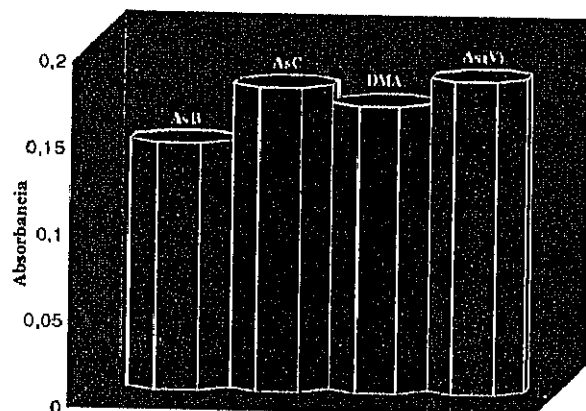
(A)



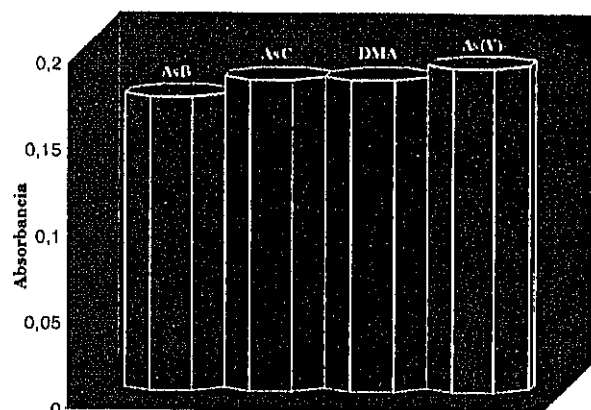
(B)



(C)



(D)



(E)

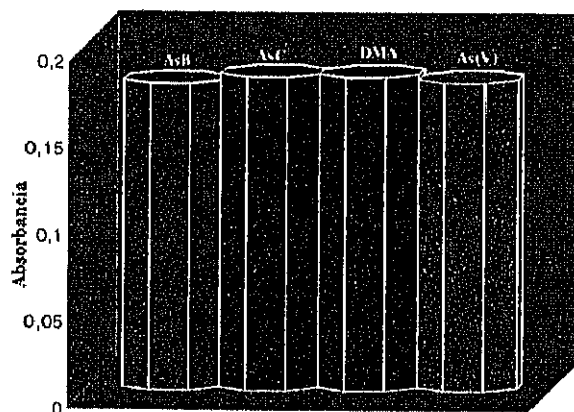


Figura 45.- Influencia del caudal del persulfato potásico, en medio alcalino, sobre la eficiencia de la oxidación asistida por microondas en muestras de orina enriquecidas individualmente con AsB, AsC, DMA ó As(V). Concentración de As: 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Caudal en  $\text{mL min}^{-1}$  de: (A) 1.6; (B) 2.2; (C) 3.1; (D) 4.0 y (E) 4.6.

Como se puede observar, al aumentar la velocidad de flujo del agente oxidante aumenta la eficiencia de transformación de todas las especies hasta obtener, a un caudal de  $4.6 \text{ mL min}^{-1}$ , la misma señal de absorbancia para todas ellas. La señal obtenida a partir del DMA, en estas condiciones, es la misma que la que se obtiene a partir de As(V), lo cual es debido a que al aumentar el caudal del agente oxidante disminuye la acidez del medio, comprobándose, una vez más, que cuando la concentración de HCl se mantiene entre 1 y  $2 \text{ mL L}^{-1}$ , la eficiencia de formación del hidruro se iguala para todas las especies.

#### **VIII.4.2.- Características analíticas del método para la determinación de arsénico total en muestras de orina**

Trabajando en las condiciones citadas anteriormente, se han obtenido calibrados lineales para la determinación de arsénico total en blancos de orina enriquecidos con cada una de las seis especies individualmente, en el intervalo de concentración comprendido entre  $20 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico. Cada punto del calibrado se ha medido por triplicado y la señal analítica considerada ha sido la altura de pico. Los valores de la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de los calibrados obtenidos para cada especie se recogen en la *Tabla XLV*.

Tabla XLV.- Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las seis especies de arsénico, en el intervalo de concentración de 20 - 200  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico, empleando FI-MO-HG-AAS bajo las condiciones descritas para la determinación de arsénico total.

Especie	Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1}\text{L}$ ( $\times 10^4$ )	Ordenada en el origen, u.A.	Coefficiente de correlación
As(III)	$7.4 \pm 0.3$	$0.014 \pm 0.007$	0.995
As(V)	$7.3 \pm 0.5$	$0.02 \pm 0.01$	0.994
AsB	$7.4 \pm 0.3$	$0.018 \pm 0.008$	0.99990
DMA	$7.6 \pm 0.3$	$0.007 \pm 0.004$	0.9998
AsC	$7.5 \pm 0.7$	$0.03 \pm 0.01$	0.994
MMA	$7.5 \pm 0.2$	$0.023 \pm 0.005$	0.998

Se realizó un estudio estadístico para ver si había diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de calibrado correspondientes a cada una de las especies transformadas a As(V) y la pendiente del calibrado de As(V). Este estudio se llevo a cabo mediante la comparación de la  $t_{\text{calculada}}$  de student con la  $t_{\text{tabulada}}$  de student ( $t_{\alpha, n1 + n2 - 4, bil}$ ). La  $t_{\text{calculada}}$  se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$t_{\text{cal}} = \frac{b_1 - b_2}{(Sb_1^2 + Sb_2^2)^{1/2}}$$

donde  $b_1$  es la pendiente correspondiente a la curva de As(V),  $b_2$  la pendiente de la curva de la especie a comparar y  $Sb_1$  y  $Sb_2$  son las desviaciones estándar de dichas pendientes.

Si se cumple que:  $t_{\text{cal}} < t_{\alpha, n1 + n2 - 4, bil}$  se puede decir que las pendientes no difieren significativamente.

Los resultados obtenidos (para un nivel de significación de 0.05) permiten concluir que no existen diferencias significativas entre la pendiente de la curva correspondiente a As(V) y las pendientes de las curvas de cada una de las restantes especies de arsénico estudiadas. Por consiguiente, se puede decir que, en estas condiciones, todas las especies se transforman y generan el hidruro con una eficiencia próxima al 100%, por lo que mediante este método es posible determinar la concentración de arsénico total en orina.

Al igual que en los métodos anteriores, se han calculado la desviación estándar relativa y el límite de detección a partir de las medidas correspondientes a 10 muestras de orina, con un contenido de arsénico total de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . Para ello, se han empleado los mismos criterios que en el *Apartado V.3.2.4*, obteniéndose una precisión (R.S.D) de un 7% y un límite de detección de  $4 \mu\text{g L}^{-1}$ .

El tiempo total requerido para realizar un análisis, empleando FI-MO-HG-AAS para la determinación de arsénico total en muestras de orina, es aproximadamente de 20 s, por lo que se puede decir que la frecuencia de muestreo es elevada.

#### **VIII.4.3.- Características analíticas del método para la determinación de arsénico tóxico en muestras de orina**

En las condiciones citadas anteriormente, se han obtenido calibrados lineales para la determinación de arsénico tóxico en muestras de orina, enriquecidas con cada una de las seis especies individualmente, en el intervalo de concentración comprendido entre  $20 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico. Todas las medidas se han realizado por triplicado y la señal analítica considerada ha sido la altura de pico. Los valores de la pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación de los calibrados obtenidos para cada especie se recogen en la *Tabla XLVI*.

Tabla XLVI.- Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las especies tóxicas de arsénico, en el intervalo de concentración de 20-200  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico, empleando FI-HG-AAS bajo las condiciones descritas para la determinación de arsénico tóxico.

Especie	Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ ( $\times 10^4$ )	Ordenada en el origen, u.A.	Coefficiente de correlación
As(V)	$4.7 \pm 0.2$	$0.015 \pm 0.004$	0.99995
As(III)	$4.5 \pm 0.5$	$0.020 \pm 0.007$	0.9991
DMA	$4.4 \pm 0.6$	$0.030 \pm 0.009$	0.997
MMA	$4.5 \pm 0.4$	$0.02 \pm 0.01$	0.9990

Se realizó un estudio estadístico para ver si había diferencias significativas entre las pendientes de las curvas de calibrado correspondientes a cada una de las especies transformadas a As(V) y la pendiente del calibrado de As(V), tal y como se describe en el apartado anterior. Se puede concluir que, para un nivel de significación de 0.05, en ningún caso existen diferencias significativas entre las pendientes comparadas. Por consiguiente, ya que, en estas condiciones, todas las especies tóxicas generan el hidruro con la misma eficiencia, es posible determinar, mediante la aplicación de este método, la concentración global de arsénico tóxico en orina.

Se han calculado la desviación estándar relativa y el límite de detección a partir de las medidas correspondientes a 10 muestras de orina con un contenido de arsénico de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ , empleando los mismos criterios que en el *Apartado V.3.2.4*, obteniéndose una precisión (R.S.D) de un 4% y un límite de detección de 6  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

#### VIII.4.4.- Aplicaciones analíticas

El método desarrollado se aplicó a la determinación de arsénico total y tóxico en muestras de orina de individuos que habían ingerido previamente algunos alimentos de origen marino. Las muestras de orina fueron aportadas por dos voluntarios que durante tres días siguieron una dieta que excluía todo tipo de alimentos procedentes del mar. La

muestra considerada como blanco de orina era recogida en la mañana del cuarto día. Ese mismo día se consumió una dieta rica en alimentos marinos que consistió en: voluntario 1) cena de 1 Kg de mejillones; y voluntario 2) almuerzo de 300 g de atún enlatado y 150 g de lenguado, y cena de 500 g de mejillones. La muestra de orina para el análisis se recogió en la mañana del quinto día. Tanto las muestra de orina, como los blancos fueron almacenados en la oscuridad a 4°C, sin adición de ningún tipo de conservante, y se analizaron transcurridas entre 2-3 horas a partir de la recogida.

Para la determinación del arsénico total en la orina del voluntario 2, fue necesario hacer diluciones de 1:1 y 1:9 para el blanco y la muestra respectivamente, mientras que, en el caso del voluntario 1, no se realizó dilución en el blanco y fue necesaria una dilución 1:1 para la muestra. Sin embargo, para la determinación del contenido de arsénico tóxico, las medidas se realizaron directamente a partir de las muestras, sin diluciones previas, ya que la concentración global de especies tóxicas es considerablemente menor que la de arsénico total, por lo que es posible la interpolación directa de la señal obtenida en la curva de calibrado. Esto confirma, como se ha comentado anteriormente, que la mayor parte del arsénico ingerido a partir de alimentos de origen marino, se encuentra principalmente en forma de las especies no tóxicas, AsB y AsC, que son detectadas en el análisis de arsénico total, pero no en la determinación de arsénico tóxico.

