



**DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA AUTOMATICA PARA LA
DETERMINACION DE CADMIO POR ICP-MS EN MUESTRAS
ORGÁNICAS**

TESIS

que como requisito para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL

Presenta:

Angélica Cervantes Trejo

Directores de Tesis:

Dra. Luz Olivia Leal Quezada

Dra. Laura Ferrer Trovato

Dr. Víctor Cerdà Martín

Dedicatorias:

A mis padres, con amor y gratitud.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	
ÍNDICE DE TABLAS.....	
Resumen	9
CAPÍTULO I. Introducción.....	5
1.1 Generalidades del cadmio.....	5
1.2 Problemática ambiental debida al cadmio	6
1.3 Presencia del cadmio en el medio ambiente	7
1.3.1 Fuentes naturales del cadmio	7
1.3.2 Fuentes antropogenicas del cadmio	8
1.4 Usos y aplicaciones del cadmio.....	9
1.5 Toxicidad del cadmio.....	10
1.6 Normatividad	11
1.5 Contenido de cadmio en tabaco	11
CAPÍTULO II. Metodología Analítica	14
2.1 Técnicas de detección de cadmio	14
2.1.1 Técnica de detección espectrometrica atomica utilizada (ICP-MS).....	15
2.2 Técnicas de análisis en flujo.....	17
2.2.1 Lab On Valve (LOV)	18
2.2.2 Análisis por inyección en flujo mutijeringa (MSFIA)	20
2.3 Técnicas de separación y preconcentración	21
2.3.1 Extracción en fase sólida (SPE).....	22
CAPÍTULO III. Objetivos.	24
3.1 Objetivo general.....	24
3.2 Objetivos específicos.....	24
CAPÍTULO IV. Materiales y Métodos.....	25
4.1 Reactivos	25

4.2	Muestras	25
4.3	Software y configuración del método.....	26
4.3.1.	Edición del método analítico.....	28
4.4	Sistema de flujo.....	29
4.5	Sistema de detección ICP-MS.....	33
4.6	Procedimiento analítico	33
4.7	Diseño de experimentos.....	35
CAPÍTULO V.	Resultados	38
5.1	Diseño y construcción del sistema de flujo.....	38
5.2	Selección de la resina y molariad de retención	38
5.2.1	Resina de intercambio catiónico fuerte SCX-500/3	39
5.2.2	Resina de intercambio catiónico débil WCX-500/3	40
5.2.3	Resina de intercambio iónico 30HCX-200/6	40
5.2.4	Resina quelatante iminodiacetic acid	41
5.2.5	Resina intercambiador de cationes fuertemente acido 50W-X8.....	41
5.3	Selección del eluyente	43
5.4	Ensayo preliminar de patrón interno y del caudal de elución.....	44
5.5	Screening y optimización mediante un diseño experimental.....	45
5.6	Factor de preconcentración.....	50
5.7	Parámetros analíticos.....	51
5.7.1	Durabilidad de la resina.....	51
5.7.2	Rango lineal de trabajo	52
5.7.3	Límite de detección	52
5.7.4	Repetibilidad y Reproducibilidad	53
5.7.4.1	Repetibilidad	53
5.7.4.2	Reproducibilidad.....	54
5.8	Interferencias	56

5.9 Validación del método	56
5.10 Muestras reales.....	57
CAPÍTULO VI. Conclusiones y recomendaciones	
Referencias.....	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Cadmio en la tabla periodica.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1.2. Mapa de la producción mundial de cadmio....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 1.3. Principales usos y aplicaciones del cadmio	13
Figura 2.1. Principales procesos del ICP-MS	19
Figura 2.2. Ejemplo de pieza LOV y canal central de válvula de selección	21
Figura 2.3. Módulo MSFIA compuesto por jeringas.....	23
Figura 2.4. Representación de las válvulas solenoides ubicadas en la cabeza de cada jeringa a) solenoide activado: posición on y b) solenoide desactivado posición off	24
Figura 2.5. Pasos comprendidos en la extracción en fase sólida (SPE).....	26
Figura 4.1. Ventana de Autoanalysis donde se configuran los instrumentos.....	30
Figura 4.2. Ventana de edición de métodos	31
Figura 4.3. Esquema del sistema LOV-MSFIA, para aislar y detectar cadmio por ICP-MS.	32
Figura 4.4. Módulo de válvula de selección de el LOV.....	33
Figura 4.5. Pre-filtro obstruyendo la salida de la resina en la columna LOV	33
Figura 4.6. Módulo multijeringa de flujo programable.....	34
Figura 4.7. Válvulas solenoides de multiconmutación externa usadas para direccionar el fluido.....	35
Figura 4.8. Bucle de reacción anudado	35
Figura 4.9. Equipo ICP-MS Elan DCR-e (Perkin Elmer)	36
Figura 5.1. Partículas de resinas de intercambio iónico.....	41
Figura 5.2. Molaridades de HNO ₃ para resina de intercambio catiónico fuerte.....	41
Figura 5.3. Molaridades de HNO ₃ para resina de intercambio catiónico débil.....	42
Figura 5.4. Molaridades de HNO ₃ para resina de intercambio catiónico fuerte Dowex	43
Figura 5.5. Molaridades de HNO ₃ para resina de intercambio cationico fuerte Dowex, en el rango de 0.25 a 1.5 mol L ⁻¹	44
Figura 5.6. Molaridades de HNO ₃ para resina de intercambio catiónico fuerte Dowex, en el rango de 0.00001 a 0.1 mol L ¹	45
Figura 5.7. Molaridades de acido nítrico para selección de eluyente	43

Figura 5.8. Caudales de elución en ml min ⁻¹	47
Figura 5.9. Gráfico de optimización para los valores de las variables	50
Figura 5.10. Ajuste de los valores predichos vs los observados	51
Figura 5.11. Volumen de muestra para pre-concentrar con la resina Dowex 50W-X8	53
Figura 5.12. Curva de calibrado másica, cps netas frente a la masa de cadmio en ng..	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Isótopos de cadmio y su abundancia natural.....	10
Tabla 1.2. Límites permisibles de cadmio en agua para uso y consumo humano	15
Tabla 4.1. Programa de microondas para digestión de hígado de pescado.....	29
Tabla 4.2. Secuencia completa de la operaciones para la determinación y pre-concentración de cadmio.....	21
Tabla 2.3. Módulo MSFIA compuesto por jeringas.....	23
Tabla 2.4. Representación de las válvulas solenoides ubicadas en la cabeza de cada jeringa a) solenoide activado: posición on y b) solenoide desactivado posición off	24
Tabla 2.5. Pasos comprendidos en la extracción en fase sólida (SPE).....	26
Tabla 4.1. Ventana de Autoanalysis donde se configuran los instrumentos.....	30
Tabla 4.2. Secuencia completa de las operaciones para la determinación y pre-concentración de cadmio.....	37
Tabla 5.1. Rango de valores en el ensayo de screening	48
Tabla 5.2. Ensayos del screening.....	48
Tabla 5.3. Rango de valores de la optimización	49
Tabla 5.4. Tabla de anova modelo Box Behnken aplicado.....	50
Tabla 5.5. Valores óptimos.....	52
Tabla 5.5. Cálculo del desvío estándar de 10 blancos.....	55
Tabla 5.7. Resultados del ensayo de repetibilidad	56
Tabla 5.8. RSD para 5 observaciones (Reproducibilidad)	57
Tabla 5.9. Parámetros analíticos.....	58
Tabla 5.10. Comparación de parámetros analíticos de métodos basados en técnicas de análisis en flujo para la determinación de cadmio en tabaco.....	59
Tabla 5.11. Análisis de cadmio en el material de referencia certificado DORM-2	60
Tabla 5.12. Análisis de muestras de tabaco por el método MSFIA-LOV-ICP-MS.....	61
Tabla 5.13. Comparación de valores de cadmio encontrados en cigarrillos	62
Tabla 5.14. Concentración de cadmio en hojas de tabaco en diferentes países.....	62

RESUMEN

En este proyecto de investigación se presenta un nuevo sistema de flujo basado en la técnica Lab on Valve (LOV), el cual ha sido desarrollado para la determinación de cadmio en muestras orgánicas. Gracias a la incorporación de una resina de extracción en fase sólida, se ha conseguido la automatización de los procesos de separación y preconcentración del cadmio con una durabilidad de resina de 130 inyecciones recomendadas, lo que representa una gran ventaja comparado con los análisis propuestos anteriormente.

El límite de detección para la determinación de cadmio fue de 0.07 ng respectivamente; mientras que la precisión de la metodología propuesta fue de 2.4% (n=10) con una frecuencia de análisis de 9 inyecciones por hora, dependiendo del volumen de muestra utilizado. El método ha sido aplicado con éxito en diferentes muestras orgánicas (tabaco) obteniéndose recuperaciones superiores al 90%.

Entre las ventajas del método propuesto pueden destacarse la mínima manipulación de la muestra, la drástica reducción de los volúmenes de fluidos (muestra y de reactivos), y la gran repetibilidad de los análisis, además de lograr una disminución significativa del tiempo y del costo por cada uno de éstos.

CAPITULO I

Introducción

El presente capítulo presenta algunas características generales del cadmio, como su presencia en el medio ambiente, sus fuentes naturales y antropogénicas, así como también la problemática asociada como contaminante ambiental y su problemática debida a la toxicidad en los seres vivos. A su vez se hace una revisión de la legislación local e internacional, con el objeto de tener conocimiento de las medidas tomadas por organismos encargados de reglamentar la salud de la población.

1.1 Generalidades del cadmio

El cadmio (del latín, *cadmia*, y éste del griego *καδμεια*, [*kadmeia*], 'calamina', nombre que recibía antiguamente el carbonato de zinc) fue descubierto en Alemania en 1817 por Friedrich Stromeyer, quien observó que algunas muestras de calamina con impurezas cambiaban de color cuando se calentaban, mientras que la calamina pura no lo hacía (Ferreira *et al.*, 2007).

El cadmio es un elemento de símbolo *Cd*, con número atómico 48 y con peso atómico de 112.40 (Figura 1.1), que tiene relación estrecha con el zinc, con el que se encuentra asociado en la naturaleza. Es un metal dúctil, de color blanco argentino con un ligero matiz azulado. Es más blando y maleable que el zinc, pero poco más duro que el estaño. El cadmio es miembro del grupo II B (zinc, cadmio y mercurio) en la tabla periódica.

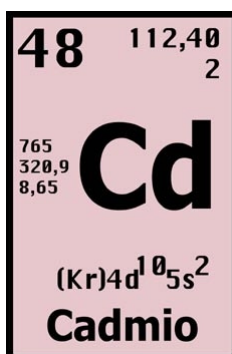


Figura 1.1. Cadmio en la tabla periódica.

El cadmio es divalente en todos sus compuestos estables (presenta estado de oxidación +1 pero es inestable en solución) y su ión es incoloro. Presenta ocho isótopos estables en la naturaleza (Tabla 1.1) y se han descrito once radioisótopos inestables de tipo artificial.

Dicho analito, presenta propiedades fisicoquímicas únicas: es débil a la corrosión y alta conductividad eléctrica, debido a dichas características es ampliamente utilizado para diversas aleaciones (Ki-Hyun, 2007).

Tabla 1.1. Isótopos del cadmio y su abundancia natural (Fuente: ATSDR, 2008).

Isótopo	Abundancia natural (%)
106	1.25
108	0.89
110	12.49
111	12.80
112	24.13
113	12.22
114	28.73
116	7.49

1.2 Problemática ambiental debida al cadmio

La contaminación ambiental se cuenta entre los diez principales problemas ambientales del mundo. La relación intrínseca contaminación-desarrollo ha provocado niveles alarmantes en el ambiente de metales pesados (Guell *et al.*, 2008).

Los metales pesados intervienen en prácticamente todos los procesos vitales conocidos, así como también, pueden producir problemas graves a la salud de los seres humanos (Bragazza, 2006). La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables (Barakat, 2011), tal es caso del cadmio, importante de analizar por no ser biodegradable (Guell *et al.*, 2008) y ser extremadamente tóxico (Cotton *et al.*, 1999).

Una vez emitido al medio ambiente, el cadmio puede permanecer en el suelo, aire y/o agua durante cientos de años, además, su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros en la cadena trófica, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación (Binggan *et al.*, 2009).

Existe evidencia de la problemática ambiental debida a la intoxicación por ingesta de alimentos contaminados por cadmio. Un claro ejemplo es el caso de Japón, en donde en la década de los 50's, la zona de Jitzu (Japón), manifestó por primera vez una intoxicación masiva por cadmio en campos de arroz. La enfermedad (*itai-itai*) es caracterizada por fracturas óseas y daño a las funciones renales (Teeyakasema *et al.*, 2007).

La mayor exposición a cadmio en humanos, se debe a fumar tabaco y a la ingesta de comida como los mariscos (Lemos *et al.*, 2008). Las personas que fuman y fumadores pasivos, tienen aproximadamente el doble de concentración de cadmio en la sangre, en comparación a las personas no fumadoras (Talio *et al.*, 2010). Los cigarros son especialmente peligrosos, debido a que el cadmio presente es fácil y rápidamente absorbido cuando es inhalado (Arain *et al.*, 2008), una vez que el cadmio es absorbido por la sangre, puede permanecer en el organismo por periodos largos de tiempo (Torjussen *et al.*, 2003).

1.3. Presencia de cadmio en el medio ambiente

1.3.1 Fuentes naturales de cadmio

El cadmio es un elemento que se encuentra de manera natural en la corteza terrestre (Ferreira *et al.*, 2007). Las fuentes naturales de este elemento se encuentran en minas. Es raro encontrarlo como metal puro, la greenockita (sulfuro de cadmio) es el único mineral de cadmio y se encuentra presente como subproducto en el procesado de minerales de zinc. Todos los suelos y rocas, incluso el carbón y abonos minerales, contienen una cantidad de este analito (ATSDR, 2008), de manera natural se encuentra en suelos a diferentes concentraciones. Dependiendo del tipo de suelo, se encuentra usualmente a una concentración menor a 1 mg L^{-1} (ppm) (McLaughlin *et al.*, 1999).

A su vez, al encontrarse de manera biodisponible en el medioambiente, las plantas pueden absorberlo. Las plantas de tabaco contienen cadmio, absorbido por el suelo debido al uso de fertilizantes y pesticidas, sin embargo existen variedades de plantas de tabaco en cuyas hojas el cadmio se encuentra de manera natural (Lemos *et al.*, 2008).

Los principales países productores de cadmio (Figura 1.2) son China, Corea y Japón.

México representa el sexto lugar en producción mundial de cadmio, con una producción anual de 1,300 toneladas métricas en el 2011.

En la Figura 1.3 se aprecia a Asia como el principal continente en la producción de cadmio con 13,810 toneladas métricas en el 2011.

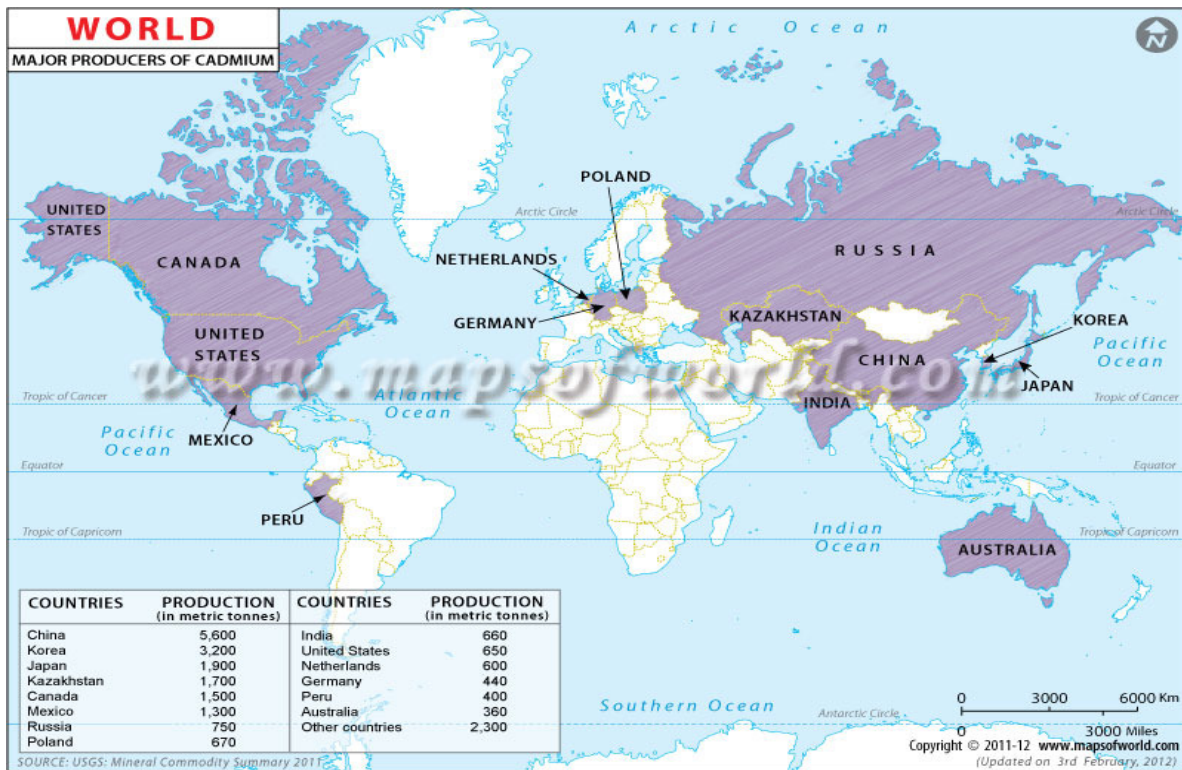


Figura 1.2. Mapa de la producción mundial de cadmio (Fuente: USGS: Mineral Commodity Summary 2011).

1.3.2 Fuentes antropogénicas de cadmio

La actividad humana es la responsable de la creación y el aumento de la concentración en el medio ambiente de algunos elementos traza, tal es el caso del cadmio.

El cadmio en estado libre en la naturaleza, no es una fuente comercial de metal. Casi todo el que se produce es obtenido como subproducto de la fundición y refinamiento de los minerales de zinc, los cuales por lo general contienen de 0.2 a 0.4% de cadmio.

