



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN
MATERIALES AVANZADOS, S.C.**

**Desarrollo de un sistema automatizado
para la determinación en línea de DMA y
Arsénico inorgánico por fluorescencia
atómica**

TESIS

que como requisito para obtener el grado de
MAESTRA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AMBIENTAL

Presenta:

Laura Lizeth Chaparro Carrillo

Directores de Tesis:

**Dra. Luz Olivia Leal Quezada
Dra. Laura Daniela Ferrer Trovato
Dr. Víctor Cerdà Martín**

Chihuahua, Chihuahua. Diciembre 2010

Dedicatorias

♣ *Con todo mi amor a mi familia que siempre me ha apoyado,
En especial a mis padres,*

*A usted mami gracias por sus consejos sus correcciones y por
darme el aliento a seguir adelante,*

*A usted papi por querer siempre lo mejor para mi, por su trabajo
y por el apoyo incondicional,*

*Gracias a los dos por que este trabajo es dedicado a ustedes,
Los Amo.*

♣ *Y gracias a ustedes hermanos, que me han apoyado de
diferente manera y gracias por mis sobrinos hermosos que
me han dado.*

Gracias Dios por permitirme este logro...

Agradecimientos

- ~ A todas aquellas personas que de alguna manera me ayudaron con la realización de esta tesis, deseo expresarles mi agradecimiento.
- ~ Principalmente a quienes son directamente participantes de este trabajo, a Luz Leal, Laura Ferrer y Víctor Cerdà, gracias por todo su apoyo y confianza.
- ~ A mis compañeras y amigas, que me han escuchado y apoyado en todo momento, a Gladiana Beltrán, Angélica Cervantes y Claudia Peregrino, muchas gracias por su amistad.
- ~ A los integrantes del Grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente, con quienes compartí muy buenos momentos durante mi estancia para la realización del trabajo de tesis.
- ~ A todas aquellas personas que me brindaron su amistad durante mi estancia en Palma.

A todos y cada uno de ustedes, gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Capítulo I. El arsénico	
1.1 Características químicas del arsénico	5
1.2 Usos del arsénico	7
1.3 Distribución ambiental del arsénico	8
1.4 Los compuestos del arsénico	11
1.5 Toxicidad del arsénico	11
1.5.1 Genotoxicidad del arsénico	12
1.6 Principales vías de absorción	14
1.7 Efectos sobre la salud	16
1.8 Metabolización del arsénico	19
1.8.1 El proceso de metabolización del arsénico	20
Capítulo II Revisión de la metodología analítica	
2.1 Introducción	23
2.2 Generación de hidruros	23
2.2.1 Mineralización	25
2.2.2 Instrumentación en la generación de hidruros	26
2.3 Espectrofotometría de fluorescencia atómica (AFS)	28
2.3.1 Especiación de As sobre la base de detección de AFS	33
Capítulo III. Automatización de sistemas analíticos	
3.1 Introducción	34
3.2 Análisis por inyección en flujo (FIA)	35
3.3 Análisis por inyección secuencial (SIA)	37
3.4 Análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA)	39
3.5 Programa para el control de los instrumentos, adquisición y análisis de datos	43
3.6 Objetivo	48

3.6.1	Objetivos específicos	48
Capítulo IV. Materiales y métodos		
4.1	Preparación de reactivos y muestras	49
4.2	Montaje del sistema automatizado para la introducción de muestra	50
4.2.1	Procedimiento	54
4.3	Montaje del sistema UV para la fotooxidación de la muestra	55
4.3.1	Procedimiento	58
4.4	Optimización de variables que afectan la señal analítica	59
4.5	Parámetros analíticos	60
4.6	Estudio de iones interferentes	60
4.7	Validación del método con muestra certificada	60
4.8	Análisis de muestras ambientales	60
Capítulo V. Resultados y discusión		
5.1	Montaje del sistema y optimización de tuberías a utilizar	62
5.1.1	Longitud del bucle de reacción	62
5.1.2	Longitud del manifold de separación del HCl	63
5.1.3	Longitud del reactor UV y tiempo de foto-oxidación	64
5.2	Caudales	65
5.2.1	Caudal de los gases	66
5.2.2	Caudal de los reactivos generadores del hidruro	67
5.3	Optimización univariante de volúmenes	67
5.3.1	Agente reductor: borohidruro de sodio (NaBH ₄)	68
5.3.2	Agente oxidante: peroxodisulfato de sodio (K ₂ S ₂ O ₈)	69
5.3.3	Medio ácido: ácido clorhídrico (HCl)	70
5.3.4	Volumen de muestra	71
5.4	Optimización mediante un diseño experimental	73
5.5	Determinación de los parámetros analíticos para DMA	77
5.6	Determinación de parámetros analíticos para As inorgánico	79

5.7	Validación del método con muestra certificada	81
5.8	Estudio de interferencias	82
5.9	Medición de muestras ambientales	82
	Conclusiones	85
	Referencias bibliográficas	86

ÍNDICE DE TABLAS.

Capítulo I

1.1	Principales compuestos del arsénico	6
1.2	Concentración del arsénico en agua, suelo, aire y alimentos (ATSDR, 2007)	10
1.3	Resumen de los efectos sobre la salud de la exposición aguda al arsénico	18

Capítulo II

2.1	Ventajas y desventajas de la generación de hidruros	25
-----	---	----

Capítulo V

5.1	Capacidades de las jeringas utilizadas y sus respectivos volúmenes en la optimización del volumen del agente reductor	69
5.2	Capacidades de las jeringas utilizadas y sus respectivos volúmenes en la optimización del volumen del agente oxidante	69
5.3	Capacidades de las jeringas utilizadas y sus respectivos volúmenes en la optimización del volumen del HCl	71
5.4	Capacidades de las jeringas utilizadas y sus respectivos volúmenes en la optimización del volumen de muestra	72
5.5	Rangos de las concentraciones estudiadas de los reactivos	73
5.6	Resultados de los experimentos realizados en la superficie de respuesta	75
5.7	Parámetros analíticos para DMA	78
5.8	Parámetros analíticos para arsénico inorgánico	80
5.9	Análisis de DMA en la muestra certificada BCR-627 (músculo de atún)	81

5.10	Valores encontrados para DMA en muestras ambientales	83
5.11	Valores encontrados para arsénico inorgánico en muestras ambientales	84

ÍNDICE DE FIGURAS.

Capítulo II

2.1	Separador líquido-gas de tipo "U"	27
2.2	Membrana permeable perma-pure	28
2.3	Tipos de fluorescencia	29
2.4	Lámpara de tipo BDHL	32
2.5	Diagrama esquemático de un detector de AFS	32

Capítulo III

3.1	Esquema de un sistema FIA	36
3.2	Esquema de un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA)	38
3.3	Esquema general de una multijeringa	40
3.4	Bureta multijeringa	41
3.5	Panel de control de conexiones del programa AutoAnalysis	45
3.6	Panel de edición de métodos analíticos del programa AutoAnalysis	46
3.7	Panel de adquisición de la señal analítica	47

Capítulo IV

4.1	Equipo de fluorescencia atómica y el sistema MSFIA aun sin realizársele el montaje para la determinación de As	51
4.2	Imágenes del manifold	52
4.3	Esquema del sistema automatizado (MSFIA-HG-AFS) para la determinación de As total	53
4.4	Imagen del equipo montado en su totalidad con el fotorreactor conectado al sistema de detección	55
4.5	Esquema del sistema MSFIA-UV-HG-AFS utilizado para las determinaciones de As inorgánico total y DMA	57

Capítulo V

5.1	Bucle de reacción anudado	62
5.2	Efectos en la señal analítica de las longitudes del bucle de reacción	63
5.3	Efectos en la señal analítica de las diferentes longitudes de tubería estudiadas para mezclar con HCl	64
5.4	Tiempo de residencia de la muestra en el fotorreactor	65
5.5	Caudalímetro para el ajuste de flujos de gases utilizados en el equipo	66
5.6	Caudal de los reactivos NaBH_4 y HCl	67
5.7	Optimización del NaBH_4	68
5.8	Optimización del volumen del agente oxidante	70
5.9	Efecto del volumen del HCl en la señal analítica	71
5.10	Efecto en la señal analítica en función del volumen de muestra	72
5.11	Diagrama de Pareto que representa las interacciones entre las variables estudiadas	74
5.12	Gráfico de solución óptima para las concentraciones de los reactivos	76
5.13	Curva de calibración para DMA	78
5.14	Curva de calibración para arsénico inorgánico	79

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar, optimizar y validar un método automático para la determinación de dimetilarsénico (DMA) y arsénico inorgánico, a través de la técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) y foto-oxidación en línea, acoplada a un generador de hidruros (HG) con fluorescencia atómica (AFS) como sistema de detección.

La metodología propuesta consiste en el montaje de un sistema *bypass*, en el cual por un paso del mismo se conectó una lámpara UV para la foto-oxidación del DMA en línea y su consecuente detección; la lectura en este paso es de arsénico total. En el segundo paso la muestra y reactivos son enviados directamente al sistema HG-AFS, sin radiación UV, de tal manera que la lectura registrada es de arsénico inorgánico.

Se llevó a cabo la optimización del sistema propuesto para establecer las condiciones ideales de operación en el equipo, a través del estudio de todas las variables que influyen en la señal analítica. Esto comprendió varios estudios preliminares, optimización univariada y diseño experimental para las variables establecidas.

Se utilizó el software *Autoanalysis* para el control del sistema MSFIA y del detector de fluorescencia atómica, así como para la adquisición y el análisis de datos.

Así mismo, se evaluó el efecto interferente de algunos iones comúnmente presentes en las matrices estudiadas. Los resultados obtenidos muestran que el cobre es el elemento que interfiere a una concentración más baja, de $750 \mu\text{g L}^{-1}$.

La validación del método se realizó mediante la determinación de DMA en una muestra certificada, cuyo valor encontrado está en concordancia con el establecido en el certificado del material de referencia.

Se aplicó el método a muestras de agua, fortificándolas para la consecuente recuperación del analito de interés. Los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

ABSTRACT

The aim of this work was the development, optimization and validation of an automatic method for on-line determination of DMA and inorganic arsenic by atomic fluorescence spectrometry. The system involves an on-line photo-oxidation coupled to hydride generation technique (HG).

The proposed methodology comprises an implementation of a bypass system, in which one position of the valve connected to a UV lamp for DMA on-line photo-oxidation and its subsequent detection; the measurement in this step was total arsenic concentration. On the second direction of the bypass, the sample and reagents were led directly to the HG-AFS system, avoiding the photo-oxidation step. In this run, the inorganic arsenic concentration was measured.

The optimization of the proposed system was carried out to set the optimal operating conditions of several variables that influence the analytical signal.

Autoanalysis software was used in order to control the MSFIA system and the atomic fluorescence detector, as well as acquisition and analysis of data.

The study of foreign ions interferences was accomplished. It showed that the presence of copper at $750 \mu\text{g L}^{-1}$ interferes in the arsenic determination.

Abstract

The proposed method was validated by the analysis of DMA in a solid reference material. The obtained result was in good agreement with the certified value.

The application of the presented system was evaluated by means of spiked water sample analysis. Satisfactory recoveries were obtained.

EL ARSÉNICO

1.1 Características químicas del arsénico.

El As es un elemento clasificado como metaloide, perteneciente al grupo VA y periodo 4 de la tabla periódica. Su número atómico es 33 y su masa atómica es 74.92. El As se puede encontrar en diferentes estados de oxidación: trivalente negativo (-3), elemental (0), trivalente positivo (+3) y pentavalente (+5). En la Tabla 1.1 se presentan en forma ordenada los principales compuestos de As, junto a su fórmula química (Wildfang et al., 2000).

El arsénico se encuentra en raras ocasiones en estado puro, pero sí combinado con metales y azufre. Se puede encontrar como elemento inorgánico cuando está en combinación con algunos metales como el cobre, el plomo, el zinc o el oro y, en forma de elemento orgánico en combinación con carbono e hidrógeno. El As puro tiene una coloración gris metálico, y la mayoría de los compuestos orgánicos de As tienen una coloración blanca o son incoloros. El As no tiene un olor ni sabor especial, por lo que su presencia en la comida, en el agua o en el aire pasa desapercibida según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de E.U. (ATSDR, por sus siglas en ingles, 2007).

La estabilidad de los compuestos inorgánicos de As depende de su valencia y de la naturaleza del medio; en un ambiente básico y oxigenado se favorece la formación de As pentavalente mientras que en un medio ácido, se favorece la formación de As trivalente.

Tabla 1.1 Principales compuestos de arsénico.

Compuestos inorgánicos	Fórmula química
Arsenito (As ^{III})	AsO ₃ ⁻³
Metaarsenito (As ^{III})	AsO ₂ ⁻
Arseniato (As ^V)	H ₂ AsO ₄ ⁻ , HAsO ₄ ⁻² , AsO ₄ ⁻³
Ácido arsenioso	H ₃ AsO ₃
Ácido arsénico	H ₃ AsO ₄
Trióxido de arsénico	AsO ₃
Pentóxido de arsénico	As ₂ O ₅
Arseniuro de galio	GaAs
Arseniuro de indio	InAs
Arsina	AsH ₃
Compuestos orgánicos	Fórmula química
Ácido monometilarsónico (MMA)	CH ₃ AsO(OH) ₂
Ácido dimetilarsénico (DMA)	(CH ₃) ₂ AsO(OH)
Óxido de trimetilarsina (TMAO)	(CH ₃) ₃ AsO
Arsenobetaína	(CH ₃) ₃ As+CH ₂ COO-X-
Arsenocolina	(CH ₃) ₃ As+CH ₂ CH ₂ OHX-

Las formas más frecuentes de As inorgánico son el arsenito (As^{+3}) y el arseniato (As^{+5}) y las formas orgánicas más frecuentes son el ácido monometilarsénico (MMA), el ácido dimetilarsénico (DMA) y el óxido de trimetilarsina (TMAO) (Thirunavukkarasu et al., 2002, Kanna et al., 2010).

1.2 Usos del arsénico.

Comercialmente, el As elemental se obtiene como subproducto del tratamiento de otros minerales metálicos como el oro, la plata y el cobre, o por calentamiento de la arsenopirita (FeAsS), en el que se produce As en estado puro.

En la naturaleza, el As se encuentra como constituyente de una gran variedad de minerales, usualmente combinado con minerales sulfurados como el oropimente (As_2S_3) y el rejalgar (AsS). Éstos han sido usados desde hace siglos como cosméticos debido a la coloración amarilla del oropimente y anaranjada del rejalgar.

Actualmente, aproximadamente 90% del arsénico que se produce es usado como preservador de la madera, para que ésta no se deteriore o se pudra. El preservador es el arseniato de cobre cromado (CCA) y a la madera tratada se le refiere como madera presurizada.

En el año 2003, los productores de preservativos para tratar madera que contienen arsénico en Estados Unidos iniciaron voluntariamente la transición de CCA a otros preservativos que no contienen arsénico, para ser usados en estructuras en donde juegan niños, mesas para picnic, terrazas de madera, cercas y entablados para caminar. Sin embargo, la madera que fue tratada con anterioridad a esta fecha aún podría usarse. No se sabe en qué grado los productos de madera presurizada

contribuyen, si es que lo hacen, a la exposición de la población al arsénico.

En el pasado, los compuestos inorgánicos de arsénico se usaron predominantemente como plaguicidas, principalmente en cosechas de algodón y huertos frutales. Actualmente están prohibidos en la agricultura.

Sin embargo, los compuestos orgánicos de arsénico, específicamente el ácido cacodílico, el arseniato de metilo bisódico (DSMA) y el arseniato de metilo monosódico (MSMA) aun se usan como plaguicidas, principalmente en cultivos de algodón. Algunos compuestos orgánicos de arsénico se usan como suplementos en alimentos para animales.

Cantidades pequeñas de arsénico metálico se agregan a otros metales para formar mezclas de metales o aleaciones con mejores características físicas. El uso más extenso de las aleaciones de arsénico es en baterías para automóviles. Otro uso importante de los compuestos de arsénico es en semiconductores y en diodos que emiten luz (ATSDR, 2007).

1.3 Distribución ambiental del arsénico.

El arsénico tiene una amplia distribución en la naturaleza, estando presente en la tierra, el aire y el agua, es el vigésimo elemento más abundante en la corteza terrestre. En el ambiente el As se encuentra combinado con oxígeno, cloro y azufre formando compuestos inorgánicos. En animales y plantas se combina con carbono e hidrógeno, formando compuestos orgánicos.

La contaminación ambiental por As puede aumentar debido a diversas actividades humanas tales como la minería, los procesos industriales en los que se usa el carbón como fuente de energía, la industria del vidrio y la agricultura.

La contaminación ambiental de las aguas con As puede ocurrir cuando éstas se filtran a través de suelos que tienen altas concentraciones del elemento en forma natural o de manera antropogénica. El agua tiene la capacidad de distribuir el As a otros focos secundarios de exposición.

Los alimentos que están en contacto con altas concentraciones de As en alguna fase de su producción pueden concentrar el elemento, convirtiéndose en vías alternativas de exposición poblacional. Sin embargo, la mayor vía de exposición de la población humana al As ocurre a través del arsénico disuelto en agua. En la Tabla 1.2 se resume algunos datos publicados de la concentración de As en suelo, aire y alimentos.

Tabla 1.2 Concentración de arsénico en agua, suelo, aire y alimentos.
(ATSDR, 2007).

Medio Analizado	Medio no Contaminado	Medio contaminado
Agua ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
Superficial	<10	500
Subterránea	1-2	300
Suelo (mg kg^{-1})		
Suelo	5 (rango de 1 a 40)	
Zonas con uso de pesticidas con As		50-500
Refinerías mineras contaminantes		>27,00
Refinerías y uso de pesticidas con As		20,10-35,50
Aire (ng m^{-3})		
Área rural	0,02-4	
Área urbana	0,04	3-200
Área industrial	47,9	>1000
Alimentos (ng As Kg^{-1})		
Alimentos	<1,0	3.000,0
Peces marinos	64,7	291,9
Hojas	47,9	134,9
Semillas	16,0	22,7

1.4 Los compuestos del arsénico.

Los principales usos de los compuestos organoarsenicales se deben a la medicina y la agricultura por sus propiedades como pesticidas o biocidas. Sin embargo, la producción y uso de estos compuestos está decreciendo por su impacto negativo en el medio ambiente. Los compuestos del arsénico en el medio biológico son moléculas complejas, como la arsenobetaina, arsenocolina y los azúcares arsenicales (Howard y Comber, 1989).

Las transformaciones químicas y biológicas que este elemento sufre en el medio natural, tales como reacciones de oxidación-reducción y metilación, modifican el comportamiento y toxicidad de las especies de arsénico. La biometilación se ha observado en bacterias, algas, invertebrados, vertebrados e incluso en el hombre.

Para los organismos terrestres, la biometilación del arsénico conduce a compuestos volátiles [metilarsina (CH_3AsH_2), dimetilarsina ($(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$) ó trimetilarsina (TMAO)] ó compuestos no volátiles tales como los ácidos monometilarsénico (MMA) o dimetilarsénico (DMA). Los organismos marinos eliminan el arsénico bajo formas solubles en el agua ó por incorporación directa en sus azúcares o sus lípidos (Thayer, 1993; Wildfang et al., 2000; WHO, 2001).

1.5 Toxicidad del arsénico.

Las formas químicas y los estados de oxidación tienen gran importancia en la toxicidad del arsénico. La toxicidad de los principales compuestos de arsénico varía de mayor a menor en el siguiente orden: $\text{As(III)} > \text{As(V)} > \text{monometilarsénico (MMA)} > \text{dimetilarsénico (DMA)} > \text{Arsenobetaina (AsBet)} > \text{arsenocolina (AsCol)}$.

Sin embargo, también son muy importantes otros factores como la naturaleza química y estado físico del compuesto, la tasa de absorción celular y la tasa de eliminación, así como el estado en que se encuentra el organismo expuesto (Mandal y Suzuki, 2002; Huang et al., 2004).

Al principio se creía que los compuestos de arsénico inorgánico tenían una mayor toxicidad que los compuestos orgánicos y que el proceso de metilación del arsénico inorgánico consistía en un proceso de detoxificación. Sin embargo, numerosos estudios han ido demostrando que los compuestos trivalentes metilados, intermediarios en el proceso de metilación del arsénico, son los más tóxicos (Yamanaka et al., 1997; Aposghian et al., 1999; Thomas et al., 2001 Hughes, 2002; Mandal y Suzuki, 2002). Resultados obtenidos con células humanas indican que el MMA(III) y el DMA(III) poseen un mayor efecto citotóxico en comparación con el arsenito, mientras que compuestos metilados pentavalentes son menos tóxicos (Stylbo et al., 1999; 2000; Petrick et al., 2000).

Se puede concluir, por lo tanto, que los compuestos arsenicales metilados que poseen arsénico trivalente son más citotóxicos, y genotóxicos, y tienen mayor potencial para inhibir las actividades de algunas enzimas, en comparación con los compuestos trivalentes de arsénico inorgánico (Petrick et al., 2001).