Los resultados obtenidos para cinco determinaciones en cada muestra se resumen en la *Tabla XLVII*. Las concentraciones de arsénico no tóxico, AsB y AsC, han sido calculadas por diferencia entre la concentración total y la de arsénico tóxico.



Tabla XLVII.- Determinación de arsénico total, tóxico y no tóxico en muestras de orina. Los resultados se expresan en concentración de arsénico;  $\bar{X} \pm s (t / \sqrt{n})$ . (n = 5)

	Contenido de arsénico, $\mu\text{g L}^{-1}$					
	Blanco de orina			Muestra de orina		
	total	tóxico	no tóxico	total	tóxico	no tóxico
Voluntario 1	53 ± 4	38 ± 3	15 ± 5	144 ± 7	49 ± 3	95 ± 6
Voluntario 2	91 ± 6	41 ± 2	50 ± 6	707 ± 18	77 ± 5	630 ± 21

Como se puede observar en la *Tabla XLVII*, el arsénico total en orina aumenta drásticamente después de hacer una dieta rica en alimentos procedentes del mar, especialmente en el voluntario 2, que consumió más variedad y cantidad de este tipo de alimentos, mientras que la concentración de arsénico tóxico se ha incrementado sólo ligeramente del blanco a la muestra. Por tanto, como era de esperar, el aumento se debe principalmente a la ingestión de compuestos de arsénico no tóxico, como AsB y AsC, lo cual concuerda con las especies encontradas en los análisis realizados en muestras de alimentos procedentes del mar (Larsen y col., 1993). Las concentraciones de arsénico en los blancos están próximas a las obtenidas por otros autores (Foa y col., 1984), que observan cantidades traza de compuestos organoarsenicales en muestras de orina de individuos que no ingieren regularmente alimentos procedentes del mar.

## VIII.5.- DETERMINACIÓN INDIVIDUALIZADA DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO EN ORINA

Se han descrito algunos métodos en la bibliografía para determinar las especies de arsénico en muestras de orina empleando acoplamientos tales como HPLC-HG-AAS (Chana y Smith, 1987) o HPLC-ICP-MS (Heitkemper y col., 1989). Sin embargo, como ya se ha dicho, la técnica basada en la generación de hidruros no puede ser usada para la detección de AsB o AsC (Mürer y col., 1992), siendo necesaria una transformación previa de estas especies a otras formadoras de hidruros. El sistema HPLC-MO-HG-AAS, descrito anteriormente para la determinación de seis especies de arsénico en muestras acuosas (*Apartado V.3.1*), se ha empleado en el análisis de estos mismos compuestos en muestras reales de orina.

### V.1.- Pretratamiento de la muestra ("Clean-up")

La orina contiene gran cantidad de sales minerales y materia orgánica, por lo que no es recomendable, para la columna cromatográfica, inyectarlas directamente en el sistema de separación, siendo necesario, por tanto, una "limpieza" previa de la muestra con el fin de poder preservar la columna, no provocar aumentos de presión por ensuciamiento de la cabeza y mantener constante la resolución cromatográfica.

Las muestras que se han empleado en la determinación de las especies de arsénico proceden de cuatro voluntarios que, al igual que en el caso anterior, se han sometido a una dieta con y sin alimentos de origen marino. Los voluntarios 1 y 2 ingirieron gambas, almejas, boquerones y navajas, mientras que el voluntario 3 y 4 ingirieron pescados variados, gambas y almejas.

Tanto los blancos de orina, recogidos a la mañana del cuarto día, como las muestras, recogidas en la mañana del quinto día, se sometieron a un proceso de "clean-up". El procedimiento experimental utilizado es una versión modificada del descrito por Kraus y col., en 1985, y se representa en la *Figura 46*.

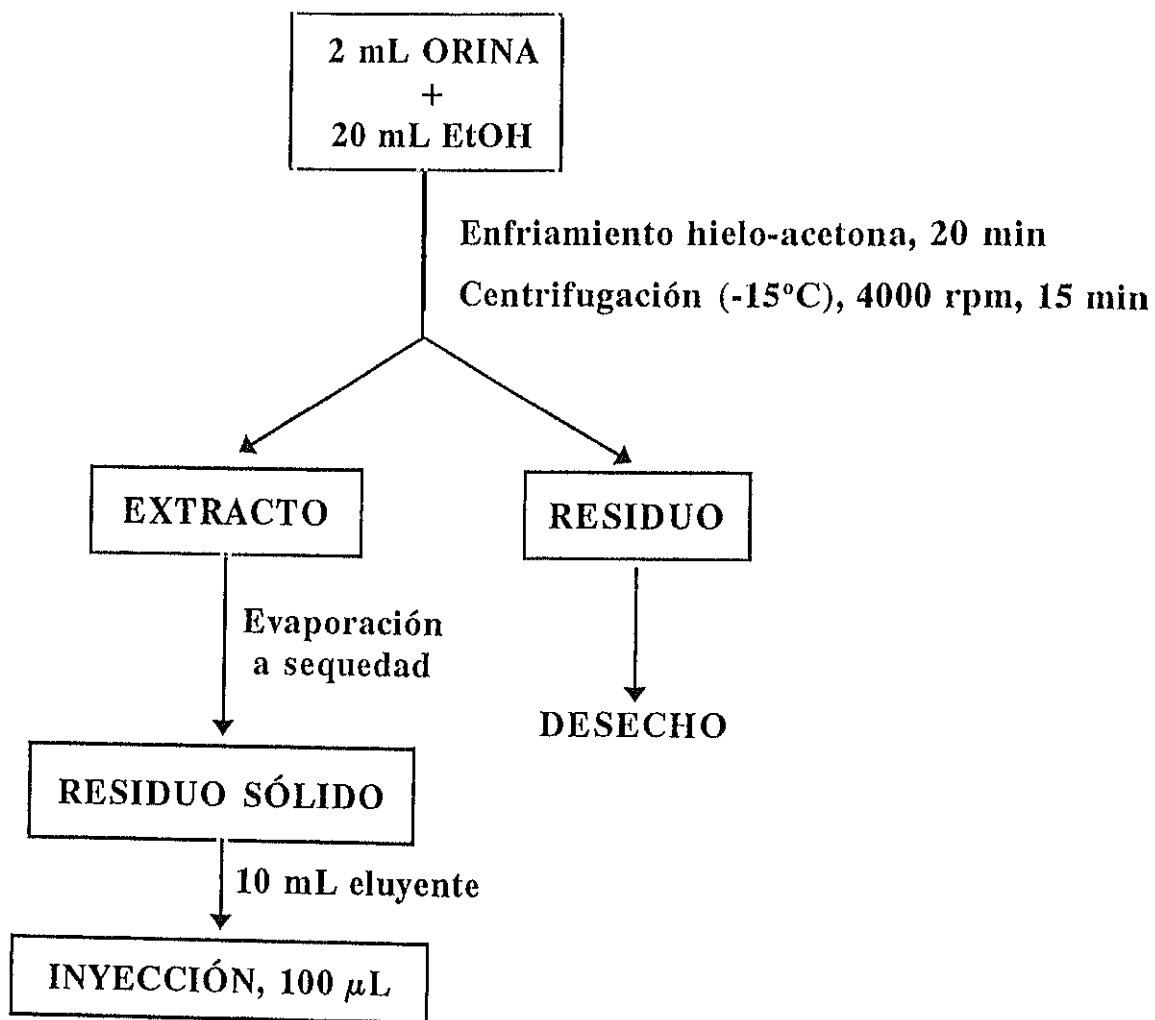


Figura 46.- Representación esquemática del procedimiento experimental de "clean-up" de orina para el análisis de especies de arsénico por HPLC-MO-HG-AAS.

Con objeto de optimizar las condiciones del proceso de "clean-up", se efectuaron estudios sobre la relación muestra/etanol y el volumen de eluyente necesario para poder disolver el residuo y obtener una resolución adecuada en la separación. El estudio de la proporción de muestra/etanol se realizó manteniendo constante el volumen de orina

(2 mL) y variando la cantidad de etanol en el intervalo de 4 a 20 mL, obteniéndose una extracción constante y prácticamente total a partir de la relación volumen de muestra: volumen de etanol 2:20. Por lo tanto, esta es la proporción considerada como óptima y es la que se ha utilizado para llevar a cabo la aplicación del método.

Por otro lado se efectuó un estudio del volumen de eluyente (tampón fosfato de concentración 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.1) necesario para disolver el residuo, variando dicho volumen entre 1 - 10 mL. En todos los casos el residuo se disuelve totalmente, pero aparece un acusado efecto matriz que impide una buena resolución en la separación de las especies, cuando se utiliza un volumen inferior a 5 mL. Por consiguiente este es el volumen de eluyente escogido para disolver el residuo de todas las muestras sometidas al proceso de "clean-up", antes de realizar el análisis correspondiente.

Las condiciones de trabajo empleadas en el sistema HPLC-MO-HG-AAS son:

- Volumen de inyección en el sistema HPLC-MO-HG-AAS: 100  $\mu$ L
- Eluyente: Tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0 con un caudal de 2.0 mL min<sup>-1</sup>
- Agente oxidante: 5% (m/v) K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> en 5% (m/v) NaOH con un caudal de 4.6 mL min<sup>-1</sup>
- Longitud del reactor de oxidación asistida con microondas: 1.5 m
- Medio ácido: HCl 4 mol L<sup>-1</sup> con un caudal de 1.9 mL min<sup>-1</sup>
- Agente reductor: 3% (m/v) NaBH<sub>4</sub> en 1% (m/v) NaOH con un caudal de 1.9 mL min<sup>-1</sup>

#### VIII.5.2.- Características analíticas del método

Se han realizado curvas de calibrado para las seis especies en medio acuoso, en el intervalo de concentración comprendido entre 25 - 150  $\mu$ g L<sup>-1</sup> de arsénico. Los valores de las pendientes, ordenadas en el origen y coeficientes de correlación de las curvas de calibrado en medio acuoso y en muestras de orina pretratadas, para todas las especies, se recogen en la *Tabla XLVIII* y *Tabla IL*, respectivamente.

Tabla XLVIII.- Parámetros de las curvas de calibrado obtenidas para las seis especies de arsénico estudiadas, en medio acuoso, en el intervalo de concentración 25 - 150  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico, empleando HPLC-MO-HG-AAS.

