



* 5 3 0 9 6 0 6 7 6 0 *

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

20.853

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. de Química Analítica



**MEJORAS AL SISTEMA DE GENERACIÓN DE HIDRUROS-ABSORCIÓN
ATÓMICA PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN
MATERIALES BIOLÓGICOS. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE SUS
ESPECIES TÓXICAS MEDIANTE PROCEDIMIENTOS DE CALIBRACIÓN
MULTIVARIANTE**

María del Rosario Torralba Marco

Directoras:

María Antonia Palacios Corvillo

María Milagros Bonilla Simón



ARCHIVO

1996



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Ciudad Universita
28040 Madrid (Españ
Teléf. 394 43
Fax 394 43

MARÍA ANTONIA PALACIOS CORVILLO, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

MARÍA MILAGROS BONILLA SIMÓN, CATEDRÁTICA DE ESCUELA UNIVERSITARIA DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL: TECNOLOGÍA HIDRÁULICA Y ENERGÉTICA DE LA E.U.I.T. DE OBRAS PÚBLICAS, DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID.

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo titulado "Mejoras al sistema de Generación de Hidruros-Absorción Atómica para la determinación de Arsénico total en materiales biológicos. Determinación simultánea de sus especies tóxicas mediante procedimientos de Calibración Multivariante", ha sido realizado bajo nuestra dirección, por María del Rosario Torralba Marco, en el Dpto. de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.C.M., constituyendo su Tesis Doctoral.

Madrid 23 de Mayo de 1996

M. A. Palacios

M. Bonilla

Fdo: M^a Antonia Palacios Corvillo

Fdo: M^a Milagros Bonilla Simón

*A Salvador,
Javier y Miguel.*

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

A mis directoras de tesis, M^a Milagros Bonilla Simón y M^a Antonia Palacios Corvillo, porque sin su supervisión y ayuda no habría sido posible concluir este trabajo.

A Carmen Cámara, por sus orientaciones, cariño y amistad.

Al Departamento de Química Analítica por brindarme todos los medios necesarios para la realización de este trabajo.

A Concepción Pérez y Ana Gutierrez por sus consejos durante las reuniones de investigación.

A mis compañeros de la E.U.I.T. de Obras Públicas y muy especialmente a Rosa Domínguez, por su ayuda en mi labor docente.

Por último, quiero mencionar a mis compañeros más directos que durante todos estos años me han demostrado su afecto y apoyo, especialmente a Yolanda, Beatriz, Gloria, Nines, Milagros, Mari Cruz, María, Vicente, Eugenia, Fernando, Pilar, Antonio, Rocío, Patricia...

GRACIAS A TODOS

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- AAS:** espectroscopía de absorción atómica
AES: espectroscopía de emisión atómica
CCMP: plasma de microondas acoplado capacitivamente.
CI: cromatografía iónica
CT: atrapamiento criogénico
DPP: polarografía diferencial de impulsos
ETV: vaporización electrotérmica
FI: inyección en flujo
FID: detección por ionización en llama
GC: cromatografía de gases
GFAAS: espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito
GSGD: espectroscopía de descarga luminiscente
HG: generación de hidruros
ICP: plasma acoplado inductivamente
LC: cromatografía líquida
MS: espectrometría de masas
QFAAS: espectroscopía de absorción atómica con célula de cuarzo
UV: ultravioleta
- As(III):** arsenito
As(V): arseniato
MMA: ácido metilarsónico
DMA: ácido dimetilarsínico
AB: arsenobetaina
AC: arsenocolina

Nota

Para nombrar los compuestos de arsénico se han seguido las normas de la IUPAC "Nomenclatura de la Química Orgánica (IUPAC)" Adaptación española del original inglés por E. Fernández y F. Fariña. CSIC-RSEQ, Madrid 1987.
"Formulación y nomenclatura. Química Inorgánica". EUNIBAR, Barcelona, 1977.

ÍNDICE

OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	1
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES GENERALES.....	5
<u>CAPÍTULO 1.-</u> Importancia biológica y toxicológica del elemento arsénico y de sus especies químicas	6
I.1.- FUENTES DE PROCEDENCIA Y USOS DEL ARSÉNICO.	7
I.2.- PROPIEDADES QUÍMICAS DEL ARSÉNICO Y SUS ESPECIES.....	9
I.3.- METABOLISMO Y DISTRIBUCIÓN DEL ARSÉNICO EN EL ORGANISMO HUMANO.	11
I.4.- ESENCIALIDAD Y TOXICIDAD DEL ARSÉNICO Y SUS ESPECIES.....	17
I-5.-LEGISLACIÓN VIGENTE.	23
<u>CAPÍTULO 2.-</u> Revisión actualizada de métodos de mineralización y tratamientos para la determinación de contenidos totales de arsénico en muestras biológicas y medioambientales.....	24
<u>CAPÍTULO 3.-</u> Importancia de la determinación de las diferentes especies de arsénico y líneas generales de las técnicas de especiación.....	39
III.1.- ESPECIES QUÍMICAS DEL ARSÉNICO EN MEDIOS AMBIENTALES Y BIOLÓGICOS.	40
III.2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO.	47

III.2.1.- Acoplamiento de técnicas de separación-detección.....	47
III.2.2.- Técnicas basadas en el diferente comportamiento químico de las distintas especies, frente a disolventes, intercambiadores o reactivos químicos.....	55
<u>CAPÍTULO 4.- Bibliografía de la primera parte: introducción y antecedentes generales.....</u>	66
PARTE EXPERIMENTAL.....	78
<u>CAPÍTULO 5.- Desarrollo de la metodología para la determinación de arsénico total en muestras biológicas.....</u>	79
V.1.- APARATOS, MATERIALES REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	81
V.1.1.- Estudio comparativo de distintas disoluciones patrón.....	84
V.2.- TIPOS DE MUESTRAS ANALIZADAS Y LIOFILIZACIÓN DE LAS MISMAS.....	87
V.3.- PROCEDIMIENTOS PROPUESTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	88
V.3.1.- Procedimientos empleados en el tratamiento de la muestra.....	88
V.3.2.- Procedimiento experimental para la determinación de arsénico por generación de hidruros en modo discontinuo-Absorción Atómica.....	91
V.3.3.- Procedimiento experimental para la determinación de arsénico por Generación de Hidruros en Flujo Continuo-Absorción Atómica.....	94
V.3.4.- Procedimiento experimental para la determinación de arsénico por Generación de Hidruros en FI-Absorción Atómica.....	95
V.4.- OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DE LOS MÉTODOS PROPUESTOS.....	96

V.4.1.- Mineralización de la muestra.....	96
V.4.2.- Desarrollo del método analítico para la determinación de As total por la técnica de generación de hidruros: Determinación en discontinuo por Absorción Atómica y espectrofotometría UV-VIS.....	98
V.4.2.1.- Consideraciones generales.....	98
V.4.2.2.- Optimización de los parámetros físico químicos para la formación del hidruro de arsénico a partir de sus especies inorgánicas.	104
V.4.2.3.- Características analíticas.	118
V.4.3.- Desarrollo del método analítico para la determinación de arsénico total por generación de hidruros-absorción atómica, mediante el método en continuo	121
V.4.3.1.- Optimización de variables para la determinación de arsénico por HG en continuo-AA.....	121
V.4.3.2.- Estudio de interferencias.	131
V.4.3.3.- Minimización de las interferencias debidas al Sb Y Se en la generación de arsina: empleo de las mezclas KI- α -hidroxiácidos....	141
V.4.3.4.- Características analíticas	149
V.4.4.- Desarrollo del método analítico para la determinación de arsénico total mediante FIA-HG-AAS	150
V.4.4.1.- Optimización de variables para la determinación de arsénico por HG-AAS mediante inyección en flujo.....	150
V.4.4.2.- Estudio de interferencias	156
V.4.4.3.- Características analíticas	157
V.5.- COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS PROPUESTOS.....	158
V.6.- APLICACIONES.....	162
V.6.1.- Generación de hidruros acoplada a la espectrofotometría ultravioleta-visible y a la absorción atómica en discontinuo: Diferenciación entre As(III) y As(V) inorgánico.	163
V.6.2.- Aplicaciones analíticas de la técnica HG-AAS en continuo y FIA.....	170

<u>CAPÍTULO 6.- Desarrollo de la metodología para la determinación de las especies de arsénico As(III), As(V), MMA Y DMA en muestras medioambientales</u>	177
VI.1.- APARATOS, MATERIALES REACTIVOS Y DISOLUCIONES	178
VI.2.- GENERALIDADES SOBRE LA ESPECIACIÓN DE As(III), As(V), MMA Y DMA	181
VI 2.1.- Procedimiento experimental	184
VI.3.- LA CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE COMO TÉCNICA DE ESPECIACIÓN	185
VI.3.1.- Métodos de calibración multivariante	189
VI.3.2.- Método de trabajo (algoritmos): CLS, ILS y Filtro de Kalman.....	191
VI.3.3.- Estudio teórico comparativo de los diferentes métodos de calibración utilizados	197
VI.3.4.- Criterios de validación de resultados.....	198
VI.3.5.- Procedimiento para la aplicación de los métodos de calibración multivariante	199
VI.3.6.- Estudio comparativo de los resultados obtenidos en los distintos métodos de calibración. Error estándar de predicción (SEP).....	210
VI.3.7.- Error relativo de predicción (REP).....	213
VI.3.8.- Estudio de simplificación del procedimiento de calibración multivariante	215
VI.3.9.- Aplicaciones a muestras reales.....	220
<u>CAPÍTULO 7.- Bibliografía de la parte experimental</u>	225
CONCLUSIONES	232

OBJETIVOS DEL TRABAJO.

Como consecuencia del uso indiscriminado de compuestos de arsénico que, en los últimos años se está haciendo en la industria, hay una creciente preocupación por posibles contaminaciones ambientales que pueden ocasionar daños importantes en la flora y en la fauna. Si bien en la mayoría de los casos es el arsénico inorgánico el que se vierte en el ambiente, debido a procesos químicos, bacteriológicos o por la acción de microorganismos, este arsénico inorgánico pasa a formar especies orgánicas, siendo las más frecuentes el ácido metilarsónico, el ácido dimetilarsínico, o los aminoácidos de arsénico tales como la arsenobetaina y la arsenocolina, compuestos que poseen muy diferente toxicidad para los organismos vivos. Así, las especies más tóxicas por ser las más reactivas son las especies inorgánicas As(III) y As(V) en este orden. Al aumentar el grado de metilación, van perdiendo parte de su toxicidad, de forma que los ácidos metilarsónico y dimetilarsínico presentan todavía una notable toxicidad, mientras que la arsenobetaina y arsenocolina son relativamente inocuas.

El desarrollo de métodos analíticos para conocer las concentraciones reales de las distintas especies que aparecen en las muestras medioambientales, 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 tejidos biológicos (envenenamientos) y en la actualidad, sigue siendo el mejor método para la determinación de arsénico total y de la mayoría de sus especies químicas.

Aunque quizás hoy en día el objetivo fundamental de la investigación que se está desarrollando, sea proponer métodos analíticos que permitan la determinación de las distintas especies, cuando se inició el trabajo de investigación contenido en la presente memoria existían grandes controversias entre los métodos analíticos, para la determinación

de arsénico total. Estas controversias se planteaban fundamentalmente cuando se trataba de realizar los procedimientos analíticos desarrollados participando en los ejercicios de intercomparación promovidos por Organismos Europeos o en la certificación de materiales de referencia. Los principales problemas sin resolver que conducían a las dificultades de la certificación eran los siguientes:

- 1º) Encontrar la mineralización más adecuada a los distintos tipos de muestra que minimizaran al máximo problemas tales como pérdidas del analito por volatilidad, acusados efectos de matriz, blancos de concentración similar a las muestras, etc.
- 2º) La mayoría de las determinaciones de arsénico se realizaban aplicando métodos de generación de hidruros en discontinuo, sin embargo, se perfilaba ya que la generación de hidruros en continuo o en inyección en flujo, presentaban grandes ventajas con respecto a los métodos en discontinuo ya que la manipulación de la muestra es menor y son mucho más automáticos.
- 3º) Existían grandes controversias acerca de la eficiencia de generación del hidruro a partir de los grados de oxidación (III) y (V). Así en aguas, extractos de sedimentos, etc., y en general muestras que no necesitan pretratamiento inicial, pueden estar presentes ambos grados de oxidación.

En muestras tratadas con ácidos oxidantes (mineralizaciones) todo el arsénico pasa a As(V). Si el hidruro no se genera con la misma eficiencia a partir de ambos grados de oxidación o a partir de As(V) (con respecto al As(III)) las determinaciones son erróneas. Una forma de subsanar el problema es la prerreducción del As(V) a As(III) añadiendo KI como paso previo a la generación del hidruro total, pero la adición de KI no está exenta de grandes inconvenientes entre los que se encuentran: i) cinética de reducción muy lenta; ii) aparición de grandes concentraciones de I₂ en medios oxidantes; iii) dificultad de añadirlo en los métodos en continuo, en FIA y en las técnicas acopladas que se emplean en especiación, etc...

- 4º) Otro de los temas controvertidos era la extensión de las interferencias producidas en fase líquida o en fase gaseosa (fundamentalmente debidas a otros formadores de hidruros) y su minimización.
- 5º) Finalmente, el problema de la especiación se abordaba empleando las técnicas acopladas: cromatografía-detectores atómicos como la alternativa más idónea. Sin embargo, estos acoplamientos presentan serios inconvenientes, tales como: i) diseños de interfases adecuados que permitan la transferencia del analito desde la columna cromatográfica al detector sin pérdidas del mismo; ii) compaginar las condiciones óptimas de trabajo de ambos instrumentos; iii) costo elevado del aparato; iv) personal altamente especializado, etc...

Tratando en esta memoria de establecer métodos fáciles, para la determinación de As total y de sus especies, que puedan ser aplicados al análisis de rutina, se ha buscado la solución óptima a cada uno de los problemas planteados. Así se ha abordado:

- 1º) El problema de la mineralización óptima dependiendo de la naturaleza de la muestra.
- 2º) Puesta a punto de métodos en continuo y FIA para el análisis de As total y de sus especies químicas.
- 3º) Generación del hidruro de As con la misma eficiencia a partir de los grados de oxidación (III) y (V) sin empleo de KI.
- 4º) Conocer el alcance de las posibles interferencias.
- 5º) Abordar el problema de la especiación del arsénico de forma química a través de la reducción selectiva de las distintas especies a la forma de hidruros, en función del

medio de reducción y ayudado por una poderosa herramienta química que constituye hoy en día la quimiometría.

PARTE I

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES GENERALES

CAPÍTULO I

IMPORTANCIA BIOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA DEL ELEMENTO ARSÉNICO Y DE SUS ESPECIES QUÍMICAS

I.1.- Fuentes de procedencia y usos del arsénico.

I.2.- Propiedades químicas del arsénico y especies.

I.3.- Metabolismo y distribución del arsénico en el organismo humano.

I.4.- Esencialidad y toxicidad del arsénico y sus especies.

I.5.- Legislación vigente.

1.1.- FUENTES DE PROCEDENCIA Y USOS DEL ARSÉNICO.

El arsénico elemental así como los compuestos arsenicales están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Su abundancia en la corteza terrestre es muy variada y es especialmente elevada en zonas con filones hidrotermales, rocas volcánicas, compuestos sulfurados, carbón etc., presentando intervalos de concentración del orden de los mg/Kg y entre los que podemos destacar: el basalto 0.06-113 mg/Kg; el granito 0.2-12.2 mg/Kg; la caliza 0.1-20 mg/Kg; los esquistos y las arcillas 0.3-420 mg/Kg; etc...

Aunque el arsénico elemental, arsénico nativo (As), se encuentra en la naturaleza, generalmente este elemento se encuentra combinado. Los minerales de arsénico más importantes son: arsenopirita (FeAsS), lollingita (FeAs_2), cobaltita (CoAsS), domeikita (Cu_3As), niquelina (NiAs), escuterudita (Co,Ni,FeAs_3), rejalgar (As_4S_4), oropimente (As_2S_3) y allemontita (AsSb), todos ellos de origen hidrotermal, es decir, se depositan a partir de disoluciones acuosas a altas temperaturas, relacionadas con las últimas fases de la consolidación magmática o con las manifestaciones finales de una erupción volcánica.

También se encuentra el arsénico en minerales de origen secundario, formados por la alteración en la superficie de otros minerales preexistentes. Así se originan, por ejemplo, la annabergita ($\text{Ni}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$), la eritrina ($\text{Co}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) y la mimetita ($\text{Pb}_5(\text{AsO}_4)_3\text{Cl}$) entre otros (GALAN E., 1979; DUD'A R., 1989).

Aunque el arsénico se presenta en un número relativamente elevado de especies minerales, sus yacimientos son escasos y diseminados, siendo sus fuentes de producción principales los procesos de refinado de otros minerales, especialmente de Cu, Pb y Zn, así como el quemado de aceites fósiles. Así, los distintos compuestos de arsénico se obtienen como subproductos y la combinación más importante de arsénico es la de trióxido, arsénico blanco, que se vaporiza durante el fundido de dichos minerales (KATZUNG B.G., 1984).

Por otra parte el uso industrial es relativamente bajo e incluye las aplicaciones como insecticida, fungicida, herbicida, en la industria del algodón, como preservador de la madera, alguicida, y como aditivo en vidrios.

En la industria metalúrgica se utiliza en muy pequeñas cantidades para la producción de algunas aleaciones ya que tiene la propiedad de aumentar la dureza y la resistencia al calor de algunos aceros, bronces etc. El arsénico se añade en la fabricación de perdigones pues aumenta la tensión superficial del fundido del plomo (DEKKER M., 1988).

También se utiliza en las pastas de semiconductores aunque el consumo neto de arsénico por la industria electrónica es bastante pequeño.

Otro uso menos recomendable pero ampliamente utilizado, ha sido como veneno y en la 2ª Guerra Mundial se emplearon compuestos clorados de arsénico orgánico como arma química (gas mostaza).

Por último destacar que los compuestos orgánicos de arsénico se utilizaron como medicamentos en el tratamiento de la sífilis aunque este uso quedó relegado por la aparición de la penicilina y otros antibióticos. Sin embargo, el empleo de algunos compuestos de arsénico es todavía indispensable en el tratamiento contra cierto parásito tropical.

I.2.- PROPIEDADES QUÍMICAS DEL ARSÉNICO Y SUS ESPECIES.

Aunque la química del arsénico está firmemente establecida y puede encontrarse en cualquier monografía del elemento, resaltaremos brevemente las principales propiedades del mismo y de las especies que inciden directamente en el desarrollo de la metodología propuesta en esta memoria para su determinación.

Las formas más usuales del arsénico en muestras medioambientales, se muestran en Tabla I.1, junto con los pK_a de disociación.

Tabla I.1.-Formas presentes del As en muestras medioambientales.

	Especie	Acido	pK _a
As inorgánico	Arsenitos (As(III))	H ₃ AsO ₃	9.23 / 12.13 / 13.40
	Arseniatos (As(V))	H ₃ AsO ₄	2.22 / 6.98 / 11.53
As orgánico	Monometilarsonato (MMA)	CH ₃ AsO(OH) ₂	4.1 / 8.7
	Dimetilarsinato (DMA)	(CH ₃) ₂ AsO(OH)	6.2
	Arsenobetaina (ASB)	(CH ₃) ₃ As ⁺ -CH ₂ -COO ⁻	
	Arsenocolina (ASC)	(CH ₃) ₃ As ⁺ -CH ₂ -CH ₂ -OH	
Formas volátiles	As H ₃ , (CH ₃) ₃ As etc.		

Por otra parte, la acción de reductores fuertes sobre algunos compuestos de arsénico, tanto en grado de oxidación III como en V, lo transforma en la arsina. La arsina (AsH₃) es un gas que licúa a -55°C y solidifica a -119°C. Dicho gas presenta un elevado poder

reductor en todo el intervalo de pH y una gran inestabilidad térmica. De hecho se descompone en arsénico pardo e hidrógeno cuando se calienta a temperaturas superiores a 230°C en ausencia de aire (BURRIEL F., 1989)

Las formas solubles de arsénico descritas, excepto la arsenobetaina y la arsenocolina, son capaces de formar hidruros covalentes volátiles, hecho de gran importancia ya que permite la determinación de las mismas por formación del hidruro correspondiente. Los puntos de ebullición de los diferentes hidruros vienen dados en la Tabla I.2.

Tabla I.2.- Puntos de Ebullición de diferentes arsinas

Especie	Hidruro	PE (°C)
As(III)	As H ₃	-55
As(V)	As H ₃	-55
MMA	CH ₃ AsH ₂	2
DMA	(CH ₃) ₂ AsH	35,6

I.3.- METABOLISMO Y DISTRIBUCIÓN DEL ARSÉNICO EN EL ORGANISMO HUMANO.

La principal fuente de consumo de arsénico por el hombre es a través de los alimentos si bien no se acumula a niveles tóxicos. Solamente, después de un consumo excesivo de pescado, mejillones, langosta y otros alimentos marinos se aumenta la cantidad ingerida, pero ni siquiera este hecho, constituye peligro de intoxicación.

Se conoce muy poco sobre aspectos específicos del metabolismo del arsénico en el organismo. El arsénico tiene una afinidad grande por los grupos hidroxilo y tioles lo que explicaría su interacción con ciertas enzimas y proteínas. De hecho se sabe que este elemento presenta especial afinidad por la queratina, proteína rica en azufre que compone los tejidos córneos del cuerpo como las uñas, cabellos y parte superficial de la piel, por lo que es en estas zonas donde se acumula de forma preferente.

Se sabe que algunas formas de arsénico, presentes en la dieta, se absorben muy fácilmente en el tracto intestinal. Dado que el selenio presenta esta misma vía de penetración en el organismo, se establece una competencia entre estos dos elementos y la presencia de selenio desplaza la absorción de arsénico, por lo que el primero tiene la propiedad de reducir la toxicidad del segundo y viceversa, resultando que el exceso corporal de uno de los elementos reduce la concentración del otro (LINDER M.C., 1988).

El arsénico también puede penetrar en el organismo a través de la piel o por inhalación.

La cantidad de arsénico consumido por los individuos es muy variable y depende fundamentalmente del tipo de alimentos de origen marino ingeridos, del tipo de arsénico contenido en el agua de bebida y de la exposición por motivo de trabajo, a atmósferas especialmente contaminadas. De todas formas los factores de contaminación industrial o

de manipulación alimentaria, no son determinantes en la carga corporal de este elemento. La Tabla I.3 muestra los contenidos medios de arsénico en algunos alimentos y bebidas (SEILER H.G., 1988).

Tabla I.3.- Contenidos medios de arsénico (mg Kg^{-1}) de algunos alimentos y bebidas usuales en la dieta.

Bebidas	mg Kg^{-1}
vino	0.005-0.03
cerveza	0.005
zumos de frutas y vegetales	0.01-0.03
café	0.01
Verduras y hortalizas	
espinacas	0.23
perejil	0.26
espárragos	0.02
patatas	0.01-0.3
zanahoria	0.007-0.03
Grasas	
aceites vegetales	0.002-0.02
margarina	0.002-0.01
mantequilla	0.01
tocino	0.005

Tabla L3.- (Continuación).

Cereales, azúcar	mg Kg⁻¹
harina	0.01
arroz	0.22
pan negro	0.006
pan blanco	0.003
maíz	0.05
azúcar	0.0001-0.04
Lácteos	
leche y derivados	0.003-0.025
Carnes y huevos	
cerdo	0.003-0.03
hígado de cerdo	0.02
riñones de cerdo	0.01
vaca	0.001-0.065
hígado de vaca	0.005-0.07
riñones de vaca	0.02-0.132
ternera	0.002-0.012
riñones de ternera	0.02-0.04
riñones de ternera	0.015-0.02
aves de corral	0.001
hígado de pavo	0.217
huevos	0.01-0.5

Tabla I.3.- (Continuación).

Pescados y mariscos	mg Kg ⁻¹
arenques	0.8-1.43
bacalao	0.6-7.29
hígado de bacalao	0.8
sepia	1.0
gambas	3.2-25.7
moluscos	1.6-2.9
langosta	1.5-122.0
pescado de agua dulce	0.01

Como se puede observar en Tabla I.3, las gambas y sobre todo las langostas son los alimentos con mayor concentración de arsénico y en casos esporádicos éstas últimas pueden sobrepasar los 100 mg Kg⁻¹ debido a que estos animales almacenan específicamente este elemento.

En el organismo humano el contenido de arsénico está próximo a los 0.3 mg Kg⁻¹. En la Tabla I.4 se muestran los contenidos de arsénico en algunos órganos y fluidos corporales.

En cuanto a la eliminación de arsénico del organismo se puede decir que mayoritariamente se excreta por vía urinaria en forma de sales inorgánicas y derivados metilados, especialmente ácido dimetilarsénico. Puesto que el cabello y las uñas contienen cantidades considerables de arsénico, es muy probable que tales estructuras sean vías de eliminación de este elemento. Además, se sabe que las cantidades pequeñas de arsénico se eliminan por medio de secreciones intestinales. Debido a que la velocidad de excreción es

lo suficientemente elevada, la formación de depósitos tóxicos de este elemento, incluso en individuos expuestos a ambientes contaminados, es altamente improbable.

Tabla L4.- Contenidos de arsénico en algunos órganos y fluidos corporales, en mg Kg⁻¹ resultado de una alimentación normal.

Órgano o fluido	mg Kg ⁻¹
Glándulas suprarrenales	0.03
Aorta	0.04
Sangre	0.04
Cerebro	0.01
Pelo	0.46
Corazón	0.02
Riñón	0.03
Hígado	0.03
Pulmón	0.08
Músculo	0.06
Uñas	0.28
Ovarios	0.05
Piel	0.08
Bazo	0.02
Estómago	0.02
Dientes	0.05

Como era de esperar, los mayores contenidos de arsénico se encuentran en uñas y en cabellos, aunque como ya veremos, esta acumulación no es observable hasta pasado un cierto periodo, relativamente largo, después de la intoxicación o exposición al elemento.

I.4.- ESENCIALIDAD Y TOXICIDAD DEL ARSÉNICO Y SUS ESPECIES.

Los efectos tóxicos del arsénico son bien conocidos pero también es cierto que determinados compuestos arsenicales se utilizan con fines terapéuticos. Un ejemplo de estos usos lo encontramos en las explotaciones agropecuarias donde utilizan el ácido arsenílico y ciertas formas de nitrofenilo de arsénico para estimular el crecimiento y la eficacia nutricional de cerdos y aves (LINDER M.C.,1988).

Hasta 1935 sólo se consideraban seis elementos traza como esenciales: Fe, I, Cu, Mn, Zn, Co. Se sabe que estos elementos juegan papeles importantes en procesos vitales, ya que pueden actuar como cofactores esenciales para la actividad de las enzimas, como constituyentes de hormonas o bien pueden estar involucrados en el transporte de oxígeno. En el periodo comprendido entre 1935 y 1976 se añadió el arsénico, junto con otros ocho elementos, a esta lista de elementos esenciales: Mo, Se, Cr, Sn, V, F, Si, Ni y As. (SHIBATA Y., 1992).

Dentro de esta clasificación podemos destacar que el arsénico, al igual que el selenio, son los únicos metaloides que son considerados elementos esenciales.

No se puede generalizar sobre la dosis de arsénico que desencadena su toxicidad, de hecho varía mucho en función de los distintos individuos y sobre todo, de la forma de arsénico suministrado en la dieta. Como dato orientativo se puede considerar que para un adulto, la dosis tóxica es de 0.5 mg Kg⁻¹ de arsénico inorgánico y la dosis potencialmente mortal es de 2.0 mg Kg⁻¹ (FARRERAS VALENTI P., 1991).

Las formas químicas de arsénico de importancia toxicológica son el arsénico elemental, el inorgánico, los arsenicales orgánicos y el gas arsina (BERTRAM G.,1984). Ahora bien, todas estas formas no son igualmente tóxicas. En orden creciente a su toxicidad:

Arsina > arsénico inorgánico (As(III) > As(V)) > arsénico orgánico > arsénico elemental.

La especie más tóxica es la arsina, AsH_3 , cuya dosis letal, para el 50% de la población en ratas (LD_{50}), es de 3 mg Kg^{-1} ; seguido del arsenito, As(III), con un valor de LD_{50} entre 20 y 60 mg Kg^{-1} y por último el arseniato As(V). La toxicidad de las especies orgánicas de arsénico, tales como el monometilarsénico (MMA), o el dimetilarsénico (DMA), es mucho más baja, del orden de 1000 veces menos, incluso la arsenobetaina, que predomina en la mayoría de los organismos marinos, se ha demostrado que no es tóxica (HARRISON R.M., 1989).

Tanto el As(III), el MMA y el DMA deben su toxicidad a la inhibición de los grupos SH de las enzimas, mientras que la toxicidad del As(V) se debe a que inhibe la fosforilación oxidativa.

El arsenito AsO_2^- , se distingue por su tendencia a reaccionar rápidamente con los grupos tiol, especialmente con los ditiolos, tales como el ácido lipoico Figura I.1. Al bloquear a los enzimas oxidativos que precisan del ácido lipoico, el arsenito provoca la acumulación del piruvato y de otros α -cetoácidos (METZLER D.E., 1981).

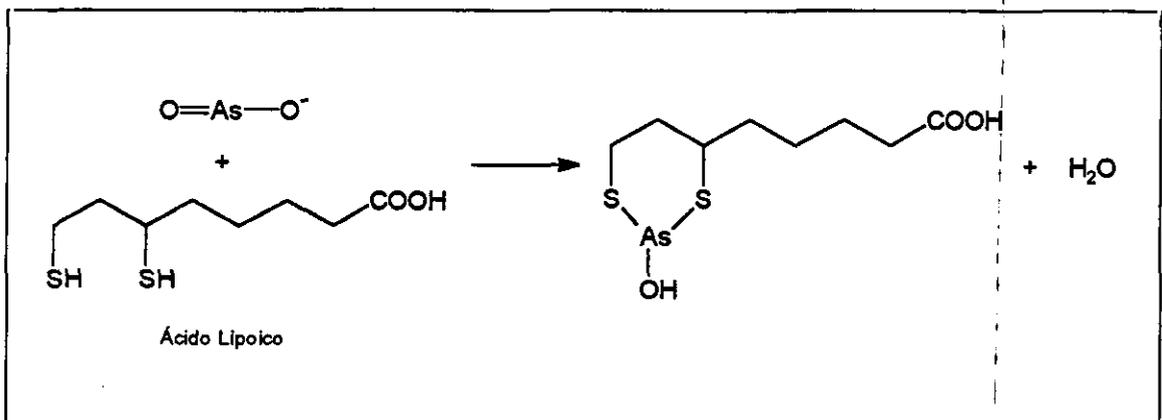


Figura I.1.- Reacción del arsenito con el ácido lipoico

El arseniato, AsO_4^{3-} , es químicamente semejante al fosfato, en tamaño, en geometría y en su capacidad para formar parte en reacciones bioquímicas; sin embargo, los ésteres de arseniato son menos estables que los ésteres de fosfato. En caso de formarse sobre una superficie enzimática, se hidrolizan inmediatamente al disociarse del enzima. Este hecho, permite interpretar la naturaleza tóxica de muchos compuestos de arsénico. El arseniato por tanto, sustituirá al fosfato en todas las reacciones fosforolíticas. Por ejemplo, el arseniato, puede participar en la reacción catalizada por el gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa formando 1-arseno-3-fosfo-D-glicerato, que es un intermedio inestable. El arsénico sustituye al fosfato inorgánico, lo que da como resultado la formación de un anhídrido mixto que, en presencia de agua, es rápidamente hidrolizado. Cuando ocurre esta hidrólisis, no se produce el paso en el cual el ADP es normalmente fosforilado por el 1,3-difosfo-D-glicerato (1,3 DPG) y como consecuencia la célula no puede regenerar el ATP y finalmente muere. Figuras I.2 y I.3 (RAWN J.D., 1989).

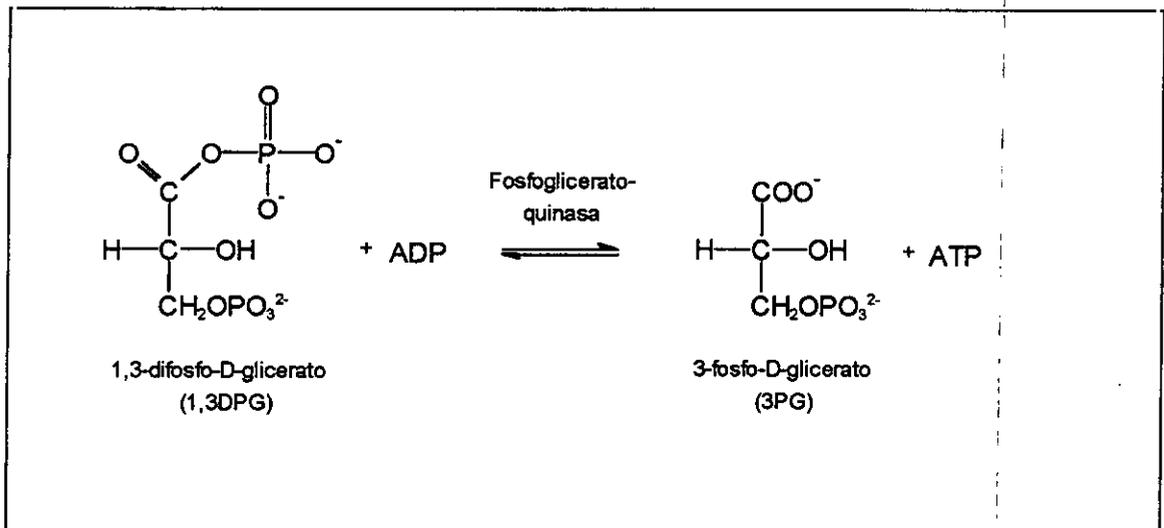


Figura I.2.- Transferencia del grupo fosforilo desde el 1,3 DPG al ADP y formación de 3-fosfo-D-glicerato (3PG). Esta reacción forma parte de la glucólisis que produce ATP.

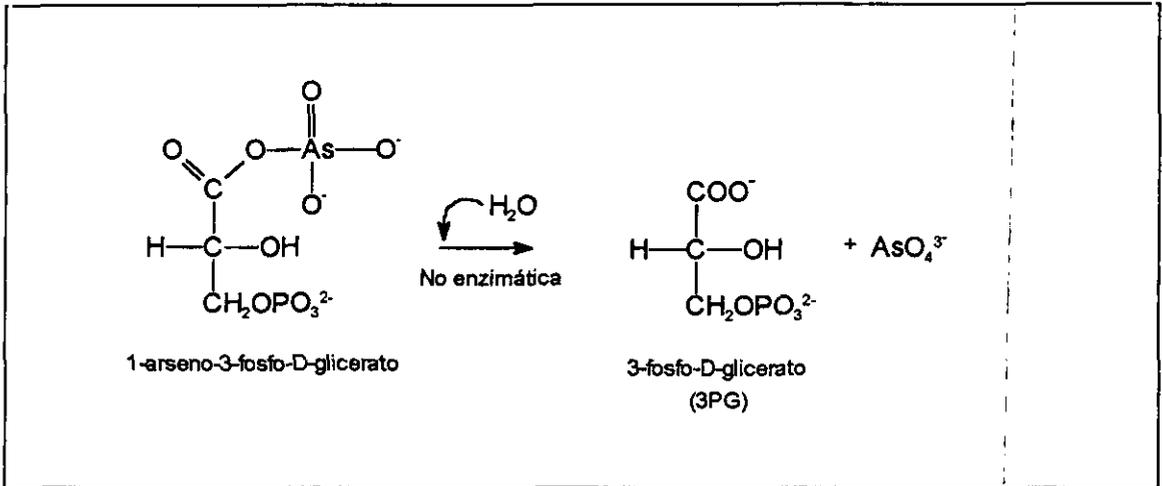


Figura L3.- Hidrólisis del 1-arseno-3-fosfo-D-glicerato. El arseniato sustituye al fosfato inorgánico como sustrato de la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, formándose el intermedio 1-arseno-3-fosfo-D-glicerato, lábil. Este intermedio se hidroliza rápidamente por el agua, sin que se produzca ATP. De esta forma el arseniato desacopla la oxidación del (3PG) y la fosforilación del ADP.

La diferencia de toxicidad entre los arsenitos y los arseniatos por tanto, puede explicarse en base a la velocidad de excreción y retención en el cuerpo, así como al número de enzimas afectadas.

El arseniato se excreta rápidamente en la orina y aparentemente no se acumula en los tejidos. Por otro lado, el arsenito no se excreta rápidamente, se acumula en el cuerpo unido a proteínas en el hígado, músculo, cabello, uñas, piel y particularmente a los leucocitos. El arsenito se excreta por vía biliar.

En cuanto a la toxicidad de los compuestos orgánicos que contienen arsénico, es también distinta dependiendo del estado de oxidación del arsénico, de su velocidad de absorción y excreción y de su distribución en el organismo. Por ejemplo, el ácido arsánico y el ácido aminobenceno arsónico, presentan muy baja toxicidad en los cerdos ya que se excretan rápidamente en la forma no metabolizada y su acumulación en los tejidos

es mínima pero pueden causar tetraplejía y otros daños neurológicos, cuando se les suministra 1100 mg Kg^{-1} durante 18 días (CONCON J.M., 1988).

El mayor procedimiento de diagnóstico de concentraciones corporales excesivas, o de consumo elevado de arsénico se basa en las determinaciones del elemento en cabello y orina y a veces, en los contenidos en sangre. La sangre aunque es un indicador biológico de una exposición a este elemento, tiene el inconveniente de que los niveles medidos sólo son útiles si se hace la medida dentro de unos pocos días de una exposición aguda, pero no es útil para determinar una exposición crónica. La orina es el mejor indicador de una exposición normal o excesiva en cuyo caso sobrepasa los $100 \mu\text{g l}^{-1}$. (CASARETT and DOULL'S, 1986)

Como ya se ha dicho, los compuestos arsenicales se combinan con los grupos tioles, por lo que en caso de envenenamiento se administra el 2,3-dimercaptopropanol, más conocido como BAL o dimercaprol. Este compuesto es especialmente efectivo ya que posee dos grupos SH adyacentes que le permiten formar una estructura estable con el metal.

Existen dos objetivos principales usando el BAL. El primero es la inactivación del veneno por formación de un complejo cíclico, de tal forma que se evita su combinación con los grupos sulfhidrilos de sistemas enzimáticos vitales. El segundo objetivo es el de promover la eliminación del veneno. El complejo es soluble en agua a $\text{pH}=7.5$ y excretado fácilmente (CLARK S.,1990). La reacción de algunos compuestos orgánicos del arsénico con el BAL, se esquematiza en la Figura I.4.

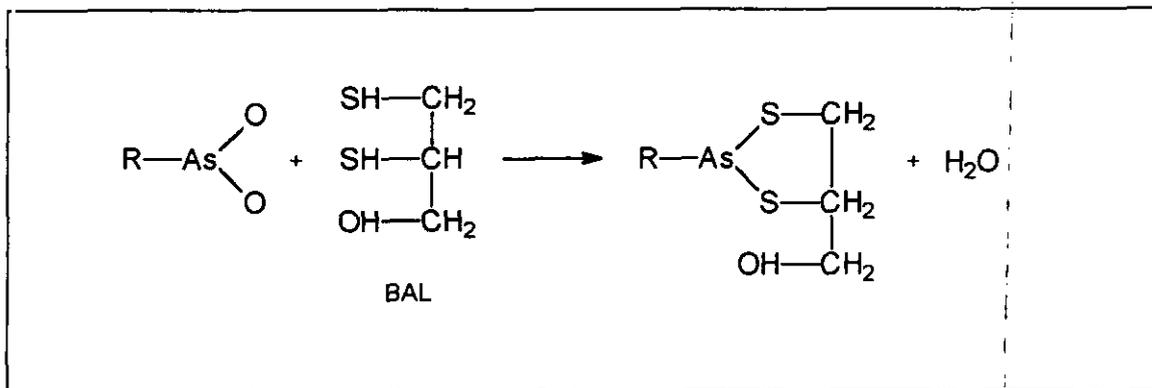


Figura I.4.- Reacción de los arsenicales orgánicos con BAL.

Los resultados obtenidos de muchos estudios realizados en animales, así como de investigaciones epidemiológicas, parecen demostrar que el arsénico posee efectos carcinógenos especialmente sobre la piel, pulmones y sistema linfático. Sin embargo, otros estudios han revelado la ausencia total de propiedades carcinógenas del arsénico, y parece demostrarse que ciertas formas orgánicas de arsénico, pueden tener efectos anticarcinógenos en relación con tumores. Es evidente que determinados factores y variables deben estar implicados en los efectos carcinógenos, si los tiene. Por ejemplo, si como ya se ha dicho, la administración de arsénico hace disminuir la concentración corporal de selenio, se podría producir carcinogénesis, no tanto por el arsénico como por la disminución corporal de selenio (LINDER M.C., 1988).

I-5.-LEGISLACIÓN VIGENTE.

Como hemos visto la fuente principal de consumo de arsénico por el hombre es a través de los alimentos, sobre todo de origen marino y del tipo de arsénico contenido en el agua de bebida.

Dada la importancia que para la salud pública tienen las aguas destinadas al consumo humano, es necesario establecer unas normas de calidad, que han de cumplir dichas aguas.

La adhesión de España a la Comunidad Económica Europea ha hecho necesario armonizar nuestra legislación a las disposiciones comunitarias, entre las que se encuentran:

- a) Directiva 75/440/CEE de 16 de junio ("Diario oficial de las Comunidades Europeas" de 25-7-75) relativa a la calidad requerida para aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los Estados miembros.
- b) Directiva 80/778/CEE de 15 de julio ("Diario oficial de las Comunidades Europeas" de 30-8-80) relativa a la calidad de aguas destinadas al consumo humano.

En esas directivas comunitarias el arsénico, como era previsible, se encuentra dentro de las sustancias tóxicas y la concentración máxima admisible es de $50 \mu\text{g l}^{-1}$.

Por otra parte, el método de referencia recomendado para su determinación analítica es la espectrometría de Absorción UV-VIS y la Absorción Atómica.(BOE núm. 226, septiembre 1990).

CAPÍTULO II

**REVISIÓN ACTUALIZADA DE MÉTODOS DE MINERALIZACIÓN Y
TRATAMIENTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTENIDOS TOTALES
DE ARSÉNICO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y MEDIOAMBIENTALES**

El destino de los elementos traza y su impacto medioambiental es y ha sido una de las mayores preocupaciones en los últimos 25 años. La mayor parte de los estudios, se han limitado a la determinación del contenido total del metal, aunque en la última década se están desarrollando métodos para la diferenciación de especies. Este capítulo se refiere únicamente a los métodos para la determinación de contenidos totales.

A continuación se comentan algunos de los trabajos encontrados en la bibliografía más reciente, o bien aquellos trabajos que siendo más antiguos, proporcionan datos y conclusiones interesantes.

La mayoría de los trabajos recogidos en la bibliografía para la determinación de arsénico, se basan en la capacidad de este elemento para formar hidruros covalentes volátiles. La técnica de generación de hidruros, ha sido la forma más generalizada para la introducción de muestra cuando se utiliza el espectrofotómetro de absorción atómica como sistema detector. Tal es su importancia que sigue siendo objeto de interés de diversos "reviews" (NAKAHARA T., 1991; YAN X-P, 1994).

El Zn fue originariamente utilizado para la generación del hidruro covalente de arsénico (y de otros hidruros) (HOLAK W., 1969), pero ha sido totalmente sustituido por el NaBH_4 como agente reductor (THOMPSON K.C., 1974); incluso, en los últimos años, están apareciendo métodos alternativos para generar el hidruro sin utilizar NaBH_4 , mediante su generación electrolítica (LIN Y., 1992; HUEBER D.M., 1995).

Un problema adicional que además es el primero con el que se encuentra el analista, es la preparación de la muestra. La importancia de llevar a cabo una buena mineralización de los materiales biológicos como paso previo a su análisis es reconocido por todos; sin embargo, la transformación del tejido biológico en una disolución, que es un paso que se requiere para el análisis de rutina, constituye en la mayoría de los casos un grave problema. Considerando el número de métodos de digestión que existen actualmente y sus

numerosas y posibles modificaciones, no es sorprendente la necesidad de evaluar críticamente las técnicas de preparación de la muestra antes de recomendar los métodos estándar óptimos para cada elemento.

La mezcla de dos o más ácidos fuertes, el empleo de un ácido fuerte con un catalizador de la descomposición, la mineralización por vía seca y más recientemente el empleo de la mineralización ácida asistida por horno microondas, se perfilan como las alternativas más aptas para el elemento arsénico, si bien todos ellos gozan de ventajas e inconvenientes.

Tradicionalmente, los métodos de mineralización por vía húmeda han sido los más recomendados para la determinación de metales volátiles tales como el Hg, As, Se, etc. Dependiendo de la naturaleza de la matriz, las mezclas HNO₃-HClO₄, HNO₃-H₂SO₄ o HNO₃-H₂SO₄-HClO₄ son las más empleadas.

En algunas determinaciones puede permitirse una digestión incompleta, pero esto no es recomendable en el caso del arsénico cuando se determina por formación del hidruro correspondiente ya que en la descomposición incompleta de la matriz, pueden formarse sustancias coloidales que ocuyen al arsénico impidiendo la formación del hidruro.

En presencia de ácidos grasos, es imprescindible el empleo de HClO₄, en la mayoría de los casos, para que se produzca la mineralización total. La mezcla HNO₃-H₂SO₄-HClO₄ puede considerarse efectiva para el arsénico siempre que se guarden las siguientes precauciones: 1°) que la disolución no hierva a sequedad ya que ocurren pérdidas de arsénico por volatilidad así como riesgo de formación de ésteres de perclorato explosivos. 2°) No emplear la mezcla cuando el contenido en grasas y aceites es superior al 50% y 3°) Evitar la carbonización de la muestra que produce pérdidas por volatilización del As.

Los métodos de mineralización húmeda, y en ausencia de HClO₄, con frecuencia requiere el empleo de catalizadores. En este caso, la combinación que puede considerarse más idónea para el caso del arsénico, es HNO₃-V₂O₅, realizando el ataque en reactores a presión. Aunque la principal virtud de este tipo de mineralización estriba en que es prácticamente imposible la pérdida del elemento por volatilidad, la limitación del tamaño de muestra (inferior en todos los casos a 1 g de peso seco) y la posible interferencia causada por el catalizador puesta de manifiesto por algunos autores, tienen que ser tomadas en consideración.

Los métodos por vía seca son una alternativa real a los métodos por vía húmeda. La mineralización requiere en el caso de este elemento un agente favorecedor de la misma que con frecuencia es el Mg(NO₃)₂ o la mezcla Mg(NO₃)₂-MgO. No se conoce el mecanismo por el cual el magnesio actúa como sustancia que retiene al arsénico impidiendo su volatilidad a la temperatura en que se realiza la mineralización (400-500°C), pero es un agente imprescindible para que el arsénico quede retenido en las cenizas. Algunos problemas que conlleva esta mineralización es la posibilidad de introducir con el Mg²⁺ metales contaminantes que pueden interferir en la formación de su hidruro, riesgo de pérdida de As fundamentalmente en presencia de contraiones que formen sales volátiles (ejem Cl⁻), enlaces del arsénico con la superficie del contenedor o dificultad de disolver el residuo de cenizas y posible formación de espumas en la etapa de formación del hidruro.

La búsqueda de métodos de mineralización más simples, seguros y baratos para la disolución de las muestras continúa siendo un reto analítico. El empleo del horno microondas para digestiones ácidas favorece la disolución de la muestra, especialmente porque solo requiere un tiempo de 5-10 minutos por muestra. Sin embargo, no todo está resuelto con este mineralizador ya que los problemas de tamaño de muestra (generalmente inferior a 0,5 g), posibles explosiones producidas por la sobrepresión que se alcanza, y la falta de reproducibilidad en la mineralización como resultado del movimiento aleatorio de la radiación microondas en el interior del sistema, hace que con frecuencia los resulta-

dos no sean correctos para el análisis del As (y de otros metales) cuya liberación de la matriz donde se encuentran anclados, necesita de tratamientos más drásticos que para otros elementos.

Con estos antecedentes, se resaltan en esta memoria alguna de las mineralizaciones más relevantes empleadas por los diferentes autores.

Considerando todos estos puntos HERSEY J.W., 1988, determina conjuntamente As y Se en muestras medioambientales y alimentos mediante HG-AAS. Para ello, y cuando la muestra está muy contaminada, la hace pasar por una microcolumna de intercambio catiónico (AG-50W-X16). A continuación, mineraliza la muestra con una mezcla de ácidos HNO₃:HClO₄:H₂SO₄. Una vez mineralizada, añade KI al 10% (p/v) para reducir As(V) → As(III), y genera la arsina utilizando como medio de generación HCl 6,6M ya que en este medio disminuyen las interferencias.

En este mismo sentido, MAHER W.A., 1989, determina As total en tejidos biológicos. A diferencia del anterior autor, éste añade a la muestra seca, HNO₃ cc. manteniéndolo a temperatura ambiente durante 12 horas. A continuación se calienta a reflujo con una mezcla de ácidos HNO₃:HClO₄:H₂SO₄ durante 3 ó 4 horas.

Dentro de la mineralización por vía seca, destaca el trabajo de HOLER B., 1989, que utiliza una mezcla de Mg(NO₃)₂·6H₂O - Ni(NO₃)₂·6H₂O - HNO₃. Se aumenta la temperatura paulatinamente hasta 260°C durante 2 horas, y finalmente se introduce en una mufla a 450°C donde se mantiene durante 1 hora. El residuo se deja enfriar y se humedece con agua y 10 ml de HCl. Cuando se calma la reacción, se añade 1 ml de CuSO₄·5H₂O al 6% y 1 ml de Na₂TeO₃. La mezcla se calienta en baño de agua durante 30 min. Se enfría y se recoge el precipitado en un filtro de membrana de celulosa de 8 µm, y una vez seco se analiza por espectrometría de fluorescencia de rayos X. Los calibrados que se obtienen son lineales hasta concentraciones superiores a 25 µg g⁻¹ de arsénico, y el L.D. 0,1 µg

g^{-1} . Los resultados obtenidos para distintas muestras, concuerdan con los obtenidos por la técnica de análisis por activación neutrónica (NAA).

BRUMBAUGH W.G., 1989, propone una mineralización algo diferente aunque también utiliza $Mg(NO_3)_2$ para analizar muestras de pescado. Para ello, parte de 0,5 g de muestra seca y homogeneizada y le añade 2 ó 3 ml de metanol y unas gotas de antiespumante, 10 ml $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ y 10 ml de HNO_3 . Se calienta esta mezcla a reflujo a una temperatura de 70-80°C durante toda la noche. Se aumenta la temperatura a 200°C y se evapora la mezcla a sequedad y el residuo se sitúa en una mufla fría. Se aumenta la temperatura a 500° y se mantiene durante 3 ó 4 horas. A continuación se enfría la muestra y se le añade 20 ml de HCl al 50% (v/v) y se deja hervir en una placa caliente. Se deja enfriar y se enrasa con HCl al 50%. El hidruro se genera con $NaBH_4$ al 1% (p/v) estabilizado con NaOH al 0,5% (p/v). El L.D. obtenido es de 0,06 $\mu g g^{-1}$ y el coeficiente de variación en torno al 4%.

CERVERA M.L., 1989, utiliza la mineralización de reducción a cenizas con $Mg(NO_3)_2$, pero disuelve el residuo con HNO_3 al 10%, calentando hasta sequedad. El nuevo residuo se disuelve con 3 ml de H_2O y 10 ml de HCl 6M. Se filtra la disolución y se lleva a 25 ml con HCl 6M. Añade KI 2% (p/v) y después de 5 min. se determina el As por HG-AAS. Las recuperaciones obtenidas son del $97 \pm 9\%$ y los L.D. de 0,1 $ng g^{-1}$.

Los hornos microondas también se han utilizado para llevar a cabo la mineralización de muestras en las que se quiere determinar el contenido total de arsénico. En esta línea HUANG J., 1988, añade 3,5 ml de HNO_3 conc. a 0,1-0,5 g de muestra, e introduce el reactor en un microondas a una potencia de 720 w. durante 2,5 min. La despresurización se realiza introduciendo el reactor en agua helada durante 30 min. Se añade 3,5 ml de HNO_3 conc, 1,5 ml $HClO_4$ al 70% y 1 ml de H_2SO_4 , cerrando de nuevo el reactor e introduciéndolo en el microondas durante 2,5 min. Este calentamiento se repite 3 veces

con intervalos de 2 min. entre calentamientos. Se enfría en un baño con agua helada durante 30 min. Se filtra la disolución y el filtrado se diluye a 50 ml con HCl al 1,5%.