1.5.1 Genotoxicidad del arsénico.

El término genotóxico se aplica a aquellos compuestos que inducen daño genético a concentraciones no citotóxicas, o que estén asociadas a un bajo grado de citotoxicidad. Así, el arsénico está clasificado como carcinógeno en humanos y presenta potencial genotóxico en diferentes estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Históricamente, a la metilación se le ha considerado como un mecanismo de detoxificación del arsénico. No obstante, y como ya se ha indicado, estudios más recientes han demostrado que los compuestos metilados trivalentes [MMA(III) y DMA(III)] presentan una mayor citotoxicidad y genotoxicidad, incluso cuando se comparan con el As(III). A pesar de que el potencial genotóxico del arsénico ha sido bastante estudiado, la complejidad de los resultados obtenidos hace necesaria una mejor caracterización de los mecanismos involucrados en estos procesos.

En un estudio más reciente, se evaluó el potencial mutagénico de seis compuestos arsenicales, incluyendo las formas metiladas trivalentes, utilizando un ensayo con *Salmonella sp.*, sin que se obtuvieran resultados positivos para ninguno de ellos. Por otro lado, utilizando el ensayo de linfoma de ratón (MLA), se pudo destacar que las especies inorgánicas y las formas trivalentes metiladas inducían mutaciones cromosómicas (Kligerman et al., 2003).

Además de actuar de forma sinérgica con aquellos agentes que tienen actividad genotóxica, el arsénico y sus metabolitos poseen la capacidad de inducir daño en el ADN detectable en diferentes sistemas de ensayo, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Así, numerosos estudios describen efectos clastogénicos y aneugénicos, inducción de daño oxidativo, amplificación genética y transformación celular, producción de enlaces cruzados y roturas en el ADN de cadena sencilla (Basu et al., 2001; Mouron et al., 2001; Rossman, 2003; Kligerman y Tennant, 2007).

1.6 Principales vías de absorción.

Cada una de las formas de arsénico posee distintas propiedades fisicoquímicas y una gran variabilidad en cuanto a su disponibilidad en el medio. El arsénico contenido en el agua (principalmente en forma inorgánica) presenta disponibilidad biológica y los compuestos de arsénico en los alimentos (en forma orgánica en su mayoría) también poseen tal disponibilidad, siendo fácilmente absorbidos.

Normalmente se considera que la dieta es la principal vía de exposición humana no ocupacional al arsénico y se estima que su ingestión a través de alimentos y bebidas se sitúa entre 20 y 300 $\mu\text{g dia}^{-1}$.

En zonas en las que existen altas concentraciones de este elemento, sea de forma natural o antropogénica, la exposición puede ocurrir también por inhalación y por contacto dérmico. Además, existe la exposición pulmonar al arsénico a través del humo del tabaco, que puede llegar a unos 10 $\mu\text{g dia}^{-1}$ en un fumador y en torno a 1 $\mu\text{g dia}^{-1}$ en una persona no fumadora, siendo estos valores más elevados en las zonas contaminadas (WHO, 2001).

La mayor parte del arsénico ingerido (60-90%) es rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal y entra en el torrente sanguíneo. La disponibilidad biológica del arsénico ingerido es variable y depende del medio en que haya sido ingerido (a través de la comida, bebida, etc.), de la solubilidad del compuesto y de la presencia de otros alimentos o nutrientes en el tracto gastrointestinal (Morgan, 2001; Mandal y Suzuki, 2002).

La absorción del arsénico a través de la respiración consiste en la deposición de las partículas inhaladas en el tracto respiratorio, seguida de la absorción de las partículas depositadas. La tasa de absorción del

arsénico inhalado dependerá principalmente de la solubilidad y del tamaño de las partículas.

A pesar de no existir ninguna estimación exacta de la tasa de absorción del As inhalado, parece ser similar a la del tracto gastrointestinal. Después de ser absorbido, la distribución del arsénico en los tejidos depende del flujo sanguíneo, de los coeficientes de difusión, de las características de las membranas y de las afinidades de los tejidos. Es pertinente señalar que en pocas horas su concentración en la sangre decrece a niveles normales (Morgan, 2001; Jones, 2007).

Después de ser absorbido, la distribución del arsénico en los tejidos depende del flujo sanguíneo, de los coeficientes de difusión, de las características de las membranas y de las afinidades de los tejidos. Es pertinente señalar que en pocas horas su concentración en la sangre decrece a niveles normales.

Inicialmente, el arsénico se acumula en hígado, bazo, riñones, pulmones y tracto gastrointestinal: sin embargo, su eliminación de estos tejidos ocurre de manera rápida. Entre dos y cuatro semanas después del final de la exposición, la mayor parte del arsénico que permanece en el organismo se encuentra en tejidos ricos en queratina como la piel, el pelo y las uñas.

En general, los niveles de arsénico o de sus metabolitos en pelo, uñas y orina son muy útiles como herramientas para evaluar y cuantificar la exposición al arsénico (WHO, 2001; Mandal y Suzuki, 2002).

1.7 Efectos sobre la salud.

La mayoría de los compuestos de As son altamente tóxicos. Se calcula que la dosis letal en humanos está entre los 100 y 500 mg de As y que la toxicidad por vía oral se produce a concentraciones entre 5 y 50 mg en adultos. Sin un tratamiento apropiado, una dosis de 10 mg As kg⁻¹ como anhídrido arsenioso puede ser mortal. Se sabe que el exceso de exposición a As provoca arsenicosis, pudiendo causar dermatitis, envenenamiento agudo o crónico y cáncer, entre otras enfermedades.

La exposición al As puede afectar de diferentes maneras a una población, dependiendo del tipo de exposición. El riesgo para la salud humana está asociado a la especie química en que éste se encuentre, a la concentración en que se dé, y al tiempo de exposición.

Los efectos de una exposición crónica al As (exposición a bajas dosis durante un tiempo prolongado) suelen tardar entre 5 y 20 años en manifestarse (WHO, 2004). Inicialmente consisten en un malestar general, que incluye adelgazamiento, cólicos, diarreas, y, en casos graves, dermatitis exfoliativas.

Los principales síntomas en humanos son una severa inflamación del tracto gastrointestinal, anomalías cardíacas, colapsos y coma. El As también tiene una acción irritante que causa inflamación local de la piel, ulceración y perforación del septo nasal. Algunas especies de As también pueden provocar reacciones alérgicas de contacto (Wilfang et al., 2000; Morgan, 2001).

La exposición crónica al As se produce principalmente por el consumo de agua contaminada, lo que se denomina hidroarsenicismo. En los casos de hidroarsenicismo crónico, los síntomas más frecuentes son: hiperqueratosis palmoplantar, dermatitis de verrugas alérgicas, estrías

blancas en las uñas de las manos, problemas cardiovasculares, isquemia miocardiaca, hipertensión, disfunciones hepáticas, cambios hematológicos y epitelomas de la piel (Leonard y Lauwerys, 1980; Santolaya et al., 1995; Andersen et al., 1999; Brown, 1999; Basu et al., 2001; Rahman et al., 2001).

Se ha determinado que la dosis total de arsénico necesaria para provocar hiperqueratosis palmoplantar en el 50% de los individuos es de 11 a 16 gramos por vía oral.

Los efectos de la toxicidad aguda frecuentemente se detectan a las pocas horas de la exposición y se caracterizan por vómitos intensos acompañados por una severa irritación, dolor en la faringe y el epigastrio, además de una sensación de quemadura local. Estos síntomas se manifiestan como un síndrome gastrointestinal severo que continúa con diarreas, pudiendo llegar al estado de shock con coma y la muerte (Morgan, 2001).

Esta reacción clínica se debe a que el As actúa como inhibidor enzimático que, al combinarse con los grupos sulfidrilos, interfiere en el metabolismo celular, principalmente de las células endoteliales. Una de las principales manifestaciones de la intoxicación aguda es la vasodilatación parálitica de los capilares sanguíneos con una alteración de la permeabilidad, lo que explica los vómitos, la diarrea y los edemas subcutáneos que suelen aparecer. Como consecuencia, se observa hipotensión arterial y *shock*, además de lesiones en casi todos los órganos (Santolaya et al., 1995; Wilfang et al., 2000; Morgan, 2001).

La Tabla 1.3 describe diversos efectos sobre la salud de poblaciones afectadas. Además, en el sistema nervioso se han descrito problemas de neuropatías periféricas y pérdida de oído (Hugues, 2002).

A pesar de los efectos tóxicos, genotóxicos y carcinogénicos del arsénico, algunos de sus compuestos han sido utilizados en la terapia contra el cáncer. Así, algunos compuestos de arsénico resultan ser bastante eficaces en el tratamiento de diversos tumores y de la leucemia aguda (McCollum et al., 2005).

Tabla 1.3 Resumen de los efectos sobre la salud por exposición aguda al arsénico.

Sistema	Efectos
Piel	Cáncer de piel, enfermedad de los pies negros, enfermedad de Bowen, carcinoma de células basales y escamosas, hiperqueratosis palmoplantar y despigmentación de la piel.
Hígado	Ictericia, agrandamiento del hígado, cirrosis e hipertensión portal no cirrótica.
Nervioso	Neuropatías periféricas y pérdida de oído.
Cardiovascular	Manifestaciones cardiovasculares, acrocianosis, enfermedad de Raynaud, hipertensión, hipotensión arterial e infarto de miocardio.
Hematopoyético	Megaloblastosis
Respiratorio	Disfunciones pulmonares y cáncer de pulmón
Endocrino	Diabetes mellitus, bocio

1.8 Metabolización del arsénico.

El metabolismo y la toxicidad del arsénico dependen de la forma química de los compuestos y del estado de valencia en que se encuentre. Comúnmente, la metilación es considerada como la principal ruta de detoxificación del arsénico en mamíferos; sin embargo, existen importantes diferencias cualitativas y cuantitativas en este proceso, hasta el punto de que algunas especies poseen una capacidad de metilación nula o casi nula.

De modo general, la mayor parte de los animales excretan más DMA y menos MMA en comparación con el hombre (Vahter, 1999a). Animales de laboratorio como la rata, el hámster y el conejo, difieren de la mayoría de los mamíferos y excretan niveles muy bajos de MMA, mientras que la cobaya, el chimpancé y algunos primates son incapaces de metilar el arsénico (Vahter et al., 1995; Seoane et al., 1998; Wildfang et al., 1998).

La exposición humana al arsénico inorgánico, ya sea por ingestión o por inhalación, implica la excreción en orina de una parte inorgánica. Los compuestos inorgánicos parcialmente metilados son rápidamente excretados por la orina, así como los compuestos orgánicos finales. Por otro lado, los compuestos de arsénico orgánico como MMA y DMA encontrados en los animales marinos son moléculas muy complejas y parecen ser bastante resistentes a los procesos de biotransformación.

Aunque existen muchas diferencias relacionadas con el proceso de metabolización del arsénico inorgánico, gran parte de las personas y animales utilizan la metilación como principal vía de biotransformación, excretando la mayor parte de los metabolitos por la orina. Independientemente del tipo y de la duración de la exposición, la distribución media relativa de metabolitos de arsénico en orina es los

individuos expuestos parece ser relativamente constante: 10-30% de As inorgánico; 10-20% de MMA y 60-80% de DMA (Vahter y Concha, 2001; Brima et al., 2006).

1.8.1 El proceso de metabolización del arsénico.

El proceso de biotransformación del arsénico inorgánico a sus derivados metilados está adquiriendo últimamente especial interés debido a la correlación existente entre metabolismo y toxicidad/ genotoxicidad. Se demostró la existencia de un proceso de metilación en humanos (Crecelius, 1977), y en general en mamíferos; que consiste en una reacción catalizada enzimáticamente, y que requiere la reducción previa del As (V) a As (III).

En humanos, la mayor parte del As (V) absorbido se reduce rápidamente a As (III) principalmente en la sangre. Los tioles y, en particular, el glutatión tienen un papel esencial en este proceso de reducción. Posiblemente el As(III) se une a un ditiol, una proteína transportadora, antes que el grupo metilo sea incorporado. Debido a que el As(III) posee una mayor toxicidad que el As (V), este primer paso de la biotransformación del As puede considerarse como una bioactivación.

La mayor parte del As (III) formado en esta reacción inicial se distribuirá en los tejidos y se transformará a MMA y DMA (Vahter, 2002), siendo el hígado el principal centro de metilación. No obstante, se ha demostrado que la mayoría de los tejidos (riñones, pulmón, testículos, etc.) también tienen capacidad metiladora (Healy et al., 1998).

En el proceso de metilación del arsénico, además de las metiltransferasa, también está involucrada la S-adenosilmetionina (SAM), que se considera como la principal donante del grupo metilo. Se ha comprobado que la inhibición de la metilación SAM-dependiente resulta en una disminución de la excreción de DMA. Otros estudios *in vitro* revelan que, en preparaciones de hígado de rata incubadas con arsenito, se necesita la SAM para que se formen MMA y DMA (Vahter, 1999).

Actualmente, existen dos propuestas para describir la biotransformación enzimática del arsénico inorgánico a los compuestos metilados (Hayakawa et al., 2005; Aposhian y Aposhian, 2006; Thomas, 2007). La ruta de la metilación oxidativa consiste en reacciones de oxidación/reducción seguidas de reacciones de metilación, en las que el arsénico inorgánico se convierte en productos orgánicos mono-, di- y trimetilados, a partir de la incorporación del grupo metilo de la SAM a los sustratos de arsénico trivalente.

Siempre se requiere de la reducción de As(V) a As(III) previamente para que ocurra la metilación oxidativa. Hasta el momento se han identificado dos enzimas capaces de reducir el As(V). La primera presenta una secuencia de aminoácidos homóloga a la proteína humana nucleósido fosforilasa, conocida como PNP (Radagabaugh et al., 2002). El As(V) también puede ser reducido por una segunda enzima, la MMA(V) reductasa, que se ha considerado como el factor limitante en el proceso de metabolización del arsénico.

El arsénico inorgánico se metaboliza a partir de sucesivas reducciones y metilaciones oxidativas, en compuestos trivalentes metilados como metabolitos finales. Posteriormente, se ha propuesto que las especies de arsénico trivalentes podrían ser oxidadas y detoxificadas por el

peróxido de hidrógeno, siendo así transformadas en especies pentavalentes menos reactivas (Aposhian et al., 2003, 2004).

La segunda ruta propuesta sobre el metabolismo del arsénico se basa en evidencias de la existencia de la vía de reducción no enzimática del As(V). En este modelo alternativo, la metiltransferasa (As₃MT) es la única enzima requerida para llevar a cabo todo el proceso de biotransformación del arsénico (Hayakawa et al., 2005).

Consiste en la reducción previa del As(V) a As(III) y la posterior conjugación de las formas trivalentes con el glutatión (GSH), formando complejos As-GSH. Estos complejos se constituyen en los sustratos para la acción de la metiltransferasa.

En este esquema de reacciones no oxidativas, los primeros compuestos que se forman son los trivalentes. Una vez que se produce el ATG (arsénico tri-glutation), éste se metila mediante la acción de las As₃MT y se transforma en MADG (monometilarsénico di-glutation) y DMAG (dimetilarsénico glutatión). Estos compuestos son oxidados y convertidos en las formas pentavalentes MMA(V) y DMA(V).

Sin embargo, los metabolitos y productos intermedios originados por esta vía metabólica alternativa, especialmente los complejos As-GSH, no han sido confirmados (Aposhian y Aposhian, 2006).

Por el momento, se puede afirmar que los modos de acción del arsénico y de sus metabolitos son extremadamente variados, complejos y, en gran parte, aún desconocidos.

REVISIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

2.1 INTRODUCCIÓN.

Algunas de las técnicas que se emplean para la determinación de arsénico son: la espectroscopia de absorción atómica (AAS), la espectroscopia de fluorescencia atómica (AFS) y la espectrometría de masas con fuentes de plasma (ICP-MS).

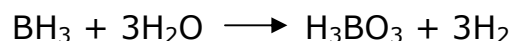
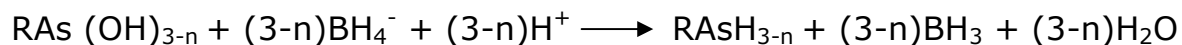
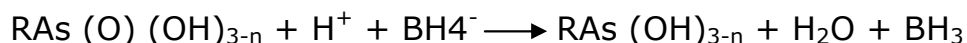
Las técnicas atómicas acopladas a un sistema de generación de hidruros permiten cuantificar en el orden de partes por billón (ppb) o ultratrazas (ppt) elementos como As, Se, Hg, Sb, Ge, Bi, y Te, que tienen la propiedad de formar el hidruro correspondiente como se resume a continuación.

2.2 Generación de hidruros.

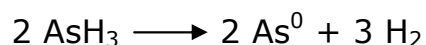
La generación de hidruros (HG) es un proceso químico que produce hidruros volátiles. La muestra disuelta en ácido diluido se mezcla con un agente reductor, tal como una solución de zinc; cloruro de estaño (SnCl_2); borohidruro de sodio (NaBH_4) o de potasio (KBH_4), y de un medio ácido como el ácido clorhídrico HCl).

Esta reacción produce hidrógeno atómico que reacciona con el As, Se, Hg, Sn, Pb, Sb, Ge, Bi y Te en la solución para formar hidruros volátiles. El borohidruro de sodio es el reductor más utilizado.

El mecanismo de formación de hidruros es complicado, y se han propuesto las siguientes reacciones (Howard et al., 1997), donde R se refiere a un radical orgánico o puede ser hidrógeno.



Los hidruros volátiles como la arsina (AsH_3) son arrastrados por un gas portador (argón) a una celda de cuarzo, que es calentada por una llama a una temperatura optimizada para producir la atomización del analito. Cuando los gases pasan a través de este tubo calentado, ocurre una descomposición térmica, y se liberan los átomos del elemento:



La cuantificación de las diversas especies de As puede realizarse separándolas antes de la formación del hidruro mediante procedimientos como la cromatografía (Gong et al., 2002), o bien a través del cambio en las condiciones de formación de los hidruros como tiempos de reacción y reactivos específicos (Howard et al., 1997; Nielsen et al., 1997; Carrero et al., 2001). Las ventajas y desventajas de la técnica HG se presentan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1 Ventajas y desventajas de la generación de hidruros.

Ventajas	Desventajas
Alta producción de especies volátiles y eficiencia en su transporte	Sistema complejo , involucra reacciones en línea
Óptima separación de las fases, evitando efectos de matriz	Formación de espumas y aerosoles
Automatización en sistemas por inyección en flujo y continuo	Aplicación a un número limitado de analitos
Alta frecuencia de análisis	Capacidad limitada para el análisis multi-elemental
Bajos límites de detección	
Económicamente accesible	

2.2.1 Mineralización

Si la muestra contiene materia orgánica, previamente a la generación de la arsina, debe ser sometida a un proceso de digestión para destruir los compuestos orgánicos del As y oxidar a As(V). El As(V) presente en el mineralizado es luego reducido a As(III) por reacción con yoduro de potasio (KI) o cloruro de estaño (SnCl_2), el que posteriormente es convertido a arsina con borohidruro de sodio.

Una molécula proteica, por ejemplo, por un mecanismo de neutralización de cargas eléctricas o por fenómenos de absorción, forma con los compuestos metálicos y no metálicos combinaciones de elevado peso molecular en las cuales desaparecen todas las características propias de los iones en solución.

En esas condiciones, resulta improbable reconocer un elemento metálico ya que no puede ionizarse suficientemente como para producir una concentración adecuada de iones. Por ello se hace necesario destruir, disgregar o mineralizar la materia orgánica. La mineralización de la materia orgánica es un proceso de combustión en el cual todo el carbono se transforma en CO_2^- .

2.2.2 Instrumentación en la generación de hidruros.

En la reacción de generación de hidruros es necesaria la separación de las especies volátiles de la fase líquida. La mezcla de reactivos conteniendo los hidruros volátiles, otros subproductos de la reacción (hidrógeno, vapor de agua) y la disolución son introducidos a un separador gas-líquido, como se muestra en la Figura 2.1, para separar las especies volátiles de la fase líquida, que posteriormente serán transportadas al detector con un gas portador. El diseño de separadores más común es el de forma en "U".