Especie	Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ ( x 10 <sup>4</sup> )	Ordenada en el origen, u.A.	Coefficiente de correlación
AsC	8.9±0.6	0.01±0.01	0.994
AsB+As(III)	6.1±0.5	0.01±0.01	0.991
DMA	6.17±0.05	0.010±0.001	0.9998
MMA	6.7±0.3	0.016±0.007	0.998
As(V)	3.8±0.2	0.009±0.001	0.9998

Tabla IL.- Parámetros de las curvas de calibrado del método de adiciones estándar obtenidas para las seis especies de arsénico estudiadas, en muestras de orina pretratadas, en el intervalo de concentración 25-150  $\mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico, empleando HPLC-MO-HG-AAS.

Especie	Pendiente, u.A. $\mu\text{g}^{-1} \text{L}$ ( x 10 <sup>4</sup> )	Ordenada en el origen, u.A.	Coefficiente de correlación
AsC	9.0±0.2	0.015±0.005	0.9992
AsB+As(III)	6.4±0.4	0.032±0.008	0.998
DMA	6.1±0.3	0.018±0.007	0.996
MMA	6.67±0.04	0.020±0.001	0.99996
As(V)	3.3±0.3	0.018±0.006	0.995

Con el fin de determinar si existe efecto matriz en las muestras sometidas a este procedimiento, se realizó un estudio estadístico comparativo entre las pendientes de las curvas de calibrado correspondientes a cada una de las especies de arsénico, en medio acuoso, y las pendientes de las curvas de calibrado del método de adiciones estándar, en las muestras de orina sometidas al proceso de "clean-up", tal y como se describe en el Apartado VIII.4.2 de este Capítulo. De los resultados obtenidos se puede concluir que, para un nivel de significación del 0.05, en ningún caso existen diferencias significativas entre las pendientes comparadas. Por consiguiente, empleando el pretratamiento de la muestra y realizando la determinación en las condiciones mencionadas, no es necesario utilizar el método de adiciones estándar porque se puede considerar que no existe efecto matriz. Por tanto, la concentración de cada especie de arsénico puede calcularse por interpolación directa de la medida de absorbancia en la curva de calibrado correspondiente, obtenida en medio acuoso.

Con objeto de evaluar la exactitud del método propuesto para realizar el pretratamiento de la muestra y determinación mediante HPLC-MO-HG-AAS, se han llevado a cabo estudios de recuperación tras añadir una cantidad conocida de cada especie de arsénico a la muestra antes de realizar el proceso de "clean-up". Así, 2 mL de una muestra de orina se enriquecieron con  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie, aplicándose a continuación el procedimiento de "clean-up" descrito anteriormente. Obviamente, para determinar la cantidad recuperada de cada especie de arsénico, se ha interpolado la absorbancia medida en la correspondiente curva de calibrado en medio acuoso. Los resultados obtenidos para cinco recuperaciones se encuentran recogidos en la *Tabla L*.

Tabla L.- Recuperación de las seis especies de arsénico en orina, empleando pretratamiento de la muestra y determinación mediante HPLC-MO-HG-AAS. Fase móvil: tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup>, a pH 6.0 y a un caudal de 2.0 mL min<sup>-1</sup>. Concentración de 100 µg L<sup>-1</sup> de arsénico en cada especie.

Especie	C <sub>teórica</sub> de As, µg L <sup>-1</sup>	C <sub>experim</sub> de As, µg L <sup>-1</sup>	% recuperación
AsC	100	97	97±8
AsB+As(III)		103	103±5
DMA		99	99±8
MMA		102	102±4
As(V)		98	98±5

Se observa que, para todas las especies, la recuperación está próxima al 100%, lo que confirma la validez del método propuesto para llevar a cabo la determinación de las seis especies de arsénico estudiadas, en este tipo de muestras.

Por otro lado, se han realizado estudios de la reproducibilidad del método para cada una de las seis especies de arsénico estudiadas. Dicha reproducibilidad se expresa en términos de la desviación estandar relativa. Los valores del tanto por ciento del R.S.D. se han calculado a partir de las medidas obtenidas con 5 muestras de orina enriquecidas con 100 µg L<sup>-1</sup> de arsénico en cada especie.

Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla LI*.

**Tabla LI.- Reproducibilidad (% R.S.D.) del método analítico para la determinación de las especies de arsénico objeto de estudio en muestras de orina. Concentración de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie. ( $n = 5$ ).**

Especie	% R.S.D.
AsC	2,5
AsB + As(III)	3,2
DMA	5,3
MMA	2,7
As(V)	4,8

Como se puede observar, los coeficientes de variación obtenidos para las seis especies de arsénico son, en todos los casos, menores del 5%, lo que indica la buena reproducibilidad del método desarrollado.

### VIII.5.3.- APLICACIÓN

Como se ha reseñado previamente, las muestras de orina fueron aportadas por cuatro voluntarios que durante tres días siguieron una dieta que excluía todo tipo de alimentos de origen marino. La muestra blanco de orina era recogida en la mañana del cuarto día. Ese mismo día se consumió una dieta rica en alimentos marinos que consistió en: voluntario 1) gambas, almejas, navajas y boquerones; voluntario 2) gambas, almejas y pescado; voluntario 3) pescado, gambas y almejas; voluntario 4) pescado y gambas. La muestra de orina para el análisis se recogió en la mañana del quinto día y se almacenó durante 2- 3 horas en la oscuridad a  $4^{\circ}\text{C}$ , sin adición de ningún tipo de conservante, antes de proceder al pretratamiento de la muestra ("clean-up"). El método desarrollado permite obtener las señales correspondientes a las especies: AsC, DMA, MMA y As(V) individualmente y la de AsB y As(III) conjuntamente. Para poder diferenciar entre As(III) y AsB se sustituyó, como ya se ha explicado anteriormente en el Apartado V.3.3.2.4, el agente oxidante por agua, de forma que sólo se obtienen las señales



correspondientes a las especies formadoras de hidruros, As(III), DMA, MMA y As(V), y no se observa ninguna señal debido a la presencia de AsB y/o AsC. La concentración de AsB se determina por diferencia entre la concentración de arsénico correspondiente a la mezcla de AsB y As(III), obtenida empleando oxidación asistida con microondas, y la concentración de As(III) medida cuando se trabaja en ausencia de agente oxidante.

El análisis del blanco de orina se llevo a cabo empleando el mismo sistema, con y sin agente oxidante, sin obtener señal en ningún caso, por lo que se puede concluir que las especies de arsénico objeto de estudio no se encuentran en el blanco de orina por encima del límite de detección de este método. Además, tampoco se obtuvo señal alguna en el análisis de las muestras de orina de los cuatro voluntarios cuando se empleaba el sistema en ausencia de agente oxidante. Por tanto, en estas muestras, la concentración de As(III), DMA, MMA y As(V), si están presentes, se encuentran en concentraciones que quedan por debajo del límite de detección del método.

Los cromatogramas obtenidos para cada una de las muestras, empleando el sistema HPLC-MO-HG-AAS, se muestran en la *Figura 47*.

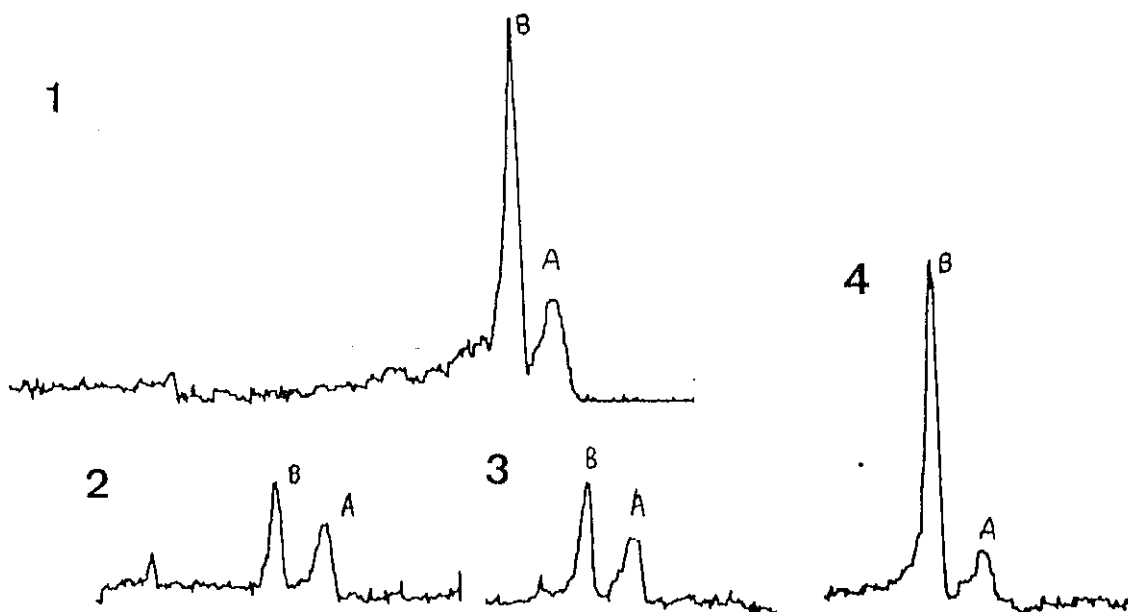


Figura 47.- Cromatogramas obtenidos a partir de las muestras de orina de los cuatro voluntarios, empleando pretratamiento de la muestra y determinación mediante HPLC-MO-HG-AAS.

Como se puede apreciar en los cromatogramas, se obtuvieron dos picos bien definidos correspondientes a dos compuestos distintos de arsénico. Con el fin de poder identificar estas especies, se compararon los tiempos de retención de estos picos: pico A, 1.20 min y pico B, 1.70 min, con los obtenidos para las seis especies objeto de estudio a partir de una disolución patrón de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie. Los tiempos de retención de los distintos compuestos en las disoluciones patrón se muestran en la *Tabla LII*.

**Tabla LII.-** Tiempos de retención de las seis especies de arsénico obtenidos a partir de disoluciones patrón, empleando el sistema HPLC-MO-HG-AAS.

Tiempo de retención, min.				
AsC	AsB + As(III)	DMA	MMA	As(V)
1.43	1.69	2.39	3.57	7.25

Se observa que el tiempo de retención del pico B concuerda exactamente con el correspondiente al obtenido para AsB, mientras que el tiempo de retención del pico A no concuerda con ninguna especie, teniendo un tiempo de retención menor que el obtenido para AsC. Además, se ha realizado un cromatograma enriqueciendo la muestra de orina del voluntario 2 con  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie, AsB y AsC, con objeto de comprobar si, efectivamente, el pico B de las muestras corresponde a AsB y si el pico A pudiera corresponder a AsC. El cromatograma obtenido se muestra en la *Figura 48*.