EPSTEIN M.S., 1989, utiliza un sistema automatizado de introducción de una suspensión ("slurry"), en el que incluye una sonda ultrasónica plegable para mezclar las suspensiones. Este dispositivo ha sido utilizado para la determinación de As, Fe, Mn y Pb empleando GFAAS como sistema detector. Mediante el empleo de este sistema, se ha observado que el coeficiente de variación aumenta en proporción al porcentaje de analito extraído en la fase acuosa de la suspensión, y es altamente dependiente de la homogeneidad de la muestra. Esta mineralización se ha aplicado a muestras de sedimentos de río.

Existen trabajos más recientes en los que se comparan distintas mineralizaciones como por ejemplo las realizadas por LÁSZTITY A., 1995, que para la determinación de arsénico en dietas infantiles y en desechos domésticos, utiliza distintas mineralizaciones: microondas, reducción a cenizas con $Mg(NO_3)_2$... La técnica empleada para la determinación es ICP-MS, obteniendo recuperaciones entre el 94,8 y el 109% y los L.D. en torno a $2,0 \text{ ng ml}^{-1}$ dependiendo de la mineralización empleada y de la muestra analizada.

Otro trabajo interesante es el realizado por MENÉNDEZ GARCÍA A., 1989, que utiliza HG-ICP-AES para la determinación de contenidos de arsénico en muestras biológicas de referencia. Inicialmente extrae el As, como AsI_3 , de la muestra disuelta en xileno en presencia de KI y HCl. El extracto se mezcla con $NaBH_4$ en DMF y ácido acético. El R.L. $0,01$ a $\geq 100 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, con coeficientes de variación del 2% y L.D. de $0,7 \text{ ng ml}^{-1}$.

WICKSTRØM T., 1995, utiliza también como técnica de determinación HG-ICP-AES, pero emplea una disolución alcalina de la muestra con un agente enmascarante dietilén-triamin-penta-acético (DTPA) para determinar As y Te en materiales de referencia. Mineraliza la muestra, aleaciones níquel, con una mezcla de ácidos HNO_3 -HCl. A continuación añade 10 ml de disolución de tartrato sódico 0,6M y 50 ml de DTPA 0,3M. Al-

caliniza la disolución con NaOH hasta pH=12-13 y añade NaBH₄. El hidruro se genera por acidificación de la disolución con HCl 4M, empleando el método de adiciones estándar. La disolución alcalina en combinación con el DTPA se utiliza para minimizar las interferencias debidas al Ni y Co. Este mismo autor determina As en muestras de cobres, eliminando la interferencia del cobre por precipitación del hidróxido y posterior filtración.

El empleo de un agente reductor del arsénico para la formación del hidruro correspondiente a partir de su estado de oxidación (III), ha sido objeto de grandes controversias ya que en condiciones normales, se constata la diferencia de la eficiencia de la generación del hidruro correspondiente dependiendo del grado de oxidación de partida. Un estudio exhaustivo de las condiciones de generación en función del grado de oxidación del elemento, se realiza en esta memoria y por tanto, el posible uso de estos prerreductores se contemplan en este apartado. Sin embargo, con frecuencia los diferentes autores contemplan esta prerreducción como un paso más en el mecanismo de la mineralización.

Varios autores emplean L-cisteína como prerreductor y para eliminar interferencias. Entre estos trabajos se encuentran los realizados por WELZ B., 1993, que realiza dos estudios teóricos en los que optimiza parámetros, estudio de interferencias y digestión ácida en microondas, en línea, con HG-AAS.

En esta misma línea, LE X-C, 1992, propone un nuevo sistema en continuo, para la determinación de As, Sb y Sn mediante HG-AAS. La presencia de L-cisteína en la disolución de la muestra hace que disminuyan las interferencias y mejora las señales de As, Sb y Sn un 60, 200 y 40% respectivamente.

Quisiera mencionar dos revisiones por los datos de interés que aportan para la determinación de arsénico. El primero de ellos es el realizado por TYSON J.F., 1990 que trata y comenta detectores para análisis por inyección en flujo. El segundo es el realizado

por CAROLI S., 1994, que recoge datos sobre distribución y valores de referencia de distintos elementos, entre ellos el As, en tejidos y fluidos humanos.

Por último se recogen una serie de trabajos en los que se determinan contenidos totales de arsénico agrupándolos en forma de tabla (Tabla II.1) en la que se especifica la técnica empleada, tratamiento y tipo de muestra, algún dato de interés y la referencia correspondiente.

Tabla II.1.- Recopilación de métodos para la determinación de contenidos totales de arsénico en muestras medioambientales y biológicas.

TÉCNICA	TRATAMIENTO	MUESTRA	DATOS DE INTERÉS	REFERENCIA
HG-AAS	HNO ₃ :HClO ₄ :H ₂ SO ₄ y reducción posterior con KI 10% (p/v)	Medioambientales y alimentos	Para muestras altamente contaminadas utiliza microcolumnas de intercambio catiónico AG-50W-X16	HERSEY J.W., 1988
HG-AAS	HNO ₃ durante 12 horas HNO ₃ :HClO ₄ :H ₂ SO ₄ a reflujo 3 ó 4 horas hasta eliminación de SO ₃	Tejidos biológicos		MAHER W.A., 1989
HG-AAS	HNO ₃ Microondas HNO ₃ :HClO ₄ :H ₂ SO ₄ baño de hielo	Tierra vegetal	R.L. > 25 µg g ⁻¹ L.D. 0,1 µg g ⁻¹	HUANG J., 1988
HG-AAS	MeOH, Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O, HNO ₃ a reflujo	Pescado	Adición de un antiespumante. L.D. 0,06 µg g ⁻¹ Coef. Variación 4 %	BRUMBAUGH W.G., 1989
HG-AAS	Reducción a cenizas con Mg(NO ₃) ₂ :MgO:HNO ₃	Tomates	Evaporación a sequedad antes de reducción a cenizas	CERVERA M.L., 1989

Tabla II.1.- (Continuación I).

TÉCNICA	TRATAMIENTO	MUESTRA	DATOS DE INTERÉS	REFERENCIA
HG-AAS	Reducción a cenizas con Mg(NO ₃) ₂	Cerveza	Reducción previa con KI 2% (p/v) antes de generar el hidruro. R.L. 60 ng; L.D. 0,1 ng g ⁻¹ Recuperación 97 ± 9%	CERVERA M.L., 1989
HG-AAS	Generación electroquímica del hidruro	Hojas de mangle	L.D. 0,45 µg l ⁻¹	LIN Y., 1992
HG-AAS	HNO ₃ :HClO ₄ :H ₂ SO ₄	Pescados		BALLIN U., 1994
FI-HG-AAS	La muestra pasa a través de una cámara de dilución	Orina	Utiliza adiciones estándar para determinar concentraciones bajas.	MÜLLER A.J.L., 1992
HG-AAS	L-cisteína para disminuir interferencias	muestras sintéticas	Nuevo diseño de generador en continuo	LE X-C, 1992
FI-HG-AAS	L-cisteína	Estudio teórico. Parte II: aplicación a cobres.	Parte I: Optimización de parámetros. Parte II: Estudio de interferencias.	WELZ B., 1993

Tabla II.1.- (Continuación 2).

TÉCNICA	TRATAMIENTO	MUESTRA	DATOS DE INTERÉS	REFERENCIA
HG-AAS	Mineralización ácida en línea en microondas con HNO ₃	Estudio teórico	Utiliza L-cisteína para la reducción previa a la generación del hidruro.	WELZ B., 1993
GFAAS	Forma suspensiones ("slurries")	Sedimentos de río	Altos coeficientes de variación en función del % de analito extraído.	EPSTEIN M.S., 1989
GFAAS	Modificador de matriz: mezcla de nitratos de Pd y Mg.	Aguas minerales	Utiliza corrector Zeeman L.D. 2,0 µg l ⁻¹	BOZSAI G., 1990
GFAAS	HNO ₃ conc. en microondas	Materiales de referencia (origen marino)	Optimización de las variables experimentales mediante un método simplex.	PERGANTIS S.A., 1994
HG-AAS ó ICP-AES	Generación electrolítica del hidruro	Disoluciones acuosas	L.D. 0,7 µg ml ⁻¹	HUEBER D.M., 1995
HG-GSGD-AES	Estudio de gases de descarga. Gases estudiados: He, Ne y Ar.	Estudio teórico	L.D. (He) 54 ng ml ⁻¹ ; (Ne) 30 ng ml ⁻¹ ; (Ar) 20 ng ml ⁻¹	BROEKAERT J.A.C., 1993

Tabla II.1.- (Continuación 3).

TÉCNICA	TRATAMIENTO	MUESTRA	DATOS DE INTERÉS	REFERENCIA
HG-ICP-AES	Extracción en xileno en presencia de KI y HCl	Materiales biológicos de referencia.	R.L. 0,01 a $> 100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Coef. de variación 2,0 % L.D. $0,7 \text{ ng ml}^{-1}$	MENENDEZ GARCÍA A., 1989
HG-ICP-AES	Disolución alcalina con DTPA. Se acidifica con HCl y se genera el hidruro. (Ac. dietilen-triamino-penta-acético)	Materiales de referencia y aleaciones.	Elimina interferencia de Cu por pptación del hidróxido y posterior filtración.	WICKSTRØM T., 1995
ICP-AES	Medios vesiculares con DDBA (Bromuro de dodecil-dimetil-amonio)	Sedimentos y materiales de referencia.	L.D. $0,6 \mu\text{g g}^{-1}$	AIZPUN FERNÁNDEZ B., 1992
ICP-MS	Descomposición con microondas	Aire, partículas en suspensión	Determinación multielemental	WANG C.F., 1995

Tabla II.1.- (Continuación 4).

TÉCNICA	TRATAMIENTO	MUESTRA	DATOS DE INTERÉS	REFERENCIA
ICP-MS	Estudio comparativo de mineralización en microondas y reducción a cenizas.	Alimentos infantiles	Recuperaciones en materiales de referencia 94,8-109%	LASZTITY A., 1995
d.c. plasma-AES (corriente directa)	HNO ₃ , L-cisteína Se ajusta a pH = 2,1 con NaOH	Agua	Reducción previa	CHEN H., 1992
CCMP	Estudio teórico	Disoluciones	L.D. 110 pg	HUEBER D.M., 1993
HG-CT-d.a. MAS	No precisa	Disoluciones sintéticas	Determinación simultánea: As, Sb y Se L.D. (As) 22 µg l ⁻¹ ; (Sb) 15µg l ⁻¹ ; (Se) 65 µg l ⁻¹	CABREDO PINILLOS S., 1995
Determinación Colorimétrica	Digestión por vía seca y por vía húmeda	Alimentos	Ejercicio de Intercomparación	SKURIKHIN I.M., 1989

Tabla II.1.- (Continuación 5).

TÉCNICA	TRATAMIENTO	MUESTRA	DATOS DE INTERÉS	REFERENCIA
Espectrofotométrico	HNO ₃ -NH ₄ MoO ₄ Extracción con butanol	Agua	Determinación indirecta $\lambda=590$ nm. R.L. 0,01-1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	KUNZE S., 1989
XRFS	Mg(NO ₃) ₂ 6H ₂ O-Ni(NO ₃) ₂ 6H ₂ O HNO ₃ ; HCl. CuSO ₄ 5H ₂ O; Na ₂ FeO ₃	Vegetales	R.L. >25 $\mu\text{g g}^{-1}$ L.D. 0,1 $\mu\text{g g}^{-1}$	HORLER B.A.T., 1989
ETV-ICP-MS	HNO ₃ (reflujo 4 horas) HF: HClO ₄ ; HCl	Materiales de referencia (marinos)	L.D. 3 pg	STURGEON R.E., 1994

CAPÍTULO III

IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE LAS DIFERENTES ESPECIES DE ARSÉNICO Y LÍNEAS GENERALES DE LAS TÉCNICAS DE ESPECIACIÓN

III.1.- Especies químicas del arsénico en medios ambientales y biológicos.

III.2.- Revisión bibliográfica sobre especiación de arsénico.

III.2.1.- Acoplamiento de técnicas de separación-detección.

III.2.2.- Técnicas basadas en el diferente comportamiento químico de las distintas especies frente a disolventes, intercambiadores o reactivos.

El término especiación ha tenido muchas definiciones. Constant M.G. van der Berg en un pequeño artículo (*Analytica Chimica Acta*, 284,461-462, 1994) recoge dos significados distintos: por una parte, para indicar el análisis o cuantificación de especies químicas y por otra, para indicar la distribución de un elemento entre diferentes formas fisicoquímicas o especies. Este autor propone que se defina el término especiación como la presencia de diferentes especies, pues considera que es una definición lo suficientemente amplia y simple que incluso engloba especies todavía hoy desconocidas.

La especiación química estudia por tanto, la variabilidad de elementos en sistemas naturales biológicos, geológicos y bioquímicos, de tal forma que los datos de la especiación se pueden utilizar, por ejemplo, para predecir el comportamiento de los metales en aguas naturales así como para el estudio de los procesos biogeoquímicos. No obstante, la especiación está condicionada por las dificultades analíticas, debido a la baja concentración en la que se encuentran muchos elementos así como a la inestabilidad de algunas de las especies durante el almacenaje y tratamiento de las muestras. Por otra parte, la especiación a menudo se ve alterada por la aplicación de los procedimientos analíticos utilizados para la detección.

III.1.- ESPECIES QUÍMICAS DEL ARSÉNICO EN MEDIOS AMBIENTALES Y BIOLÓGICOS.

El arsénico se considera un elemento contaminante prioritario y generalmente se determina en muestras medioambientales como arsénico total. La concentración de arsénico en los diferentes apartados medioambientales están directamente influenciados por la actividad humana (origen antropogénico) si bien puede tener un origen natural (origen geológico). El arsénico pues, es uno de los elementos más distribuido en la biosfera aunque su distribución no es homogénea ya que podemos encontrarlo en un amplio intervalo

que va desde unos pocos ppb ($\mu\text{g kg}^{-1}$) en muestras puras como aguas de mar abierto, hasta unos cientos de ppm (mg kg^{-1}) en suelos contaminados y organismos marinos.

El arsénico se mueve dentro del ecosistema y puede circular varias veces a través de la atmósfera, el agua y el suelo bajo distintas formas (CULLEN W.R., 1989).

Recientes estudios sobre química medioambiental del arsénico han mostrado que se producen conversiones entre estados de oxidación, así como la formación de especies organometálicas en el metabolismo procedente de los organismos vivos. Tal vez los descubrimientos más significativos son la reducción y biometilación de arsénico inorgánico por hongos, bacterias o algas y mamíferos, incluido el hombre, cuyo resultado es la presencia de compuestos mono, di y trimetilados en el medioambiente. Así, los compuestos más caracterizados en las muestras medioambientales son: arsenito, arsenato, ácido metilarsónico (MMA), ácido dimetilarsínico (DMA), arsenobetaina (AB), arsenocolina (AC) y tres arsenozúcares que han sido aislados en algas. En la Figura III.1 se muestran algunas de las fórmulas desarrolladas de estas especies.

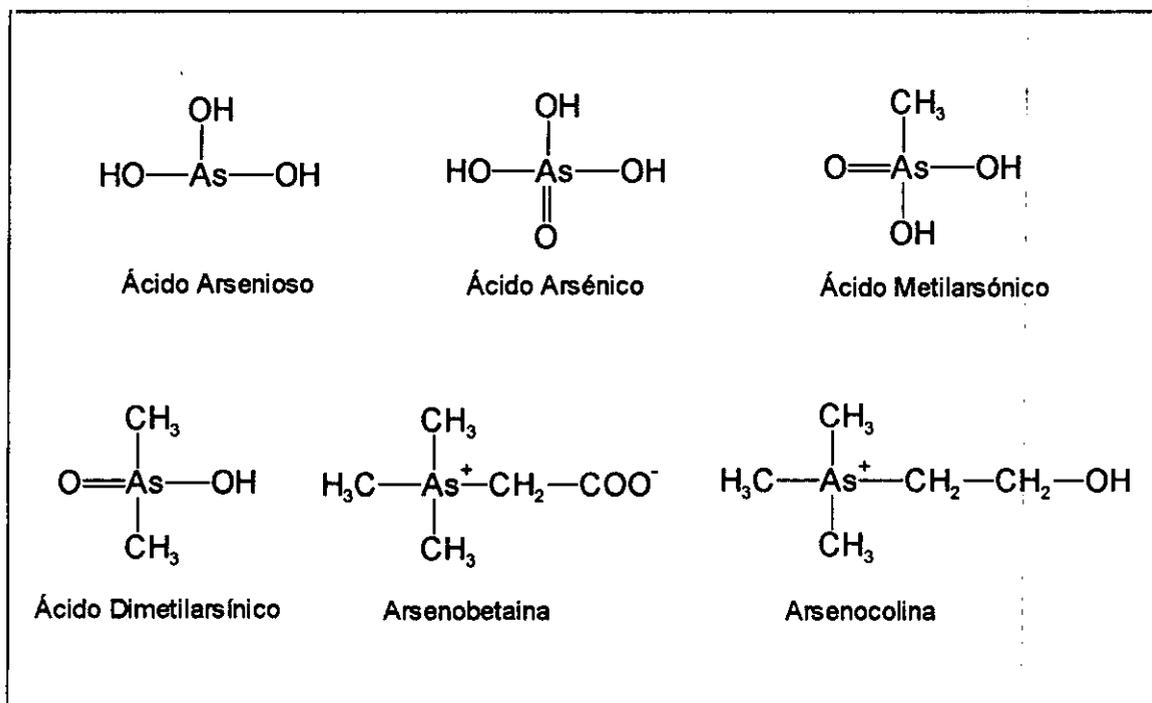


Figura III.1.- Estructura de los compuestos de arsénico identificados en muestras medioambientales.

La toxicidad de las especies de arsénico no es la misma, de hecho, el arsénico inorgánico es más tóxico que el arsénico orgánico y dentro de esta pequeña clasificación se pueden ordenar en cuanto a su toxicidad: $\text{As(III)} > \text{As(V)} > \text{MMA} > \text{DMA} > \text{AC} > \text{AB}$.

En organismos marinos, se ha puesto de manifiesto la conversión de arsénico inorgánico en compuestos que se consideran no tóxicos, como son los arsenoazúcares, la arsenobetaina y la arsenocolina (HARRISON R.M., 1994). Este tipo de alimentos constituyen la mayor fuente de arsénico en la dieta. Dicho arsénico se encuentra en formas esencialmente no tóxicas además de que se excreta inalterado en la orina.

Formación de los compuestos orgánicos de arsénico.

Un componente importante del medio ambiente es el agua por lo que vamos a describir brevemente la química del arsénico en este medio

Las valencias más usuales del arsénico en aguas puras son (+3), arsenito, y (+5), arseniato, que se presentan como especies inorgánicas hidrolizadas: H_3AsO_3 , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} , AsO_3^{3-} y H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} y AsO_4^{3-} . Si nos fijamos en los valores de las constantes de disociación H_3AsO_4 ($\text{p}K_a$ 2,19/ 6,94/ 11,5) y H_3AsO_3 ($\text{p}K_a$ 9,20 (otros desconocidos)), las especies predominantes, en los intervalos normales de pH en aguas naturales son: H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} , H_3AsO_3 y en menor grado H_2AsO_3^- .

En el arsénico geogénico sólo están presentes el As(III) y el As(V), ahora bien, debido a la contaminación antropogénica, el agua puede contener todas las especies de este elemento.

Considerando el par redox As(V)/As(III)



Si se aplica la ecuación de Nerst cuando el pH = 7 y ambas formas estén en la misma concentración, el valor obtenido para el potencial es 0,147 v. Para que se produzca el 99% de la oxidación sólo se necesitan 0,206 v., lo que indica la facilidad de oxidación del As(III) siempre que haya oxígeno disuelto. Según esto, se puede generalizar que el arsénico se encuentra en forma reducida en aguas exentas de oxígeno (anaeróbicas) pero no así en aguas con oxígeno disuelto (aeróbicas). Sin embargo este hecho solo es una regla general ya que en algunas aguas de sondeo, que en principio se considerarían anaeróbicas, aparecen ambas formas simultáneamente.

Se sabe que algunos microorganismos pueden reducir el As(V) a As(III), otros son capaces de oxidar el As(III) a As(V) y éste puede transformarse en sus formas orgánicas por metilación biológica. Como ejemplo, en la Figura III.2 se muestra esquemáticamente el ciclo biológico del arsénico.

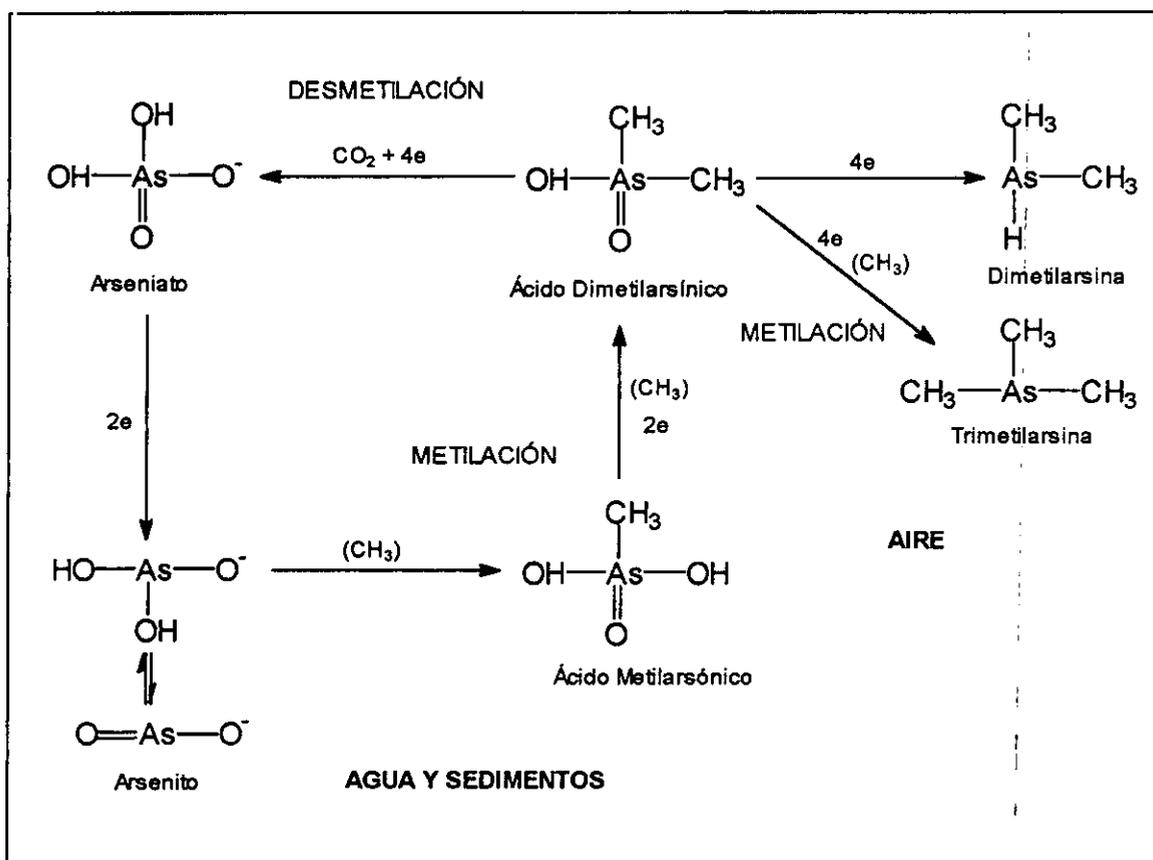


Figura III.2.- Ciclo biológico del arsénico.

La metilación puede producirse en aguas dulces y marinas, obteniéndose compuestos mono o polimetilados. La biometilación del arsénico puede ser producida por numerosos organismos por lo que la naturaleza de los compuestos obtenidos y sus proporciones son muy variadas.

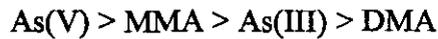
En los organismos terrestres la biometilación del arsénico puede ir acompañada de su eliminación por volatilización por formación de la arsina correspondiente, o bien por excreción en forma de ácido monometilarsónico o ácido dimetilarsínico. Sin embargo, los organismos marinos eliminan el arsénico mediante formas solubles como azúcares o lípidos.

La arsenocolina se convierte fácilmente en arsenobetaina, la cual por oxidación se transforma en dimetilarsínico o trimetilarsénico. Estas especies orgánicas por la acción de bacterias, luz o calor en medio oxidante, se desmetilan sucesivamente hasta liberar arsénico inorgánico.

Por otra parte, no se pueden olvidar las transformaciones biológicas en los sistemas acuáticos y que en éstos, existe una interrelación entre el agua y los sedimentos. En esta línea, Faust y colaboradores analizaron el arsénico en agua y sedimentos del río Maurice (New Jersey) contaminado por una industria química. Según estos estudios, los contenidos de arsénico en muestras de agua variaban entre 515 y 2,2 mg kg⁻¹, según fueran muestras tomadas en el foco de contaminación o muestras de agua obtenidas río abajo. También observaron que el agua contenía grandes cantidades de As(V) con trazas de MMA, DMA y As(III), indicativos de ambientes aeróbicos.

En cuanto a la determinación de arsénico en los sedimentos del mismo río, la incubación en el laboratorio de dichos sedimentos, revelaron que el 85% del arsénico liberado durante la lixiviación, era inorgánico predominando el As(V) mientras que el otro 15% eran MMA y el DMA. La presencia de estos compuestos orgánicos de arsénico, pone en evidencia que la metilación ocurre en los sedimentos porque la termodinámica del agua no es favorable a dicha metilación. Esta biotransformación, si ocurre, puede afectar de forma significativa a la distribución y movilización del arsénico.

La distribución y movilización de las especies de arsénico en sedimentos, e indirectamente en el agua en contacto con estos sedimentos, está controlada por las transformaciones microbiológicas de las especies y por fenómenos de adsorción. La adsorción de las especies de arsénico en los sedimentos varía:



El arseniato es fuertemente adsorbido por el sedimento, presumiblemente con óxidos e hidróxidos de hierro y manganeso. Ahora bien, la transformación de arseniato a DMA puede acelerar la movilización del As en sistemas acuáticos, o dicho de otro modo, el arsénico puede ser “redisuelto” de los sedimentos por acción de bacterias.

Es interesante reseñar que la adsorción está influenciada por el pH, pE, textura y contenido de arcilla y arena de los sedimentos. Por otra parte, cuando las especies están adsorbidas, su movilización depende fundamentalmente del tiempo y del volumen de agua que pasa a través de los sedimentos.

Por tanto, el conocimiento de la cinética, mecanismos y equilibrios asociados con las interacciones agua-partícula es esencial para el desarrollo de modelos biogeoquímicos que permitan predecir, de forma segura, el destino de los elementos traza, particularmente de las formas tóxicas de origen antropogénico (MILLWARD G.E., 1995).

III.2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO.

Para conocer los efectos biológicos del arsénico así como sus mecanismos de interacción con el medio ambiente, es preciso cuantificar sus diferentes formas químicas mediante las denominadas técnicas de especiación.

Las dos vías generales dentro de las técnicas de especiación son: la especiación basada en el acoplamiento de técnicas instrumentales de separación-detección y la especiación basada en el diferente comportamiento químico de las especies. En esta memoria se da una visión general del acoplamiento de técnicas para la especiación del arsénico señalando los acoplamientos que más exhaustivamente se han empleado en los últimos 10 años, y se incide más profundamente, en la especiación basada en la determinación diferenciada de las especies del arsénico en función de su diferente comportamiento químico, ya que es la línea de especiación del trabajo experimental desarrollado.

III.2.1.- Acoplamiento de técnicas de separación-detección.

Esta forma de especiación se basa en la combinación de técnicas de alta resolución con sistemas de detección de elevada selectividad y sensibilidad (técnicas acopladas).

La especiación analítica engloba varias etapas: preconcentración, separación y detección. A continuación se detallan las técnicas de preconcentración/separación más utilizadas para la especiación de arsénico:

*** Generación de hidruros y atrapamiento criogénico (HG-CT).**

Este acoplamiento ha sido ampliamente utilizado debido a su alta sensibilidad y simplicidad. La derivatización de la muestra se lleva a cabo "en-línea" por generación de hidruros de las especies presentes: As(III), As(V), MMA y DMA, la preconcentración, mediante atrapamiento criogénico y la separación, mediante desorción térmica (BRAMAN R.S., 1977; HOWARD A.G., 1981; ODONAKA Y., 1983; VAN ELTEREN J.T., 1994). Este acoplamiento es sencillo pero debe ser capaz de soportar las altas presiones que se producen en la generación de hidruros. Los detectores que se pueden acoplar a la salida de una trampa fría son muy diversos, pero la absorción atómica con célula de cuarzo o cámara de grafito, son las más utilizadas.

En la trampa fría (CT) se recogen las diferentes arsinas, liberándolas posteriormente aprovechando su distinta volatilidad. Entre los trabajos encontrados en la bibliografía a este respecto, algunos se detallan brevemente a continuación.

En el trabajo de COMBER S.D.W., 1989, se combina la generación de hidruros en distintos medios (HCl y acético/acetato pH=5), trampa fría, espectrofotometría de absorción atómica. Cuando utiliza HCl como medio de generación, recoge las distintas arsinas formadas en una trampa fría constituido por un tubo en forma de U relleno con bolas tratadas con ácido fluorhídrico, sumergido en nitrógeno líquido. Las arsinas se eluyen posteriormente conforme a su volatilidad, arsina, monometilarsina y dimetilarsina, que son conducidas hacia una célula de cuarzo calentada eléctricamente. El As(III), lo determina utilizando como medio de generación una disolución amortiguadora de acético/acetato de pH=5 ya que en este medio únicamente se forma la arsina a partir de este estado de oxidación. MICHEL P., 1992, también combina HG-CT-AAS, pero a diferencia del anterior, la trampa fría está constituida por chromosorb WAV-DMCS (3% OV-101). A continuación liberan las arsinas sucesivamente a una célula de cuarzo para determinarlas por AAS. En este caso, los medios ácidos utilizados son H₂SO₄ 9M (0,2 ml)

para determinar As(III)+As(V), MMA y DMA, y acético/acetato a pH=5 para determinar As(III).

*** Cromatografía de gases (GC):**

La cromatografía de gases es una técnica de separación mediante la cual se consiguen límites de detección muy bajos y presenta la ventaja adicional de que sólo se necesitan volúmenes del orden de μl . La principal dificultad de la aplicación de la cromatografía de gases, para la determinación de especies organometálicas no volátiles, radica en la necesidad de realizar procesos de extracción-derivativación-preconcentración que suelen ser largos y tediosos, además de aumentar la posibilidad de errores por pérdida de analito. El detector más empleado en este acoplamiento es QFAAS (VIJAN, P.N., 1976; HOWARD, A.G., 1981).

En esta línea, KAIPING D., 1992, realiza una separación las especies inorgánicas de arsénico mediante adsorción selectiva del As(III) en algodón sulfidrilo y posterior lixiviación con HCl en caliente. A continuación se le hace reaccionar con BAL, extrayéndose el complejo As-BAL en tolueno para su determinación por CG. El As(V) no adsorbido se reduce con una disolución de KI-tiourea y se determina por el mismo procedimiento. Este método se ha aplicado a la determinación de arsénico en hojas de melocotón y agua de lago, obteniendo LD 0,01 ng de arsénico.

*** Cromatografía de líquidos (LC) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC):**

Es una de las técnicas más desarrolladas para la determinación de las diferentes especies químicas inorgánicas y orgánicas de metales. La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) es la más empleada. Esta técnica de separación presenta la gran ventaja res-

pecto a la cromatografía de gases, de que permite la separación de especies sin necesidad de derivatización. El HPLC presenta una gran variedad de cromatografías entre las que destacan para la determinación de especies inorgánicas y organometálicas de arsénico las de intercambio iónico y en fase reversa.

Las técnicas de detección más habituales que se pueden acoplar con el HPLC para la determinación de arsénico son: GFAAS, QFAAS, ICP/AES e ICP/MS.

El acoplamiento HPLC/AAS ha sido ampliamente utilizado ya que permite la separación e identificación de compuestos de arsénico desconocidos a partir de sus cromatogramas. Las combinaciones más utilizadas son: las que utilizan atomización en célula de cuarzo calentada con llama, HPLC/QFAAS, (RICCI G.R., 1985; CHANA B.S, 1985; KADOKAMI K., 1988) o las que emplean, atomización en cámara de grafito, HPLC/GFAAS, mediante la cual se consigue aumentar la sensibilidad respecto a la llama en más de dos órdenes de magnitud (AGGET J., 1983; PACEY, G.E., 1986). Si bien existen técnicas de acoplamiento en continuo, la forma más usual de trabajo es en discontinuo recogiendo las fracciones que posteriormente se han de introducir en la cámara de grafito. El mayor problema que presenta la cámara de grafito es la pérdida de analito por volatilización durante la etapa de calcinación o por el contrario que se produzca una combinación química con carbón produciendo compuestos que impiden una atomización completa.

Existen varios trabajos de especiación de arsénico en los que se utiliza el acoplamiento HPLC/ICP-AES (RAURET G., 1991; EBDON L., 1991) ya que el flujo de trabajo con el que opera el HPLC (~1 ml/min) es perfectamente compatible con el flujo del sistema ICP-AES. Aunque este acoplamiento ha demostrado ser muy adecuado, no tiene la elevada sensibilidad que requiere, por ejemplo, la especiación de arsénico en orina humana, donde la concentración total de las especies a menudo está comprendida entre 10-20 ng ml⁻¹.

Últimamente se está utilizando el acoplamiento HPLC/ICP-MS (BEAUCHEMIN D., 1989; SHIBATA Y., 1989; THOMAS P., 1995) con el que se consigue una sensibilidad extremadamente alta. Sin embargo, la aceptación del ICP-MS como detector de un sistema HPLC, requiere una reducción substancial del elevado coste instrumental para su aplicación en análisis de rutina.

Mediante la incorporación de la Generación de Hidruros (HG) como método de derivatización post-columna de un sistema HPLC, se puede mejorar substancialmente la sensibilidad en la especiación de arsénico, cuando el sistema de detección es AAS con llama (TYE C.T., 1985; HAKALA E., 1992), con calentamiento electrotérmico (RICCI G.R., 1981) o ICP-AES (RAURET G., 1991). La mayor limitación del uso de Generación de Hidruros como parte integrante del sistema de detección para la especiación de arsénico, radica en la presencia de compuestos orgánicos de arsénico tales como la arsenobetaina, la arsenocolina y los arsenozúcares, importantes en muestras medioambientales y biológicas, que no forman hidruros volátiles por lo que no pueden detectarse. Para resolver este problema se ha recurrido a la descomposición "en-línea" por digestión en microondas como paso previo a la formación del hidruro (LÓPEZ-GONZALVEZ M.A., 1994).

Trabajos en esta misma línea son los realizados por JIMENEZ DE BLAS O., 1994, que determina arsénico y sus metabolitos en orina mediante HG-AAS y otros acoplamientos. Para la determinación de arsénico total utiliza FIA-HG-AAS con mineralización previa de la muestra con una mezcla HNO_3 , H_2SO_4 y H_2O_2 . La determinación de As(III), As(V), MMA y DMA se realiza mediante cromatografía líquida con una resina catiónica AG 50W-X8 y elución selectiva de las especies, que se analizan por FIA-HG-AAS en las condiciones óptimas. También en muestras de orina, HAKALA E., 1992, determina selectivamente las especies de arsénico importantes desde el punto de vista toxicológico mediante el acoplamiento HPLC-HG-AAS. Para ello utiliza dos columnas, colocadas en serie, Chromospher C_{18} (5 μm) empleando como fase móvil tetrabutilamonio a $\text{pH}=6,0$

con una disolución amortiguadora de fosfato. Se genera el hidruro de los distintos eluidos, con NaBH_4 . Se determina As(III) , As(V) , MMA y DMA a la longitud de onda de 193,7 nm, siendo los LD respectivos 1,0; 1,6; 1,0 y 4,7 $\mu\text{g l}^{-1}$.

HWANG C.J., 1994, determina As(III) , As(V) , MMA y DMA en muestras de agua, mediante CL-HG-ICP-MS. Una vez separados las distintas especies de arsénico por cromatografía, el eluido se trata con L-cisteína y HNO_3 0,25M (1 ml/min) y se introduce en un reactor a 95°C, donde se mezcla con NaBH_4 pasando a otro reactor que mediante un nebulizador neumático, se introduce en el ICP-MS. La muestra se analiza en 10 min y el métodos se ha validado con materiales de referencia.

THOMAS P., 1995, utiliza un acoplamiento HPLC-ICP-MS para la determinación de seis especies de arsénico con bajos límites de detección (1-3 $\mu\text{g l}^{-1}$), en muestras de agua de manantial y embotellada. También obtiene buenos balances de arsénico total en las muestras, mediante un sistema de generación de hidruros.

Un acoplamiento muy interesante es el realizado por LÓPEZ-GONZÁLEZ M.A., 1994, que utiliza HPLC-MW_{oxidación}-HG-AAS para la determinación en línea As(III) , As(V) , MMA, DMA, AB y AC. Para ello, utiliza una columna aniónica donde retiene el As(III) , As(V) , MMA y DMA (especies aniónicas) y deja pasar las especies catiónicas, AB y AC que se determinan después de su descomposición en microondas con $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$. Los límites de detección para todas las especies están comprendidos entre 0,3-0,9 ng.

Por otra parte, LE X-C., 1994, también mediante el acoplamiento HPLC-MW_{digestión}-HG-AAS determina As(III) , As(V) , MMA, DMA y AB coeluida con el As(III) . Si no realiza la digestión en microondas sólo determina cuatro especies ya que la AB no forma hidruros. Los resultados obtenidos los compara con los obtenidos por acoplamiento HPLC-ICP-MS. Los LD obtenidos son: 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ As(III) ; 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ As(V) ; 15 $\mu\text{g l}^{-1}$ MMA; 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ DMA y 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ AB.

BLAIS J.S., 1990. Propone un método para la determinación de arsenobetaina, arsenocolina y el ion positivo tetrametilarsonio por HPLC-HG-AAS con generación termoquímica de hidruros. El método consiste en producir la nebulización mediante un termoespray del eluido metanólico del HPLC, con pirólisis del analito con una llama metanol/oxígeno, y posterior formación del hidruro.

SCHLEGEL D., 1994, utiliza el acoplamiento IC-HG-ICP-AES. Emplea una columna PRP X-100 y como disolventes ácido benzoico y ácido parahidroxibenzoico en una mezcla metanol-agua. Los LD obtenidos: 0,017 ppm para el As(III); 0,64 ppm para el As(V) y 0,11 ppm para el DMA.

EBDON L., 1988. Realiza distintos acoplamientos combinando técnicas de separación como la GC o el HPLC con diferentes técnicas de detección como AAS, AFS o ICP-AES. Para la utilización de la cromatografía de gases es preciso derivatizar los compuestos de arsénico como hidruros, que se pueden preconcentrar mediante la utilización de una trampa fría (CT), o como metilglicolatos. Mediante la utilización de un HPLC, se pueden separar sin necesidad de derivatización, pero en este caso es preciso utilizar la generación de hidruros (HG) para aumentar la sensibilidad. Este autor por tanto, recomienda el acoplamiento HG-CT-GC-AAS cuando se desee detectar niveles comprendidos entre 0,22-0,55 ng absolutos. Sin embargo recomienda el acoplamiento HPLC-HG-AAS para análisis de rutina y el acoplamiento HPLC-HG-ICP-AES como procedimiento preferente para análisis multielementales.

WOLLER A., 1995, propone una nueva técnica que incluye un acoplamiento HPLC-AFS utilizando nebulización ultrasónica, para la determinación de As(III), As(V), MMA y DMA, obteniendo límites de detección de 35,50,20 y 20 ng respectivamente (para un volumen inyectado de 250 µl). El rango lineal es de 250 a 2500 ng para todas las especies de arsénico.

La *Cromatografía de fluidos supercríticos* ha sido utilizada para determinar arsénico y antimonio en muestras de aguas y en materiales biológicos. En este sentido, LAINTZ K.E., 1992, consigue la determinación de As(III y V) y Sb(III y V) utilizando bis(trifluoretil)ditiocarbamato y cromatografía de fluidos supercríticos. La determinación de As(V) y Sb(V) necesitan una reducción con KI- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ obteniendo LD(As) de 7 pg.

III.2.2.- Técnicas basadas en el diferente comportamiento químico de las distintas especies, frente a disolventes, intercambiadores o reactivos químicos.

Un apartado importante de la especiación es el de la posibilidad de diferenciar especies mediante procedimientos químicos, basados en los distintos comportamientos de las especies frente a un mismo reactivo. Este hecho que clásicamente se ha empleado como método de evitar las interferencias en las determinaciones analíticas, proporciona una herramienta extraordinariamente útil y sencilla para abordar el problema de la especiación.

*** Extracción líquido-líquido:**

Tiene aplicación en la determinación de trazas de arsénico y presenta algunas ventajas. Este procedimiento permite separar el analito de la matriz, es decir, de las posibles interferencias además de realizar una preconcentración simultáneamente. La extracción L-L implica varias etapas tales como formación de complejos, extracción, separación de fases, evaporación..., como pasos previos a su determinación, generalmente por GFAAS. No obstante, la posibilidad de separar especies de arsénico y preconcentrarlas, requiere la disponibilidad de un gran volumen de muestra, lo que no siempre es posible. En esta línea se comentan brevemente algunos de los trabajos encontrados en la bibliografía.

BALLIN U., 1994, realiza un estudio en muestras de pescado donde determina el contenido total de arsénico y en arsenobetaina. Para obtener el contenido total de arsénico, se mineraliza la muestra con $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ a 250°C y se determina por HG-AAS. Por otra parte, utiliza un método indirecto de cuantificación de arsenobetaina mediante la determinación de trimetilarsina. Para ello, realiza una extracción con una mezcla de cloroformo/metanol-agua. Una porción del extracto metanol-agua se hidroliza por calentamiento con NaOH pasando el gas a una columna 0,8% carbowax 20M realizando

la detección por ionización de llama o absorción atómica. El contenido obtenido para la arsenobetaina supone ~95% del As_{total} .

Por otra parte, HASEGAWA H., 1994, propone un método para la determinación de especies de arsénico trivalente ($As(III)$, $MMA(III)$, $DMA(III)$) y pentavalentes ($As(V)$, $MMA(V)$, $DMA(V)$) en aguas naturales, mediante extracción de las formas trivalentes con dietilamonio dietilditiocarbamato (DDDC) en tetracloruro de carbono. Los arsenicales se retroextraen de la fase orgánica con $NaOH$ 0,1M. Se añade $NaClO$ y HCl 5M calentando a $100^{\circ}C$ durante 20 minutos. Se deja enfriar y se añade HCl y EDTA (para eliminar posibles interferencias) procediéndose a la determinación mediante HG-CT-AAS. La determinación de $As(III + V)$ la realiza directamente por HG-CT-AAS, previa adición de HCl y EDTA ($As(III + V)$, $MMA(III + V)$, $DMA(III + V)$). Por último determina As_{total} mediante oxidación con $K_2S_2O_8$ en $NaOH$, calentando a $70^{\circ}C$ durante 2 horas. El $As(V)$ resultante lo determina por HG-AAS.

La especiación del arsénico inorgánico en muestras de suelos contaminados, puede realizarse mediante extracciones en distintos disolventes. Para ello, CHAPPELL J., 1995, inicialmente moviliza el arsénico del suelo con HCl . A partir de aquí, extrae selectivamente el $As(III)$ con cloroformo en forma de $AsCl_3$. Mediante una segunda extracción en agua, recupera el arsénico y lo determina mediante HG-AAS. Para la determinación del As_{total} , realiza una reducción con KI y aplica el mismo procedimiento. El $As(V)$, lo determina por diferencia, siendo además la especie predominante en estas muestras. El contenido de As_{total} obtenido por este procedimiento, lo confirma mediante fluorescencia de rayos X.

Diez años antes, AMANKWAH S.A., 1985, separa y determina $As(III)$ y $As(V)$ en agua de mar mediante extracción en cloroformo del complejo formado con APDC y posterior HG-AAS. Al igual que el método anterior, determina As_{total} , reduciendo previamente con KI , y el $As(V)$ por diferencia.

La separación de las distintas especies puede realizarse mediante un separador de intercambio iónico a presión atmosférica. Las especies se fijan en la columna y se eluyen selectivamente. Esta forma de trabajo, requiere eluciones múltiples con distintos reactivos, recolección y almacenamiento de las diferentes fracciones de eluido para su posterior determinación. La separación por intercambio iónico, al igual que la extracción líquido-líquido, son procedimientos largos y tediosos que presentan el gran inconveniente de aumentar los riesgos de contaminación debido a la manipulación de las muestras durante las distintas etapas que implican.

En esta misma línea ZONG-LI L., 1995, propone un método para la determinación secuencial de arsenito y arsenato mediante cromatografía iónica en aguas de desecho (industria de semiconductores). El As(III) lo determina electroquímicamente consiguiendo un LD $2,9 \mu\text{g l}^{-1}$ y recuperaciones del 97,5-104%. Por otra parte determina el As(V) espectrofotométricamente por formación de un complejo coloreado de asociación iónica formado por el ácido heteropolimolibdoarsénico con bismuto en presencia de Tritón X-100 (Mo-As-Bi), obteniendo recuperaciones del 93.5-103% y LD de $13 \mu\text{g l}^{-1}$.

*** Formación selectiva de las arsinas.**

Quizás la propiedad química más útil para la especiación de arsénico por vía química, es la capacidad que poseen las especies As(III), As(V), MMA y DMA para formar selectivamente los correspondientes hidruros mediante un control adecuado de las condiciones del medio, fundamentalmente del pH de generación. En esta línea, se han encontrado en la bibliografía distintos trabajos sobre la eficacia de la generación de las diferentes arsinas, en los que se llegan a resultados muy diferentes. No se conoce a ciencia cierta la razón de estas diferencias aunque se cree que se deben a la influencia de parámetros que no son reproducibles de unos laboratorios a otros, factores cinéticos o inclu-

so diseño del módulo de reacción (ANDERSON R.K., 1986). Sin embargo, reproduciendo dentro de un mismo laboratorio las condiciones de generación, los resultados son perfectamente reproducibles lo que permite pensar en esta vía como técnica extraordinariamente útil para abordar el problema de la diferenciación y determinación de distintas especies de arsénico.

La Generación de Hidruros utilizando NaBH_4 como reductor en conjunción con AAS o ICP-AES se ha empleado para determinar selectivamente As(III) , As(V) , MMA, y DMA. Braman y colaboradores llegan a la conclusión de que la reducción de los compuestos de arsénico con NaBH_4 dependen del pH y está relacionado con el pK_a de los ácidos de arsénico (BRAMAN R.S, 1977).

Como ya hemos mencionado, cuando se utiliza HG-AAS para la determinación de arsénico se necesita, además de NaBH_4 , un medio ácido. La naturaleza y concentración de este medio ácido es uno de los factores importantes que condicionan las eficiencias de la generación de las posibles arsinas. En la Tabla III.1 se muestra los estudios teóricos realizados, generalmente a concentraciones muy superiores a las existentes en muestras reales, con los sistemas reguladores y pH más representativos, utilizados como medios de generación de las correspondientes arsinas, junto con las especies determinadas, reductor empleado y la referencia bibliográfica correspondiente. El pH de trabajo puede establecerse mediante el uso de ácidos puros de diferentes concentraciones o bien, con disoluciones reguladoras formadas con las especies del mismo.

El ácido utilizado preferentemente es el **ácido clorhídrico** en distintas concentraciones. La controversia en cuanto a la concentración de este ácido es total, pues mientras unos autores generan el hidruro de arsénico inorgánico con la misma eficiencia a partir de los grados de oxidación (III) y (V) en HCl 2-4M, otros autores en HCl 6M, obtienen sistemáticamente una eficiencia de generación un 30% inferior a partir de As(V) , necesiándose la presencia de un reductor, generalmente KI ($\text{As(V)} \rightarrow \text{As(III)}$) o un oxidante tal

como el MnO_4^- ($\text{As(III)} \rightarrow \text{As(V)}$) para conseguir generar el hidruro a partir de un único grado de oxidación. El MMA y el DMA generan también el hidruro en medio HCl, pero la eficiencia observada varía para la misma concentración de ácido de un 40-100% dependiendo del autor.

Otros medios ácidos inorgánicos utilizados son: **ácido nítrico** con el que se obtienen análogos resultados a los obtenidos con HCl, pero no es muy aconsejable debido a que su carácter oxidante, puede alterar a las especies produciendo la interconversión de una en otras previamente a su determinación diferenciada; **ácido sulfúrico**, en el que las señales de todas las especies decaen bruscamente; **ácido ortofosfórico** con el que se obtiene un elevado ruido de fondo.

En cuanto a los medios ácidos orgánicos se pueden destacar: **ácido oxálico** en el que se obtienen máximas respuestas para el As(III) y el DMA cuando la concentración de ácido es ~1% m/v. Cuando el porcentaje de ácido aumenta, se produce una disminución de la señal para el DMA, mientras que el As(III) pasa por un mínimo para aumentar de nuevo su respuesta. Las señales correspondiente al As(V) y al MMA, son considerablemente más bajas (-75%) respecto a las otras dos especies, y la respuesta del MMA es doble a la correspondiente al As(V) para esta concentración del ácido.

Si se trabaja con **ácido cítrico**, en un intervalo de 0-5%, se obtienen comportamientos de las especies, similares a los observados con ácido oxálico.

El **ácido tartárico** también se ha utilizado como posible medio de generación de las diferentes arsenias. Con este ácido se obtienen comportamientos análogos a los obtenidos en los otros ácidos para el As(III), DMA y MMA pero el comportamiento del As(V) difiere bastante ya que aumenta la respuesta obtenida a partir de este estado de oxidación, al aumentar la concentración de ácido. Este hecho sugiere que posiblemente se produzca una conversión parcial del As(V) a As(III) en este medio, o simplemente que la eficiencia

de generación de la arsina a partir de As(V), mejora al aumentar la concentración del ácido.

Otro ácido orgánico ensayado como medio de generación es el **ácido acético**, en un intervalo de concentración comprendido entre 0-1 M. En este medio el As(III) y el DMA producen elevadas respuestas, el MMA responde un 70% menos que el As(III) y el As (V) no produce señal analítica (<10%) (ANDERSON R.K., 1986).

Finalmente en el **ácido mercaptoacético** (0-1,5 M) todas las especies presentan un comportamiento similar aumentando la señal analítica cuando aumenta la concentración del ácido hasta 0,1 M y posteriormente decaen bruscamente hasta anularse completamente las respuestas (ANDERSON R.K., 1986).

El empleo de *disoluciones reguladoras* como medio de generación ha sido también ampliamente utilizado. Las primeras investigaciones fueron encaminadas hacia la búsqueda de un amortiguador químicamente inerte, que fuera capaz de realizar la reducción selectiva del As(III) con un mínimo de interferencias debidas al As(V), MMA y en particular al DMA ya que este último presenta comportamientos más similares al As(III), en los medios anteriormente citados. Entre los sistemas amortiguadores así como los pH de trabajo, seleccionados como medios de generación de la arsina, en presencia de otras especies del mismo elemento, se destacan los recogidos en la Tabla III.I

Como puede deducirse, el estudio de los medios de generación de las distintas arsinas, es un campo todavía abierto y con un gran interés para llevar a cabo la determinación de las diferentes formas químicas del arsénico (ANDERSON R.K., 1986; RUEDE T.R., 1994).

Tabla III.1.- Sistemas reguladores y pH utilizados como medios de generación de la correspondientes arsinas.