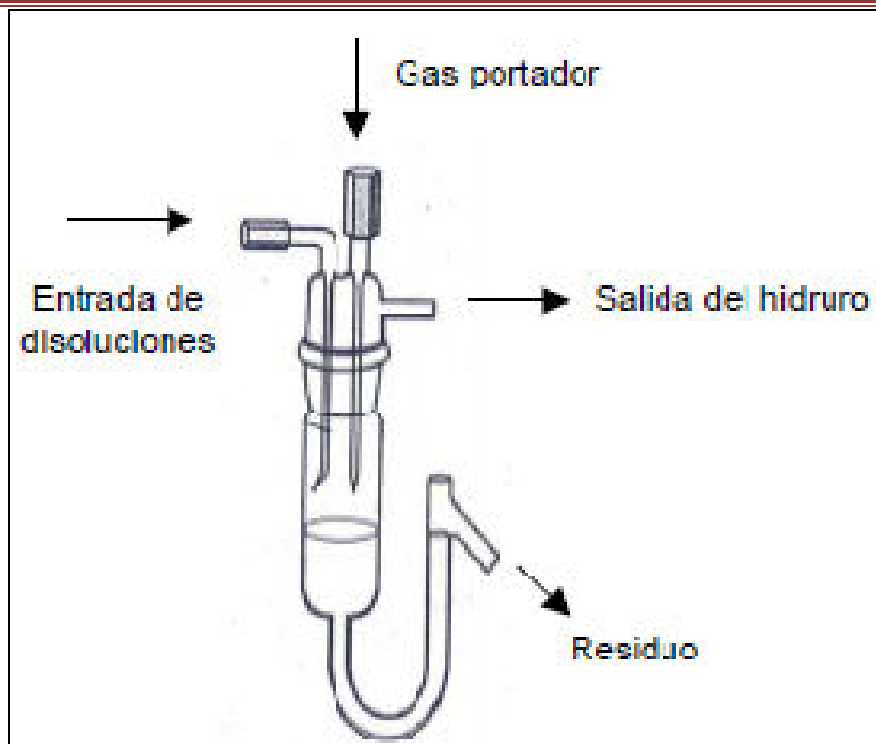


Figura 2.1 Separador líquido-gas de tipo "U"

El gas portador arrastrará no sólo las especies volátiles, sino también vapor de agua. En el caso de acoplar este tipo de separador a un sistema de detección por fluorescencia atómica, se requiere de un sistema de eliminación de humedad para evitar su entrada al atomizador. En la Figura 2.2 se presenta el esquema de una membrana higroscópica semipermeable, que consta de dos tubos concéntricos, el exterior está hecho de politetrafluoroetileno (PTFE) y el interior es una membrana higroscópica de nafión. Las especies volátiles de analito, el vapor de agua, así como el gas portador (argón) fluyen a lo largo del tubo de nafión, y la humedad atraviesa la membrana; un gas de secado (nitrógeno) fluye a contracorriente a lo largo del tubo de PTFE, eliminando la humedad de la superficie exterior de la membrana y arrastrándola hasta su salida.

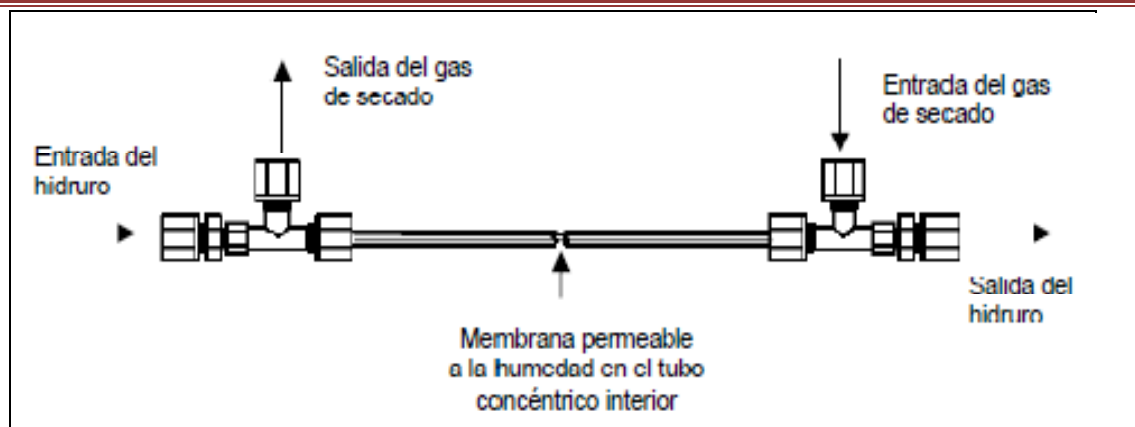


Figura 2.2 Membrana permeable

2.3 Espectrometría de fluorescencia atómica (AFS).

La fluorescencia atómica es un proceso espectroscópico que se basa en absorción de la radiación de longitudes de onda específicas por un vapor atómico, seguida de la desactivación con la consecuente emisión de la radiación a través de emisiones en una dirección (por lo general ortogonal) a la fuente de excitación.

Tanto la absorción y los posteriores procesos de emisión atómica se producen en longitudes de onda que son características de las especies atómicas. La AFS es un método muy sensible y selectivo para la determinación de mercurio, arsénico, selenio, bismuto, antimonio, telurio, plomo y cadmio.

Los principales tipos de fluorescencia atómica son: (a) de resonancia fluorescente, (b) la fluorescencia de línea directa y (c) la línea de paso a paso. La Figura 2.3 muestra los tipos de fluorescencias. Las longitudes de onda pueden ser diferentes y dependerán del proceso de desactivación implicado.

La fluorescencia resonante se produce cuando los átomos absorben y emiten la radiación a la misma longitud de onda.

La fluorescencia en línea directa se produce cuando un átomo se excita desde su estado basal hasta un estado excitado más alto, y luego se somete a una transición directa de irradiación a un nivel meta estable por encima del estado fundamental.

La fluorescencia paso a paso se produce cuando la parte superior de los niveles de energía de excitación y la fluorescencia en línea son diferentes.

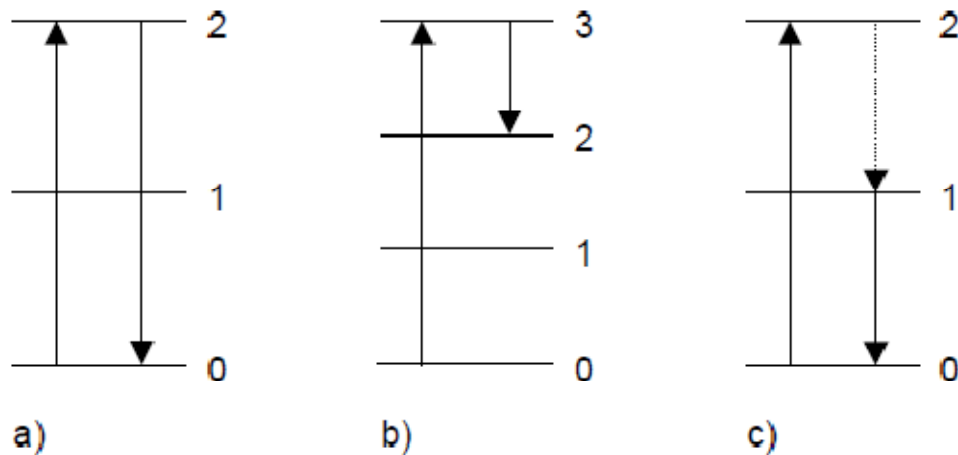


Figura 2.3 Tipos de Fluorescencia: a) Resonante; b) De línea directa c) Fluorescencia paso a paso.

La intensidad de fluorescencia depende de varios factores: (a) la intensidad de la fuente de excitación, (b) las concentraciones de los átomos es decir, la atomización, (c) la eficiencia cuantitativa del proceso (es decir, la proporción de la energía emitida en la fluorescencia de la energía absorbida por unidad de tiempo) y (d) el alcance de la auto-absorción en el atomizador.

La radiación de fluorescencia es linealmente dependiente de la fuente de radiación y de la eficiencia cuántica de la fluorescencia de transición

siempre y cuando se evite la saturación. Si la concentración atómica es baja, la señal de fluorescencia varía linealmente con la concentración total atómica. La intensidad de AFS es proporcional a la concentración del analito en la muestra.

Los inconvenientes de la fluorescencia atómica son: (a) quenching (desactivación de la fluorescencia) y (b) las interferencias. El "quenching" se produce cuando están excitados los átomos y chocan con otras moléculas en las fuentes de atomización. Estos procesos han sido discutidos a detalle en varios artículos (Alkemade et al., 1971, Kirkbright et al., 1974). Una desventaja adicional "genérica" de la AFS es la fuente de dispersión y la emisión del atomizador causando interferencias espectrales. Estas luego son minimizadas cuando se utilizan técnicas de generación de hidruros y vapor frío.

Las interferencias en la AFS pueden ser de dos tipos principales. Las interferencias espectrales ocurren cuando las líneas en el origen de los elementos se superponen a las líneas de la matriz en el atomizador. Las interferencias químicas son el resultado de diferentes procesos químicos durante la atomización que reduce la población de átomos libres.

El diseño básico de un instrumento de AFS es similar al de AAS, salvo que la fuente de luz y el detector se colocan en ángulo recto. Los instrumentos para AFS se pueden clasificar en dispersivos y no dispersivos, dependiendo de la selección de longitud de onda.

Los instrumentos dispersivos requieren de un monocromador de baja resolución. Si se emplea una fuente de radiación en línea, se requiere un monocromador de alta resolución. En la instrumentación no dispersiva los monocromadores no se utilizan, dando como resultado un diseño más simple y de más bajo costo. Los instrumentos no

dispersivos pueden ser propensos a las interferencias, debido a la luz externa y emisión de fondo del atomizador (Lajunen et al., 2004). En instrumentos no dispersivos que están equipados con una fuente de radiación en línea, estas interferencias pueden ser minimizadas mediante un filtro que permite definir el ancho de banda para llegar al detector.

En la mayoría de los sistemas de AFS la selección de la longitud de onda se realiza mediante un filtro situado entre la fuente y el detector. Se utilizan diversas fuentes de excitación en AFS, principalmente las fuentes de líneas y las fuentes continuas. Ya que la intensidad de la radiación de fluorescencia es proporcional a la radiación excitante, son necesarias fuentes de excitación con una alta intensidad para lograr una buena sensibilidad y un amplio rango lineal dinámico. La fuente debe ser simple y fácil de usar, tener un recorrido óptico corto, estabilidad a largo plazo y requerir un mantenimiento mínimo para obtener un rendimiento óptimo.

La lámpara de cátodo hueco de doble descarga (BDHCL, por sus siglas en inglés) cumple con estos requisitos. Este tipo de lámparas producen un espectro intenso con líneas muy estrechas (Figura 2.4). Tal como ocurre con una lámpara de cátodo hueco convencional, se lleva a cabo una primera descarga entre el cátodo y el ánodo para producir átomos del elemento de interés.

La BDHCL se encuentra disponible comercialmente y esto ha contribuido significativamente a la disponibilidad de instrumentos comerciales de AFS. La mayoría de los atomizadores utilizados para AFS son similares a los utilizados en AAS o AES. En la Figura 2.5 se representa un diagrama esquemático de la configuración de un sistema AFS.

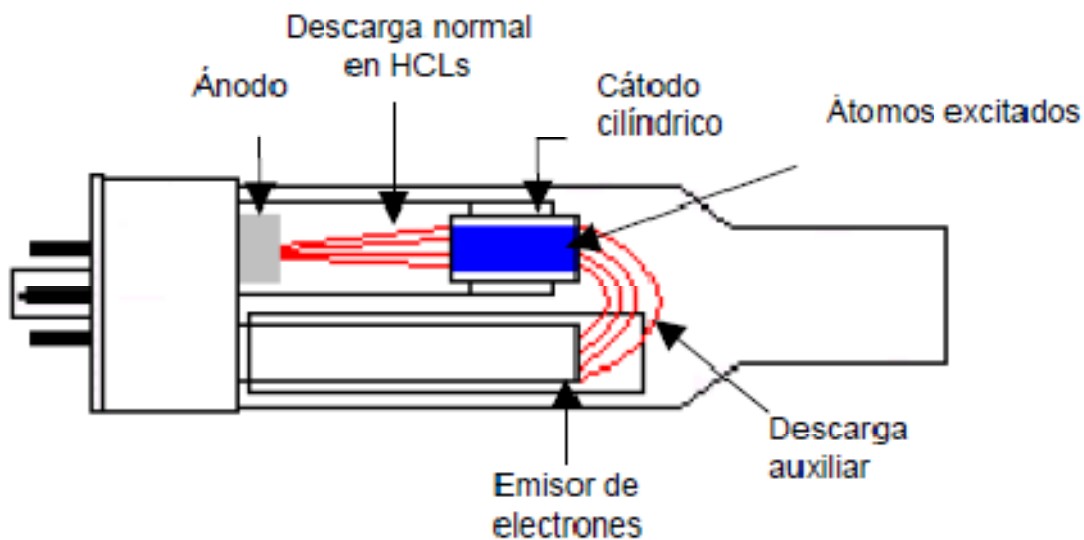


Figura 2.4 Lámpara de tipo BDHCL

Los requisitos básicos son una producción eficiente y rápida de los átomos libres con un mínimo de ruido de fondo, y un tiempo de residencia larga del analito para recorrer el camino. La facilidad de la manipulación y el costo económico de las operaciones también son importantes (Sanchez-Rodas et al., 2010)

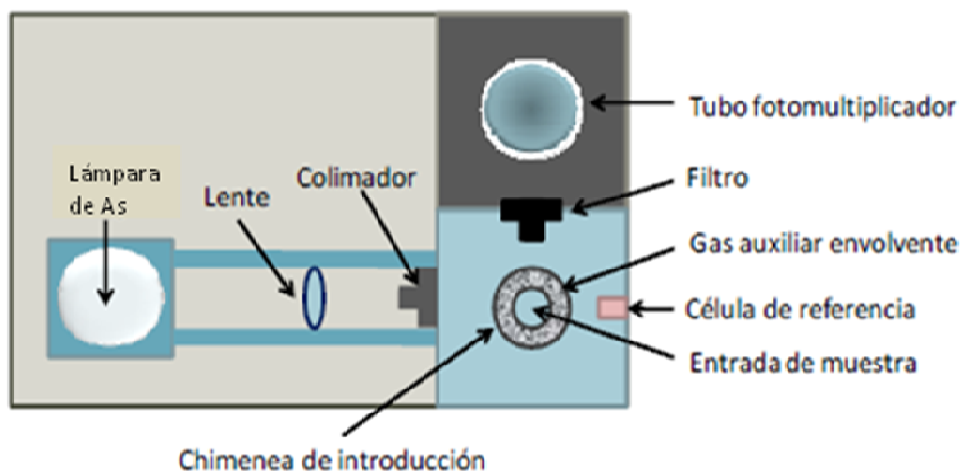


Figura 2.5 Diagrama esquemático de un detector de AFS.

2.3.1 Especiación de As sobre la base de la detección de AFS.

La especiación de arsénico incluye especies químicas, orgánicas e inorgánicas. Los oxianiones, arsenito y arseniato, generan arsinas volátiles cuando se reduce con NaBH_4 en medio ácido.

Hay otras especies, como el monometil y dimetil arsénico (MMA y DMA), el trimetil óxido de arsénico (OTMA), el tetrametilo de iones de arsénico (TETRA), arsenobetaína (AB), arsenocolina (AC) y varios arsenoazúcares, que no forman fácilmente especies volátiles.

Como se mencionó anteriormente, antes del paso de HG se requiere la destrucción de la parte orgánica de las moléculas, y se puede lograr por medio de una foto-oxidación, por ejemplo, con $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ como fuerte oxidante en medio básico y la radiación UV. Este método se utilizó en esta tesis para la oxidación de la materia orgánica y la formación de la arsina. Otros métodos son, la termo oxidación (con un $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ oxidante fuerte en medio básico y calefacción), o un horno de microondas de digestión asistida (MW).

En este trabajo se ha empleado la adición de un flujo de H_2 en el separador gas-líquido, para mantener una llama constante en el atomizador de la AFS, y no depender del H_2 producido durante la reacción de generación de hidruros, dado que el carácter discontinuo de la técnica empleada para introducir muestras y reactivos (Gomez-Ariza et al., 1999).

AUTOMATIZACIÓN DE SISTEMAS ANALÍTICOS

3.1. Introducción

El elevado número de muestras a las que se tiene que enfrentar el analista en ciertas ocasiones, hace necesario recurrir a los métodos de análisis automáticos, ya que requieren un mínimo consumo de tiempo por parte del usuario.

La automatización permite reemplazar la actividad humana en tareas tediosas e incluso peligrosas para el operador, proporcionando una mayor reproducibilidad al minimizar la influencia del factor humano, además de incrementar la velocidad de análisis, ya que hace posible la realización de un mayor número de análisis en un menor tiempo.

La automatización es posible gracias al uso de las técnicas de análisis en flujo. Éstas permiten la reducción del consumo de reactivos, con el consiguiente beneficio medioambiental y económico. Todo ello, junto con la disponibilidad comercial instrumental y las ventajas económicas que reporta su incorporación a los laboratorios de investigación e industriales, son razones a las que se atribuyen el auge de estos sistemas automatizados.

Un método completamente automatizado debe ser capaz de llevar a cabo todos los pasos del procedimiento analítico sin la intervención del analista, incluso tomar decisiones y cambiar las condiciones de trabajo si los resultados así lo exigen.

Generalmente, se realiza la automatización parcial de un proceso confiriendo esta característica a una o varias etapas, pero no a todas.

La automatización total debe incluir todas las etapas que un análisis pueda requerir: toma de muestra, separación del analito, eliminación de interferencias, dilución o concentración en línea, medición del analito, tratamiento de los datos obtenidos, evaluación de resultados, toma de decisión y cambios de estrategia para la medición.

Evidentemente, resulta complicado realizar un análisis completamente automático en todos los casos, especialmente para muestras sólidas que requieren de una disolución previa. Por el contrario, las matrices acuosas se adaptan fácilmente para ser analizados mediante técnicas de análisis en flujo.

3.2 Análisis por inyección en flujo (FIA).

El análisis por inyección en flujo fue propuesto por Ruzicka y Hansen. Los componentes básicos del FIA son que la muestra es introducida mediante una válvula de inyección en un canal por el que circula una corriente continua de fluido portador (carrier). Durante el transporte de la muestra hacia el detector se incorporan los reactivos necesarios en el canal del portador o mediante canales auxiliares conectados al principal (Figura 3.1).

Entre las características principales de los sistemas FIA son: que los tubos son considerablemente más estrechos (0,5 mm de diámetro interno) en los cuales se produce un flujo laminar, y se alcanzan altas frecuencias de muestreo (100 inyecciones hr^{-1}) y una elevada precisión (1-2%). Además, se consigue una disminución del consumo de reactivos y no se requieren ciclos de lavado para evitar la contaminación entre muestras.

La muestra es intercalada un volumen constante en la corriente de un líquido portador (*carrier*) mediante una válvula de inyección y se va haciendo confluir con los distintos reactivos necesarios en el método analítico. Las longitudes de los tubos y la velocidad de rotación de la bomba peristáltica encargada de la propulsión de los líquidos son los que fijan el tiempo de reacción.

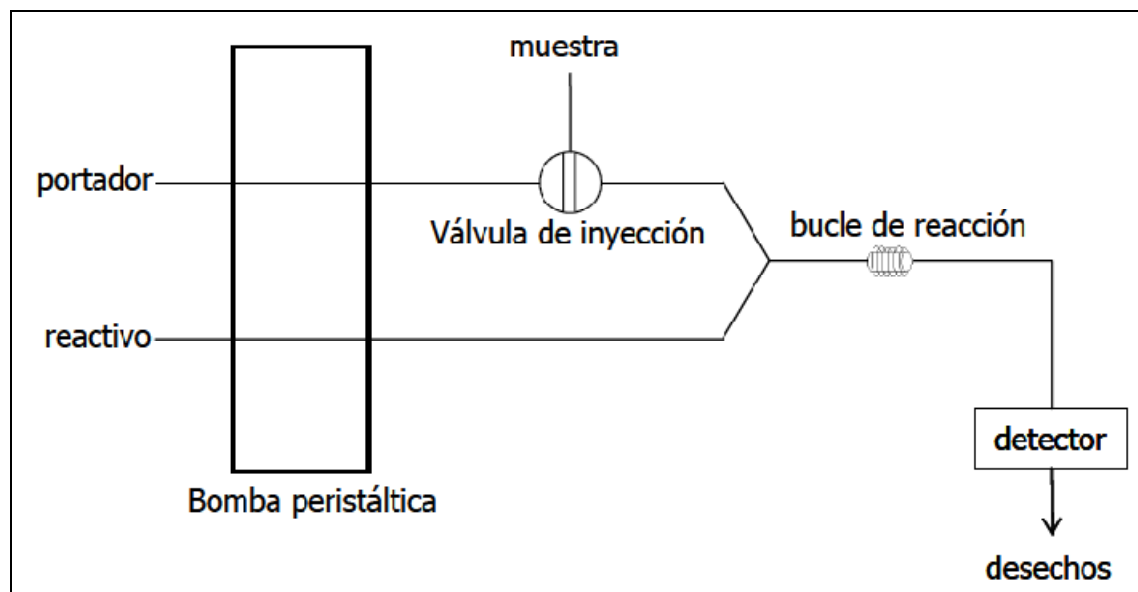


Figura 3.1 Esquema de un sistema FIA.

Entre otras ventajas fundamentales del FIA merece ser destacada la facilidad de implementación, así como un bajo costo de inversión y de mantenimiento. Esta facilidad permitió una extraordinaria expansión en los laboratorios de investigación, inclusive sin comparación con otras técnicas en flujo más recientes.

No obstante, esta técnica tiene su punto débil en el uso de las bombas peristálticas para la impulsión de los líquidos. Estas bombas requieren el uso de tubos flexibles de Tygon®, lo que implica cambios en los caudales debido al aplastamiento progresivo que sufren los tubos, por lo que los sistemas deben ser calibrados frecuentemente.