A su vez el cadmio presente en suelos se debe a la agricultura, en donde el uso de fertilizantes por largos periodos de tiempo, a base de fosfatos enriquecidos con Cd, ha contaminado suelos, plantas y la atmósfera (McLaughlin *et al.*, 1999). Este elemento traza puede ser encontrado en altas concentraciones en cultivos (Wagner, 1993), lodos de depuradora, estiércol y deposición atmosférica (Davis *et al.*, 2006).

1.4. Usos y aplicaciones del cadmio

Desde su descubrimiento, el cadmio ha sido ampliamente utilizado en pinturas, el color amarillo brillante de las obras de Vincent Van Gogh provenía de pigmentos de cadmio. El cadmio como pigmento proporciona colores vibrantes y de larga duración (Ferreira *et al.*, 2007).

La aplicación industrial del cadmio fue desarrollada a finales del siglo XIX y principios del siglo XX, en donde uno de los principales usos a sido para la construcción de las baterías de cadmio-níquel, inventadas por Thomas A. Edison a comienzos del siglo XX. También se usa apliamente como recubrimiento de acero ya que evita la corrosión (Cotton *et al.*, 1999 y Ferreira *et al.*, 2007).

El principal uso del cadmio (Figura 1.3) es en la construcción de baterías, representandoun 84%. Las baterías de níquel-cadmio proporcionan un tiempo de vida mayor.

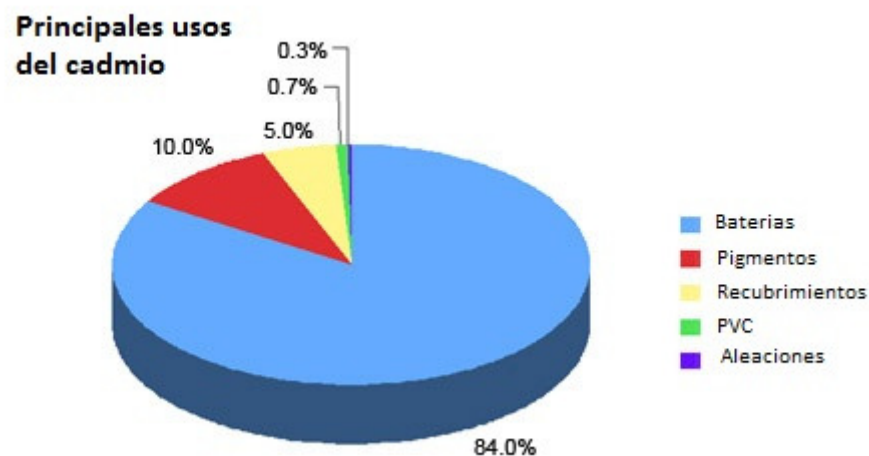


Figura 1.3. Principales usos y aplicaciones del cadmio (Fuente: Vulcan, 2009).

Después de la fabricación de baterías, el uso más importante de cadmio es en pigmentos (Figura 1.4). Estos se utilizan no sólo en las pinturas, sino también en la cerámica, esmaltes, vidrios y plásticos.

El cadmio también se utiliza en ciertos catalizadores químicos, filtros de vidrio, láseres y en tintas de película gruesa sobre placas de circuitos, entre otros (Davis *et al.*, 2006).

1.5. Toxicidad del cadmio

Los metales pesados intervienen en prácticamente todos los procesos vitales conocidos, así como también pueden producir problemas graves a la salud de los seres humanos (Bragazza, 2006). La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables (Barakat, 2011). El cadmio no tiene una función biológica conocida. Su presencia en determinadas concentraciones en seres vivos conlleva aparejadas disfunciones y puede resultar altamente

tóxico, además de presentar la propiedad de acumularse en los organismos biológicos (Binggan *et al.*, 2009). La toxicidad de los metales como el cadmio, se debe a su capacidad de combinarse con una gran variedad de moléculas orgánicas, pero la reactividad de cada metal es diferente y consecuentemente lo es su acción tóxica. Usualmente las moléculas suelen tener dentro de su estructura grupos sulfhídricos que tienen afinidad por los metales pesados produciendo inhibición de las actividades enzimáticas del organismo (Hawkes, 1997).

El cadmio es un metal potencialmente tóxico que ha sido clasificado como un cancerígeno humano por la *Agency for Research on Cancer* (IARC, 1993).

Usualmente el cadmio sólo es absorbido por la sangre alrededor del 1 al 5% del que ese ingiere por vía oral, mientras que se absorbe alrededor del 30 al 50% del que es inhalado. Aproximadamente 10% del cadmio inhalado al fumar es depositado en tejidos, mientras que entre un 30-40% es absorbido en la sangre por el sistema circulatorio. El cadmio puede estar en concentraciones por encima de lo normal, de 2-3 veces en los riñones, en comparación con personas que no fuman (Moore & Satarug, 2004).

Una vez absorbido, el cadmio es transportado por el torrente circulatorio hasta el hígado, en donde se une a una proteína de bajo peso molecular. Pequeñas cantidades de ese complejo proteína-cadmio pasan continuamente del hígado al torrente sanguíneo, para ser transportado a los riñones y filtrado a través de los glomérulos, para posteriormente ser reabsorbido y almacenado en las células tubulares del riñón. Este último órgano excreta del 1 al 2% del cadmio tomado directamente de las fuentes ambientales, lo que provoca una gran acumulación de cadmio en los riñones. La concentración del metal en el riñón es aproximadamente 10 mil veces más alta que en el torrente sanguíneo. La excreción fecal del metal representa una mínima cantidad de cadmio no absorbido en el sistema gastrointestinal. Por otra parte, la toxicidad del cadmio es capaz de provocar acumulaciones en los riñones, por periodos largos de tiempo, dichos periodos pueden ser de 20 a 30 años (Greenwood, 1997). La presencia de este metal en la orina es un indicador de acumulación de este analito (Nordeberg *et al.*, 1998). La enfermedad renal debida al cadmio normalmente no es mortal, pero puede ocasionar la formación de cálculos y sus efectos en el sistema óseo se manifiestan a través de dolor y debilidad (Talio *et al.*, 2010).

Otros tejidos también son dañados por exposición al cadmio (en animales o humanos) incluyendo al hígado, los testículos, el sistema inmunológico, el sistema nervioso y la sangre. Efectos en la reproducción y el desarrollo han sido observados en animales expuestos al cadmio, pero no han sido reportados aún en seres humanos.

1.6. Normatividad

Existen diferentes niveles jerárquicos normativos que pretenden regular y salvaguardar la salud de las personas y el cuidado ambiental. La jerarquía de tales normas tiene presencia desde el orden internacional hasta el regional dentro de un país. Para un monitoreo apropiado en muestras

ambientales, es necesario e imprescindible tener niveles de referencia establecidos, los cuales indican los límites permisibles de algún elemento.

El límite máximo permisible de cadmio en agua para uso y consumo humano es de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (USEPA) y la Administración de Drogas y Alimentos (FDA). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reduce dicho límite a $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Límites permisibles de cadmio en agua para uso y consumo humano.

Dependencia	Límite permisible de cadmio en agua para uso y consumo humano ($\mu\text{g L}^{-1}$)
NOM-117-SSA1-1994	5
EPA	5
FDA	5
OMS	3

Debido a que México carece de normas oficiales que regulen el contenido de metales pesados en baterías, la importación de dichas baterías se realiza de manera incontrolada. Sin embargo un valor de referencia es el de establecido en la Directiva Europea (DOUE, 2006) para cadmio en baterías es de 0.002% (20 mg kg^{-1}).

1.7. Contenido de cadmio en tabaco

Las enfermedades relacionadas al tabaco, se originan por la exposición vía inhalación de numerosos tóxicos presentes en los cigarrillos (Pappas , 2006). El humo del tabaco es tóxico (Masironi, 1992), genotóxico (Hhusgavfel-Pursiainen, 2004), mutagénico (Demarini, 2004), con propiedades cancerígenas y con situaciones adversas durante el embarazo (Little , 2004). Lo cual se debe a las reacciones químicas que ocurren al fumar (Thielen *et al.*, 2008), por lo tanto el estudio de metales presentes en el tabaco ha aumentado significativamente en los últimos años.

El impacto potencial a la salud debido a los metales tóxicos presentes en los cigarrillos no se encuentra limitado a fumadores activos. Es decir el humo del cigarrillo que contiene cadmio, plomo, talio, cromo, níquel principalmente y otros metales, afecta también a fumadores pasivos (Pappas , 2006), dichos metales contribuyen substancialmente al riesgo de cáncer (Dybing, 2003).

El exposición crónica con cadmio debida al cigarrillo, puede generar acumulaciones en varios tejidos y órganos durante la absorción de calcio en los huesos, principalmente durante el embarazo es posible una acumulación de cadmio al bebe, se han encontrado niveles de cadmio en sangre entre un 7-49% en recién nacidos con madres fumadoras (Levallois, 1997). A su vez, el

cadmio puede estar en concentraciones 2 veces por encima de lo normal durante el embarazo (semana 32-39) en el líquido amniótico (Pappas , 2006).

Por lo tanto, el monitoreo de cadmio en hojas de tabaco y cigarrillos es necesario para el control y prevención de riesgos a la salud (Lugon-Moulin *et al.*, 2006).

El nivel encontrado de cadmio en cigarrillos ha variado en las últimas décadas (Menden *et al.*, 1972; Franzke *et al.*, 1977; Perinelli &Carugno, 1978; Barkemeyer, 1979). Diversas investigaciones del contenido de metales en hojas de tabaco señalan que el cadmio está presente en las hojas del tabaco de manera natural, es decir dicho analito no forma parte de los aditivos de fabricación del cigarrillo. Los cultivos de hojas de tabaco de 13 países fueron analizados, encontrándose que la concentración media de cadmio varía entre 330 y 2240 ng g⁻¹ (Lugon-Moulin *et al.*, 2006).

CAPITULO II

Metodología Analítica

En el presente capítulo se presentan las metodologías analíticas utilizadas en el sistema desarrollado, poniéndose de manifiesto los fundamentos y principios de funcionamiento de cada una de ellas.

Así, se exponen brevemente los métodos de detección existentes para la determinación de cadmio y la técnica de detección elegida; las diferentes técnicas de análisis en flujo, haciendo énfasis en la importancia que tienen estas técnicas de introducción de muestra, constituyendo un factor decisivo para una apropiada y confiable medición de los analitos de interés; y finalmente la metodología analítica para la extracción en fase sólida (SPE), ya que es parte fundamental en el desarrollo de métodos analíticos que incluyan protocolos de separación y preconcentración con el objetivo de aislar al analito de interés de la matriz de la muestra y de alcanzar los niveles de detección requeridos.

2.1 Técnicas de detección de cadmio

Los métodos espectrofotométricos y espectrométricos atómicos citados a continuación, son aplicables generalmente para todos los iones metálicos, y a su vez son utilizados para el caso específico de la determinación de cadmio (Ferreira, 2007). Entre los métodos convencionales utilizados para la determinación de cadmio se encuentran: la espectrofotometría de absorción atómica con llama (FAAS) (Bulska *et al.*, 1997), la generación de hidruros acoplada a absorción atómica (HG-AAS) (Ferreira, 2007), la espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito (GF-AAS) (Knapek *et al.*, 2005), la espectroscopia de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) (Ferreira, 2007), la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) (Prusisz, 2003) y la fluorescencia atómica con generación de hidruros (HG-AFS) (Ferreira, 2007).

Dentro de los métodos mencionados, los más utilizados tanto por su selectividad como por su sensibilidad, son la ET-AAS (Long *et al.*, 2005) y el ICP-MS (Wang & Hansen, 2003 y Warnken *et al.*, 2000).

La técnica ET-AAS se ha aplicado a cerca de 60 elementos y es una herramienta para los estudios en donde se determinan vestigios de metales en muestras biológicas o del medio ambiente, sin embargo los límites de detección de dicha técnica, no son lo suficientemente sensibles para la determinación de analitos en niveles ultra traza (Prusisz, 2004).

En el desarrollo del presente trabajo, se seleccionó la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), presenta ventajas en comparación a las otras técnicas

ya mencionadas. Posee una alta sensibilidad, con bajos límites de detección y está relativamente libre de interferencias. Además, ofrece la posibilidad de realizar análisis multi-elemental e isotópico (Wang, 2003; Forte, 2007) con la capacidad de alta frecuencia de muestras analizadas por día (Forte, 2007) A su vez el ICP-MS tiene una gran variedad de aplicaciones, ya sea en la medicina forense, clínica, petróleo, ambiental u otra aplicación que requiera alta sensibilidad de detección simultánea de analitos.

2.1.1 Técnica de espectrometría atómica utilizada (ICP-MS)

Las ventajas que ofrece la técnica de espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), han logrado que sea ampliamente utilizada.

La espectrometría de masas atómica es una herramienta versátil y muy utilizada para identificar elementos presentes en muestras de matriz orgánica y determinar sus concentraciones. Casi todos los elementos del sistema periódico se pueden determinar por espectrometría de masas. Esta técnica ofrece numerosas ventajas frente a otros métodos espectrofotométricos atómicos ya mencionados, entre esas ventajas se encuentran:

- ❖ Límites de detección que son, para muchos elementos, tres órdenes de magnitud mejores que los métodos ópticos.
- ❖ Espectros notablemente sencillos que generalmente son únicos y con frecuencia fácilmente interpretables.
- ❖ Capacidad para medir relaciones isotópicas atómicas (Skoog, 2001).
- ❖ Costos económicos razonables, excepto en preparación de muestras y Ar del plasma.
- ❖ Análisis cualitativo (Miranda, 2009).
- ❖ Accesible a más de 80 elementos.
- ❖ Límites de detección generalmente menores a 1 ng L^{-1} (ppt).
- ❖ Menor ruido y máxima intensidad (Marin, 2009).

Un ICP-MS consta de cuatro procesos principales (Figura 2.1) incluyendo la introducción de muestras y la generación de aerosoles, la ionización por una fuente de plasma de argón, la discriminación en masa, y el sistema de detección.

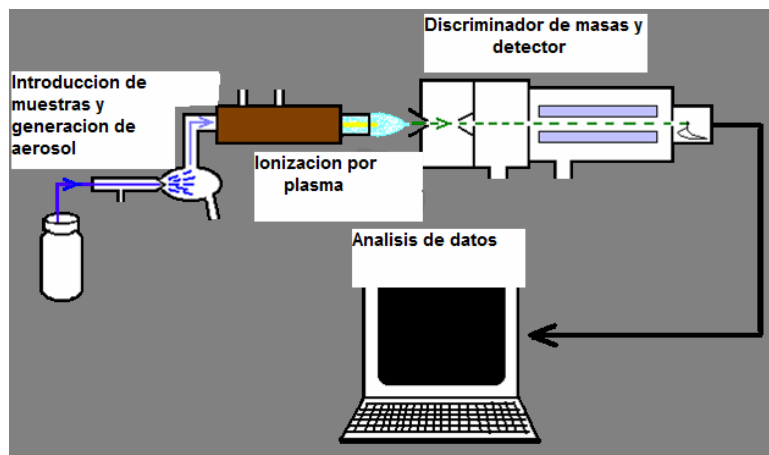


Figura 2.1. Principales procesos de ICP-MS (Worley, 2000).

El proceso de un ICP-MS, se inicia con el acoplamiento de un método para generar iones (plasma acoplado inductivamente) y un método para separar y detectar los iones (espectrómetro de masas). La muestra, en forma líquida, es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador donde es transformada en aerosol gracias a la acción de gas argón. Dicho aerosol es conducido a la zona de ionización que consiste en un plasma generado al someter un flujo de gas argón a la acción de un campo magnético oscilante inducido por una corriente de alta frecuencia. En el interior del plasma se pueden llegar a alcanzar temperaturas de hasta 8000 K. En estas condiciones, los átomos presentes en la muestra son ionizados (Miranda, 2009).

En el caso de ICP-MS los iones pasan al interior del filtro del cuadrupolo a través de una interfase de vacío creciente, allí son separados según su relación carga/masa. Cada una de las masas sintonizadas llegan al detector donde se evalúa su abundancia en la muestra (Valiente, 2008).

2.2 Técnicas de análisis en flujo

En la actualidad, el elevado número de muestras a las que se tiene que enfrentar el analista conlleva a la alternativa de recurrir a la aplicación de métodos que solo requieran un mínimo consumo de tiempo. Es así como surgió a mediados de los 50's, el desarrollo de las técnicas de análisis en flujo con el objeto de realizar una vigilancia y control continuos de un gran número de analitos de interés, que permitan obtener resultados fiables, seguros y económicos, de un gran número de muestras en un corto lapso de tiempo (Cerdà, 2006).

La primera técnica desarrollada fue el análisis en Flujo Segmentado (Segmented Flow Analysis - SFA) (Skeggs, 1957). Desde entonces han ido evolucionando, desarrollándose entre otras: el Análisis por Inyección en Flujo (Flow Injection Analysis - FIA) (Ruzicka & Hansen, 1975), Análisis por Inyección Secuencial (Sequential Injection Analysis - SIA) (Ruzicka & Marshall, 1990), Análisis por Inyección en Flujo Multiconmutado (Multicommutation Flow Injection Analysis - MCFIA) (Reis,

1994), Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa (Multisyringe Flow Injection Analysis - MSFIA) (Cerdà *et al.*, 1999), el Lab-on-valve (LOV) (Ruzicka, 2000) y el sistema en Flujo Multibomba (Multipumping Flow Systems - MPFS) (Lapa *et al.*, 2002)

Los objetivos de las técnicas en flujo hacen énfasis en:

- ❖ Automatización: mínima intervención del analista, e implementación del método analítico en continuo.
- ❖ Miniaturización: menor consumo de reactivos y muestra.
- ❖ Rapidez: elevada frecuencia de análisis.
- ❖ Portabilidad: monitorización de parámetros (in-situ).
- ❖ Estudio de cinéticas de reacción.
- ❖ Tratamiento de muestra, operaciones preliminares: operaciones unitarias.
- ❖ Implementación de sistemas de gestión medioambiental: ISO 14001. Química verde (*Green Chemistry*).