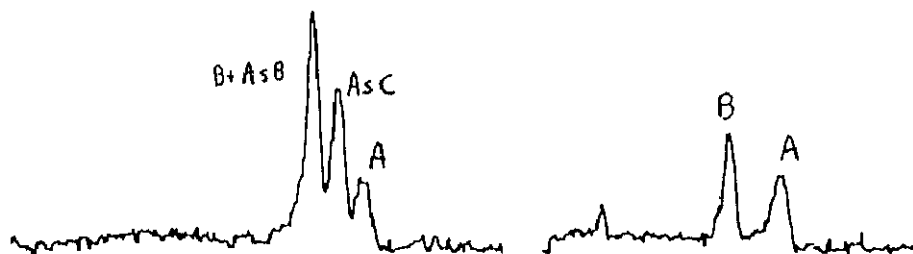


Figura 48.- Cromatograma correspondiente a la muestra de orina del voluntario 2 enriquecida con una concentración de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de Arsénico en AsB y AsC.

A la vista de los resultados se puede deducir que el pico B corresponde, como era de esperar, a AsB mientras que el pico A corresponde a una especie de arsénico que no está incluida entre las estudiadas en este trabajo, por lo que no es posible realizar su cuantificación.

La concentración de los compuestos de arsénico en las muestras se calculó por lectura directa de la señal medida en cada caso, en las curvas de calibrado obtenidas correspondiente a cada una de las especies en medio acuoso. Para realizar la determinación de estas especies en las muestras de orina de los voluntarios 1 y 4, fue necesario hacer diluciones 1:1.

Los resultados obtenidos para cinco determinaciones en cada muestra se recogen en la *Tabla LIII*.

Tabla LIII.- Especiación de arsénico en muestras de orina de cuatro individuos que ingirieron alimentos procedentes del mar. Los resultados se expresan en concentración de arsénico;  $\bar{X} \pm s (t/\sqrt{n})$ . ( $n = 5$ )

Muestra de orina	Contenido de arsénico, $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Compuesto X	AsB
Voluntario 1	sin cuantificar	$223 \pm 12$
Voluntario 2	sin cuantificar	$61 \pm 7$
Voluntario 3	sin cuantificar	$69 \pm 9$
Voluntario 4	sin cuantificar	$157 \pm 10$

Como se puede observar, en todas las muestras de orina se encontraron los mismos compuestos, pero en distinta concentración. Teniendo en cuenta que el voluntario 1 y el voluntario 2 habían seguido la misma dieta, igual que los voluntarios 3 y 4, esta diferencia podría atribuirse a la distinta dilución de las correspondientes muestras de orina, que se debe, principalmente, a la cantidad de líquido ingerida diariamente por cada individuo. Con el fin de comprobar esta hipótesis, se verificó el volumen de agua ingerido cada día aproximadamente por todos los voluntarios, encontrándose que los individuos 2 y 3 beben unos 3 L de agua al día, mientras que los voluntarios 1 y 4 no llegan a los 2 L, lo cual concuerda con la menor concentración de arsénico detectada en su orina.

Los resultados obtenidos confirman, además, que los compuestos encontrados mayoritariamente en muestras de orina de individuos que han ingerido alimentos procedentes del mar, son especies de arsénico no tóxicas, principalmente AsB.

## VIII.6.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO EN AGUA Y ORINA

Uno de los principales problemas que inciden en la dificultad de validación de los métodos analíticos propuestos por los distintos investigadores para la determinación de especies metálicas en muestras medioambientales, es el desconocimiento existente de la estabilidad de las distintas especies en función de la matriz que le acompaña. La consecuencia inmediata de este hecho es la falta de patrones certificados y muestras certificadas que hagan posible la validación de estos métodos analíticos. Este hecho se agrava en el caso del arsénico, ya que posee una química muy complicada como consecuencia de las reacciones espontáneas que ocurren en el medio ambiente y en medios biológicos, dando lugar a muy diversas formas químicas.

Es un hecho normal que las muestras no se analicen inmediatamente después de su recogida, sino que transcurran varios días hasta que se efectúa el análisis. Durante este tiempo la naturaleza química de las especies puede cambiar, e incluso producirse pérdidas bien por volatilidad o por adsorción en las paredes del recipiente. Por esta razón, el material del recipiente debe ser elegido cuidadosamente para evitar efectos no deseables, como la adsorción. Además, durante el almacenamiento se pueden producir alteraciones significativas de las proporciones relativas de las diferentes especies de un analito por diversos factores, tales como, la actividad microbiológica, la temperatura, la luz, etc. Por ejemplo, la actividad microbiológica, producida por los microorganismos presentes en las muestras, origina la metilación del arsénico inorgánico, la cual está fuertemente favorecida por el incremento de la temperatura. Por otro lado, la luz es una de las principales causas de inestabilidad de los compuestos organometálicos ya que, normalmente, el enlace metal-carbono es lo suficientemente débil como para ser fotodegradado. Por este motivo las disoluciones deben conservarse en la oscuridad.

La mayor parte de los trabajos encontrados en la bibliografía tratan sobre la estabilidad de la concentración total de arsénico o de las especies inorgánicas de este elemento en agua, pero se han realizado pocos trabajos sobre la estabilidad de las

especies orgánicas de arsénico en otros medios. Los medios ensayados para estabilizar las especies inorgánicas del arsénico en muestras de agua son los ácidos nítrico, perclórico, clorhídrico y acético, pero existen muchas discrepancias en cuanto a la magnitud de las pérdidas de arsénico en las disoluciones almacenadas. Sin embargo, las muestras de agua conservadas a temperaturas inferiores a  $-15^{\circ}\text{C}$  es la forma de almacenamiento considerada como óptima por varios autores (Portmann y col., 1964; Wagner, 1976 y Harrison y col., 1975).

El agua y la orina han sido las muestras sobre las que se han centrado la mayoría de los métodos desarrollados en este Trabajo, por lo que se ha considerado de gran interés realizar en estas matrices un estudio sobre la estabilidad de las especies de arsénico estudiadas. Además, el procedimiento de limpieza (clean-up) propuesto para aislar los analitos de la matriz, conduce a la obtención de un residuo seco en la orina que, en principio, puede favorecer la estabilización de las especies. Con estas bases, en este apartado se realiza un estudio comparativo sobre la influencia de los principales parámetros físico-químicos que inciden en la estabilidad de As(V), MMA, DMA, AsB y AsC, en las muestras no tratadas de agua bidestilada, orina y en el residuo seco de la orina después del tratamiento de "clean-up".

#### **VIII.6.1.- Preparación y conservación de las muestras**

Para llevar a cabo el estudio de la estabilidad de dichas especies de arsénico, se procedió a preparar dos disoluciones mezcla de As(III), DMA, MMA, AsB y AsC ( $200\ \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie), una en medio acuoso y otra en orina humana. De cada disolución se almacenaron el mismo día veintiuna alícuotas de 5 mL, en contenedores de poliestireno y en la oscuridad, a tres temperaturas: Temperatura ambiente,  $4^{\circ}\text{C}$  (refrigerador) y  $-20^{\circ}\text{C}$  (congelador). Por otro lado, una muestra de orina se ha enriquecido con una mezcla que contenía  $500\ \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada una de las cinco especies objeto de estudio. De esta disolución y en el mismo día de su preparación, se tomaron 14 alícuotas de 2 mL y se trataron mediante el procedimiento de "clean-up", descrito en el apartado anterior, para obtener los residuos secos de orina

que se almacenaron a dos temperaturas: Temperatura ambiente y 4°C (refrigerador), en contenedores de vidrio de borosilicato de bajo coeficiente de dilatación. En el momento del análisis, las muestras se restituyeron con 5 mL del eluyente cromatográfico (Tampón fosfato 17 mmol L<sup>-1</sup> a pH 6.0) empleado en el procedimiento analítico. La *Tabla LIV* muestra, de manera resumida, las condiciones de conservación las muestras.

**Tabla LIV.- Condiciones de conservación de las muestras almacenadas para realizar el estudio de estabilidad de las especies de arsénico.**

Muestra de una mezcla de As(V), MMA, DMA, AsB y AsC	Medio	Condiciones de Conservación
L-1	acuoso	poliestireno oscuridad T <sup>a</sup> ambiente
L-2	acuoso	poliestireno oscuridad 4°C
L-3	acuoso	poliestireno oscuridad -20°C
L-4	orina	poliestireno oscuridad T <sup>a</sup> ambiente
L-5	orina	poliestireno oscuridad 4°C
L-6	orina	poliestireno oscuridad -20°C
L-7	residuo seco de orina	poliestireno oscuridad T <sup>a</sup> ambiente
L-8	residuo seco de orina	poliestireno oscuridad 4°C

### VIII.6.2.- Procedimiento analítico

El estudio de estabilidad se ha realizado cuantificando cada especie mediante el sistema HPLC-MO-HG-AAS descrito en el apartado V.3.1, después de transcurridos 1, 3, 7, 15, 30 y 67 días a partir de la preparación de las disoluciones.

Las disoluciones almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  se han empleado como disoluciones de referencia en cada medio, excepto del residuo seco, del cual no se conservó, a dicha temperatura, ninguna muestra, por lo que se empleó como referencia la disolución acuosa a  $-20^{\circ}\text{C}$ , ya que tiene una matriz más parecida a él, debido al proceso de "clean-up".

### VI.3.- Tratamiento estadístico

La influencia de los parámetros físico-químicos se ha determinado por tratamiento estadístico de los datos obtenidos. Por lo tanto, la estabilidad puede ser valorada mediante la relación ( $R_{A,X,Y}$ ):

$$R_{A,X,Y} = \frac{X_{A,X,Y}}{X_{A,X,-20^{\circ}\text{C}}}$$

donde  $X_{A,X,Y}$  es el valor medio de las medidas realizadas para una especie A, en un medio X y almacenada a una temperatura Y, y  $X_{A,X,-20^{\circ}\text{C}}$  es el valor medio de las medidas obtenidas para dicha especie A, en el medio X y a la temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ambas medidas se realizaron en el mismo día.

La incertidumbre ( $U_x$ ) se ha calculado empleando la expresión:

$$U_{A,X,Y} = (\text{RSD}_{A,X,Y}^2 + \text{RSD}_{A,X,-20^{\circ}\text{C}}^2)^{1/2} \frac{R_{A,X,Y}}{100}$$



donde  $RSD_{A,X,Y}$  y  $RSD_{A,X,-20^{\circ}C}$  son las desviaciones estándar relativas obtenidas al analizar una especie A, en el medio X y almacenada a una temperatura Y ó  $-20^{\circ}C$ , respectivamente.