3.3 Análisis por inyección secuencial (SIA).

El análisis por inyección secuencial fue propuesto en 1990 por Ruzicka y Marshall como una alternativa al FIA (Ruzicka, 1990).

Este sistema está constituido por una válvula de selección, en la cual un puerto central se conecta con distintos puertos laterales. Además, el puerto central está conectado con una bomba de pistón bidireccional. Los puertos laterales de la válvula están conectados a los recipientes que contienen los reactivos necesarios para la aplicación del método analítico, a la muestra y al detector que realizará las medidas. Los puertos laterales pueden ser también utilizados con otras finalidades, tales como una salida a un desagüe, conexión a otros dispositivos (microondas, sistemas de foto-oxidación, cámaras de mezcla, etc.) (Figura 3.2).

A diferencia del FIA, el SIA constituye de por sí un verdadero sistema de análisis multiparamétrico. Basta para ello disponer de una válvula con un número suficiente de canales como para albergar todos los reactivos necesarios. De esta forma se puede programar con el ordenador que se vayan sucesivamente seleccionando los distintos reactivos para determinar cada parámetro.

En la forma usual de operar del FIA el consumo de muestra y reactivos es prácticamente independiente de la frecuencia de análisis, ya que la bomba peristáltica bombea las muestras y reactivos a un caudal constante todo el tiempo, sin parar.

Por el contrario, en SIA, la bomba de pistón se mueve en el momento que interesa hacer una determinación, aspirando sólo en ese momento la cantidad de reactivos y muestra necesarios. El consumo adicional de muestra se da cuando se desea sustituirla por otra, momento en que

hay que asegurarse que, la nueva muestra ha sustituido a la antigua en su tubería de aspiración.

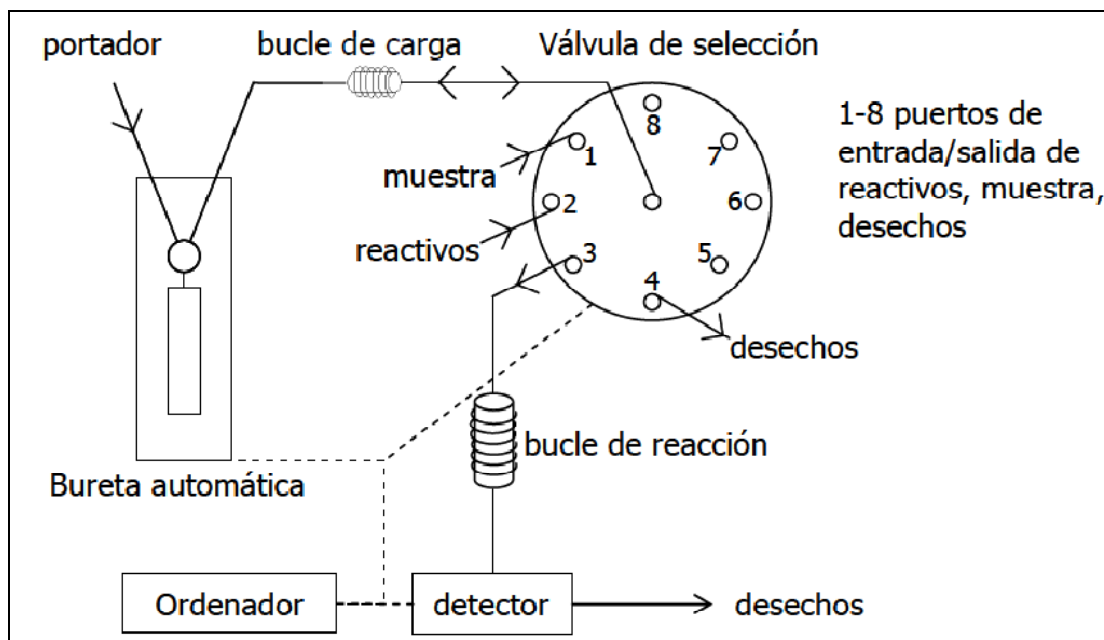


Figura 3.2 Esquema de un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA).

Una de las mayores limitaciones iniciales al desarrollo del SIA, y que hizo que a diferencia del FIA al año de su aparición sólo había apenas una decenas de métodos desarrollados, ha sido la necesidad de incorporar un ordenador para el control del sistema. La falta de software comercial y la inexperiencia en la conexión de los ordenadores a la instrumentación hizo que el SIA se desarrollara muy lentamente a pesar de sus claras ventajas.

La incorporación de los ordenadores al sistema SIA ha hecho que en esta técnica se encuentre muy bien adaptada para la aplicación de las técnicas de flujo detenido. El uso del ordenador permite también dar una gran flexibilidad al sistema, ya que fácilmente se pueden programar

muchas operaciones que mimeticen los sistemas manuales, realizándolas en línea sin grandes dificultades.

3.4 Análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA).

La técnica de análisis por inyección en flujo multijeringa fue diseñada por Cerdà et al., en el año 1999. Esta técnica, que se presenta como una herramienta ponderosa 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 análisis del FIA, y la robustez y versatilidad del SIA.

Este sistema incluye una bureta multijeringa construida por adaptación de una bureta automática de jeringa análoga usada en los sistemas de análisis por inyección secuencial (SIA), para mover simultáneamente cuatro jeringas que están conectadas al mismo motor paso a paso, como se muestra en la Figura 3.3 A. Este tipo de buretas reúnen las ventajas de la operación multicanal, propia de las bombas peristálticas, y el manejo de volúmenes exactos, característico de las bombas de pistón.

Cada jeringa está equipada con una válvula solenoide de tres vías, que funcionan independientemente del desplazamiento del pistón y permiten realizar los procesos de conmutación que tienen dos posiciones, "off" (desactivada), esta posición permite que el líquido propulsado regrese a su recipiente, y "on" (activada), que introduce el reactivo al sistema. De este modo, hay dos direcciones de flujo para el movimiento de impulsión (I, II) y otras dos direcciones para la aspiración de disolución (III, IV) como se muestra en la Figura 3.3 B.

El cambio de posición "on u off" es muy rápido, sólo se necesitan 35 ms y por lo tanto, las conmutaciones se pueden realizar sin detener el movimiento del pistón. Con el objeto de evitar la contaminación entre muestras consecutivas y que el cambio de muestra sea automático, se coloca una válvula solenoide de conmutación conectada a la multijeringa.

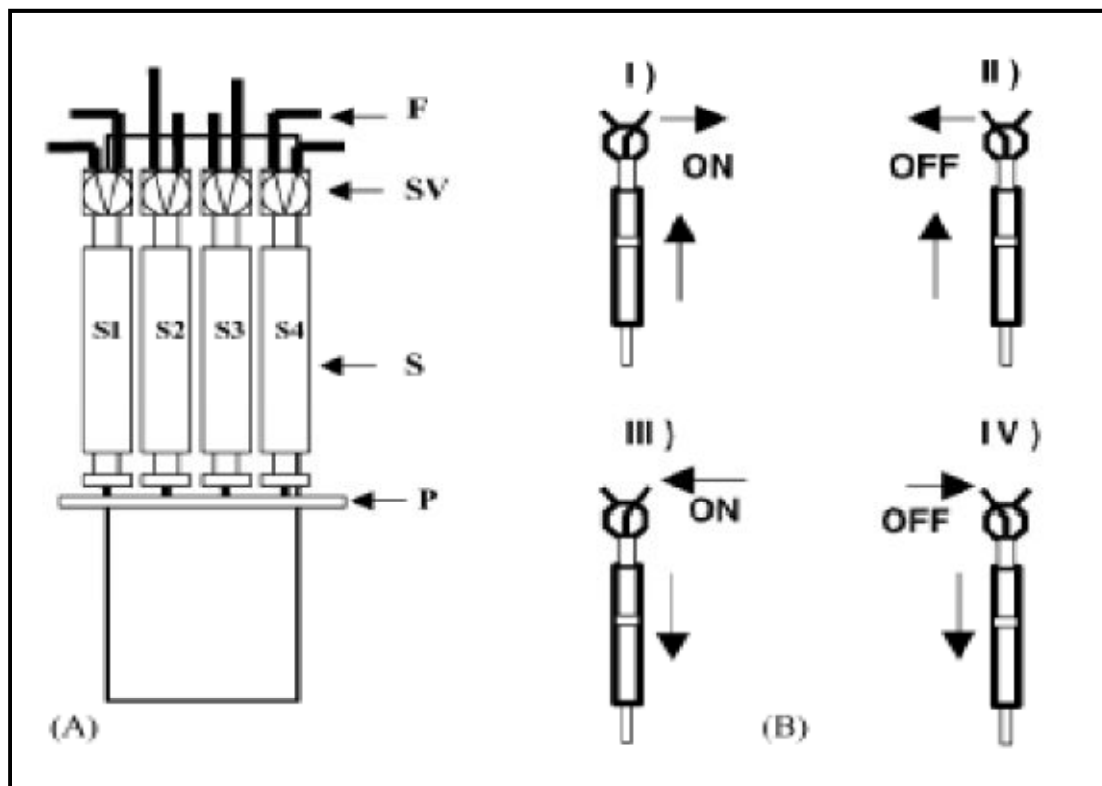
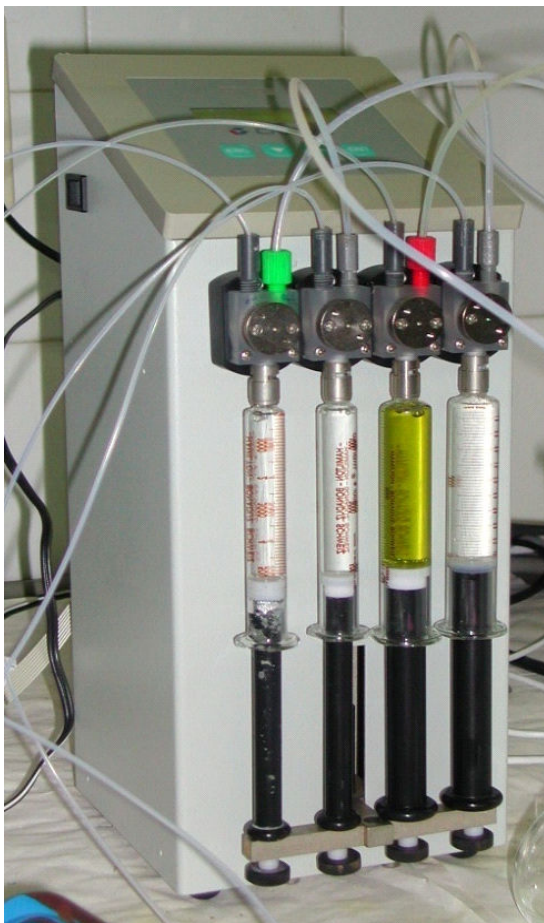


Figura 3.3. Esquema general de una multijeringa. (A) Vista frontal de una bureta multijeringa, P: pistón; S: Jeringas (S1-S4); SV válvulas solenoides de tres vías y F: accesorios y tuberías. (B) Direcciones de flujo, ON: conectado con el sistema de tuberías; OFF: conectado con los depósitos o el desagüe.

Para aumentar la versatilidad del MSFIA se han construido los módulos con cuatro salidas digitales de 12V/0,5 A (Figura 3.4). Estas salidas pueden ser acopladas a las válvulas solenoides, permitiendo así la

actuación de un número elevado de modalidades de inyección multiconmutada (es decir, muestreo binario, flujo en tándem, técnicas de división, sistemas de sandwich e inyecciones hidrodinámicas) (Miró et al., 2002).



(B) Fotografía de la parte posterior de la bureta multijeringa en el que se puede apreciar la barra de conexión para cuatro salidas de 12 voltios.

Figura 3.4 (A) Bureta multijeringa

Las válvulas solenoides colocadas en la cabeza de las jeringas permiten que los reactivos sean 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.

La resistencia química del MSFIA es análoga a la del SIA. Los cabezales de los pistones de las jeringas están fabricados con teflón y no presenta los inconvenientes derivados del uso de bombas peristálticas, cuyos tubos de Tygon® tienen una vida corta debido a su vulnerabilidad a ácidos y bases concentrados y a disolventes orgánicos.

Además se pueden manejar volúmenes de muestra y reactivos desde niveles de μL a mL con alta precisión como consecuencia de la gran variedad de tamaños de jeringas disponibles (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10 o 25 mL), proporcionando una gran flexibilidad a las configuraciones. El volumen nominal mínimo para ser manipulado usando la jeringa de 0,5 mL es de 0,03 μL para un motor de 15000 pasos.

Es importante destacar la robustez del MSFIA, ya que se ha aplicado con éxito a procesos de monitorización de más de 250 h (Horstkotte et al., 2006).

La forma de llenado y vaciado de las jeringas viene delimitada por el movimiento en bloque de las cuatro jeringas y porque el programa toma como base el volumen de la jeringa que se encuentra en la posición uno. Una vez que se ha seleccionado el volumen y el caudal de la jeringa, el de las restantes viene definido automáticamente dependiendo únicamente de su tamaño.

Desde que se implantó la técnica MSFIA en 1999, la evolución de las buretas multijeringa ha sido considerable. Así, en la actualidad se dispone de módulos cuyo motor tiene una resolución de 40.000 pasos por cada movimiento del pistón. De este modo, estas buretas permiten dispensar volúmenes con una mayor precisión que los primeros prototipos iniciales, que tenían una resolución de 5000 pasos.

3.5 Programa para el control de los instrumentos, adquisición y análisis de datos.

Inicialmente, el aumento de complejidad por la introducción de una computadora para el control instrumental parecía una seria desventaja. Pero al final ha otorgado un gran número de ventajas, como por ejemplo el tiempo de residencia, que en lugar de controlarse por la longitud del tubo y el caudal se controla de forma muy reproducible con la computadora. Además permite una mayor flexibilidad de los sistemas al poder programar operaciones que sustituyan configuraciones físicas del sistema.

En la mayoría de las aplicaciones de las técnicas de flujo descritas en la literatura, se utiliza un software desarrollado por el propio grupo de trabajo escrito en Quick BASIC que, por lo general, sólo es útil para una aplicación determinada. Este hecho supone uno de los principales inconvenientes a la hora de aplicar las técnicas de flujo (Cerdà et al., 2005). Sin embargo, en el mercado existen como alternativa unos pocos programas para el manejo de técnicas FIA y SIA, tales como FIALab (FIALAB Instruments Company, Bellevue, Washington, Estados Unidos) y el FlowTEK (Global Company, Fox Island, Washington, Estados Unidos).

Para esta investigación se usó el software AutoAnalysis (Becerra et al., 1999), que ha sido desarrollado por el Grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente de la Universidad de las Islas Baleares en Mallorca, España (Cerdà et. al., 1999). Este software se caracteriza por su gran flexibilidad, ya que permite la combinación de diferentes instrumentos y aparatos según las necesidades del analista.

Este programa se divide en una aplicación principal relativamente simple y un conjunto de bibliotecas de enlace dinámico (DLLs, dynamic link libraries) para la conexión de los instrumentos al ordenador y su control, por lo que para incorporar un instrumento nuevo en el sistema sólo se requiere que se creen dos DLLs, una para el canal de comunicación y otra para el control del instrumento.

Otra de las características a destacar de este software es que el analista puede crear sus propios métodos de una forma sencilla e intuitiva sin que sea necesario que tenga conocimientos previos de informática. El AutoAnalysis permite, también, introducir una serie de variables que se pueden relacionar con la señal analítica y, según el valor de ésta y lo establecido por un condicional, se inicializa un determinado procedimiento.

Por esta razón, resulta posible desarrollar procedimientos analíticos totalmente automatizados, es decir, que sean capaces de tomar decisiones por si mismos mediante la ayuda de un sistema de retroalimentación ó "feedback". El programa básico presenta un panel que permite la configuración de los equipos que conforman el analizador en flujo montado. En la Figura 3.5 se muestra el panel en el que se hace la conexión de los equipos a utilizar. En el caso de este trabajo se realizó la conexión para el modulo multijeringa y para el equipo de fluorescencia atómica.

Una vez configurado el sistema con los instrumentos a utilizar se procede a la edición del método analítico. Esto consiste en crear una secuencia de instrucciones, donde cada instrucción es un comando definido por el programa principal para controlar el tiempo, agregar marcas, condiciones o repetir procedimientos (Figura 3.6).

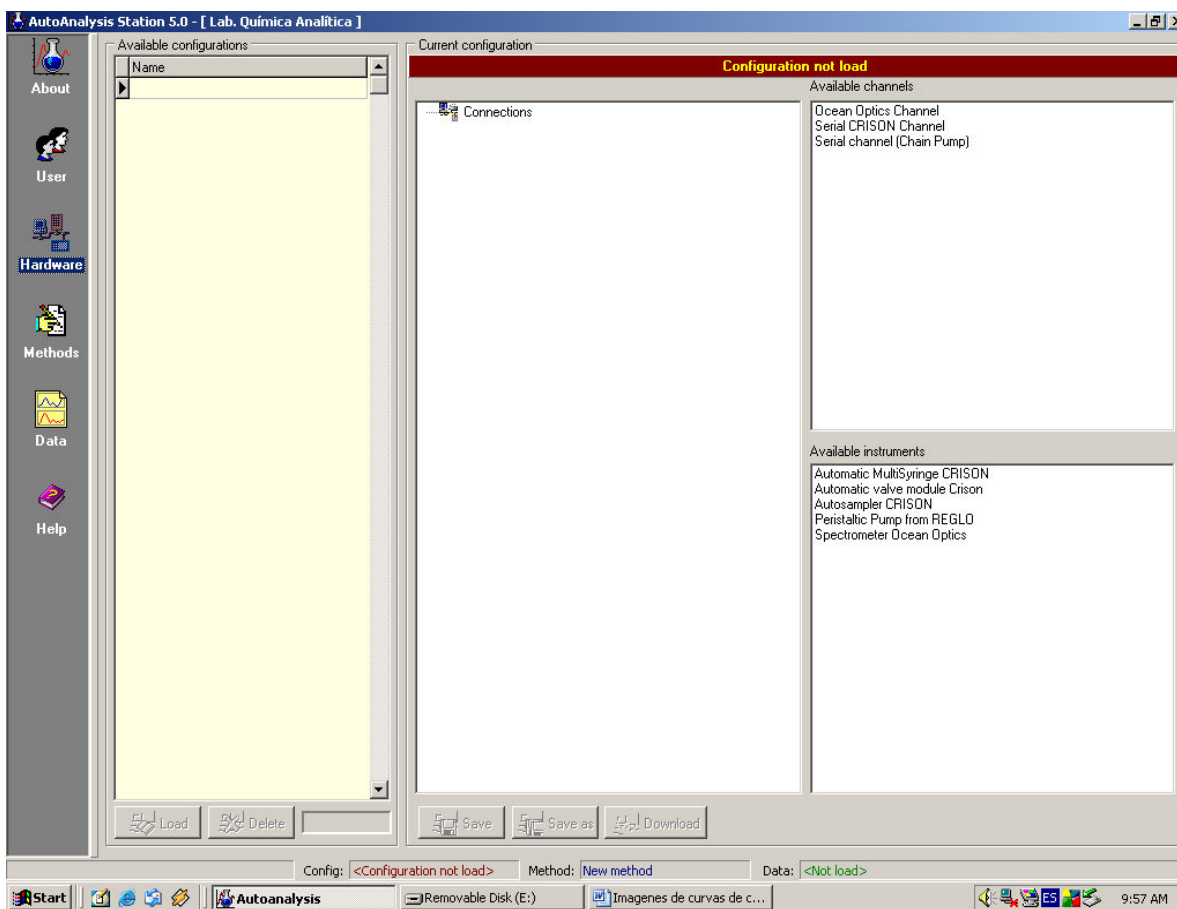


Figura 3.5 Panel de control de conexiones del programa AutoAnalysis.

Un procedimiento es un conjunto de instrucciones agrupadas bajo el mismo nombre, que bien puede repetirse dentro del mismo método o puede ser utilizado por métodos diferentes, con la ventaja de no ser necesario definirlo otra vez.