Los componentes básicos de los sistemas de análisis en flujo son un módulo de impulsión del líquido (bombas peristálticas, bombas de pistón bidireccional o micro-bombas) y un conjunto de tubos de plástico o *manifold* que conduce los líquidos hacia el detector. Estos métodos se basan en la introducción de la muestra en una tubería de pequeño diámetro a la que se le agregan los reactivos y luego se conducen al detector para realizar la medición que permita determinar la concentración de la especie de interés. El orden de adición de la muestra y los reactivos, así como el tiempo de reacción y el caudal, se controlan automáticamente permitiendo una repetitividad de la señal analítica y una frecuencia de muestreo elevadas. La propiedad de interés (absorbancia, fluorescencia, potencial, etc.) se registra continuamente mediante un sistema de detección adecuado, que produce una señal transitoria en forma rectangular o de pico, cuyas características (altura o área del pico) se relacionan con la concentración del analito en la muestra (Trojanowicz, 2008).

Las técnicas de análisis en flujo, utilizadas como sistemas de introducción y pretratamiento de muestras, son especialmente adaptables a la determinación de parámetros ambientales, debido a algunas de sus características tales como alta precisión, alta frecuencia de muestreo, alto grado de flexibilidad, manipulación de micro-volúmenes, habilidad para llevar a cabo pre-tratamientos químicos en línea y fácil automatización (Cerdà, 2006).

2.2.1 Lab On Valve (LOV)

Las técnicas de análisis en flujo ya mencionadas, han modificado la estructura de su diseño original con la finalidad de adaptarse a las necesidades y exigencias del análisis que se desea realizar.

Como consecuencia de las crecientes exigencias ambientales para la reducción del consumo de muestra y reactivos, la primera generación de análisis en flujo, el FIA, fue complementada por la segunda generación, es decir, el análisis por inyección secuencial (SIA) basado en flujo programado discontinuo (Miró, 2007).

Con el objetivo de compactar el SIA, se propuso un dispositivo en el que diversos elementos típicos de las técnicas de flujo se encuentran directamente implementados sobre la válvula de selección (Figura 2.2). Es así como surge la tercera generación de análisis en flujo Lab On Valve (LOV), de hecho es una conjunción lógica de los sistemas FIA integrados y el SIA. En los primeros, se proponía el montaje de las válvulas sobre la placa madre, mientras que en el LOV lo que se hace es montar distintos dispositivos sobre la válvula típica de selección del SIA, que es la principal gestora del flujo de muestra y reactivos (Ruzicka, 2000).

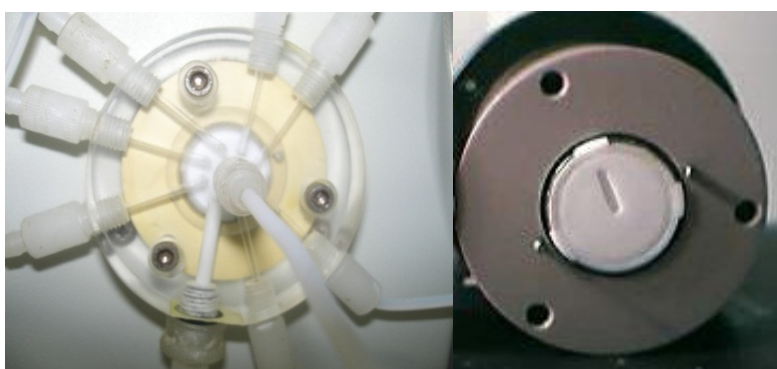


Figura 2.2. Ejemplo de pieza LOV y canal central de válvula de selección.

El LOV, presenta ventajas específicas y aplicaciones exclusivas, tales como la miniaturización del sistema y el pre-tratamiento de la muestra (pre-concentración), lo que permite niveles de sensibilidad más altos. La técnica LOV que al igual que el SIA, conecta los puertos periféricos con un puerto central mediante un canal central. El puerto central está conectado a un bucle de carga, donde se almacenan la muestra y los reactivos antes envíanlos al sistema. Este bucle de carga se conecta a bomba tipo pistón (jeringa) encargada de aspirar y dispensar los líquidos. El LOV permite realizar varias operaciones en línea, como cargar la muestra y adicionar y mezclar reactivos. Puede también incorporarse una micro-columna renovable, para hacer extracciones en fase sólida, lo que permite hacer separaciones y pre-concentraciones en línea. Este sistema de introducción de muestra puede ser operado a volúmenes de microlitros de reactivos y muestra, disminuyendo la generación de residuos y resultando amigable para el medio ambiente (Wang, 2003).

Las mayores ventajas del LOV son su compactibilidad y la posición rígida permanente del canal que procesa la muestra, que asegura aún más la repetitividad de la manipulación de los fluidos (Amorim *et al.*, 2010)

Cabe mencionar que esta técnica no sólo maneja disoluciones homogéneas sino también heterogéneas, de hecho su flexibilidad para manipular fluidos ha resultado también muy útil a la hora de manipular partículas y así poder desarrollar métodos en los que la renovación de la fase

sólida se lleva a cabo de una forma totalmente automática (*bead injection*). Dicha renovación de la fase sólida presenta ventajas las cuales pueden resumirse como:

- ❖ Solución para la microextracción en línea.
- ❖ Herramienta versátil para el proceso en línea de la muestra: limpieza, derivatización, afinidad para separaciones cromatográficas (Ruzicka, 2008).
- ❖ Alta frecuencia de análisis.
- ❖ Eliminación de interferentes.
- ❖ Gran repetitividad en los procesos de empaquetamiento y perfusión de las partículas con muestras y reactivos (Miró, 2007).

Por lo tanto el LOV presenta ventajas únicas de flexibilidad para infinidad de análisis ambientales y biológicos que han hecho de la técnica un éxito (Amorim, 2010).

2.2.2 Análisis por inyección en Flujo Multijeringa (MSFIA)

La técnica MSFIA fue propuesta en 1999 por el grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente del departamento de Química de la Universidad de las Islas Baleares (UIB). Esta técnica, que se presenta como una herramienta para la manipulación automática en flujo de disoluciones, reúne diversas ventajas de las otras técnicas de análisis en flujo ya existentes, tales como la alta frecuencia del FIA, la robustez y la versatilidad del SIA y la simplicidad de técnicas MCFIA (Cerdà *et al.*, 1999)

El MSFIA se beneficia de la versatilidad y robustez de los sistemas de inyección secuencial utilizando bombas de pistón provistas de jeringas como impulsores de líquidos (Pons *et al.*, 2006). De este modo, se evitan los continuos procedimientos de re-calibración requeridos en los sistemas basados en bombas peristálticas, como consecuencia del envejecimiento de los tubos flexibles de Tygon, manteniendo la eficiencia de la mezcla radial de las zonas de muestra y reactivos de los métodos de inyección en flujo. Debido a que los líquidos entran en contacto solamente con tubos de vidrio o de PTFE, el MSFIA permite el uso de reactivos agresivos y disolventes orgánicos.

Básicamente, un sistema MSFIA está compuesto por un módulo con cuatro jeringas, movidas conjuntamente con un solo pistón (Figura 2.3). La variedad de jeringas con volúmenes comprendidos entre 0,5 y 25 ml, permite obtener diferentes caudales y volúmenes de inyección a través de un mismo conjunto de tuberías. También cabe señalar que la velocidad del motor paso-a-paso puede ajustarse dentro de un amplio rango, de modo que las reacciones con diferentes cinéticas pueden fácilmente acomodarse sin ninguna re-configuración del *manifold* o sistema de tuberías.

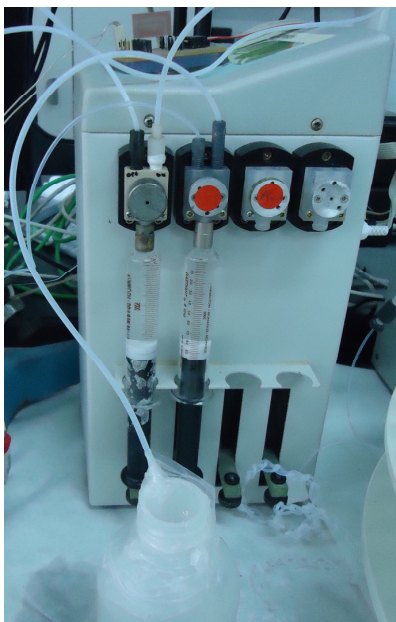


Figura 2.3. Módulo MSFIA compuesto por jeringas.

Cada jeringa tiene acoplada en su cabeza una válvula solenoide de tres vías, lo que permite una gran variedad de modalidades de inyección, como protocolos de multiconmutación (Figura 2.4). Las válvulas solenoides de tres vías tienen dos posiciones: “on” y “off”, las cuales permiten la conexión de un canal común a dos diferentes canales de entrada/salida mediante la activación y desactivación del solenoide. La implementación de estas válvulas de conmutación en la cabeza de cada jeringa permite la inyección precisa de volúmenes bien definidos de muestras y reactivos de acuerdo con una programación establecida para efectuar las mediciones analíticas.

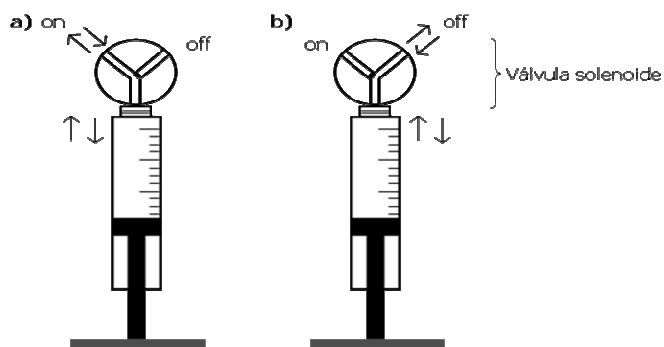


Figura 2.4. Representación de las válvulas solenoides ubicadas en el cabezal de cada jeringa. a) Solenoide activado: posición “on” y b) Solenoide desactivado: posición “off”.

Además, gracias a estas válvulas, los reactivos son devueltos a sus depósitos cuando no son necesarios, sin perturbar el desarrollo de la reacción. Por lo tanto, se logra una reducción de más de 10 veces en la generación de residuos respecto a los procedimientos usuales de técnicas de inyección en flujo.

El módulo multijeringa posee en su parte posterior un conector de cuatro salidas, a cada una de las cuales se le puede conectar hasta tres válvulas. A cada una de las válvulas adicionales al sistema se le incorpora un circuito electrónico de protección para evitar su sobrecalentamiento. Las válvulas solenoides, introducidas con la técnica MCFIA, pueden conmutar sin necesidad de parar el movimiento del pistón del módulo multijeringa. Su conmutación es tan rápida que no se produce ninguna sobrepresión al cambiar la posición de las mismas. Los sistemas MSFIA se controlan por ordenador, tanto el o los módulos multijeringa que lo compongan, como las válvulas solenoides adicionales o el muestreador automático (Cerdà, 2006).

2.3 Técnicas de separación y pre-concentración

Generalmente en los métodos analíticos se requiere de un tratamiento de la muestra, previo a la detección del analito, que separe al analito de interés de la matriz de la muestra y de posibles interferentes y que lo pre concentre para su análisis a niveles traza.

De este modo, los pre-tratamientos de la muestra que incluyen protocolos de separación y preconcentración, mejoran la sensibilidad y reducen las interferencias de la matriz. En análisis medioambiental y biológico se utilizan una gran variedad de técnicas de extracción y preconcentración, incluyendo la microextracción en fase líquida (SD-LPME) (Miró, 2007), la extracción en fase sólida (SPE) (Harrison, 2000), la extracción gas-líquido (Ferrer, 2005) y la microdiálisis, pervaporación y el uso de electromembranas (Miró, 2007) entre las más habituales.

2.3.1 Extracción en fase solida (SPE)

La extracción en fase sólida ha sido seleccionada como pretratamiento de muestra para el presente trabajo, ya que presenta las siguientes ventajas:

- Mínimo consumo de disolventes orgánicos.
- Mejora de selectividad mediante interacciones químicas.
- Elevados factores de mejora / alta capacidad de resinas (factores de preconcentracion mayores, alta frecuencia de análisis).

Los principales objetivos de la SPE son: la extracción de los analitos de la matriz de la muestra, a través de sus interacciones con la superficie activa de los materiales en fase sólida, así también se consigue el poder simplificar la matriz muestral, ya que permite reducir o eliminar completamente los posibles interferentes que conforman la matriz y, al mismo tiempo pre-concentra al analito de interés (Poole, 2003 y Yu, 2011).

La SPE es una de las técnicas más populares para el pre-tratamiento de la muestra ya que, el consumo de reactivos y muestras se minimiza de forma considerable, con lo cual se cumple con los principios de química verde y el procedimiento analítico se hace más sencillo.

El procedimiento analítico de la extracción en fase sólida incluye la siguiente serie de pasos:

1. Empaquetamiento de la fase estacionaria y acondicionamiento.
2. Contacto de las dos fases en para la extracción del analito de interés.
3. Limpieza y eliminación de interferencias.
4. Elución de los analitos retenidos en la fase sólida.
5. Detección de los analitos de interés.

Es decir, los analitos en la fase líquida pasan a través de una fase sólida empaquetada en una columna, en donde los analitos de interés son retenidos y posteriormente eluidos. En un paso posterior, la elución es conducida al detector para su análisis (Figura 2.5).

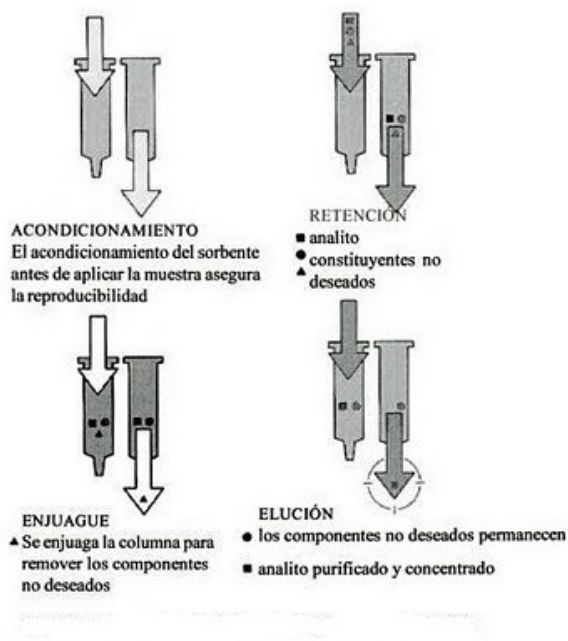


Figura 2.5. Pasos comprendidos en la extracción en fase solida (SPE).

CAPITULO III

Objetivos

3.1 Objetivo general

Desarrollar, implementar y optimizar una metodología de análisis automatizada, basada en las técnicas de análisis en flujo Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa y Lab-on-valve (MSFIA-LOV) con extracción en fase sólida, para la separación y preconcentración de cadmio, con detección por espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) , y su aplicación a muestras de tabaco.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Construir e implementar del sistema MSFIA y LOV.
- 2) Optimizar del sistema implementado a través de ensayos analíticos para encontrar los valores óptimos (en términos de sensibilidad y reproducibilidad) de cada una de las variables que influyen en el mismo.
- 3) Determinar de los parámetros analíticos del método desarrollado mediante ensayos, utilizando las condiciones óptimas obtenidas en la etapa anterior.
- 4) Estudiar las interferencias de los analitos que normalmente se encuentran presentes en muestras de tabaco.
- 5) Validar del método desarrollado a través del análisis de materiales de referencia certificados (CRM).
- 6) Aplicar de la metodología desarrollada al análisis de muestras de tabaco.
- 7) Acoplar del sistema MSFIA-LOV al detector ICP-MS

CAPITULO IV

Materiales y métodos

4.1. Reactivos

En todos los casos para la preparación de las diferentes disoluciones se utilizó agua desionizada obtenida con un equipo Millipore. Todos los reactivos fueron de calidad analítica.

- HNO₃ 65 %, Scharlau, España.
- H₂O₂ 30%, Scharlau, España.
- Resina de intercambio iónico Dowex 50 W-X8 (Intercambiador de cationes fuertemente ácido, forma H⁺), tamaño de partícula 90-250 µm, Merck, Alemania.
- Resina SCX-500/3, tamaño de partícula 60 µm, Interchim, Francia.
- Resina WCX-500/3, tamaño de partícula 60 µm, Interchim, Francia.
- Resina 30HCX-200/6, tamaño de partícula 30 µm, Interchim, Francia.
- Resina Chelating (iminodiacetic acid), tamaño de partícula 50-100 µm, Sigma-Aldrich.
- Pre-filtros de fibra de vidrio, Millipore.
- Patrón interno certificado de Cadmio de referencia de 1000 mg L⁻¹ Scharlau, España.
- Patrón interno certificado de Plomo de referencia de 1000 mg L⁻¹ Scharlau, España.
- Patrón interno certificado de Níquel de referencia de 1000 mg L⁻¹ Scharlau, España.
- Patrón interno certificado de Cromo de referencia de 1000 mg L⁻¹ Scharlau, España.

4.2. Muestras

Se analizaron diferentes tipos de muestras de tabaco cuatro muestras de marcas comerciales de cigarrillos, una muestra de tabaco de liar y hojas de tabaco de la variedad *sylvestris*.

Las marcas comerciales de cigarrillos se describen a continuación:

1. Camel, variedad Filters.
2. Philip Morris (creadora de Marlboro), variedad Rojos (Red).
3. Gold Coast.
4. Marlboro, variedad Rojos (Red).
5. El Pueblo, tabaco de liar.

Para la validación del método analítico se utilizó una muestra de referencia certificada de músculo de pescado (DORM-2 Dogfish Muscle) suministrada por el National Research Council de Canadá.

Las muestras siguieron un protocolo de digestión, el cual consistió en quitar la humedad de las muestras, manteniéndolas en estufa a 100 ° C durante 24 horas.

1. Luego se procede a una digestión por microondas, con un método para muestras de matriz orgánica sugerido por el fabricante del digestor Start D (Milestone, Italia). Se pesaron unos 500 mg de muestra y se les añaden 8 mL de HNO₃ 65% y 1 mL de H₂O₂ 30%. El programa del microondas utilizado se resume en la Tabla 4.1.
2. El extracto obtenido de la digestión fue llevado a sequedad por medio de parrilla a 120 °C, con la finalidad de eliminar los ácidos utilizados en la digestión. Por último, el residuo seco se lleva a 20 mL con HNO₃ al 0.001mol L⁻¹.