La estabilidad se ha evaluado a partir de la representación de  $R_{A,X,Y}$  frente a los distintos tiempos de almacenamiento. En el caso de que la estabilidad fuera total,  $R_{A,X,Y}$  debería tener el valor de 1, pero en la práctica se pueden producir variaciones de este valor debido a la incertidumbre de las medidas. Por lo tanto,  $R_{A,X,Y}$  deberá encontrarse entre los límites  $(1 - U_{A,X,Y})$  y  $(1 + U_{A,X,Y})$  para poder concluir la estabilidad de la especie correspondiente.

#### **VIII.6.4.- Resultados y discusión**

Los resultados obtenidos para las distintas especies se han representado en las *Figuras 49, 50, 51, 52 y 53*, que corresponden a la representación estadística de las cinco especies de estudio, en cada medio y temperatura. Cada punto representado en las gráficas es el valor medio de tres medidas obtenidas a partir de una misma muestra, tras un periodo de almacenamiento determinado.

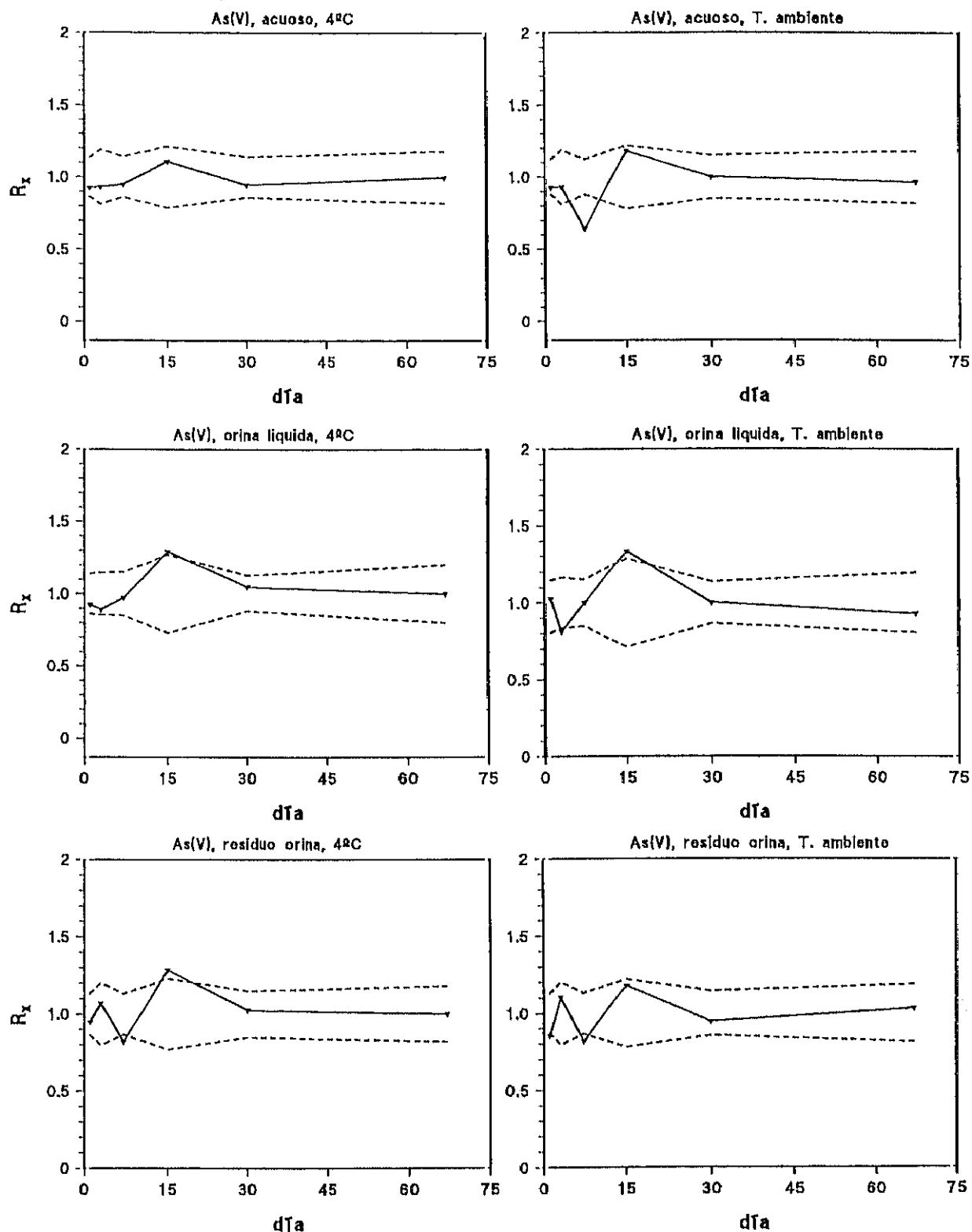


Figura 49.- Influencia del tiempo de almacenaje de la muestra, enriquecida con una mezcla de As(V), DMA, MMA, AsB y AsC ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie), sobre la estabilidad de As(V). (A) acuoso, 4°C; (B) acuoso, temperatura ambiente; (C) orina, 4°C; (D) orina, temperatura ambiente; (E) residuo seco, 4°C y (F) residuo seco, temperatura ambiente.

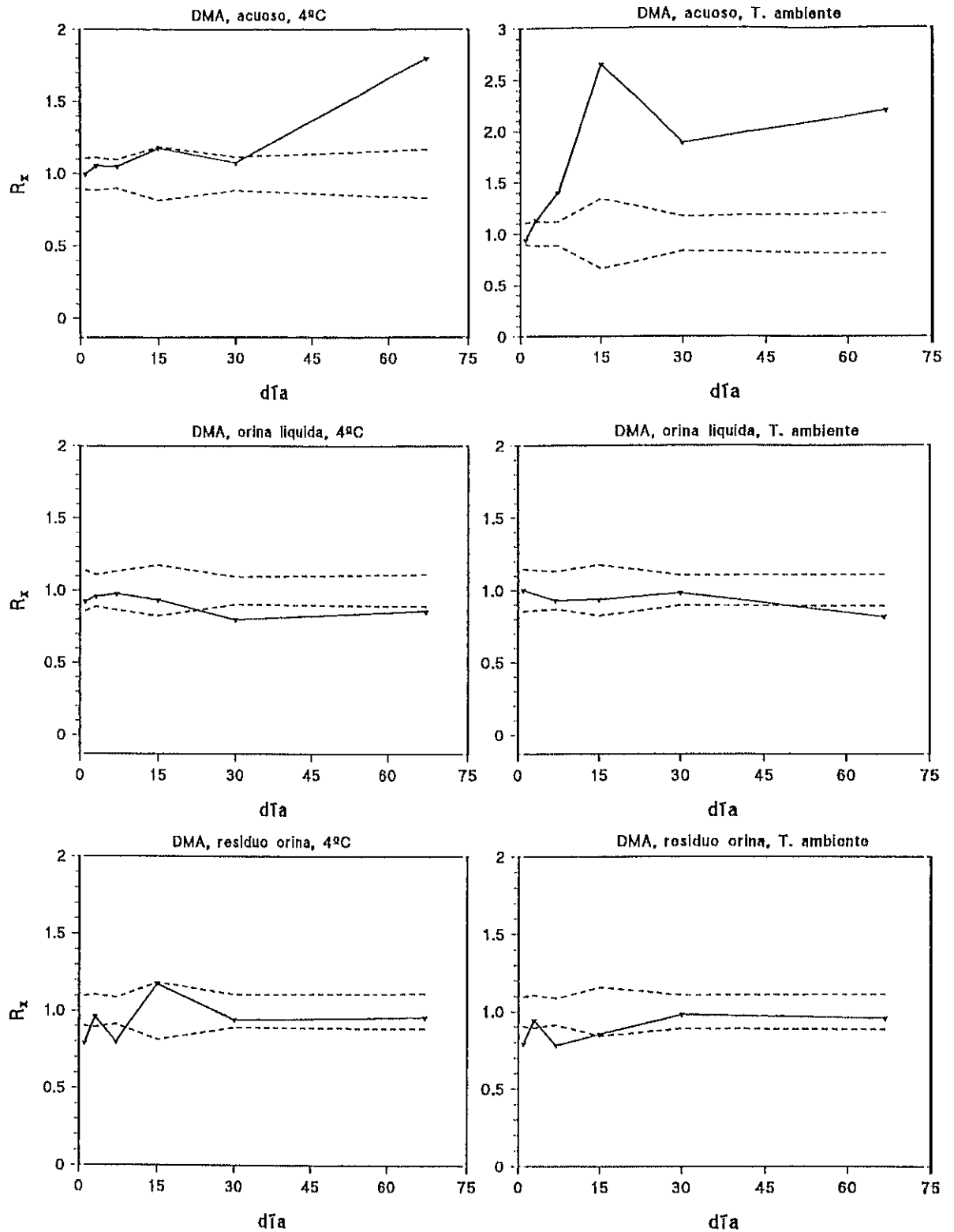


Figura 50.- Influencia del tiempo de almacenaje de la muestra, enriquecida con una mezcla de As(V), DMA, MMA, AsB y AsC ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie), sobre la estabilidad de DMA. (A) acuoso, 4°C; (B) acuoso, temperatura ambiente; (C) orina, 4°C; (D) orina, temperatura ambiente; (E) residuo seco, 4°C y (F) residuo seco, temperatura ambiente.