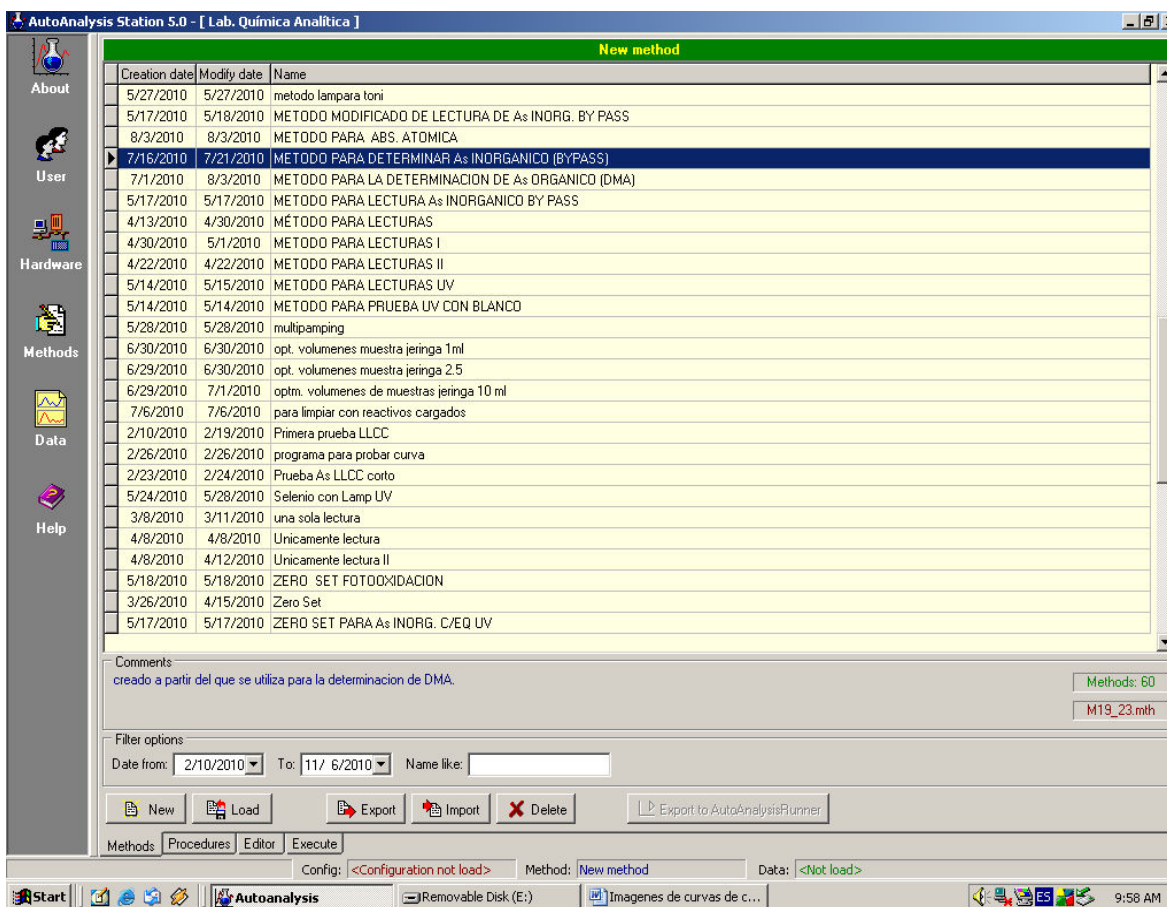


Figura 3.6 Panel de edición de métodos analíticos del programa AutoAnalysis.

En el panel de la Figura 3.9 se crea el método analítico mediante tres columnas. Una vez creado 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.

El software AutoAnalysis permite también visualizar el panel donde se obtiene la señal analítica, tal como se muestra en la Figura 3.7. La señal es presentada en forma de picos, donde los resultados se pueden calcular ya sea por área o por altura de pico.

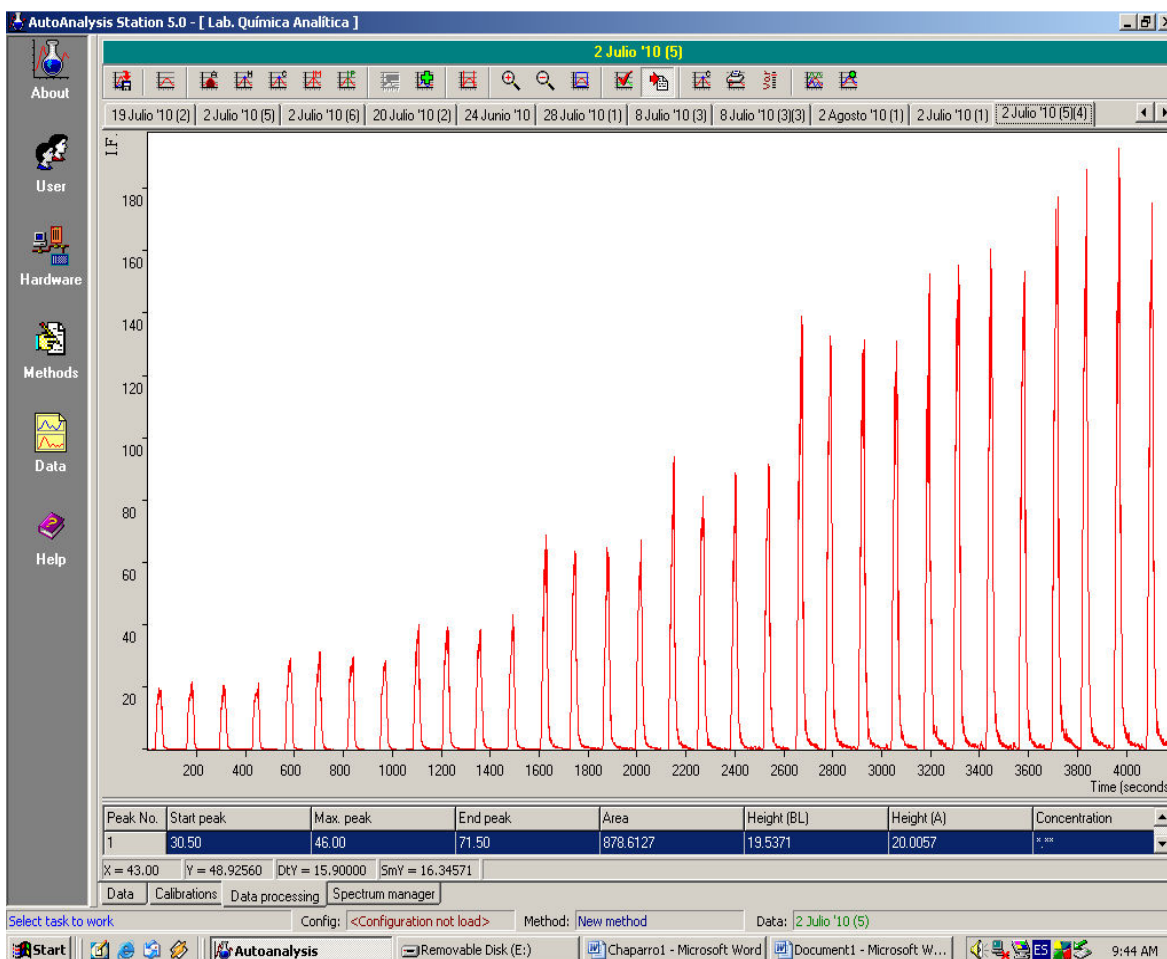


Figura 3.7 Panel de adquisición de la señal analítica.

3.6 OBJETIVO

El objetivo general de este trabajo es desarrollar, optimizar y validar un método automático para la determinación de dimetilarlésico (DMA) y arsénico inorgánico por espectrometría de fluorescencia atómica (AFS), utilizando el análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) y radiación UV, acoplados a la generación de hidruros (HG).

3.6.1 Objetivos específicos.

- ✓ Realizar el montaje del sistema MSFIA para la automatización de la introducción de muestra y reactivos.
- ✓ Acoplar al sistema una lámpara UV para la foto-oxidación de DMA y su posterior detección en el equipo de fluorescencia atómica.
- ✓ Optimizar las condiciones de operación del sistema MSFIA-HG-UV-AFS y la optimización de las variables químicas que pudieran afectar la señal analítica.
- ✓ Determinar los parámetros analíticos para DMA y para arsénico inorgánico.
- ✓ Validar el método propuesto mediante un material de referencia certificado.
- ✓ Aplicar el método propuesto a la determinación de muestras ambientales.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparación de reactivos y muestras.

Los patrones de As (III) y DMA se prepararon a partir de disoluciones madre de 1000 mg L^{-1} de As_2O_3 (disuelto en 4 g L^{-1} de NaOH) y $[(\text{CH}_3)_2\text{AsNaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$ (Sigma Aldrich) disuelto en agua.

Las soluciones de peroxodisulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ Scharlau extra puro) se prepararon en una disolución al 3% de NaOH. El NaBH_4 (Sharlau extra puro) 2,2% fue disuelto en 1% NaOH filtrado en membrana de $0,45 \mu\text{m}$. Todas las disoluciones fueron preparadas inmediatamente antes de su uso.

El material de referencia se preparó mediante una extracción en microondas a 700 W por 10 minutos, pesándose 0.300 g de muestra. La extracción se hizo con 5 mL de agua Millipore para finalmente aforar a 100 ml. Las muestras ambientales de agua de las cuales se determinó la recuperación de los analitos de interés, no se les realizó ningún tratamiento previo, a excepción de una filtración para eliminar cualquier tipo de materia sólida suspendida.

Todas las disoluciones fueron preparadas con agua Millipore. El material de vidrio necesario para la determinación de arsénico fue puesto en baño de ácido nítrico al 10% (v/v) por 24 horas y enjuagado por triplicado con agua Millipore.

4.2 Montaje del sistema automatizado de introducción de muestra.

Como paso inicial se procedió a realizar el montaje y acoplamiento del sistema MSFIA, como sistema de introducción de muestra al detector de fluorescencia atómica (Figura 4.1).

El equipo utilizado para el montaje del sistema está constituido por una bureta multijeringa programable (MicroBU 16 A Crison, Alella Barcelona), una válvula solenoide adicional de tres vías (V1) (Takasago Electric, INC.) y un automuestreador (Crison). Las jeringas (Hamilton, Suiza) utilizadas fueron las siguientes: 5 ml para muestra, 2,5 y 5 mL para los reactivos encargados de la generación del hidruro, para NaBH_4 y HCl, respectivamente. El conjunto de tuberías o *manifold* se compone de tubos de PTFE (0,8 mm de diámetro interno) y conectores de PMMA (polimetilmetacrilato) de tres vías. Se utilizó el separador gas-líquido descrito en la sección 2.2.

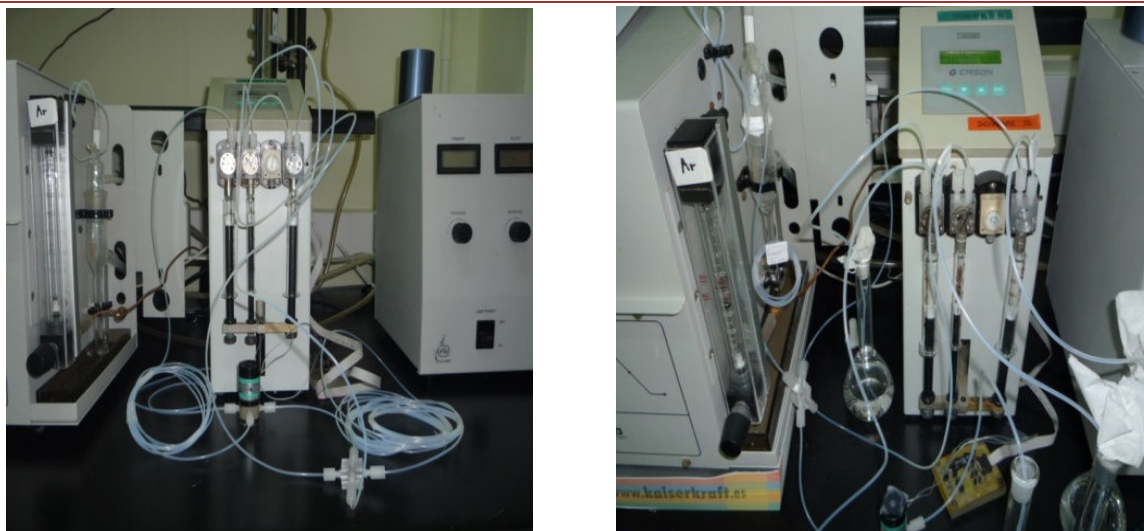
El montaje del manifold se realizó con tubos de 1,5 mm de diámetro interno para la carga de reactivos y muestras, y de 0.8 mm de diámetro interno para el resto (bucles de reacción y conexiones) según recomendaciones establecidas por Cerdà et al., (2006).



Figura. 4.1 Equipo de fluorescencia atómica y el sistema MSFIA aun sin realizársele el montaje para la determinación de arsénico.

El sistema montado consta de los siguientes componentes:

- El módulo multijeringa, encargado de la automatización de la introducción de muestra hacia el detector, del cual se utilizaron tres de las cuatro jeringas disponibles.
- El manifold utilizado para la conexión MSFIA-HG-AFS estuvo constituido por una tubería de PTFE de 1,5 mm de diámetro interno y 50 cm de longitud para carga y llenado de jeringas con los reactivos encargados de la generación del hidruro volátil y para la muestra se muestra en la Figura 4.2 (a y b).
- El bucle de carga de la muestra, fue de 300 cm de longitud y 1,5 mm de diámetro interno. El resto de la tubería utilizada fue de 0.8 mm de diámetro interno, y el bucle de reacción fue de 100 cm.



(a)

(b)

Figura. 4.2 Imágenes del manifold.

El sistema de tuberías está conectado al separador gas-líquido, que a su vez está acoplado a una membrana permeable (Permapure Dryer), por la cual pasa a través de ella el analito de interés arrastrado por gas argón y a contracorriente fluye nitrógeno seco para la eliminación de la humedad. Un conector T introduce el hidrógeno al sistema para el mantenimiento de la flama encargada de la atomización. Las mediciones se realizaron con un detector de fluorescencia atómica (PS Analytical Excalibur 10.044). En el siguiente esquema (Figura 4.3) se puede apreciar el sistema implementado para la medición de arsénico. Se realizaron unas primeras pruebas preliminares para la verificación de la señal analítica.

Para el control instrumental y adquisición de datos se utilizó el programa Autoanalysis 5.0 (Sciware, Palma de Mallorca).

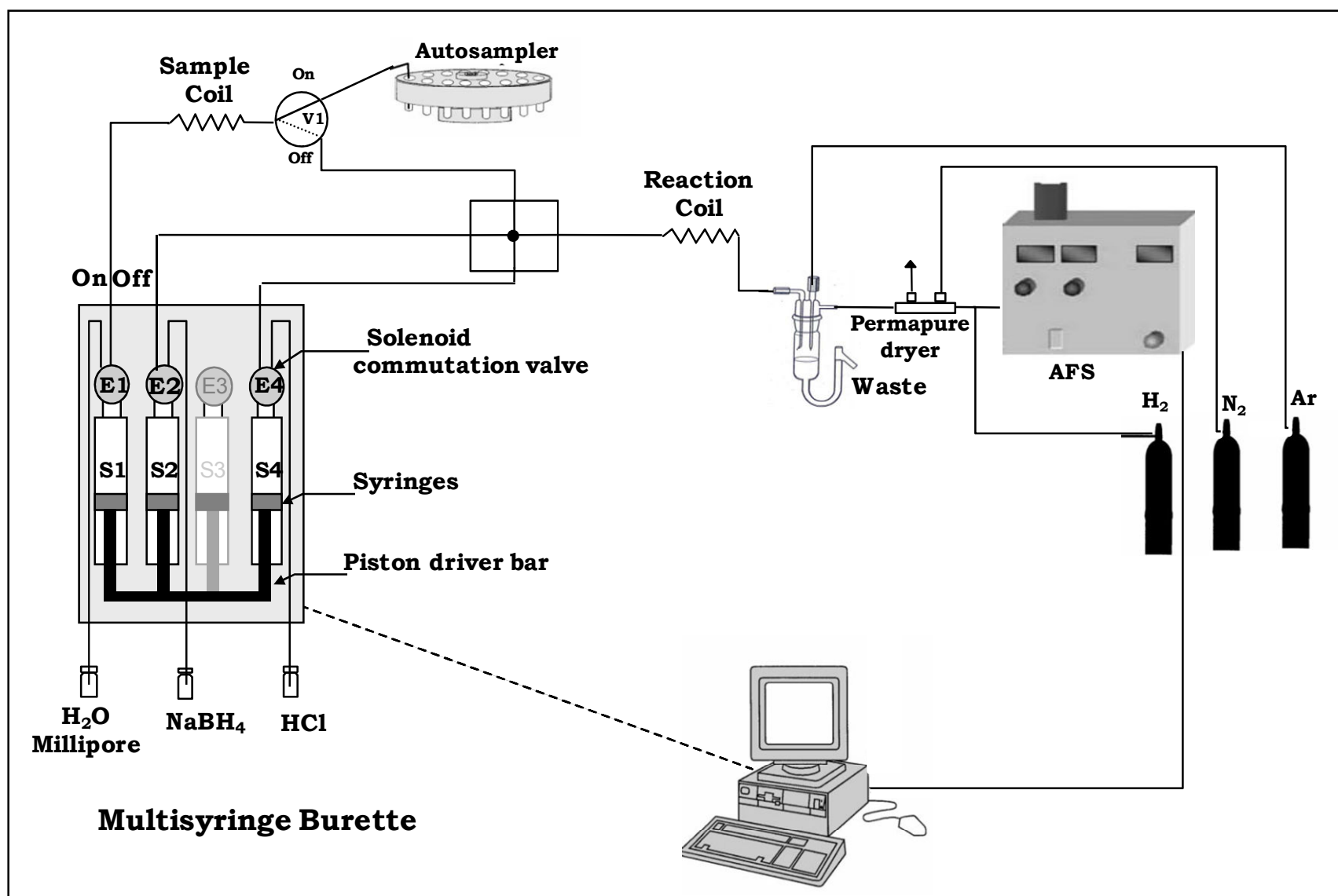


Figura 4.3 Esquema del sistema automatizado MSFIA-HG-AFS para la determinación de As total.

4.2.1 Procedimiento.

El procedimiento para la medición de arsénico con el sistema desarrollado consiste en:

1. Carga de la muestra en el bucle de carga.
2. Inyección simultánea de muestra impulsada por la jeringa S1 (con la válvula solenoide extra V1 conectada hacia el sistema), y de los reactivos impulsados con las jeringas S2 y S4, respectivamente, hacia el bucle de reacción.
3. Conducción de los reactivos y la muestra al bucle de reacción para realizar la mezcla de los mismos. De este modo, se genera en línea el hidruro volátil arsina. Posteriormente se impulsa la mezcla hacia el separador líquido-gas.
4. El hidruro generado es separado de la matriz acuosa y arrastrado con la ayuda de un gas portador (Ar). Con el objetivo de eliminar el exceso de humedad, la arsina se hace pasar por una membrana permeable (Permapure Dryer) que mantiene un flujo en contracorriente de un gas desecante (N₂).
5. Finalmente, el hidruro es conducido al detector para ser atomizado en la llama alimentada por el H₂ suplementario conectado al sistema. La señal de fluorescencia del As es obtenida con ayuda de una lámpara de As de cátodo hueco de doble descarga (BDHCL por sus siglas en inglés).

4.3 Montaje del sistema UV para la irradiación de la muestra.

Una vez realizado el montaje del sistema de algunas pruebas preliminares para la verificación de la lectura de arsénico, se montó el módulo de fotorreacción con el objetivo de llevar a cabo la medición de arsénico orgánico.

Para el montaje del fotorreactor encargado de irradiar la muestra se implementó un equipo consistente en una lámpara ultravioleta de 8W, a la cual se le enbobinó una tubería de PTFE de 200 cm de largo y 0.08 mm de diámetro interno. Este sistema (Figura 4.4) quedó conectado a una válvula solenoide de tres vías acoplada al auto-muestreador y a otra válvula solenoide que permitía hacer fluir el líquido hacia el fotorreactor o bien obviarlo mediante un bypass.



Figura.4.4 Imagen del equipo montado en su totalidad con el fotorreactor conectado al sistema de detección.

De igual manera se hizo la conexión de una cuarta jeringa al módulo multijeringa para el manejo del reactivo encargado de oxidar y descomponer la materia orgánica. Dicha conexión al fotorreactor se realizó mediante un conector de tres vías acoplado entre la válvula solenoide y el fotorreactor para realizar la mezcla muestra-oxidante antes de su paso por el fotorreactor.

Después del paso de la mezcla muestra-oxidante a través de los conectores, se adicionan el reductor y los reactivos encargados de la generación del hidruro de volátil de As. Todas estas tuberías convergen al bucle de reacción.

A partir de este punto la configuración del sistema no sufrió modificaciones en relación al montaje anterior. La Figura 4.5 muestra el esquema del sistema propuesto para la determinación de As inorgánico total y DMA.