Tabla 4.1. Programa de microondas para digestión de hígado de pescado (fuente: Milestone, 2011).

Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C)	Potencia de microondas (W)
1	10	120	1000
2	5	120	1000
3	10	180	1000
4	10	180	1000
5	20	ventilación	ventilación

4.3. Software y configuración del método

El control instrumental se realiza mediante el programa AutoAnalysis 5.0 (SCIWARE, Palma de Mallorca). Dicho software permite la automatización de técnicas analíticas de forma que el programa principal no depende de la instrumentación utilizada, sino que ésta se puede incorporar al sistema mediante la elaboración de bibliotecas de enlace dinámico (Dynamic Link Library, DLL's) según el interés del investigador. De esta forma resulta ser muy flexible, de fácil manipulación incluso para usuarios poco experimentados y de aplicación muy general, permitiendo la combinación de distintos dispositivos e instrumentos y la elaboración de sistemas automáticos simples o combinados cuyas posibilidades van más allá de los que presentan los estrictos sistemas en flujo. AutoAnalysis es un paquete de programas diseñado para ofrecer al usuario una gran versatilidad en la automatización de métodos analíticos. Así, mediante una selección apropiada de módulos instrumentales y las DLLs necesarias, permite la aplicación de un gran número de técnicas de flujo, tales como el FIA, SIA, MCFIA, MSFIA, etc.

Una de las grandes ventajas de AutoAnalysis es la de permitir la resolución de muchos problemas analíticos con el mismo programa, lo que evita la engorrosa necesidad de tener que aprender un programa distinto para cada uno de ellos. Así en el mismo laboratorio se puede utilizar con

distintas técnicas de análisis en flujo y diferentes detectores, en medidas conductimétricas, fluorimétricas, espectrofotométricas, etc.

El diseño de AutoAnalysis para la plataforma Win32, permite que mientras se está utilizando este programa, se pueda estar trabajando simultáneamente con otros distintos, tales como un procesador de textos, un navegador, una hoja de cálculo, etc. AutoAnalysis se divide en una aplicación principal y un conjunto de bibliotecas de enlace dinámico (DLL) para la conexión de los instrumentos al ordenador y para su control.

La aplicación principal es un programa independiente del hardware, lo que significa que cualquier configuración instrumental y cualesquiera que sean los equipos conectados al programa se usa la misma aplicación principal, con la misma interfaz de usuario, las mismas facilidades y posibilidades.

Los instrumentos se tienen que conectar a un canal de comunicación que es una DLL, de cuyo funcionamiento se encarga la aplicación de forma evidente para el usuario. Un mismo canal de comunicación puede ser compartido por varios instrumentos a la vez. Para cada instrumento se debe disponer de una DLL que lo controla (Figura 4.1) al canal de comunicación.

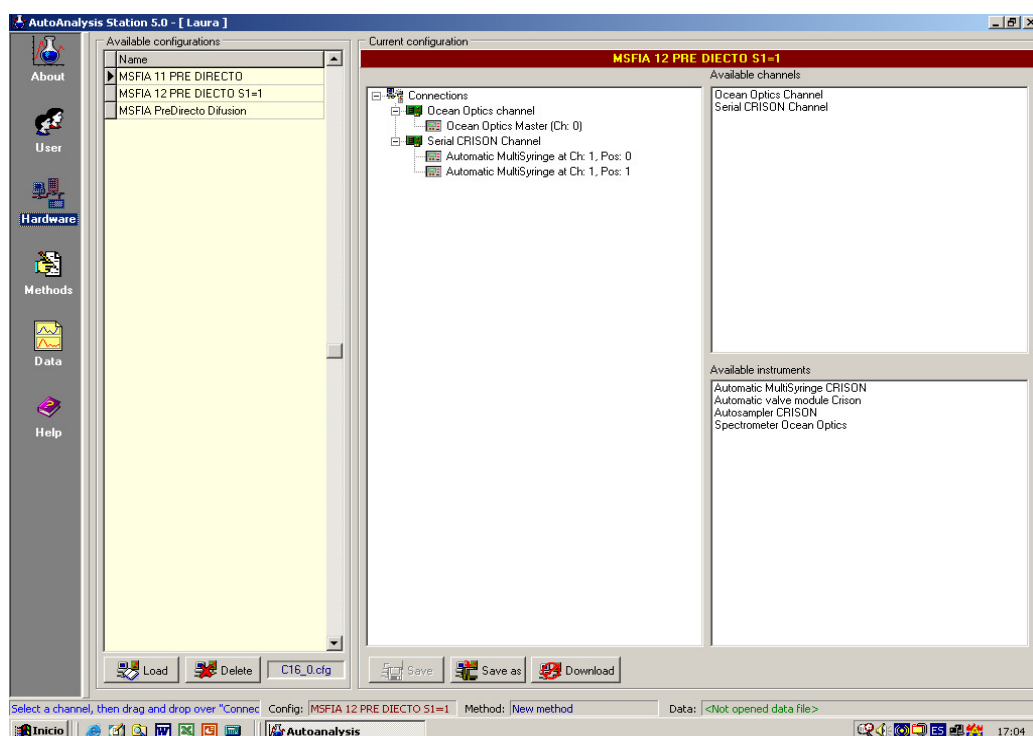


Figura 4.1 Ventana de AutoAnalysis donde se configuran los instrumentos.

4.3.1. Edición del método analítico

Un método es un conjunto de instrucciones para realizar todas las etapas del protocolo analítico. Éstas incluyen tanto el posicionamiento de la válvula de selección y de la válvula de inyección, como el de las válvulas solenoides de las cabezas de las jeringas, la carga o descarga de líquido por las jeringas, condicionales, tiempos de espera, etc. Un procedimiento es un conjunto de instrucciones agrupadas bajo el mismo nombre, que bien puede repetirse dentro del mismo método o puede ser utilizada por métodos diferentes, con la ventaja de definirla solo una vez.

La ejecución de las instrucciones de los instrumentos puede llevarse a cabo de dos maneras, en forma exclusiva durante la cual no se realizará ninguna otra instrucción hasta finalizar la que está en curso, y en forma no exclusiva según la cual el método continúa con la ejecución de los pasos sucesivos sin finalizar la que está en curso.

Una vez definido un método o cargado uno existente, se procede a la ejecución del mismo. Mediante una barra de herramientas se puede controlar dicha ejecución y los parámetros del área de dibujo (Figura 4.2).

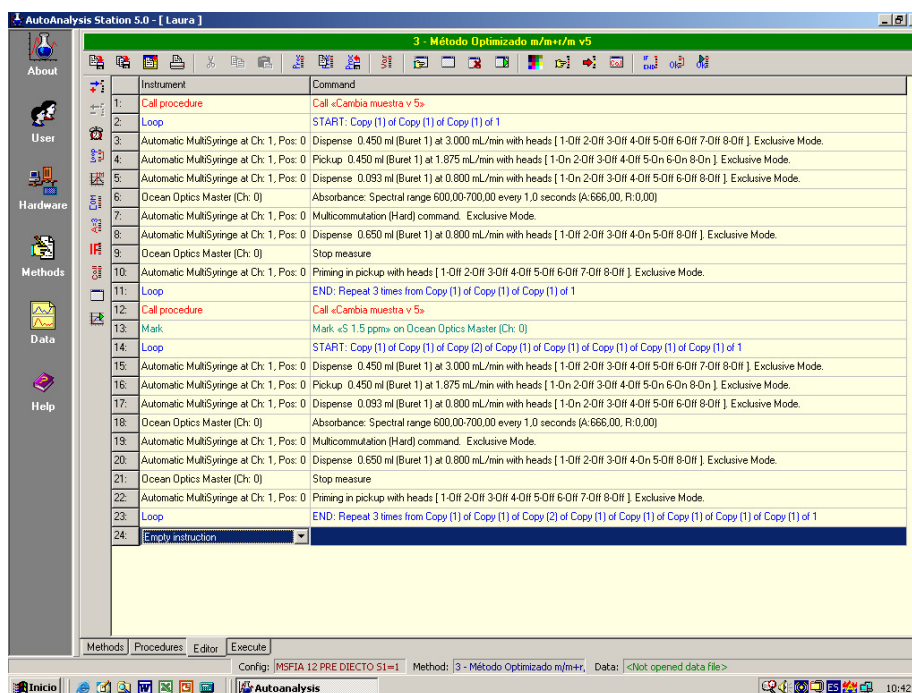


Figura 4.2. Ventana de edición de métodos.

4.4. Sistema de flujo

El sistema LOV-MSFIA empleado se muestra en las Figuras 4.3 y 4.4. La pieza del LOV está hecha de metacrilato, con 8 canales integrados (1,5 mm de diámetro interno/16 mm largo, exceptuando el canal de la columna con un d.i. de 3,2 mm). Esta pieza se monta sobre una válvula de selección de 8 puertos. El puerto central de la unidad LOV está conectado a un bucle de carga, el cual a su vez se conecta por el otro extremo a una jeringa de vidrio de 10 ml (Hamilton, Suiza) manipulada por una bureta (Crison, Alella, España). El puerto central se comunica a través de un conducto central con los puertos periféricos (1-8). Uno de los canales del LOV (puerto 7) hace la función de microcolumna, conteniendo la resina de extracción en fase sólida, esta columna se rellena con una cantidad adecuada resina (0.0375 g) evitando su compactación y así posibles sobrepresiones.

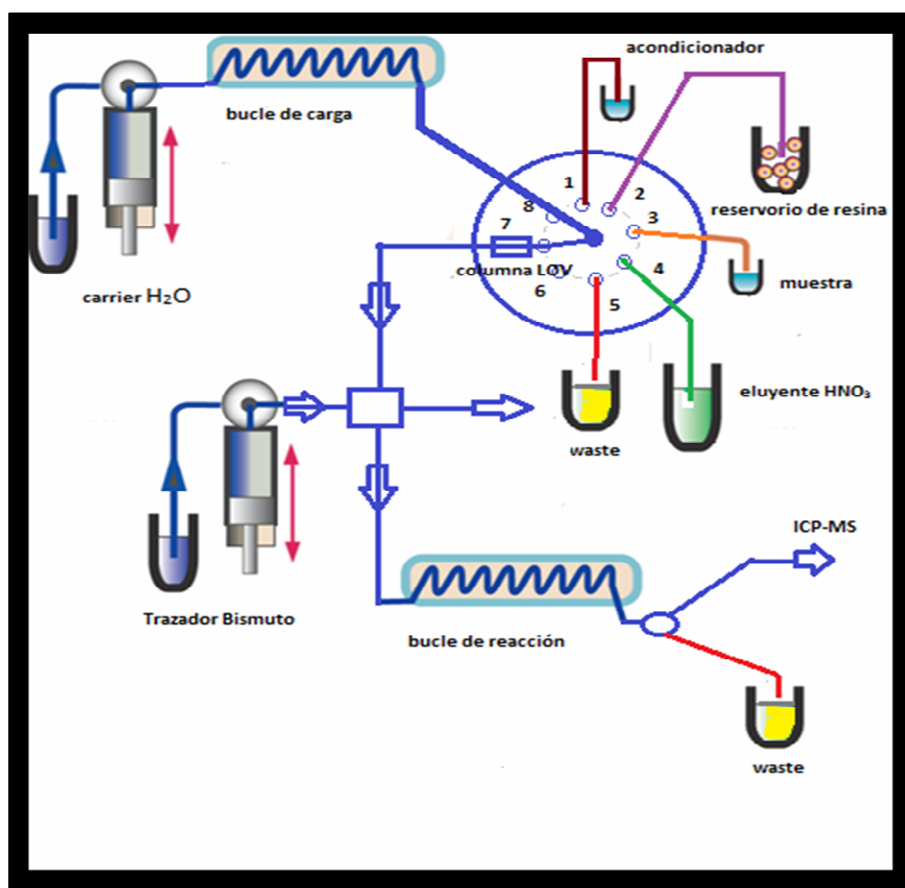


Figura 4.3. Esquema del sistema LOV-MSFIA, para aislar y detectar cadmio por ICP-MS.

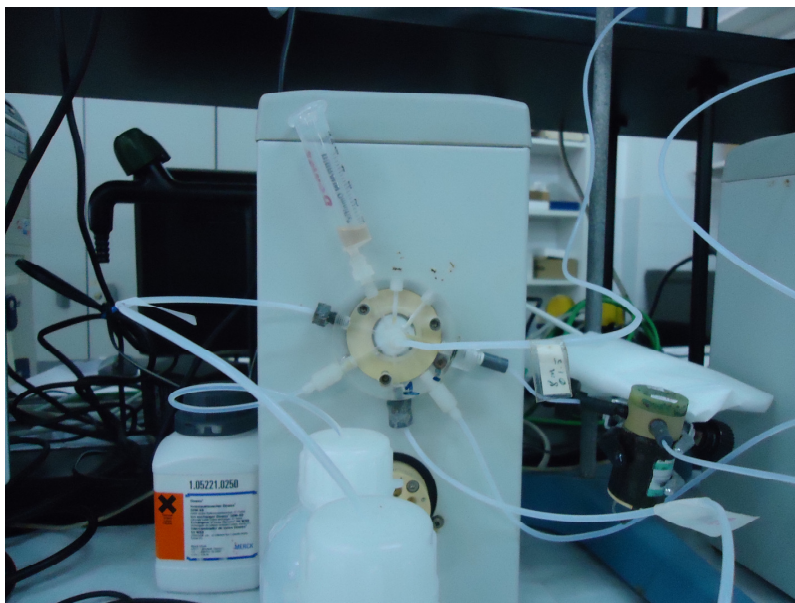


Figura 4.4. Módulo de válvula de selección con el LOV.

Para contener la resina en la cavidad del LOV (puerto 7), se coloca un prefiltro de fibra de vidrio (Millipore) a la salida de la columna (Figura 4.5). Así la resina queda retenida, dejando que las disoluciones fluyan libremente.

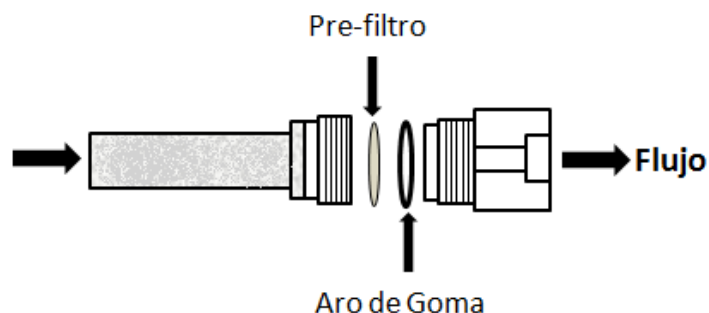


Figura 4.5. Pre-filtro obstruyendo la salida de la resina en la columna LOV.

La resina en una solución de ácido nítrico 0.001 mol L^{-1} está contenida en una jeringa de plástico de 5 mL, que actúa de reservorio, montada sobre el puerto 2 del microsistema integrado. El depósito que contiene la solución empleada para el acondicionamiento y limpieza de la resina fue conectado al puerto 1 ($0.001 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$), el líquido empleado como eluyente se conectó al puerto 4 ($1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$), mientras que el puerto 3 y el puerto 5 fueron empleados para la aspiración de muestras y para direccionar los residuos, respectivamente.

Un módulo multijeringa (BU4S, Crison Instruments, Barcelona, España) de flujo programable (Figura 4.6), equipado con dos jeringas de vidrio, es empleado como bomba tipo pistón para aspirar y dispensar los líquidos. La jeringa tiene una válvula solenoide de tres vías (NResearch, Caldwell, NJ, EE.UU.) en la cabeza, lo que facilita la aplicación de los regímenes multiconmutados y

el direccionamiento de los líquidos (On: al sistema, Off: al depósito). Para evitar la contaminación de la jeringa con los líquidos se conecta a un depósito con agua des-ionizada la cual es empleada como líquido portador o *carrier*.

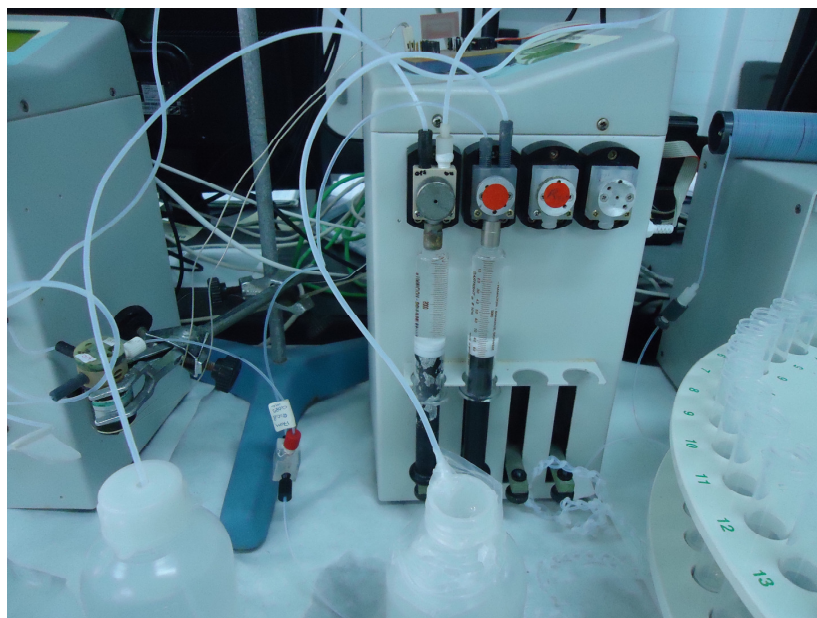


Figura 4.6. Módulo multijeringa (BU4S, Crison Instruments, Barcelona, España) de flujo programable.

El *manifold* se construye con tubos de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.8 mm de diámetro interno (SCIWARE, Palma de Mallorca, España). El bucle de carga permite acumular un volumen de 10.0 mL y posee un diámetro interno de 1.5 mm. Todas las conexiones son de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (SCIWARE, Palma de Mallorca, España) excepto la unión que conecta la columna con el sistema la cual es de metacrilato. El puerto 7 está conectado a una electroválvula de conmutación (On: en línea; Off: al residuo), que ayuda a direccionar el flujo de la manera deseada (Figura 4.7).



Figura 4.7. Válvulas solenoides de multiconmutación externa (Takasago Electronic Inc.) usadas para direccionar el fluido.