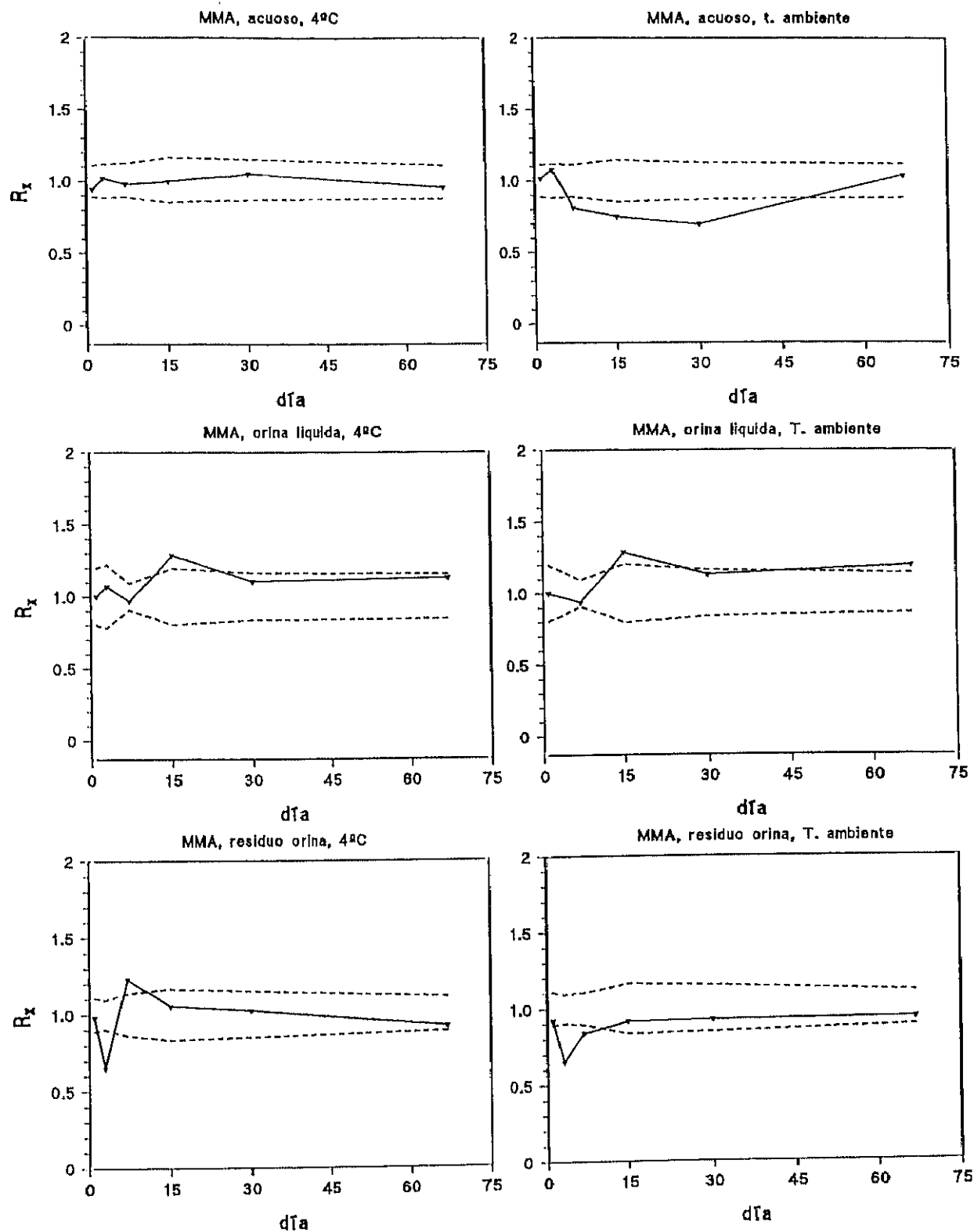


Figura 51.- Influencia del tiempo de almacenaje de la muestra, enriquecida con una mezcla de As(V), DMA, MMA, AsB y AsC ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie), sobre la estabilidad de MMA. (A) acuoso, 4°C; (B) acuoso, temperatura ambiente; (C) orina, 4°C; (D) orina, temperatura ambiente; (E) residuo seco, 4°C y (F) residuo seco, temperatura ambiente.

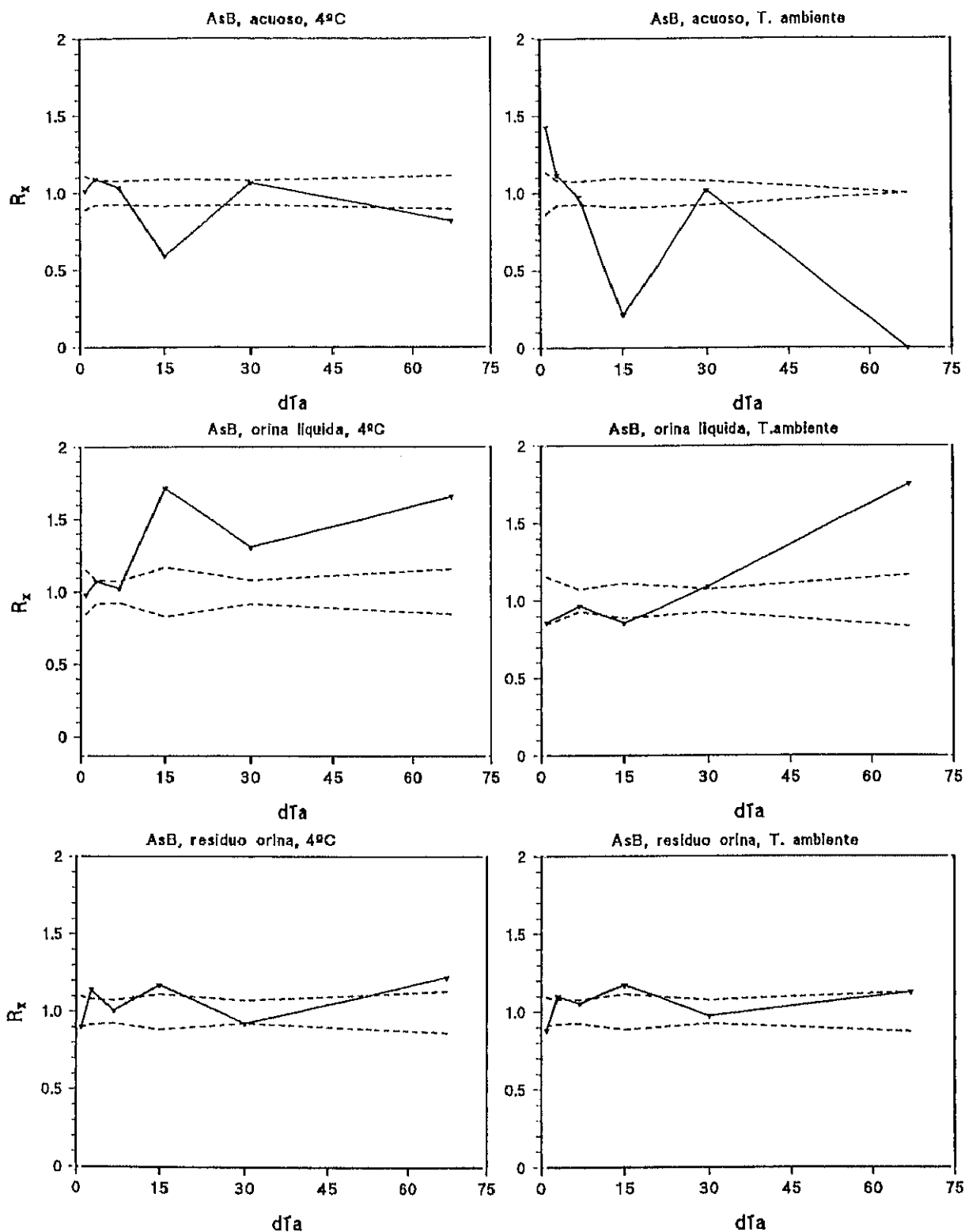


Figura 52.- Influencia del tiempo de almacenaje de la muestra, enriquecida con una mezcla de As(V), DMA, MMA, AsB y AsC ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie), sobre la estabilidad de AsB. (A) acuoso, 4°C; (B) acuoso, temperatura ambiente; (C) orina, 4°C; (D) orina, temperatura ambiente; (E) residuo seco, 4°C y (F) residuo seco, temperatura ambiente.

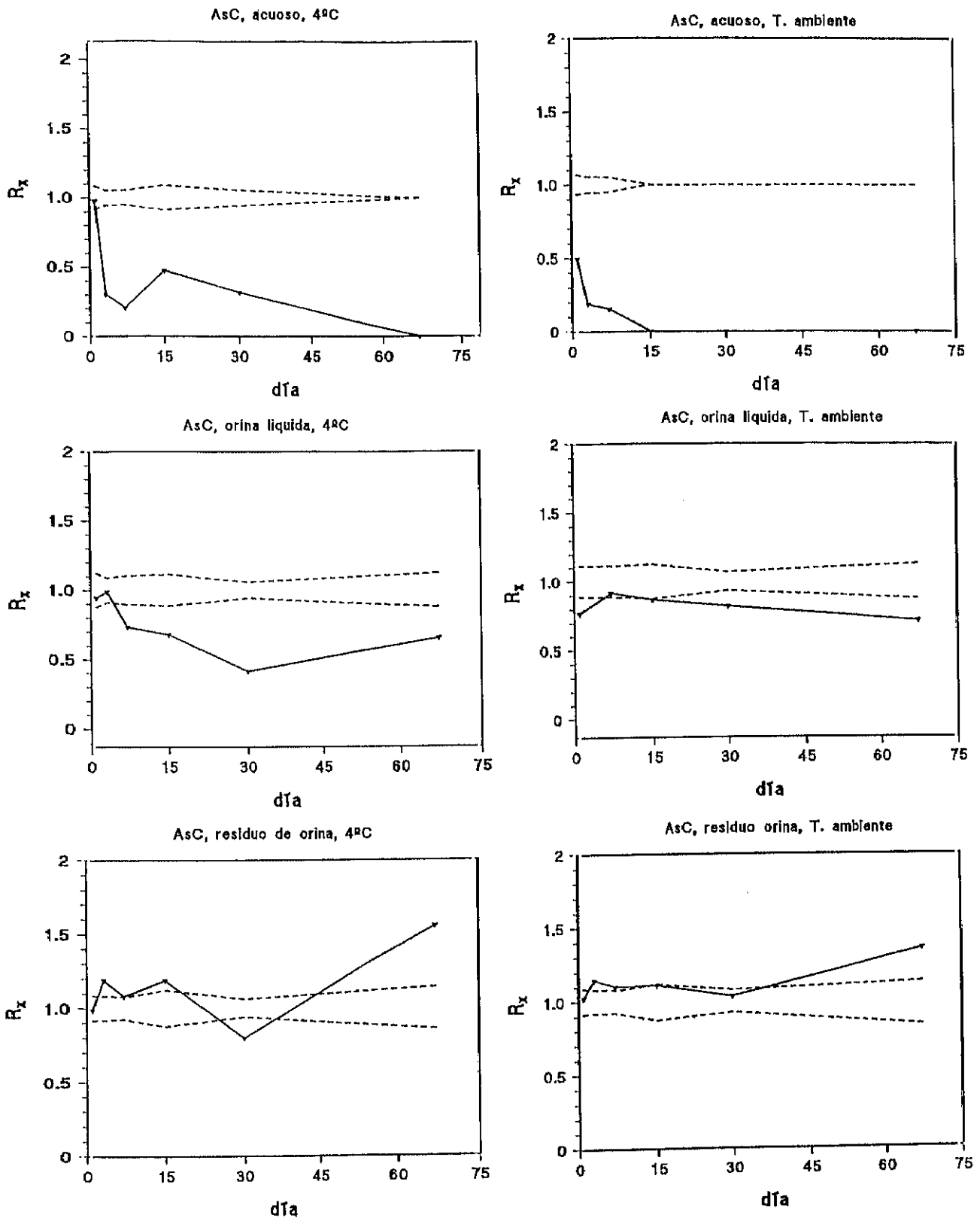


Figura 53.- Influencia del tiempo de almacenaje de la muestra, enriquecida con una mezcla de As(V), DMA, MMA, AsB y AsC ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de arsénico en cada especie), sobre la estabilidad de AsC. (A) acuoso, 4°C; (B) acuoso, temperatura ambiente; (C) orina, 4°C; (D) orina, temperatura ambiente; (E) residuo seco, 4°C y (F) residuo seco, temperatura ambiente.