Medio ácido	Especies	Reductor	Referencia
HCl 5M cítrico/citrato (pH=5,5) acético/acetato “	As(III) + As(V) As(III)	NaBH ₄ 5% en NaOH 0,1M	AGGETT J., 1976
Zr ^{IV} + HCl 0,25M HCl 2M + KI	As(III) As(III) + As(V)	NaBH ₄ 5% en NaOH 0,1M	NAKASHIMA S., 1978
HCl (pH=0) oxálico (pH=1) acético/acetato (pH=5) cítrico/citrato “	As(III) + As(V) As(III)	NaBH ₄ 5% en NaOH 0,1M	SHAIKH A.U., 1978
H ₃ PO ₄ /H ₂ PO ₄ ⁻ (pH=1-3) acético/acetato (pH=4)	As(III) + As(V) As(III)	NaBH ₄ 1% en NaOH 0,1M	HOWARD A.G., 1980
HCl 6M acético/acetato (pH=4,8)	As(III) + As(V) As(III)	NaBH ₄ 1%	HINNERS T.A., 1980
HCl 1M acético/acetato (pH=5,0)	As(III) + As(V) As(III)	NaBH ₄ 2%	HOWARD A.G., 1981
HCl 2M + KI 40%(p/v) cítrico 40%(p/v) (pH=5)	As(III) + As(V) As(III)	NaBH ₄ 3% en NaOH 0,1M	YAMAMOTO m. 1981
HCl 5M + KI 0,1%(p/v) cítrico/citrato (pH=6) Acético (0,16M) Mercaptoacético (0,1M)	As(III) + As(V) As(III) As(III) + DMA As(III)+ As(V)+ MMA + DMA	NaBH ₄ 2%	ANDERSON R.K. 1986
HCl 4M HCl (0,16M+KMnO ₄) Tartárico + KMnO ₄	As(III) MMA + DMA As _{total}	NaBH ₄ (37mM) NaOH (5 mM)	RUENDE T.R. 1994

La adición de *agentes oxidantes y reductores* al medio de generación ha sido ampliamente utilizada cuando, en la muestra, pueden estar presentes diferentes especies químicas de arsénico, fundamentalmente As(III) y As(V). En este sentido han sido varios los sistemas redox empleados, con una gran variedad de procedimientos analíticos. Algunos de estos sistemas redox requieren calentamiento y largos tiempos de reacción. Los oxidantes y reductores más utilizados han sido **yoduro potásico** (YAMAMOTO M., 1981), **tiourea** (KAIPING D., 1992), **permanganato potásico** (ANDERSON R.K., 1986), **L-cisteína** (LE X.C., 1993), obteniéndose resultados muy diversos, según sean las condiciones de trabajo. En este campo, se puede concluir que tampoco existe un medio en el que se produzca selectivamente la reducción de una de las especies, por lo que es necesario recurrir a factores cinéticos y de complejación.

Las investigaciones básicas realizadas sobre la eficiencia de la generación de las diferentes arsinas, es aprovechada en muchos casos para resolver el problema de diferenciar las distintas especies de arsénico presentes en muestras de interés biológico y medioambiental por su posible repercusión en el hombre.

Así HOWARD A.G., 1980: determina especies inorgánicas de arsénico, en muestras medioambientales, mediante el control del pH para la generación de la arsina. Para ello utilizan distintas disoluciones amortiguadoras. El método empleado se basa en la reacción del hidruro formado, con dietilditiocarbamato de plata (Ag-DDTC) y posterior detección espectrofotométrica. Un año más tarde este mismo autor amplía el método para la determinación de cuatro especies de arsénico: As(III), As(V), MMA y DMA mediante HG-AAS. Para llevar a cabo esta diferenciación, combina la posibilidad de atrapamiento de las distintas arsinas formadas y la variación del medio ácido para la generación de los hidruros. Con HCl 1M es posible determinar As(III)+As(V), MMA y DMA; mientras que si el medio es acético/acetato a pH=5 sólo se determina el As(III). Este método fue aplicado a muestras de agua de río donde es posible determinar las cuatro especies, y muestras de moluscos donde determinan As(III)+As(V), MMA y DMA.

YAMAMOTO M., 1981, aplica sus estudios básicos para la determinación diferencial de As(III), As(V), Sb(III) y Sb(V) mediante HG-AAS utilizando una llama de hidrógeno/nitrógeno. Este trabajo incluye un estudio de distintos amortiguadores y distintos medios ácidos, orgánicos e inorgánicos, (cítrico, tartárico, málico, acético y clorhídrico) para la generación de las distintas especies en muestras de agua de mar. Los mejores resultados los obtiene cuando determina el As(III) en medio cítrico/citrato de pH=5 y el As total generando el hidruro en HCl 2M con reducción previa As(V) → As(III) con KI 40% (p/v).

ANDERSON R.K., 1986, realiza estudios sobre reducción selectiva de las especies de arsénico mediante generación de hidruros en continuo, aplicando el método a aguas naturales. En una primera parte, un estudio del medio ácido de generación le lleva a la conclusión de que no existe ningún medio que produzca la reducción selectiva de algunas de las especies, pero se puede recurrir a factores cinéticos y de complejación para conseguir la especiación, resaltando la necesidad de validar los resultados mediante ejercicios de intercomparación entre los laboratorios o mediante el empleo de materiales de referencia.

Los medios seleccionados para evaluar estas especies en aguas de río son los siguientes:

- HCl 5M con KI (0,1% p/v): determina el As inorgánico total.
- cítrico/citrato (pH=6) + tiourea, para prevenir la interferencia del Cu: determina As(III)
- ácido acético (0,16 M): determina As(III)+DMA o sólo DMA después de la oxidación del As(III) con KMnO_4 +tiourea+Na-EDTA para prevenir interferencias.
- ácido mercaptoacético (0,1M): con el que consigue determinar las cuatro especies conjuntamente, es decir, $\text{As}_{\text{total}} = \text{As(III)} + \text{As(V)} + \text{MMA} + \text{DMA}$.

Más recientemente, RUEDE T.R., en 1994, aborda el problema de la especiación mediante FI-HG-AAS, utilizando distintos medios para la generación de las distintas arsinas. En este método se inyecta 0,5 ml de muestra en un flujo de HCl (10 ml/min) que se combina con KBH_4 (37 mM y 5 mM en NaOH). Esta mezcla pasa a través de un tubo reactor y posteriormente a un separador gas líquido. La arsina se mide por AAS a 193,7 nm., obteniendo límites de detección entre 0,2-0,5 $\mu\text{g l}^{-1}$. Los medios seleccionados por este autor son los siguientes:

- HCl 4M: sólo reacciona el As(III)
- HCl 0,165M, 1 mg/l KMnO_4 : As(III) \rightarrow As(V) y se determina conjuntamente con el MAA y el DMA.
- HCl 0,025M, 1 mg KMnO_4 : MMA+DMA.
- ácido tartárico 0,85 mM, 1 mg KMnO_4 : determina las cuatro especies.

La *L-Cisteína* ha sido utilizada tanto para la determinación de arsénico total, como para la determinación de distintas especies de arsénico. Con este último fin, se han encontrado distintos trabajos en la bibliografía que se recogen a continuación.

FENG Y-L., 1994. Propone un método para la determinación simultánea de As(III) y As(V) en agua mediante HG-ICP-AES. Para ello, reduce el As(V) con L-cisteína y determina ambos estados de oxidación basándose en el tiempo de reducción del As (V).

LE X-C, 1993, estudia el impacto del consumo de arsénico en la dieta mediante la determinación de As(III); As(V), MMA, DMA y AB en muestras de orina. La determinación la realiza mediante FIA-HG-AAS con descomposición en microondas para la determinación de As_{total} y sin descomposición previa, para la determinación de las especies que forman hidruros. Por diferencia determina la arsenobetaina. Utiliza L-cisteína como reductor del As(V) a As(III).

Posteriormente, este mismo autor, realiza un estudio teórico del efecto de la L-cisteína (2% p/v) en la generación de las arsinas en medio HCl de distintas concentraciones, sobre cuatro especies tóxicas de arsénico: As(III), As(V), MMA, y DMA en el que concluye que, cuando la concentración de HCl está comprendida entre 0,3-0,7 M y en presencia de L-cisteína, se obtienen respuestas máximas e idénticas para las cuatro especies (resultado análogo al obtenido por Anderson R.K., 1986, con el ácido mercaptoacético). Sin embargo, cuando utiliza HCl 2M como medio de generación, se obtienen respuestas para el DMA y para el MMA mientras que las especies inorgánicas de arsénico no responden. Este trabajo incluye estudios de recuperación de estas especies, añadidas a una matriz de orina (LE X-C, 1994).

HWANG C-J., 1994, propone un método para la determinación de As(III), As(V), MMA y DMA en muestras de agua en el que utiliza L-cisteína como prerreductor, y combina la LC-ICP-MS.

Finalmente uno de los trabajos más recientes, sobre especiación sin acoplamiento de técnicas, es el realizado por CHATTERJEE A., 1995, que determina As(III), As(V), MMA y DMA. Para ello utiliza cuatro métodos: a) Extracción con Na-DDTC en cloroformo-FI-HG-AAS (para separar el arsenito y el arsenato. b) Absorción de la arsina en Ag-DDTC en cloroformo con hexametilentetraamina con detección espectrofotométrica. c) Intercambio iónico-FI-HG-AAS (determina las cuatro especies). d) Mineralización con $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HClO}_4$ con posterior determinación con FI-HG-AAS (determina el As_{total}).

CAPÍTULO IV.

**BIBLIOGRAFÍA DE LA PRIMERA PARTE: INTRODUCCIÓN Y
ANTECEDENTES GENERALES**

- * AGGETT J., and ASPELL A.C. *Analyst*, 101, 341, (1976).
- * AGGETT J., KADWANI R. *Analyst*, 108, 1495, (1983).
- * AIZPUN B., VALDÉS-HEVIA C., FERNANDEZ DE LA CAMPA M.R. and SANZ-MEDEL A. *Talanta*, 39, 1517, (1992).
- * AMANKWAH S.A. and FASCHING J.L. *Talanta*, 32, 111, (1985).
- * AN Y., WILLIE S.N. and STURGEON R.E. *Spectrochim. Acta*, 47B, 1403, (1992).
- * ANDERSON R.K., THOMPSON M. and CULBARD E. *Analyst*, 111, 1143, (1986).
- * ANDREAE M.O. *Anal. Chem.*, 49, 820, (1977).
- * ARSENIC IN THE ENVIRONMENT. Part. I: Cycling and Characterization. Part. II: Human Health and Ecosystem Effects. Ed. Jerome O. Nriagu. John Wiley & Sons, Inc., (1994).
- * BALLIN U., KRUSE R. and RUESSEL H. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 350, 54, (1994).
- * BEAUCHEMIN D., BEDNAS M.E., BERMAN S.S., McLAREN J.W., SIU K.W.M. and STURGEON R.E. *Anal. Chem.*, 60, 2209, (1988).
- * BEAUCHEMIN D., SIU K.W.M., McLAREN J.W. and BERMAN S.S. *J. Anal. At. Spectrom.*, 4, 285, (1989).
- * BLAIS J.S., MONPLAISIR G-M and MARSHALL W.D. *Anal Chem.* 62, 1161, (1990).

- * BRAMAN R.S., JOHNSON D.L., FOREBACK C.C. and BRICKER J.L. *Anal. Chem.*, 49, 621, (1977).
- * BRANCH S., EBDON L. and O'NEILL P. *J. Anal. At. Spectrom.*, 9, 33, (1994).
- * BROEKAERT J.A.C., PEREIRO R., STARN T.K. and HIEFTJE G.M. *Spectrochim. Acta*, 48B, 1207, (1993).
- * BRUMBAUGH W. G. and WALTHER M.J. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 484, (1989).
- * BURRIEL MARTÍ F., LUCENA CONDE F., ARRIBAS JIMENO S., HERNÁNDEZ MENDEZ J. *Química Analítica Cuantitativa*. Paraninfo S.A., (1989).
- * CABREDO PINILLOS S., SANZ ASENSIO J. and GALBAN BERNAL J. *Anal. Chim. Acta*, 300, 321, (1995).
- * CAROLI S., ALIMONTI A., CONI E., PETRUCCI F., SENOFONTE O. and VIOLANTE N. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 24, 363, (1994).
- * CASARETT and DOULL'S. *Toxicology. The basic science of poisons*. Macmillan Publishing Company, New York, (1986).
- * CERVERA M.L., LÓPEZ J.C., MONTORO R. *Microchem J.*, 49, 20, (1994).
- * CERVERA M.L., NAVARRO A., MONTORO R. and CATALA R. *At. Spectrosc.*, 10, 154, (1989).
- * CERVERA M.L., NAVARRO A., MONTORO R., CATALA R. and YBAÑEZ N. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 282, (1989).

- * CLARK S., WESLEY G., BRATER D.G., JHONSON A.R. *Farmacologia Clínica*. Ed. Médica Panamericana S.A., México, (1990).
- * COMBER S.D.W. and HOWARD A.G. *Analytical Proceedings*, 26, 20, (1989).
- * CONCON J.M. *Food Toxicology. Part B: Contaminants and additives*. Marcell Dekker INC, New York, (1988).
- * CULLEN W.R. and REIMER J. *Arsenic Speciation in Environmen. Chem. Rev.* 89, 713, (1989).
- * CHANA B.S. and SMITH N.J. *Anal. Chim. Acta*, 169, 195, (1985).
- * CHAPPELL J., CHISWELL B., OLSZOWY H. *Talanta*, 42, 323, (1995)
- * CHATTERJEE A., DAS A., MANDAL B.K., CHOWDHURY T.R., SAMANTA G. and CHAKRABORTI D. *Analyst*, 120, 643, (1995).
- * CHEAM V. and AGEMIAN H. *Analyst*, 105, 737, (1980).
- * CHEM H., BRINDLE I.D., LE X-C. *Anal. Chem.*, 64, 667, (1992).
- * DUD'A R. y REJL L. *La Gran Enciclopedia de los Minerales*. SUSAEETA S.A., (1989).
- * EBDON L., FISHER A.S. and WORSFOLD P.J. *J. Anal. At. Spectrom.*, 9, 611, (1994).
- * EBDON L., HILL S., WALTON P. And WARD R.W. *Analyst*, 113, 1159, (1988).

- * EPSTEIN M.S., CARNRICK G.R., SLAVIN W. and MILLIR-IHLI N.J. *Anal. Chem.*, 61, 1414, (1989).
- * EVANS W.H., JACKSON F.J. and DELLAR D. *Analyst*, 104, 16, (1979).
- * FARRERAS VALENTI P., ROZMAN C. *Medicina interna, vol II*. Ediciones Doyma SA, Barcelona, (1991).
- * FAUST S.D., WINKA A.J. and BELTON T. *J. Environ. Sci. Health* A22, 209, (1987).
- * FENG Y-L., CAO J-P. *Anal. Chim. Acta*, 293, 211, (1994).
- * GALAN E. y MIRETE S. *Introducción a los Minerales de España*. Instituto Geológico y Minero de España, (1979).
- * GALBAN J., MARCOS E., LAMANA J. and CASTILLO J.R. *Spectrochim. Acta*, 48B, 53, (1993).
- * GREULACH U., HENZE G. *Anal. Chim. Acta*, 306, 217, (1995).
- * HAKAIA E. and PYY L. *J. Anal. At. Spectrom.*, 7, 191, (1992).
- * HAN H-B., LIU Y-B., MOU S-F and NI Z-M. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 8, 1085, (1993).
- * HANDBOOK of CHEMISTRY and PHISICS. 69th Edition (1988-89).
- * HARRISON R.M. *Environmental Analysis using Chromatography Interfaced with Atomic Spectroscopy*. Ellis Horwood Limited, (1989).

- * HASEGAWA H., SOHRIN Y., MATSUI M., HOJO M. and KAWASHIMA M. *Anal. Chem.*, 66, 3247, (1994).
- * HERSEY J.W., OOSTDYK T.S. and KELIHER P.N. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 1090, (1988).
- * HINNERS T.A. *Analyst*, 105, 751, (1980).
- * HOLAK W. *Anal. Chem.*, 41, 1712, (1969).
- * HORLER B.A.T.N. *Analyst*, 114, 919, (1989).
- * HOWARD A.G. and ARBAB-ZAVAR M.H. *Analyst*, 105, 338, (1980).
- * HOWARD A.G. and ARBAB-ZAVAR M.H. *Analyst*, 106, 213, (1981).
- * HUANG J., GOLTZ D. and SMITH F. *Talanta*, 35, 907, (1988).
- * HUEBER D.M. and WINEFORDNER J.D. *Anal. Chim. Acta*, 316, 129, (1995).
- * HUEBER D.M., MASAMBA W.R.L., SPENCER B.M. and WINEFORDNER J.D. *Anal. Chim. Acta*, 278, 279, (1993).
- * HWANG C.J., JIANG S.J. *Anal. Chim. Acta*, 289 (2), 205, (1994).
- * JIMENEZ DE BLAS O., GONZÁLEZ V., MUÑOZ R., MARTÍN A. and SÁNCHEZ M.A. *Quim. Anal.*, 13, 138, (1994).
- * KADOKAMI K., UEHIRO T., MORITA M., FUWA K. *J. Anal. At. Spectrom.*, 3, 187, (1988).

- * KAIPING D., YAN L., and WENHAO S. *Inorganic Anal. Chem.*, 116, 227168 y, (1992).
- * KATZUN B.G. *Farmacología básica y clínica*. Ed. El manual moderno S.A. de C.V., México, (1984).
- * KELLEN G.J. and JASELSKIS B. *Anal. Chem.*, 48, 1538, (1976).
- * LAINTZ K.E., SHIEH G.M. and WAI C.M. *J. Chromatography Sci.*, 30 (4), 120, (1992).
- * LARSEN E.H., PRITZL G. and HANSEN S.H. *J. Anal. At. Spectrom.*, 8, 557, (1993).
- * LÁSZTITY A., KRUSHEVSKA A., KOTREBAI M. and BARNES R.M. *J. Anal. At. Spectrom.*, 10, 505, (1995).
- * LE X-C., CULLEN W.R., REIMER K.J. and BRINDLE I.D. *Anal. Chim. Acta*, 258, 307, (1992).
- * LE X-C., CULLEN W.R. and REIMER K.J. *Anal. Chim. Acta*, 285, 277, (1994).
- * LE X-C., CULLEN W.R. and REIMER K.J. *Talanta*, 40, 185, (1993).
- * LE X-C., CULLEN W.R. and REIMER K.J. *Talanta*, 41, 495, (1994).
- * LE X-C., CULLEN W.R., REIMER K.J. and BRINDLE I.D. *Anal. Chim. Acta*, 258, 307, (1992).
- * LI Z-L., MOU S-F., NI Z-M. and RIVIELLO J.M. *Anal. Chim. Acta*, 307, 79, (1995).

- * LIN Y., WANG X., YUAN D., YANG P., HUANG B. and ZHUANG Z. *J. Anal. At. Spectrom.*, 7, 287, (1992).
- * LINDER M.C. *Nutrición. Aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos*. EUNSA, Pamplona, (1988).
- * LIU H.M., FERNÁNDEZ M.L., BLANCO E. and SANZ-MEDEL A. *J. Anal. At. Spectrom.*, 8, 815, (1993).
- * LÓPEZ J.C., REIJA C., MONTORO R., CERVERA M.L. and DE LA GUARDIA M. *J. Anal. At. Spectrom.*, 9, 651, (1994).
- * LÓPEZ-GONZÁLVEZ M.A., GÓMEZ M.M., CÁMARA C. and PALACIOS M.A. *J. Anal. At. Spectrom.*, 9, 291, (1994).
- * MAHER W.A. *Microchem. J.*, 40, 132, (1989).
- * MARTÍN I., LÓPEZ-GONZÁLVEZ M.A. GÓMEZ M., CÁMARA C. and PALACIOS M.A. *J. Chromatography B*, 666, 101, (1995).
- * MENENDEZ GARCÍA A., SANCHEZ URÍA J.E. and SANZ-MEDEL A. *J. Anal. At. Spectrom.*, 4, 581, (1989).
- * METZLER D.E. *Bioquímica. Las reacciones químicas en las células vivas*. Ed. Omega, Barcelona, (1981).
- * MICHEL P., AVERTY B., COLANDINI V. *Mikrochim. Acta*, 109, 35, (1992).
- * MILLWARD G.E. *Analyst*, 120, 609, (1995).

- * MOMPLASIR G-M., LEI T. and MARSHALL W.D. *Anal. Chem.*, 66 (20), 3533, (1994).
- * MÜRER A.J.L., ABILDTRUP A., POULSEN O.M. and CHRISTENSEN J.M. *Talanta*, 39, 469, (1992).
- * NAKAHARA T. *Anal. Chim. Acta*, 131 73, (1981).
- * NAKAHARA T. *Spectrochim. Acta Rev.*, 14, 95, (1991).
- * NAKASHIMA S. *Analyst*, 104, 172, (1979).
- * ODONAKA Y., TSUCHIYA N., MATONO O. and GOTO S. *Anal. Chem.*, 55, 929, (1983).
- * PACEY G.E., FORD J.A. *Talanta*, 28, 935, (1986).
- * PAHLAVANPOUR B., THOMPSON M. and THORNE L. *Analyst*, 105, 756, (1980).
- * PEREIRO R., WU M., BROEKAERT J.A.C., HIEFTJE G.M. *Spectrochim. Acta*, 49B, 59, (1994).
- * PERGANTIS S.A., CULLEN W.R. and WADE A.P. *Talanta* 41, 205, (1994).
- * PETER F., GROWCOCK G. and STRUNC G. *Anal. Chim. Acta*, 104, 177, (1979).
- * RAURET G., RUBIO R., PADRÓ A. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 340, 157, (1991).
- * RAWN J.D. *Bioquímica*. Mc Graw Hill Interamericana, (1989).

- * REILLY C. *Metal contamination of food*. Applied Science Publishers LTD, Londres, (1980).
- * RICCI G.R., SHEPARD L.S., COLOVOS G. and HESTER N.E. *Anal. Chem.*, 53, 610, (1981).
- * RUEDE T.R., PUCHELT H. *Fresenius'J. Anal. Chem.*, 350, 44, (1994).
- * SANZ-MEDEL A., AIZPUN B., MARCHANTE J.M., SEGOVIA E., FERNANDEZ M.L., BLANCO E. *J. Chromatography A*, 683, 233, (1994).
- * SCHLEGEL D., MATTUSCH J., and DITTRICH K. *J. Chromatography A*, 683, 261, (1994).
- * SEILER H.G. & SIGEL H. *Handbook on toxicity of inorganic compounds*. Marcell Dekker INC, New York, (1988).
- * SHAIKH A.U. and TALLMAN D.E. *Anal. Chim. Acta*, 98, 251, (1978).
- * SHIBATA Y. and MORITA M. *Anal. Chem.*, 61, 2116, (1989).
- * SHIBATA Y., MORITA M. and FUWA K. *Adv. Biophys.*, 28, 21, (1992).
- * SKURIKHIN L.J. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 286, (1989).
- * SKURIKHIN L.J. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 290, (1989).
- * STROH A. and WÖLLKOPF U. *J. Anal. At. Spectrom.*, 8, 35, (1993).
- * STURGEON R.E. and GREGOIRE D.C. *Spectrochim. Acta*, 49B, 1335, (1994).

- * STURGEON R.E., BERMAN S.S., DESAULNIERS J.A.H., MYKYTIUK A.P., McLAREN J.W. and RUSSELL D.S. *Anal. Chem.*, 53, 2337, (1980).
- * THOMPSON J.J. and HOUK R.S. *Anal. Chem.*, 58, 2541, (1986).
- * THOMPSON K.C. and THOMERSON D.R. *Analyst*, 99, 595, (1974).
- * TYE C.T., HASWELL S.J., O'NEIL P. and BANCROFT K.C.C. *Anal. Chim. Acta*, 169, 195, (1985).
- * TYSON J.F. *Anal. Chim. Acta*, 234, 3, (1990).
- * VAN DER BERG C.M.G. *Anal. Chim. Acta*, 284, 461, (1994).
- * VAN ELTEREN J.T., DAS H.A., DE LIGNY C.L., AGTERDENBOS J. and BAX D. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 179, 211, (1994).
- * VAN GRIEKEN R.E. *Anal. Chim. Acta*, 143, 3, (1982)
- * VIJAN P.N., RAYNER A.C. and WOOD G.R. *Anal. Chim. Acta*, 82, 329, (1976).
- * WANG C.F., CHEN W.H., YANG M.H. and CHIANG P.C. *Analyst*, 120, 1681, (1995).
- * WELZ B. and SUCMANOVA M. *Analyst*, 118, 1417, (1993).
- * WELZ B. and SUCMANOVA M. *Analyst*, 118, 1425, (1993).
- * WELZ B., HE Y., SPERLING M. *Talanta*, 40, 1917, (1993)
- * WICKSTRØM T., LUND W. and BYE R. *Analyst*, 120, 2695, (1995).

- * YAMAMOTO M., URATA K., MURASHIGE K. and YAMAMOTO Y. *Spectrochim. Acta*, 36B, 671, (1981).
- * YAN X-P and NI Z-M. *Anal. Chim. Acta*, 291, 89, (1994).
- * YUSOF A.M., IKHSAN Z.B. and WOOD A.K.H. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 179, 277, (1994).

PARTE II

PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO V

DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

V.1.- Aparatos, materiales, reactivos y disoluciones

V.1.1. Estudio comparativo de distintas disoluciones patrón.

V.2.- Tipos de muestras analizadas y liofilización de las mismas.

V.3.- Procedimientos propuestos para la determinación de As_{total} en muestras biológicas.

V.3.1. Procedimientos empleados en el tratamiento de la muestra.

V.3.2. Procedimiento experimental para la determinación de arsénico por generación de hidruros, en modo discontinuo, y espectrofotometría de absorción atómica.

V.3.3. Procedimiento experimental para la determinación de arsénico por HG en flujo continuo-AAS.

V.3.4. Procedimiento experimental para la determinación de arsénico por HG en inyección en flujo-AAS.

V.4.- Optimización de las variables de los métodos propuestos.

V.4.1. Mineralización de las muestras.

V.4.2. Desarrollo del método analítico para la determinación de As total por las técnicas de generación de hidruros: determinación en discontinuo por AAS y espectrofotometría UV-VIS..

V.4.2.1. Consideraciones generales.

V.4.2.2. Optimización de parámetros físico-químicos para la formación del hidruro de arsénico a partir de sus especies inorgánicas.

V.4.2.3. Características analíticas.

V.4.3. Desarrollo del método analítico para la determinación de As total por HG-AAS en continuo.

V.4.3.1. Optimización de variables para la determinación de arsénico por HG en continuo-AAS.

V.4.3.2. Estudio de interferencias.

V.4.3.3. Minimización de las interferencias debidas al Se y Sb.

V.4.3.4. Características analíticas.

V. 4.4. Desarrollo del método analítico para la determinación de As total mediante FI-HG-AAS.

V.4.4.1. Optimización de variables para la determinación de As por HG-AAS mediante inyección en flujo.

V.4.4.2. Estudio de interferencias.

V.4.4.3. Características analíticas.

V.5.- Comparación de los métodos propuestos.

V.6.- Aplicación de los métodos propuestos.

V.6.1. Generación de hidruros acoplada a la espectrofotometría UV-VIS y a la AAS en discontinuo: Diferenciación entre As(III) y As(V) inorgánico.

V.6.2. Aplicaciones analíticas de la técnica HG-AAS en continuo y en inyección en flujo.

V.1.- APARATOS, MATERIALES REACTIVOS Y DISOLUCIONES.

Aparatos y materiales:

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica de doble haz, Perkin-Elmer mod. 2380.
- Lámpara de Arsénico de descarga sin electrodos (EDL) con una potencia de trabajo de 8W Perkin-Elmer.
- Fuente de energía externa Perkin-Elmer, para la utilización de lámparas EDL, acoplada al espectrofotómetro.
- Registrador Perkin-Elmer Recorder mod. 56.
- Espectrómetro UV-VIS mod. HP 8452A Diode-Array.
- Generador de hidruros diseñado y construido en el Departamento.
- Bomba peristáltica de cuatro canales Gilson mod. HP4. Tubos de Tygon de 0,6 cc m⁻¹.
- Tubo de teflón de 0.5 mm d.i.
- Separador gas-líquido Philips.
- Célula de atomización de cuarzo, calentada por una llama aire/acetileno (20/40 ml/min).
- Placa calefactora Kowel mod. F-1.
- Balanza analítica Sartorius con sensibilidad de 0.1 mg .
- pHmetro de precisión Crison 2001 H.
- Material volumétrico de calidad contrastada.
- Sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore.
- Trituradora de aspas de titanio Robot-Coupe mod. R-86.

- Liofilizador (Facultad de Veterinaria de la U.C.M.)
- Acetileno extrapuro C-26 y Argón C-50 (Carburos metálicos).

Reactivos:

Todos los reactivos utilizados han sido de grado de análisis o de alta pureza y el agua desionizada se ha obtenido por un sistema Milli-Q.

- Ácidos y bases: ácido nítrico (HNO_3 , Carlo Erba), ácido clorhídrico (HCl , Carlo Erba), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, Merck), ácido láctico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$, Sigma), hidróxido sódico (NaOH , Merck).
- Sales: Yoduro potásico (KI , Carlo Erba), nitrato de magnesio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck).
- Las disoluciones de cationes y aniones utilizadas en los estudios de interferencias, se prepararon a partir de sales, metales u óxidos de calidad para análisis de diversas procedencias.

Disoluciones:

- Disolución patrón de As(III) de 1000 $\mu\text{g/ml}$: se disuelven 0,3300 g de trióxido de arsénico (As_2O_3 , Merck) en 10 ml de hidróxido sódico (NaOH) 1M. Se enrasa a 250 ml con HCl 2M.

- Disolución patrón de As(V) de 1000 $\mu\text{g/ml}$: Se disuelven 0,4436 g de pentóxido de arsénico dihidratado ($\text{As}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba) en 10 ml de NaOH 1M y se lleva a 250 ml con HCl 2M.
- Disoluciones de trabajo de As(III) y de As (V) en el intervalo 10-140 ng ml^{-1} : se preparan diariamente por dilución conveniente en agua desionizada de una disolución de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ obtenida a partir de las disoluciones patrón.
- Disolución de borohidruro sódico (NaBH_4 , Aldrich) al 3% (p/v): se prepara añadiendo 15,0 g de NaBH_4 en una disolución formada por 5,0 g de NaOH en 250 ml de agua ultrapura.
- Disolución reguladora de ácido cítrico/citrato de distintos pH: se preparan añadiendo a una disolución de ácido cítrico al 40% (p/v) la cantidad adecuada de NaOH al 10% para obtener las disoluciones con los pH de trabajo.
- Disolución reguladora de ácido acético/acetato: se prepara una disolución de ácido acético al 50% (p/v) y se ajusta el pH con NaOH al 10% (p/v).
- Disolución reguladora de ácido tartárico/tartrato: se prepara una disolución de ácido tartárico al 30% (p/v) ajustando el pH con NaOH 10% (p/v).
- Disolución de dietilditiocarbamato de plata (Ag-DDTC): se disuelven 0,5 g de Ag-DDTC en 100 ml de piridina previamente enfriada. Esta disolución puede conservarse durante dos semanas a baja temperatura y en la oscuridad.
- Mezcla estabilizante $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2/\text{MgO}$: se disuelven 80,0 g de nitrato de magnesio en 200 ml de agua ultrapura y se añaden 8,0 g de MgO, obtenido por calcinación a 500°C de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ durante 15 horas.

V.1.1.- Estudio comparativo de distintas disoluciones patrón

Con objeto de utilizar las disoluciones patrón de As(III) y As(V) que ofrezcan las mejores prestaciones en cuanto a similitud con las muestras, estabilidad en función del tiempo y blancos más bajos, se ha realizado un estudio comparativo de las posibles disoluciones que son empleadas por distintos autores como disolución patrón.

A₁: Disolución patrón de As (III) de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$: Se disuelven 0,3300 g de trióxido de arsénico (As_2O_3) en hidróxido sódico (NaOH) 1M. Se neutraliza con ácido clorhídrico (HCl) hasta viraje de la fenoftaleína, añadiendo a continuación 0,5 g de yoduro potásico (KI) como estabilizante. Se enrasa con HCl 0,6M hasta un volumen de 250 ml.

A₂: Disolución patrón de As(III) de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$: se pesan 0.3300g de As_2O_3 se disuelven en 10 ml de NaOH 1M y se enrasa a 250 ml con HCl 2M.

B₁: Disolución patrón de As(V) de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a partir de la sal: Se disuelven 1,0400 g de monohidrogenoarseniato de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en agua desionizada y se enrasa a 250 ml.

B₂: Disolución patrón de As(V) de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a partir del óxido: Se disuelven 0,4436 g de $\text{As}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en agua ultrapura y se enrasa a 250 ml.

B₃: Disolución patrón de As(V) de 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a partir del óxido: Se pesan 0.4436 g de $\text{As}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se disuelven con 10 ml de NaOH 1M y se enrasa con HCl 2M a 250 ml.

Una vez preparadas estas disoluciones se preparan, por dilución conveniente, disoluciones intermedias de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de la siguiente manera:

Disoluciones de As(III) de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$:

- 1.- Por dilución conveniente en HCl 2M de las disoluciones de As(III) A₁ y A₂.
- 2.- Por reducción de una disolución de As(V) de 10 $\mu\text{g /ml}$ preparada a partir de disolución B₃ añadiendo 0.5 ml de KI al 30%(p/v) y enrasando con HCl 2M.

Disoluciones de As(V) de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$:

- 1.- Por dilución en HCl 2M de las disoluciones de As(V): B₁, B₂ y B₃.
- 2.- Por oxidación con KMnO₄ de una disolución de As(III) preparada como se describe en el apartado (A₂).

Con objeto de realizar un control de la calidad de las distintas disoluciones empleadas, se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) empleando el procedimiento general basado en el modelo lineal (ANDERSON L.R., 1987). Los factores F experimentales obtenidos fueron siempre mas bajos que los factores teóricos en las disoluciones de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y su estabilidad se mantuvo durante 1 mes, tiempo máximo ensayado. Sin embargo, el estudio comparativo de las distintas disoluciones mostró que las disoluciones de As(III) que contienen KI como estabilizante, producen blancos más altos.

Si se comparan las distintas disoluciones de As(V), preparadas por los distintos procedimientos, se observa que no existen diferencias significativas entre todas ellas.

Ahora bien, para estudios posteriores se han seleccionado las disoluciones patrón preparadas a partir de los respectivos óxidos y enrasando con HCl 2M. De esta manera,

se tienen las dos especies de arsénico inorgánico en las mismas condiciones evitando posibles variaciones debidas a su preparación.

V.2.- TIPOS DE MUESTRAS ANALIZADAS Y LIOFILIZACIÓN DE LAS MISMAS.

En el análisis de alimentos y dietas, las muestras fueron liofilizadas según el siguiente procedimiento: se tritura la muestra con un Robot-Coupe mod.R-86 con aspas de titanio para prevenir posibles contaminaciones. La trituración se lleva a cabo aumentando paulatinamente la velocidad, desde 1500 rpm hasta 3000 rpm.

Para comprobar la homogeneidad de las muestras, se toman cinco porciones de la misma y se controla la pérdida de humedad, obteniendo en todas ellas valores análogos.

Una vez trituradas y homogeneizadas las muestras, se extienden en bandejas en capas de 1 cm. de espesor y se liofilizan. La liofilización es un proceso que favorece la conservación de las muestras al mismo tiempo que facilita la mineralización y puesta en disolución de las mismas.

Cuando ha concluido la liofilización, la muestra seca se vuelve a triturar para homogeneizarla de nuevo, se introducen en botes de polietileno y se guardan a -20°C.

V.3.- PROCEDIMIENTOS PROPUESTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

La mayoría de los métodos de análisis para la determinación de los distintos componentes inorgánicos, requieren una preparación previa de la muestra. Con este fin, se han descrito en la bibliografía diferentes métodos, todos ellos basados en la destrucción de la materia orgánica.

V.3.1.- Procedimientos empleados en el tratamiento de la muestra.

La etapa de mineralización es por regla general una etapa larga y tediosa, en la que se pueden cometer muchos errores, por lo que es muy importante seleccionar el procedimiento más adecuado a cada tipo de muestra y para cada elemento.

Las muestras de interés en este trabajo son las muestras biológicas y alimentos por lo que deben ser sometidas a un proceso de mineralización y destrucción de la materia orgánica antes de proceder a su análisis. En la mineralización de estas muestras los constituyentes orgánicos e inorgánicos se alteran por acción de los distintos reactivos utilizados, por lo que el control de estas variaciones y transformaciones es primordial para seleccionar el método de mineralización más adecuado.

En el caso de la determinación de arsénico, el problema se agrava debido a la volatilidad del elemento y de algunas de sus sales, fundamentalmente los haluros de As(III) ; sin embargo, una mineralización ácida suave a temperatura moderada, no produce la destrucción total de la materia orgánica, presentando grandes interferencias de matriz en la generación de la arsina.

Existen muchos métodos de mineralización propuestos por distintos autores, pero todos ellos presentan ventajas e inconvenientes por lo que no existe un método que pueda ser propuesto como el óptimo. Se ha realizado por tanto, un estudio comparativo de las distintas mineralizaciones.

Para las matrices biológicas y alimentos, básicamente existen dos tipos de mineralizaciones: mineralizaciones por vía húmeda y mineralizaciones por vía seca.

- **Mineralizaciones por vía húmeda** que implica la adición de mezclas de ácidos, coincidiendo la mayoría de los autores en la utilización de ácido perclórico como parte integrante de las mismas debido a su gran eficacia en muestras con alto contenido en grasas (K.S. SUBRAMANIAN, 1982).

En el presente trabajo se han utilizado y comparado distintos tratamientos:

Mineralización por vía húmeda por calentamiento en placa calefactora: se pesan 0,5 g de muestra y se introduce en vasos de precipitados de 50 ml con 10 ml de una mezcla de ácidos $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HClO}_4$ (3:1:1). A continuación se calientan lentamente los vasos en una placa calefactora hasta alcanzar los 200-250°C , reponiendo la mezcla de ácidos a medida que se evapora, hasta que se complete la mineralización. Se deja enfriar la disolución y se diluye convenientemente con agua ultrapura.

Mineralización por vía húmeda en bloque de aluminio sobre una placa calefactora: este tipo de mineralización es una variante de la mineralización anterior. En este caso se pesan entre 0,25 y 0,5 g de muestra y se le añaden 5 ml de la mezcla de ácidos. El tratamiento se lleva a cabo en tubos de ensayo que se introducen en los orificios del bloque de aluminio.

La mineralización se produce rápidamente y de forma uniforme, disminuyendo el riesgo de proyecciones y aumentando la eficiencia del proceso. Por otra parte, la mineralización tiene lugar a una temperatura mas baja que en placa calefactora. El volumen de ácidos necesario es bastante menor comparándolo con otros procedimientos por vía húmeda, lo que supone una gran ventaja ya que hay menor riesgo de contaminación de las muestras y una disminución de la señal de los blancos.

Mineralización en reactores a presión: Se introducen 0,25-0,5 g de muestra en los vasos de teflón de los reactores (PTFE) y se añade 2 ml de HNO_3 y unos 15 mg de V_2O_5 . Se enfrían durante 30 minutos a -20°C para asegurar que se cierra herméticamente. A continuación se introducen en una estufa a 80°C durante 4 horas. Finalizado el proceso, se deja enfriar el reactor a temperatura ambiente y se diluyen las muestras convenientemente con agua ultrapura.

En este tipo de mineralización se consigue una completa digestión además de minimizar los riesgos de pérdidas por volatilización y de contaminación de las muestras. Esta mineralización no requiere una atención constante del operador. Sin embargo, este método no es muy recomendado cuando las muestras tienen altos contenidos de materia grasa (H. BERNARD, 1982).

- **Mineralización por vía seca.** La mineralización por vía seca también es muy empleada en el caso de la determinación de arsénico. En general, la muestra se somete a una temperatura de $500-600^\circ\text{C}$. El procedimiento empleado por nosotros es el que a continuación se indica.

Reducción a cenizas con $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{MgO}$: se pesa entre 1 y 2 g de muestra que se introducen en un crisol de porcelana de 150 ml de capacidad. Se le añaden 10 ml de la mezcla estabilizante, se tapa el crisol para evitar pérdidas por proyecciones de la mues-

tra, y se introduce en una estufa a 110°C durante 1 hora. A continuación, se pasa el crisol a una mufla precalentada a 250°C manteniéndolo durante 1 hora y progresivamente se sube la temperatura hasta alcanzar 500°C manteniéndolo durante 15 horas. Transcurrido este tiempo se saca el crisol de la mufla y se deja enfriar.

Se humedece el sólido obtenido y se lava cuidadosamente la tapa del crisol con agua ultrapura primero y con HCl 6N después, incorporando las aguas de lavado al crisol. Se añade HCl 6N hasta disolución del residuo. Se trasvasa cuantitativamente a un matraz enrasando con ácido.

Una vez preparadas las muestras, se procede a su determinación por espectrometría de absorción atómica y generación de hidruros, aplicando en todos ellos el método de adiciones estándar.

V.3.2.- Procedimiento experimental para la determinación de arsénico por generación de hidruros en modo discontinuo-Absorción Atómica.

Generador de hidruros : El generador de hidruros utilizado en esta parte del trabajo, ha sido diseñado y construido en nuestro laboratorio. Este generador es semejante a los generadores comerciales (MHS-10 de Perkin Elmer) pero tiene la gran ventaja de que permite variar los flujos de purga y agitación, pudiéndose crear las condiciones de flujos óptimas para la generación de los diferentes hidruros de las distintas especies, condiciones variables como consecuencia de las distintas cinéticas de formación.

El esquema este generador se representa en la Figura V.1.

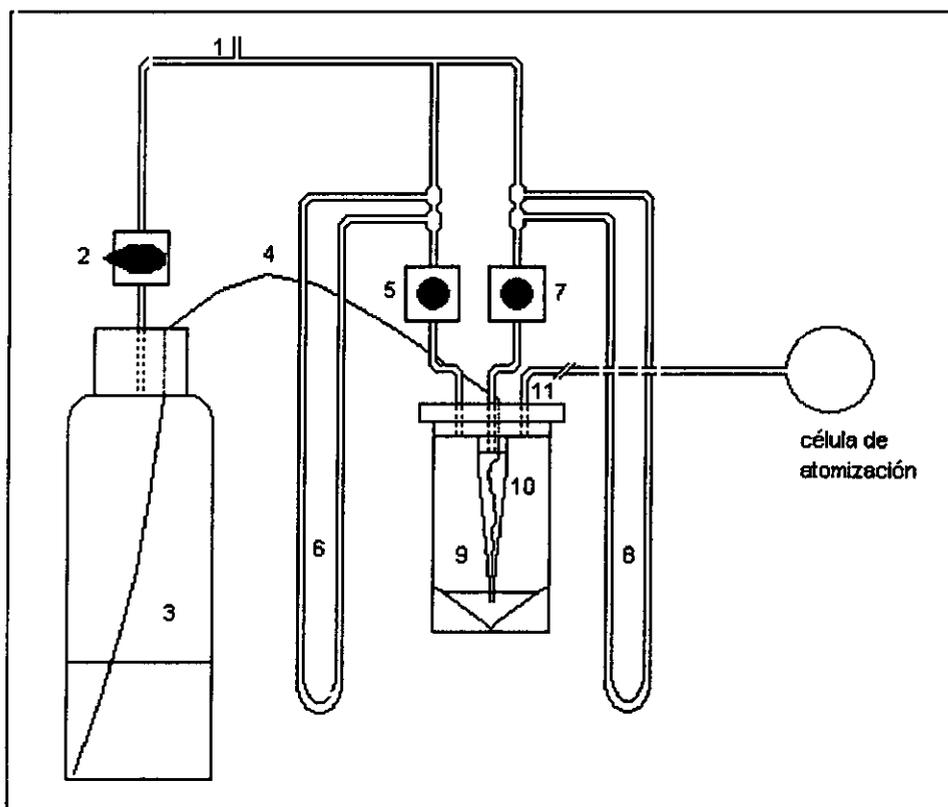


Figura V.1 Generador de hidruros con control de flujos

Las partes principales de este generador son:

- 1.- Entrada general del gas inerte.
- 2.- Llave de paso de presurización del depósito de borohidruro sódico.
- 3.- Depósito de borohidruro sódico (500 ml).
- 4.- Tubo conductor del borohidruro sódico desde el depósito al vaso de reacción (20 cm).
- 5.- Válvula reguladora de presión: control del gas de purga.
- 6.- Medidor de flujo del gas de purga (25 cm, \varnothing 0,4 cm).
- 7.- Válvula reguladora de presión: control del gas de agitación.
- 8.- Medidor del flujo del gas de agitación (25 cm, \varnothing 0,4 cm).

- 9.- Reactor (250 ml).
- 10.- Cono conductor del gas de agitación y canalizador del tubo conductor del reactivo.
- 11.- Conducto de salida de la mezcla gas portador-hidruro hacia la célula de atomización.

Modo de operar: En un vaso de reacción que contiene entre 5,0-9,0 ml de HCl 6N se añaden alícuotas de 5,0-1,0 ml de la disolución de la muestra, volumen final 10 ml. Una vez fijados los flujos de purga y agitación, se coloca el reactor en su soporte creándose una atmósfera de argón. Se abre la válvula multipaso de forma que el gas inerte fluya parcialmente al depósito del reductor. Este flujo de gas crea una presión en dicho depósito empujando la disolución de borohidruro sódico (3% p/v) al vaso de reacción con una velocidad constante (Fig. V-1). La válvula permanece abierta y por tanto la caída de borohidruro, hasta que la señal empieza a decaer.

La forma especial en "V" del fondo del vaso de reacción y el tubo capilar que permite la introducción del agente reductor en el seno de la muestra, producen la reacción uniformemente sin necesidad de agitación exterior (JACKWERTH E., 1979).

A continuación, la arsina generada es arrastrada por el argón junto con el hidrógeno formado que actúa como gas portador adicional, y ambos son transportados a la célula de atomización.

Existe un tercer flujo de gas a través del cono canalizador del tubo capilar, que permite una mezcla total de la muestra y de los reactivos, es decir es el gas de agitación.

V.3.3.- Procedimiento experimental para la determinación de arsénico por Generación de Hidruros en Flujo Continuo-Absorción Atómica.

Modo de operar: Para la determinación de arsénico mediante un sistema en continuo, se bombean la muestra, el ácido clorhídrico 6M y el borohidruro sódico al 3% con la ayuda de una bomba peristáltica. Mediante un sistema de conexiones en forma de T, se van mezclando las distintas disoluciones tal y como se muestra en la *Figura V.2*. En la primera conexión confluyen la disolución de la muestra y el medio ácido. La disolución resultante se une al flujo de NaBH_4 mediante otra conexión en T. A la salida de esta segunda conexión hay un reactor de 50 cm de longitud y 0,5 mm de diámetro interno, donde se forma el hidruro. El terminal del reactor está conectado a un separador de fases gas-líquido en el que la arsina es conducida, con ayuda de un gas de arrastre (Ar), hasta una célula de cuarzo calentada con una llama aire-acetileno.

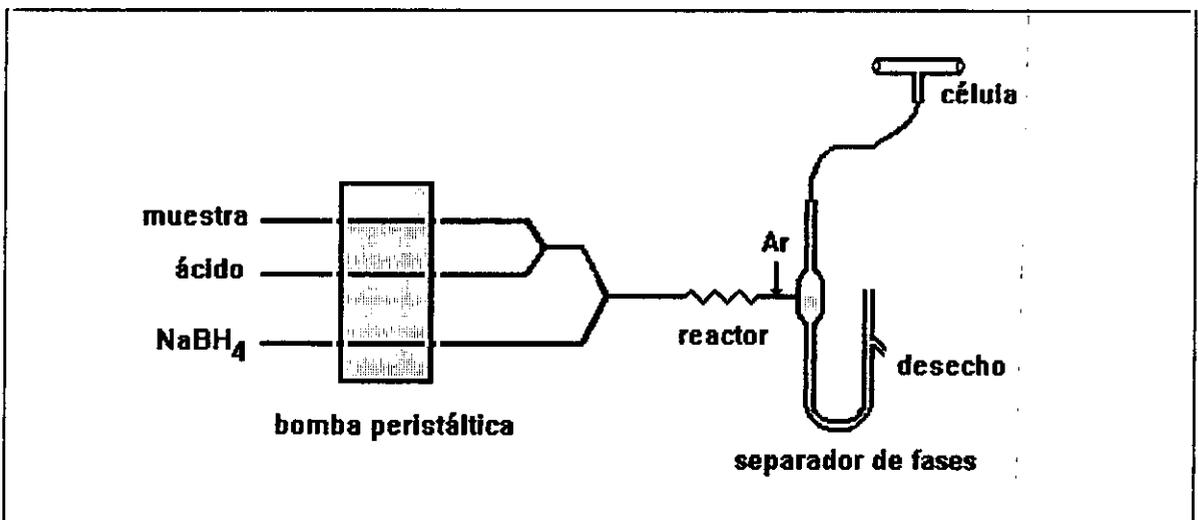


Figura V.2.- Sistema en continuo para la determinación de arsénico.

Con la utilización de este sistema para la determinación del elemento, se reduce el consumo de reactivos y se consigue una mínima manipulación de la muestra con la consiguiente disminución de riesgos de contaminación.

V.3.4.- Procedimiento experimental para la determinación de arsénico por Generación de Hidruros en FI-Absorción Atómica.

Modo de operar: Mediante una bomba peristáltica se bombea la disolución de ácido (HCl 6M) y el borohidruro sódico (NaBH₄ 3%), como agente reductor y formador del hidruro. En este caso y a diferencia del método en continuo, se inyecta la muestra (25-300 µl) mediante una válvula en el flujo del ácido. Con la ayuda de una conexión en forma de T, la muestra junto con el ácido se une con el borohidruro, y a partir de aquí, sigue el mismo recorrido que el método en continuo tal y como se muestra en la Figura V.3.

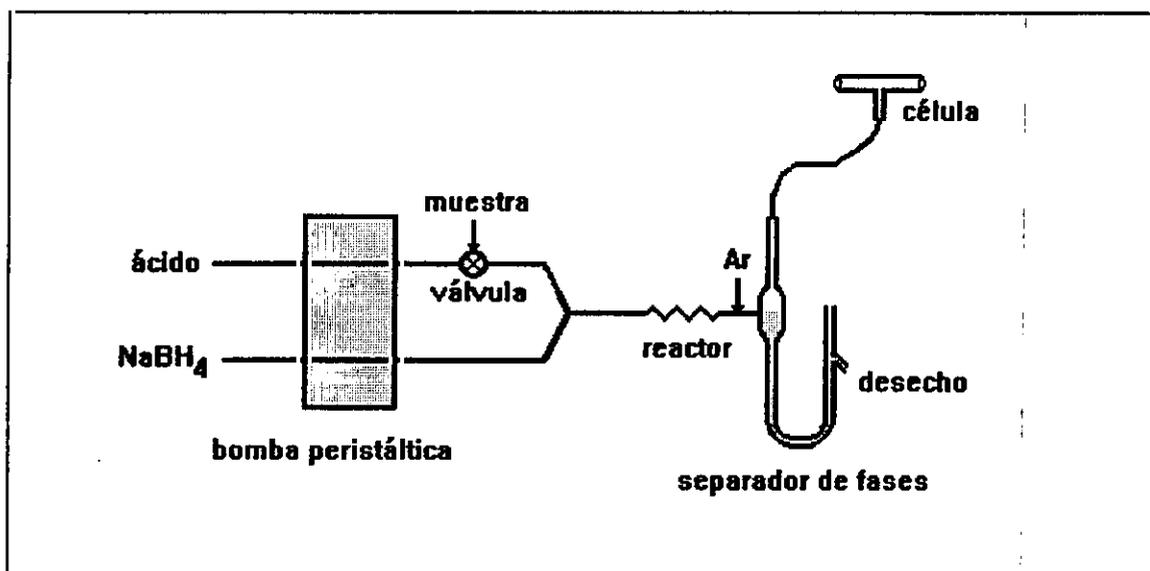


Figura V.3.- Esquema de un sistema FIA para la determinación de arsénico

El uso de la inyección en flujo (FI) además de presentar las ventajas del método en continuo, tales como la reducción considerable del volumen de los reactivos, menor manipulación de la muestra etc... incorpora la ventaja adicional de disminuir el volumen de muestra consumido, lo que va a permitir la determinación del elemento cuando el volumen de muestra sea mínimo.

V.4.- OPTIMIZACIÓN DE LAS VARIABLES DE LOS MÉTODOS PROPUESTOS.

V.4.1.- Mineralización de la muestra.

La optimización de las variables para los cuatro tratamientos de muestras que se proponen en la presente memoria se realizó considerando los parámetros siguientes:

1º) Tamaño de la muestra: el tamaño de la muestra debe ser el adecuado para que en la dilución posterior al volumen necesario para la determinación cuantitativa, el contenido en As se encuentre dentro del intervalo óptimo de calibración. Sólo las muestras con contenido relativamente elevado en As pudieron mineralizarse en bloque de aluminio y en los reactores a presión, ya que éstos limitan extraordinariamente la cantidad de muestra, debido a la gran limitación que imponen en el volumen de ácido de mineralización.