El bucle de reacción anudado colocado a la salida de la columna del LOV (puerto 7) permite la mezcla entre el eluato y el patrón interno (bismuto). El anudado favorece la mezcla debido al flujo turbulento, proporcionando una mezcla homogénea. Dicho reactor anudado se preparo entrelazando la tubería de PTFE en nudos de unos 5 mm de diámetro (Figura 4.8) y permite contener 10 mL de volumen.

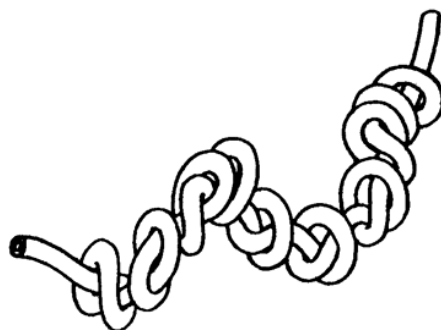


Figura 4.8. Bucle de reacción anudado.

4.5. Sistema de detección ICP-MS

La detección del cadmio se llevó a cabo con el sistema de detección espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) Perkin Elmer modelo Elan DCR-e (Figura 4.9.).

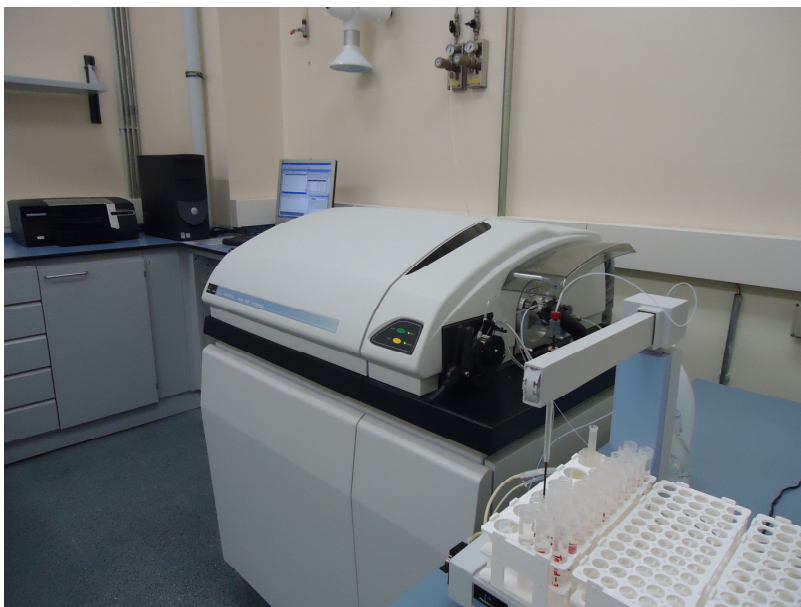


Figura 4.9. Equipo ICP-MS Elan DCR-e (Perkin Elmer).

4.6. Procedimiento analítico

La secuencia completa de las operaciones para la determinación y pre-concentración del cadmio se muestra en la Tabla 4.2 y la Figura 4.9 muestra el acoplamiento del sistema en flujo al detector ICP-MS.

A continuación se describen cada una de las operaciones del protocolo analítico:

1. Carga de la Resina. La resina se encuentra en suspensión en una solución de ácido nítrico (0.001 mol L^{-1}) en el reservorio ubicado en el puerto 2, de tal forma, que el puerto central se direcciona hacia el canal correspondiente, cargándose la cantidad necesaria de perlas de resina. Posteriormente el conducto central es programado para orientar el fluido hacia la columna (puerto 7) inyectando la cantidad apropiada de resina hasta llenar completamente el canal, formando la columna de extracción en fase sólida.

2. Acondicionamiento de la resina. Para el acondicionamiento de la resina, el puerto central de la válvula de selección se conecta al puerto 1, de donde se aspiran 2 mL de ácido nítrico 0.001 mol L^{-1} . Posteriormente la cantidad cargada es inyectada a un caudal de 1 mL min^{-1} al puerto 7 donde se

encuentra la columna con resina, la válvula solenoide adicional se encuentra desactivada dirigiendo el líquido al desagüe o *Waste*.

3. **Carga de muestra.** Una vez que la columna está lista, se cargan X mL del estándar o de muestra (puerto 3), para posteriormente ser inyectados a la columna con la resina (puerto 7) a un caudal de 2.3 mL min⁻¹, la válvula solenoide continua desactivada. Es este paso donde la resina acondicionada retiene al Cd.

5. **Elución de cadmio.** En esta etapa, el cadmio retenido en la columna es eluido. El conducto central de la válvula de selección se direcciona hacia el puerto 4, cargando 2 mL de 1 mol L⁻¹ HNO₃, inmediatamente después el puerto central se conecta con el puerto 7 para dispensar los 2 mL (caudal de 2 mL min⁻¹) más 1 mL de *carrier*, con el propósito de asegurar que todo el volumen eluido llegue al recipiente si la detección es off-line o al bucle de la válvula de inyección en la detección on-line. En este punto la válvula solenoide se activa, direccionando el líquido hacia el reactor anudado donde se mezclará con el patrón interno mediante una inyección simultánea de ambos.

6. **Cambio de muestra.** Para eliminar la posible presencia de muestra anterior, se carga la muestra nueva (puerto 3), y se dispensa un volumen suficiente para asegurarse de que toda la tubería de la muestra está completamente llena de la muestra siguiente, enviándolo al desagüe (puerto 5). Esto eliminará cualquier residuo o presencia de la muestra anterior.

7. **Cambio de Resina.** El cambio de resina se realizará a diferentes frecuencias dependiendo del tipo de muestra que se analice, ya que a matrices más complejas menor duración de la resina. La resina usada se quita de la columna (se carga en el bucle de carga y se dispensa al desagüe) y se reemplaza con resina nueva de manera automática Finalmente se comienza en el punto 1.

Tabla 4.2. Secuencia completa de las operaciones para la determinación y pre-concentración del cadmio.

Etapa	Caudal LOV (mL min ⁻¹)	LOV posición	Válvula solenoide	Posición de Jeringa con carrier (H ₂ O)	Posición de jeringa con Bi
Carga de resina:					
a)	1.0	2	off	Pick up - on	Pick up - off
b)	1.0	7		Dispensa - on	Dispensa off
Acondicionamiento:					
a)	2.5	1	off	Pick up - on	Pick up - off
b)	1.0	7		Dispensa on	Dispensa off
Carga de muestra:					
a)	2.5	3	off	Pick up - on	Pick up - off
b)	2.3	7		Dispensa on	Dispensa off
Elución:					
a)	2.5	4	on	Pick up - on	Pick up - on

b)	2.0	7		Dispensa on	Dispensa on
Cambio de muestra:					
a)	5.0	3	off	Pick up - on	Pick up - off
b)	5.0	5		Dispensa on	Dispensa off

4.7. Diseño de experimentos

La optimización de los métodos desarrollados se llevó a cabo mediante diseño experimental, con el objeto de conocer los factores, que de manera individual o en interacción con otros factores, tienen una influencia en los valores de la variable respuesta; establecer los niveles de los factores que dan lugar a condiciones óptimas y predecir los valores de la variable respuesta para ciertos niveles de los factores.

El diseño de experimentos, tiene como finalidad dirigir y planificar los experimentos, para extraer la máxima cantidad de información a partir de los datos adquiridos, con el menor número de ensayos experimentales. La idea fundamental es variar todos los factores importantes simultáneamente en un conjunto de experimentos planificados, y conectar los resultados con la variable respuesta, mediante un modelo matemático. El modelo estimado se utiliza para interpretar, predecir y optimizar. Al optimizar el método de una forma multivariante se evitan las limitaciones del método univariante, tales como tener una comprensión limitada de los efectos de los factores y no alcanzar el óptimo real.

El método Box-Behnken es comúnmente utilizado para reducir el número de ensayos a realizar, ya que crecen exponencialmente con el número de factores a optimizar. La alternativa de usar diseños como los de Box-Behnken se debe a su fácil manejo de datos y reducido número de experimentos.

En el método se siguió el siguiente procedimiento: en primer lugar se realizó un estudio preliminar de las variables independientes o *screening*, y a continuación, con las variables o sus interacciones que fueron significativas, se llevó a cabo la optimización con un diseño superficie respuesta. En todos los casos se incluyeron tres puntos centrales, para estimar el error, la pérdida de linealidad en el centro del intervalo, y además determinar los intervalos de confianza del modelo seleccionado.

Para el *screening* se realizó un diseño factorial completo (*Full factorial*) 2^k , donde k es el número de factores. Este diseño permite estimar los efectos de las variables principales y sus interacciones. Con los resultados del *screening* se evaluó mediante la tabla de ANOVA, las variables a ser consideradas para los ensayos de superficie- respuesta.

Las variables a optimizar fueron:

1. Volumen del eluyente.
2. Concentración del eluyente.
3. Caudal de la muestra en la columna de SPE (tiempo de contacto).

Para cada factor se especificaron tres niveles incluyendo el punto central, que corresponde a la corrida experimental determinada por el valor medio entre los niveles alto y bajo de cada factor. Además, los puntos centrales nos permiten estimar la variabilidad sin tener que replicar todos los puntos axiales (experimentos correspondientes a los niveles alto y bajo de los factores).

CAPITULO V

Resultados y Discusión

5.1 Diseño y construcción del sistema en flujo

En la primera fase de la experimentación, se realizó el montaje del sistema utilizando la bureta multijeringa y el lab-on-valve, realizando la detección *off-line*. Una vez que el sistema se optimizó, y se realizaron los estudios de interferencias y parámetros analíticos, fue acoplado al detector ICP-MS para demostrar su capacidad de acoplamiento y detección en línea.

Si bien el ICP-MS es un detector selectivo, requiere para su buen funcionamiento que la muestra que se inyecta tenga un bajo contenido de sólidos disueltos. Con este objetivo, la SPE permite que el cadmio sea retenido por la resina y posteriormente eluido en un medio ácido, eliminando la matriz de la muestra.

El LOV permitió la manipulación de la muestra y los reactivos en un modo secuencial consiguiendo flujos directo y reverso y la reprogramación del método para adaptar fácilmente el mismo sistema a diferentes pasos del protocolo analítico. Además de su compactidad, otra ventaja del “lab-on-valve” es la posición rígida y permanente de los canales de procesamiento de la muestra, lo que asegura la repetitividad de la manipulación de los líquidos, proporcionando robustez y exactitud, como quedará demostrado más adelante por los parámetros analíticos y los resultados de la validación del método. La arquitectura abierta de la unidad de procesamiento central en el LOV-MSFIA, basada en una válvula de selección permite la manipulación de líquidos sino que también permite el acoplamiento a módulos auxiliares a través de puertos periféricos facilitando las operaciones en línea. De modo que, el acoplamiento del MSFIA al LOV, además de manipular los líquidos, permitió la adición en línea del patrón interno utilizado en el sistema.

5.2 Selección de la resina y de la molaridad de retención

Los primeros estudios fueron realizados para la retención tanto de cadmio como de plomo. Con el fin de comparar la capacidad de retención se ensayaron cinco resinas distintas, entre ellas de intercambio catiónico fuerte y débil, de intercambio iónico (Figura 5.1) y quelatante. Las condiciones de los estudios se basaron en la bibliografía y en las recomendaciones de los fabricantes, utilizándose distintas molaridades de ácido nítrico en la preparación de la muestra. Los ensayos de retención se realizaron determinando la señal (cps: cuentas por segundo) del ICP-MS para los isótopos del cadmio y del plomo con más abundancia relativa, el Cd-114 con un 28.73% y el Pb-208 con un 52.40%, respectivamente. Estos isótopos se determinaron en muestras

preparadas en diferentes molaridades de HNO_3 , luego de pasarlas a través de las resinas para evaluar su retención.

Las molaridades de retención ensayadas nunca fueron superiores a 6 mol L^{-1} , y luego diluídas hasta 0.3 mol L^{-1} ya que es la concentración que puede tolerar el equipo de detección ICP-MS, sin generar problemas en el detector. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, utilizando una concentración de $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de cadmio y plomo, respectivamente.

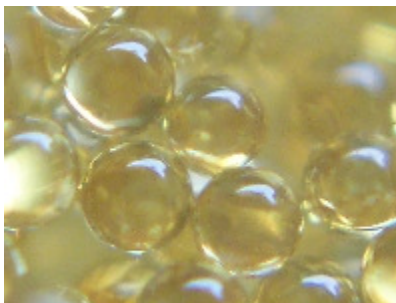


Figura 5.1. Partículas de resinas de intercambio iónico.

5.2.1 Resina de intercambio catiónico fuerte, SCX-500/3

La resina de intercambio catiónico fuerte SCX-500/3 con tamaño de partícula de $60 \mu\text{m}$ (Interchim, Montuclon Cedex, France) fue probada con molaridades de 0.5, 1, 1.5, 3 y 6 mol L^{-1} de ácido nítrico en la preparación de la muestra. En cada caso, la misma molaridad de ácido nítrico se utilizó para acondicionar la resina previamente a su uso. La Figura 5.2 muestra el comportamiento de la señal analítica, utilizando la resina de intercambio catiónico fuerte SCX-500/3 para el Cd-114 y Pb-208.

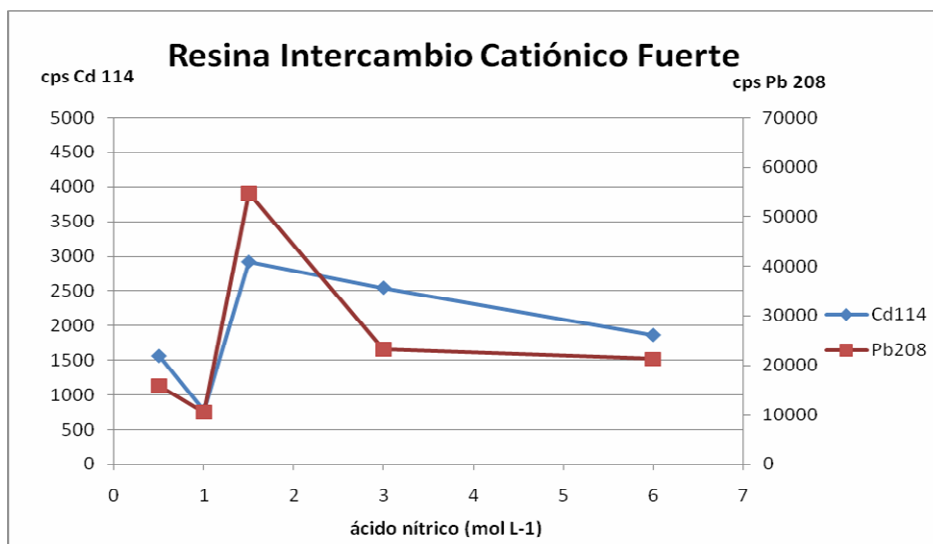


Figura 5.2. Molaridades de HNO_3 para resina intercambio cationico fuerte.

Puede observarse que la mayor retención se encuentra a 1.0 mol L^{-1} de HNO_3 que corresponde a 778 cps de Cd-114 y 10469 de Pb-208.

5.2.2 Resina de intercambio catiónico débil, WCX-500/3

La resina de intercambio catiónico débil WCX-500/3, tamaño de partícula $60 \mu\text{m}$ (Interchim, Montuclon Cedex, France) fue probada en ensayos de retención con molaridades de 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 y 6.0 mol L^{-1} de ácido nítrico en la preparación de la muestra, los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.3.

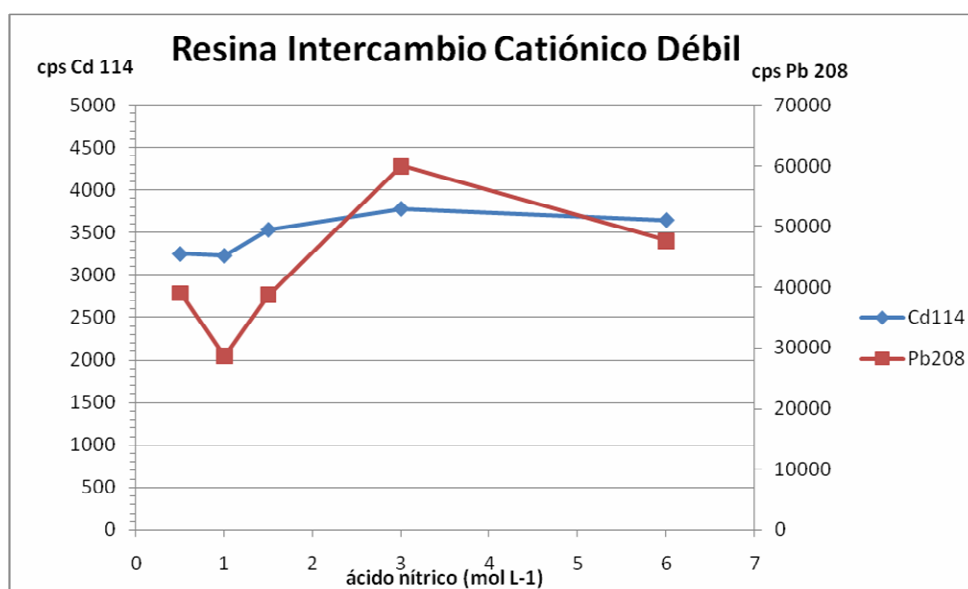


Figura 5.3. Molaridades de HNO_3 para resina de intercambio catiónico débil.

Se puede observar que la molaridad óptima de retención para la resina de intercambio catiónico débil WCX-500/3, también fue de 1.0 mol L^{-1} de HNO_3 . Sin embargo, comparando las señales en cps 778 a 3201 cps de Cd-114 y 10469 a 30102 de Pb-208. Para dichos isótopos Cd-114 y Pb-208 resulta una resina con menor capacidad de retención que la de intercambio catiónico anteriormente ensayada.

5.2.3 Resina de intercambio iónico, 30HCX-200/6

La resina de intercambio iónico 30HCX-200/6, con tamaño de partícula de 30 μm (Interchim Montuclon Cedex, France) generó sobrepresión en la columna del LOV, debida probablemente al empaquetamiento que sufre por su estructura, ya que tiene la mitad de diámetro que las anteriormente ensayadas. Por lo tanto los ensayos de retención con dicha resina no fueron posibles de realizar.