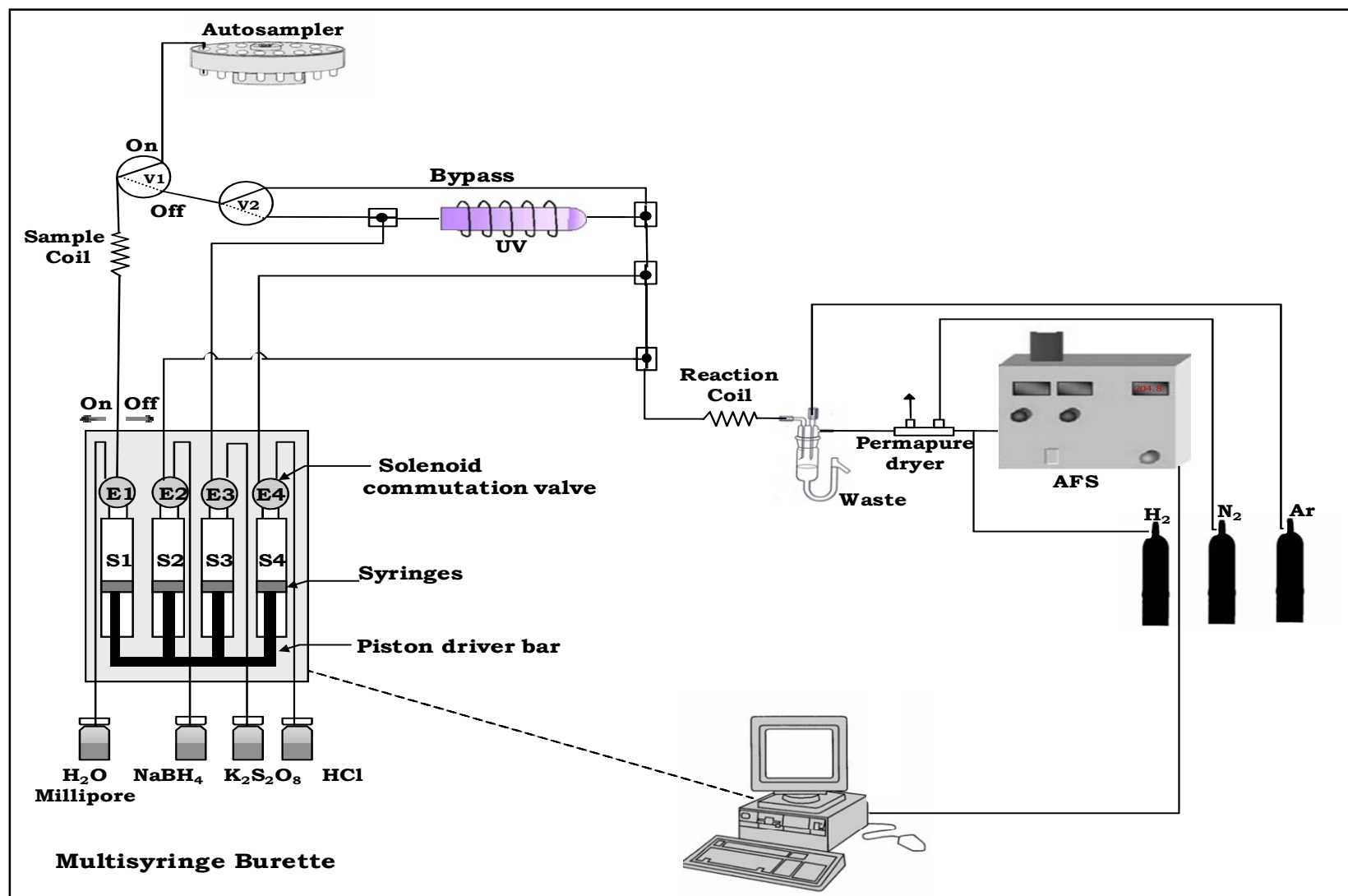


Figura. 4.5 Esquema del sistema MSFIA-UV-HG-AFS utilizado para las determinaciones de As inorgánico total y DMA.

4.3.1 Procedimiento.

Para la determinación de DMA:

El procedimiento analítico puede resumirse en los siguientes pasos:

1. Carga de la muestra en el bucle de carga.
2. Inyección simultánea de 1.6 mL de muestra y 0.8 mL de oxidante mediante las jeringas S1 y S2.
3. Irradiación de la mezcla en flujo continuo por un tiempo de 20 s, con ayuda de las válvulas solenoides adicionales (V1 y V2), de tal manera que se logre un tiempo de residencia suficiente para separar la especie DMA.
4. A partir de aquí, se realiza una inyección simultánea de la muestra y los reactivos generadores de hidruro. Primero la muestra irradiada se mezcla con el ácido y luego esta muestra acidificada se mezcla con el NaBH_4 . Este segmento de muestra-reactivos se conducen hacia un bucle de reacción, donde se genera la arsina, que es conducida a la celda de separación gas-líquido.
5. Una vez en la celda de separación, el hidruro generado es separado de la matriz acuosa. El hidruro es arrastrado con la ayuda de un gas portador (Ar). Con el objetivo de eliminar el exceso de humedad de la arsina, se hace pasar por una membrana permeable (Permapure Dryer) que mantiene un flujo inverso de un gas secante (N_2).

6. Finalmente el segmento de hidruro se conduce al detector para ser atomizado en la llama, que es generada por el gas H_2 conectado al sistema. La señal de fluorescencia se obtiene con la ayuda de una lámpara de As de cátodo hueco de doble descarga.

Para la determinación de arsénico inorgánico

Se utilizó el mismo procedimiento anteriormente descrito, con la diferencia de que para realizar la lectura se hace pasar la muestra por el bypass, de modo que no se foto-oxida y no se impulsa reactivo oxidante. Sólo es necesario mezclar la muestra con los reactivos encargados de la generación de hidruros para formar la arsina (H_3As).

4.4 Optimización de variables que afectan la señal analítica.

La optimización de las variables que pudieran afectar la señal analítica se realizó con un diseño experimental. Se ha demostrado que ésta es una herramienta eficiente en la etapa de la optimización del método, ya que la calidad de los resultados depende de la distribución de los experimentos en el ámbito experimental (Leardi, 2009).

En primer lugar se realizaron estudios preliminares, para establecer condiciones de operación y lectura del sistema, así como el establecimiento de la longitud del tubo PTFE del reactor UV y el tiempo de irradiación. Posteriormente se realizó un planeamiento factorial para estudiar las variables y sus interacciones que influyen al sistema dentro del rango establecido para cada una de ellas (*screening*).

Finalmente se llevó a cabo una superficie de respuesta para seleccionar el valor óptimo de cada variable. Este diseño fue realizado con ayuda del programa Minitab® 15.1.0.0. Se estudió exhaustivamente otro

conjunto de variables (volúmenes de muestra y reactivos) exhaustivamente de modo univariante.

4.5 Parámetros analíticos.

Se establecieron los parámetros analíticos del método tanto para la medición de arsénico inorgánico como para el arsénico proveniente del DMA. Se determinaron el rango de trabajo lineal, límite de detección, límite de cuantificación, reproducibilidad, repetibilidad y sensibilidad.

4.6 Estudio de iones interferentes.

Se realizó un estudio de interferencias que consistió en la determinación de una concentración conocida de arsénico orgánico que contenía elementos interferentes. Dichos elementos se estudiaron a diferentes niveles de concentración. Se consideró como interferente la concentración de un ión a partir de la cual se afecta $\pm 10\%$ la señal analítica del arsénico.

4.7 Validación del método con muestra certificada.

La validación del método consistió en la determinación de dimetilarsénico (DMA) procedente de una muestra certificada de músculo de atún (BCR-627), la cual requirió una extracción del compuesto orgánico en agua como único método de tratamiento.

4.8 Análisis de muestras ambientales.

La aplicación del método desarrollado se llevó a cabo en muestras ambientales, las cuales fueron diferentes tipos de aguas (agua de pozo, de grifo y mineral). Inicialmente se realizó la lectura de las muestras para determinar si tenían arsénico presente, tanto por el método de arsénico orgánico como inorgánico. Posteriormente se realizó la recuperación de arsénico orgánico e inorgánico a las muestras mediante

el método de adición de una concentración conocida de estándar a las muestras de agua (*spiked samples*).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Montaje del sistema y optimización de tuberías a utilizar.

En esta sección se realizó el montaje del sistema automatizado que consiste en la bureta multijeringa acoplada al detector de AFS. Para dicho montaje, se realizarón algunas optimizaciones de manera univariante de las tuberías a utilizar, descritas a continuación.

5.1.1 Longitud del bucle de reacción.

El estudio del bucle de reacción se realizó probando tubería anudada de diferentes longitudes y de diámetro interno de 0.08 mm. La Figura 5.1, muestra uno de los bucles de reacción utilizados.



Figura 5.1 Bucle de reacción anudado.

Tal como se muestra en la Figura 5.2, las longitudes estudiadas del bucle de reacción fueron las de 50, 100 y 150 cm con un diámetro interno de 0.08 mm. La longitud óptima fue de 100 cm, ya muestra la mejor señal analítica, además de una reducción en el ruido observado.

La tubería larga provoca una mayor dispersión y una tubería muy corta presenta un mezclado deficiente de muestra-reactivos.

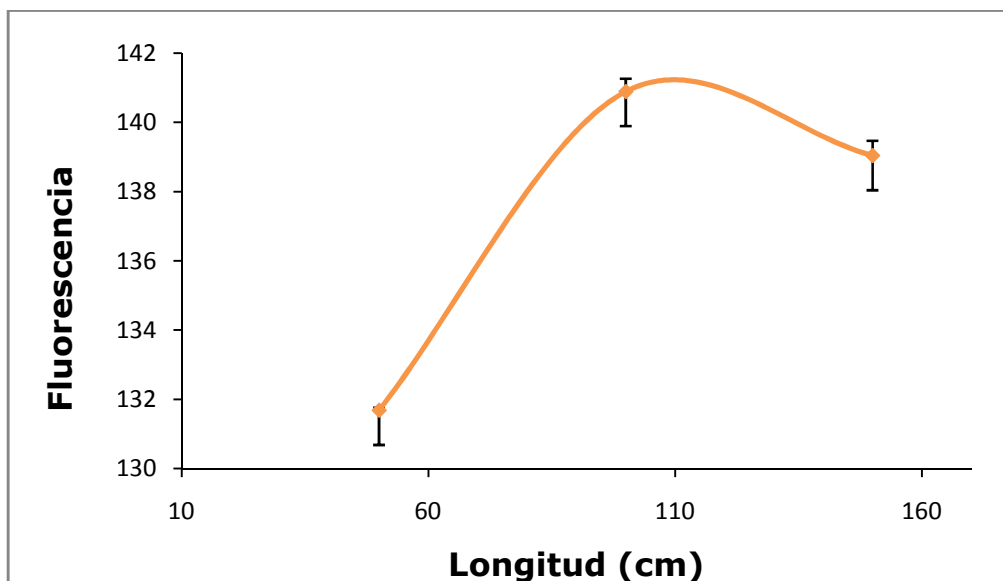


Figura 5.2 Efectos en la señal analítica de las longitudes del bucle de reacción.

5.1.2 Longitud de la tubería de separación del HCl.

Para la determinación de DMA (con foto-oxidación) se requiere primero contrarrestar el efecto del reactivo oxidante mezclando la muestra con el ácido. Para esto se realizó un estudio de la longitud del tubo que une la muestra irradiada con el ácido clorhídrico.

Como se puede apreciar en la Figura 5.3, las longitudes estudiadas fueron de 5.5, 10, 20, 30, y 50 cm, todas con un diámetro interno de 0.08 mm. La de 20 cm presentó la mejor señal analítica.

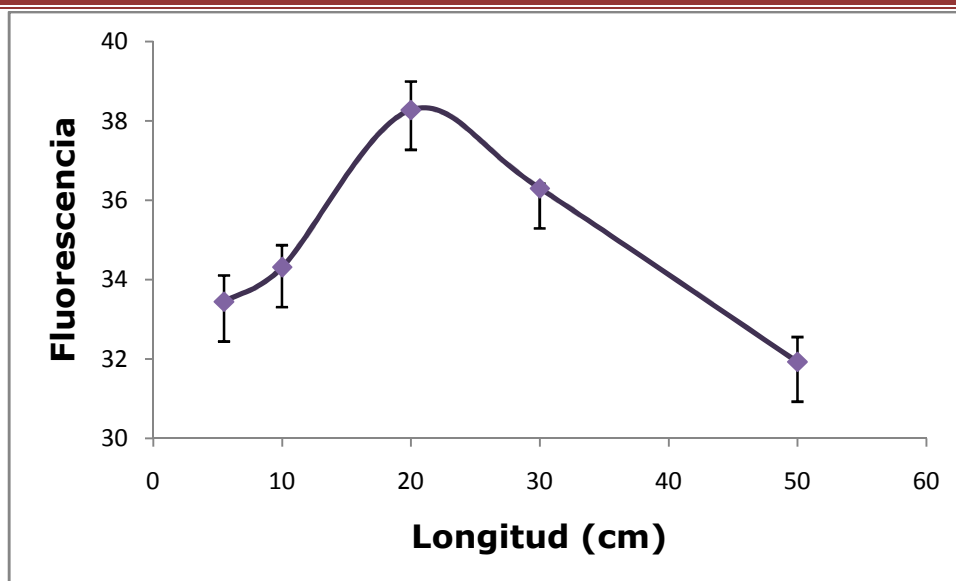


Figura 5.3 Efecto en la señal analítica de las diferentes longitudes de tubería estudiados para mezclar con HCl.

5.1.3 Longitud del reactor UV y tiempo de foto-oxidación.

Dado que el tiempo de irradiación depende de la geometría del tubo (Simon et al., 2004), se ensayaron diferentes longitudes para el reactor, seleccionándose una de 200 cm.

El estudio del tiempo de residencia de la muestra en el fotorreactor se llevó a cabo programando el caudal de la muestra a su paso a través del fotorreactor. Como se muestra en la Figura 5.4., los tiempos de residencia estudiados fueron de 0.2, 0.5, 1, 2 y 3.5 minutos.

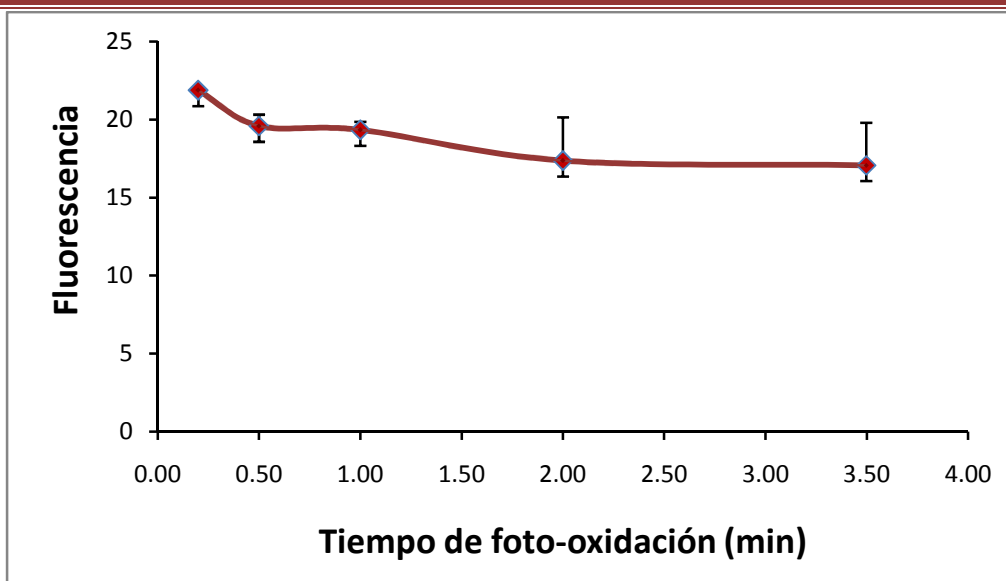


Figura 5.4 Tiempo de residencia de la muestra en el fotorreactor.

El tiempo de residencia de la muestra en el fotorreactor fue controlado con el módulo multijeringa utilizando los comandos de espera establecidos por el programa. El resultado óptimo de irradiación fue de 20 s para completar la oxidación.

5.2 Caudales.

Se realizó un estudio para establecer el flujo de los diferentes tipos de gases utilizados en el equipo de fluorescencia atómica, es decir el N_2 , H_2 y argón. Este estudio se realizó con las siguientes condiciones de operación: $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de As, 1.2% NaBH_4 en 1% de NaOH y HCl 5%, concentraciones recomendadas por el manual del equipo para la lectura de arsénico.

5.2.1 Caudal de los gases.

La regulación de los gases se hizo durante la lectura de un patrón de arsénico, inicialmente el H₂ se estableció en 50 mL min⁻¹, pero al momento de llegar la muestra al atomizador, la flama no se mantenía, así que se probaron también los flujos de 55 y 60 mL min⁻¹. En la de 60 mL min⁻¹ la llama crecía demasiado y obstruía parte del área de la lente por donde pasa la luz fluorescente, ocasionando unas lecturas de blancos muy altas, así que se estableció un caudal de 55 mL min⁻¹.

Para el establecimiento del caudal de los gases se utilizó el caudalímetro mostrado en la Figura 5.5. Para el argón se estableció un caudal de 300 mL min⁻¹, ya que flujos mayores a 300 ocasionaban que la flama del quemador se apagara, por lo cual la señal analítica era nula. El caudal del N₂ se estableció en 300 mL min⁻¹, aunque éste último no supone una influencia significativa en la detección del As ya que sólo se utiliza para deshumidificar la muestra (Semenova et al., 2002).



Figura 5.5 Caudalímetro para el ajuste de flujos de gases utilizados en el equipo.

5.2.2 Caudal de los reactivos generadores del hidruro.

Se estudió el efecto de los caudales de los reactivos NaBH_4 y HCl en la señal analítica. Si el caudal es muy rápido la mezcla de los reactivos para generar el hidruro no es totalmente efectiva y por ende no se tiene una buena señal analítica. Además, ocasiona mucho ruido y blancos muy altos al llegar al quemador. La Figura 5.6 muestra la influencia de los caudales de NaBH_4 y HCl en la señal analítica.

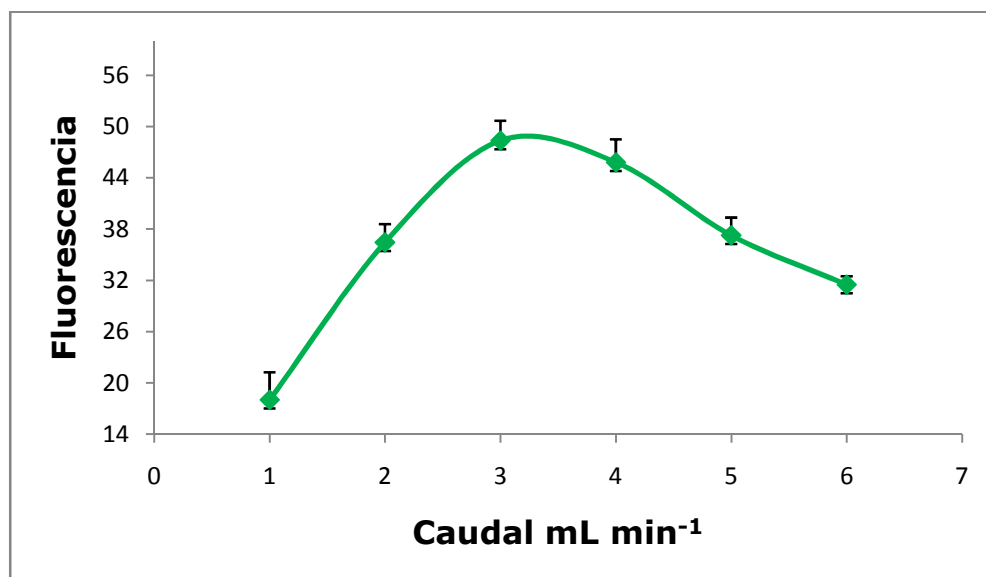


Figura 5.6 Caudal de los reactivos NaBH_4 y HCl .

Como se puede observar en la figura anterior, el flujo óptimo de inyección de los reactivos hacia el sistema es de 3 mL min^{-1} .

5.3 Optimización univariante de volúmenes.

Los volúmenes estudiados para los reactivos dependían parcialmente de las capacidades de las jeringas utilizadas para cada tipo de reactivo.

5.3.1 Agente reductor: borohidruro de sodio (NaBH_4)

Como puede observarse en la Figura 5.7, el valor óptimo para el volumen a utilizar del agente reductor es de 1 mL, el cual generó una mejor señal analítica y blancos bajos. Como el borohidruro de sodio es reductor y genera hidrógeno como producto de la reacción, ocasiona, que a volúmenes mayores la flama del quemador crezca, y por lo tanto dé como resultado señales de blancos muy altos, lo que implica decremento de la señal analítica.