2º) Volúmenes de las mezclas ácidas: los volúmenes apropiados de las mezclas de ácidos son función del tamaño y naturaleza de las muestras. En las muestras con altos contenidos en grasas (dietas, huevos, etc.) sólo la mineralización con mezclas de ácidos fuertes y la mineralización por vía seca, fue suficientemente enérgica como para destruir todo vestigio de materia orgánica, dejando la disolución totalmente transparente. Aunque algunos autores postulan que no es necesaria la mineralización completa de la muestra para la determinación de elementos traza, en el caso del elemento As, y para su determinación por hidruros, se observa un grave efecto matriz en función de la materia orgánica presente en la muestra. A medida que la mineralización se hace mas exhaustiva, la pendiente del calibrado aumenta y por tanto su sensibilidad. Por otra parte, una mineralización incompleta conduce a la formación de espumas en la etapa de la reducción al hidruro.

3°) Temperatura de mineralización: la temperatura de mineralización ha resultado ser un parámetro crítico para los métodos de mineralización por vía húmeda en placa calefactora. La mineralización debe realizarse de forma gradual, manteniendo la temperatura por debajo de 150°C hasta que gran parte de la materia orgánica ha sido destruida. Sólo después, puede elevarse hasta los 200-250°C para finalizarla. En el caso de un calentamiento rápido, se produce una volatilización de los ácidos más volátiles de la mezcla, HNO_3 y HClO_4 , y la carbonización instantánea de la muestra por el ácido sulfúrico, fundamentalmente cuando estas muestras poseen altos contenidos en hidratos de carbono; aunque en el caso del arsénico la pérdida por volatilidad no es tan crítica como en el caso del selenio (se pierde inmediatamente en cuanto se forman partículas carbonosas), no debe alcanzarse el estado de carbonización.

La mineralización en los reactores a presión presenta una grave limitación de la temperatura a 80°C. Por encima de dicha temperatura, aún empleando pequeñas cantidades de muestra, se produce la apertura de las válvulas de seguridad, con la consiguiente pérdida de arsénico. Esto conduce a que, salvo en muestras con bajo contenido en grasas, la mineralización es incompleta. Por el contrario, no se ha observado en ningún caso interferencias producidas por el catalizador V_2O_5 .

La mineralización por vía seca, en su conjunto presentó las máximas prestaciones ya que se consigue la destrucción total de la materia orgánica sin pérdidas de As. Además, pueden mineralizarse hasta 2 g de muestra, cantidad imposible de mineralizar con los otros métodos. Sólo en el caso de concentraciones muy bajas de arsénico, se ha observado efecto matriz producido por la elevada concentración de Mg. La precaución necesaria en esta mineralización es la de efectuar un calentamiento progresivo de la muestra y de la mezcla estabilizante a fin de evitar proyecciones que conducen a la pérdida de analito. La precaución es necesaria hasta la sequedad total de la muestra. Otra precaución adicional es la de conseguir durante todo el proceso la mayor homogeneización de

la muestra dentro de la matriz del estabilizante. Conseguido esto, la muestra puede calentarse durante largo tiempo (hasta 15 horas) sin observarse pérdidas de As.

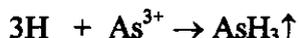
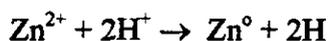
Los métodos desarrollados en la presente memoria, se ha aplicado a las muestras analizadas y a aquellas muestras sometidas a certificación (Apdo.V.8.) eligiéndose el método óptimo en función de la naturaleza de dicha muestra y de las prestaciones del método.

V.4.2.- Desarrollo del método analítico para la determinación de As total por la técnica de generación de hidruros: Determinación en discontinuo por Absorción Atómica y espectrofotometría UV-VIS.

V.4.2.1.- Consideraciones generales

La determinación de arsénico inorgánico por generación de hidruros ha tenido como técnicas de detección dos técnicas analíticas extraordinariamente desarrolladas: la espectrofotometría de Absorción Atómica y la espectrofotometría UV-VIS. Dos conocimientos básicos contribuyen de forma relevante al desarrollo de los procedimientos propuestos por los diferentes autores en base a estas dos técnicas de detección: la cinética de generación de la arsina y la formación de un complejo coloreado de As que absorbe radiación en la región visible-ultravioleta.

Es sabido que para que la conversión del arsénico presente en la disolución a su forma química de gas arsina (AsH_3) es necesario la presencia de reductores fuertes. Los reductores tradicionalmente empleados fueron las mezclas ácido-metal, fundamentalmente Zn-HCl-SnCl₂. El mecanismo de la reducción es el siguiente:



Pero la conversión a arsina es un proceso relativamente lento, particularmente si el arsénico está presente en estado pentavalente, por lo que debe ser reducido previamente a su estado trivalente. Son varios los reductores propuestos, pero el KI ofrecía las mejores prestaciones por lo que fue el reactivo elegido por los diferentes autores, una vez demostrada su cuantitatividad de reducción.

A partir de 1972 la mezcla Zn-Cl fue sustituida por el reactivo borohidruro sódico empleado por F.J. SMIDTH y colaboradores (1973) Desde entonces, el NaBH₄ reemplazó a las mezclas ácido metal debido a sus muchas prestaciones entre las que se encuentra la rapidez de formación de la arsina. Sin embargo, aparece una nueva controversia, ya que si bien, es posible generar el hidruro con este reactivo desde el grado de oxidación (V), en la mayoría de los casos, la diferencia de sensibilidad con respecto a la generación a partir del grado de oxidación (III) es considerable.

La mayoría de los autores coinciden en esta diferencia aunque existen bastantes contradicciones en la magnitud de este efecto. Así por ejemplo algunos autores encuentran diferencias de sensibilidad entre el 25-30% (VIJAN P.N., 1976), otros llegan a la conclusión de que la diferencia de señales varía según el anión presente (THOMSON A.J., 1977), o bien, a que la diferencia de señal es más acusada cuando se mide en altura de pico que cuando la medida se hace en área (PEATS A.J., 1979) e incluso, algunos no encuentran diferencias entre las señales obtenidas midiendo en área de pico (SIEMER D.D., 1976). Una forma de obviar estas diferencias de sensibilidad es la reducción previa del arsénico (V) a arsénico (III) añadiendo, como en el caso de la reducción de metales, yoduro potásico (KI) como reductor; sin embargo, la introducción de KI en el sistema crea nuevas dificultades en los procedimientos analíticos. Así:

- 1.- En muestras tratadas con ácidos fuertemente oxidantes (caso de mineralizaciones de las muestras), o que contengan agentes oxidantes, como Fe (III), se forman grandes cantidades de I_2 por lo que se necesitan elevadas concentraciones de KI para la reducción efectiva de As(V) a As(III). La presencia de I_2 o I_3^- formado en la muestra es un inconveniente por varias razones:
 - a) El I_2 es un agente fuertemente absorbente que puede desprenderse de la disolución antes de la adición del $NaBH_4$, produciendo la modificación de la línea base.
 - b) Pueden producirse pérdidas en la generación por formación del aducto volátil As(III)- Y_2 (SIEMER D.D., 1976).
 - c) Consume reductor $NaBH_4$ y por tanto puede ejercer una interferencia de competencia por el reactivo.

- 2.- La velocidad de reducción $As(V) \rightarrow As(III)$ a altas concentraciones de ácido a menudo es muy lenta (pueden ser necesarios tiempos de hasta 2-3 horas) y como consecuencia el tiempo consumido en la medida es elevado (las referencias y las disoluciones estándar deben tratarse de forma similar).

- 3.- El método de derivatización más usual para la especiación de arsénico, es la formación de hidruros después de separar las especies por Cromatografía Líquida o por Cromatografía Iónica. Las dificultades analíticas debidas a la etapa de prerreducción con KI son difícilmente evitables, ya que sería necesario realizarlo en el flujo continuo desde la salida de la especie del cromatógrafo y antes de la formación del correspondiente hidruro.

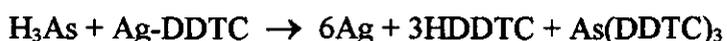
La posibilidad de establecer un método analítico robusto en el cual la eficiencia de generación del hidruro a partir de ambos grados de oxidación, ocurra en forma instantánea (cinética rápida) y reproducible, sin la presencia de KI, ha sido uno de nuestros principales objetivos en la determinación de arsénico total.

Para el conocimiento de la cinética con que se forma el hidruro de arsénico a partir de los grados de oxidación (III) y (V), la espectrofotometría UV-VIS aporta un servicio extraordinario ya que puede recogerse el hidruro en una disolución adsorbente en tiempos definidos, lo que no es posible con la técnica de absorción atómica. Prácticamente, todas las determinaciones espectrofotométricas de arsénico que pueden aplicarse a muestras biológicas o medioambientales con bajos contenidos en el elemento, se basan en recoger su hidruro en una solución adsorbente que contiene un ligando capaz de formar un cromóforo con la arsina generada.

VASAK V. y colaboradores, 1959, fueron los primeros en usar la disolución de dietilditiocarbamato de plata (Ag-DDTC) en piridina para la determinación espectrofotométrica de cantidades traza de arsénico. En este método, la arsina desarrollada por hidrógeno naciente es absorbida en una solución de Ag-DDTC en piridina. La disolución piridínica del complejo, tiene un intenso color rojo-violeta, mientras que la disolución piridínica de Ag-DDTC es amarillo pálido.

La absorptividad molar del producto coloreado es $1,4 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($a = 0,19$) con longitud de onda máxima aproximadamente a 536 nm y el reactivo Ag-DDTC absorbe a longitud de onda menor de 500 nm.

Los datos de la literatura referentes a la composición química del cromóforo, que sirve como base a la determinación, son incompletos e inconsistentes. G.W. POWERS y colaboradores, 1959; W. FRESENIUS y W. SCHNEIDER, 1964, y finalmente J. STEINKE, 1968, mencionan la formación de un complejo rojo pero sin hacer referencia a su estructura o composición. H. BODE, 1968, atribuye la aparición del color rojo a la formación de plata coloidal.



Esta ecuación se cita también en dos monografías (KOCH O.G., 1978; UPOR E., 1978). L. DUBOIS y colaboradores, 1969, mencionan la formación simultánea de Ag^0 y un complejo, pero asignan el color al complejo y no a la plata.

Un estudio del espectro de absorción de la disolución roja formada en la reacción de H_3As con Ag-DDTC muestra dos máximos de absorción: uno a 410 y otro a 536 nm., Figura V.4.

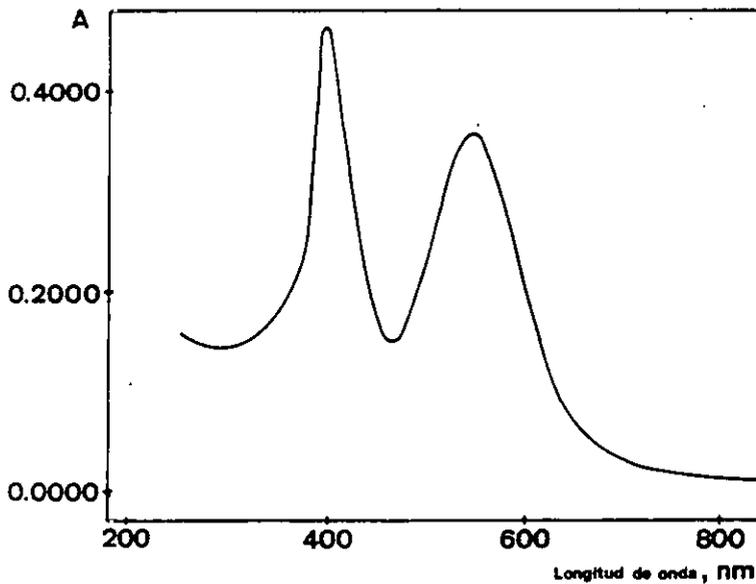


Figura V.4.- Espectro del complejo coloreado As-Ag-DDTC/py, en la región del UV-VIS.

Los dos máximos de absorción de la longitud de onda roja siempre aparecen en la zona visible del espectro y pueden explicarse mediante la siguiente reacción de formación del complejo (SANDBO S., 1978), aunque no se indica la composición del mismo:



Por otra parte, A. CSIKKEL-SZOLNOKI, 1986, asigna el color rojo a un complejo polinuclear que contiene Ag° y As(III) como átomos centrales. Sin embargo, las condiciones extremas de formación del cromóforo (alta concentración de Ag-DDTC y agente reductor, H_2 , además del disolvente polar) hacen imposible determinar la composición del complejo.

Como se ha mencionado ya, y teniendo en cuenta que la arsina generada puede burbujearse por tiempo indefinido, se puede dilucidar si el problema de la diferencia de la señal obtenida por ambas especies, se debe a la capacidad del NaBH_4 para reducir al As(V) o, si por el contrario se debe a que el proceso tiene una cinética lenta.

Para llevar a cabo este estudio comparativo se ha utilizado un generador de hidruros con control de flujos, similar al utilizado en la determinación de arsénico mediante HG-AAS en discontinuo, pero en este caso el conducto de desalojo del hidruro desde el vaso de reacción, se conecta a un tubo colector donde se encuentra el reactivo complejante (disolución piridínica de Ag-DDTC). La Figura V.5., muestra el esquema del diseño desarrollado.

El módulo de reacción está compuesto por un depósito de la disolución alcalina (A) y un recipiente de reacción en el que se lleva a cabo la generación del hidruro (B). Una vez que se añade la muestra en el recipiente de reacción, se acciona la llave de paso del borohidruro sódico (C) de forma que el gas fluya parcialmente al depósito de reductor. Este flujo de gas crea una presión en dicho depósito que permite que la disolución de NaBH_4 sea transferida al recipiente de reacción con una velocidad constante, teniendo lugar el proceso de reducción.

Las llaves de purga y agitación, llevan incorporados unos medidores de flujos (G y H) consistentes e unos tubos de vidrio en forma de U y graduados en unidades arbitrarias. Dichos medidores de flujo permiten controlar el caudal de gas que entra en el vaso

de reacción. A continuación el hidruro formado es transportado por el flujo de purga (E) al tubo colector (F) donde se encuentra el reactivo complejante (solución piridínica de dietilditiocarbamato de plata) que recoge la arsina.

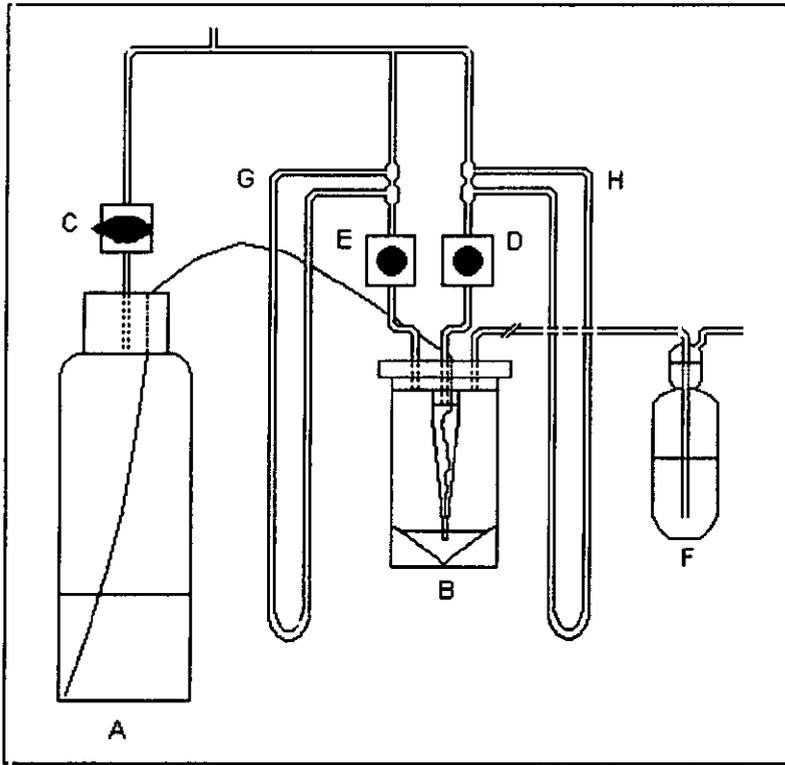


Figura V.5.- Generador de hidruros con control de flujos y sistema de recogida del hidruro.

V.4.2.2.- Optimización de los parámetros físico químicos para la formación del hidruro de arsénico a partir de sus especies inorgánicas.

La concentración y caudal del borohidruro sódico, la concentración, naturaleza y volumen del ácido que se encuentra en el medio de reacción y que suministra el hidrógeno necesario para la formación del hidruro, y finalmente, la velocidad de desalojo, arrastre y purga del hidruro hacia el espectrofotómetro de absorción atómica (o hacia la disolución espectrofotométrica), son los principales parámetros que pueden influir en la

eficiencia de la generación del hidruro a partir de cualquiera de sus dos grados de oxidación. Inicialmente, se ensayan los parámetros físicos acerca de las condiciones óptimas de transporte del hidruro a la célula y caudal de caída del borohidruro para , una vez fijados estos parámetros, estudiar lo que es verdaderamente representativo de la química de la generación que, son las condiciones óptimas del par NaBH_4 -ácido.

Influencia del flujo de NaBH_4 y de purga en la eficiencia de generación de la arsina:

Los ensayos previos para fijar las condiciones óptimas de transporte de los hidruros formados a la célula de atomización, así como el flujo de caída del borohidruro que produjese las mejores señales con máxima reproducibilidad, se realizan fijando el par NaBH_4 -ácido entre los más usuales encontrados en la bibliografía para la especie As(III) . Para ello, se toman alícuotas de 50 ng de As(III) generando el hidruro con NaBH_4 al 3% (p/v) y HCl 1,5% (p/v), y se varían los flujos implicados: caudal de NaBH_4 , el flujo del gas de purga y el flujo de gas de agitación. La sensibilidad con que se obtuvo el hidruro de arsénico a partir del grado de oxidación (V) fue muy baja y la señal muy irreproducible. En vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta resultados de estudios posteriores sobre la influencia del medio de generación en la eficiencia de formación de la arsina a partir de estados de oxidación distintos, se repite el estudio de los flujos pero generando la arsina en medio HCl 6M tanto a partir de As(III) como de As(V) . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V.1.

Como puede verse en esta tabla, cuando el flujo de NaBH_4 es de 30 ml min^{-1} y flujo de gas de purga de 100 ml min^{-1} , se obtiene la máxima señal de absorbancia para el As(III) mientras que en el caso de generar la arsina a partir de As(V) , el máximo se obtiene con purgas de 65 ml min^{-1} . En el máximo de señal para el As(III) , la absorbancia obtenida para la misma concentración de As(V) es un 30% inferior. Manteniendo constante el caudal de caída del NaBH_4 , un flujo de gas de purga inferior en principio produce un aumento de la señal del As(V) y posteriormente vuelve a disminuir al igual que pa-

ra el As(III) hasta que, a partir de un caudal de purga inferior a 50 ml min^{-1} , las señales se igualan para ambos estados de oxidación, incluso en el caso de no utilizar gas de arrastre, en que el hidruro llega a la célula arrastrado por el hidrógeno generado al ser tan alta la concentración de ambos reactivos. La irreproducibilidad en este caso, aumenta considerablemente. Se elige por tanto como flujos óptimos 30 ml min^{-1} de NaBH_4 y flujo de gas de purga de 50 ml min^{-1} cuando el medio de generación es $\text{HCl } 6\text{M}$ y se trabaja sin reducción previa del As(V) a As(III). Trabajando con reducción previa del As(V) a As(III), se elige 30 ml min^{-1} de NaBH_4 y 100 ml min^{-1} de gas de purga.

La presencia del gas de agitación de las disoluciones no es relevante ya que variaciones dentro del intervalo $5\text{-}15 \text{ ml min}^{-1}$ no mostraron diferencias significativas. Este gas de agitación viene a ser un suplemento al gas de arrastre, pero como su denominación indica, se emplea para favorecer el contacto íntimo entre el borohidruro y la muestra. Se observó que aunque las señales permanecían invariables a su presencia, sí contribuía a un aumento de la reproducibilidad de la señal hasta los 10 ml min^{-1} a partir del cual, se formaban notables turbulencias dentro de la disolución, con las consabidas pérdidas de reproducibilidad. Un flujo de 10 ml min^{-1} fue el que se fijó para posteriores experiencias.

Adición de KI: La adición de yoduro potásico al medio de generación en las condiciones en que las señales analíticas se igualan para ambas especies, produjo un incremento de ambas señales del orden del 30%. Para conocer el efecto real de la eficiencia de generación en presencia de este reactivo, se realizó el siguiente ensayo.

Se añaden 2 ml de KI 1M a las disoluciones ensayo que contienen 30 ng de As(III) y As(V) en acidez $\text{HCl } 6\text{M}$, quince minutos antes de proceder a su medida analítica variando los flujos de NaBH_4 y de gas de purga (Ar) de forma similar al ensayo previamente realizado. La Tabla V.1., muestra los resultados obtenidos. Se observa de su estudio, que la presencia de KI iguala las señales obtenidas desde ambos grados de oxidación en cual-

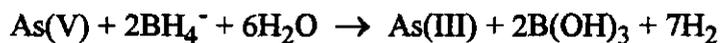
Tabla V.1 .- Efecto del flujo de NaBH₄ y del flujo de purga en la eficiencia de la generación del hidruro a partir de 50 ng de As (III) y As(V), en medio HCl 6M. (Medida por AAS).

\varnothing NaBH ₄ (ml min ⁻¹)	\varnothing purga (ml min ⁻¹)	As (III) Absorbancia (x ± s)	As (V) Absorbancia (x ± s)	% diferencia	As(III) + KI Absorbancia (x ± s)	As(V) + KI Absorbancia (x ± s)
18	100	0,120± 0,004	0,076± 0,004	37	0,150± 0,007	0,150± 0,004
24	100	0,133± 0,007	0,089± 0,002	34	0,157± 0,005	0,153± 0,005
30	100	0,174± 0,003	0,108± 0,002	38	0,160± 0,006	0,160± 0,005
30	65	0,159± 0,009	0,121± 0,007	24	0,163± 0,004	0,160± 0,006
30	50	0,104± 0,007	0,104± 0,007	-	0,174± 0,006	0,169± 0,005
30	25	0,101± 0,005	0,099± 0,005	-	0,179± 0,004	0,171± 0,004
30	0	0,09± 0,01	0,09± 0,01	-	0,170± 0,008	0,169± 0,008

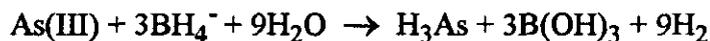
quier condición de flujos de NaBH_4 y purga, y que las señales se incrementan a medida que aumenta el flujo del primero y disminuye el flujo de purga. Este hecho ratifica que la presencia de KI proporciona robustez al método de la generación a partir de cualquiera de sus grados de oxidación; sin embargo, los inconvenientes ya señalados del empleo del KI en soluciones reales hacen desaconsejable su empleo.

Influencia del pH del medio en la generación del hidruro a partir de los grados de oxidación (III) y (V).

El control del medio en el que se genera la arsina es muy importante pues la eficiencia de generación depende de la acidez del medio y de la concentración de borohidruro sódico. Ya se han mostrado las discrepancias obtenidas por diferentes autores. Sin embargo, el borohidruro sódico ha resultado ser un reductor energético en medios fuertemente ácidos debido a la formación de hidrógeno nascente. Se cree que cuando la acidez clorhídrica es superior a 1M, el As(V) se reduce a As(III) con borohidruro sódico según la reacción:



seguido de la reducción del As(III) a arsina



La reducción preliminar de As(V) a As(III) no está favorecida a valores de pH por encima de 4, por lo que con un control cuidadoso de la acidez de la disolución, es posible inhibir esta reducción y producir selectivamente la arsina a partir de arsénico trivalente.

Ante la diversidad de criterios existente, se procede a estudiar la influencia que el pH ejerce en la generación de arsina, tanto empleando la espectrofotometría de absorción atómica como la espectrofotometría de absorción molecular como técnica alternativa; esta última, puede servir para aclarar la disminución de señal, observada a veces, con la técnica de absorción atómica cuando el As se encuentra en estado de oxidación (V). La posible ayuda en la dilucidación de la influencia del pH en la reducción de las especies estriba en que debido a la forma de medida en la espectrofotometría molecular, en la que se pueden alargar indefinidamente los tiempos de recogida del hidruro sobre la disolución complejante, la cinética de la reacción no afecta a la señal.

Espectrofotometría de Absorción Atómica.

El estudio del comportamiento de las especies en función de la acidez del medio se ha realizado con los flujos de gas de purga y caudal de borohidruro sódico previamente optimizados. Ensayos previos mostraron que sólo a partir de concentraciones de borohidruro sódico superiores al 2%, y con independencia del medio ácido, se obtienen señales analíticas sensibles y reproducibles. Así, para llevar a cabo el estudio de la acidez se fijó la concentración de NaBH_4 en 3%.

Para llevar a cabo la experiencia, se preparan una serie de disoluciones que contienen una cantidad fija e igual a 30 ng, tanto de As(III) como de As(V) y se varía convenientemente el pH, desde una acidez clorhídrica 6M hasta $\text{pH}=4$. Los valores de pH comprendidos entre $\text{pH}=1-4$, se establecen con HCl de distintas concentraciones y con regulador cítrico/citrato.

Las absorbancias se midieron en altura relativa de pico en las condiciones experimentales óptimas. Los resultados experimentales obtenidos se incluyen en la Figura V-6.

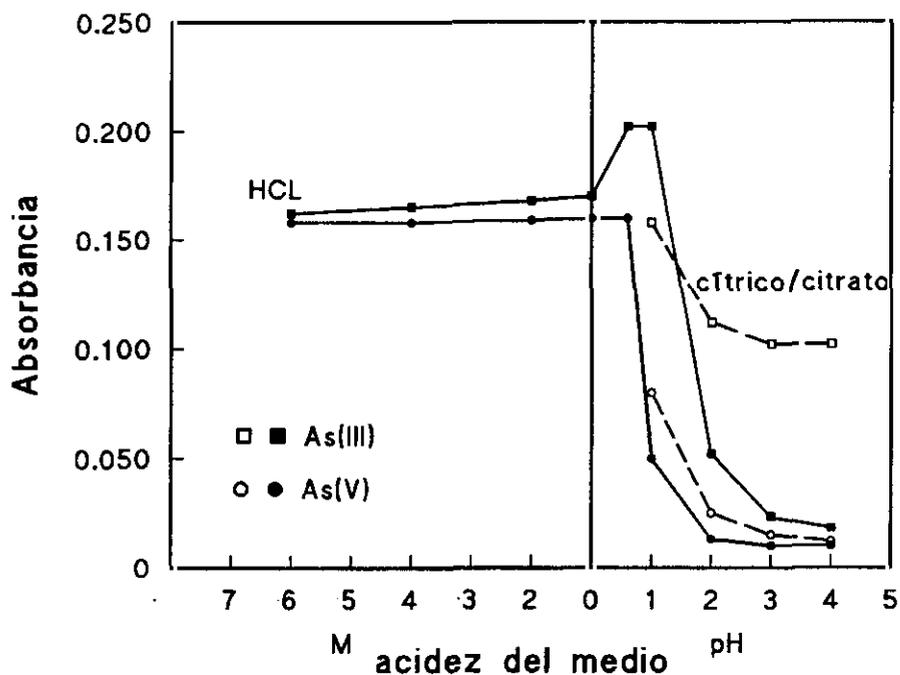


Figura V-6. Influencia de la acidez del medio en la generación de la arsina a partir de As(III) y As(V).

Como puede verse en esta figura, cuando se utiliza una acidez clorhídrica 6M, se obtiene la misma eficiencia en la generación de la arsina tanto si se parte de As(III) como de As(V). Según disminuye la acidez del medio de generación, las eficiencias se van diferenciando dependiendo del estado de oxidación inicial, siendo siempre más sensible la determinación cuando se parte de arsénico trivalente. Cuando las concentraciones del medio ácido clorhídrico son menores de $10^{-1}M$, se observa que la absorbancia disminuye bruscamente, siendo más acusada esta disminución para el As(V), de forma que, a partir de $pH=2$, la señal debida a este estado de oxidación se confunde con el ruido de fondo. A partir de $pH=3$, obtenido con disolución de HCl, ya no se obtienen señales apreciables para ninguno de los dos estados de oxidación.

Ahora bien, si el pH se varía en un intervalo de 1 a 4, pero el medio se establece con un regulador cítrico/citrato, los resultados que se obtienen son diferentes. En este caso,

la señal procedente de arsénico(III) no decrece tan bruscamente como lo hace la señal procedente del arsénico (V). Cuando el pH=3, la sensibilidad para el arsénico (III) es bastante menor que en medio clorhídrico a pH=0.6 (1.5%), del orden del 50%, pero, el medir en este medio de relativa baja sensibilidad, se justifica por su mayor selectividad ya que a este pH, la señal obtenida para el As(V), se confunde con el ruido. Además, esta diferencia de selectividad nos permitirá, diferenciar estos estados de oxidación del arsénico.

Espectrofotometría UV-VIS.

El estudio de la influencia de la acidez en este método se llevó a cabo una vez optimizado los parámetros inherentes a la técnica pero independientes del pH. La optimización de los correspondientes parámetros se realiza en HCl 6M y concentración de NaBH₄ al 3% (p/v) manteniendo constante la concentración de As(III) en 8 µg/10 ml. El hidruro generado se burbujea en la disolución de Ag-DDTC. Una vez formado el complejo coloreado, se mide su absorbancia a una longitud de onda de 536 nm.

Los parámetros optimizados fueron:

- Volumen NaBH₄: inicialmente se fija la concentración de NaBH₄ al 3% y se varía el volumen añadido para generar el hidruro en un intervalo comprendido 2-9 ml obteniendo un máximo cuando el volumen es de 6 ml.
- Concentración de NaBH₄: añadiendo un volumen fijo de 6 ml se varía la concentración de borohidruro, en el intervalo comprendido entre 0,5-4% (p/v), observándose que a partir de una concentración del 3% (p/v), la señal obtenida es máxima y se mantiene constante.

- Tiempo de burbujeo de la arsina sobre la disolución complejante: para ver la influencia del tiempo de burbujeo de la arsina sobre la disolución de Ag-DDTC, se burbujea la arsina durante diferentes tiempos comprendidos entre 25-300 s observándose que a partir de 180 s la señal de absorbancia prácticamente permanece constante. Para tener la certeza de la completa formación del complejo, se elige como tiempo óptimo 300 s.
- Volumen de disolución Ag-DDTC: para ver la influencia de esta variable se mantienen constantes, en los valores óptimos, los parámetros y variables anteriormente estudiadas y se recoge la arsina formada en diferentes volúmenes de disolución entre 2,5-4 ml observándose una disminución en el valor de la absorbancia. Este comportamiento era previsible ya que al aumentar el volumen de Ag-DDTC se diluye el complejo. Se elige 2,5 ml como volumen óptimo por ser la cantidad necesaria para rellenar la cubeta del espectrofotómetro.

Una vez optimizadas las variables que afectan en la determinación espectrofotométrica de arsénico, se realiza un estudio comparativo de diferentes medios ácidos y a distintos valores de pH para los dos estados de oxidación del arsénico inorgánico.

Este estudio se realiza con una cantidad de arsénico (III) y (V) constante de 10 μg , siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Los medios ácidos utilizados fueron HCl de distintas concentraciones comprendidas entre 10^{-4} -6M y con disoluciones amortiguadoras de cítrico/citrato al 40%, acético/acetato al 50% y tartárico/tartrato al 30%, todas ellas en un intervalo de pH entre 1-5. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura V.7. y V.8.

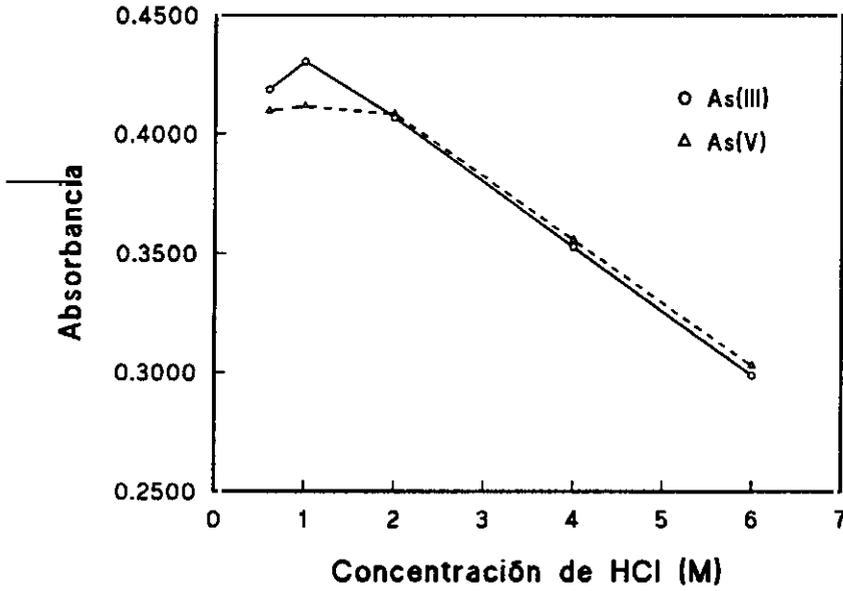


Figura V.7.- Absorbancias del sistema As-Ag-DDTC en piridina, generando la arsina en HCl de distintas concentraciones, para 10 µg de As(III) y As(V).

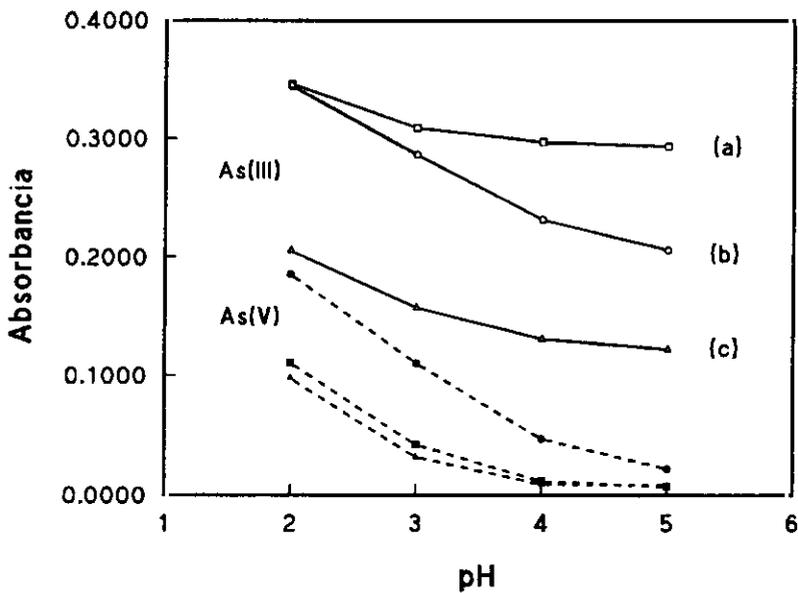


Figura V.8.- Absorbancias del sistema As-Ag-DDTC en piridina, generando la arsina en distintos medios tamponados y distintas concentraciones, para 10 µg de As(III) y As(V). (a) cítrico/citrato. (b) tartárico/tartrato. (c) acético/acetato.

En las gráficas se observa que cuando la arsina se genera en medio HCl de concentración comprendida entre 6-2 M, se obtiene la misma eficiencia de generación independientemente del estado de oxidación del arsénico de partida, además de producirse un aumento de la sensibilidad al disminuir la concentración del ácido. El decrecimiento de la señal de la absorbancia a medida que aumenta la concentración del ácido no puede atribuirse a la diferente eficiencia en la generación del hidruro, sino a una competencia entre la arsina y el hidrógeno por el complejo de Ag-DDTC.

La Tabla V.2., muestra que las pendientes de los calibrados realizados para el As(III), As(V) y As(V) + KI en HCl 2M son idénticas después de dos minutos de colección de la arsina en la disolución del complejo Ag-DDTC.

Tabla V.2.- Calibrados de As(III), As(V) y As(V) + KI, en HCl 2M por espectrofotometría de absorción molecular.

µg As	ABSORBANCIA		
	As(III)	As(V)	As(V) + KI
0,0	0,008± 0,001	0,008± 0,001	0,006± 0,001
4,0	0,170± 0,002	0,176± 0,001	0,174± 0,003
8,0	0,339± 0,002	0,338± 0,002	0,336± 0,002
12,0	0,511± 0,002	0,513± 0,003	0,512± 0,002
16,0	0,701± 0,001	0,704± 0,002	0,709± 0,002
Pendiente	0,0431	0,0432	0,0435
(STD)	(0,0007)	(0,0008)	(0,001)
Ordenada en el origen	0,001	0,002	0,001
(STD)	(0,007)	(0,008)	(0,009)
r	0,9995	0,9995	0,9992

n=5

En medio HCl 1M se obtienen valores de absorbancia diferentes según sea el estado de oxidación del elemento, siendo más sensible la determinación a partir de As(III). Para concentraciones de HCl inferiores, es decir, valores de pH comprendidos entre 0-4, se observa una disminución brusca de la absorbancia del complejo siendo esta disminución más acusada para el As(V), de forma que a partir de pH=2, dicha señal se confunde con el ruido de fondo. A pH superiores a 3, no se obtiene una señal apreciable para ninguno de los dos estados de oxidación.

Los resultados obtenidos para HCl en concentración inferior a 2M parece confirmar que a partir de esta acidez, el borohidruro va perdiendo su eficiencia para reducir instantáneamente el As(V) a As(III) como paso previo a la formación del hidruro. A partir de pH=1, establecido con una concentración de HCl 0,1M el borohidruro pierde su capacidad de reducir cuantitativamente incluso al As(III).

Efecto de las disoluciones tamponadas.

Se han empleado diferentes disoluciones tamponadas para la generación de AsH₃ por espectrofotometría molecular. Los medios reguladores empleados han sido cítrico/citrato del 40%, acético/acetato del 50% y tartárico/tartrato del 30% y en esos medios se ha variado la acidez desde pH 2 a 5 aproximadamente. Los resultados obtenidos vienen dados en la Figura V.8. Dicha figura muestra que con el empleo del amortiguador cítrico/citrato a pH=4,5 es posible inhibir la reducción del As(V) a AsH₃ y por tanto obtener la arsina a partir del estado de oxidación (III) únicamente. Estos resultados confirman los obtenidos por hidruros-absorción atómica y demuestran que no es un problema de cinética lenta sino que la reacción en ese medio, a partir de As(V) no está termodinámicamente favorecida. La determinación diferenciada de As(III) y As(V) puede realizarse por tanto, en este medio de generación.

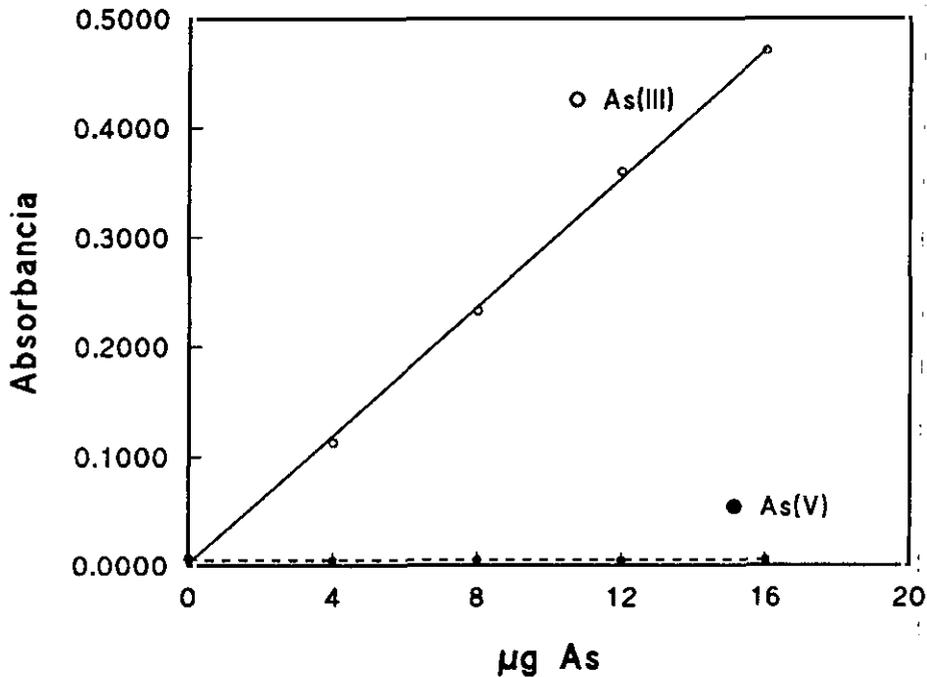


Figura V.9.- Calibrados para As(III) y As(V) en medio cítrico/citrato a pH 4,5 mediante espectrofotometría molecular.

Resultados similares se han obtenido en medio acético acetato pero la sensibilidad para el As(III) fue mas baja que con el regulador anterior.

En medio tartárico/tartrato a pH=4,5, la señal de As(V) desaparece totalmente. La habilidad del medio cítrico/citrato para distinguir entre As(III) y As(V) puede verse en la Figura V.9., donde se representan las curvas de calibrado obtenidas para As(III) y As(V) este medio. Análogo resultado se obtiene empleando la espectrofotometría de absorción atómica.

Estudio comparativo del efecto del pH en la especiación del As(III) y As(V) por las técnicas espectrofotometría de absorción atómica - absorción molecular.

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores por espectrofotometría de absorción molecular y espectrofotometría de absorción atómica, permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- 1.- Mientras en absorción molecular se obtiene la misma señal independientemente del estado de oxidación del elemento en un rango de concentraciones de ácido clorhídrico entre 6 y 2 M, en absorción atómica esto sólo se cumple cuando la concentración de HCl es 6M. Parece demostrarse que el proceso está regido por la cinética de reducción del hidruro a partir del As(V). En una concentración de HCl inferior a 6M, la cinética de formación del hidruro a partir de As(V) es inferior a la correspondiente a partir de As(III) y por tanto, la eficiencia de la generación del hidruro para su determinación por absorción atómica es distinta; sin embargo, la formación del hidruro es total a partir de ambos estados de oxidación como se demuestra en el método espectrofotométrico.
- 2.- Para concentraciones de ácido clorhídrico inferiores a 1M, el comportamiento es análogo en ambas técnicas.
- 3.- Si se comparan entre sí los resultados obtenidos con las disoluciones reguladoras, para ambas técnicas y para ambos grados de oxidación, se puede apreciar que en medio cítrico/citrato es posible la determinación selectiva de arsénico en estado de oxidación (III).
- 4.- La determinación diferenciada de ambos grados de oxidación puede llevarse a cabo trabajando en dos medios diferentes. Mediante espectrofotometría UV-VIS, en la acidez HCl 2-6M se determina el contenido de arsénico inorgánico total. En medio

cítrico/citrato a pH=4,5 se determina el As(III). El As(V) puede conocerse por diferencia.

Empleando la HG-AAS, en HCl 6M se determina el As total y a pH=3 en medio cítrico citrato se determina el As(III). Como en el caso anterior, el As(V) se determina por diferencia.

La ventaja de trabajar con la espectrofotometría de absorción atómica respecto a la espectrofotometría UV-VIS, radica en su mayor sensibilidad como se observa en las características analíticas que se muestran en el apartado siguiente.

V.4.2.3.- Características analíticas.

Antes de proceder a dar las características analíticas de los métodos aplicados, se detallan los criterios utilizados.

Límite de detección, L_D : según la definición de la IUPAC es la concentración mínima de analito que puede ser detectada y diferenciada del blanco con un nivel de probabilidad determinado (LONG L.C., 1983). El valor numérico del límite de detección se obtiene a partir de la ecuación:

$$L_D = \frac{Ks_b}{s}$$

siendo:

K un factor estadístico elegido de acuerdo al nivel de confianza deseado, en nuestro caso $K=3$ para un nivel de probabilidad del 99,7%.

S_b es la desviación estándar de las medidas del blanco.

s es la pendiente del calibrado.

Límite de cuantificación, L_Q : se puede definir como la concentración mínima de analito que puede ser determinada de forma cuantitativa. Se puede obtener aplicando la ecuación:

$$L_Q = \frac{Ks_b}{s}$$

siendo en este caso $K=10$

En todas las experiencias de este trabajo, para calcular tanto el L_D como el L_Q se preparan 10 disoluciones iguales, cuya concentración se corresponde con la parte más baja del calibrado, se miden sus absorbancias y se aplican los algoritmos anteriormente descritos.

Precisión: la precisión en términos de coeficiente de variación se evalúa para 10 determinaciones. En nuestro caso, se consideran tanto la zona baja como la alta del intervalo de linealidad del calibrado.

Sensibilidad: expresada como la pendiente del calibrado.

A continuación se detallan las características analíticas para ambas técnicas, Tablas V.3. y V.4.

Tabla V. 3.- Características analíticas para la determinación de arsénico mediante HG-AAS en discontinuo, generando el hidruro en medio HCl 6M.

Rango de Linealidad	0-100 ng
Límite de detección	0,5 ng
Límite de cuantificación	1,5 ng
Precisión	5% (20 ng) 3% (80 ng)

Tabla V.4.- Características analíticas para la determinación de arsénico mediante HG-Espectrometría UV-VIS.

	HCl 6M	HCl 2M	cítrico/citrato (pH=4,4)
Rango de Linealidad	0-40 µg	0-16 µg	0-16 µg
Límite de detección	0,22 µg	0,08 µg	0,22 µg
Límite de cuantificación	0,75 µg	0,26 µg	0,73 µg
Precisión	3% (20 µg)	3% (8 µg)	5% (8 µg)

V.4.3.- Desarrollo del método analítico para la determinación de arsénico total por generación de hidruros-absorción atómica, mediante el método en continuo.

V.4.3.1.- Optimización de variables para la determinación de arsénico por HG en continuo-AA.

La generación de hidruros en flujo continuo es una alternativa de la generación de hidruros, ofreciendo ventajas e inconvenientes con respecto a la modalidad en flujo discontinuo. Entre las ventajas se pueden destacar la sencillez y bajo coste del diseño, ya que sólo se necesita una bomba peristáltica que impulsa los distintos reactivos a través de los tubos de teflón; se disminuye considerablemente el volumen de reactivos con respecto al método en discontinuo; es más fácil de manipular debido al sistema de introducción continua de la muestra y como consecuencia se disminuyen los riesgos de contaminación; se obtienen señales de absorbancias continuas, lo que proporciona siempre mejor precisión, y con frecuencia, la sensibilidad es un orden de magnitud superior a los sistemas en discontinuo. Entre las desventajas se encuentra el que cuando la muestra posee una matriz compleja y densa, se puede producir la obturación de los tubos por depósitos de la matriz en el interior de los mismos, por lo que en este caso, el método en discontinuo ofrece incuestionables ventajas sobre las determinaciones en flujo continuo.

El diagrama del sistema empleado se mostró en la Figura V.2 de la presente memoria. La muestra, el medio ácido y posteriormente el borohidruro se encuentran sucesivamente, impulsadas a través del sistema por una bomba peristáltica. El hidruro formado en el bucle de reacción es conducido por un flujo portador de Ar a la célula de atomización, calentada en la llama aire-acetileno del espectrofotómetro de absorción atómica. Dentro de la célula, recibe la radiación procedente de la lámpara EDL de arsénico. La señal obtenida es continua y se registra como altura de "pico". Las variables físicas tales como

flujo de argón, velocidad de la bomba, ángulos de conexión, longitud y forma del reactor, se han optimizado para la especie As(III). Las variables químicas fundamentalmente en lo que se refiere a reductor y ácido de generación, se han optimizado para las especies As(III) y As(V). El encontrar condiciones que, como en el caso en discontinuo, proporcionara la misma eficiencia de generación a partir de ambos grados de oxidación, daría lugar a poder determinar el contenido de arsénico total sin necesidad de reducción previa. En sentido contrario, la posibilidad de encontrar un medio donde se genere selectivamente el hidruro de As(III), permite abordar la determinación diferenciada de estas especies en las condiciones óptimas. Así mismo, se ha realizado un estudio exhaustivo de interferencias y su minimización.

Optimización de parámetros físicos

Flujo de argón: El flujo de argón utilizado para transportar la arsina desde el separador de fases hasta la célula de atomización, es un parámetro que requiere un control riguroso ya que influye de forma muy acusada en las señales obtenidas.

El estudio se realizó con dos concentraciones de As(III) de 50 y 100 $\mu\text{g l}^{-1}$, generando el hidruro en medio HCl 6M con NaBH₄ al 3% (p/v), variando el flujo de gas en un intervalo comprendido entre 5 y 70 l/h. Los resultados obtenidos pueden verse en la Figura V.10.

Como puede verse en dicha figura, la señal analítica decrece a medida que se aumenta el flujo del gas de arrastre probablemente debido a la dilución del mismo en el flujo de argón. Para flujos inferiores a 5 l/h la proporción de hidrógeno generado por la reducción del medio con NaBH₄ aumenta extraordinariamente con respecto al argón, lo que a veces conduce a que se produzca, una llama en el interior de la célula que hace además, aumentar extraordinariamente la irreproducibilidad.

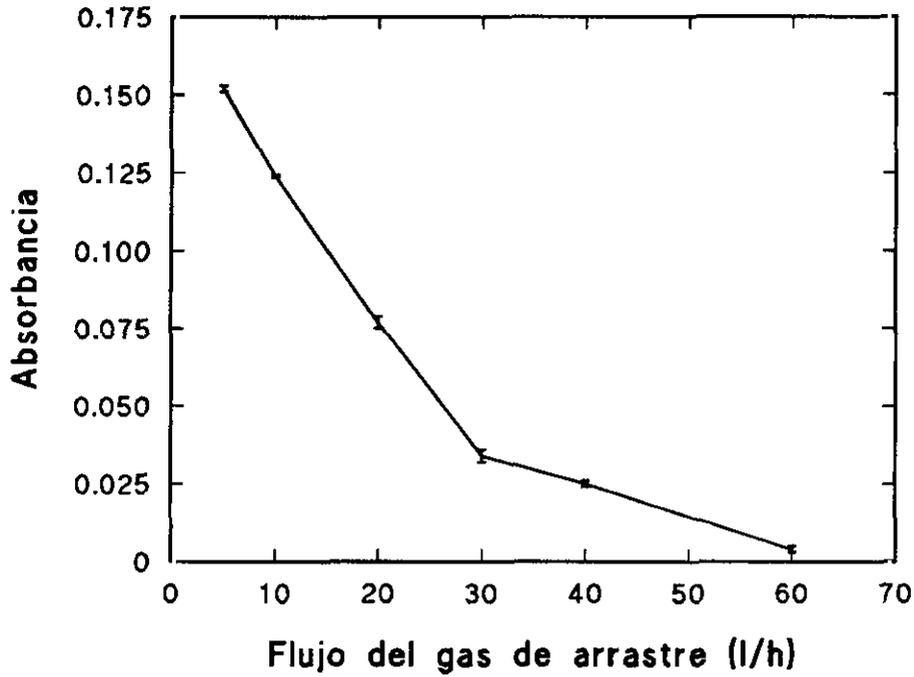


Figura V.10.- Influencia del flujo de argón para una concentración de 100 $\mu\text{g/l}$.

Se ha elegido como flujo óptimo de trabajo el más bajo posible: 5 l/h, que equivale a 83 ml/min.

Influencia de la velocidad de la bomba: La bomba impulsa simultáneamente las disoluciones de la muestra, del medio ácido y del borohidruro sódico por lo que para estudiar la influencia de este parámetro, se fijó una concentración de arsénico (III) de 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ y se generó el hidruro variando el diámetro de los tubos y la velocidad de la bomba peristáltica desde 400 hasta 900 rph, que se corresponde con unos flujos comprendidos entre 0.7 y 1,7 ml/min. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura V.11.

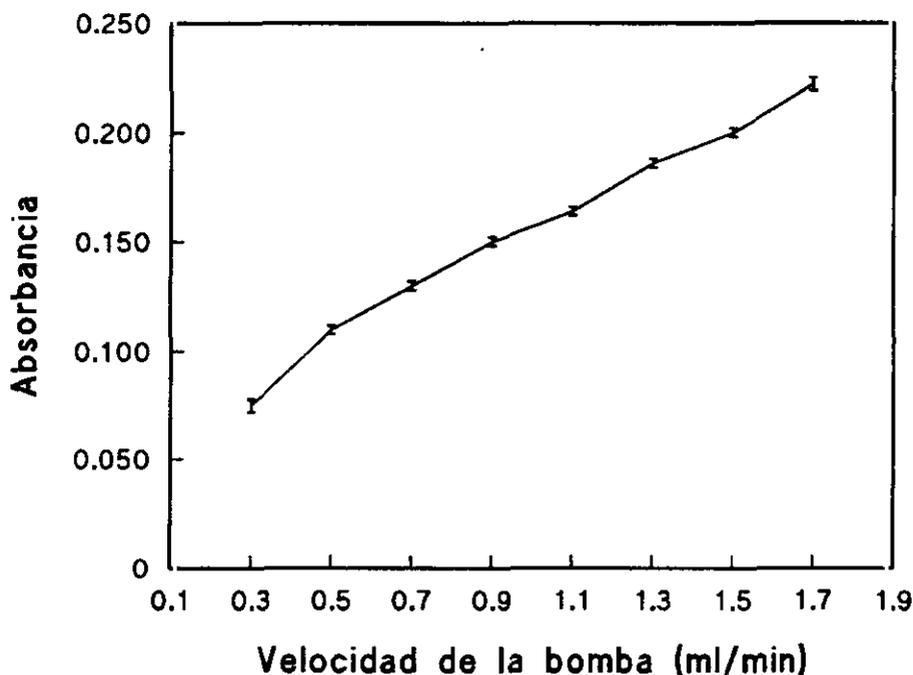


Figura V.11.- Influencia de la velocidad de la bomba peristáltica en la generación de la arsina para $100 \mu\text{g l}^{-1}$.