5.2.4 Resina quelatante, *Iminodiacetic acid*

En el caso de la resina quelatante *Iminodiacetic Acid* (Sigma Aldrich, USA), con un tamaño de partícula de 50-100 μm , tampoco pudo probarse, ya que al cabo de unos segundos las esferas se expandían en la columna, provocando que sea imposible su manipulación en el LOV. Por lo tanto los ensayos de retención en dicha resina no fueron posibles de realizar.

5.2.5 Resina intercambiadora de cationes fuertemente ácido, 50W-X8

Los ensayos de retención de la resina 50W-X8 (Dowex, Merck, Germany), con un tamaño de partícula de 90-250 μm se llevaron a cabo inicialmente con molaridades de ácido nítrico de 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 y 6.0 mol L^{-1} .

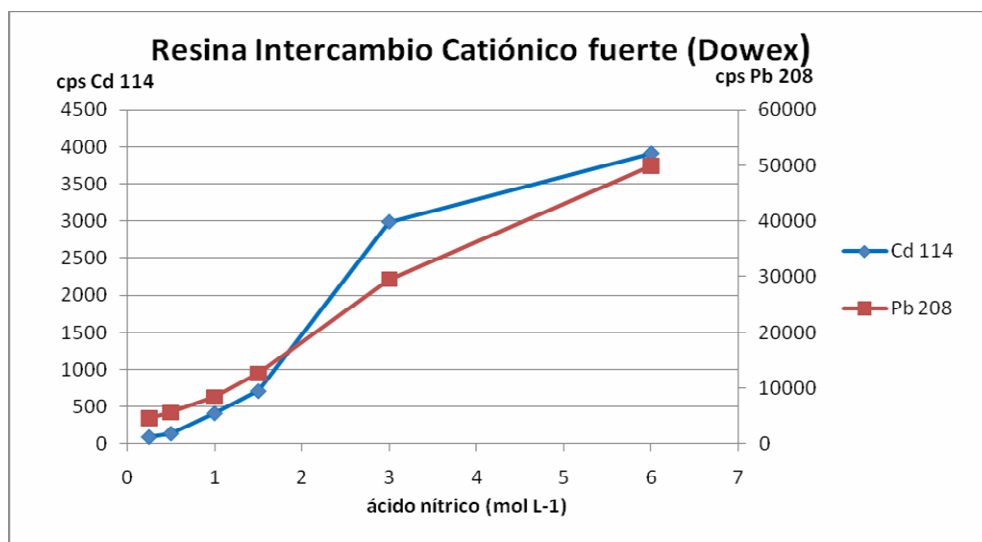


Figura 5.4. Molaridades de HNO_3 para resina de intercambio cationico fuerte Dowex.

En la Figura 5.4 se observa que para la molaridad de 0.25 mol L^{-1} de HNO_3 , las cps registradas para el Cd-114 fueron 142 y para el Pb-208 fueron 5612. Por lo tanto se procedió a realizar ensayos de retención a molaridades más bajas de 0.25 mol L^{-1} para encontrar el punto óptimo de retención de los analitos de interés.

La Figura 5.5 muestra las molaridades ensayadas en el rango de $0.25 - 1.5 \text{ mol L}^{-1}$, para la resina de intercambio catiónico Dowex. En este rango ensayado nuevamente la menor molaridad ofreció la mejor retención para la resina Dowex, registrándose una media de 96 cps para Cd-114 y 4576 cps para Pb-208. Observándose la tendencia de los resultados se determinó realizar más ensayos de retención bajando aún más la molaridad.

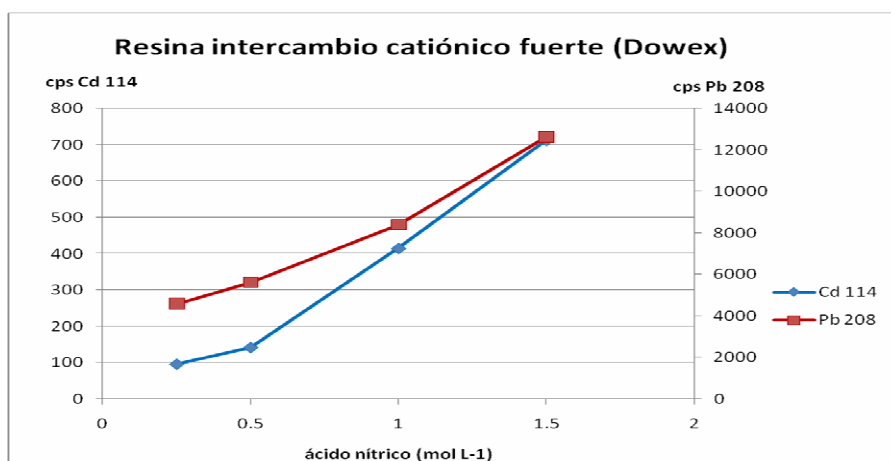


Figura 5.5. Molaridades de HNO_3 para resina de intercambio catiónico fuerte Dowex, en el rango de 0.25 a 1.5 mol L^{-1} .

La Figura 5.6 muestra los resultados de los ensayos de retención para molaridades entre 0.00001 y 0.1 mol L^{-1} . En el gráfico se observa un comportamiento diferente entre los analitos de interés. El cadmio presenta su óptimo de retención en $0.00001 \text{ mol L}^{-1}$ y a mayores molaridades la retención fue decreciendo. Por su parte el plomo presentó una molaridad óptima de retención en 0.01 mol L^{-1} .

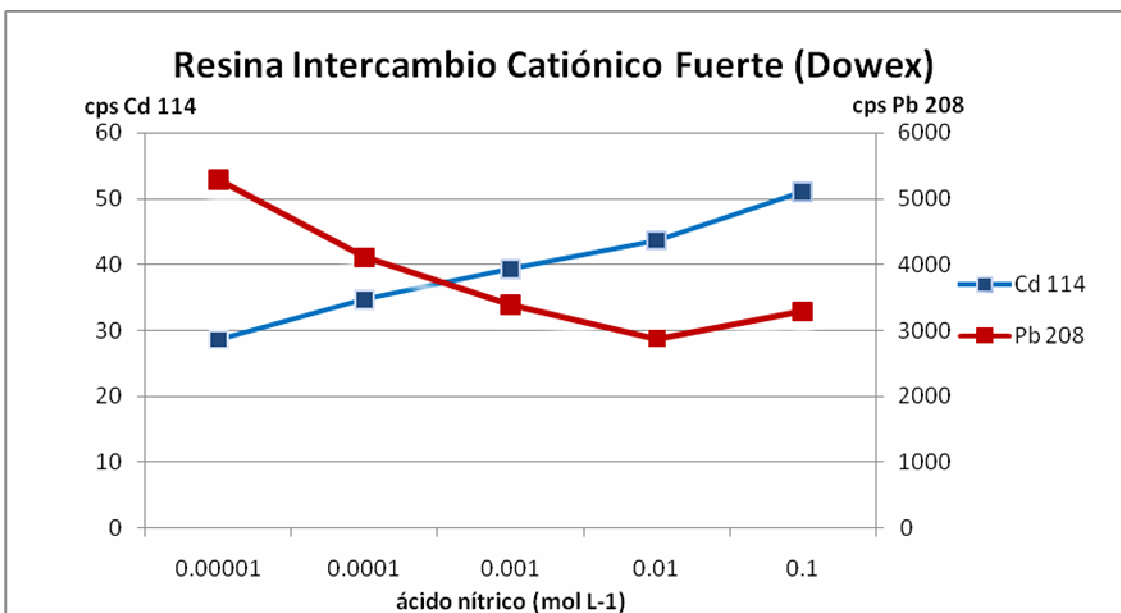


Figura 5.6. Molaridades de HNO₃ para resina de intercambio catiónico fuerte Dowex, en el rango de 0.00001 a 0.1 mol L⁻¹

En este punto de la experimentación se optó por un compromiso entre las molaridades de retención para el cadmio y el plomo. Se decidió seleccionar la molaridad de 0.001 mol L⁻¹ de HNO₃ (pH 3) ya que el cadmio se encuentra totalmente retenido (las cps son similares a la del blanco de reactivos) y la retención de plomo no difiere mucho de la molaridad de 0.01 mol L⁻¹.

Por lo tanto, los ensayos de retención realizados con las diferentes resinas, demostraron que la resina de intercambio de cationes fuertemente ácido Dowex 50W-X8 posee la mejor capacidad de retención y es totalmente apta para manipularla en el LOV. De modo que fue seleccionada para el desarrollo del sistema propuesto.

5.3 Selección del eluyente

Se realizaron ensayos para seleccionar un eluyente capaz de eluir simultáneamente el cadmio y el plomo. Es importante señalar que las opciones de eluyente son reducidas, ya que para preservar el buen funcionamiento del detector ICP-MS no es posible utilizar algunos ácidos o disoluciones que sirven para eluir ambos analitos, por ejemplo, una elevada molaridad de ácido clorhídrico.

El primer ensayo de elución se realizó con ácido acético, a una concentración 4 mol L⁻¹ (Khopkar, 1960), pero no se consiguieron buenos resultados para ninguno de los dos analitos.

Luego se ensayó con una mezcla de ácido nítrico con ácido clorhídrico en proporción 2:1, utilizada previamente para eluir Cd y Pb (Prusisz, 2004), obteniéndose una pobre elución de plomo y una muy deficiente para el cadmio.

Por último, se realizaron ensayos de selección de eluyente con ácido nítrico a diferentes molaridades. En la Figura 5.7 se muestra el comportamiento de la elución de cadmio a molaridades entre 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mol L⁻¹. Se observa que a una molaridad de 1.5 mol L⁻¹ de ácido nítrico, se obtienen los mejores resultados para el cadmio con un promedio de 10761 cps, que representan un 98.4 % de elución de cadmio respecto a la señal para la misma concentración sin pasar por la columna de SPE.

El caso del plomo, los resultados no fueron satisfactorios, ya que se recuperó un 57 % de plomo respecto a la señal para la misma concentración sin pasar por la columna de SPE. Por lo tanto, en este punto de la experimentación se descartó del proyecto al plomo por no disponer de tiempo suficiente.

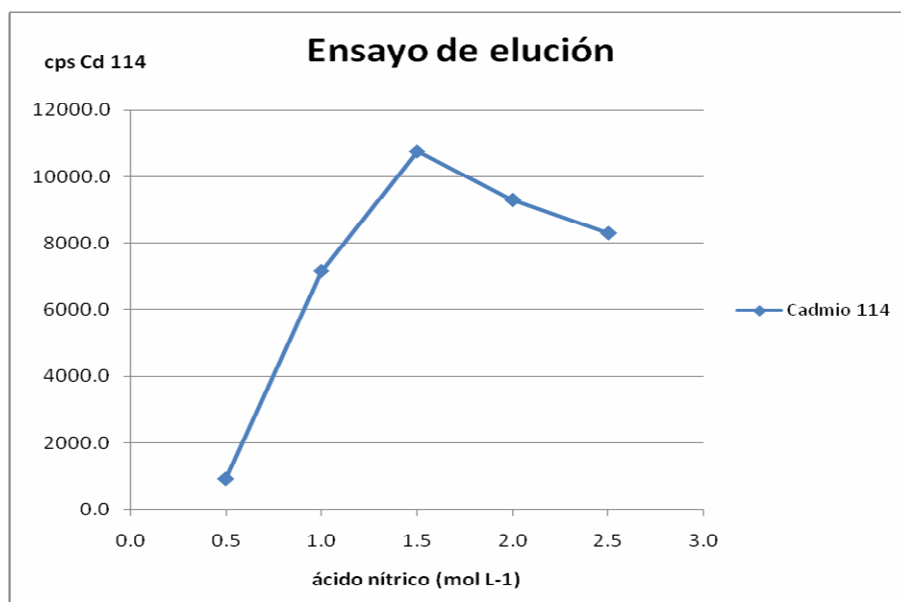


Figura 5.7. Molaridades de ácido nítrico para selección de eluyente.

5.4 Selección del patrón interno y del caudal de elución

Cuando han de efectuarse numerosos análisis similares durante un cierto período de tiempo, es útil comprobar la coherencia entre los datos mediante el uso de patrones internos. De este modo, cualquier variación en el detector será solventada al trabajar con la tasa entre las cuentas del analito de interés y las cuentas del patrón interno.

El uso de bismuto (Bi-209) como patrón interno, se basó en que no presenta interferencias en la detección con el cadmio, y fundamentalmente no se encuentra en las muestras de tabaco. Se realizaron ensayos (a una concentración de 2.5 µg Bi L⁻¹) con la finalidad de comprobar si el bismuto era retenido y eluido de la misma manera que el cadmio, para utilizarlo como patrón

interno en las etapas de separación y pre-concentración en la resina de extracción. Los resultados no fueron satisfactorios, ya que el 75% del bismuto agregado antes de la columna fue retenido en la resina, y sólo se eluyó un 25% del patrón interno. Por lo tanto, el bismuto es agregado en línea a la fracción de elución después de su paso por la columna de extracción del LOV y previo al análisis por ICP-MS.

Se realizaron ensayos para determinar el caudal de elución que permita obtener la mayor señal sin deteriorar la frecuencia de análisis. Los caudales analizados fueron de 0.5, 1.0 y 1.5 ml min⁻¹. En la Figura 5.8 se observa que el mayor número de cps de Cd-114 se encuentran en un caudal de elución de 1.0 ml min⁻¹, por lo tanto dicho caudal será el utilizado en el sistema propuesto.

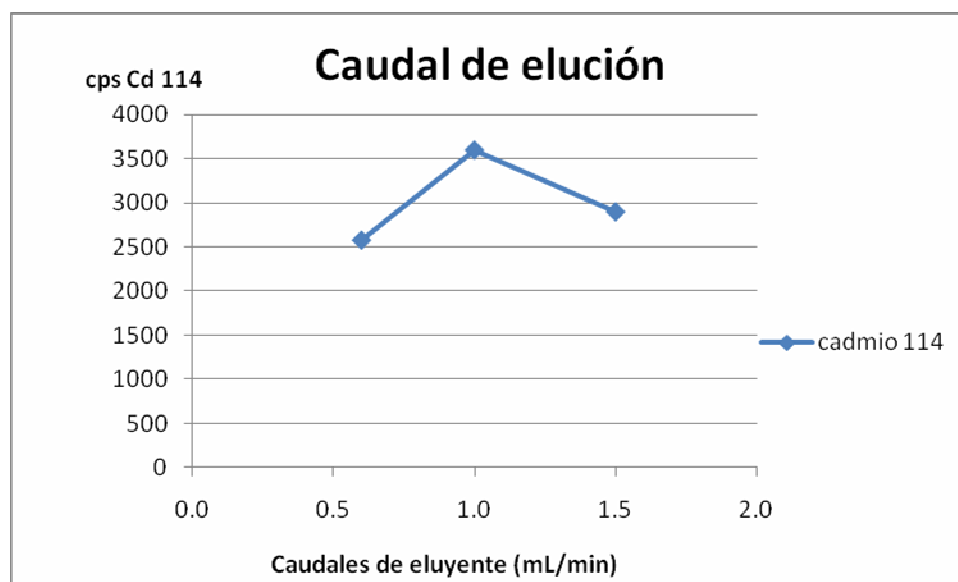


Figura 5.8. Caudales de elución en ml min⁻¹.

5.5. *Screening* y optimización de las variables mediante un diseño experimental

Para encontrar las condiciones óptimas para la separación, preconcentración y detección de cadmio a niveles ultra-traza mediante el sistema LOV-MSFIA, se llevaron a cabo diversos ensayos de un modo multivariante. La finalidad de la optimización, es encontrar los valores de las variables que arrojen la mayor señal analítica, es decir la máxima elución del cadmio retenido en la columna de separación y preconcentración del LOV.

Las variables a optimizar fueron: la acidez y el volumen del eluyente, y el caudal de retención de la muestra. Para la optimización del método se utilizó el paquete estadístico STATISTICA 6.0 StatSoft, Inc. (2001).

Primero se realizó un *screening*, con un diseño experimental 2^k , siendo k el número de variables independientes a optimizar, para estudiar las variables y sus interacciones. El *screening* contó con ocho experimentos y tres puntos centrales. En la Tabla 5.1 se presentan los niveles ensayados de las variables. En todos los casos, los rangos del dominio experimental fueron seleccionados por resultados reportados en la bibliografía o por ensayos preliminares. Por ejemplo, el rango de la concentración del eluyente comprendido entre 1 y 2.5 mol L⁻¹ fue seleccionado para ampliar el rango del estudio preliminar de selección de resina (ver Figura 5.7).

Los valores que se utilizaron para el *screening* se detallan en la Tabla 5.1. Se probaron valores de volumen de eluyente entre un rango de 0.5 y 2 ml ya que resultados preliminares marcaban dichos valores con una mejor respuesta analítica.

Tabla 5.1. Rango de valores de las variables en el ensayo de *screening*

Variable	(-1)	(0)	(+1)
Volumen de eluyente (mL)	0.5	1.25	2
Concentración de eluyente (mol L ⁻¹)	1	1.75	2.5
Caudal de retención (mL min ⁻¹)	0.286	0.643	1

En la Tabla 5.2. se detallan los valores utilizados de las variables del *screening*, en base a este ensayo se realiza la superficie de respuesta. Se observa que se realizaron 11 ensayos, en donde hubo 3 puntos centrales.

Tabla 5.2 Ensayos del *screening*

Ensayo	Volumen (mL)	Concentración (M)	Caudal (mL_min ⁻¹)
1	0,5	1	1
2	2	2,5	1
3	1,25	1,75	0,643
4	0,5	1	0,286
5	1,25	1,75	0,643
6	0,5	2,5	0,286
7	2	1	0,286
8	1,25	1,75	0,643
9	2	2,5	0,286
10	0,5	2,5	1
11	2	1	1

Como tanto la curvatura en el *screening* fue significativa, esto es que los resultados no se ajustaron al modelo lineal, y las tres variables fueron también significativas dentro del dominio experimental estudiado, se pasó a la segunda fase de la optimización para buscar los valores críticos de las variables, ajustando los resultados a un modelo con términos cuadráticos.