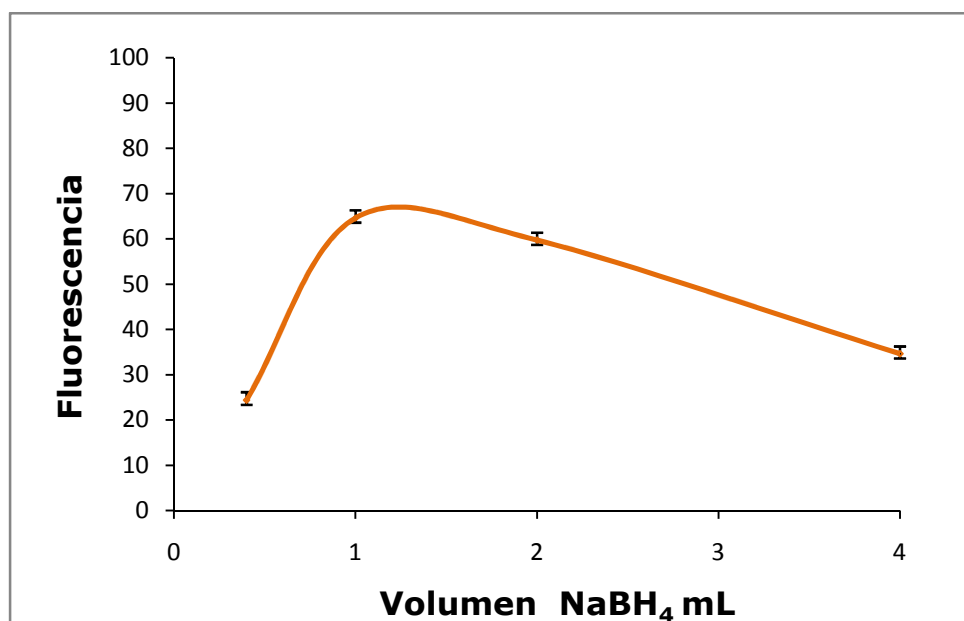


Figura 5.7. Optimización del NaBH_4

La Tabla 5.1 muestra las capacidades de las jeringas utilizadas para la optimización del volumen del agente reductor, con cada jeringa se dispuso diferente volumen de NaBH_4 , esto dependió del volumen a dispensar y de la capacidad de la jeringa.

Tabla 5.1. Capacidades de las jeringas utilizadas y sus respectivos volúmenes en la optimización del volumen del agente reductor.

Capacidad jeringa	Volumen NaBH ₄
1 mL	0.4 mL
<u>2.5 mL</u>	<u>1 mL</u>
5 mL	2 mL
10 mL	4 mL

El volumen óptimo de 1 mL de borohidruro de sodio fue dispensado con una jeringa de 2.5 mL de capacidad.

5.3.2 Agente oxidante: peroxodisulfato de sodio (K₂S₂O₈).

El volumen estudiado del agente oxidante fue establecido de acuerdo a la capacidad de la jeringa como se muestra en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Capacidades de las jeringas utilizadas y sus respectivos volúmenes en la optimización del volumen del agente oxidante.

Capacidad jeringa	Volumen K ₂ S ₂ O ₈
1 mL	0.16 mL
2.5 mL	0.4 mL
<u>5 mL</u>	<u>0.8 mL</u>
10 mL	1.6 mL

Se estudió el efecto sobre la señal analítica del volumen de reactivo oxidante en un rango entre 0.16 y 1.6 mL. La Figura 5.8 muestra el

efecto en la señal analítica de los volúmenes estudiados para la optimización del reactivo oxidante.

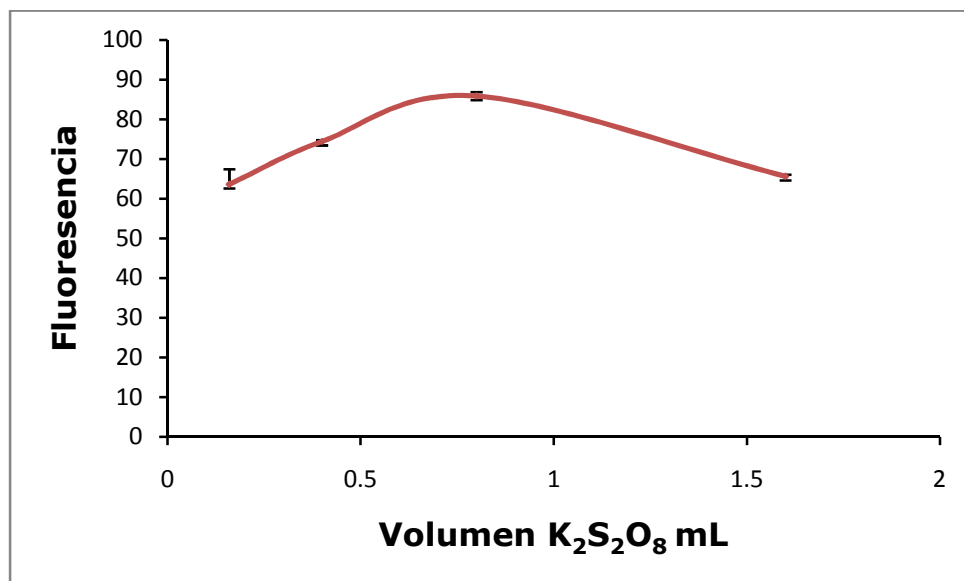


Figura 5.8 Optimización del volumen del agente oxidante.

El volumen de $K_2S_2O_8$ seleccionado fue de 0.8 mL, dispensado con una jeringa de 5 mL de capacidad.

5.3.3 Medio ácido: ácido clorhídrico (HCl).

Los volúmenes estudiados para el ácido clorhídrico fueron 0.4, 1, 2 y 4 mL tal como se muestra en la Tabla 5.3. Se seleccionó un volumen de 1 mL, ya que los volúmenes de 2 y 4 mL muestran una tendencia decreciente en la señal (Figura 5.9). Para dispensar el volumen de 1 mL de HCl se utilizó una jeringa de 2.5 mL.

Tabla 5.3. Capacidades de las jeringas utilizadas y sus respectivos volúmenes en la optimización del volumen de HCl.

Capacidad jeringa	Volumen HCl
1 mL	0.4 mL
2.5 mL	1 mL
5 mL	2 mL
10 mL	4 mL

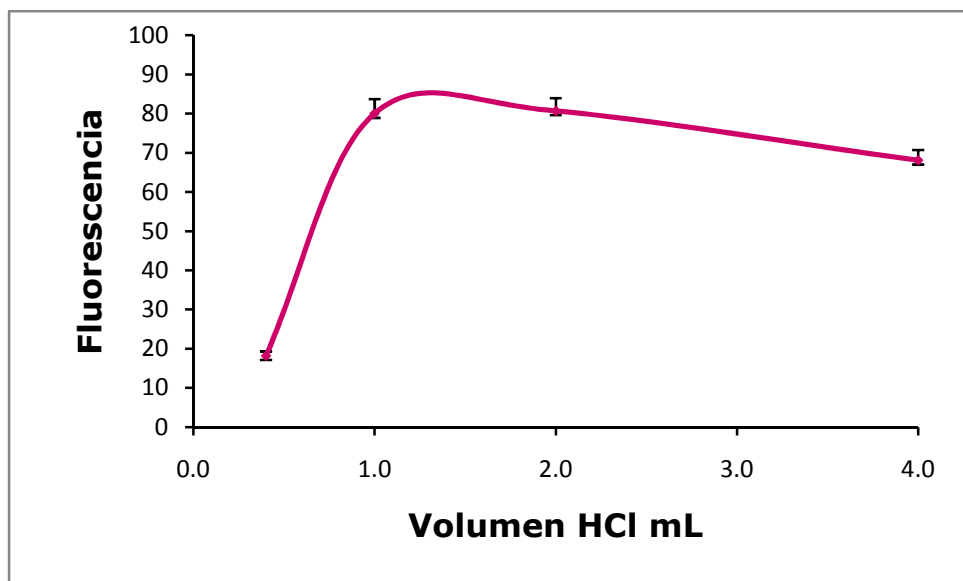


Figura 5.9 Efecto del volumen del HCl en la señal analítica

5.3.4 Volumen de muestra.

La Tabla 5.4 muestra los volúmenes estudiados para la optimización del volumen de muestra a utilizar, tanto para la medición de arsénico orgánico, como para la determinación de arsénico inorgánico.

Tabla 5.4. Capacidades de las jeringas utilizadas y sus respectivos volúmenes en la optimización del volumen de muestra.

Capacidad jeringa	Volumen muestra
1 mL	0.16 mL
2.5 mL	0.4 mL
5 mL	0.8 mL
<u>10 mL</u>	<u>1.6 mL</u>

El valor óptimo de volumen de muestra fue el de 1.6 mL, inyectado a través de una jeringa de 10 mL. El efecto del volumen en la señal analítica se muestra en la Figura 5.10

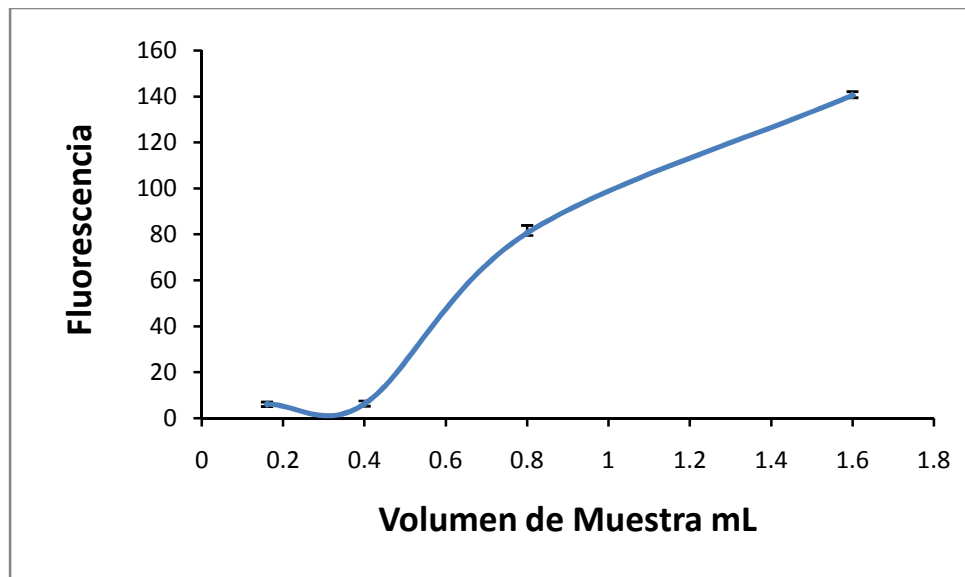


Fig. 5.10 Efecto en la señal analítica en función del volumen de muestra.

5.4 Optimización mediante un diseño experimental.

La optimización de las concentraciones de los reactivos NaBH₄, HCl y K₂S₂O₈ se llevó a cabo a través de un diseño experimental. Éstas fueron estudiadas en un rango establecido para cada reactivo. Por ejemplo, el borohidruro de sodio se estudió en un rango que no afectara los blancos, siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante del equipo. En la Tabla 5.5 se muestran los rangos de concentraciones estudiadas para los reactivos.

Tabla 5.5 Rangos de concentraciones estudiadas de reactivos.

Variable	Valor mínimo	Valor máximo	Punto central
[HCl] (mol L ⁻¹)	3	8	5.5
[NaBH ₄] (%)	0.5	3	1.75
[K ₂ S ₂ O ₈] (%)	0.5	3	1.75

Se realizó un *screening* mediante un diseño factorial (Factorial Designs Overview, DOE) con las tres variables. Como puede observarse en la Figura 5.11, todas las variables y sus interacciones superan el valor crítico del gráfico de Pareto, indicando que todas ellas son significativas en el rango estudiado. El reductor NaBH₄ (B) es el reactivo que más influye en el sistema, debido a que su interacción resultó ser la más grande y con un valor positivo, es decir, que entre más alta sea la concentración, mejor será la señal analítica, sin comprometer la señal de los blancos.

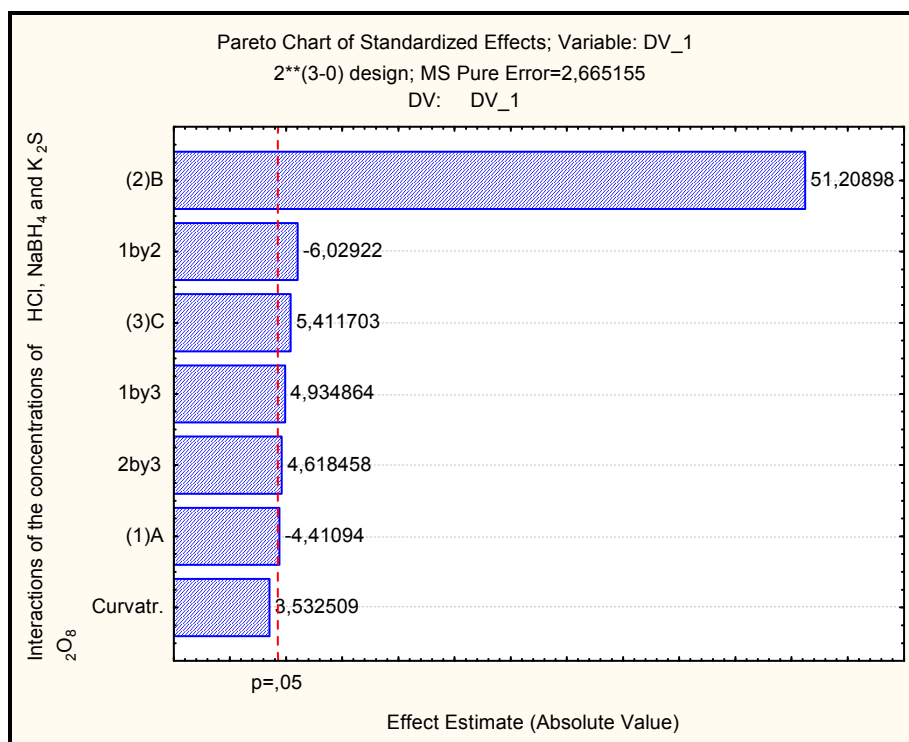


Figura 5.11 Diagrama de Pareto que representa las interacciones entre las variables estudiadas.

La respuesta del HCl (A) también fue significativa, pero su valor es negativo. Esto quiere decir que a menor concentración de ácido clorhídrico mayor será la señal analítica.

Para el oxidante (C), el diagrama indica que su efecto es positivo, por lo cual una concentración relativamente alta de oxidante va a formar una mejor oxidación de la materia orgánica en la muestra y por lo tanto mejor señal analítica. Finalmente las interacciones entre las propias variables no son mayormente significativas según el diagrama de Pareto.

Posteriormente se procedió a realizar nuevos experimentos para generar una superficie de respuesta, como se muestra en la Tabla 5.6, y se

analizaron los resultados de esta superficie para obtener los valores óptimos de las variables. Se utilizó el programa Minitab 15.0.0.

Tabla 5.6. Resultados de los experimentos realizados en la superficie de respuesta.

StdOrder	RunOrder	Blocks	[HCl]	[NaBH ₄]	[K ₂ S ₂ O ₈]	RESULTADOS I.F. NETA
6	1	1	8	0.5	3	14.7800
12	2	1	5.5	3	1.75	75.4962
1	3	1	3	0.5	0.5	11.9962
3	4	1	3	3	0.5	75.1695
10	5	1	8	1.75	1.75	57.3257
9	6	1	3	1.75	1.75	50.4419
16	7	1	5.5	1.75	1.75	43.7666
17	8	1	5.5	1.75	1.75	46.9847
15	9	1	5.5	1.75	1.75	44.8978
5	10	1	3	0.5	3	9.6457
14	11	1	5.5	1.75	3	59.6010
11	12	1	5.5	0.5	1.75	10.3467
8	13	1	8	3	3	74.6962
7	14	1	3	3	3	78.6209
13	15	1	5.5	1.75	0.5	42.9219
2	16	1	8	0.5	0.5	10.5981
4	17	1	8	3	0.5	54.9905

El Minitab 15.0.0 también calcula una solución óptima y dibuja un gráfico (Figura 5.12). La solución óptima sirve como punto de partida para la trama. Esta parcela de optimización le permite cambiar de

forma interactiva la configuración de variable de entrada para realizar análisis de sensibilidad y, posiblemente, mejorar la solución inicial.

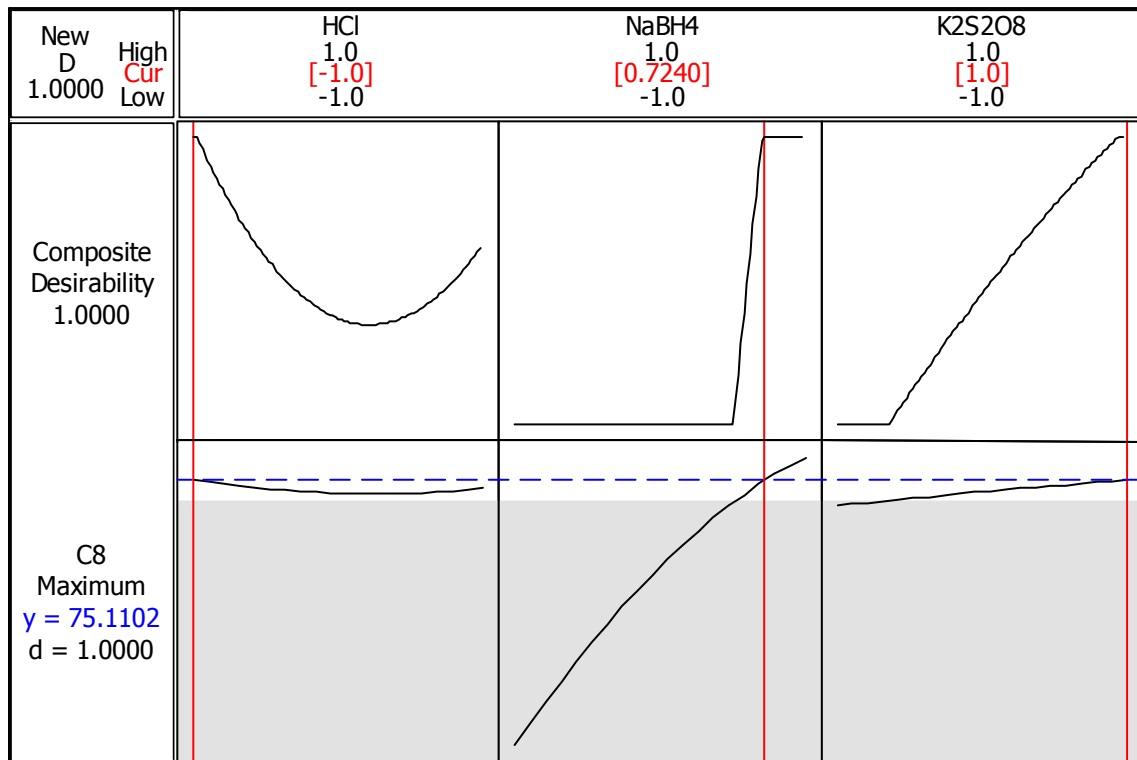


Figura 5.12 Gráfico de solución óptima para las concentraciones de los reactivos.

La trama de optimización muestra el efecto de cada factor (columnas) en las respuestas (filas). Las líneas verticales de color rojo en el gráfico representan la configuración de los factores actuales. Los números que aparecen en la parte superior de una columna muestran la configuración de los factores que son el nivel actual (en rojo).

Las líneas horizontales azules y los números representan las respuestas para el nivel de factor actual. Minitab calcula la fuerza y la flexibilidad maximizada cuando todos los factores están en su punto más alto.

De este modo, las concentraciones óptimas para los reactivos quedaron de la siguiente manera: el reactivo oxidante en 3% (m/v), el NaBH₄ en 2.2% (m/v) y el HCl en 3 mol L⁻¹.

El valor de concentración del reactivo oxidante coincide con el establecido por Rubio et al. (1993) para determinar As orgánico mediante un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA). En cuanto al NaBH₄, el valor óptimo es similar al establecido por Simon et al. (2004 b), que utiliza 2.5% mediante un sistema FIA. La concentración de HCl es similar a las reportadas por Palacios et al. (1997) y Simon et al. (2004).

5.5 Determinación de los parámetros analíticos para DMA.

Una vez establecidos los valores óptimos de las variables del sistema, se determinaron algunos parámetros analíticos. Así, se estableció el rango lineal de trabajo entre 0.5 y 7 µg As L⁻¹ alcanzándose un límite de detección (LD) de 0.09 µg As L⁻¹.

El LD fue calculado con:

$$LD = \frac{3\sigma b}{s}$$

Donde σb es la desviación estándar del blanco (n=10) y S es la pendiente de la recta de ajuste de la curva de calibración.

En la Figura 5.13 se muestra una curva de calibración, donde cada punto es el promedio de tres inyecciones para cada disolución (n=24). Se obtuvo una ecuación de la recta $y=27.2743x+1.6977$, con un ajuste de $R^2= 0.9995$.

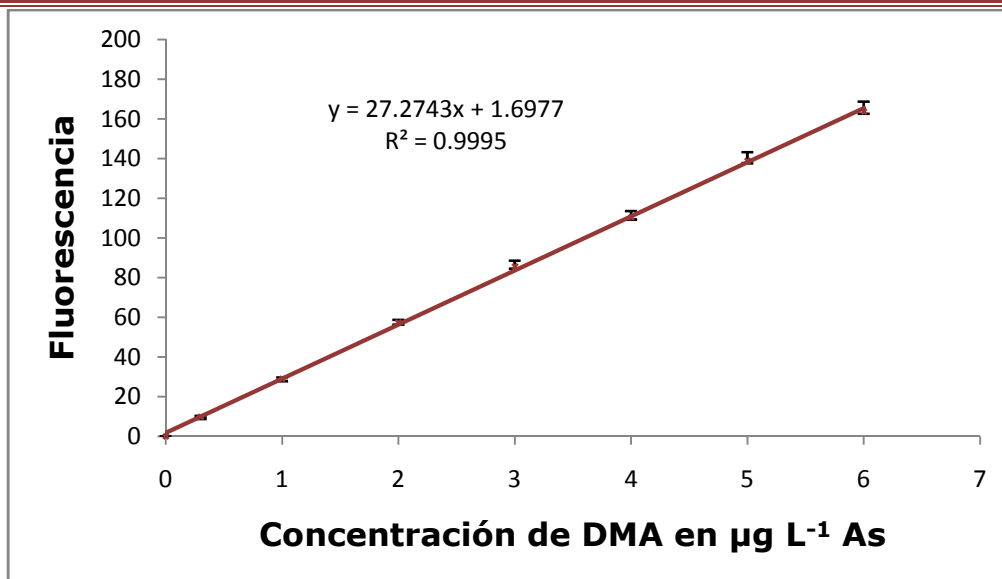


Fig. 5.13 Curva de calibración para DMA.