Como puede observarse, al aumentar la velocidad de la bomba aumenta la señal obtenida. Se ha elegido como velocidad de trabajo 700 rph que equivale a un flujo de 1.3 ml/min ya que la sensibilidad es aceptable y se obtiene la mejor reproducibilidad, sin embargo, este aumento de señal no parece ser achacable a una mayor eficiencia de la generación sino a un mayor aporte de la muestra al sistema, ya que se obtiene una línea próxima a un calibrado. Se utilizaron tubos de $0,6 \text{ cc m}^{-1}$ para establecer los tres flujos (muestra, ácido y borohidruro sódico).

Conexiones en T: como puede verse en la Figura V.2, se necesitan dos conexiones de este tipo, muestra-ácido y muestra acidificada-borohidruro sódico, por lo que se estudiaron dos posibles uniones:

- en ángulos de 90°
- en ángulos de 120°

No se han encontrado grandes diferencias, aunque se han obtenido resultados ligeramente mejores cuando las conexiones en T estaban hechas en ángulos de 90° , por lo que elegimos este tipo de conexiones.

Longitud y forma del reactor: Una vez fijados los parámetros optimizados hasta ahora, se procedió al estudio de la longitud del reactor así como de la forma en la que se encuentre, es decir, sin nudos, con nudos y con vueltas.

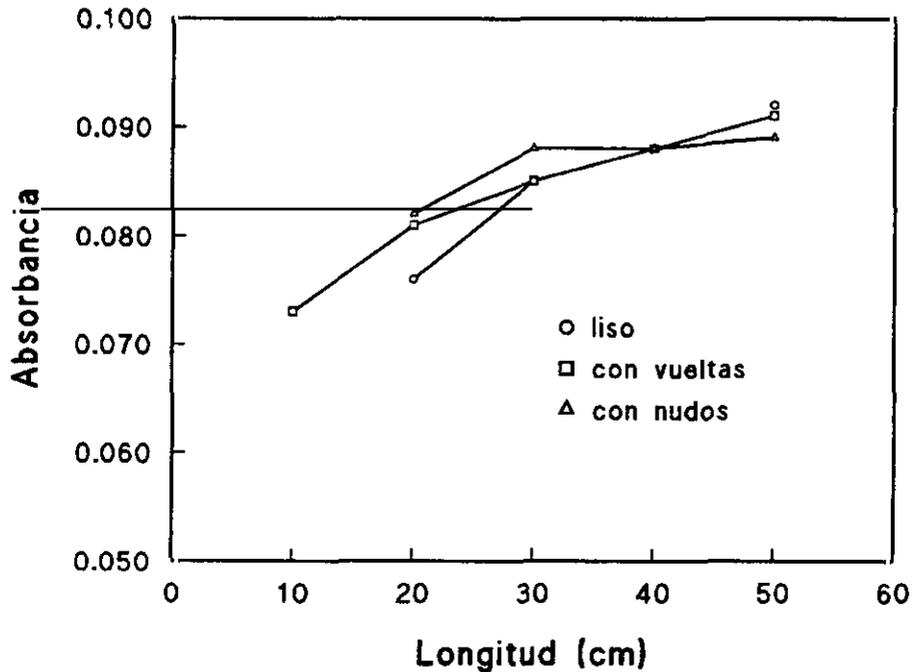


Figura V.12.- Estudio de la influencia de la longitud y forma del reactor.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura V.12, donde puede comprobarse que las diferencias en absorbancias proceden fundamentalmente de la longitud del reactor y no de la forma en que este se encuentre. Se ha elegido como reactor trabajo el de 50 cm con nudos.

Optimización de parámetros químicos.

Los parámetros químicos que influyen en la generación del hidruro empleando el método en continuo son: la concentración de reductor (NaBH_4) y la concentración de medio ácido.

Influencia de la concentración de NaBH_4 : La influencia de la concentración de borohidruro sódico se llevó a cabo para dos concentraciones diferentes de 40 y 80 $\mu\text{g l}^{-1}$ tanto de As(III) como de As(V) en medio HCl 6M (óptimo para la generación en el método en discontinuo para ambos grados de oxidación). De esta manera puede verse si es posible trabajar con menores concentraciones de reductor manteniéndose la misma eficiencia de generación del hidruro a partir de los dos estados de oxidación. El intervalo de concentración de NaBH_4 ensayado fue de 0,1-3% (p/v) y los resultados obtenidos se muestran en la Figura V.13. para la concentración de trabajo de 80 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Como puede observarse, para un intervalo de concentración de reductor del 0.1-0,25 %, no se obtiene señal analítica para el arsénico (V). Este hecho, nos hizo pensar en la posible diferenciación de estos dos estados de oxidación, en función de la concentración de NaBH_4 utilizada para la generación de la arsina. Se prepararon distintas mezclas de As(III) y de As(V) en disolución, con una misma concentración final de arsénico total, pero ante la falta de reproducibilidad de resultados, se abandonó la idea.

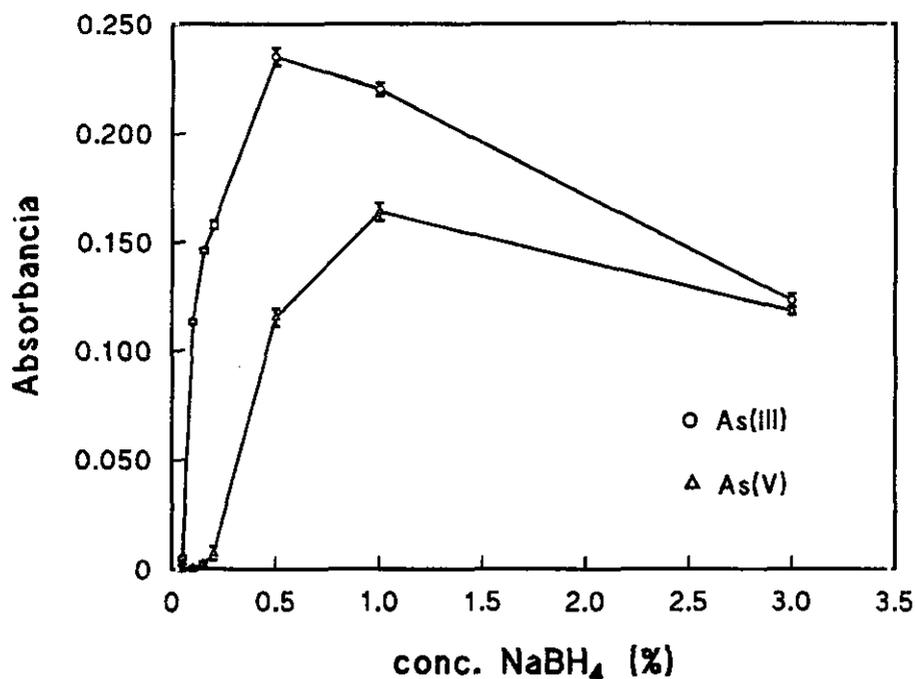


Figura V.13.- Efecto de la concentración de NaBH₄ en la determinación de arsénico mediante el método en continuo para una concentración de As(III) y (V) de 80 ng ml⁻¹.

Influencia de la concentración de ácido clorhídrico: Comprobadas ya con el método de la generación de hidruros en discontinuo, las prestaciones que presenta el HCl frente al resto de los posibles ácidos inorgánicos (HNO₃, H₂SO₄ y H₃PO₄), el estudio se ha centrado en conocer la influencia de la concentración de HCl en estas condiciones. Dicho estudio se ha realizado en el intervalo 1-6 M para ambos grados de oxidación.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura V.14. para una concentración de 60 µg l⁻¹ en ambas especies. En dicha figura se puede ver que, en el intervalo comprendido entre 2-6 M, la eficiencia de generación es la misma para el As(III) y As(V). Este resultado difiere un poco del comportamiento observado cuando se utiliza el método en discontinuo (ver gráfica V.4.), ya que el intervalo de acidez es más amplio. Este hecho podría justificarse desde el punto de vista cinético porque cuando se trabaja en continuo

el tiempo de contacto de reactivos y muestra es algo mayor, hecho que también se refleja cuando se utiliza el método espectrofotométrico, es decir, el método absorción molecular. Este hecho es también importante ya que permite trabajar en condiciones menos críticas en cuanto al control de la acidez que el método en discontinuo y como posteriormente se verá en el método FIA.

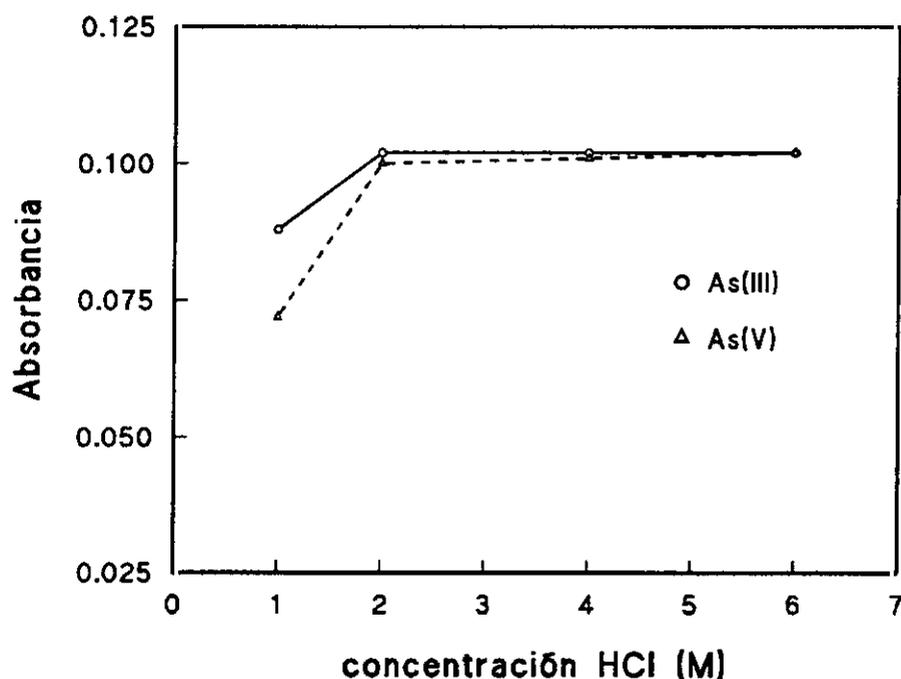


Figura V.14.- Eficiencia de generación de la arsina en función de la concentración de HCl utilizado como medio de generación de $60 \mu\text{g l}^{-1}$ de As(III) y As(V).

Medio regulador cítrico-citrato: Para optimizar el pH del regulador cítrico/citrato en la generación de los hidruros de As(III) y As(V) se ha trabajado con una concentración de regulador del 40% (p/v) en el intervalo de pH 2-4. La Figura V.15, muestra los resultados obtenidos para ambos grados de oxidación. El tampón a pH=3 inhibe la formación del hidruro a partir de As(V) mientras que se obtiene una señal aceptable a partir de

As(III). Esto permite, como en el caso en discontinuo, la determinación diferenciada de As(III) y por tanto la posibilidad de abordar el problema de la especiación con control de la acidez.

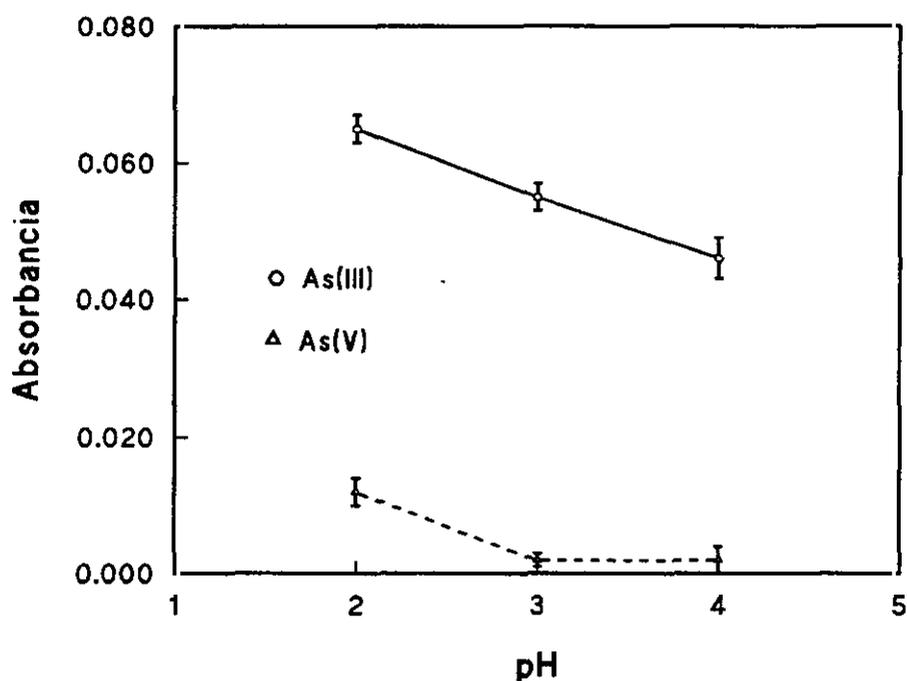


Figura V.15.- Generación de la arsina a partir de $60 \mu\text{g l}^{-1}$ de As(III) y de As(V), en medio cítrico-citrato a distintos pH.

Curvas de calibrado

Se han realizado curvas de calibrado para As(III) y As(V) en aquellos medios de generación de la arsina en los que se obtienen señales de absorbancia iguales (HCl 6M) y señales completamente diferentes (cítrico/citrato a pH=3), (Figura V.4.). Como puede verse, se obtienen curvas de calibrado de coeficientes de correlación de 0,999 para As(III) y As(V) en el medio ácido fuerte. Sin embargo cuando se trabaja en el medio

tamponado a pH=3 sólo se genera la arsina a partir del As(III) mientras que, como era de esperar, la respuesta del As(V) a todas las concentraciones dentro del intervalo de calibración, es prácticamente nula.

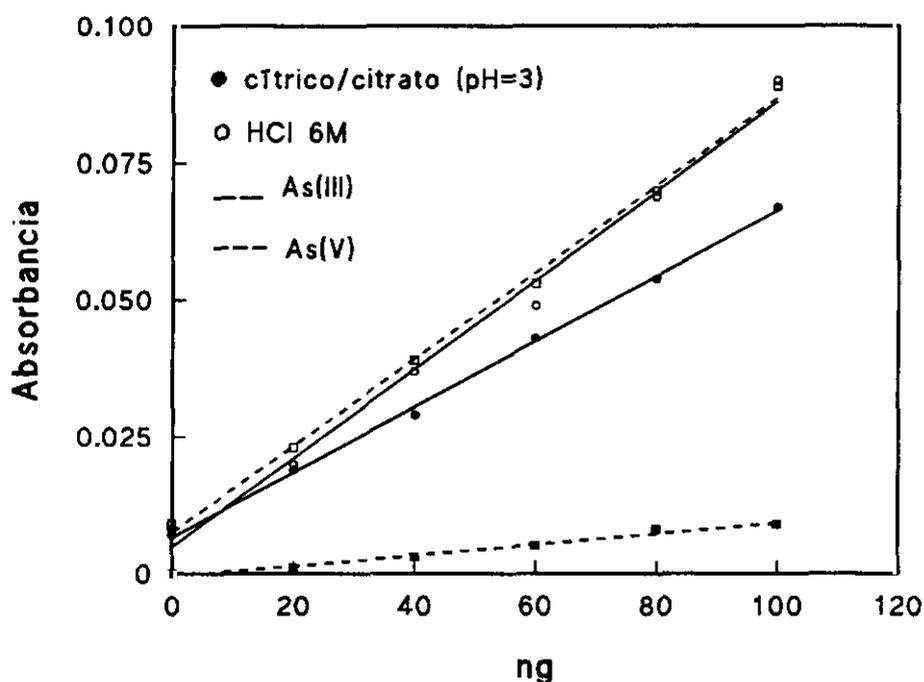


Figura V.16.- Calibrados de As(III) y As(V) en HCl 6M y citrico/citrato pH=3, como medios de generación de la arsina.

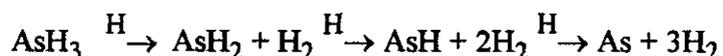
V.4.3.2.- Estudio de interferencias.

Los mecanismos por los cuales se producen las interferencias en HG-AAS son todavía muy discutidos. De hecho, parece ser que pequeñas diferencias en las condiciones experimentales pueden condicionar de forma significativa los mecanismos de atomización, la sensibilidad, así como las interferencias observadas.

Las interferencias se pueden agrupar en dos grandes bloques dependiendo de dónde afecten:

- a) Interferencias que tienen lugar en la fase gaseosa, en cuyo caso la interferencia se debe a las formas volátiles del interferente (DEDINA J., 1982).
- b) Interferencias químicas que tienen lugar en la disolución, durante la formación del hidruro (DITTRICH K., 1979; MEYER A., 1979).

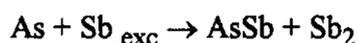
Considerando las interferencias en fase gaseosa, algunos autores justifican la depresión que se produce en la señal de absorción (WELZ B., 1983; DEDINA J., 1980) y proponen el siguiente mecanismo para la atomización en células de cuarzo:



Los radicales H requeridos se producen en la célula caliente por reacción del oxígeno residual del argón (gas de arrastre) con el exceso de hidrógeno formado en la reacción del borohidruro sódico. También debido a la elevada temperatura que se alcanza en la célula de atomización (900°C) puede haber reacción entre los grupos silanol (Si-OH) de

la superficie de la célula y el hidrógeno, produciéndose la liberación de radicales H. Cuando la muestra contiene otros elementos formadores de hidruros, los radicales H se consumen preferentemente por esos elementos y como consecuencia, la sensibilidad para el arsénico disminuye.

Dittrich y Mandry proponen otro mecanismo de interferencias basado en la formación de moléculas diatómicas estables entre el arsénico elemental y el elemento en exceso, cuyo hidruro se ha descompuesto en la llama (DITTRICH K., 1986). Así, para el caso de la interferencia producida por el Sb sería:



Este tipo de interferencias se produce cuando la atomización se lleva a cabo en células que se calientan externamente; ahora bien, la magnitud de estas interacciones entre los distintos elementos formadores de hidruros, difiere considerablemente dependiendo de los autores. DITTRICH K. y colaboradores, 1986, encuentran que la interferencia del Sb en la determinación de As empleando un tubo de cuarzo como atomizador es del 10% para una relación As:Sb de 1:1000. NARASAKI e IKEDA, 1984, afirman que puede tolerarse un exceso de antimonio de 500 veces en la determinación de arsénico, no siendo necesario el empleo de agentes enmascarantes. PETRICK y KRIVAN, 1987, encuentran que la presencia de 1000 µg de Sb y 100 µg de Se, 100 µg de Sn ó 100 µg de Bi eliminan totalmente la señal de absorbancia de 50 ng/10ml de As(V) teniendo además el Sn interferente, un efecto de memoria.

Las diferencias observadas en la magnitud de las interferencias, pueden ser atribuidas a los diferentes procedimientos empleados en la generación, así como al diseño y temperatura de los distintos atomizadores.

Las interferencias que tienen lugar en la fase líquida, proceden fundamentalmente de metales de transición capaces de reducirse con NaBH_4 dando precipitados metálicos o amalgamas metálicas con el analito (NAKAHARA T., 1983). Estas interferencias se han puesto de manifiesto por numerosos autores pero su magnitud, al igual que ocurre en las interferencias en fase gaseosa, depende extraordinariamente de las condiciones experimentales empleadas y de los diseños de los dispositivos. Sin embargo, diferentes autores parecen coincidir en que es la masa absoluta de interferente más que la relación analito:interferente la que determina la supresión de la señal. Las interferencias se minimizan por adición de agentes complejantes enmascarantes (BOAMPONG C., 1988) o seleccionando apropiadas combinaciones entre el medio ácido y el reductor borohidruro (HERSHEY I.W., 1986).

Con estos antecedentes se ha realizado un estudio de interferencias en las condiciones analíticas optimizadas en este trabajo. Se han incluido elementos formadores de hidruros, así como elementos que frecuentemente están en distintos tipos de muestras, tales como metales de transición: Fe, Ni, Cu, Zn, Mg, Pd; metales alcalinos y alcalinotérreos: Na, K, Ca, Mg y aniones como: Cl^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} .

Para llevar a cabo este estudio se fijó una cantidad de $60 \mu\text{g/l}$ de arsénico y se le adicionaron cantidades de interferente en distintas proporciones, preparando todas las disoluciones en medio acuoso. A continuación se procedió a generar el hidruro en medio HCl 6M y a registrar las señales obtenidas, comparándolas siempre con una disolución de referencia. Los resultados obtenidos para As(III) se muestran en las Figuras V.17, V.18, V.19, V.20, y se recogen en la Tabla V.5; los resultados obtenidos para las interferencias sobre As(V) se recogen en la Tabla V.6 y en la Figura V.21.

Estudio de interferencias sobre As(III).

Tabla V.5.- Estudio de interferencias. % de señal respecto a una disolución de As(III) de 60 µg/l.

Interferente	Relación arsénico: interferente				
	1:1	1:2	1:10	1:100	1:1000
Sb(III)	85	75	40	15	0
Se(IV)	85	75	45	30	5
Pb(IV)	100	100	100	100	95
Hg(II)	100	97	80	75	70
Sn(IV)	100	95	90	75	40
Ni(II)	100	100	88	75	50
Pd(II)	100	100	0	-	-

**** Otros metales ensayados y que no interfieren hasta una proporción 1:1000**Metales de transición: **Fe, Cu, Zn, Mn.****** Cationes ensayados que no interfieren hasta una proporción 1:10000**Metales alcalinos y alcalinotérreos: **Na, K, Ca, Mg.****** Aniones ensayados y que no interfieren hasta una proporción 1:10000****Cl⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻**

Cabe resaltar de estos estudios, que las interferencias observadas para el estaño y para el paladio, se deben a que se deposita en el sistema el elemento en estado metálico como consecuencia de la reducción con el borohidruro, siendo mas visible dicho efecto en el caso del estaño ya que se oscurecen los tubos.

Aparte de estos dos elementos, y de forma general se puede destacar que, como era de esperar, las mayores interferencias se deben a elementos formadores de hidruros, sobre todo al Sb(III) y al Se(IV), debido a que ambos elementos generan su hidruro correspondiente en condiciones analíticas semejantes al arsénico, por lo que es lógico que compitan para reaccionar con el borohidruro sódico. Debido a la importancia de la interferencia de estos dos elementos, se profundiza a continuación en su estudio. Sin embargo cuanto más difieren las condiciones de generación de elementos también formadores de hidruros, la interferencia que producen en la generación de la arsina es menor, como puede observarse en los datos obtenidos para el plomo ya que necesita medios fuertemente oxidantes y concentraciones de reductor del 10% (p/v).

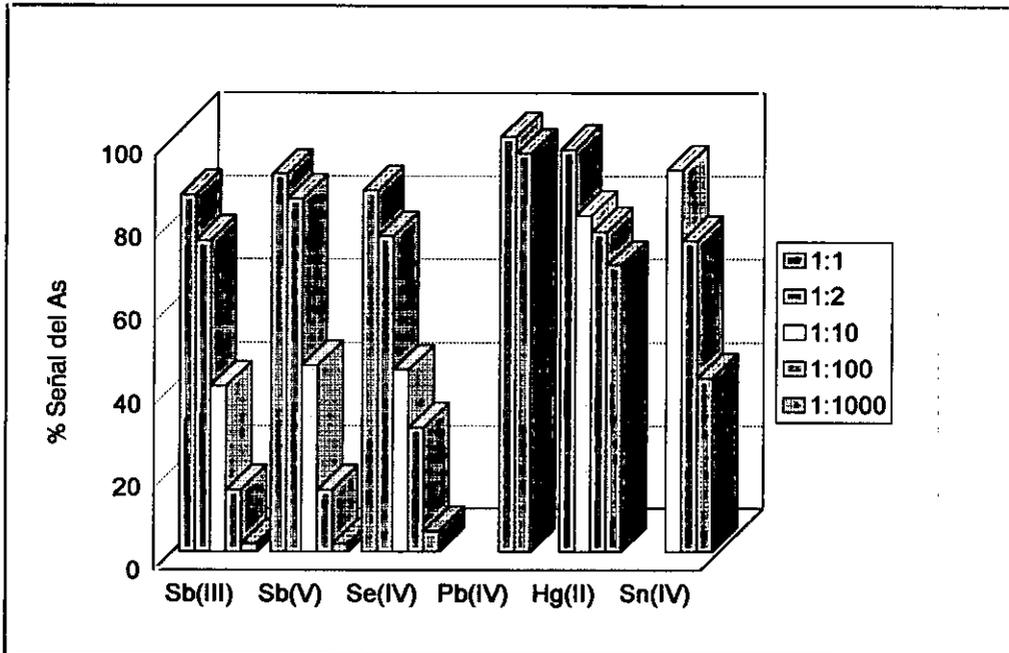


Figura V.17.- Interferencias, en flujo continuo, de elementos formadores de hidruros en medio HCl 6M sobre una disolución de As(III) de $60 \mu\text{g l}^{-1}$.

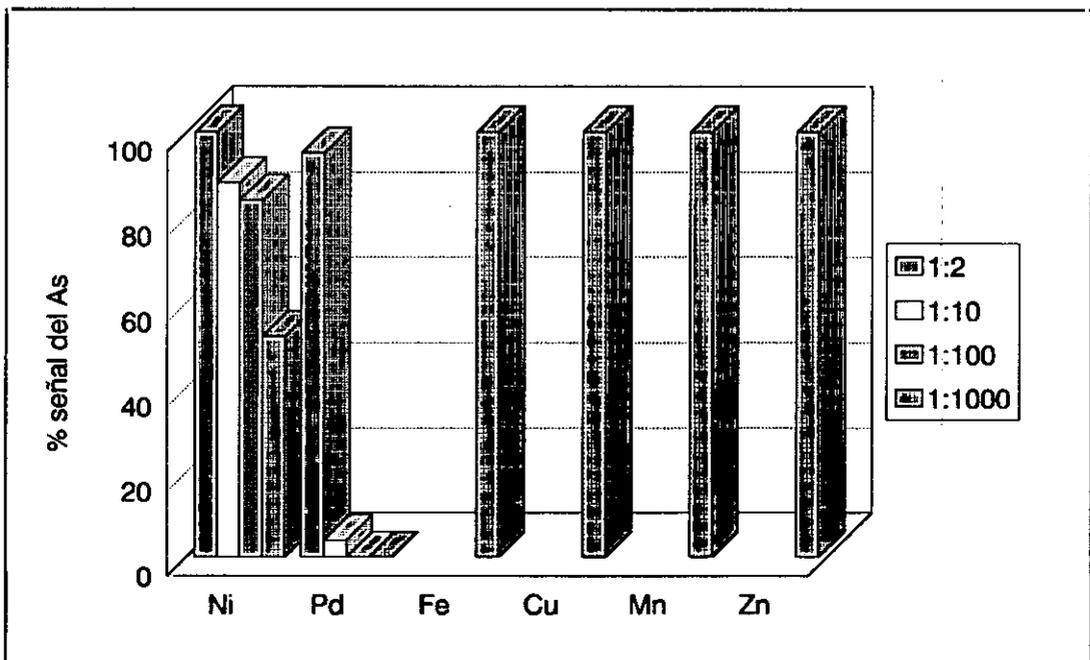


Figura V.18.- Interferencias debidas a metales de transición, sobre una disolución de $60 \mu\text{g l}^{-1}$ de As(III), generando la arsina en HCl 6M.

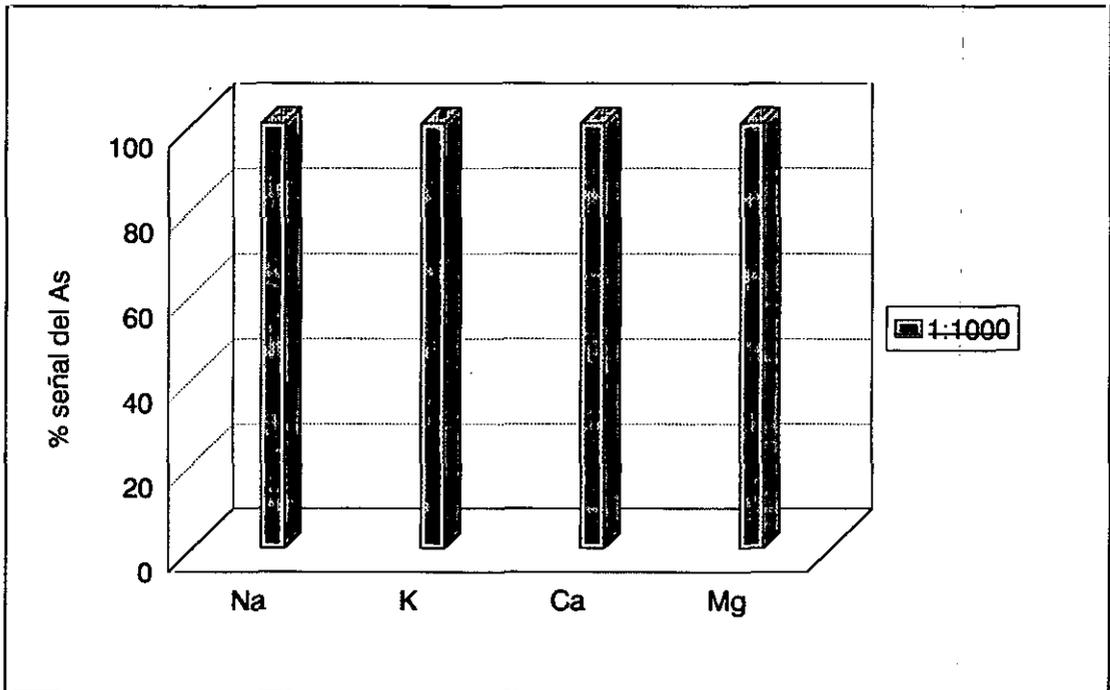


Figura V.19.- Interferencias de metales alcalinos y alcalinotérreos sobre una disolución de 60 ng ml^{-1} de As(III), en medio HCl 6M.

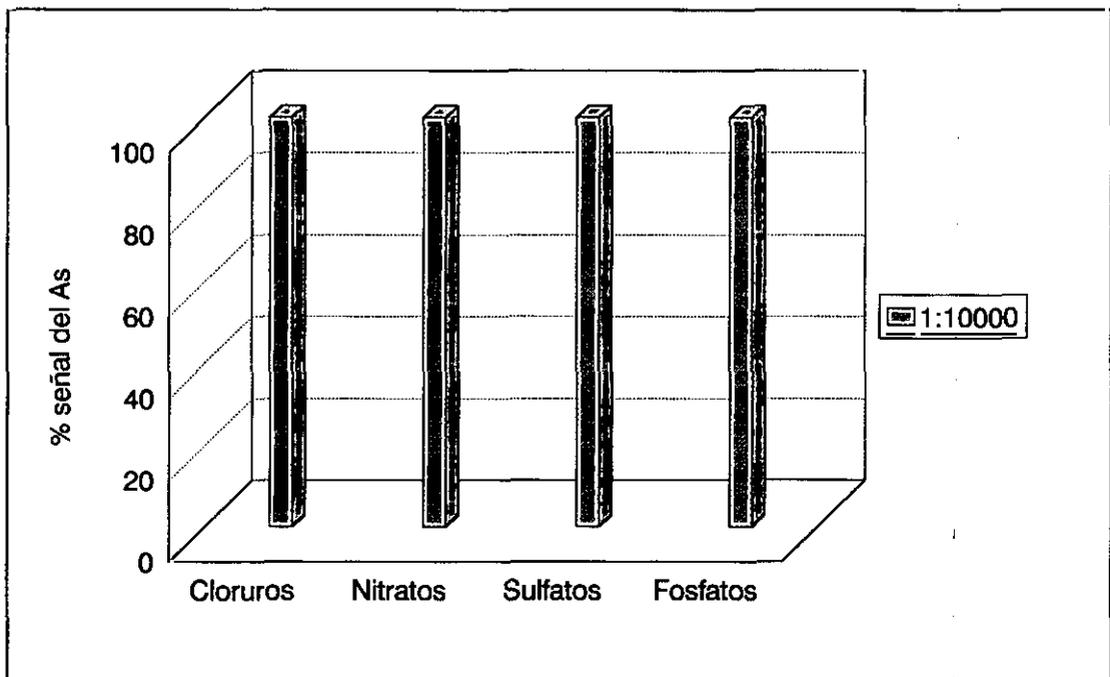


Figura V-20.- Interferencias de aniones, sobre una disolución de As(III) 60 ng ml^{-1} utilizando como medio de generación HCl 6M.

Estudio de interferencias sobre As(V).

En primer lugar se ensayaron como posibles interferentes de As(V), aquellas especies que causaron interferencia para As(III) utilizando como medio de generación HCl 6M. Para ello se utiliza una disolución de As(V) de 60 µg/l. Los resultados se recogen en la tabla V.6 y en la Figura V.21.

Tabla V.6.- Estudio de interferencias. % de señal respecto a una disolución de As(V) de 60 µg/l.

Interferente	Relación arsénico:interferente			
	1:1	1:2	1:10	1:100
Sb(III)	90	75	40	5
Sb(V)	90	80	50	15
Se(IV)	95	85	40	10
Hg(II)	100	97	95	95
Ni(II)	100	100	90	90
Pd(II)	100	100	75	-

Como puede observarse, el Sb produce análogos efectos sobre los dos estados de oxidación cuando se genera el hidruro en medio HCl 6M. Sin embargo el Hg(II) que interfiere sobre el As(III) a partir de una proporción, arsénico:interferente, 1:10, produce interferencia sobre el As(V), a partir de una relación 1:100. En el caso del Pd(II), se observa que interfiere en la misma proporción para ambos estados de oxidación de As, pero su magnitud es menor sobre As(V) ya que para éste se anula la señal analítica cuando la proporción es 1:100. También se ha observado que el efecto interferente del Ni(II) sobre As(V) es menor que sobre As(III).

Estudio de interferencias sobre As(III) utilizando como medio de generación de la arsina un amortiguador cítrico/citrato de pH=3.

Por otra parte , se realiza un estudio para observar el efecto de los distintos interferentes sobre 60 µg/l de As(III), generando su hidruro en medio cítrico citrato de pH=3 y cuyos resultados se recogen en la tabla V.7 y en la Figura V.22.

Tabla V.7.- Estudio de interferencias. % de señal respecto a una disolución de As(III) de 60 µg/l, utilizando como medio de generación de la arsina una disolución amortiguadora de cítrico/citrato pH=3.

Interferente	Relación arsénico:interferente		
	1:2	1:10	1:100
Sb(III)	95	95	75
Sb(V)	100	95	90
Se(IV)	100	95	95
Hg(II)	100	100	100
Ni(II)	100	100	100
Pd(II)	25	-	-

En este estudio se observa en general una disminución de las interferencias debidas a elementos formadores de hidruros cuando se genera la arsina en medio tamponado a pH=3. Entre los resultados obtenidos resaltar que el Sb(III) no produce interferencia hasta una proporción As:Sb de 1:100. Otro hecho observado es la disminución del efecto interferente del Pd(II), aunque la magnitud de la interferencia observada es muy elevada.

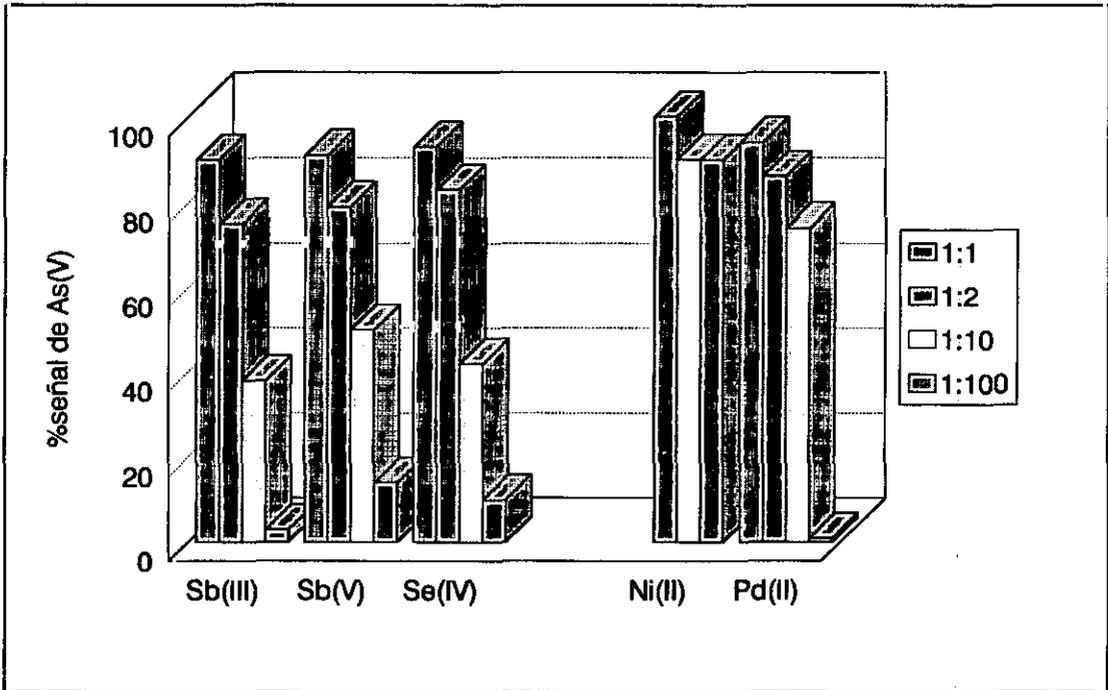


Figura V.21.- Interferencias sobre una disolución de $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ de As(V) generando el hidruro en medio HCl 6M.

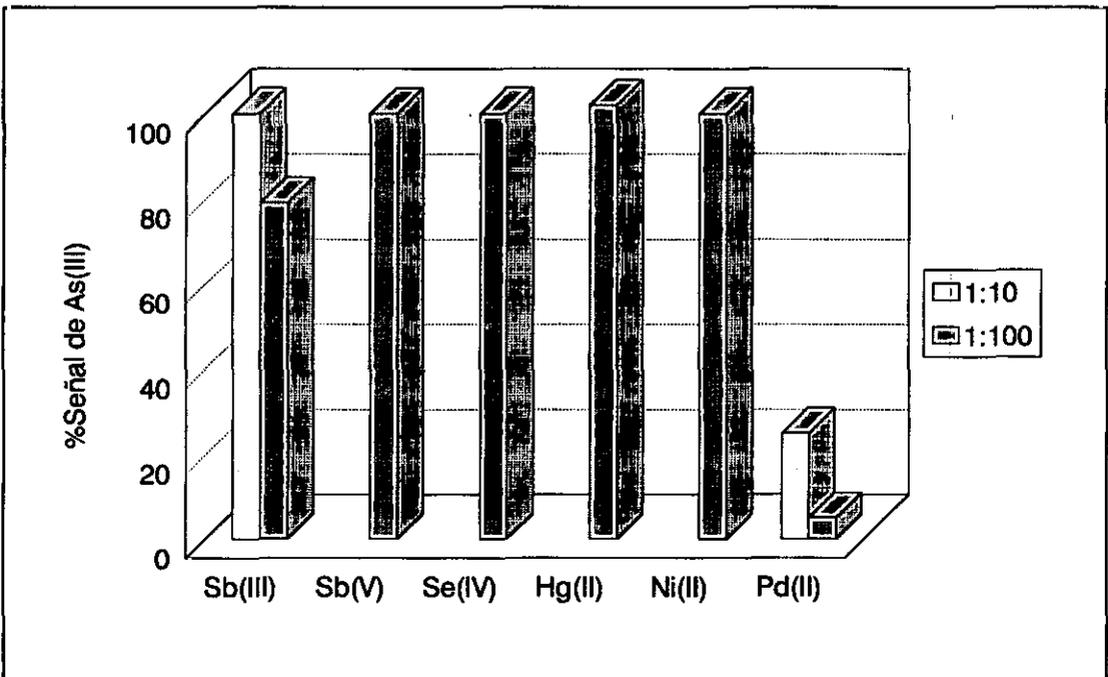


Figura V.22.- Interferencias sobre una disolución de $60 \mu\text{g l}^{-1}$ de As(III) generando la arsina en medio cítrico citrato de pH=3

V.4.3.3.- Minimización de las interferencias debidas al Sb Y Se en la generación de arsina: empleo de las mezclas KI- α -hidroxiácidos.

En la bibliografía se encuentran marcadas diferencias en cuanto a la magnitud de las interferencias que ejercen el Sb y el Se en la señal del hidruro de arsénico. Las divergencias encontradas pueden atribuirse a las diferencias en los procedimientos de generación, tales como diseño y temperatura de los atomizadores, o quizás, a las diferencias en el abastecimiento de oxígeno en esos atomizadores (DITTRICH K., 1986; NARASAKI H, 1984; PETRICK K.,1987). Ahora bien, conviene destacar que, aunque no coinciden en magnitud, la mayoría de los autores coinciden en las especies interferentes. Debido a esto, se han realizado distintos estudios para eliminar dichas interferencias (IKEDA M., 1985).

En estudios preliminares se observó que cuando se añadían α -hidroxiácidos (ácido láctico, ácido cítrico y ácido málico) a una disolución de Sb(V) no se obtenía señal Figura V.23., mientras que si se adicionaba a una disolución de Sb(III), la señal no se inhibía. Se pensó entonces que si sobre la disolución de Sb(V) se añadía una mezcla de KI/ α -hidroxiácido, se podría obtener respuesta ya que el KI reduce al Sb(V) a Sb(III). Sin embargo los resultados fueron negativos. En vista de este hecho, se procedió a añadir las mismas mezclas, sobre una disolución de Sb(III), Figura V.24.

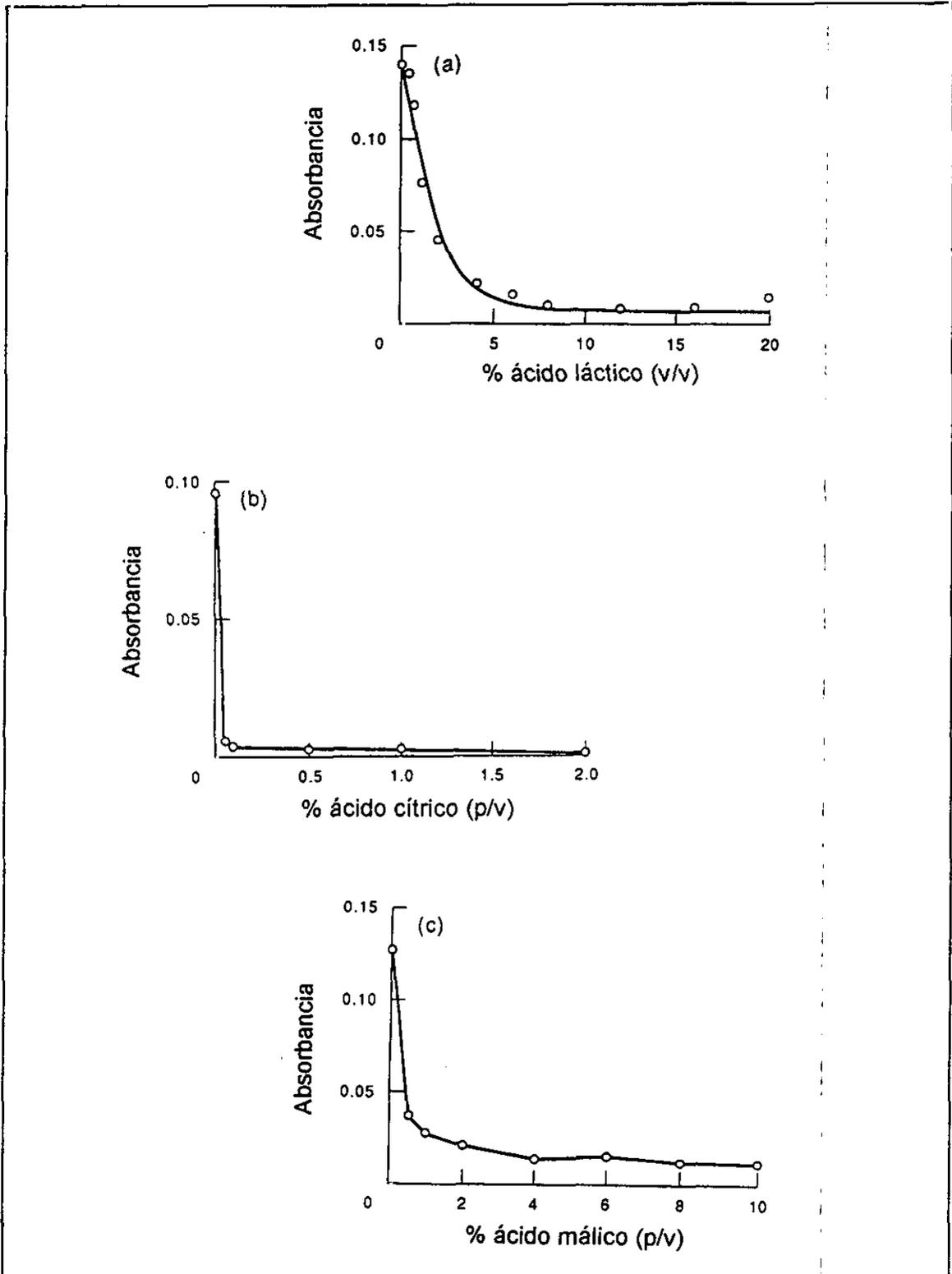


Figura V.23.- Efecto de α -hidroxiácidos sobre la señal de absorbancia de $80 \mu\text{g l}^{-1}$ de Sb(V) : a) ácido láctico; b) ácido cítrico; c) ácido málico.

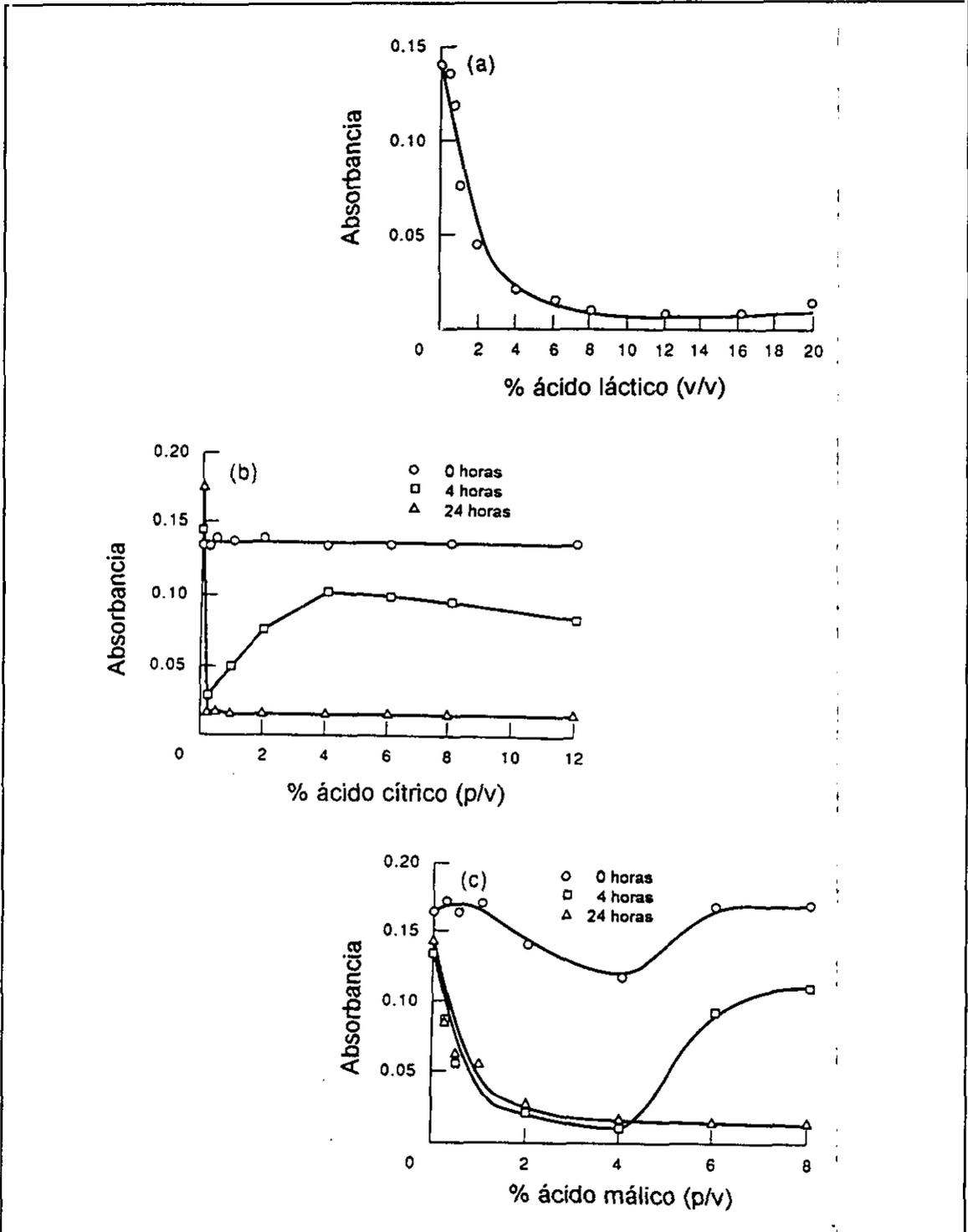


Figura V.24.- Influencia de la concentración de los α -hidroxiácidos en la generación de la estibina, a partir de una disolución de Sb(III) de $80 \mu\text{g l}^{-1}$: a) ácido láctico; b) ácido cítrico; c) ácido málico (todas las disoluciones al 0,5% en KI p/v).

Como puede verse, en el medio ácido láctico la absorbancia de la estibina es despreciable a concentraciones por encima del 6 % (v/v) porque la reacción involucrada es inmediata (el efecto es ya observable en medidas realizadas inmediatamente después que la disolución se ha preparado). En los medios del ácido cítrico y del ácido málico, la absorbancia de la estibina decrece gradualmente y se hace despreciable sólo después que han transcurrido 24 horas de haber preparado la disolución, mientras que no se observa el efecto depresor cuando las medidas se llevan a cabo inmediatamente después de la preparación. Después de 24 horas, la señal se hace mínima en concentraciones por encima de 0,5 % (m/v) de ácido cítrico y 6 % (m/v) de ácido málico. Estos resultados sugieren que los tres α -hidroxiácidos dan lugar al mismo efecto pero a diferentes velocidades siendo mas lento para el ácido cítrico y málico que para el ácido láctico. Así pues, desde el punto de vista de poder evitar la interferencia del Sb(III) o Sb(V) en la señal del As(III), el ácido láctico proporcionaba las mejores condiciones de resolución de la señal de forma instantánea.

Evaluación del efecto de los α -hidroxiácidos en la generación de la arsina.

Considerando el comportamiento de las especies de antimonio, se comprobó el comportamiento de las especies inorgánicas de arsénico frente a las mezclas KI/ α -hidroxiácidos.

Para llevar a cabo estos estudios se procedió a la preparación de tres disoluciones:

As(III)

As(III) + KI (0.5% (p/v)) + ácido láctico (6% (v/v))

As(III) + KI (0.5% (p/v)) + ácido cítrico (2% (p/v))

En todos los casos se estudiaron tres niveles de concentración distintos, 20, 60 y 140 $\mu\text{g l}^{-1}$, para comprobar así que se mantiene el efecto en todo el rango de concentración. A continuación se genera la arsina en acidez HCl entre 1-6 M.

El efecto del ácido málico no se estudió debido a su baja cinética de reacción y a su similitud con el ácido láctico. Los resultados obtenidos mostraron que para las diferentes concentraciones ensayadas y en los diferentes medios, las señales de absorbancia obtenidas eran análogas a las de las disoluciones acuosas de As(III), por lo que se podría concluir que estos medios no previenen la generación de la arsina. Esto puede ser bien porque el arsénico no da la misma reacción que el Sb o bien, porque el complejo formado es lo suficientemente débil como para ser destruido bajo las condiciones empleadas para la generación de la arsina.