De este modo, se realizó un diseño de superficie de respuesta Box Behnkel, con las tres variables, que comprendió 15 experimentos, incluyendo tres puntos centrales. Los rangos estudiados en la superficie-respuesta se muestran en la Tabla 5.3. Los rangos de valores de concentración no se variaron respecto del *screening*, a pesar de las tendencias mostradas, por limitaciones del detector al no poder inyectarse concentraciones de ácido nítrico superiores al 2% ($\sim 0.3 \text{ ml L}^{-1}$).

Los valores inferior y superior del rango del caudal de retención se incrementaron siguiendo los resultados del screening.

Tabla 5.3. Rango de valores de la optimización.

Variable	(-1)	(0)	(+1)
Volumen del eluyente (mL)	0.25	1.125	2
Concentración del eluyente (mol L^{-1})	1	1.75	2.5
Caudal de retención(mL min^{-1})	0.5	1.4	2.3

En la Figura 5.9. se muestra el resultado del modelo estadístico con las recomendaciones del modelo estadístico.

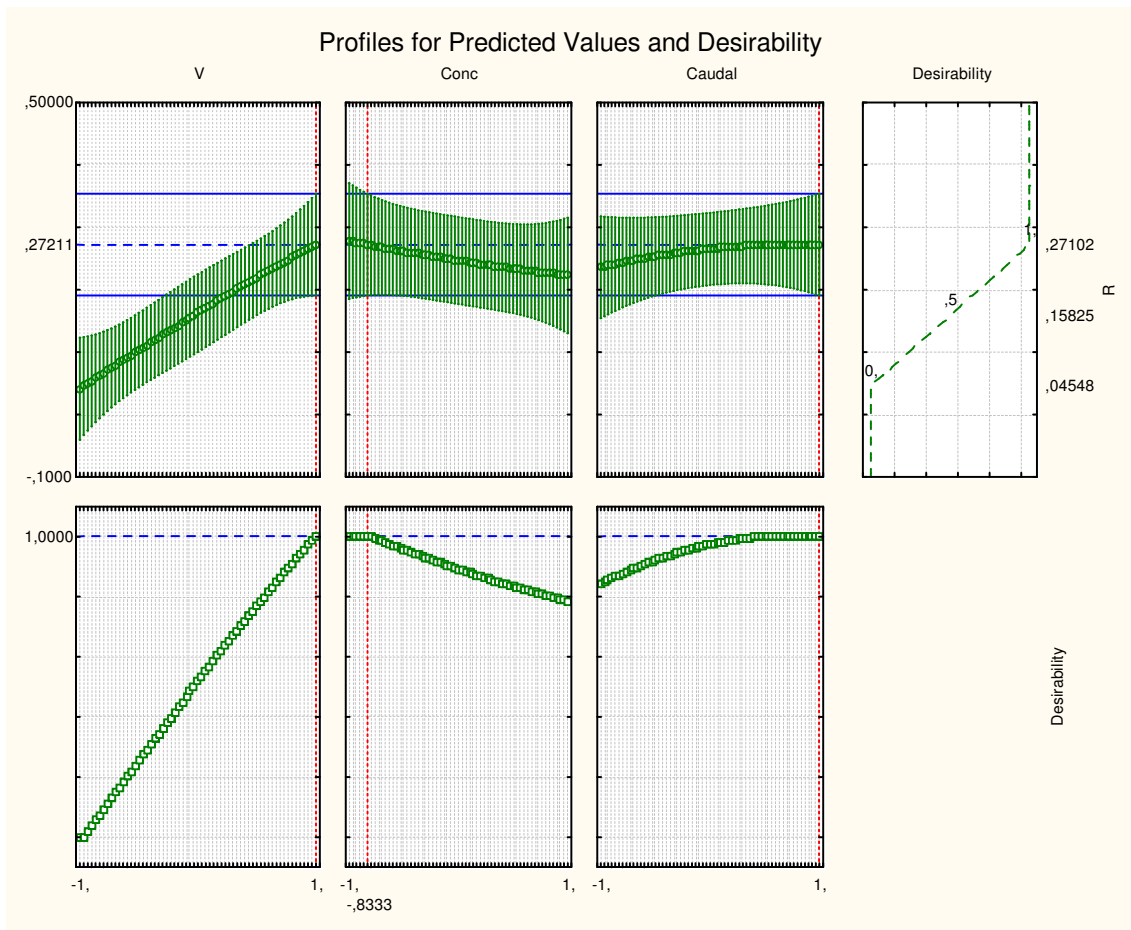


Figura 5.9. Gráfico de optimización para los valores de las variables.

En la Tabla 5.4 se presentan los datos del análisis estadístico, tabla de de Anova del modelo **Box-Behnken** aplicado.

ANOVA; Var.:R; R-sqr=,98944; Adj:,92606 (3 factor Box-Behnken design, 1 block , 15 runs (Spreadsheet1) in Boxbehnken)

Tabla 5.4 Tabla de anova modelo Box- Behnken aplicado

Ensayo	Volumen (mL)	Concentración (M)	Caudal (mL min ⁻¹)
1	0.25	1	1
2	2	1	1
3	0.25	2.5	1
4	2	2.5	1

5	0.25	1.75	0.5
6	2	1.75	0.5
7	0.25	1.75	2.5
8	2	1.75	2.5
9	1.125	1	0.5
10	1.125	2.5	0.5
11	1.125	1	2.5
12	1.125	2.5	2.5
13	1.125	1.75	1.75
14	1.125	1.75	1.75
15	1.125	1.75	1.75

En la Figura 5.10 se observa un ajuste satisfactorio de los valores observados vs. Los valores predichos por el modelo.

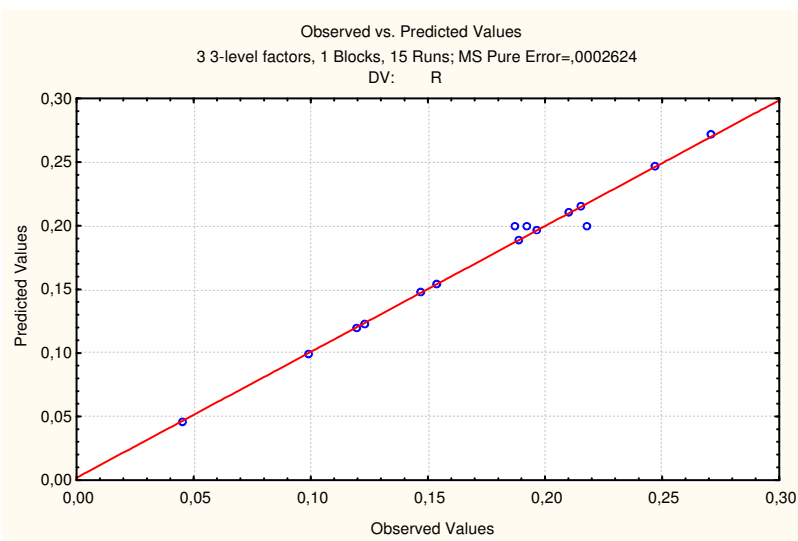


Figura 5.10. Ajuste de los valores predichos vs. los observados.

Los valores críticos se obtuvieron de la función deseabilidad (Figura 5.9). En el caso del volumen de eluyente, indica el máximo valor ensayado (+1) que corresponde a 2 ml. La concentración de eluyente sugerida es de 1.09 mol L^{-1} (-0.8333 en valor codificado). Para el caso del caudal de la muestra, la función deseabilidad indica se aprecia una tendencia clara de la curva al valor de (+1)

de valor 2.3 ml min^{-1} dichos valores serán utilizados a lo largo de la parte posterior de la experimentación.

La Tabla 5.5. muestra los valores críticos de las variables optimizadas: volumen y concentración de HNO_3 (eluyente) y el caudal de retención.

Tabla 5.5. Valores óptimos

Variable	Valor
Volumen de elución	2 mL
Concentración de HNO_3 (eluyente)	1.09 mol L^{-1}
Caudal de retención	2.3 ml min^{-1}

5.6. Factor de preconcentración

El sistema propuesto incluye en su protocolo analítico la SPE que permite tanto la separación del analito como su preconcentración. Esto implica una calibración másica y que los volúmenes de muestra a ser preconcentrados pueden variar. Se realizaron ensayos donde se mantuvo la masa de cadmio constante y se varió la concentración, de modo que los volúmenes variaron entre 1 y 50 ml. El volumen de 1 ml se fijó en función de la repetibilidad, ya que volúmenes más pequeños aumentaron la desviación estándar. Mientras que los 50 mL constituyen el volumen máximo de muestra que soporta la resina obteniéndose una recuperación superior al 90%.

Por lo tanto, se puede calcular un factor de preconcentración para volúmenes de muestra superiores a 6.0 mL, debido a que éste es el volumen final al que se lleva el eluido para alcanzar una molaridad de ácido que no afecte al detector. De tal forma que se consigue un factor de preconcentración máximo de 8.3, correspondiente a los 50 mL de volumen de muestra cargado en la resina y llevados a 6 mL.

La Figura 5.11 muestra el comportamiento constante de la señal correspondiente a diferentes volúmenes pasados por la columna de extracción del LOV. La respuesta se representa como una tasa entre los cps de Cd-114 y los cps de Bi-209.

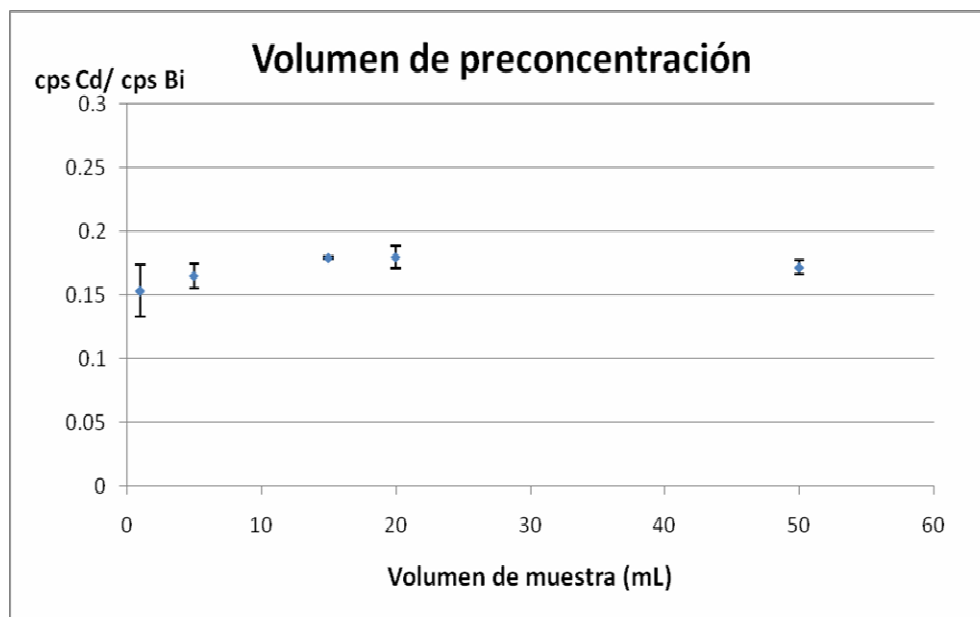


Figura 5.11. Volumen de muestra para preconcentrar con la resina Dowex 50W-X8

5.7. Parámetros analíticos

5.7.1 Durabilidad de la resina

Con el objetivo de estimar la cantidad de veces que puede ser reutilizada la resina, se realizaron ensayos consecutivos con la misma disolución patrón de cadmio, calculando el porcentaje de recuperación para cada uno de ellos.

La resina fue renovada en la columna al comienzo de las inyecciones y se realizaron 132 inyecciones consecutivas con el mismo patrón de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cadmio. Una vez obtenidas las eluciones, éstas fueron analizadas para determinar la cantidad de cadmio presente por medio del ICP-MS.

Los resultados obtenidos arrojaron una recuperación del analito superior al 94.9% durante las primeras 132 inyecciones con un desvío estándar relativo (RSD) del 4.7 %. Por lo tanto, se recomienda renovar el empaquetamiento de la columna luego de 130 inyecciones, hecho que se convierte en una ventaja importante, al reducir costos y residuos.

En estos ensayos, los resultados se expresan como una tasa entre los cps de Cd-114 y los cps de Bi-209, con lo cual se tiene la fiabilidad de la eliminación de ruido del detector.

Además, el sistema LOV propuesto ofrece la ventaja de renovar la resina de extracción en fase sólida de forma automática, lo que resulta en una mayor reproducibilidad.

5.7.2 Rango lineal de trabajo

El rango lineal de trabajo se obtuvo a partir de las masas de cadmio que dieron un buen ajuste en la recta de calibrado másica (cps netas frente a masa de cadmio en ng) ($y = 256.1x - 221.8$,

$r^2=0,9993$). De este modo, se estableció que bajo las condiciones óptimas descritas anteriormente se consigue un rango de trabajo lineal entre 1 y 100 ng de Cd. En la Figura 5.12 se muestra una curva de calibrado másica.

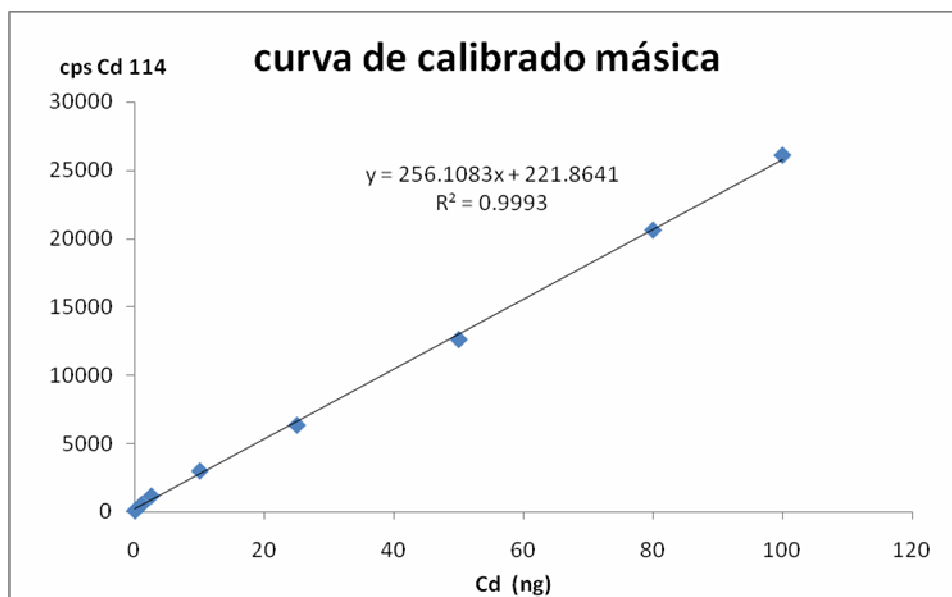


Figura 5.12. Curva de calibrado másica, cps netas frente a la masa de cadmio en ng. Se representa el valor medio \pm desviación estándar (n=3).

5.7.3 Límite de detección

El límite de detección (LOD), se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado. El límite de detección para el método propuesto calculado de acuerdo a la IUPAC como 3 veces la desviación estándar del blanco (n=10) sobre la pendiente de la curva de calibrado, es de 0.07 ng. Para expresar el LOD en concentración, se divide la masa de cadmio sobre el máximo volumen de muestra preconcentrable, alcanzando un LOD de 1.34 ng L^{-1} (ppt).

El ensayo consistió en determinar la señal de 10 eluidos de blancos obtenidos con la misma resina y una curva de calibrado para determinar la pendiente de dicha curva.

La Tabla 5.6 muestra la señal expresada como la tasa de cps de Cd-114 y las cps de Bi-209.

Tabla 5.6. Calculo del desvió estándar de 10 blancos.

Blanco	cps Cd-114/ cps Bi-209
1	0.0016
2	0.0013
3	0.0014
4	0.0015
5	0.0015
6	0.0015
7	0.0015
8	0.0013
9	0.0015
10	0.0016
Desv. estándar	9.6E-05

5.7.4 Repetibilidad y reproducibilidad

Para estimar el error que afecta a la precisión de la señal analítica, los parámetros analíticos de repetibilidad y reproducibilidad fueron calculados.

5.7.4.1 Repetibilidad

La medida del error se puede estimar a partir de la desviación estándar relativa (RSD), que se basa en la medida de una disolución de masa o concentración conocida bajo las mismas condiciones de operación el mismo día de trabajo.

La desviación estándar relativa (RSD) está dada por:

$$RSD= S*100/ X$$

Donde,

S es la desviación estándar

X es la media de las réplicas

Se obtuvo un RSD de 2.7 %, analizando 10 repeticiones de una solución de cadmio a una concentración de 25 µg L⁻¹, el mismo día de trabajo sin cambiar la resina de SPE. Los resultados de muestran en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Resultados del ensayo de repetibilidad.

Réplica	cps Cd-114/ cps Bi-209
1	0.132
2	0.141
3	0.137
4	0.137
5	0.143
6	0.135
7	0.141
8	0.143
9	0.135
10	0.141
Media	0.138
Desv. Estándar	0.003
RSD (%)	2.4

5.7.4.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad es un parámetro analítico que también representa una medida del error. Se calcula de manera similar a la repetibilidad, con la variante que la reproducibilidad se desarrolla en días diferentes de trabajo y bajo condiciones diferentes (por ejemplo, bajo distintas cargas de la resina, con reactivos y patrones preparados el día del análisis), la finalidad es determinar la precisión del método propuesto en distintos días de trabajo. Se obtuvo un RSD de 3.2 % analizando 5 réplicas del mismo patrón, en 5 días de trabajo distintos. La Tabla 5.6 muestra los

resultados con los que se calculó la reproducibilidad del método propuesto, a partir de la señal analítica y su respectiva desviación estándar.

Tabla 5.6. RSD para 5 observaciones (Reproducibilidad)

Fecha	Concentración $\mu\text{g L}^{-1}$	cps Cd-114 / cps Bi-209
20/01/2012	2.5	0.140
23/01/2012	2.5	0.132
25/01/2012	2.5	0.141
28/01/2012	2.5	0.143
31/01/2012	2.5	0.138
Media		0.139
Desv. Estándar		0.004
RSD (%)		3.2

La Tabla 5.9. muestra un resumen de los parámetros analíticos del método propuesto para la determinación de cadmio en muestras de tabaco.