Del estudio de las *Figuras 49-53*, se deduce que:

- El As(V) se mantiene en los diferentes medios y temperaturas dentro del intervalo de incertidumbre, no haciéndose patente la pérdida o ganancia de esta especie química a lo largo de los 67 días de almacenamiento (*Figura 49*). Esta observación implica que ninguna especie se transforma en As(V), lo que daría lugar a un aumento de su concentración, ni que el propio As(V) se transforma en otra especie (pérdida de concentración). La permanencia de la concentración de As(V) en su valor inicial también implica la falta de adsorción del analito en las paredes del recipiente que lo contiene.

- El MMA (*Figura 51*) puede considerarse estable en las diferentes condiciones de temperatura y medios, ya que no se hace patente la transformación de esta especie en otras, ni que esta especie sea el producto final de la degradación de otras más metiladas o de la metilación de especies inorgánicas. La fuerza del único enlace C-As existente puede ser la causa de la estabilidad del MMA. Al igual que el As(V) esta especie no parece ser adsorbida por las paredes del recipiente que la contiene.

El DMA muestra un marcado aumento de la concentración en medio acuoso, desde los primeros días del almacenamiento, siendo más acusado a temperatura ambiente que a 4°C. Por el contrario, su concentración se mantiene dentro del intervalo de incertidumbre en la orina líquida y en el residuo seco de orina (*Figura 50*). El aumento de la concentración observada en el medio acuoso sólo puede achacarse al hecho de que aparezca como subproducto de la degradación de especies más metiladas, ya que el As(V) y el MMA permanecen en sus concentraciones iniciales, lo que implica la falta de metilación hacia el DMA.

- Como puede observarse en la *Figura 53*, la AsC no es estable en medio acuoso desde el primer día, tanto a 4°C como a temperatura ambiente. En orina líquida, la tendencia es también a inestabilizarse aunque en menor proporción que en el

medio acuoso. Además, debido a la naturaleza de la especie no parece probable que la inestabilidad sea producto de la adsorción en las paredes del recipiente, sino a la transformación a otra especie más estable en el medio. En el residuo seco de orina tratada, la especie parece ser estable a las temperaturas ensayadas.

- Finalmente, del estudio de los diferentes gráficos que conforman la *Figura 52*, se deduce que la AsB presenta el comportamiento más anómalo de todas las especies de arsénico estudiadas, quedando manifiesta la permanencia de la concentración a lo largo de los 67 días sólo en el caso del residuo seco de la orina. El habito anómalo que presenta la curva de estabilidad a 4°C en el medio acuoso, impide deducir conclusiones acerca de la estabilidad o inestabilidad de la especie a temperatura ambiente, sin embargo, puede verse un incremento de la concentración en los primeros días seguido de un decrecimiento paulatino a partir de la primera semana y hasta el final del estudio. En el caso de la AsB contenida directamente en la orina, puede observarse un incremento paulatino de la concentración a ambas temperaturas. Este comportamiento opuesto de la misma especie en los dos medios (acuoso y orina) sugiere mecanismos de transformación diferentes en función del medio.

Tratando de correlacionar sí, en los medios donde existe transformación de especies para una misma temperatura, la disminución/aumento en la concentración de una especie ocurre de forma paralela al aumento/disminución de otras especies presentes en el medio, se han estudiado los correspondientes cromatogramas de las disoluciones que contenían las cinco especies y para los casos en los que se ha observado en alguna ellas resultados que conducen a pensar en su inestabilidad.

El primer caso que nos encontramos es el medio acuoso a 4°C. Los cromatogramas correspondientes a las especies contenidas en ese medio, al primer día de preparada y después de los 67 días de almacenamiento, se han comparado con la solución acuosa conservada a -20°C, donde las especies resultan ser totalmente estables. Como puede observarse, del estudio comparativo (*Figura 54*) parece deducirse una



primera transformación de AsC a AsB y, posteriormente, la paulatina degradación de AsB hacia la forma del DMA. Este resultado está en consonancia con los gráficos de estabilidad en ese medio (y a esa temperatura) de la AsC, que desaparece desde el primer momento de la disolución acuosa, *Figura 53A* y el aumento que desde los 30 días ocurre para la especie DMA, *Figura 50A*.

A temperatura ambiente en medio acuoso se observa la misma transformación de especies, lo que parece avalar la inestabilidad general de la AsC y AsB en medio acuoso. Los resultados obtenidos en los cromatogramas de la *Figura 55*, parecen confirmar la inicial transformación de la AsC (*Figura 53B*) en AsB (*Figura 52B*) y la posterior degradación de ésta a la forma del DMA (*Figura 50B*).

La *Figura 55* muestra la transformación de las especies en la orina mantenida en el refrigerador a 4°C. Como puede observarse, y al igual que ocurre en el medio acuoso, existe una paulatina transformación de la AsC en AsB, pero en este medio parece estabilizarse la AsB, no ocurriendo la posterior transformación al DMA. Este hecho vuelve a corroborar, en parte, los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de la AsC (*Figura 53C*), que disminuye en proporción similar al aumento de la AsB (*Figura 52C*), mientras que el DMA (*Figura 50C*) mantiene su concentración dentro del intervalo de incertidumbre en ese medio.

Finalmente, la *Figura 57* confirma la estabilidad de todas las especies a temperatura ambiente a lo largo de los 67 días en estudio, donde todas las especies mantienen sus concentraciones al margen de la sensibilidad conseguida ese día para el análisis.

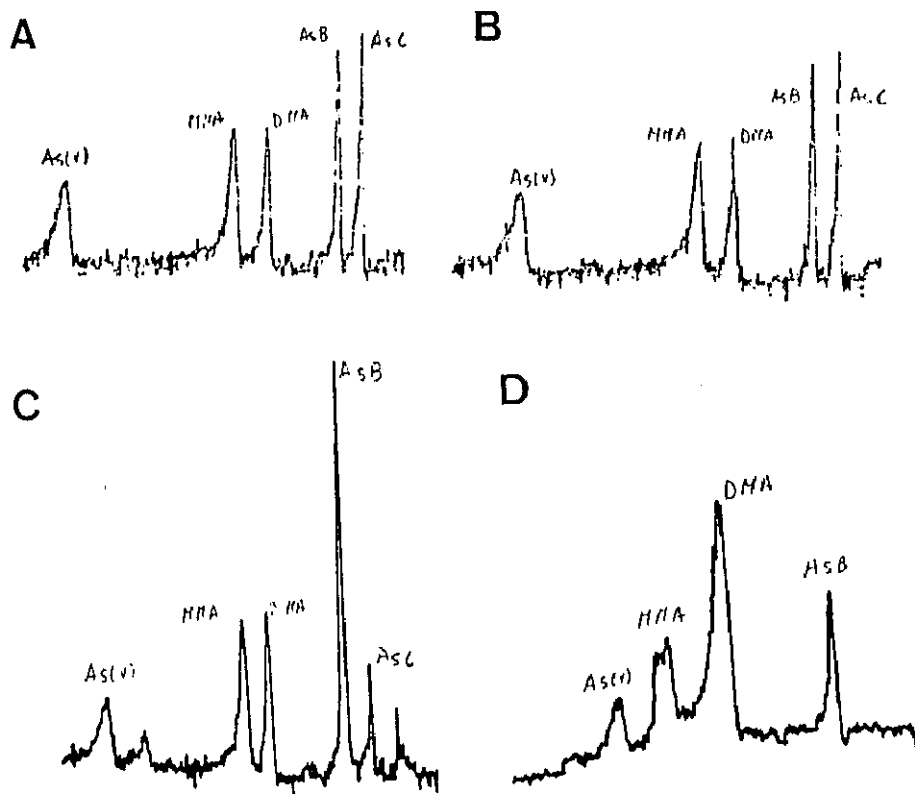


Figura 54.- Cromatogramas obtenidos a partir de una mezcla que contiene  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de As como As(V), MMA, DMA, AsB y AsC, en medio acuoso y almacenada: (A) 1 día a  $-20^\circ\text{C}$ ; (B) 1 día a  $4^\circ\text{C}$ ; (C) 3 días a  $4^\circ\text{C}$  y (D) 67 días a  $4^\circ\text{C}$ .

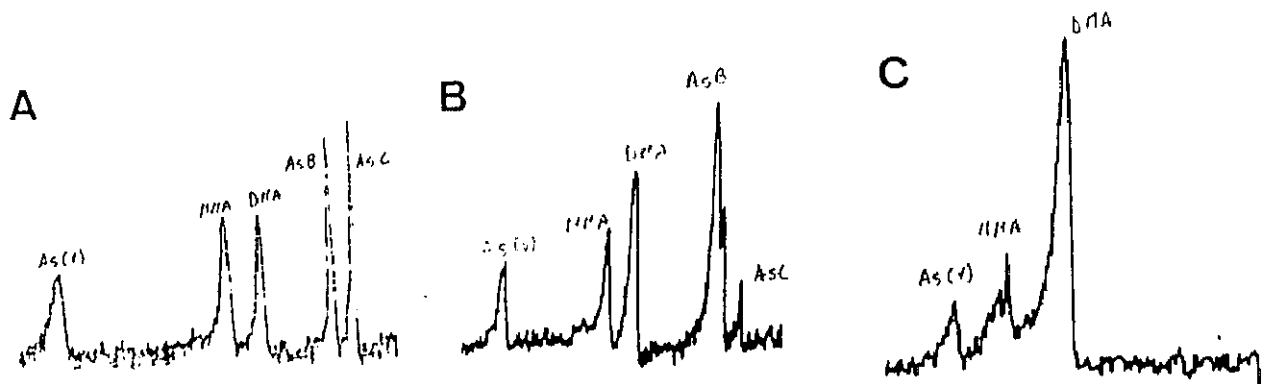


Figura 55.- Cromatogramas obtenidos a partir de una mezcla que contiene  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de As como As(V), MMA, DMA, AsB y AsC, en medio acuoso y almacenada: (A) 1 día a  $T^a$  ambiente; (B) 3 días a  $T^a$  ambiente y (C) 67 días a  $T^a$  ambiente.