Con estos resultados, se procedió a estudiar la interferencia específica producida por el Sb en la señal del As y posteriormente, evaluar hasta qué punto la interferencia puede minimizarse en presencia de KI/ácido láctico ya que fue el α -hidroxiácido que mejores condiciones aportó para el fin perseguido.

Un estudio paralelo realizado con el Se(IV) y su comportamiento en presencia de los hidroxiácidos, mostró que respondía de forma similar al Sb(III). Debido a que el Sb y el Se son los principales interferentes, también se ha contemplado el alcance de la interferencia producida por el Se y su posible minimización en presencia de los α -hidroxiácidos. En las condiciones establecidas para el Sb y Se se han ensayado, así mismo, las interferencias producidas por el Sn, Bi y Te.

Estudio de las interferencias de Sb y de Se en la determinación de As.

Para estudiar las interferencias producidas por el Sb y Se en la generación de la arsina se prepararon disoluciones con distintas proporciones As:interferente, en tres niveles de concentración (20, 60 y 140 $\mu\text{g l}^{-1}$) y se midieron dichas disoluciones en medio HCl 6M y HCl 1M. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla V.8. y en las Figuras V.25 y V.26.

Tabla V.8.- Eficiencia de generación de la arsina, en % de señal respecto a una disolución de As(III), preparando las disoluciones en medio acuoso y medio ácido láctico siendo el ácido de generación HCl 1M y HCl 6M.

Interferente	As:interferente	As(III) (ng ml ⁻¹)	HCl 1M		HCl 6M		
			Disol. acuosa	Disol. ác. láctico	Disol. acuosa	Disol. ác. láctico	
Sb	1:1	20	100	100	100	100	
		60	82	100	86	100	
		140	80	100	81	100	
	1:10	20	70	100	66	100	
		60	56	100	40	70	
		140	37	100	36	56	
	1:100	20	20	20	15	15	
		60	20	20	15	15	
		140	20	20	15	15	
Se	1:10	20	100	100	88	100	
		60	100	100	44	100	
		140	100	100	36	100	
	1:100	20	100	100	31	72	
		60	100	100	30	66	
		140	100	100	20	63	
	1:1000	140	73	63	0	0	
	As:Se:Sb	1:1:10	140	39	100	37	100
	Sn	1:100	20	100	100	100	100
140			75	65	81	56	
Bi	1:1000	140	100	100	80	80	
Te	1:100	140	0	0	0	0	

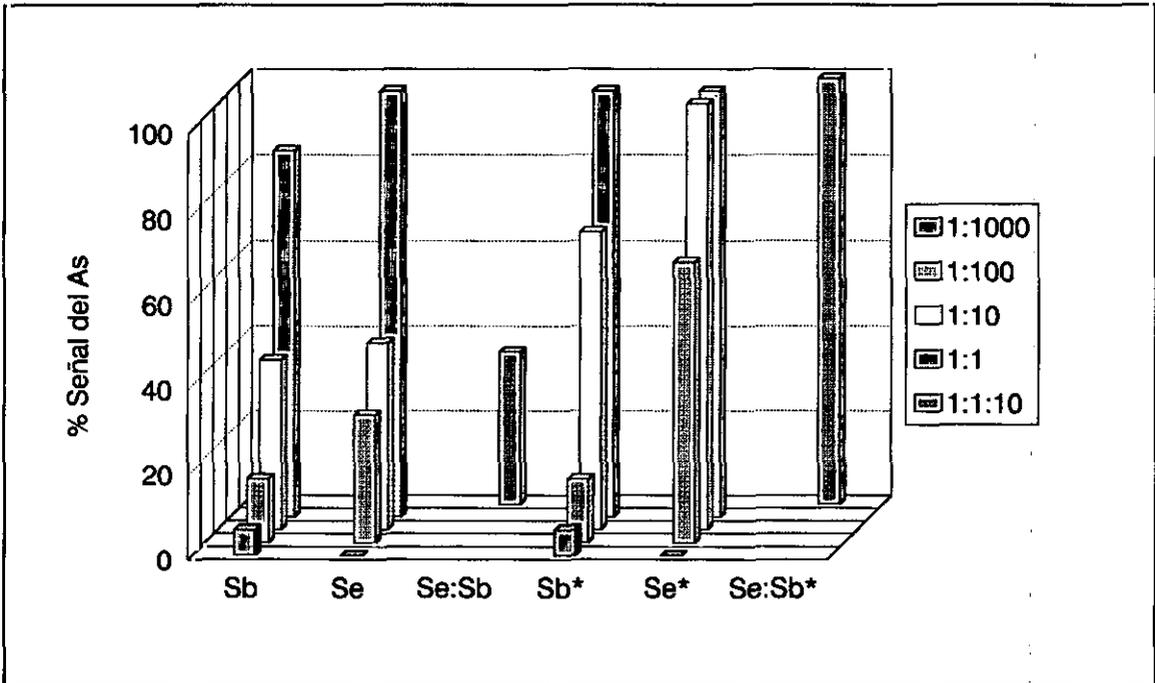


Figura V.25.- Estudio de interferencias de Sb y Se en la determinación de As ($60 \mu\text{g l}^{-1}$) en medio acuoso y en medio ácido láctico/KI (*). Medio de generación HCl 6M.

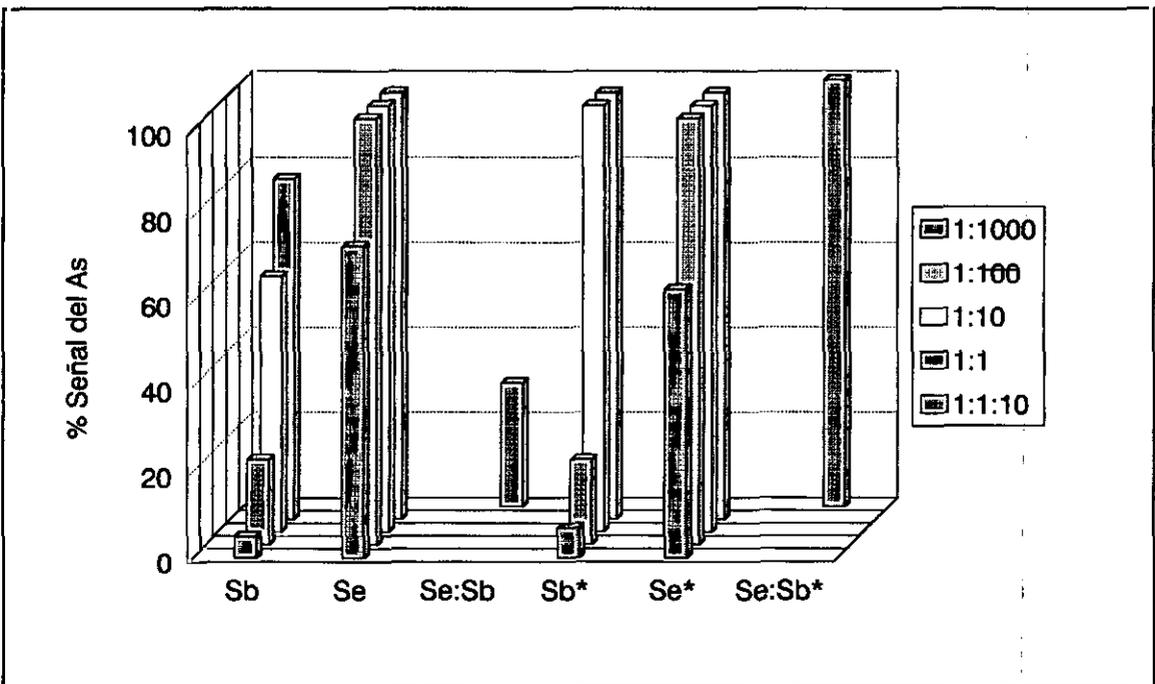


Figura V.26.- Estudio de interferencias de Sb y Se en la determinación de As ($60 \mu\text{g l}^{-1}$) en medio acuoso y en medio ácido láctico/KI (*). Medio de generación HCl 1M.

Los resultados muestran que el antimonio deprime la absorbancia del arsénico a partir de una relación As:Sb de 1:1 a todas las concentraciones de HCl ensayadas. La interferencia aumenta al aumentar la concentración de HCl y depende no sólo de la relación As:Sb, sino también de la cantidad total de interferente presente. La interferencia es generalmente mas grande para elevadas concentraciones de arsénico.

La interferencia del antimonio decrece significativamente en presencia de ácido láctico y se elimina cuantitativamente en presencia de KI para la proporción As:Sb de 1:10 cuando se genera la arsina en HCl 1M, mientras que si se genera en HCl 6M, la interferencia se elimina totalmente en la proporción 1:1 y se reduce significativamente para una proporción 1:10.

En la Tabla V.8 puede verse también la minimización de las interferencias producidas por el Se, Sn, Bi y Te. Como puede observarse, el Se interfiere en HCl 6M en la relación As:Se de 1:100 y su interferencia decreció significativamente en presencia de agente enmascarante. Un relación As:Se de 1:1000, produce seria interferencia y además, en este caso, se forma un precipitado rojo del Se metálico en los tubos de reacción, probablemente debido al medio fuertemente reductor. Esto parece significar que la interferencia es probablemente debida a la descomposición catalítica del hidruro por el depósito de selenio rojo, siendo por tanto una interferencia en fase líquida. Este mismo fenómeno se observa para el Sn, Bi y Te en las relaciones de arsénico:interferente de 1:100, 1:1000 y 1:100 respectivamente, produciéndose así mismo, depósitos del metal en el sistema.

Podemos concluir de este estudio que el medio KI-ácido láctico proporciona un buen camino para eliminar las interferencias mas importantes que existen en la fase gaseosa para la determinación de arsénico, que son debidas al Sb y al Se. Las interferencias del Sn, Bi y Te ocurren probablemente en la fase líquida debido a los depósitos metálicos que aparecen en el sistema.

V.4.3.4.- Características analíticas.

En la Tabla V.9 se recogen las características analíticas del método en continuo para la determinación de arsénico mediante HG-AAS.

Tabla V.9.- Características analíticas para la determinación de arsénico mediante HG-AAS en continuo.

	HCl 6M	Cítrico/citrato pH=3
Rango de Linealidad	15-140 $\mu\text{g l}^{-1}$	20-140 $\mu\text{g l}^{-1}$
Límite de detección	4,5 $\mu\text{g l}^{-1}$	6,5 $\mu\text{g l}^{-1}$
Límite de cuantificación	15 $\mu\text{g l}^{-1}$	22 $\mu\text{g l}^{-1}$
Precisión	2,5% (20 $\mu\text{g l}^{-1}$) 2,0% (80 $\mu\text{g l}^{-1}$)	10% (20 $\mu\text{g l}^{-1}$) 2,5% (100 $\mu\text{g l}^{-1}$)

V.4.4.- Desarrollo del método analítico para la determinación de arsénico total mediante FIA-HG-AAS.

V.4.4.1.- Optimización de variables para la determinación de arsénico por HG-AAS mediante inyección en flujo.

La determinación de arsénico por generación de hidruros, empleando la técnica de inyección en flujo (FIA) posee las ventajas del método en continuo, tales como la reducción considerable del volumen de los reactivos, menor manipulación de la muestra etc. e incorpora la ventaja adicional de disminuir el volumen de muestra, lo que permite la determinación de elemento cuando el volumen de misma es reducido. En este apartado, se realiza la optimización de variables para esta nueva modalidad.

Flujo del argón: La función del argón al igual que en el método en continuo, es la de gas de arrastre del hidruro desde el separador de fases hasta la célula de atomización, además de proporcionar una atmósfera adecuada para la atomización y determinación del elemento.

Para llevar a cabo este estudio, se han ensayado flujos de arrastre desde 5-25 l/h para una concentración de As(III) de $60 \mu\text{g l}^{-1}$ y un volumen de inyección de 25 μl en HCl 6M, como medio de generación y NaBH_4 al 3% (p/v) obteniéndose los resultados que muestran la Figura V.27. Se produce una disminución en la señal obtenida al aumentar el flujo de argón, lo que indica que predomina el efecto de la dilución del hidruro sobre la eficiencia de arrastre, si bien es menos crítica que cuando se utiliza el método en continuo.

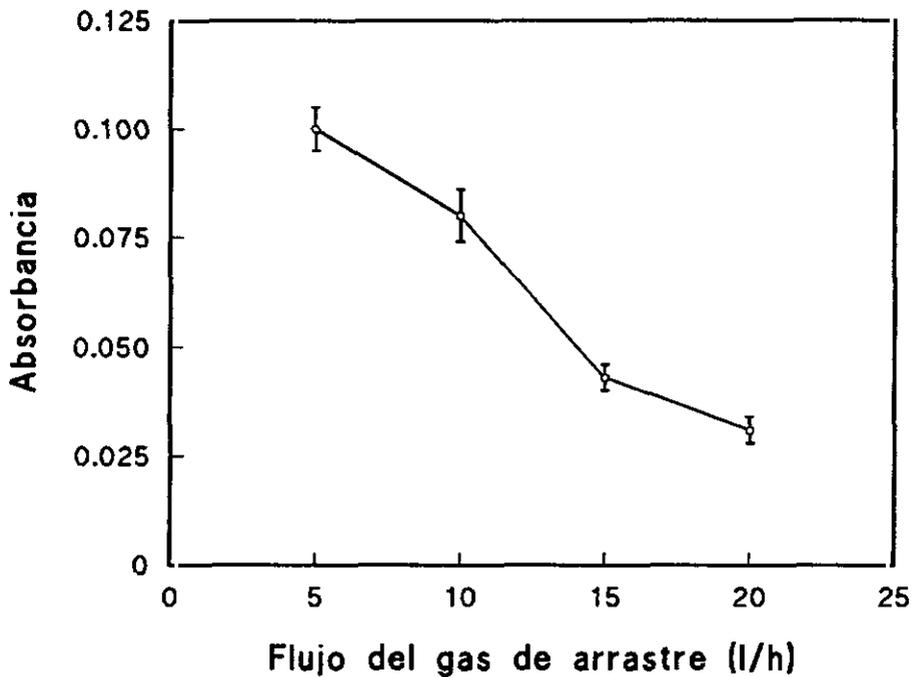


Figura V.27.- Influencia del gas de arrastre en la generación del hidruro de arsénico. (As(III): $60 \mu\text{g l}^{-1}$).

Influencia de la velocidad de la bomba: Para estudiar la influencia de la velocidad de la bomba peristáltica que impulsa al portador (HCl) y al reductor NaBH_4 se preparó una disolución de As(III) de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ y se generó la arsina en un intervalo de velocidades comprendido entre 400 y 900 rph, que como ya se ha dicho, se corresponden con flujos comprendidos entre 0.8 y 1.8 ml min^{-1} . En la Figura V.28 se observa un aumento de la respuesta analítica al aumentar la velocidad además de un estrechamiento de los picos obtenidos. Figura V.29.

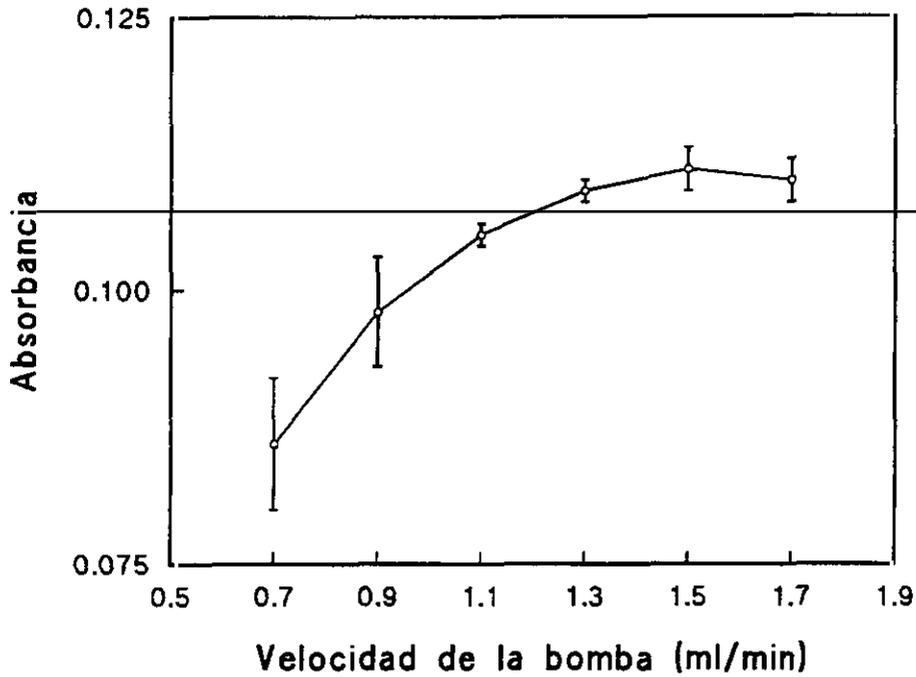


Figura V.28.- Variación de la absorbancia correspondiente a una disolución de As(III) de $100 \mu\text{g l}^{-1}$ en función de la velocidad de la bomba peristáltica.

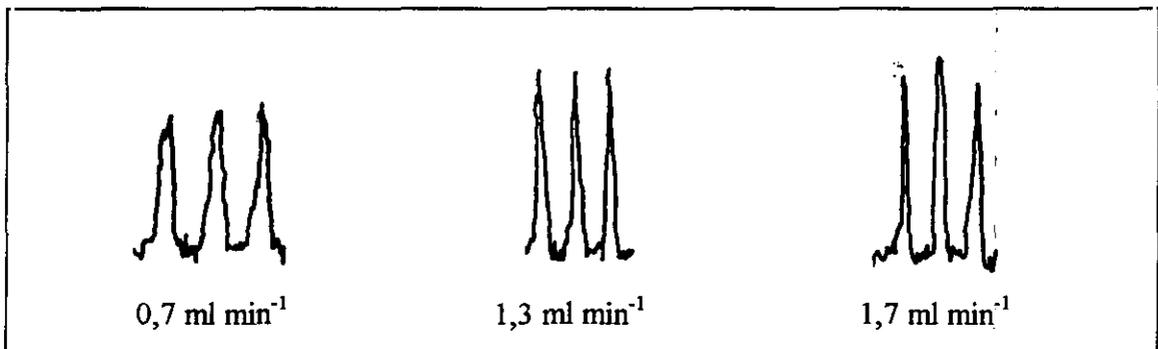


Figura V.29.- Perfil de los picos FIA del hidruro de As en función de la velocidad de la bomba.

Se eligió como velocidad de trabajo 700 rph, que equivale a 1.3 ml min^{-1} , ya que con este flujo se obtienen buenas señales analíticas, el consumo de reactivos no es muy elevado y los picos son suficientemente estrechos.

Influencia del volumen de inyección: Es un parámetro bastante importante en el análisis por inyección en flujo por lo que se abordó su estudio empleando dos procedimientos distintos.

a) Variando el volumen de inyección, para una cantidad fija de As de $100 \mu\text{g l}^{-1}$, mediante la utilización de bucles de distinta longitud, desde 25 a 300 μl . En este caso, se observó que al aumentar el tamaño del bucle aumentaba la señal hasta que se mantenía constante la respuesta. Dado que esta constancia en la respuesta obtenida podía deberse a una saturación de la señal por la mayor cantidad neta de elemento introducida se procedió a verificar dicha tendencia mediante un segundo procedimiento.

b) Realizando calibrados con los distintos bucles. Para llevar a cabo esta segunda experiencia se utilizaron bucles de 25, 100, 150, 250 y 300 μl y se realizaron calibrados de As(III) en medio HCl 6M para concentraciones comprendidas entre 20 y $100 \mu\text{g ml}^{-1}$. Una vez realizados los calibrados se procedió a la comparación de sus pendientes.

Al representar gráficamente la pendiente de los distintos calibrados obtenidos con los bucles de distintos volúmenes, Figura V.30, se observa que se obtienen una mayor sensibilidad, en altura de pico, cuanto menor es el volumen de inyección, siendo máxima cuando el volumen de inyección es de 25 μl .

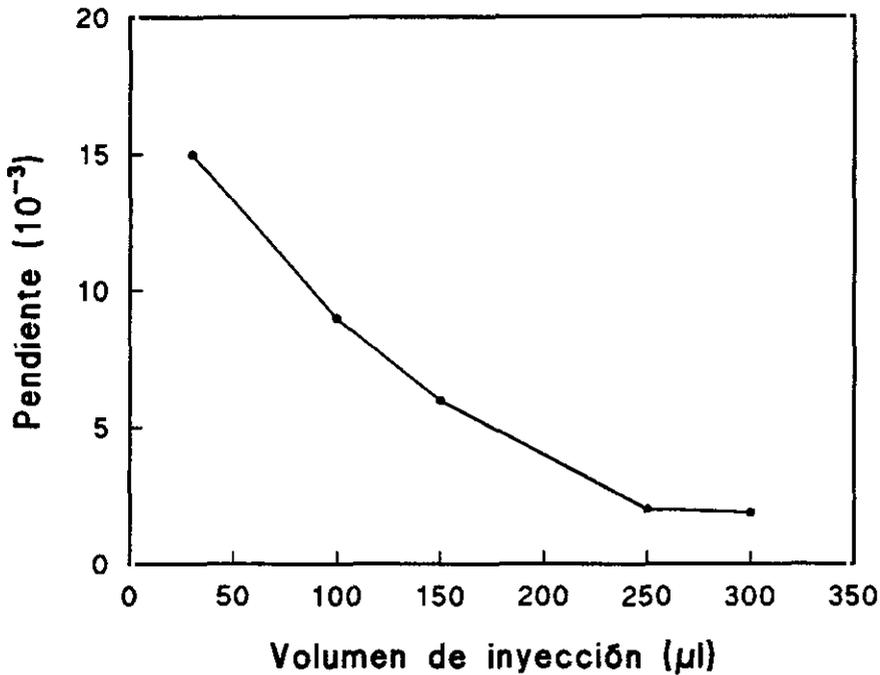


Figura V.30.- Influencia del volumen de inyección en la pendiente del calibrado de As mediante el método FIA.

Influencia de la concentración del NaBH_4 : Para llevar a cabo este estudio se prepararon dos disoluciones de As de diferente concentración, 40 y 80 $\mu\text{g l}^{-1}$, y se varió la concentración del reactivo desde una concentración de 0,5 hasta 3% (p/v). En este caso, al igual que en los métodos anteriormente descritos, se elige como concentración óptima de trabajo una disolución de NaBH_4 del 3%.

Influencia de la concentración de ácido clorhídrico: Al realizar este estudio se llegó a conclusiones parecidas a los dos métodos anteriores: determinación en discontinuo y determinación en flujo continuo, es decir, iguales eficiencias en la generación de los dos estados de oxidación de arsénico, cuando la concentración de HCl es 6 M. Esta igualdad de respuesta para los dos estados de oxidación se amplía para el intervalo 2-6 M cuando

se trabaja con el método en continuo y con el método FIA. Además se confirma el hábito de comportamiento cuando la acidez es menor de 2M Figura V.6.

Influencia del medio cítrico-citrato: Al igual que en el método en continuo, la arsina se generó en el medio cítrico/citrato a pH comprendidos entre 2 y 4, Figura V.31.

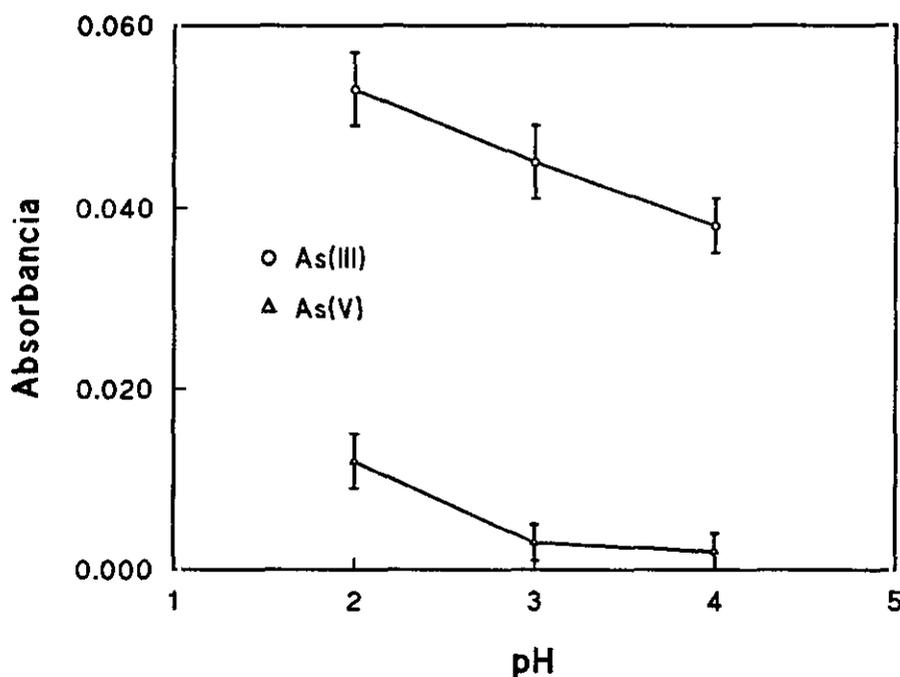


Figura V. 31.- Variación de la absorbancia obtenida para el hidruro de arsénico a partir de As(III) y As(V), en medio cítrico/citrato de distintos pH, mediante un sistema de inyección en flujo. ($60 \mu\text{g l}^{-1}$).

Como era de prever, a partir de $\text{pH}=3$ se inhibe la formación de la arsina desde el grado de oxidación (V), siendo sin embargo muy aceptable la sensibilidad obtenida a partir del grado de oxidación (III). Se abre aquí también la posibilidad de especiar entre ambos grados de oxidación al igual que en el método en continuo.

V.4.4.2.- Estudio de interferencias

Para llevar a cabo este estudio se fijó una cantidad de As(III) de $60 \mu\text{g l}^{-1}$, adicionando cantidades distintas de interferente. A continuación se generó la arsina en las condiciones óptimas ya determinadas.

La elección de los posibles interferentes en el método FIA, se llevó a cabo basándonos en los resultados obtenidos en el estudio de interferencias del método en continuo. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla V.10.

Tabla V.10.- Estudio de interferencias para la determinación de As mediante FI. % de señal respecto a una disolución de As(III) de $60 \mu\text{g l}^{-1}$ (volumen de inyección $25 \mu\text{l}$).

Interferente	Relación arsénico:interferente		
	1:2	1:10	1:100
Sb(III)	100	100	100
Se(IV)	100	100	100
Pb(IV)	100	100	100
Hg(II)	100	100	100
Ni(II)	100	85	70
Pd(II)	100	60	20

Considerando las interferencias de elementos alcalinos, alcalinoterreos, Fe(III), Cu(II), Zn(II), Mn(II), Pb(II), Ni(II), Pd(II), Sb(III) y (V), Se(IV), Hg(II), y Sn(II), en la generación de la arsina procedente de As(III) por FIA (3 ng) y en flujo continuo (60 ng ml^{-1}) y en medio HCl 6M , se observa que su magnitud es superior en flujo continuo que en FIA. La mayor interferencia producida en el sistema FIA está causada por Ni(II) y Pd(II) ya que la absorbancia disminuye más del 10% en la proporción As:interferente por encima de 1:10. De los otros iones ensayados, incluso de los otros elementos formadores de hidruros, no interfieren en la relación de concentraciones 1:1000. El Pd(II) fue

también un serio interferente ya que inhibe la señal del As(III) en la relación de concentraciones 1:10 y Ni(II), Hg(II) y Sn(II), disminuyen la señal en un 25% cuando la relación es 1:100.

No se observan interferencias procedentes de alcalinos, alcalinotérreos, Fe, Cu, Zn, Mn, Pb, SO_4^{2-} , NO_3^- y PO_4^{3-} , en la relación 1:1000.

La única interferencia sobre el As(III) a pH=3 en medio cítrico/citrato es debida al Pd que produce una disminución del 75% la señal del As(III) cuando la relación es 1:10.

Es de resaltar la gran disminución de la interferencia producida por el cobre, tanto en continuo como en FIA, con respecto a la interferencia que se presenta en discontinuo. Probablemente la elevada concentración del ácido y el corto bucle de reacción minimiza el efecto de este interferente.

V.4.4.3.- Características analíticas

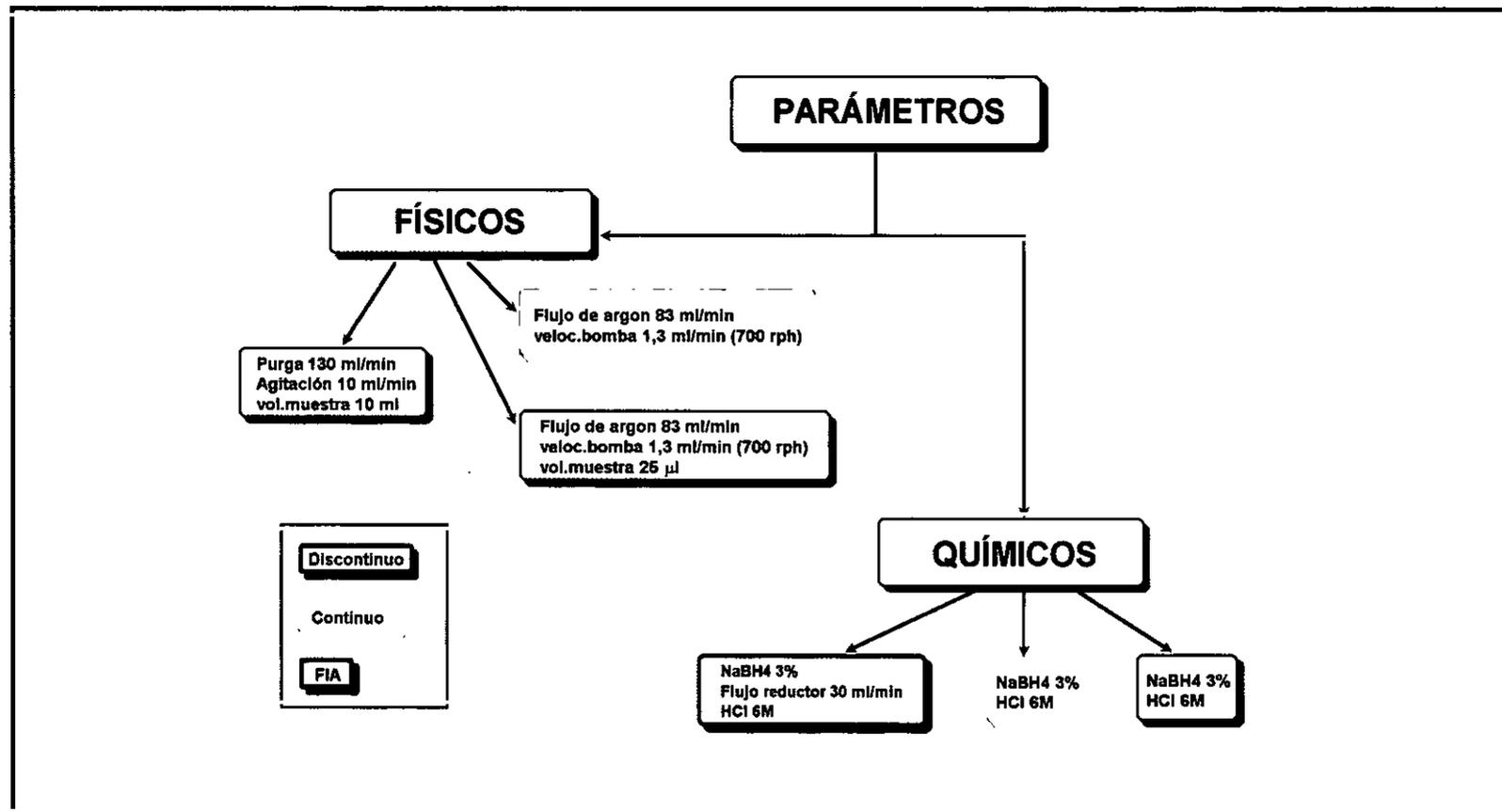
Tabla V.11.- Características analíticas del método FI-HG-AAS.

	HCl 6M	Cítrico/Citrato pH=3
Rango de Linealidad	15-25 ng	10-200 ng
Límite de detección	0,75 ng	1,5 ng
Límite de cuantificación	2,5 ng	7,5 ng
Precisión	5% (2 ng)	8% (10 ng)
	4% (4 ng)	6% (25 ng)

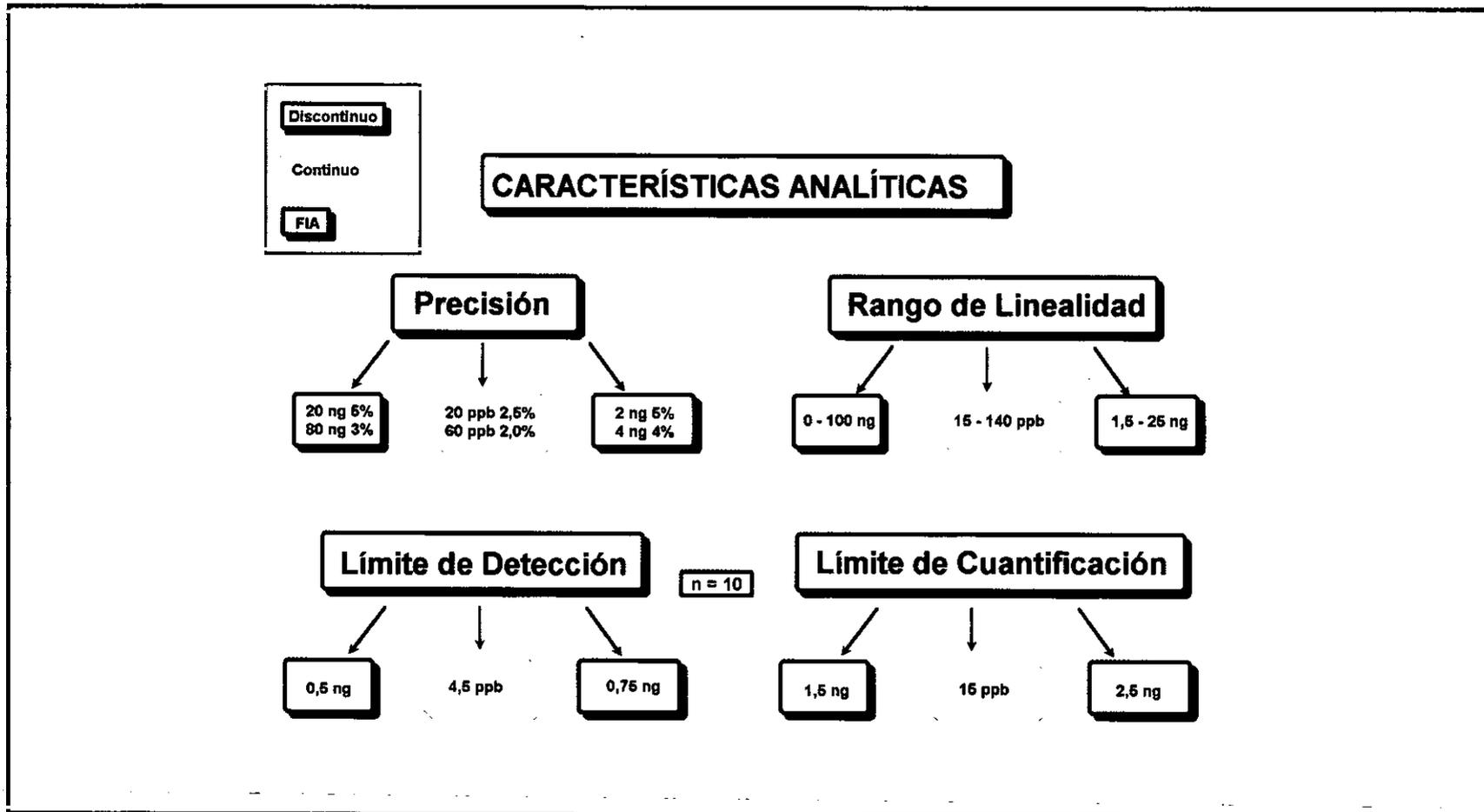
V.5.- COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS PROPUESTOS

Los Esquemas V.1 y V.2 muestran los parámetros físicos y químicos de los distintos métodos propuestos para la determinación de As_{total} , así como las características analíticas de los mismos tales como la precisión, rango de linealidad, límite de detección y límite de cuantificación.

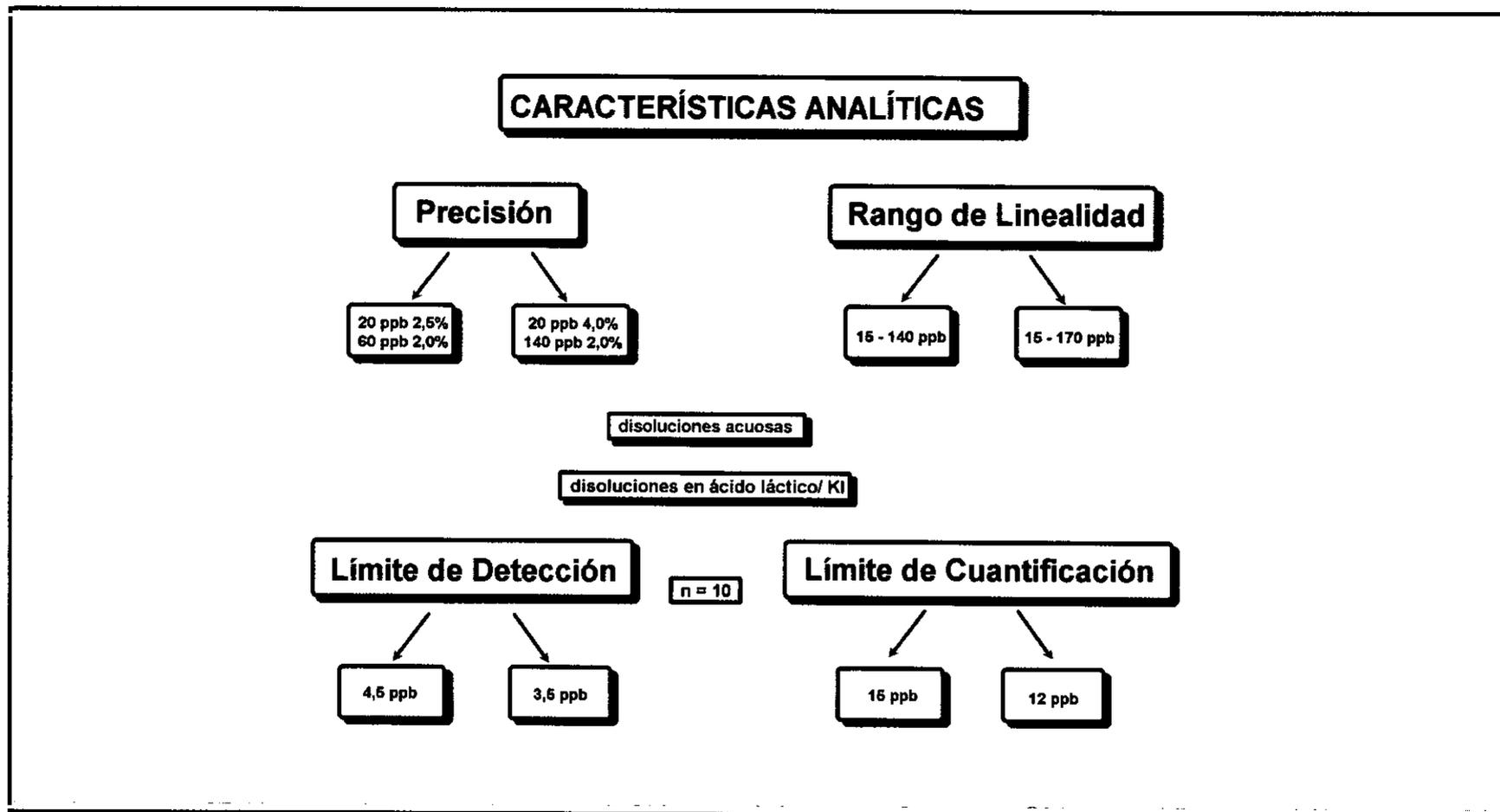
Por otra parte, en el Esquema V.3, se muestran las diferencias en las características analíticas cuando se genera el hidruro de arsénico a partir de una disolución acuosa y una disolución preparada en KI-ácido láctico.



Esquema V.1.- Parámetros físicos y químicos de los métodos propuestos para la determinación de arsénico total.



Esquema V.2.- Características Analíticas de los métodos propuestos para la determinación de arsénico total.



Esquema V.3.- Características Analíticas para la generación de la arsina en continuo con HCl 6M y NaBH₄ 3% (p/v), a partir de disoluciones de As preparadas en medio acuoso y en medio ácido láctico/KI.

V.6.- APLICACIONES

Los métodos desarrollados para la determinación de As total mediante generación de hidruros-absorción atómica y espectrometría de absorción molecular en discontinuo, generación de hidruros absorción atómica en continuo y en inyección en flujo, se han aplicado a la determinación de arsénico en distintos tipos de muestra.

Es sabido que la minimización de los posibles errores que pueden aparecer en todo método analítico se lleva a cabo desarrollando los procedimientos en una matriz cuya composición sea lo mas similar a la de la muestra objeto de análisis y que además posea un valor certificado en el contenido del elemento. El problema radica en que aunque ya existen patrones con valores certificados en el contenido total de arsénico, todavía éstos son escasos y no hay para todas las matrices que actualmente poseen un relevante interés.

Otra forma de controlar los posibles errores sistemáticos que pueden aparecer, es adicionar el analito a la muestra bajo la forma química que se supone. El problema que aparece en esta forma de trabajo radica fundamentalmente en el hecho de que los protocolos de la adición no están firmemente establecidos y la falta de certeza de que las recuperaciones obtenidas para el elemento adicionado sea la que corresponde al elemento anclado en la muestra.

Con estos precedentes, la validación de los métodos desarrollados se ha realizado con muestras de contenidos certificados, mediante estudios de recuperaciones y fundamentalmente participando en campañas de intercomparación de métodos y certificación de materiales. La participación en estos ejercicios interlaboratorios es una herramienta fundamental para controlar la exactitud de nuestras determinaciones. En esta línea, se ha participado activamente en las campañas promovidas por el Organismo Internacional de Energía Atómica de Viena y en los programas de la Comunidad Europea.

Los resultados analíticos obtenidos en el análisis por los métodos propuestos, de muestras de diferente naturaleza y los obtenidos en la participación de estos ejercicios se muestran a continuación.

V.6.1.- Generación de hidruros acoplada a la espectrofotometría ultravioleta-visible y a la absorción atómica en discontinuo: Diferenciación entre As(III) y As(V) inorgánico.

Los métodos desarrollados se han aplicado a la determinación de As total y a la diferenciación entre los grados de oxidación (III) y (V) en muestras de aguas, sedimentos, mejillón y dietas.

AGUAS: Se han analizado agua de grifo y agua de desecho procedente del efluente de una fábrica de papel.

El contenido de arsénico total de las aguas del grifo fue demasiado bajo como para poder ser detectado por ambas técnicas. Para conocer la bondad de los métodos en este tipo de matriz, las muestras se enriquecieron con As(III) y As(V) y se analizaron sin ningún tratamiento previo. Debido a la ausencia de efecto matriz, las muestras se midieron directamente sobre el calibrado. Las recuperaciones obtenidas, tanto en el procedimiento por absorción atómica como por espectrometría UV-VIS, osciló entre el 98-105%.

El agua de desecho se pasó a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 μm y se acidificó con HCl antes de proceder a su análisis. Tampoco mostró contenidos medibles de arsénico total, tanto por absorción atómica como por espectrofotometría. Cuando se añadieron cantidades conocidas de As(III) y As(V), todo el arsénico añadido apareció en la determinación con grado de oxidación (V). Este hecho se atribuye a la presencia de

materiales oxidantes en la matriz. Las recuperaciones obtenidas por ambas técnicas oscilaron alrededor del 100% empleando las adiciones estándar ya que se apreciaba un acusado efecto matriz.

SEDIMENTO: Aplicando la espectrofotometría molecular, se analizó el contenido total de arsénico en un sedimento con contenido certificado de $8,9 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ (SOIL 7-OIEA, RM). Sobre la muestra no se utilizaron los procedimientos de mineralización desarrollados (sólo eran aptos para muestras biológicas) y se aplicó el procedimiento de extracción empleando HCl 6M y realizando sobre el sedimento un calentamiento suave en horno microondas. El residuo sólido fue desechado y se analizó sólo el sobrenadante. Debido a la ausencia de efecto de matriz, los análisis se realizaron sobre calibrado convencional. La cantidad de As(III) encontrada en el sedimento fue del 85% del As_{total} certificado. La cantidad de As(V) medida fue despreciable.

MEJILLÓN: Los dos métodos desarrollados se aplicaron a la determinación de arsénico total en una muestra representativa de una partida de mejillones comprada en el mercado. Después de liofilizada, la muestra fue sometida a una digestión $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-H}_2\text{SO}_4$ según el procedimiento de mineralización desarrollado. La generación del hidruro se llevó a cabo en HCl 6M y en ausencia de KI. Se aplicó en ambos casos el método de las adiciones estándar sobre la muestra y el blanco a fin de contemplar los posibles efectos de la matriz.

Los contenidos medios encontrados fueron para la muestra de $4,9 \pm 0,4 \mu\text{g}$ y para el blanco de $0,8 \pm 0,2 \mu\text{g}$. El contenido neto de la muestra se encuentra por tanto en torno al valor $6,8 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ en el mejillón liofilizado.

Este trabajo forma parte de un proyecto internacional coordinado por el O.I.E.A (Organización Internacional de Energía Atómica de Viena) cuyo objeto principal era la determinación de elementos traza, en dietas y alimentos básicos consumidos por la po-

blación en su dieta diaria. Para ello, se confeccionaron distintas dietas representativas del consumo alimentario de la clase media urbana española en temporada de invierno. Estas dietas se elaboraron a partir de datos facilitados por el Instituto Nacional de Estadística, como resultado de una encuesta de presupuestos familiares, publicados por dicho organismo en 1984.

DETERMINACIÓN DE As EN UNA DIETA, DIETA 6: Inicialmente se centraron los estudios en una dieta, denominada dieta 6 constituida por:

Desayuno: 200 ml de café con leche con dos cucharadas de azúcar, dos tostadas de pan normal con mantequilla y mermelada.

Comida: Lentejas con zanahoria, pechuga de pollo a la plancha con patatas fritas, dos rebanadas de pan, una pera y un vaso de vino con gaseosa.

Cena: Repollo reogado con patatas, una pescadilla de ración, queso manchego, dos rebanadas de pan, una naranja y un vaso de refresco de naranja.

Entre horas: un café cortado con dos terrones de azúcar.

Nota: según la encuesta anteriormente citada, el consumo del aceite de oliva y del aceite de girasol es del 50% por lo que la comida se elaboró con aceite de oliva y la cena con aceite de girasol.

El análisis del contenido de arsénico se realiza a partir de la dieta liofilizada empleando la mineralización recomendada por Tam y Lacroix (TAM G.K.H., 1977 y 1982) que utilizan una mezcla de $Mg(NO_3)_2/MgO$ como estabilizante en la reducción a cenizas y el método recomendado por el protocolo del OIEA en el cual tanto a las muestras como en

los blancos y antes de proceder a su medida, se les adiciona KI al 30% (p/v). Las absorbancias se registraron en altura de pico, en las condiciones óptimas de análisis, utilizando el método de las adiciones estándar.

En estas condiciones se determina el arsénico total de la muestra, independientemente del estado de oxidación en el que se encuentre este elemento.

La validación de los procedimientos desarrollados por nosotros sin el empleo de KI como prerreductor, se realizó una vez obtenidos los resultados con el método por la OIEA. Así, la determinación de As_{total} se ha realizado en medio HCl y en medio cítrico/citrato de pH=3. Se ha elegido este valor de pH en función de los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del medio de generación de la arsina descrito en el apartado V.4 del presente trabajo. Los resultados obtenidos para las adiciones a los blancos y a la muestra se recogen Figura V.32. Por ambos métodos se obtienen los mismos resultados, lo que nos demuestra que ambos medios son perfectamente válidos para la determinación del arsénico en dietas utilizando la mineralización de reducción a cenizas con $Mg(NO_3)_2/MgO$.

El contenido medio de arsénico en esta dieta analizada es de $250 \pm 11 \mu g kg^{-1}$ con un coeficiente de variación del 4,4%, un L_D de $3 \mu g kg^{-1}$ y un L_Q de $9 \mu g kg^{-1}$.

También se observa, Figura V.32, que existe paralelismo entre las líneas correspondientes a las adiciones de los blancos y de las muestras, lo cual indica que no existe efecto matriz cuando utilizamos esta mineralización en la determinación de arsénico en esta dieta.

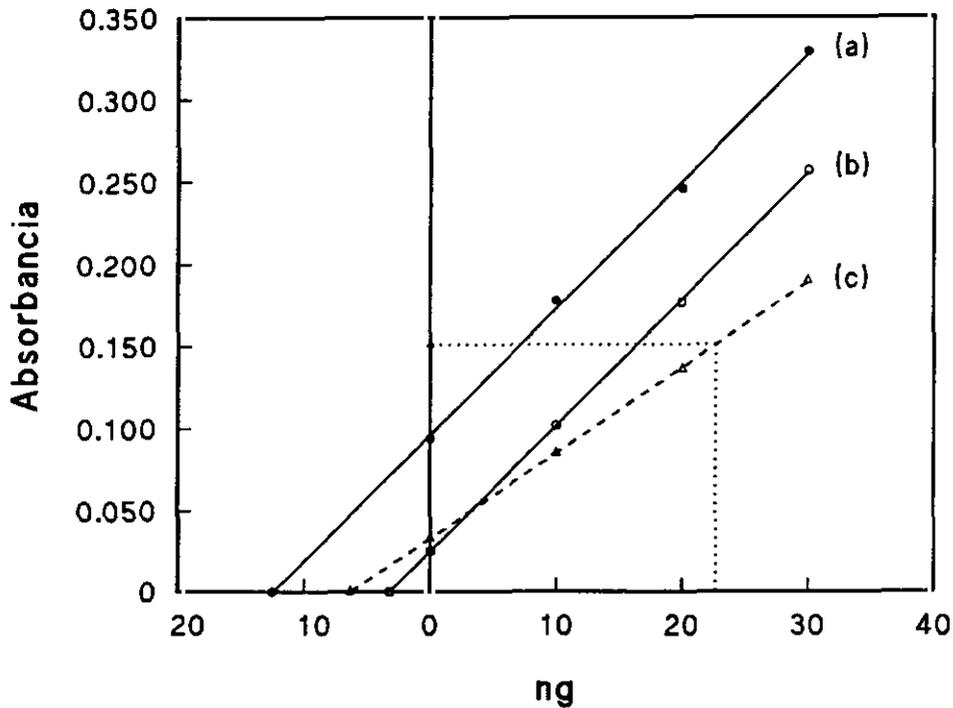


Figura V.32.- Determinación de arsénico en la Dieta 6. — Adiciones a las muestras (a) y a los blancos (b) utilizando HCl 6M como medio de generación. ---- Adiciones a los blancos (c) generando el hidruro en medio cítrico/citrato de pH=3.

- **Influencia de la cantidad de estabilizante:** Para ver si la cantidad de estabilizante añadido a la muestra en la mineralización influye en la determinación de arsénico en este tipo de muestras, se preparan una serie de mineralizaciones en las que se pesa 1 g. de muestra (dieta 6), a las que se adiciona cantidades variables de la disolución de $Mg(NO_3)_2/MgO$: 10, 20 y 30 ml.

El procedimiento utilizado es el mismo que en casos anteriores, registrando la absorbancias en las condiciones óptimas de trabajo. Los resultados experimentales demuestran

que, al menos en las cantidades probadas, la cantidad de estabilizante no afecta a la determinación ya que se obtienen resultados análogos a los ya obtenidos.

Otro aspecto interesante de este estudio es que no se modifican la representación de los datos correspondientes a las adiciones estandar de los blancos, lo que indica que el estabilizante no aporta contaminación apreciable de arsénico.

- *Influencia del KI:* Al aplicar los métodos en ausencia y presencia de KI, se observa un pequeño aumento de las pendientes de los calibrados de las muestras y de los blancos en presencia de KI, pero dado que estos son del mismo orden en ambos casos, no se justifica la adición de KI cuando se trabaja en medio HCl 6M. Además, las cantidades de arsénico total obtenidas son totalmente concordantes, independientemente de la adición o no de KI a la dieta.