Tabla 5.9. Parámetros analíticos

Parámetro analítico	Valor obtenido
Límite de detección (masa)	0.07 ηg
Límite de detección (concentración)	1.34 ppt
Repetibilidad (n=10)	2.4 %
Reproducibilidad (n=5)	3.2 %
Durabilidad de la resina	130 inyecciones
Volumen preconcentrable	50 ml
Rango lineal de trabajo	1-100 ng
Frecuencia de inyección	9 h^{-1}

En la tabla 5.10. se presenta una comparación con métodos existentes basados en técnicas de análisis en flujo para la determinación de cadmio en muestras de tabaco.

Como puede observarse, el método propuesto permite preconcentrar hasta 50 mL de muestra, lo que conlleva a un límite de detección muy bajo, similar al alcanzado por un método SIA-LOV con detección por espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS). Sin embargo, el método SIA-LOV-ETAAS presenta un rango lineal de trabajo muy estrecho en comparación con el método propuesto. En cuanto a la frecuencia de análisis, si bien el método basado en la técnica FIA presenta la más elevada, tiene la desventaja de alcanzar unos límites de detección muy pobres (tres órdenes de magnitud mayor que el método propuesto). Además, es importante mencionar la gran versatilidad que presenta el método propuesto al permitir cargar entre 1 y 50 mL de muestra, adaptando de esta forma el contenido en masa de cadmio a la curva de calibrado másica.

Tabla 5.10. Comparación de parámetros analíticos de métodos basados en técnicas de análisis en flujo para la determinación de Cd en tabaco.

Parámetro Analítico	Frecuencia de análisis (h ⁻¹)	Volumen de muestra (mL)	Límite de detección (ng L ⁻¹)	Rango lineal de trabajo (µg(RSD) L ⁻¹)	Precisión (%)	Ref.
1. LOV-MSFIA ICP-MS Tabaco	9	1-50	1.34	0.1-10	2.4	Propuesto
2. FIA FAAS Tabaco	60	7	1 100	2-20	4	Lemos, 2008
3. SIA-LOV ETAAS Sedimentos	12	1.8	1	0.005-0.050	3.6	Long, 2005
4. FIA-SPE FAAS Aguas	24	12	90	300-12,000	2.9	Anthemidis, 2011

5.8. Interferencias

Debido a que la resina Dowex 50W-X8 de intercambio catiónico fuerte, no solo retiene cadmio sino también otros elementos con estado de oxidación +2, la selección de posibles elementos interferentes se basó en dos aspectos: analitos con estado de oxidación +2 y que éstos elementos se encuentren presentes en la muestra de tabaco.

Se considerará que un elemento causa interferencias cuando afecte en $\pm 10\%$ a la señal analítica del analito de interés.

Los analitos seleccionados para el análisis de interferencias fueron plomo, níquel y cromo. Las concentraciones estudiadas de los posibles interferentes nunca superaron la proporción 1: 1 respecto a la concentración de cadmio ya que es la máxima proporción en la que estos elementos se encuentran en el tabaco, según Pappas *et al.* (2006). El cadmio para el estudio de interferencias se mantuvo a una concentración de $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Se ensayaron concentraciones de los posibles cationes interferentes en un rango entre 0.5 a $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ sin encontrarse modificaciones significativas en la señal del cadmio para los tres elementos estudiados.

5.9. Validación del método

La validación del método MSFIA-LOV propuesto para cadmio se realizó con un material de referencia certificado DORM-2 (músculo de pescado) del National Research Council Canada (NRC).

En la Tabla 5.11. se presentan los resultados obtenidos. La evaluación de los resultados se realizó mediante una comparación de medias con la prueba t-student al 95% de confianza, donde no se encontraron diferencias significativas entre el valor certificado y el obtenido.

Tabla 5.11. Análisis de cadmio en el material de referencia certificado DORM-2.

Material de referencia certificado	Valor certificado	Valor encontrado
DORM-2 (músculo de pescado)	$0.043 \pm 0.008 \text{ mg kg}^{-1}$	$0.0480 \pm 0.0005 \text{ mg kg}^{-1}$

*Los resultados son expresados como valor medio \pm desviación estándar (n=3)

5.10 Muestras reales

La aplicación del método analítico propuesto en muestras de tabaco se llevó a cabo satisfactoriamente con recuperaciones comprendidas entre el 90 y el 105 % (Tabla 5.12). El tabaco analizado consistió en seis muestras de las cuales, una fue tabaco de liar, cuatro muestras de distintas marcas de tabaco comercial y una última muestra de planta de tabaco cultivada en la UIB.

Tabla 5.12. Análisis de muestras de tabaco por el método MSFIA-LOV-ICP-MS.

Muestra	Cd Agregado (ng)	Cd Encontrado (ng)	Recuperación %
Pueblo	0	31.2 ±0.4	103
	25	58.0 ±1.0	
Camel	0	37.0 ±0.1	90
	25	56.0 ±0.8	
Philip Morris	0	31.2 ±2.7	96
	25	54.0 ±1.2	
Gold Copot	0	27.4 ±0.9	97
	25	51.0 ±0.4	
Marlboro	0	29.4 ±0.8	97
	25	52.9 ±0.1	
Planta de tabaco	0	8.70 ±0.2	105
	25	35.5 ±0.3	

*Los resultados son expresados como valor medio ± desviación estándar (n=3).

Los porcentajes de recuperación obtenidos para las muestras de tabaco confirman al sistema propuesto como una alternativa eficiente para monitorear cadmio en dichas muestras en niveles ultra traza. Los resultados obtenidos con el sistema LOV-MSFIA propuesto se comparan con trabajos previos (Tabla 5.13), en donde se observa que la concentración media de cadmio en cigarrillos ha disminuido con el tiempo.

Tabla 5.13. Comparación de valores de cadmio encontrados en cigarrillos.

Cigarrillo	Técnica de Análisis en Flujo	Cd encontrado (ng por cigarrillo)	Referencia
Comercial, Estados Unidos	FIA	1 930	Menden <i>et al.</i> , 1972
Comercial, Alemania	FIA	1 300	Franzke <i>et al.</i> , 1977
Comercial, Italia	FIA	1 390	Perinelli & Carugno 1978
Comercial, Alemania	FIA	1 220	Barkemeyer, 1979
Comercial,	FIA	≥ L.D.	Lemos <i>et al.</i> , 2008
Comercial, España	MSFIA-LOV	892	En este estudio

Al comparar la concentración de cadmio de la hoja de tabaco de la variedad *sylvestris*, cultivada en la UIB (Mallorca España), puede observarse que su contenido en cadmio es similar a los más bajos encontrados en hojas de tabaco en otros sitios (Lugon-Moulin *et al.*, 2006). (Tabla 5.14).

Tabla 5.14 Concentración de cadmio en hojas de tabaco de diferentes países.

País	Concentración de Cadmio (ng g ⁻¹)
India	330 ±170
Filipinas	2240 ±750
Tailandia	1990 ±750
Turquía	560 ±680
Albania	1640 ±1350
Bulgaria	1060 ±870
Francia	1460 ±730
Grecia	770 ±460
Italia	820 ±270
Argentina	650 ±450
Brasil	750 ±610
Ecuador	1950 ±670
Estados Unidos	510 ±50
España* (este estudio)	348 ±8

Los valores de concentración son expresados con un valor medio ± desviación estándar (n=216).

*Los valores de concentración son expresados con un valor medio ± desviación estándar (n=3).

CAPÍTULO VI

Conclusiones y recomendaciones

El sistema LOV desarrollado se aplicó con éxito para la determinación de cadmio por ICP-MS, en muestras orgánicas.

Con el método propuesto es posible analizar cadmio en niveles traza en muestras de tabaco. Además, el sistema desarrollado ofrece una alta precisión y reproducibilidad.

Se logró mejorar el límite de detección de cadmio en relación a los trabajos publicados anteriormente.

El reemplazo de la resina es totalmente automático, y aunado a la pequeña cantidad de resina empleada y a su larga duración, se reduce el costo del análisis. Como se trata de un sistema miniaturizado, se minimiza no sólo la cantidad de resina empleada, sino también el volumen de muestra y del resto de los reactivos.

La técnica LOV propuesta para la determinación de cadmio automatiza las operaciones de introducción y pre-tratamiento de la muestra (separación y preconcentración), minimizando la intervención del analista.

El sistema LOV-MSFIA desarrollado se aplicó con éxito para la determinación de Cadmio por ICP-MS.

Recomendaciones para futuros trabajos

Se sugiere adaptar el sistema LOV-MSFIA de separación y pre-concentración para la determinación de otros analitos y tipos de muestra.

Para evitar la contaminación o el efecto memoria de muestras anteriores, es importante conocer el volumen de líquido que puede contener cada tubería que conecta los recipientes al sistema, de esta manera, cuando exista un cambio de muestra se tomará la cantidad apropiada de líquido, dispensando al desagüe el doble de ese volumen para asegurar la limpieza de la tubería.

Referencias

- Anthemidis A., G. G. (2011). On-line sorptive preconcentration platform incorporating a readily exchangeable Oasis HLB extraction micro-cartridge for trace cadmium and lead determination by flow injection-flame atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal* , Vol. 98 pp 66-71.
- Araín M., K. T. (2008). Hazardous impact of toxic metals on tobacco levels grown in contaminated soil by ultrasonic assisted pseudo-digestion: multivariate study. *J. Hazard Mater* , Vol 155, 1-2.
- ATSDR. (2008). *Cadmio*. disponible en línea: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts5.html.
- Barakat, M. (2011). New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry* , vol. 4 361-377.
- Barkemeyer, S. &. (1983). Cadmium concentrations in tobacco and tobacco smoke. *Ecotoxicology and environmental safety* , vol. 7 71-78.
- Binggan W., J. F. (2009). Spatial distribution and contamination assessment of heavy metals in urban road dusts from Urumqi, NW China. *Microchemical Journal* , Vol. 93 147-152.
- Bragazza, L. (2006). Heavy metals in bog waters: An alternative way to assess atmospheric precipitation quality? *Globan Planetary Change* , vol. 5 290-298.
- Bulska E., W. M. (1997). On-line preconcentration of lead and cadmium for flame atomic absorption spectrometry using a flow-through electrochemical microcell. *Anal. Chim. Acta* , Vol. 357 pp 133-140.
- C.G. Amorim, R. S. (2010). *Food Chemistry* , Vol (122) 871.
- Cerdà V., E. J. (1999). *Talanta* , volumen 50, 695.
- Cerdà, V. (2006). *Introducción a los métodos de análisis en flujo*. Palma de Mallorca: SCIWARE, S.L.
- Cotton F.A., W. G. (1999). *Advanced Inorganic Chemistry*. New York: John Wiley & Sons INC. Sixth ed.
- Davis A., W. P. (2006). Determination of cadmium in biological samples. *Appl. Spectrosc.* , vol.41 35-75.
- Demarini, D. (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.* , vol. 567 447-474.
- Dybing, F. &. (2003). Application of toxicological risk assessment principles to the chemical constituents of tobacco smoke. *Tob. Control* , Vol. 12 424-430.

- F. Poole. (2003). *Trends Anal. Chem.* , Vol. 22, 362.
- Ferreira S., A. J. (2007). Review of procedures involving separation and preconcentration for the determination of cadmium using spectrometric techniques. *Journal of Hazardous Materials* , Vol. 145 pp 358-367.
- Ferreira S., A. J. (2007). Review of procedures involving separation and preconcentration for the determination of cadmium using spectrometric techniques. *Journal of Hazardous Materials* , Vol. 145, 358-367.
- Forte, G. (2007). Quantification of cadmium and lead in offal by SF-ICP-MS: Method development and uncertainty estimate. . *Food chemistry* , Vol 105 1591-1598.
- Greenwood, N. (1997). *Chemistry of the elements*. Elsevier, 2 Ed.
- Guell R., A. G. (2008). Sensitive and stable monitoring of lead and cadmium in seawater using screen-printed electrode and electrochemical stripping analysis. *Analytica Chimica Acta* , Vol. 627 219-224.
- Hansen, R. &. (1975). *Ana. Chim. Acta* , vol. 78 145.
- Harrison. (2000). *Rapid Commun. Mass Spectrom.* , Vol (14) 1377.
- Hawkes, N. (1997). Influences and trends in lead/acid battery demand, lead supply and prices. . *Journal of power sources.* , Vol. 67 213-218.
- Husgavfel-Pursiainen, K. (2004). Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. *Mutat. Res* , Vol. 567 427-445.
- IARC. (1993). Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. *IARC Monographs on the evaluation of Carcinogenic Risks to Humans and Their Supplements* , Vol. 58 1-444.
- Khopkar. (1960). Cation- exchange behaviour of barium on dowex 50 W-X8 separation from mixtures. *Analytica Chimica Acta* , vol. 23 441-445.
- Ki-Hyun, K. (2007). Airborne cadmium in the major monitoring locations in Korea between 1991 and 2004. *Atmospheric Environment* , Vol. 41, 4380-4395.
- Knappek J., K. J. (2005). Determination of cadmium by electrothermal atomic absorption spectrometry by using electrochemical separation in a microcell. *Spectrochim. Acta B* , Vol. 60 pp 393-398.
- L. Ferrer, G. A. (2005). *Talanta* , Vol. (68) 343.
- Lapa. (2002).

- Lemos V., G. C. (2008). Flow injection preconcentration system using a new functionalized resin for determination of cadmium and nickel in tobacco samples. *Journal of Hazardous Materials* , Vol. 155 128-134.
- Levallois, R. &. (1997). Effects of maternal cigarette smoking and alcohol consumption on blood lead levels of newborns. *Am. J. Epidemiol.* , vol. 145 250-257.
- Little J., C. A. (2004). Tobacco smoking and oral clefts: a meta-analysis. *World Health Organ.* , Vol. 82 213-218.
- Long X., H. H. (2005). Determination of trace metal ions via on-line separation and preconcentration by means of chelating Sepharose beads in sequential injection lab-on-valve (SI-LOV) system coupled to electrothermal atomic absorption spectrometric detection. *Talanta* , vol. 66 1326-1332.
- Lugon-Moulin N., M. F. (2006). Cadmium concentration in tobacco (*Nicotina tabacum* L.) from different countries and relationship with other elements. *Chemosphere* , vol. 63 1074-1086.
- Marin. (2009). Curso teorico practico de ICP-MS del modelo X-series II marca Thermo Scientific. Chihuahua Mexico: Thermo Electron Corporation.
- Marshall, R. &. (1990).
- Masironi, C. &. (1992). Toxic and trace elements in tobacco and tobacco smoke. *World Health Organ.* , Vol. 70 269-275.
- McLaughlin, M. a. (1999). Cadmium in soils and plants. *Kluwer Academic Publishers* .
- Miranda. (2009). Curso de metodos espectrometricos atomicos: ICP-OES y ICP-MS, Centro de Investigacion en Materiales Avanzados, S.C. Chihuahua Mexico.
- Miro, H. a. (2007). *Anal. Chim Acta* , Vol.(600) 46.
- Moore, S. a. (2004). Adverse health effects of chronic exposure to low-level cadmium in foodstuffs and cigarette smoke. *Environ Health Perspect.* , vol. 112 1099-103.
- Morton, L. &. (2008). Cigarette smoke chemistry market maps under Massachusetts Department of Public Health smoking conditions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* , vol. 51 1-30.
- Nordeberg A., J. T. (1998). Biological monitoring of cadmium exposure and renal effects in a population group residing in a polluted area in China. . *Science of the total Environment* , Vol. 199 111-114.
- Pappas R., P. G. (2006). Cadmium, lead and thallium in mainstream tobacco smoke particulate. *Food and Chemical Toxicology* , vol. 44 714-723.

- Pons C., F. R. (2006). *Trends Anal. Chem.* , vol. 25 583-588.
- Prusisz, P. &. (2004). Pre-concentration of Cd, Co, Cu, Ni and Zn using different off-line ion exchange procedures followed by the inductively coupled plasma atomic emission spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* , Vol. 502 83-90.
- Prusisz, P. a. (2003). Pre-concentration of Cd, Co, Cu, Ni and Zn using deifferent off-line ion exchange procedures followed by the inductively coupled plasma atomic emission spetrometric detection. *Analytica Chimica Acta* , Vol. 502 pp 83-90.
- Reis. (1994).
- Rustemeier K., S. R. (2002). Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke. *Food and chemical toxicology* , vol. 40 93-104.
- Ruzicka. (2000). *Analyst* , Vol. 125 153.
- Ruzicka. (2008). *Comprehensive Anal. Chem.* , vol (54) 23-50.
- Skeggs. (1957).
- Skoog D., H. J. (2001). *Principios de analisis instrumental*. Mc Graw Hill, cap 11 269-289.
- Talio M., L. M. (2010). Cadmium monitoring in saliva and urine as indicator of smoking addiction. *Science of the total enviroment.* , Vol. 408, 3125-3132.
- Teeyakasema W., N. M. (2007). Monitoring of cadmium toxicity a thai population with high-level enviromental exposure. *Analytica Chimica Acta* , Vol. 169 185-195.
- Thielen A., K. H. (2008). Tobacco smoke: Unraveling a controversial subject- . *Experimental and toxicologic Pathology* , Vol. 60 141-156.
- Torjussen W., Z. H. (2003). Cigarette smoking and nickel exposure. *J. Environ. Monit.* , Vol. 5 198-201.
- Trojanowicz, M. (2008). *Advances in flow analysis* . Wiley and Sons.
- Valiente M., P. C. (2008). Técnicas de separación química (GTS): Oferta tecnológica para análisis. Laboratorio de ICP-OES e ICP-MS. *Univeridad de Barcelona* .
- Wagner. (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. *Adv. Agron* , vol. 51 173-212.
- Wang, H. H. (2003). On line simple-pre-treatment chemes for trace-level determinations of metals by coupling flow injection or sequential injection with ICP-MS. *Trends in Analytical Chemmistry* , Vol. 22 836.

Warnken K., T. D. (2000). Performance optimization of a commercially available iminodiacetate resin for the determination of Mn, Ni, Cu, Cd and Pb by on-line preconcentration inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* , Vol. 423 265-276.

Worley. (2000). ICP-MS alta resolución con plasma acoplado inductivamente espectrometría de masas. *online: [Http://zonvark.wustl.edu/icpms/hires.html](http://zonvark.wustl.edu/icpms/hires.html).*

Y. L. Yu, Y. J. (2011). *Trends Anal. Chem.* , Vol 30, 1649.