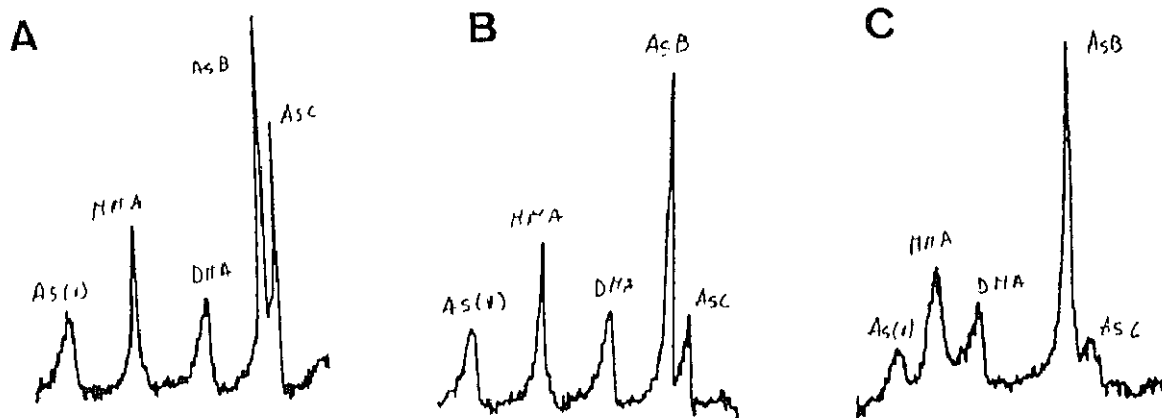


Figura 56.- Cromatogramas obtenidos a partir de una mezcla que contiene  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de As como As(V), MMA, DMA, AsB y AsC, en orina líquida y almacenada: (A) 3 días a  $4^\circ\text{C}$ ; (B) 7 días a  $4^\circ\text{C}$  y (C) 67 días a  $4^\circ\text{C}$ .

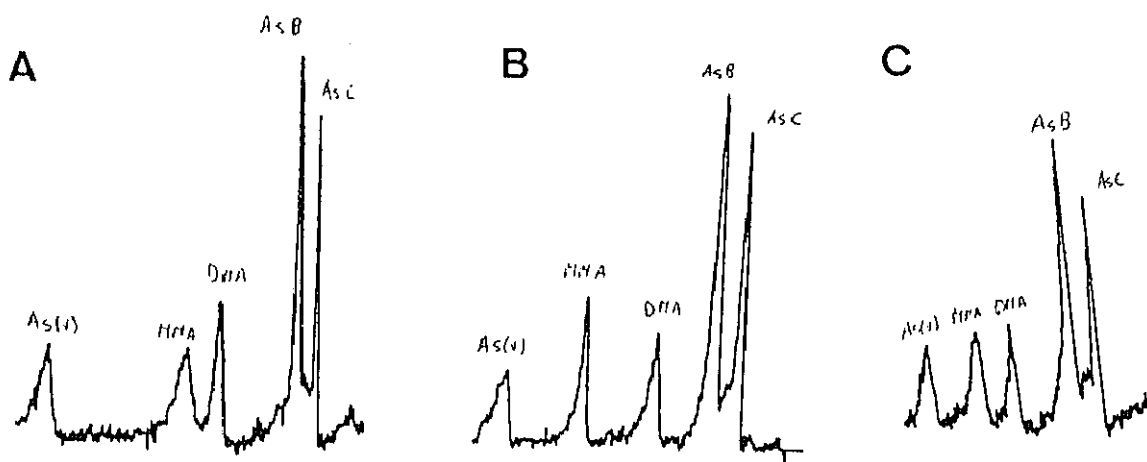


Figura 57.- Cromatogramas obtenidos a partir de una mezcla que contiene  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  de As como As(V), MMA, DMA, AsB y AsC, en el residuo seco de orina y almacenada a temperatura ambiente durante: (A) 3 días; (B) 7 días y (C) 67 días.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS DEL  
CAPÍTULO VIII

Brown R.M., Newton D., Pickford C.J. and Sherlock J.C. (1990)  
*Hum. Exp. Toxicol.*, 9, 41.

Cannon J.R., Edmonds J.S., Francesconi K.A. and Langsford J.B. (1979)  
Arsenic in the Marine Fauna.  
*Management and Control of Heavy Metals and The Environment, CEP Consultants, Edinburg*, 283-286.

Challenger F. (1945)  
*Chem. Rev.*, 36, 315.

Chana B.S. and Smith N.J. (1987)  
*Anal. Chim. Acta*, 187, 177.

Foa V., Colombi A., Maroni M., Buratti M. and Calzaferri G. (1984)  
*Sci. Tot. Environ.*, 34, 241.

Harrison S.H., LaFleur P.D. and Zoller W.H. (1975)  
*Anal. Chem.*, 47, 1685.

Heitkemper D., Creed J., Caruso J. and Fricke F.L. (1989)  
*J. Anal. At. Spectrom.*, 4, 279.

Mafarante E. and Vahter M. (1989)  
*Proc. Int. Conf. Heavy Metals in the Environment, Ed J.-P. Vernet, Geneva*, p. 162.

Maher W. and Butler E. (1988)  
*Appl. Organomet. Chem.*, 2, 191.

Mürer A.J.L., Abildtrup A., Poulsen O.M. and Christensen J.M. (1992)  
*Talanta*, 39, 469.

National Food Agency of Denmark (1990)  
*Food Monitoring in Denmark. Nutrients and Contaminants 1983-1987. Publication N<sup>o</sup> 195. ISBN, 87-503-8621-2.*

Portmann J.E. and Riley J.P. (1964)  
*Anal. Chim. Acta*, 31, 509.

**Shinagawa A., Shiomi K., Yamanaka H. and Kikuchi t: (2983)**

*Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 49, 75.

**Vahter M. and Mafarante E, (1988)**

*In vivo* Methylation and Detoxication of Arsenic.

*The Biological Alkylaton of Heavy Elements. Ed. Craig P.J. and Glocking F. Special Publication N<sup>o</sup> 66, Royal Society of Chemistry, London, p. 105.*

**Wagner R. (1976)**

*Z. Anal. Chem.*, 282, 315.

**CONCLUSIONES**



1) El acoplamiento de una técnica de separación a un detector atómico es hoy en día una herramienta imprescindible para la determinación de especies químicas orgánicas e inorgánicas de elementos metálicos y metaloides a las bajas concentraciones que aparecen en las muestras medioambientales. En el trabajo realizado se ha puesto a punto un acoplamiento de estas técnicas para la determinación de las especies químicas del As: As(III), As(V), MMA, DMA, AsB y AsC, en diferente tipo de muestras. El acoplamiento comprende:

- a) Un sistema cromatográfico para la separación de especies por cromatografía de intercambio aniónico (HPLC).
- b) Un módulo de descomposición por horno microondas (termoreactor) de las diferentes especies orgánicas, a especies derivatizables (MO).
- c) Un sistema de derivatización a la forma de hidruro volátil (HG) de las especies.
- d) Un sistema detector atómico de gran versatilidad como es la Absorción Atómica.

El horno de microondas (termoreactor) y el generador de hidruros actúan de interfase entre la técnica de separación (HPLC) y la técnica de detección (AAS). La novedad del acoplamiento es el hecho de que por primera vez se ha acoplado el horno de microondas a la salida del cromatógrafo y como parte integrante de la interfase de generación de hidruros.

2) El sistema diseñado origina cinco picos cromatográficos para las seis especies en estudio. Esto significa el solapamiento de dos especies en todos los métodos de separación estudiados. Para poder determinar las seis especies de forma individualizada, se han desarrollado procedimientos analíticos basados en lo siguiente:

- a) Diferente comportamiento cromatográfico de las especies que solapan en función del pH.
- b) Diferente comportamiento de las especies que solapan en el proceso de derivatización a la forma de hidruros.
- c) Retención diferenciada de las especies que solapan en cartuchos que actúan de atrapadores iónicos.



En los tres casos la determinación individual de las seis especies se realiza por combinación de dos cromatogramas. En los dos primeros casos, la especie solapada se determina por diferencia. En el tercer caso pueden determinarse de forma diferenciada las seis especies.

3) El proceso de la termooxidación en el horno de microondas se lleva a cabo introduciendo una corriente adicional de  $K_2S_2O_8$  como reactivo oxidante. Simultáneamente a la termooxidación de las especies orgánicas del As ocurre la destrucción de la materia orgánica de la muestra. De esta forma se minimizan los problemas de matriz y puede abordarse el análisis de muestras orgánicas líquidas (orina, suero, etc.) sin pretratamiento previo.

4) Mediante el simple acoplamiento del horno de MO al sistema HG-AAS, trabajando en inyección en flujo es posible distinguir entre los contenidos en As tóxico (As(III), As(V), MMA y DMA) y As no tóxico (AsB y AsC). Esta distinción es extraordinariamente importante desde el punto de vista de la toxicidad.

5) Los métodos desarrollados con los acoplamientos HPLC-MO-HG-AAS o FI-MO-HG-AAS se han aplicado a la determinación de las seis especies del As en muestras medioambientales, tales como aguas de distinta procedencia, extractos de sedimento y de pescado y orina. Se ha observado que las aguas contienen fundamentalmente las especies tóxicas del As, mientras que en la orina predominan las especies menos tóxicas. Este hecho sugiere la posibilidad de un mecanismo de biometilación del organismo humano hacia las formas menos perjudiciales.

6) La posibilidad de diferenciar las formas químicas del As permite abordar el problema de la biodisponibilidad y asimilación del As por el organismo humano. Como puede observarse en las aplicaciones desarrolladas, una dieta de pescado rica en AsB, aumenta extraordinariamente los contenidos de AsB en orina, lo que parece indicar que la inocuidad de la AsB en el organismo humano procede de que este As no es biodisponible al no ser asimilada esta especie.

7) La determinación diferenciada de las especies del arsénico permite la posibilidad de fabricar materiales de referencia con contenidos certificados en cada una de estas especies, a fin de poder validar los métodos existentes que determinan alguna de estas formas químicas. Como paso previo se ha estudiado la estabilidad de estas especies en agua, orina y orina sometida a un procedimiento de limpieza (clean-up), por espacio de 70 días. Los resultados obtenidos muestran que existe una tendencia de las especies orgánicas a la degradación hacia especies más simples cuando se encuentran en disolución. Por el contrario, todas las especies permanecen estables por espacio de los 70 días ensayados cuando la orina se somete al tratamiento de "clean-up".