- *Estudios de recuperación:* Finalmente y con objeto de comprobar la recuperación del método, se preparan una serie de muestras que contienen 1 g de dieta 6, a las que se añaden 200 ng de As(III), cantidad del mismo orden al encontrado en esta dieta. La recuperación media obtenida es del orden del 95%.

DETERMINACIÓN DE As EN UNA DIETA DE VALOR SEMICERTIFICADO,

H-9: Para comprobar la fiabilidad de los datos obtenidos en la determinación de arsénico en la dieta 6, se procedió a aplicar el mismo procedimiento en una dieta semicertificada: dieta H-9. Esta dieta fue facilitada por el O.I.E.A., cuyos contenidos en elementos traza, certificados provisionalmente, se incluyen en la Tabla V-12.

En este caso también se analizó con y sin KI antes de generar el hidruro en las condiciones óptimas y aplicando el método de adiciones estándar, tanto al blanco como a la muestra. Las absorbancias se registraron en altura de pico. Al igual que en la determinación de arsénico en la dieta 6, no se observa efecto de matriz. El valor medio encontrado para la dieta H-9 se recoge en la Tabla V.13.

Tabla V.12.- Contenidos provisionales de elementos traza en la dieta semicertificada H-9

Elemento	Unidades	Concentración ⁽¹⁾	Intervalo de confianza ⁽²⁾	% Error ⁽³⁾
As	µg kg ⁻¹	88	55-120	37
Br	mg kg ⁻¹	7,5	6,8-8,2	9
Ca	mg kg ⁻¹	2310	2150-2470	6,8
Cd	µg kg ⁻¹	31,5	27-36	15
Cl	g kg ⁻¹	12,5	11-14	12
Co	µg kg ⁻¹	43	38-48	11
Cr	mg kg ⁻¹	0,15	0,11-0,19	28
Cs	µg kg ⁻¹	25 *	-	-
Cu	mg kg ⁻¹	2,9	2,6-3,1	8,5
Fe	mg kg ⁻¹	33,5	31-36	6,6
Hg	µg kg ⁻¹	4,8	3,4-6,2	30
I	mg kg ⁻¹	0,4 *	-	-
K	g kg ⁻¹	8,3	7,6-9,0	8
Mg	mg kg ⁻¹	785	730-840	6,7
Mn	mg kg ⁻¹	11,8	11,0-12,6	7
Mo	mg kg ⁻¹	0,24	0,21-0,27	14
Na	g kg ⁻¹	8,1	7,4-8,8	8,5
Ni	mg kg ⁻¹	0,27	0,22-0,32	20
P	g kg ⁻¹	3,4	3,1-3,7	9
Pb	mg kg ⁻¹	0,16	0,12-0,20	26
Rb	mg kg ⁻¹	8,0	7,4-8,6	7,5
Se	mg kg ⁻¹	0,11	0,10-0,12	10
Sr	mg kg ⁻¹	3,0	2,6-3,4	13
Zn	mg kg ⁻¹	27,5	25,7-29,3	6,4

(1) Referido a peso seco

(2) Intervalo de confianza del 95%;

(3) % de error, aplicado a la concentración certificada, en sentido positivo y negativo, en un intervalo de confianza del 95%

* Valores no certificados

Tabla V.13.- Valores encontrados para la dieta H-9 en $\mu\text{g kg}^{-1}$

As \pm s	Precisión %	L _D	L _Q
70 \pm 6	8,6	2,2	7,5

L_D Límite de detecciónL_Q Límite de cuantificación

Como puede observarse, el valor encontrado se encuentra dentro del intervalo de confianza del certificado provisional.

V.6.2.- Aplicaciones analíticas de la técnica HG-AAS en continuo y FIA.

Los métodos analíticos desarrollados en continuo y en inyección en flujo, se han aplicado al análisis del contenido total y su posible diferenciación entre las especies inorgánicas de As(III) y As(V) en aguas y otras matrices.

AGUAS: Dentro de las aguas naturales se han analizado aguas de grifo, agua subterránea procedente de un sondeo, y un agua mineral. La Tabla V.14. muestra los resultados obtenidos.

Puesto que no se observó efecto matriz en las aguas de grifo y mineral a las que se les adicionó el elemento, la determinación de As(III) y As(V) se realizó por calibrado convencional. La especiación de arsénico en las muestras de agua subterránea procedente de una zona industrial, dio un contenido en arseniato de $112 \pm 5 \mu\text{g l}^{-1}$ (n=5), mientras que la presencia de arsenito no se pudo detectar.

Tabla V.14.- Contenidos de arsénico total y arsénico (III) en distintas muestras de agua.

Muestra	As total (ng ml ⁻¹)	As(III) (ng ml ⁻¹)
	HCl 6M	citrato/citrato (pH=3)
Agua de grifo con adición de 50 (ng ml ⁻¹) de As(III) y As(V)	100 ± 1	48 ± 2
Agua subterránea	112 ± 5	nd
Agua mineral	50 ± 3	nd

nd: no detectado.

EJERCICIO DE INTERCOMPARACIÓN DE UN AGUA (HM-91): Los métodos desarrollados en FIA y en continuo, se han validado. El método en continuo se ha aplicado en la determinación de arsénico en muestras de agua, formando parte de un ejercicio de intercomparación de 23 laboratorios, bajo los auspicios del Bureau of Community Reference Material of the European Communities, coordinado por el grupo dirigido por la Dra. Gema Rauret de la Universidad de Barcelona. Dicho laboratorio preparó una muestra sintética de agua (HM/91) con distintos contenidos de metales pesados que se indican a continuación en µg ml⁻¹: Cu (10), Ni (30), Zn (150), Cd (0,5), Cr (2,0), As, Se (4,0), Pb (1,0) y Hg (1,5).

Los resultados obtenidos en la determinación de arsénico se detallan a continuación:

Laboratorios participantes: 23

Laboratorios seleccionados: 21

Ref. de nuestro laboratorio: 326

Resultados (mg kg⁻¹): 2,075; 2,140; 2,108; 1,848; 1,881; 1,881

Media (mg kg⁻¹): 1,989±0,132

Media interlaboratorios (mg kg⁻¹): 2,059±0,360

Valor real (mg kg⁻¹): 2,000

Los resultados globales de la determinación de arsénico, enviados por el laboratorio coordinador, se muestran en la figura V.33.

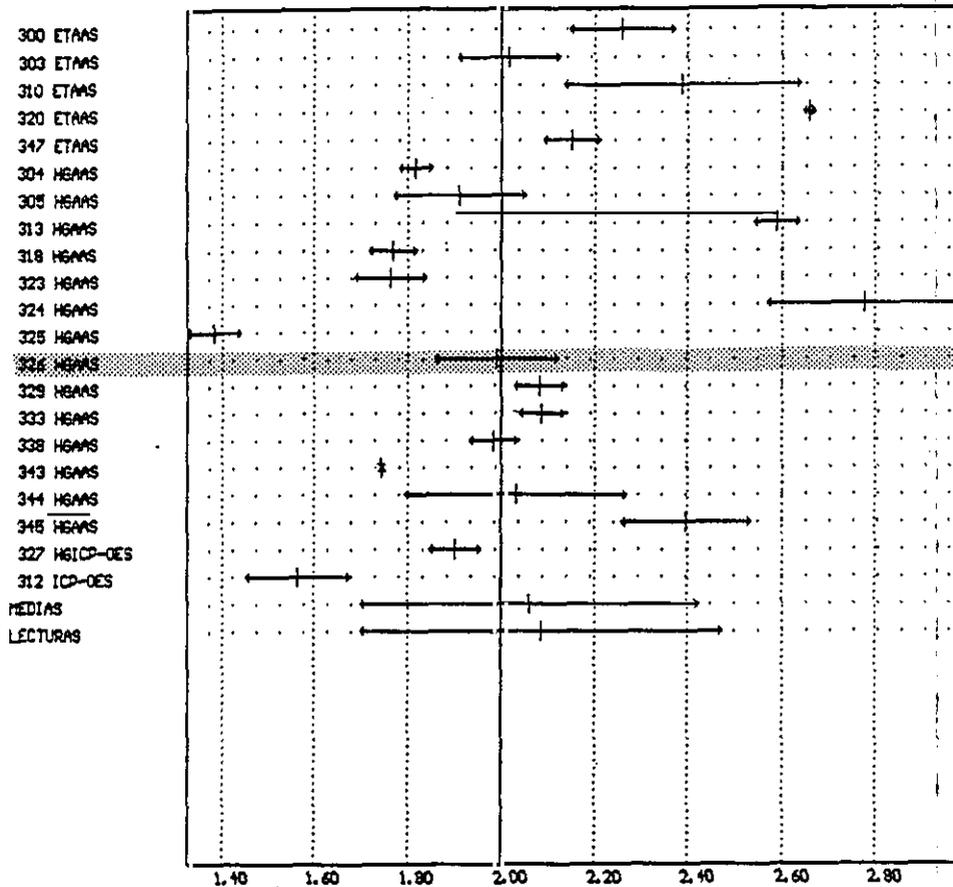


Figura V.33.- Resultados de As globales del ejercicio de intercomparación de una muestra de agua: HM/91 (mg kg⁻¹).

La concordancia entre el valor medio obtenido por nosotros y el valor real, y la media interlaboratorios, valida nuestro procedimiento en este tipo de matriz.

RYE GRASS: MATERIAL DE REF. CRM(281): La determinación de arsénico en este materia forma parte de la certificación de este material, en la que han participado 25 laboratorios de países integrados en el Mercado Común. Del informe facilitado por la CEC (Commission of the European Communities) se puede destacar que se han aplicado diversas técnicas analíticas con distintos tratamientos previos de la muestra los cuales se detallan a continuación:

- **ETAAS** (Cámara de grafito): combustión en frasco de oxígeno; HNO_3 ; $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$; $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-HF}$; $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$.
- **HGAAS** (Generación Hidruros-Absorción Atómica): $\text{HNO}_3\text{-Mg}(\text{NO}_3)_2$; $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4\text{-HNO}_3\text{-HCl}$.
- **HGICP**(HG-Plasma acoplado inductivamente): $\text{HNO}_3\text{-HCl-HClO}_4$.
- **ICPMS** (ICP-Espectroscopía de Masas): $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HNO}_3$; $\text{HNO}_3\text{-HCl-H}_2\text{O}_2$
- **INNA**(Activación Neutrónica): mineralización a reflujo con $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4$, separación, reducción, etc... seguida de irradiación con neutrones térmicos.
- **SETAS** (Suspensiones-ETA): HNO_3 .

Otra dato interesante del informe, es que no han observado problemas especiales de mineralización de la muestra ya que básicamente está constituida por carbohidratos y proteínas, por lo que el empleo de medios ácidos oxidantes es generalmente suficiente para una mineralización completa.

Los resultados obtenidos en la determinación de arsénico en este material han sido:

Laboratorios participantes: 25

Resultados (mg kg^{-1}): 0,045; 0,049; 0,055; 0,061; 0,069

Media (mg kg^{-1}): $0,056 \pm 0,010$

Valor Certificado (mg kg^{-1}): $0,057 \pm 0,004$

La concordancia entre el valor certificado y el valor obtenido por nosotros, para 5 determinaciones, valida nuestro procedimiento para ser aplicado en este tipo de materiales.

CABELLO HUMANO. CRM (398): Es bien sabido que el arsénico se acumula en el pelo y en las uñas, por lo que se participó en la certificación de este elemento en este tipo de matriz. Para ello se partió de una muestra CRM n° 398 facilitada por el BCR (Community Bureau of Reference).

Para llevar a cabo dicho análisis, se tomaron 0,5 g de muestra a la que se sometió a mineralización de reducción a cenizas, es decir, tratamiento con $Mg(NO_3)_2/MgO$ tal y como se describe en el apartado de procedimientos. A continuación se deja enfriar y se disuelve el residuo con HCl 6M, enrasando posteriormente a 25 ml. Una vez preparada la muestra se generó el hidruro en las condiciones analíticas óptimas, aplicando el método de las adiciones estándar tanto en continuo como en FIA.

Los resultados obtenidos ($mg\ kg^{-1}$): 0,17; 0,14; 0,17; 0,17; 0,20; 0,20

Media ($mg\ kg^{-1}$): $0,18 \pm 0,02$.

Valor certificado ($mg\ kg^{-1}$): $0,31 \pm 0,02$

La diferencia observada entre los valores obtenidos y el valor indicativo, puede ser debida a que el cabello humano es un material difícil de mineralizar cuantitativamente por su elevado contenido en S y Si. Así pues, considerando los resultados de los laboratorios participantes, se recomienda el empleo de ácidos oxidantes seguido de la adición de HF/ HNO_3 y evaporación a sequedad.

De hecho, no se certificó el contenido de As en este materia por observarse errores sistemáticos en su determinación que no pudieron ser cuantificados.

VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE MINERALIZACIÓN: MUESTRA DE

MAÍZ: La validación de todos nuestros métodos de mineralización se han llevado a cabo mediante la participación en un nuevo ejercicio de intercomparación entre laboratorios. La muestra elegida para llevar a cabo este estudio ha sido una muestra de maíz liofilizado, facilitado por el grupo dirigido por la Dra. Gema Rauret de la Universidad de Barcelona, como ejercicio de intercomparación de laboratorios.

En este caso, se han aplicado a la muestra pulverizada todas las mineralizaciones detalladas en el apartado de procedimientos V.3.1, es decir:

- $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-HClO}_4$: en recipiente abierto calentado en placa y en recipientes abiertos calentados en bloque de aluminio.
- $\text{HNO}_3\text{-V}_2\text{O}_5$: en reactores a presión.
- $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2\text{-MgO}$: vía seca.

Una vez concluida la mineralización, se diluye convenientemente la muestra y se genera su hidruro en las condiciones óptimas. Las señales se miden en altura de pico, aplicando el método de adiciones estándar.

Los resultados obtenidos en esta muestra han sido:

Laboratorios participantes: 17

Laboratorios seleccionados: 14

Ref. de nuestro laboratorio: 326

Resultados (mg kg^{-1}): 1,300; 1,220; 1,360; 1,220; 1,360; 1,200.

Media (mg kg^{-1}): $1,277 \pm 0,073$

Media interlaboratorios (mg kg^{-1}): $1,286 \pm 2.054$

Los resultados globales del ejercicio de intercomparación facilitado por el laboratorio coordinador se muestra en la Figura V.34.

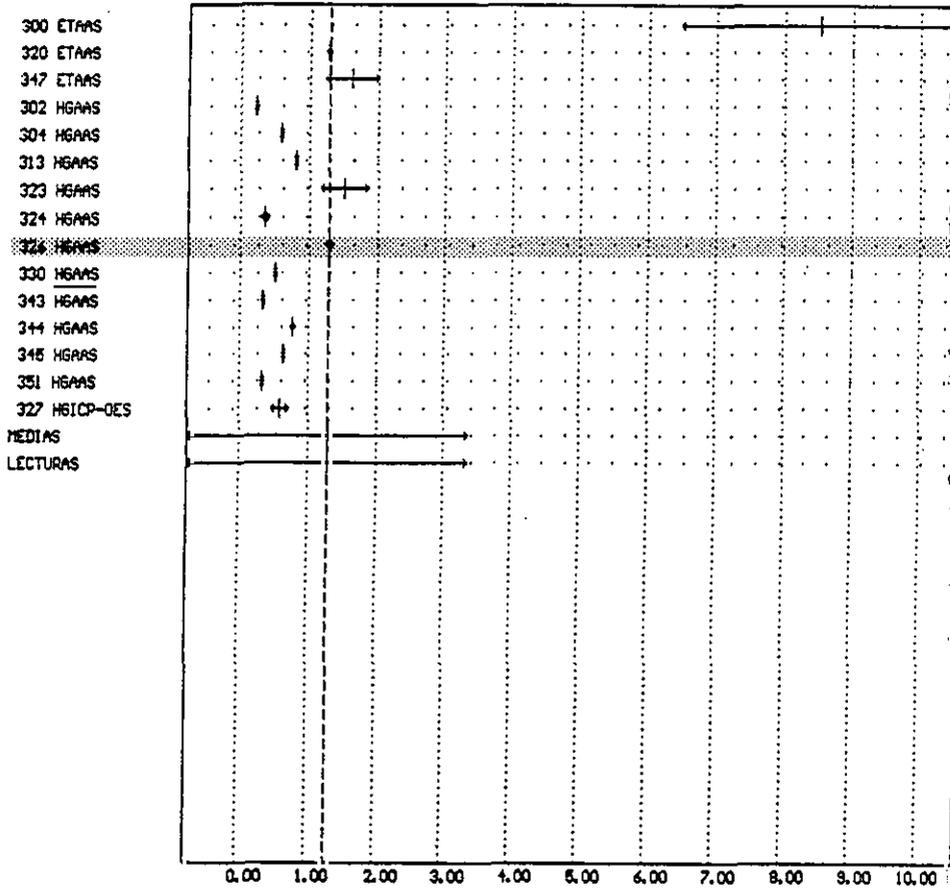


Figura V.34.- Ejercicio de intercomparación: Metales pesados. As liofilizado FD8 (mg kg⁻¹).

Es interesante destacar que la dispersión de resultados obtenidos por los distintos laboratorios participantes se ha justificado como pérdida de analito durante la mineralización o bien a una reducción incompleta de As(V) → As(III).

CAPÍTULO VI

DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO As(III), As(V), MMA Y DMA EN MUESTRAS MEDIOAMBIENTALES

VI.1.- Aparatos, materiales y reactivos.

VI.2.- Generalidades sobre la especiación de As(III), As(V), MMA y DMA.

VI.2.1. Procedimiento experimental para la determinación de As(III), As(V), MMA y DMA mediante Generación de Hidruros, en continuo, y espectrofotometría de Absorción Atómica.

VI.3.- La calibración multivariante como técnica de especiación.

VI.3.1.- Métodos de calibración multivariante.

VI.3.2.- Métodos de trabajo (algoritmos): CLS, ILS y Filtro de Kalman.

VI.3.3.- Estudio comparativo de los diferentes métodos de calibración utilizados.

VI.3.4.- Criterio de validación de resultados.

VI.3.5.- Procedimiento para la aplicación de los métodos de calibración multivariante.

VI.3.6.- Comparación de resultados obtenidos en los distintos métodos multivariantes. Error estándar de predicción (SEP).

VI.3.7.- Error relativo de predicción (REP).

VI.3.8.- Estudio para simplificar el procedimiento de calibración multivariante.

VI.3.9.- Aplicación a muestras reales.

VI.1.- APARATOS, MATERIALES REACTIVOS Y DISOLUCIONES.

Aparatos y materiales:

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica de doble haz, Perkin-Elmer mod. 2380.
- Lámpara de Arsénico de descarga sin electrodos (EDL) con una potencia de trabajo de 8W Perkin-Elmer.
- Fuente de energía externa Perkin-Elmer, para la utilización de lámparas EDL, acoplada al espectrofotómetro.
- Registrador Perkin-Elmer Recorder mod. 56.
- Bomba peristáltica de cuatro canales Gilson mod. HP4. Tubos de Tygon de 0,6 cc m⁻¹.
- Tubo de teflón de 0.5 mm d.i.
- Separador gas-líquido Philips.
- Célula de atomización de cuarzo, calentada por una llama aire/acetileno (20/40 ml/min).
- Balanza analítica Sartorius con sensibilidad de 0,1 mg .
- pHmetro de precisión Crison 2001 H.
- Material volumétrico de calidad contrastada.

- Sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore.
- Acetileno extrapuro C-26 y Argón C-50 (Carburos metálicos).

Reactivos:

Todos los reactivos utilizados han sido de grado de análisis o de alta pureza y el agua desionizada obtenida por un sistema Milli-Q.

- Ácidos y bases: ácido nítrico (HNO_3 , Carlo Erba), ácido clorhídrico (HCl , Carlo Erba), ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{H}_2\text{O}$, Merck), ácido acético (CH_3COOH , Carlo Erba), hidróxido sódico (NaOH , Merck).

Disoluciones:

- Disolución patrón de As(III) de 1000 $\mu\text{g/ml}$: se disuelven 0,3300 g de trióxido de arsénico (As_2O_3 , Merck) en 10 ml de hidróxido sódico (NaOH) 1M. Se enrasa a 250 ml con HCl 2M.
- Disolución patrón de As(V) de 1000 $\mu\text{g/ml}$: Se disuelven 0,4436 g de pentóxido de arsénico dihidratado ($\text{As}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Carlo Erba) en 10 ml de NaOH 1M y se lleva a 250 ml con HCl 2M.
- Disolución patrón de MMA de 1000 $\mu\text{g/ml}$: Se pesan 0,5291 g de $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{ONa})_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se disuelven en 250 ml de agua. Esta disolución corresponde a 543 $\mu\text{g/ml}$ de As, concentración utilizada como patrón para la preparación de las disoluciones de trabajo.

- Disolución de DMA de 1000 $\mu\text{g/ml}$: Se disuelven 0,1562 g de $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de agua milli-Q. Esta disolución se corresponde con una concentración menor de As e igual a 547 $\mu\text{g/ml}$, que al igual que en la disolución anterior, es la concentración considerada para preparar las disoluciones de trabajo.
- Disoluciones de trabajo de As(III), As (V), MMA y DMA, en el intervalo 10-140 $\mu\text{g l}^{-1}$: se preparan diariamente por dilución conveniente en agua desionizada de una disolución de 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ obtenida a partir de las disoluciones patrón.
- Disolución de borohidruro sódico (NaBH_4 , Aldrich) al 3% (p/v): se prepara añadiendo 15,0 g de NaBH_4 en una disolución formada por 5,0 g de NaOH en 250 ml de agua ultrapura.
- Disolución reguladora de ácido cítrico/citrato de distintos pH: se preparan añadiendo a una disolución de ácido cítrico al 40% (p/v) la cantidad adecuada de NaOH al 10% para obtener las disoluciones con los pH de trabajo.
- Disoluciones de ácidos (HCl y CH_3COOH) preparadas por dilución conveniente de los ácidos concentrados.

VI.2.- GENERALIDADES SOBRE LA ESPECIACIÓN DE As(III), As(V), MMA Y DMA.

Se ha demostrado que la concentración total de arsénico no es una medida apropiada para determinar la toxicidad, el impacto ambiental o el efecto de la exposición ocupacional, por lo que el desarrollo de métodos de especiación es un tema preferente en investigación.

El arsénico se encuentra en el medio ambiente tanto en sus formas inorgánicas como en sus formas orgánicas. De hecho, en el agua de la superficie del planeta, existe la posibilidad de que se produzcan biometilaciones, por lo que es posible encontrar en este tipo de muestras As(III), As(V), MMA y DMA. Sin embargo, en aguas subterráneas las especies preferentes son las correspondientes a las formas inorgánicas de As(III) y de As(V). Por lo tanto, As(III), As(V), MMA y DMA son las principales especies investigadas en estos ecosistemas.

La especiación del arsénico es por tanto, un desafío analítico, particularmente cuando concierne a sistemas medioambientales y biológicos ya que en este tipo de muestras, los compuestos de arsénico se encuentran en cantidades traza en matrices más o menos complejas (CHATTERJEE A., 1995).

Como ya se ha señalado en el estudio bibliográfico inicial, la forma usual de especiación es combinar un "tandem en línea" de las técnicas cromatográficas con detectores específicos de los elementos. Un estudio comparativo de las diferentes técnicas acopladas para As ha sido publicado por EBDON y colaboradores, 1988. El ácido monometilarsónico (MMA), dimetilarsínico (DMA), arsenito (As(III)), y arseniato (As(V)) han sido extensivamente determinados por métodos que incluyen fundamentalmente intercambio aniónico-horno de grafito-absorción atómica (PACEY G.E., 1981) o cromatografía iónica acoplada a la generación de hidruros ICP-AES o MIP-AES (SCHRAMEL P.,

1992; CREED J.T., 1988). La electroforesis capilar acoplada a un detector UV también se ha empleado como técnica de especiación (MORIN P., 1992). Estos métodos requieren usualmente preconcentración antes de la determinación a fin de disminuir los límites de detección y reducir las interferencias. La combinación de la generación de hidruros y el atrapamiento criogénico para preconcentrar la arsina, seguido de la desorción térmica selectiva, se emplea frecuentemente para exaltar la sensibilidad.

A pesar de la habilidad de las técnicas combinadas para separar y determinar de forma individualizada las especies del arsénico, aparecen algunos problemas en la metodología del acoplamiento. Esto es debido a la dificultad de encontrar interfases adecuada entre los sistemas, se gasta mucho tiempo debido a que los procesos son relativamente lentos, los análisis son generalmente caros y se necesita personal altamente entrenado.

La bibliografía acerca de la reducción selectiva de las especies de arsénico a la forma de los hidruros señala el potencial considerable de estos métodos para proporcionar procedimientos de especiación rápidos, capaces y prácticos para el análisis de gran número de muestras.

PAHLAVANPOUR y THOMPSON, 1981; HINNER, 1980 y ARBAB-ZAVAR, 1980, describen como ya previamente hemos señalado, procedimientos de especiación en este sentido. ANDERSON y colaboradores, 1986, distinguen las formas inorgánicas y metiladas del arsénico por reducción selectiva a los hidruros en medios ácidos no usuales seguidos por su determinación por AAS o ICP-AES.

Un problema que presenta la especiación por reducción selectiva, es que en la mayoría de los casos, no puede emplearse debido a la baja selectividad en la determinación de las especies; sin embargo, esta línea de investigación junto con los métodos de calibración multivariante, presentan la gran ventaja de una mayor simplicidad instrumental y

como consecuencia es un camino alternativo para llevar a cabo la diferenciación de especies en laboratorios menos dotados.

Un estudio previo realizado por nosotros sobre las interferencias que produce el MMA y DMA en la generación de la arsina desde As(III) en concentración de 60 ng l^{-1} , mostró que la presencia de MMA en medio cítrico/citrato, superior a 180 ng l^{-1} no interfería, mientras que en medio HCl 6M empezaba a interferir a concentraciones superiores a 30 ng l^{-1} y se producía un aumento en la señal del As(III) del 20% para una concentración de MMA de 60 ng l^{-1} .

Para la especie DMA, el nivel de interferencias en el medio cítrico/citrato es mayor que para el caso del MMA, sólo se tolera una proporción As(III):DMA de 1:1. En HCl 6M el efecto interferente, producido por el DMA, es significativamente mas bajo que el producido por el MMA. Las interferencias causadas por ambas especies se deben, fundamentalmente, a la formación de sus respectivos hidruros que llegan a la célula de atomización junto con el hidruro de la especie As(III).

Con estos precedentes, la reducción selectiva de las distintas especies As(III), As(V), MMA y DMA a sus correspondientes hidruros, combinada con la calibración multivariante, en principio podría permitir la determinación simultánea de las distintas especies presentes en una matriz compleja. Además, la calibración multivariante permite obtener información cuantitativa y selectiva a partir de medidas no selectivas. El potencial analítico de esta técnica surge de combinar: 1º) desde el punto de vista químico, el comportamiento de las distintas especies en diferentes medios ácidos para la reducción selectiva de los correspondientes hidruros y 2º) la aplicación de 3 métodos distintos de la calibración multivariante ha sido el objetivo de esta parte de la memoria.

VI 2.1.- Procedimiento experimental

Se ha empleado el mismo sistema diseñado para el método de la generación de hidruros en continuo (Figura V.2.) Las disoluciones que contienen las especies de arsénico, el NaBH_4 al 3% y el ácido correspondiente, se introducen en el sistema de flujo continuo a través de una bomba peristáltica. Después de pasar la mezcla al separador gas líquido, las arsinas generadas son conducidas a la célula de atomización por el flujo de argón. Los parámetros experimentales óptimos vienen dados en la Tabla VI.1 así como los medios ácidos elegidos para llevar a cabo este estudio.

Tabla VI.1.- Parámetros experimentales para la generación de los hidruros a partir de As(III), As(V), MMA y DMA mediante un sistema de flujo continuo.

Parámetro	Datos
Flujo de Argón	83 ml min ⁻¹
Velocidad de la bomba	1,3 ml min ⁻¹
Concentración de NaBH_4	3% (pV)
Ácidos para la generación	HCl: 6M, 1M, 0,5M
	AcH: 1M
	Cítrico/citrato: pH=2 y pH=4

VI.3.- LA CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE COMO TÉCNICA DE ESPECIACIÓN.

Para la determinación de las cuatro especies, se seleccionaron cuatro medios de generación : HCl 6M, HCl 1M, disolución amortiguadora de cítrico/citrato de pH=2 y pH=4.

Los resultados obtenidos de las absorbancias de los hidruros correspondientes se recogen en las Tablas VI.2-5 y en las Figuras VI.1-4

Tabla VI.2.- Calibrados de As(III), As(V), MMA y DMA en HCl 6M

ng ml ⁻¹	As(III)	As(V)	MMA	DMA
10	0.034±0.002	0.033±0.001	0.036±0.001	0.010±0.001
20	0.048±0.001	0.050±0.002	0.049±0.002	0.015±0.002
40	0.070±0.001	0.069±0.002	0.071±0.003	0.031±0.002
60	0.085±0.001	0.088±0.002	0.087±0.002	0.043±0.001
80	0.102±0.001	0.102±0.003	0.100±0.001	0.053±0.002
100	0.124±0.002	0.126±0.001	0.125±0.002	0.060±0.002

Tabla VI.3.- Calibrados de As(III), As(V), MMA y DMA en HCl 1M

ng ml ⁻¹	As(III)	As(V)	MMA	DMA
10	0.022±0.001	0.018±0.001	0.019±0.002	0.018±0.001
20	0.030±0.002	0.028±0.002	0.030±0.002	0.022±0.002
40	0.050±0.002	0.046±0.001	0.047±0.002	0.037±0.001
60	0.067±0.003	0.059±0.001	0.063±0.002	0.050±0.001
80	0.088±0.002	0.072±0.002	0.083±0.001	0.058±0.001
100	0.101±0.002	0.084±0.002	0.095±0.001	0.067±0.001

Tabla VI.4.- Calibrados de As(III), As(V), MMA y DMA en cítrico/citrato de pH=2

ng ml ⁻¹	As(III)	As(V)	MMA	DMA
10	0.023±0.001	---	0.010±0.002	0.018±0.002
20	0.035±0.002	---	0.015±0.002	0.023±0.002
40	0.058±0.002	0.005±0.003	0.020±0.002	0.043±0.001
60	0.077±0.002	0.008±0.002	0.030±0.002	0.055±0.001
80	0.095±0.002	0.011±0.002	0.045±0.002	0.073±0.002
100	0.110±0.003	0.020±0.002	0.057±0.002	0.086±0.001

Tabla VI.5.- Calibrados de As(III), As(V), MMA y DMA en cítrico/citrato de pH=4

ng ml ⁻¹	As(III)	As(V)	MMA	DMA
10	0.025±0.002	---	---	0.010±0.002
20	0.039±0.002	---	---	0.016±0.002
40	0.059±0.002	0.004±0.002	0.004±0.002	0.032±0.002
60	0.080±0.001	0.006±0.002	0.005±0.002	0.043±0.002
80	0.098±0.002	0.009±0.002	0.007±0.003	0.055±0.001
100	0.117±0.002	0.010±0.002	0.009±0.002	0.066±0.002

Como se puede ver en las Tablas VI.2-5, las respuestas obtenidas a partir de las distintas especies, en los diferentes medios ácidos, mantienen una eficiencia relativamente constante con respecto a la señal obtenida para el As(III), por lo que se pensó que la determinación conjunta era posible.

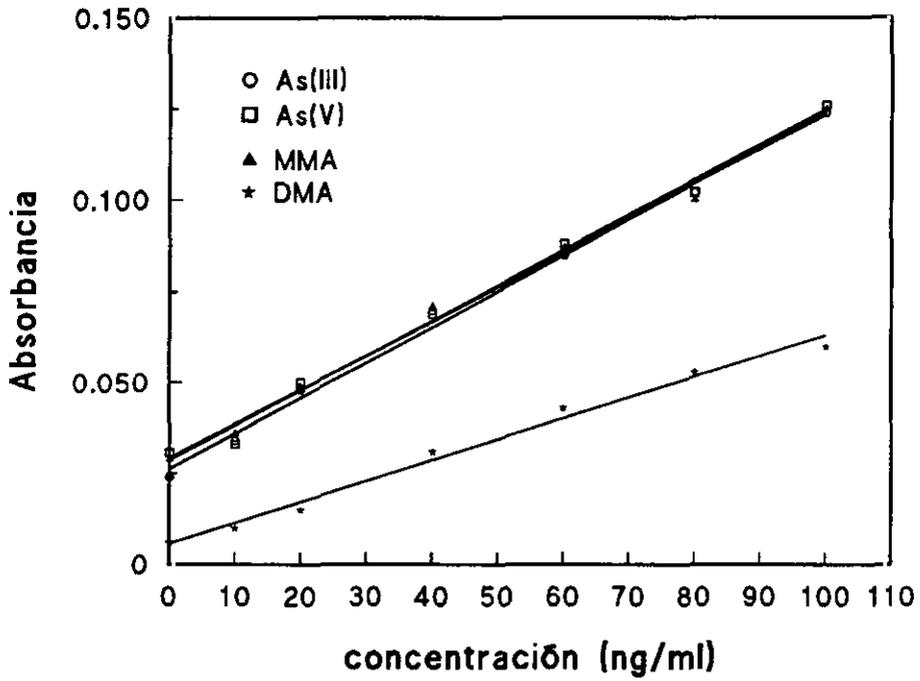


Figura VL1.- Calibrados de As(III), As(V), MMA y DMA en medio HCl 6M.

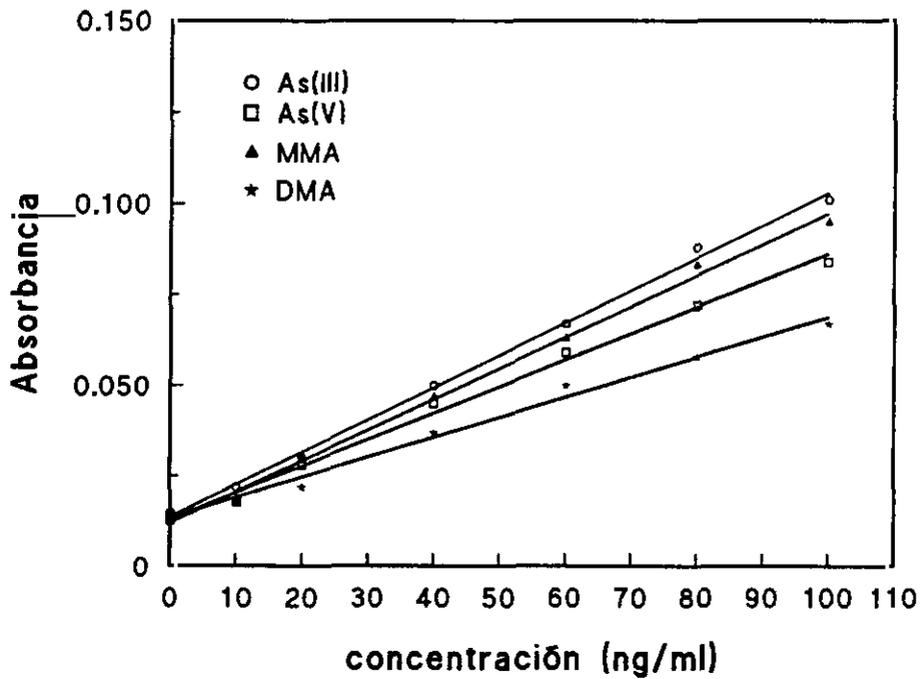


Figura VL2.- Calibrados de As(III), As(V), MMA y DMA en medio HCl 1M.

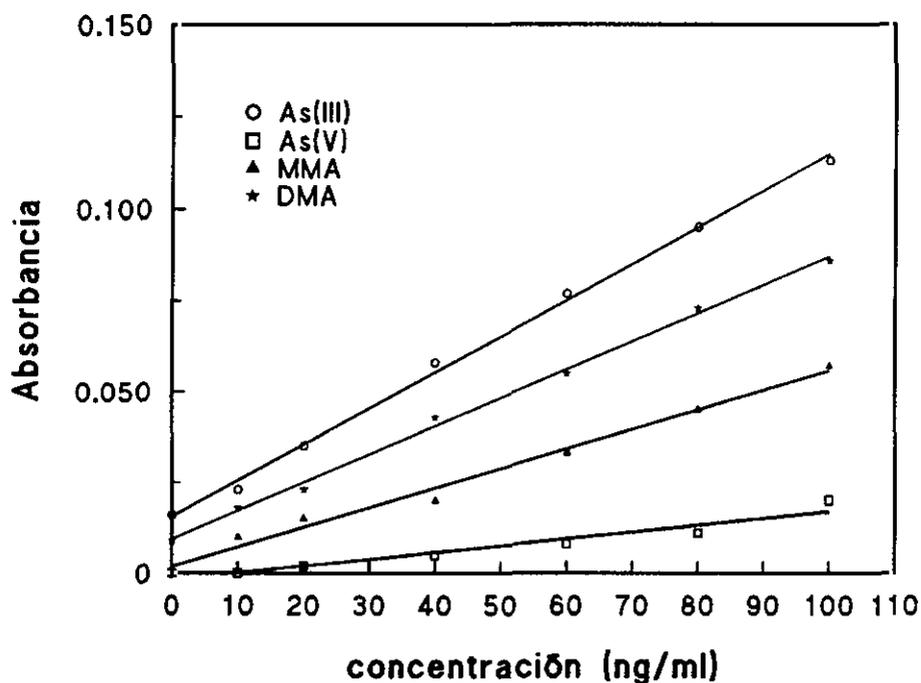


Figura VL3.- Calibrados de As(III), As(V), MMA y DMA en medio cítrico/citrato de pH=2.

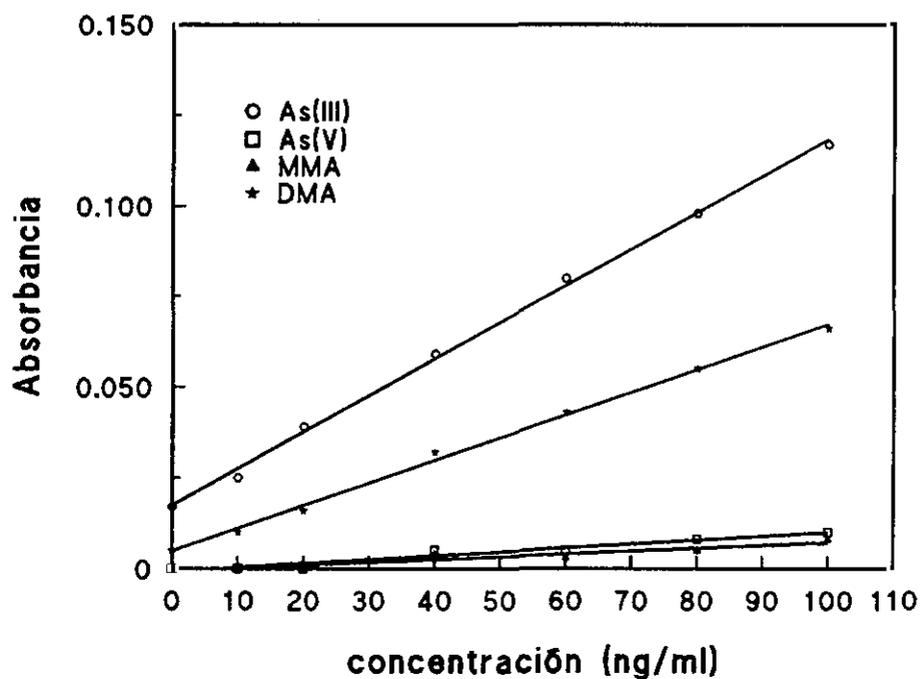


Figura VL4.- Calibrados de As(III), As(V), MMA y DMA en medio cítrico/citrato de pH=4.

VI.3.1.- Métodos de calibración multivariante.

En un primer momento, se pensó que era suficiente el planteamiento de un sistema de cuatro ecuaciones con cuatro incógnitas, de forma análoga a como se había hecho en un trabajo para la determinación de especies de plomo (D'ULIVO A., 1986). Ahora bien, como la información que puede obtenerse de las señales medidas en función de una sola variable es limitada, se ha recurrido al análisis multivariante para resolver este "problema".

De hecho la calibración tradicional univariante, admite que el método de medida es selectivo para el constituyente que se va a determinar, por lo que este proceso de calibración no puede aplicarse cuando las medidas están sujetas a interferencias físicas, químicas, debidas a fenómenos de la propia muestra o bien, a interferencias experimentales del propio proceso de medida.

La calibración multivariante ofrece una solución alternativa a estos problemas ya que permite la determinación simultánea de la concentración de distintos componentes en muestras complejas, es decir, aplicando métodos de calibración multivariante se puede obtener información cuantitativa y selectiva a partir de datos poco selectivos. (TAULER R., 1991).

Los métodos de calibración multivariante suponen que existe una relación lineal entre la absorbancia y la concentración de los componentes aunque, en algunos casos, también se han desarrollado algoritmos para sistemas no lineales. Básicamente constan de dos etapas bien diferenciadas. La primera de ellas es la *etapa de calibración*, donde se relacionan la absorbancia y la concentración de unas mezclas de referencia. En la segunda etapa o *etapa de predicción*, los resultados obtenidos en la calibración se utilizan para estimar o predecir la concentración de una muestra desconocida.

Existen distintos métodos de calibración multivariante entre los que se pueden destacar:

Métodos de Regresión Lineal

- Regresión lineal clásica por mínimos cuadrados, también llamado análisis multicomponente clásico, (Classical Least Squares) CLS.
- Regresión inversa por mínimos cuadrados, (Inverse Least Squares) ILS.
- Regresión por componentes principales, (Principal Component Regression) PCR.
- Regresión por mínimos cuadrados parciales, (Partial Least Squares) PLS.

Métodos Iterativos

- Filtro de Kalman.
- Simplex.

No existe, a priori, ningún criterio de selección que nos indique cual de estos métodos es el mejor. De hecho, Haaland y Thomas recomiendan que se comparen siempre varios métodos para cada problema (HAALAND D.M., 1988). Otros autores, intentando responder a la pregunta de ¿qué método es el mejor?, han estudiado y comparado matemáticamente los distintos métodos, concluyendo que cada problema es diferente y por lo tanto, no hay ninguna razón para pensar que un método es mejor que otro (LANG P.M, 1993).

En el presente trabajo se han utilizado y comparado un método directo de regresión lineal (CLS), un método inverso (ILS) y un método iterativo (Filtro de Kalman).

Todos los métodos de calibración multivariante parten de dos conjuntos de datos:

A: conjunto de respuestas instrumentales, en nuestro caso absorbancias, que se agrupan de forma ordenada en una tabla o matriz de datos de dimensiones ($r \times m$), siendo r los medios de generación y m las mezclas utilizadas.

C: conjunto de datos constituidos por las concentraciones conocidas de n analitos, componentes, sobre las m disoluciones mezcla patrón, luego de dimensiones ($n \times m$).

En todos los métodos de calibración multivariante se busca la relación que existe entre estas dos matrices de tal manera que, una vez conocida esta relación, se pueda utilizar en la predicción de las concentraciones de analito en las disoluciones problema.

VI.3.2.- Método de trabajo (algoritmos): CLS, ILS y Filtro de Kalman.

Para poder aplicar los métodos de calibración multivariante es necesario hacer un buen diseño de las mezclas que vamos a medir en la calibración y así garantizar que se han considerado las posibles variaciones que pueden afectar a los resultados en la etapa de predicción. Existen distintos diseños para la selección de las mezclas (BRERETON R.G., 1990), (GLICK M., 1991) pero siempre hay que tener en cuenta que, el número de ecuaciones ha de ser mayor que el número de incógnitas, es decir, debemos obtener un sistema superdeterminado.

El diseño factorial es uno de los más utilizados pues engloba las posibles combinaciones de los componentes en los niveles de concentración estudiados. Ahora bien, con este diseño el número de combinaciones puede ser muy elevado, por lo que se suele utilizar diseño factorial fraccionado, en el que se seleccionan una serie de combinaciones representativa del total, para la obtención de la matriz de calibración, de tal manera que se llegue a un compromiso entre los resultados obtenidos y el volumen de trabajo.

El diseño aleatorio es también muy utilizado pero tiene el inconveniente de que si el número de disoluciones seleccionado es pequeño, puede no abarcar todo el espacio muestral y como consecuencia cometer más error que si utilizamos el método factorial simplificado. Ahora bien, si el número de disoluciones seleccionadas es suficientemente grande, ambos métodos son comparables (THOMAS E. V., 1990).

Otro método que también se utiliza para estos diseños es el método simplex centrado, que no hay que confundir con la optimización simplex ni con la calibración simplex. Este método reduce aún más el número de disoluciones seleccionadas que el método factorial simplificado por lo que su aplicación es limitada. (BRERETON R. G., 1990).

En el presente trabajo se ha utilizado un diseño factorial simplex de los denominados cerrado, "closure", que se caracterizan por seleccionar de un diseño factorial, las combinaciones que suman un determinado valor. De esta manera se prepararon 35 disoluciones y se midieron las absorbancias correspondientes a cada una de las mezclas medidas en los distintos medios ácidos de generación seleccionados (seis medios).

Una vez obtenidas las respuestas instrumentales se procedió a la aplicación de un método directo de calibración multivariante (CLS), un método inverso (ILS) y un método iterativo (Filtro de KALMAN).

Todos estos métodos parten del cumplimiento de la ley de Beer:

$$\begin{array}{c}
 \mathbf{A} = \mathbf{KC} \\
 \\
 \begin{pmatrix} A_{11} & \dots & A_{1m} \\ \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ A_{r1} & \dots & A_{rm} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} K_{11} & \dots & K_{1n} \\ \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ K_{r1} & \dots & K_{rn} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} C_{11} & \dots & C_{1m} \\ \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ \cdot & & \cdot \\ C_{n1} & \dots & C_{nm} \end{pmatrix} \\
 \\
 \mathbf{r} \times \mathbf{m} \qquad \qquad \mathbf{r} \times \mathbf{n} \qquad \qquad \mathbf{n} \times \mathbf{m}
 \end{array}$$

Siendo:

r : medios de generación

m : mezclas

n : componentes

A_{ij} : Absorbancia de la mezcla j en el medio generador i

K_{hi} : Absortividad del componente h en el medio generador i

C_{hj} : Concentración del componente h en la mezcla j

Es decir, el conjunto de respuestas instrumentales (Absorbancias) obtenidas, para las m mezclas patrón de los cuatro componentes (As(III), As(V), MMA y DMA), en los seis medios de generación seleccionados (HCl 6M, 1M, 0.5M, Cítrico/citrato de pH=2, pH=4 y AcH 1M), se agrupan de forma ordenada en una matriz de datos (\mathbf{A}) de dimensiones

$(r \times m)$ donde cada fila se corresponde con las absorbancias obtenidas en cada medio para cada una de las mezclas.

Por otro lado, el conjunto de datos constituido por las concentraciones de los n analitos, en las m disoluciones también se agrupan de forma ordenada en una matriz (C) de dimensiones $(n \times m)$ en donde las filas son las concentraciones de los componentes en cada una de las disoluciones patrón utilizadas en el proceso de calibración.

Como ya hemos dicho, en los métodos de calibración multivariante se busca la relación (matriz K o P) que existe entre ambos conjuntos de datos, de tal manera que una vez calculada, se pueda utilizar para predecir las concentraciones de los cuatro analitos en disoluciones problema en las que se ha obtenido la respuesta analítica.

El cálculo de la matriz de correlación entre (A) y (C), es decir, (K o P) se lleva a cabo aplicando los algoritmos correspondientes a cada uno de los métodos y que se detallan a continuación:

Calibración clásica (CLS) Algoritmo

Calibración: $A = KC$

$$K = AC^T(CC^T)^{-1}$$

Predicción: $a = Kc$

$$c = (K^TK)^{-1}K^T a$$

Calibración inversa (ILS) Algoritmo
--

Calibración: $C = PA$

Si $r = n$, $P = K^{-1}$

$$P = CA^T(AA^T)^{-1}$$

Predicción: $c = Pa$

Filtro de Kalman. Algoritmo

Calibración: $A = KC$

Modelo $A^T = C^TK^T$

Para cada medio (r) seleccionado:

1°.- $k(0) = 0$, $P(0) = 10^6I$, $R = 1 \times 10^{-5}$

2°.- $g(i + 1) = P(i)c_c^T(i + 1) / [R + c_c(i + 1)P(i)c_c^T(i + 1)]$

$$P(i + 1) = [I - g(i + 1)c_c(i + 1)]P(i)[I - g(i + 1)c_c(i + 1)]^T + g(i + 1)Rg^T(i + 1)$$

$$k(i + 1) = k(i) + g(i + 1)[a_c(i + 1) - c_c(i + 1)k(i)]$$

para $i = 1, 2, \dots, m$ mezclas patrón.

Predicción:

Modelo $\mathbf{a} = \mathbf{Kc}$

$$1^\circ - \mathbf{c}(0) = 0, \mathbf{P}(0) = 10^6 \mathbf{I}, R = 1 \times 10^{-5}$$

$$2^\circ - \mathbf{g}(i+1) = \mathbf{P}(i)\mathbf{k}^T(i+1) / [\mathbf{R} + \mathbf{k}(i+1)\mathbf{P}(i)\mathbf{k}^T(i+1)]$$

$$\mathbf{P}(i+1) = [\mathbf{I} - \mathbf{g}(i+1)\mathbf{k}(i+1)]\mathbf{P}(i)[\mathbf{I} - \mathbf{g}(i+1)\mathbf{k}(i+1)]^T + \mathbf{g}(i+1)\mathbf{R}\mathbf{g}^T(i+1)$$

$$\mathbf{c}(i+1) = \mathbf{c}(i) + \mathbf{g}(i+1)[\mathbf{a}(i+1) - \mathbf{k}(i+1)\mathbf{c}(i)]$$

para $i = 1, 2, \dots, r$ medios seleccionados

siendo:

(i) valor que indica la iteración, una por cada fila de la matriz \mathbf{C}^T

$\mathbf{g}(i)$ matriz ($n \times 1$) llamada *factor de ganancia Kalman*

$\mathbf{k}(i)$ matriz ($n \times 1$) que contienen la constante de proporcionalidad estimada en cada iteración

$\mathbf{P}(i)$ matriz varianza-covarianza, de dimensiones ($n \times n$)

$\mathbf{c}(i)$ matriz ($1 \times n$) de concentración de n componentes en la mezcla i , es decir, la fila i de la matriz \mathbf{C}^T

R es un escalar que representa la varianza del ruido del blanco

\mathbf{I} matriz identidad de dimensiones ($n \times n$)

Dado que el filtro de Kalman es un método iterativo, se necesitan valores iniciales de $\mathbf{P}(i)$, $\mathbf{k}(i)$ en calibración, $\mathbf{C}(i)$ en predicción y R para comenzar el procedimiento. Cuando no tenemos información disponible a priori, se inicia generalmente con los valores de $\mathbf{k}(0) = 0$ en calibración, $\mathbf{C}(0) = 0$ en predicción y $\mathbf{P}(0) = \sigma^2 \mathbf{I}$. Poulisse sugiere que σ sea lo más grande posible y propone una ecuación empírica para su estimación. (POULISSE H.N.J., 1979) y para R se toma un valor por debajo del nivel del ruido. Algunos autores

recomiendan que cuando existen diferentes posibilidades, se tome el valor más bajo posible ya que generalmente este valor no afecta a los resultados del cálculo en un amplio intervalo (LIU Y.M., 1988).

VI.3.3.- Estudio teórico comparativo de los diferentes métodos de calibración utilizados.

El método clásico de calibración CLS, precisa incluir en el modelo todas las causas que afecten a la matriz de respuesta, es decir, la concentración de los analitos, la de los posibles interferentes así como cualquier otra causa que pueda variar la respuesta instrumental. Según esto podemos indicar que la mayor desventaja del método de calibración CLS es que han de ser conocidos todos los componentes químicos que interfieren en el sistema e incluirlos en la calibración.

En cambio, el método ILS permite la evaluación de las concentraciones de los analitos de interés aún en presencia de otras fuentes de variación no contempladas en la formulación del modelo. (TAULER R., 1991) por lo que con este método se minimizan los errores de concentración. Además, presenta la gran ventaja de que el análisis basado en este modelo es invariable respecto al número de componentes (n) incluidos en el análisis (HAALAND D.M., 1988).

La utilización de un método iterativo como el filtro de Kalman para el análisis multicomponente, también requiere un conocimiento previo de la matriz de absorbancias molares o específicas (K), como en CLS y en ILS. Esta matriz puede obtenerse mediante distintos procedimientos: i) a partir de las absorbancias de los componentes puros; ii) mediante calibración multivariante a partir de mezclas patrones utilizando el algoritmo CLS; iii) por regresión secuencial de las absorbancias obtenidas durante la calibración pa-

ra las concentraciones patrones utilizando el algoritmo basado en el filtro de Kalman. (BROWN S.D., 1991).

Una vez que se ha calculado la matriz de calibración K , se puede determinar una concentración desconocida midiendo absorbancias y usando un método iterativo, como el filtro de Kalman, en lugar de utilizar un método de regresión lineal como el CLS.

Ahora bien, el filtro de Kalman presenta una gran ventaja sobre el CLS, y ésta es que no necesita realizar inversión de matrices. (PÉREZ-ARRIBAS L.V., 1993).

VI.3.4.- Criterios de validación de resultados.

Es importante que un método analítico esté libre de errores sistemáticos, es decir, que el valor obtenido en la determinación de un analito sea el valor verdadero. Ahora bien, la existencia de errores aleatorios impiden que la cantidad medida sea exactamente igual al valor verdadero, incluso en ausencia de errores sistemáticos. Cuando se hace una determinación, sin tener una idea previa de las medidas experimentales, los resultados pueden tener desviaciones positivas o negativas respecto al valor verdadero. Esta es la razón por la que se necesita disponer de una prueba que cubra ambas posibilidades. Esta prueba se denomina bilateral o prueba de dos colas.

Por todo esto, cuando se pone a punto un método, es necesario aplicar unas pruebas estadísticas llamadas pruebas de significación, mediante las cuales podemos apreciar si las diferencias entre dos resultados experimentales son o no significativas.

Hasta aquí se ha hablado de la necesidad de detectar errores sistemáticos, pero en muchos casos es importante determinar errores aleatorios a través de las desviaciones estándar.

La prueba F considera la razón entre dos varianzas, es decir, la razón de los cuadrados de las desviaciones estándar. Si el valor de F excede de un valor conocido y tabulado ($F_{\text{crítico}}$) entonces se puede decir que existen diferencias entre ambas desviaciones estándares al nivel de significación y del tamaño de las muestras determinado.

Además de los errores experimentales es importante detectar y determinar las anomalías u "outliers" debidas a fenómenos inesperados tales como ruidos inespecíficos, derivas instrumentales...

No todas las anomalías representan errores inútiles ("outliers malos") pues algunos nos pueden conducir a una información muy valiosa, por lo que se puede decir que existen ciertos datos, que si bien están fuera de un límite, no son totalmente erróneos o anormales, por lo que para que el aprovechamiento de los datos sea óptimo, es muy importante detectarlos. La calibración multivariante constituye una herramienta muy poderosa para detectar éstos de forma automática.

VI.3.5.- Procedimiento para la aplicación de los métodos de calibración multivariante.

Para llevar a cabo la **etapa de calibración** como se ha dicho anteriormente, en esta experiencia se ha utilizado un diseño factorial simplex cerrado para cuatro componentes en cinco niveles de concentración.

Considerando que en las muestras ambientales puede haber ausencia de algunas de estas especies, se han incluido "ceros" en el diseño. Ahora bien, para no complicar en exceso, ni introducir demasiadas indeterminaciones, sólo se han contemplado las ausencias

de las especies inorgánicas por ser las más tóxicas y como consecuencia son las especies que exigen un mayor control.

De esta manera, los intervalos de concentración empleados han sido los siguientes:

Arsénico inorgánico (III y V): intervalo de concentración de 0 - 40 ng ml⁻¹

nivel 1 = 0 ng ml⁻¹

2 = 10

3 = 20

4 = 30

5 = 40

Arsénico orgánico (MMA y DMA): intervalo de concentración de 10 - 50 ng ml⁻¹

nivel 1 = 10 ng ml⁻¹

2 = 20

3 = 30

4 = 40

5 = 50

Como se ha dicho anteriormente, para aplicar métodos de calibración multivariante es necesario disponer de sistemas superdeterminados. Como consecuencia de esto, se seleccionan seis medios para la generación de la arsina a partir de las distintas mezclas.

Los medios seleccionados son: HCl 6M, HCl 1M, HCl 0.5M, cítrico/citrato de pH=2 y cítrico/citrato de pH=4 . La elección de estos medios se ha basado en la utilización de

éstos en distintas partes de este trabajo. Al ser necesario otro medio más de generación más, se ha escogido el AcH 1M recomendado para la reducción selectiva de especies de As (ANDERSON R.K., 1986).

En conjunto, resultaron 35 mezclas, con 60 ng ml^{-1} de concentración total, obteniéndose las absorbancias mediante la generación de su hidruro en los distintos medios seleccionados: HCl 6M, HCl 1M, HCl 0.5M, AcH 1M, cítrico/citrato de pH=2 y cítrico/citrato de pH=4 que se incluyen en la Tabla VI.6.

Además, al poder influir la referencia utilizada para la normalización de los datos, se utilizaron dos referencias:

SERIE A: la disolución de referencia es una disolución de 60 ng ml^{-1} de As(III).

SERIE B: la disolución de referencia es una mezcla de As(III), As(V), MMA y DMA 20, 20, 30, 30 ng ml^{-1} respectivamente .

Tabla VL6- Absorbancias, corregidas respecto a una disolución de referencia, correspondientes a las 35 mezclas, en los medios HCl 6M, HCl 1M, HCl 0.5M, AcH 1M, cítrico/citrato de pH=2 y cítrico/citrato de pH=4, utilizadas para la calibración.

Nº	Nivel	concentración (ng ml ⁻¹)				HCl			AcH	cítrico/citrato	
		As(III)	As(V)	MMA	DMA	6M	1M	0.5M	1M	pH=2	pH=4
1	1:1:1:5	0	0	10	50	0.110±0.002	0.093±0.002	0.061±0.001	0.041±0.001	0.043±0.002	0.015±0.002
2	1:1:2:4	0	0	20	40	0.112±0.001	0.092±0.001	0.068±0.002	0.053±0.002	0.053±0.002	0.019±0.002
3	1:1:3:3	0	0	30	30	0.092±0.002	0.091±0.001	0.069±0.002	0.058±0.002	0.056±0.002	0.028±0.001
4	1:1:4:2	0	0	40	20	0.090±0.001	0.092±0.001	0.080±0.002	0.072±0.003	0.060±0.001	0.035±0.001
5	1:1:5:1	0	0	50	10	0.073±0.001	0.086±0.001	0.075±0.002	0.073±0.001	0.050±0.002	0.033±0.002
6	1:2:1:4	0	10	10	40	0.120±0.002	0.090±0.002	0.059±0.002	0.044±0.002	0.042±0.002	0.016±0.002
7	1:2:2:3	0	10	20	30	0.110±0.002	0.088±0.002	0.068±0.003	0.053±0.001	0.043±0.002	0.016±0.001
8	1:2:3:2	0	10	30	20	0.107±0.002	0.096±0.001	0.067±0.003	0.063±0.002	0.047±0.002	0.028±0.001
9	1:2:4:1	0	10	40	10	0.100±0.001	0.091±0.002	0.070±0.002	0.066±0.002	0.043±0.002	0.032±0.002
10	1:3:1:3	0	20	10	30	0.128±0.002	0.091±0.002	0.054±0.001	0.041±0.001	0.032±0.003	0.011±0.001
11	1:3:2:2	0	20	20	20	0.121±0.003	0.095±0.001	0.062±0.002	0.051±0.002	0.036±0.001	0.020±0.001
12	1:3:3:1	0	20	30	10	0.121±0.003	0.094±0.002	0.067±0.003	0.061±0.002	0.047±0.001	0.024±0.001
13	1:4:1:2	0	30	10	20	0.115±0.001	0.078±0.002	0.055±0.001	0.042±0.001	0.037±0.001	0.019±0.001
14	1:4:2:1	0	30	20	10	0.111±0.001	0.079±0.001	0.063±0.001	0.054±0.001	0.042±0.001	0.027±0.001
15	1:5:1:1	0	40	10	10	0.129±0.001	0.070±0.002	0.050±0.001	0.040±0.001	0.032±0.001	0.016±0.001
16	2:1:1:4	10	0	10	40	0.118±0.002	0.072±0.001	0.064±0.001	0.0054±0.001	0.049±0.001	0.023±0.002
17	2:1:2:3	10	0	20	30	0.110±0.001	0.073±0.001	0.071±0.001	0.066±0.001	0.049±0.002	0.033±0.002

Tabla VL6.- (Continuación)

Nº	Nivel	concentración (ng ml ⁻¹)				HCl			AcH	cítrico/citrato	
		As(III)	As(V)	MMA	DMA	6M	1M	0.5M	1M	pH=2	pH=4
18	2:1:3:2	10	0	30	20	0.104±0.001	0.067±0.001	0.073±0.003	0.069±0.001	0.046±0.002	0.036±0.001
19	2:1:4:1	10	0	40	10	0.102±0.002	0.071±0.003	0.080±0.003	0.077±0.001	0.054±0.001	0.042±0.001
20	2:2:1:3	10	10	10	30	0.106±0.001	0.079±0.002	0.060±0.003	0.053±0.001	0.041±0.001	0.023±0.001
21	2:2:2:2	10	10	20	20	0.108±0.002	0.075±0.001	0.068±0.002	0.063±0.0020	0.045±0.002	0.032±0.002
22	2:2:3:1	10	10	30	10	0.108±0.002	0.072±0.001	0.070±0.002	0.051±0.001	0.052±0.002	0.039±0.001
23	2:3:1:2	10	20	10	20	0.115±0.002	0.078±0.003	0.058±0.001	0.068±0.001	0.042±0.001	0.023±0.001
24	2:3:2:1	10	20	20	10	0.111±0.002	0.075±0.001	0.061±0.001	0.058±0.002	0.043±0.001	0.033±0.001
25	2:4:1:1	10	30	10	10	0.115±0.002	0.072±0.002	0.076±0.002	0.044±0.001	0.041±0.001	0.025±0.002
26	3:1:1:3	20	0	10	30	0.116±0.001	0.086±0.002	0.099±0.002	0.074±0.001	0.061±0.002	0.045±0.002
27	3:1:2:2	20	0	20	20	0.099±0.002	0.076±0.003	0.091±0.002	0.065±0.002	0.055±0.001	0.048±0.001
28	3:1:3:1	20	0	30	10	0.094±0.002	0.080±0.002	0.096±0.002	0.075±0.002	0.056±0.001	0.053±0.002
29	3:2:1:2	20	10	10	20	0.116±0.002	0.071±0.002	0.087±0.002	0.057±0.001	0.048±0.001	0.041±0.002
30	3:2:2:1	20	10	20	10	0.105±0.002	0.076±0.002	0.090±0.002	0.066±0.001	0.053±0.001	0.046±0.001
31	3:3:1:1	20	20	10	10	0.117±0.001	0.072±0.002	0.082±0.001	0.053±0.002	0.044±0.001	0.034±0.002
32	4:1:1:2	30	0	10	20	0.115±0.002	0.075±0.003	0.097±0.001	0.063±0.001	0.048±0.001	0.039±0.002
33	4:1:2:1	30	0	20	10	0.106±0.002	0.069±0.002	0.101±0.002	0.075±0.001	0.053±0.001	0.048±0.001
34	4:2:1:1	30	10	10	10	0.113±0.002	0.065±0.002	0.096±0.002	0.066±0.001	0.051±0.002	0.039±0.001
35	5:1:1:1	40	0	10	10	0.109±0.002	0.070±0.002	0.109±0.003	0.073±0.003	0.054±0.001	0.050±0.001

Una vez obtenidas todas las absorbancias correspondientes a las 35 mezclas preparadas, se ha procedido a la aplicación de los algoritmos correspondientes a la calibración CLS, ILS y filtro de Kalman anteriormente descritos si bien y con el fin de detectar los posibles errores inútiles, se aplicó el *criterio F* para la determinación de datos que están fuera de rango "outliers" (MARTENS H., 1989). Como este criterio detecta "outliers buenos y malos" aplicamos el método del efecto leva, más conocido por "*Leverage*" para confirmar dichos datos. Mediante la aplicación de estos dos criterios, consideramos datos erróneos aquellos que coinciden en ambos. En nuestro caso no ha coincidido ninguna mezcla por lo que no eliminamos ninguna de ellas.

Antes de exponer los resultados obtenidos, se detallan estos dos criterios utilizados.

Criterio F

En el criterio F se considera la razón de dos varianzas, es decir, la razón de los cuadrados de las desviaciones estándar. Si el valor calculado de F excede un cierto valor tabulado, F crítico, entonces se rechaza el dato. El valor tabulado de F depende del tamaño de las muestras, del nivel de significación y del tipo de prueba realizada.

Para la eliminación de datos según este criterio se aplican las siguientes ecuaciones:

*** Varianza residual de una mezcla de calibración:**

$$s^2(r_i) = \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2}{n(m-1)/m}$$

* Varianza residual total:

$$s^2(r) = \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\hat{c}_{ij} - c_{ij})^2}{n(m-1)}$$

$$F_{cal} = \frac{s^2(r_i)}{s^2(r)}$$

El valor de F_{cal} se compara con el valor de $F_{crit}(v_1, v_2, \alpha)$ correspondiente siendo:

\hat{c}_{ij} = puesto

c_{ij} = encontrado

$$v_1 = \frac{n(m-1)}{m}$$

$$v_2 = n(m-1)$$

$$\alpha_{calibración} = 0.05$$

n = de componentes

m = mezclas

r = medios

Leverage

Para la aplicación de este criterio, hay que considerar que cuando se aplica a métodos multivariantes basados en una regresión lineal, CLS e ILS, o bien en métodos iterativos, filtro de KALMAN, A es la matriz de absorbancias en calibración y cuyas dimensiones son $r \times m$, siendo r los medios de generación utilizados y m las mezclas empleadas.

Una vez hechas estas consideraciones se realizan los siguientes pasos:

(WEISBERG S., 1985)

1°) $(AA^T) = (r \times r)$

2°) $(AA^T)^{-1} = (r \times r)$

3°) Para cada mezcla

$a^T(AA^T)^{-1}a = h$; donde h (leverage) está comprendido entre 0 y 1, y a es el vector de absorbancia medido para cada mezcla en cada medio.

$$\begin{pmatrix} a_{11} \\ a_{12} \\ a_{13} \\ a_{14} \\ a_{15} \\ a_{16} \end{pmatrix} = a_{ij}$$

4°) Cuando $h_{cal} > h_{crit}$ se trata de un "outlier"; $h_{crit} = 2 \frac{\text{medios}}{\text{mezclas}}$ (HOCKING R.R., 1983)

Cuando ambos criterios, F y Leverage, coinciden para una misma mezcla se elimina el dato.

Una vez aplicados los dos criterios de eliminación de datos y comprobados que no debemos eliminar ninguna mezcla, ya que todos son "outliers buenos", para los tres métodos de calibración estudiados, se ha calculado el % de error de calibración y la desviación estándar de cada uno de los componentes en la determinación conjunta, mediante las siguientes ecuaciones:

% Error en calibración:

$$\% \text{ Error cal} = \sqrt{\frac{\sum_1^m (\hat{c}_i - c_i)^2}{\sum_1^m \hat{c}_i^2}} \times 100$$

de esta forma calculamos el error en % del componente i en el conjunto de mezclas de calibración.

Desviación estándar:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_1^m (\hat{c}_i - c_i)^2}{(m-1)}}$$

Los resultados obtenidos, para cada serie de datos, se muestran en las Tablas VI.7 y VI.8:

Tabla VI.7.- Valores de % de error de calibración, desviación estándar, para los métodos de calibración multivariante utilizados, para un nivel de significación de $\alpha=0.05$ y Límite de Detección. (SERIE A).

	CLS		ILS		Filtro de KALMAN	
	% Error cal	Desv. Estand	% Error cal	Desv. Estand	% Error cal	Desv. Estand
As(III)	27.3	4.1	23.7	3.6	27.2	4.1
As(V)	81.0	12.2	43.7	6.6	67.4	10.1
MMA	40.2	9.3	27.0	6.3	38.3	8.9
DMA	61.8	14.3	32.3	7.5	58.3	13.5
Lim.Detecc.	5.2 ng ml ⁻¹		4.9 ng ml ⁻¹		5.4 ng ml ⁻¹	

Tabla VI.8.- % de error de calibración, desviación estándar, para un nivel de significación de $\alpha=0.05$ y Límite de Detección. (SERIE B).

	CLS		ILS		Filtro de KALMAN	
	% Error cal	Desv. Estand	% Error cal	Desv. Estand	% Error cal	Desv. Estand
As(III)	30.6	4.6	23.7	3.6	31.1	4.7
As(V)	72.5	10.9	42.3	6.4	59.5	8.9
MMA	41.1	9.5	28.7	6.6	42.3	9.8
DMA	57.0	13.2	32.3	7.5	56.3	13.1
Lim.Detecc.	4.6 ng ml ⁻¹		3.9 ng ml ⁻¹		5.1 ng ml ⁻¹	

A la vista de estos resultados en ambas series, se puede destacar que en la calibración con el método inverso ILS se obtienen mejores resultados ya que presenta valores de desviación estándar algo más bajos que los de los otros métodos, es decir es algo más preciso, y sobre todo es mucho más exacto tal y como lo demuestra los valores de % de error de calibración.

Una vez que hemos terminado la etapa de calibración, se procede a la realización de la segunda etapa del análisis multivariante, es decir, la **etapa de predicción**.

Para ello, se preparan 10 mezclas de los cuatro componentes, obtenidas mediante un diseño aleatorio y cuyas concentraciones están comprendidas entre 0 y 35 ng ml⁻¹, midiendo sus absorbancias en los medios ácidos de generación seleccionados. El diseño de las diez mezclas viene reseñado en la Tabla VI.9.

Las absorbancias obtenidas para esta mezclas, también se normalizaron con dos referencias distintas con el fin de comprobar si afectaba a los resultados, el normalizar con una disolución de un sólo componente respecto a normalizar con una mezcla de los cuatro componentes.

Tabla VI.9.- Diseño de las diez mezclas de los cuatro componentes utilizadas en la etapa de predicción (ng ml⁻¹).

Mezcla n°	As(III)	As(V)	MMA	DMA
1	0	20	35	35
2	20	25	15	35
3	30	25	20	15
4	25	0	20	25
5	20	30	30	30
6	25	15	35	25
7	30	30	25	20
8	15	20	30	30
9	30	15	15	30
10	25	20	25	15

Serie A: la disolución de referencia es una disolución de 60 ng/ml de As(III)

Serie B: la disolución de referencia era una mezcla de As(III), As(V), MMA, DMA:
20, 20, 30, 30 ng ml⁻¹.

Con los datos experimentales obtenidos, se aplica el algoritmo correspondiente a esta etapa para cada método de calibración multivariante objeto de este estudio.

VI.3.6.- Estudio comparativo de los resultados obtenidos en los distintos métodos de calibración. Error estándar de predicción (SEP).

En el presente trabajo, para la comparación de los tres métodos de calibración multivariante estudiados, se ha utilizado la prueba F que nos da la razón de los cuadrados de los errores estándar de predicción (SEP), calculados a partir de las siguientes ecuaciones:

$$SEP = \sqrt{\frac{\sum_1^m (\hat{c}_i - c_i)^2}{m_p}}$$

siendo m_p el número de muestras utilizadas en predicción.

Los resultados obtenidos se recogen en las Tablas VI.10 y VI.11.

Tabla VI.10.- Valores de los errores estándar de predicción en ILS, para las cuatro especies de arsénico, empleando dos referencias distintas, utilizando 10 mezclas de predicción.

	SEP	
	ILS (serie A)	ILS (serie B)
As(III)	6.3	5.4
As(V)	7.9	6.2
MMA	8.0	6.4
DMA	13.1	10.9

Como puede verse en esta Tabla VI.10, se obtienen errores estándar de predicción algo mas altos cuando se normalizan los valores de las absorbancias con un sólo componente.

Ahora bien, para ver si estas series son comparables aplicamos el criterio F obteniendo los valores de F que se muestran en la Tabla VI.11.

Tabla VI.11.- Valores de F para comparar las series A y B.

F (Serie A/Serie B)	
As(III)	1.4
As(V)	1.6
MMA	1.6
DMA	1.4

* $F_{crit}(\alpha_p=0.05)=3.7$

A la vista de estos resultados se puede decir que no existen diferencias significativas entre las dos series por lo que a partir de este punto, se utilizará como mezcla de referencia para la normalización de los datos de absorbancia, una disolución de 60 ng ml^{-1} de As(III) ya que es menos probable cometer errores en su preparación.

Una vez seleccionada la serie A de los datos, se procede a la comparación de resultados en los tres métodos de calibración utilizados: CLS, ILS y fitro de Kalman.

Los resultados de esta comparación se muestran en las Tablas VI.12 y VI.13.

Tabla VL12.- Valores de errores estándar de predicción para las cuatro especies de arsénico, utilizando 10 mezclas de predicción. (SERIE A).

SEP			
	CLS	ILS	Kalman
As(III)	7.7	6.3	7.1
As(V)	12.4	7.9	11.8
MMA	9.6	8.0	12.1
DMA	17.7	13.1	22.3

Como se puede ver, los errores mas bajos en conjunto, para las cuatro especies se obtienen cuando se aplica el método ILS.

A continuación para comprobar si existen o no diferencias significativas entre los tres métodos, se aplica el criterio F.

$$F = \frac{(\text{SEP})_1^2}{(\text{SEP})_2^2} > 1$$

Si $F_{\text{cal}} > F_{\text{crit}}$ los métodos no son comparables.

$$F_{\text{crit}}(\alpha_p=0.05)=3.7$$

Tabla VI.13.- Valores correspondientes a las F calculadas para comparar los tres métodos de calibración multivariante utilizados: CLS, ILS y filtro de Kalman.

	F_{cal}		
	CLS / ILS	CLS / KALMAN	KALMAN / ILS
As(III)	1.5	1.2	1.3
As(V)	2.5	1.1	2.2
MMA	1.4	1.6	2.3
DMA	1.8	1.6	2.9

A la vista de esta tabla puede destacarse que todos los valores de F son más pequeños que el correspondiente a F_{crit} , para $\alpha_p=0.05$, por lo que los tres métodos son comparables.

VI.3.7.- Error relativo de predicción (REP)

Para cuantificar el error global cometido en la determinación de cada componente, cuando se realiza esta determinación conjunta mediante los métodos de calibración multivariante, se utiliza el error relativo de predicción que se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$REP = \sqrt{\frac{\sum_1^m (\hat{c}_i - c_i)^2}{\sum_1^m \hat{c}_i^2}} \times 100$$

Aplicando esta ecuación a los valores obtenidos para las diez mezclas de predicción utilizadas se obtienen los siguientes errores, Tabla VI.14:

Tabla VI.14.- Valores del error relativo de predicción en % para cada componente cuando se calibra con mezclas binarias, ternarias y cuaternarias de los cuatro componentes ($\alpha=0.05$). SERIE A.

REP			
	CLS	ILS	Kalman
As(III)	10.9	8.9	9.9
As(V)	19.7	12.5	18.7
MMA	12.1	10.2	15.3
DMA	21.5	15.9	27.1

Con los datos recogidos en esta tabla podemos observar que los errores de predicción cometidos cuando se aplican métodos directos como el CLS y el filtro de Kalman, superan en alguno de los componentes el 20% mientras que cuando se aplica el método ILS el error de predicción está cercano al 10% en todos los componentes excepto para el DMA (~ 16%).

Conviene recordar en este punto que se trata de una determinación conjunta de las cuatro especies y que para la calibración se han utilizado mezclas de los cuatro componentes binarias, ternarias y cuaternarias ya que se incluyeron "ceros" para las especies inorgánicas de arsénico.

VI.3.8.- Estudio de simplificación del procedimiento de calibración multivariante.

Como se ha visto en anteriores apartados de esta memoria, las líneas de calibrado de estas cuatro especies de arsénico, en los distintos medios de generación estudiados, no pasaban por el origen, por lo que se pensó eliminar las mezclas con ausencia de alguna de las especies y se hizo un nuevo diseño en el que todas las mezclas utilizadas contenían los cuatro componentes con el fin de ver si era posible disminuir los errores.

Por esta razón se realizó el nuevo calibrado constituido por 25 mezclas de los cuatro componentes en cinco niveles de concentración, obtenidas mediante diseño factorial fraccionado, pero en el que no se contemplan ceros de ninguna de las especies.

En este caso también se han aplicado los dos criterios de eliminación de datos que están fuera de rango. Los resultados del % de error, desviación estándar, y límite de detección, se recogen en la Tabla VI.15.

Tabla VI.15.- % de error en calibración, Desviación estándar, Límite de Detección cuando se aplica el método ILS a 25 mezclas cuaternarias de As(III), As(V), MMA y DMA (SERIE A).

ILS		
	% Error cal	Desv. Estand
As(III)	22.4	5.3
As(V)	29.1	6.9
MMA	27.8	6.6
DMA	25.4	6.0
Lím. Detecc.	4.9 ng ml ⁻¹	

Siguiendo el mismo procedimiento del calibrado anterior, se obtienen los siguientes valores de errores de predicción, Tabla VI.16:

Tabla VI.16.- Valores de errores estándar de predicción y errores relativos de predicción, para los cuatro componentes cuando se calibra con mezclas cuaternarias de As(III), As(V), MMA y DMA, utilizando 10 mezclas de predicción y ($\alpha=0.05$).

ILS		
	SEP	% REP
As(III)	10.1	14.6
As(V)	8.3	13.1
MMA	10.0	13.8
DMA	7.2	8.7

Si comparamos los valores del REP cuando se aplica el método de calibración multivariante ILS para calibrados obtenidos con o sin "ceros" de las especies inorgánicas (ver Tabla VI.14.), podemos resaltar que en ambos casos los errores para las cuatro especies son del mismo orden (~12%).

En vista de que los resultados en cuanto a errores de predicción son similares, se procede a comprobar si son comparables los dos calibrados (el obtenido con 35 mezclas binarias, ternarias y cuaternarias, y el obtenido con 25 mezclas todas ellas cuaternarias), mediante la aplicación del criterio F, Tabla VI.17.

Tabla VI.17.- Valores de F calculados para comparar los SEP obtenidos por aplicación del método ILS a 10 mezclas de predicción sobre un calibrado de 35 mezclas binarias, ternarias y cuaternarias o sobre un calibrado obtenido con 25 mezclas cuaternarias.

	F _{cal}
As(III)	2.6
As(V)	1.1
MMA	1.6
DMA	3.3

como $F_{crit} = 3.7$ y todos los valores de $F_{cal} < F_{crit}$ los resultados obtenidos son totalmente comparables.

A la vista de estos resultados podemos concluir que es mejor trabajar siempre con mezclas que contengan los cuatro componentes, ya que obtenemos errores análogos cuando utilizamos 25 mezclas cuaternarias para la calibración que cuando utilizamos 35 mezclas binarias, terciarias y cuaternarias de As(III), As(V), MMA y DMA. Sin embargo, al reducir el número de mezclas utilizadas en la calibración, el tiempo de análisis se reduce considerablemente lo que supone una gran ventaja.

Una vez visto esto, se prepararon 12 mezclas de predicción de los cuatro componentes, se midieron sus absorbancias en los seis medios de generación, y se calculó su concentración sobre el calibrado obtenido con las 25 mezclas cuaternarias. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla VI.18:

Tabla VI.18.- Datos obtenidos para 12 mezclas cuaternarias de predicción, sobre calibrado de 25 mezclas cuaternarias.

	Especie	Valor puesto (ng ml ⁻¹)	Valor encontrado (ng ml ⁻¹)	Error %
MEZCLA N° 1	As(III)	14.0	16.1	+15.0
	As(V)	18.0	16.6	- 7.8
	MMA	28.0	24.0	-14.3
	DMA	25.0	23.9	- 4.4
MEZCLA N° 2	As(III)	18.0	20.5	+13.9
	As(V)	18.0	19.8	+10.0
	MMA	25.0	22.5	-10.0
	DMA	25.0	21.3	-14.8
MEZCLA N° 3	As(III)	25.0	26.6	+ 6.4
	As(V)	18.0	21.9	+21.7
	MMA	18.0	16.4	- 8.9
	DMA	25.0	20.4	-18.4
MEZCLA N° 4	As(III)	28.0	29.6	+ 5.7
	As(V)	18.0	20.9	+16.1
	MMA	14.0	13.8	- 1.4
	DMA	25.0	22.5	-10.0

Tabla VI.18. (Continuación)

MEZCLA N° 5	As(III)	18.0	20.4	+13.3
	As(V)	21.0	22.1	+ 5.2
	MMA	25.0	20.2	-19.2
	DMA	21.0	19.1	- 9.0
MEZCLA N° 6	As(III)	25.0	24.9	- 0.4
	As(V)	21.0	23.4	+11.4
	MMA	18.0	16.6	- 7.8
	DMA	21.0	17.9	-14.4
MEZCLA N° 7	As(III)	14.0	15.5	+10.7
	As(V)	25.0	21.3	-14.8
	MMA	28.0	25.3	- 9.6
	DMA	18.0	20.6	+14.4
MEZCLA N° 8	As(III)	18.0	15.6	-13.3
	As(V)	25.0	27.5	+10.0
	MMA	25.0	26.2	+ 4.8
	DMA	18.0	15.3	-15.0
MEZCLA N° 9	As(III)	25.0	26.1	+ 4.4
	As(V)	25.0	25.8	+ 3.2
	MMA	18.0	16.6	- 7.8
	DMA	18.0	16.9	- 6.1
MEZCLA N° 10	As(III)	28.0	24.4	-12.8
	As(V)	25.0	27.8	+11.2
	MMA	14.0	15.8	+12.8
	DMA	18.0	16.7	- 7.2
MEZCLA N° 11	As(III)	18.0	21.5	+19.4
	As(V)	28.0	23.5	-16.1
	MMA	25.0	22.9	- 8.4
	DMA	14.0	16.8	+20.0
MEZCLA N° 12	As(III)	25.0	25.9	+3.6
	As(V)	28.0	26.6	- 5.0
	MMA	18.0	17.8	- 1.1
	DMA	14.0	16.6	+18.6

Como puede apreciarse en esta tabla, existen errores puntuales algo elevados, si bien, en general, estos se corresponden con las concentraciones más bajas.

Los valores obtenidos, en % de recuperación, se recogen en la Tabla VI.19.

Tabla VI.19.- % de recuperación global para cada componente en las 12 mezclas de predicción.

	% Recuperación \pm s
As(III)	105 \pm 10
As(V)	104 \pm 12
MMA	94 \pm 8
DMA	96 \pm 14

Si se representan gráficamente los valores medios de las recuperaciones de cada componente, considerando todas las mezclas de predicción, con sus correspondientes desviaciones se observa que dichos valores están próximos al 100%, Figura VI.5.

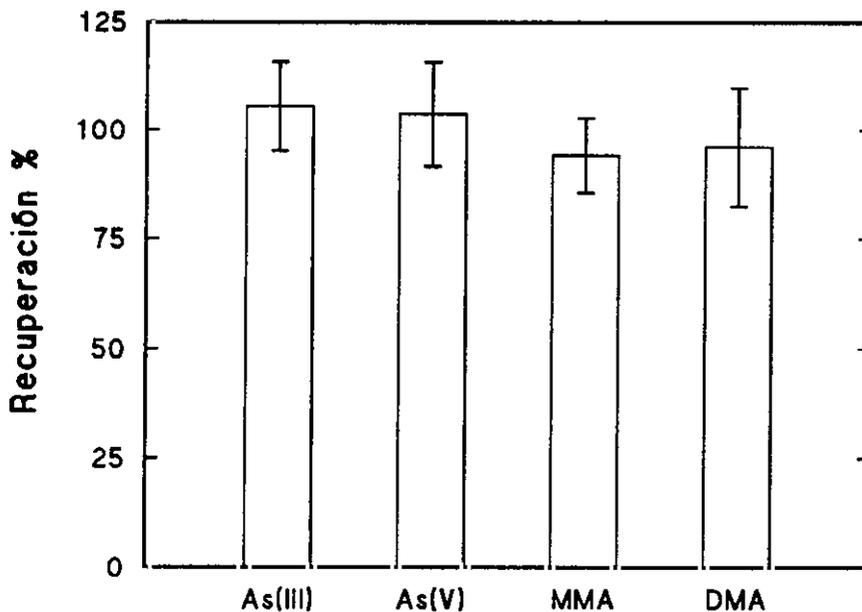


Figura VI.5.- Recuperación, en %, de cada componente considerando las 12 mezclas de predicción sobre el calibrado con 25 mezclas cuaternarias. ($\bar{x} \pm s$).

VI.3.9.- Aplicaciones a muestras reales.

El método propuesto, ILS, se ha aplicado a muestras sintéticas con matrices reales.

Dada la complejidad de conseguir muestras reales con contenidos de arsénico dentro de los límites de detección del método y, teniendo en cuenta la limitación de no poder utilizar métodos de mineralización porque alteran los estados de oxidación de las especies, se realizaron estudios de recuperación en muestras de agua.

Por tanto, para dichos estudios se eligieron dos muestras : un agua mineral embotellada y un agua de mar (Mediterráneo). En esta elección se tuvo en cuenta que los contenidos en sales fueran lo más dispares posible, de tal manera que por una parte se pudiera comprobar la efectividad del método y por otra la posibilidad de detectar efectos de matriz.

El procedimiento seguido para llevar a cabo estos análisis se detalla a continuación.

Se tomaron las muestras de agua y se prepararon distintas disoluciones con mezclas cuaternarias elegidas al azar, entre las utilizadas en la etapa de calibración realizada con 25 mezclas de los cuatro componentes, Tabla VI.20.

Tabla VI.20.- Diseño mezclas adicionadas a las aguas reales (ng ml^{-1}).

Adición	As(III)	As(V)	MMA	DMA
1	7	7	35	35
2	14	21	28	21
3	28	28	14	14
4	21	35	21	7

Se prepararon cuatro adiciones a cada una de las muestras con el fin de extremar las condiciones experimentales, es decir, para ver la efectividad del método sin necesidad de realizar un número elevado de adiciones, como ya se hizo en los estudios previos en los que se utilizaron doce mezclas distintas.

La elección de cuatro muestras de adiciones y una muestra sin adiciones, tiene por objeto el asemejar, lo mas posible, estos procedimientos con los procedimientos de calibración univariantes, es decir, calibrados mínimos de cinco puntos, de tal manera que se pudiera evitar, en controles de rutina, un trabajo excesivo.

Durante todo el análisis se realizó un seguimiento constante de las muestras, analizando ambas muestras de agua en un mismo día y comparando las absorbancias obtenidas con las mismas adiciones sobre agua ultrapura que actuaba como posible blanco.

Con todo esto, se comprobó que en ninguna de las dos muestras de agua analizadas, agua mineral y agua de mar, existía efecto matriz. Los resultados de las recuperaciones obtenidos se recogen en la Tabla VI.21:

Tabla VI.21.- Valores de % de recuperación, expresado como $\bar{x} \pm s$, en muestras de agua aplicando el método ILS de calibración multivariante.

% Recuperación			REP(ILS)
	Agua mineral	Agua de mar	
As(III)	106±29	109±27	14.6
As(v)	111±36	107±37	13.1
MMA	108±22	103±24	13.8
DMA	118±33	116±33	8.7

La representación gráfica de estos valores se muestran en las figuras VI.6 y VI.7.

A la vista de estos resultados, conviene comentar que aunque los valores obtenidos para las desviaciones estándar globales son algo elevados, hay que tener muy presente que se han obtenido las mayores desviaciones en las contenidos más bajos de los distintos componentes y que el número de adiciones ha sido muy pequeño. El intervalo de error podría rebajarse considerablemente sin más que aumentando el número de adiciones en cada análisis.

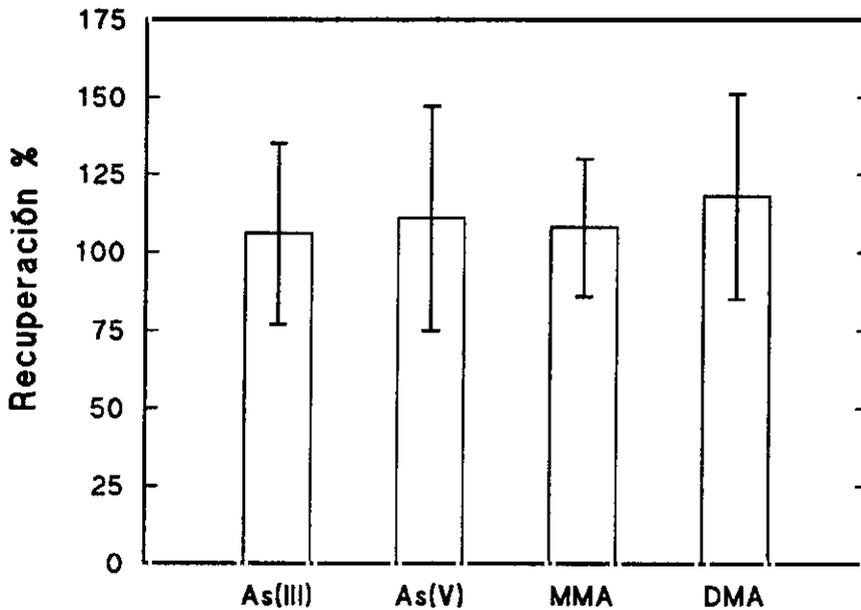


Figura VI.6.- % de recuperación en agua mineral ($\bar{x} \pm s$).

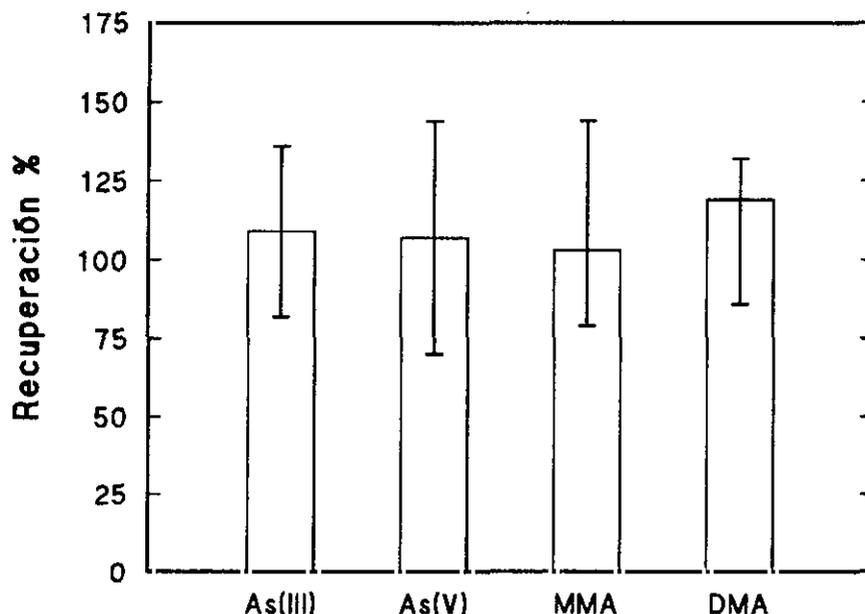


Figura VL7.- % de recuperación en agua de mar ($\bar{x} \pm s$).

Ahora bien, si consideramos los valores de los errores relativos de predicción (REP) obtenidos mediante la aplicación del método inverso ILS, vemos que los valores obtenidos para cada una de las especies de arsénico determinadas, se encuentran dentro del error de predicción del método.

Aún así, se ha querido confirmar si ambos procedimientos de análisis utilizados, 12 adiciones ó 4 adiciones, son comparables se han aplicados los siguientes criterios de comparación de métodos:

- 1.- Test MANN-WHITNEY para dos colas y distribución no normal (MILLER J.C., 1988).

2.- Test COCHRAN para dos colas y distribución normal (COCHRAN W.G., 1941, 1974).

En ambos casos se ha obtenido que no hay diferencias significativas, para ninguna de las especies de arsénico determinadas, al nivel de probabilidad del 95 % en las dos muestras de agua analizadas.

Por todo esto se puede afirmar que, incluso utilizando un número de adiciones muy reducido, el método es totalmente válido para la determinación de As(III), As(V), MMA y DMA en muestras de agua sin necesidad de separaciones previas, sobre todo en controles rutinarios.

Este método tiene gran aplicabilidad en análisis de rutina ya que una vez realizada la etapa más tediosa correspondiente a la etapa de diseño y calibración para un tipo determinado de matriz, basta con la medida y normalización de la absorbancia de la muestra, para aplicar el algoritmo y obtener el contenido de As(III), As(V), MMA y DMA en dicha muestra.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA DE LA PARTE EXPERIMENTAL

- * AGGETT J., ASPELL A.C. *Analyst*, 101, 341, (1976).
- * ANDERSON L.R. *Practical statistics for Analytical Chemists*, N.Y., (1987).
- * ANDERSON R.K., THOMPSON M. y CULBARD E. *Analyst*, 3, 1143 (1986).
- * ANDERSON R.K., THOMPSON M. y CULBARD E. *Analyst*, 3, 1153 (1986).
- * ARBAB-ZAVAR M.H. y HOWARD A.G. *Analyst*, 105, 744, (1980).
- * BARNET H.A. and BARTOLI A. *Anal. Chem*, 32, 1153, (1960).
- * BEEBE K.R. and KOWALSKI B.R. *Analytical Chemistry*, 59, 1007, (1987).
- * BERNARD H., PINTA M. *At. Spectrosc.* 3, 8, (1982).
- * BOAMPONG C., BRINDLE J.D., LE C.X., PIDWERBESKY L., CECCARELLI C.M. *Anal. Chem.*, 60, 1185, (1988).
- * BODE H. y HACHMANN K. *Z. Anal. Chem.*, 241, 18, (1968).
- * BRAMAN R.S., FOREBACK C.C. *Science*, 182, 1247, (1973).
- * BRERETON R.G. *Chemometrics. Applications of Mathematics and Statistics to Laboratory Systems*. Ellis Harwood Limited. England, (1990).
- * BROWN C.W., LYNCH P.F., OBREMSKI R.J. and LAVERY D.S. *Anal. Chem.*, 54, 1472, (1982).
- * BROWN S.D. *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, 10, 87, (1991).

- * COCHRAN W.G. "The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total". *Annals. of Eugenics*, 11, 47, (1974).
- * COCHRAN W.G. y COX G.M. *Diseños experimentales*. Ed. Trillas, (1941).
- * CREED J.T., MOHAMED A.H., DAVIDSON T.M., ATAMAN G. y CARUSO J.A. *J. Anal. At. Spectrom.*, 3, 923, (1988).
- * CSIKKEL-SZOLNOKI A., CSAKI-TOMBACZ E., VERES S. y BURGER K. *Acta Chimica Ungarica*, 123, 45, (1986).
- * CHATTERJEE A., DAS D., MANDAL B.K., CHOWDHURY T.R., SAMANTA G., CHAKRABORTI D. *Analyst*, 120, 643, (1995).
- * D'ULIVO A., FUOCO R. and PAPOFF P. *Talanta*, 33, 401, (1986).
- * DEDINA J. *Anal. Chem.*, 54, 2097, (1982).
- * DEDINA J., RUBESKA Y. *Spectrochim. Acta B*, 35, 119, (1980).
- * DITTRICH K., MANDRY R. *Analyst*, 111, 277, (1986).
- * DITTRICH K., VORBERG B., WOTHERS H. *Talanta*, 26, 747, (1979).
- * DUBOIS L., TEICHMAN T., BACKER C.J., ZDROJEWSKI A. y MONKMAN L.J. *Microchim. Acta*, 185, (1969).
- * EBDON L., HILL S., WALTON A.P. y WARD R.W.K *Analyst*, 113, 1159, (1988).
- * FRESENIUS W. y SCHNEIDER W. *Z. Anal. Chem.*, 203 417, (1964).

- * **GEMPERLINE P.J., LONG J.R. and GREGORIU V.G.** *Anal. Chem.*, 63, 2313, (1991).
- * **GLICK M., BRUSHWYLER K.R. and HIEFTJE G.M.** *Applied spectroscopy*, 45, 328, (1991).
- * **HAALAND D.M. and THOMAS E.V.** *Anal. Chem.*, 60, 1193, (1988).
- * **HARVEY D.T. and BOWMAN A.** *Journal of Chemical Education*, 67, 470, (1990).
- * **HENRION G., HENRION R. HEBISCH R. and BOEDEN B.** *Anal. Chim. Acta.*, 268, 115, (1992).
- * **HERSEY L.W., KELIHER P.N.** *Spectrochim. Acta*, 41B, 713, (1986).
- * **HINNER T.A.** *Analyst*, 105, 751, (1980).
- * **HOCKING R.R.** *Technometrics*, 25, 219, (1983).
- * **HOWARD A.G., ARBAB-ZAVAR M.H.** *Analyst*, 105, 338, (1980).
- * **IKEDA M.** *Anal. Chim. Acta*, 167, 289, (1985).
- * **JACKWERTH H., WILLMER P.G., HOEHN R., BERNDT H.** *At. Absortion Newuslett*, 18, 66, (1979).
- * **KALMAN R.E.** *J. Basic Eng.*, 82, 35, (1960).
- * **KISNER H.J., BROWN C.W. and KAVARNOS G.J.** *Anal. Chem.*, 55, 1703, (1983).
- * **KOCH O.G. y KOCH-DEDIC G.A.** *Handbuch der spurenanalyse Part.1*, 451, (1978).

- * LANG P.M. and KALIVAS J.H. *Journal of Chemometrics*, 7, 153, (1993).
- * LIU Y.M. and YU R.Q. *Talanta*, 35, 707, (1988).
- * MEYER A., HOFER C.H., TÖLEG G., RAPTIS S., KNAPP G. *Fresenius'z Anal. Chem.*, 296, 337, (1979).
- * MILLER J.C. and MILLER J.N. *Statistics for Analytical Chemistry*. John Wiley & Son, (1988).
- * MORIN P., AMRAN M.B., FAVIER S., HEIMBURGER R. y LEROY M. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 342, 357, (1992).
- * MÜSKENS P.J.W.M. *Anal. Chim. Acta*, 103, 445, (1978).
- * NARASAKI H., IKEDA M. *Anal. Chem.*, 56, 2059, (1984).
- * NAKAHARA T. *Prog. Anal. At. Spectrosc.*, 6, 163, (1983).
- * PAHLAVANPOUR B. y THOMPSON M. *International Conference of Heavy Metals in the Environment*; p.661, Amsterdam, (1981).
- * PEATS A.J. *At. Absorpt. Newsl*, 18, 118, (1979).
- * PÉREZ-ARRIBAS L.V., NAVARRO-VILLOSLADA F., LEÓN-GONZÁLEZ M.E. and POLO DÍEZ L.M. *Journal of Chemometrics*, 7, 267, (1993).
- * PETRICK K., KRIVAN V. *Fresenius'z Anal. Chem.*, 342, 327, (1987).
- * POULISSE H.N.J. *Anal. Chim. Acta*, 112, 361, (1979).

- * POWERS G.V., MARTIN R.L. y PIEHL E.J. *Anal. Chem.*, 31, 1589, (1959).
- * SALA G., MASPOCH S., ITURRIAGA H., BLANCO M. and CERDA V. *J. Pharmacol. Biomed. Anal.*, 6, 765, (1988).
- * SANDBO S. y NELSON P. *Anal. Chem.*, 50, 332, (1978).
- * SCHRAMED P. y XU L-Q. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 343, 373, (1992).
- * SEELING P.F. and BLOUNT H.N. *Anal. Chem.*, 51, 327, (1979).
- * SHARAF M.A., ILLMAN D.L. and KOWALSKI B.R. *Chemometrics*, 135, Wiley, New York, (1986).
- * SIEMER D.D., KOTEEL P. *Anal. Chem.*, 48, 836, (1976).
- * SMIDTH F.J. y ROYER J.L. *Anal. Lett.*, 6, 17, (1973).
- * STEINKE J. Z. *Anal. Chem.*, 240, 184, (1968).
- * SUBRAMANIAN K.S., MERAGER J.C. *Analyst*, 107, 157, (1982).
- * TAULER R., IZQUIERDO-RIDORSA A. y CASASSAS E. *Anales de Química*, 87, 571, (1991).
- * THOMAS E.V. and HAALAND D.M. *Anal. Chem.*, 62, 1091, (1990).
- * THOMPSON K.C. and THOMERSON D.R. *Analyst*, 99, 595, (1974).
- * THOMPSON A.J., THORESBY P.A. *Analyst*, 102, 9, (1977).

- * TOFT J., KVALHEIM O.M., KARSTANG T.V., CHRISTY A.A., KLEVELAND K. and HENRIKSEN A. *Applied Spectroscopy*, 46, 1004, (1992).

- * ULTHUS E.O. *Anal. Chem.*, 53, 671, (1981).

- * UPOR E., MOHAI M. y NOVAK G. *Fotometriás nyomelemzési módszerek (Photometric methods in trace analysis)*. Muazaki Könyvkiadó, Budapest, 143, (1978).

- * VASAK V. y SEDIVES U. *Chem. Listy*, 46, 341, (1959).

- * VIJAN P.N., RAYNER A.C., STURGIS D., WOOD G.R. *Anal. Chim. Acta*, 82, 329, (1976).

- * WEISBERG S. *Applied Linear Regression*. John Wiley & Sons, (1985).

- * WELZ B., MELCHER M. *Analyst*, 108, 213, (1983).

- * YAMAMOTO M., URATA K., MURASHIGE K., YAMAMOTO Y. *Spectrochim Acta B*, 36, 671, (1981).

PARTE III

CONCLUSIONES

Los resultados experimentales obtenidos y reflejados en la presente memoria, nos permiten resumir el trabajo realizado en las siguientes conclusiones:

**** Se han desarrollado métodos para la determinación de A_{Stotal} (As(III) + As(V)) mediante generación de hidruros sin el empleo de KI como agente prerreductor del As(V), tradicionalmente empleado con este fin. Una adecuada combinación de los agentes formadores del hidruro (HCl/NaBH₄), permite realizar esta determinación a muy bajas concentraciones, independientemente de la matriz de la muestra, del sistema de detección (espectrofotometría molecular UV-VIS, y espectrofotometría de absorción atómica) y de la técnica de generación de hidruros (discontinuo, inyección en flujo, continuo).**

Esta forma de trabajo presenta las ventajas de minimizar los efectos paralelos e interferencias no deseables derivados del empleo del yoduro potásico.

**** De las distintas mineralizaciones empleadas en las muestras objeto de estudio, y apoyándonos en los resultados obtenidos en los ejercicios de intercomparación y certificación, podemos destacar que ninguna de ellas resulta preferente sobre las demás en cuanto a resultados obtenidos, si bien la naturaleza de la muestra puede condicionar su elección. Así pues, en muestras voluminosas y poco densas es aconsejable la mineralización por vía seca con Mg(NO₃)₂/MgO.**

**** Del estudio de interferencias realizado en los métodos propuestos cabe destacar lo siguiente:**

- 1.- Las interferencias producidas en fase líquida por los elementos de transición han resultado ser menores que las reseñadas en la bibliografía, fundamentalmente la debida al Cu, que produce un gran efecto interferente en la generación del hidruro

de arsénico, tanto en FIA como en continuo, ya que se disminuye su efecto en varios órdenes de magnitud. Este hecho probablemente se deba al empleo de una elevada concentración de ácido y al reducido tamaño del bucle de reacción.

2.- Las interferencias producidas por Sb, Se y otros elementos formadores de hidruros, pueden minimizarse con el empleo de mezclas yoduro potásico/ α -hidroxiácidos, fundamentalmente KI/ácido láctico. Con la acidez adecuada (HCl 1M) las interferencias debidas al Sb y al Se se reducen en 1 y 2 órdenes de magnitud respectivamente.

** La robustez de los procedimientos desarrollados para la determinación de As_{total} viene ratificada por los buenos resultados obtenidos en la participación de los ejercicios de intercomparación y certificación en el ámbito de la C.E.E.

** El estudio realizado sobre la influencia de los distintos medios ácidos en la eficiencia de generación de los correspondientes hidruros de las especies tóxicas de arsénico ($As(III)$, $As(V)$, MMA y DMA), permite abordar el problema de su especiación. Se han aplicado por primera vez los métodos de calibración multivariante: CLS, ILS y filtro de Kalman, para la evaluación de los contenidos de estas especies en aguas enriquecidas.

Aunque estadísticamente pueden considerarse adecuados los tres métodos aplicados, el método de regresión lineal inversa (ILS) presenta una mayor precisión.

** El método de especiación química desarrollado a través de la calibración multivariante presenta la ventaja, frente a los acoplamientos de técnicas instrumentales para la separación y determinación de especies, de: i) rapidez; ii) simplicidad; iii) bajo costo; iv) escasa manipulación; y v) gran versatilidad para el análisis de rutina de aguas naturales.