A partir de los resultados de la curva de calibración mostrada anteriormente para DMA, se realizaron los cálculos para obtener el rango lineal de trabajo y los límites de cuantificación y límite de detección, tal como se muestra en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7. Parámetros analíticos para DMA.

Parámetro	Valor
Rango lineal trabajo	0.5 – 7 µg As L ⁻¹
Límite de Detección	0.09 µg As L ⁻¹
Límite de Cuantificación	0.29 µg As L ⁻¹
Sensibilidad	27.27 UI/µg As L ⁻¹
Frecuencia de Inyección	24 h ⁻¹
Repetibilidad	2.34 % (n=10)
Reproducibilidad	1.89 (n=5)

El LD alcanzado es del mismo orden de magnitud que los obtenidos por métodos de determinación de DMA utilizando fluorescencia atómica, pero basados en la técnica FIA, como por ejemplo, $0.5 \mu\text{g As L}^{-1}$ obtenidos por Slejkovec et al. (1998).

También hay otros métodos basados en la técnica FIA con detección mediante fluorescencia atómica, que si bien presentan una frecuencia de inyección más elevada, su LD es de dos órdenes de magnitud por debajo del alcanzado en este estudio (LD de $14 \mu\text{g As L}^{-1}$, Pérez-Ruiz et al., 2001).

5.6 Determinación de parámetros analíticos para As inorgánico.

Se construyó la curva de calibración para la determinación de As inorgánico, la cual se muestra en la Figura 5.14. Los parámetros analíticos estudiados se muestran en la Tabla 5.8.

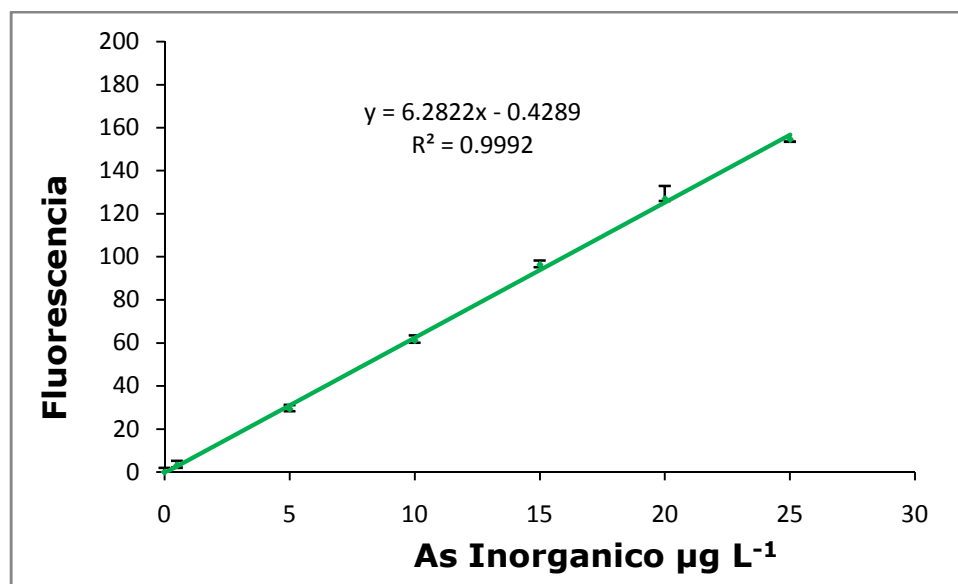


Fig. 5.14 Curva de calibración para arsénico inorgánico.

El LD fue calculado como $3\sigma_b/S$, donde σ_b es la desviación estándar del blanco ($n=10$) y S es la pendiente de la recta de ajuste de la curva de calibración.

Tabla 5.8. Parámetros analíticos para arsénico inorgánico.

Parámetro	Valor
Rango lineal trabajo	0.5 – 25 $\mu\text{g As L}^{-1}$
Límite de Detección	0.47 $\mu\text{g As L}^{-1}$
Límite de Cuantificación	1.44 $\mu\text{g As L}^{-1}$
Sensibilidad	6.28 UI/ $\mu\text{g As L}^{-1}$
Frecuencia de inyección	28 h^{-1}
Repetibilidad	1.51% ($n=10$)
Reproducibilidad	2.00 ($n=5$)

La determinación del límite de cuantificación se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$LQ = \frac{10 \sigma_b}{S}$$

Donde σ_b es la desviación estándar del blanco ($n=10$) y S es la pendiente de la recta de ajuste de la curva de de calibración.

La repetibilidad se realizó mediante el análisis del blanco en un solo día y como mínimo diez lecturas. La reproducibilidad se llevó a cabo midiendo una misma concentración de patrón en cinco días, calculándose su desviación estándar.

5.7 Validación del método con muestra certificada.

La validación del método para DMA se realizó con la muestra certificada BCR-627 (músculo de atún), obteniéndose como resultado una recuperación del 98%, como se muestra en la Tabla 5.9. El resultado obtenido es aceptable de acuerdo a la concentración estipulada por el certificado del material de referencia.

Tabla 5.9. Análisis de DMA en la muestra certificada BCR-627 (músculo de atún).

Muestra	Valor Certificado $\mu\text{g As L}^{-1}$	Valor Obtenido $\mu\text{g As L}^{-1}$	Recuperación %
BCR-627 ($\mu\text{mol Kg}^{-1}\text{DMA}$)	1.60 ± 0.24	1.57 ± 0.01 n=12	98

El análisis de los resultados de la muestra certificada se hizo mediante una comparación de medias T-student, al 95% de confianza, en donde no se encontraron diferencias significativas entre los valores. La determinación del porcentaje de humedad presente en la muestra certificada se analizó a través de un estudio a peso constante de la muestra en estufa a 90°C, presentando una humedad de 10.6%.

5.8 Estudio de interferencias.

El estudio de las interferencias se realizó mediante la adición del ion interferente a $5 \mu\text{g As L}^{-1}$ de DMA. Los iones interferentes estudiados fueron Hg, Pb, Cu y Co, y se eligieron en base a la interferencia que generan en el proceso de reacción para la determinación del As Total y DMA, es decir, el Hg y el Pb compiten por el reductor, ya que también generan hidruro volátil, y en el caso del Cu y Co interfieren en la formación de la arsina.

Las interferencias que se presentaron de estos iones en el análisis fueron de: $750 \mu\text{g L}^{-1}$ para Cu, de $1500 \mu\text{g L}^{-1}$ para Co; para Hg y Pb a partir de $3000 \mu\text{g L}^{-1}$. Estas interferencias también fueron estudiadas por Pérez-Ruiz (2001) y los resultados reportados son similares a los arrojados por este estudio.

5.9 Medición de muestras de ambientales.

Con la finalidad de evaluar la utilidad del método implementado se llevó a cabo la determinación de DMA y arsénico inorgánico en diversas matrices de agua utilizando la técnica de fortificación de muestra. La Tabla 5.10 muestra la concentración encontrada de DMA en las muestras y el valor encontrado después de la fortificación de las mismas con un patrón de DMA, reportadas en porcentajes de recuperación.

Tabla 5.10. Valores encontrados de DMA en muestras ambientales

Muestra*	Conc. encontrada	Adición estándar	Valor encontrado	Recuperación
Agua de Pozo	ND	5 $\mu\text{g L}^{-1}$ DMA	4.86 \pm 0.67 $\mu\text{g L}^{-1}$	97%
Agua de Grifo	ND	5 $\mu\text{g L}^{-1}$ DMA	5.41 \pm 0.41 $\mu\text{g L}^{-1}$	108%
Agua mineral	ND	1 $\mu\text{g L}^{-1}$ DMA	0.99 \pm 1.09 $\mu\text{g L}^{-1}$	99%

*Las muestras se analizaron por triplicado; ND: no detectado.

La recuperación en el análisis de muestras ambientales se realizó determinando inicialmente la cantidad de arsénico orgánico e inorgánico en las muestras. Luego, se adicionó una concentración conocida de patrón para proceder a su recuperación. Para ambos casos, tanto para DMA como para inorgánico, la recuperación obtenida fue satisfactoria.

La Tabla 5.11 muestra la determinación de arsénico inorgánico en muestras de agua, la cual también se realizó por fortificación de muestra. Primero se analizaron las muestras de agua para determinar la concentración de arsénico inorgánico y posteriormente se fortificaron las muestras.

Tabla 5.11. Valores encontrados para arsénico inorgánico en muestras ambientales.

Muestra*	Conc. encontrada	Adición estándar	Valor encontrado	Recuperación
Agua de Pozo	2.27 $\mu\text{g L}^{-1}$	3 $\mu\text{g L}^{-1}$	5.73 \pm 1.47 $\mu\text{g L}^{-1}$	91%
Agua de Grifo	ND	1.5 $\mu\text{g L}^{-1}$	1.65 \pm 1.22 $\mu\text{g L}^{-1}$	99%
Agua mineral	ND	3 $\mu\text{g L}^{-1}$	2.99 \pm 1.02 $\mu\text{g L}^{-1}$	100%

*Las muestras se analizaron por triplicado; ND: No detectado.

La adición del estándar para la recuperación del analito se realizó a partir de un patrón de DMA para los ensayos de arsénico orgánico y a partir del patrón de trióxido de arsénico para los de arsénico inorgánico.

Tanto para DMA como para As inorgánico, los ensayos de recuperación de las muestras analizadas mostraron resultados dentro del rango de aceptación de la prueba de \pm 10%. Esto indica la aplicación del método desarrollado en diversas matrices.

CONCLUSIONES.

La técnica MSFIA-UV-HG-AFS desarrollada permite la determinación y especiación de As inorgánico y DMA de forma automatizada, aumentando su frecuencia de análisis en relación a otros métodos como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC por sus siglas en ingles).

La utilización de la bureta multijeringa consigue la elevada frecuencia de muestreo debido a que la adición de la muestra y reactivos se hacen en paralelo, lo que conduce además a una mejor mezcla de los mismos, además de que todo el sistema es cerrado, evitándose así una contaminación de la muestra o de los reactivos.

El método ofrece ventajas tales como una alta sensibilidad, alta frecuencia de análisis, bajos costo de operación y mantenimiento. Los límites de detección y cuantificación alcanzados permiten hacer análisis a niveles ultra-traza (ng L^{-1}).

Hay una reducción considerable en el consumo de muestra y reactivos ya que estos se inyectan al sistema sólo en el momento de la determinación analítica, generando una menor cantidad de residuos.

El sistema MSFIA-UV-HG-AFS ha sido aplicado con éxito a la determinación de DMA en diversas matrices biológicas y ambientales, como es el caso del material de referencia sólido BCR-627 (músculo de atún) y muestras de agua de pozo, de grifo y mineral.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Alkemade C. Th. J. and Zeegers P. J. Th., (1971). Spectrochemical Methods of Analysis, ed. J.D. Winefordner, Wiley-Interscience, New York.
- [2]. Aposhian H.V., Aposhian M.M. (2006). Chem. Res. Toxicol. 19: 1-15.
- [3]. Aposhian H.V., Gurzau E.S., Le X.C., Gurzau A., Healy S.M., Lu X., Ma M., Yip L., Zakharyan R., Maiorino R.M., Dart R.C., Tircus M.G., Gonzalez-Ramirez D., Morgan D.L., Avram D., Aposhian M.M. (2000). Chem. Res. Toxicol. 13: 693-697.
- [4]. Aposhian H.V., Zakharyan R.A., Avram M.D., Kopplin M.J., Wollenberg M.L. (2003). Toxicol. Appl. Pharmacol. 193: 1-8.
- [5]. Aposhian H.V., Zakharyan R.A., Avram M.D., Sampayo-Reyes A., Wollenberg M.L., (2004). Toxicol. Appl. Pharmacol. 198: 327-335.
- [6]. Aposhian H.V., Zakharyan R.A., Wildfang E.K., Healy S.M., Gailer J., radabaugh T.R., Bodgan G.M., Powell T.A., Aposhian M.M., (1999). Elsevier Science: 289-297.
- [7]. ATSDR (2007) Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Servicio de Salud Pública Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades: Resumen de Salud Pública Arsénico CAS#: 7440-38-2 División.
- <http://www.atsdr.cdc.gov/es/training/arsenico/docs/>
- [8]. Basu A., Mahata J., Gupta S., Giri A.K.; (2001). Mutat. Res., 488:171-19

- [9]. Becerra E., Cladera A., Cerdà V.; (1999). *Lab. Rob. Autom.* 11: 131.
- [10]. Brima E.I., Haris P.I., Jenkins R.O., Polya D.A., Gault A.G., Harrington C.F.; (2006). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216:122-130.
- [11]. Cerdà V., Estela J.M. *Inter. J.*; (2005). *Environ. Anal. Chem.* 85: 231.
- [12]. Cerdà V., Pons C.; (2006). *Trends in Analytical Chemistry.* 25: 236.
- [13]. Cerdà V., Estela J.M., Forteza R., Cladera A., Becerra E., Altimira P., Sitjar P.; (1999). *Talanta* 50: 695-705
- [14]. Cerdà V. (2006). *Introducción a los Métodos de Análisis en Flujo*, 1a. ed., SCWARE S.L., Palma de Mallorca, España.
- [15]. Gomez-Ariza J.L., Sanchez-Rodas D., Giraldez I.; (1999). *Environ. Anal. Chem.* 74: 203-213
- [16]. Healy S.M., Casares E.A., Ayala-Fierro F, Aposhian H.; (1998). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148: 65-70.
- [17]. Horstkotte B., Elsholz O., Cerdà V., (2005). *Flow Injection Anal.*, 22: 99-109.
- [18]. Horstkotte B., Werner E., Wiedemeier S., Elsholz O., Cerdà V., Luttmann R.; (2006). *Anal. Chim. Acta* 559: 248
- [19]. Howar A.G., Comber; (1989). *Appl. Organomet. Chem.* 3:509.
- [20]. Huang C., Ke Q., Costa M., Shi X.; (2004). *Mol. cell Biochem.* 255: 57-66.
- [21]. Hugues M.F.; (2002). *Toxicol Lett* 133: 1-16.
-

- [22]. Jain C.K., Ali I.; e.d. Pergamon (2000); p.p.: 4304-4312.
- [23]. Jarvis K.E. e.d. Steve J. Hill Scheffield Academic Press and CRC Press, (1999), p.p.: 98-118.
- [24]. Ito K., Palmer C.D., Corns W.T., Patrick J. Parsons; (2010). *J. Anal. Atomic Spectrometry*. 25: 822-830.
- [25]. Kikbright G.K., Sargent M.; (1974). *Atomic Absorption and Fluorescence Spectroscopy*, Academic Press, London.
- [26]. Kligerman A.D., Doerr C.L., Tennant A.H., Harrington-Broch K., Allen J.W., Winkfield E., Poorman-Allen O., Kundu B., Funasaka K., Roop B.C., Mass M.J., De Marini D.M.; (2003). *Environ. Mol. Mutagen*. 42: 192-205.
- [27]. Kligerman A.D., Tennant A.H.; (2007). *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 222: 281-288.
- [28]. Lajunen L.H.J. y Perämäk. *Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission*, RSC, Cambridge, 2nd edn, (2004), Cap. 7, p.p. 276-285.
- [29]. Lapa R.A.S., Lima J.L.F.C., Reis B.F., Santos J.L.M., Zagatto E.A.G.; (2002). *Acta. Chim. Acta* 466: 125
- [30]. Leardi R.; (2009). *Anal. Chim. Acta*, 652: 161-172.
- [31]. Mandal B.K., Suzuki K.T.; (2002). *Talanta* 58: 201-235.
- [32]. Mc Collum G., Keng P., States J.C., Mc Cabe M.J. Jr.; (2005). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313: 877-887.
- [33]. Miró M., Cerdà V., Estela J.M.; (2002). *TrAC-Trends Anal. Chem.* 21 199.

- [34]. Morgan A. Exposure and health effects. Office of water. Office of Science and Technology. Health and ecological criteria Division. United States Environmental Protection Agency, Washington, D.C. (2001). Chapter 3.
- [35]. Mouron S.A., Golijow C.D., Dulout F.N. ; (2001). *Mutat. Res.* 498:47-55.
- [36]. Nemeti B., Csanaky I., greus Z.; (2003). *Toxicol. Sci.* 74:22-31.
- [37]. Palacios M.A., Gomez M., Cámara C., López M.A.; (1997). *Anal. Chim. Acta*, 340: 209-220.
- [38]. Perez-Ruiz T., Martinez C., Tomás V. y Martín J.; (2001). *Anal. Chim. Acta*, 447: 229-235.
- [39]. Petrick J.S., Ayala-Fierro F., Cullen W.R., Carter D.E., Vasken Aposhian H.; (2000). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 163:203-207.
- [40]. Petrick J.S., Jagadish B., Mash E.A., Aposhian H.V.; (2001). *Chem. Res. Toxicol.* 14: 651-656.
- [41]. Radabaugh T.R., Sampayo-Reyes A., Zakharyan R.A., Aposhian H.V.; (2002). *Chem. Res. Toxicol.* 15: 692-698.
- [42]. Reis B.F., Giné M.F., Zagatto E.A.G., Lima J.L.F.C., Lara R.A.; (1994). *Anal. Chim. Acta* 293: 129
- [43]. Rossman T.G.; (2003). *Mutat. Res.* 533:37-65.
- [44]. Rubio R., Padró A., Abertí J. y Rauret G., (1993). *Anal. Chim. Acta*, 283: 160-166.
- [45]. Ruzicka J., Hansen E.H. *Flow Injection analysis*, second ed., Wiley-Interscience, New York, 1988.
-

- [46]. Ruzicka J.; (2000). *Analyst* 125: 1053
- [47]. Ruzicka J., Lima J.L.F.C., Reis B.F., Santos J.L.M, Zagatto E.A.G.; (2002). *Anal. Chim. Acta* 466: 125.
- [48]. Ruzicka J., Marshall G.; (1990). *Anal. Chim. Acta* 237: 329.
- [49]. Ruzicka J. y Hansen E.H.; (1975). *Anal Chim Acta* 78: 145
- [50]. Sánchez-Rodas D., Corns W.T., Chen B., Stockwell P.B.; (2010). *J. Anal. Atomic Spectrometry* 25: 933-946.
- [51]. Seoane C., Grillo A., Nilsson R., Darroudi F., Natarajan A.T., Dulot F.N.; (1998). *Evaluación Mutagénica y Genotóxica*, DGESIC, SEMA. I Burguete, De la Peña E., Guadaño A. (Eds). Madrid: 239-248.
- [52]. Segundo M., Magalhaes L.M.;(2006). *Anal. Sci.* 22: 3-8.
- [53]. Segura M., Muñoz J., Madrid Y., Cámara C., (2002). *Anal Bioanal. Chem.*, 374: 513-519.
- [54]. Semenova N.V., Bauzá de Mirabó F.M., Forteza R., Cerdá V., (2000). *Anal. Chim. Acta*, 412: 169-175.
- [55]. Semenova N.V., Leal L.O., Forteza R., Cerdá V., (2002). *Anal. Chim. Acta*, 455: 277-285.
- [56]. Simon S., Tran H., Pannier F. Potin-Gautier M.;(2004). *Journal of Chromatography A*, 1024: 105-113.
- [57]. Simon S., Lobos G., Pannier F., De Gregori I., Pinochet H. Potin-Gautier M., (2004b). *Anal. Chim.Acta*, 521: 99-108.
- [58]. Slejkovec Z., van Elteren J., Byrne A., (1998). *Anal. Chim. Acta*, 358: 51-60.
-

- [59]. Semenova N.V., Leal L.O., Forteza R., Cerdà V. *Anal. Chim. Acta* (2002) 455: 277
- [60]. Sharma Vireder K., Sohn M.; (2009). *Environment International*, 35: 743-759.
- [61]. Skeggs L.T. *Am. J. Clin. Path.*, 28 (1957) 311-322.
- [62]. Stylbo M., Vega L., Germolec D.R., Le Cluyse E.L., Hamilton G.A., Reed W., Wang C., Cullen W.R., Thomas D.J.; (1999). *Arsenic Exposure and Health Effects*. Albernathy C.O., Chapell W.R., Calderón R.L. (Eds). San Diego, Elsevier, 311-323.
- [63]. Tapio S., Grosche B.; (2006). *Mutat. Res.* 612: 215-246.
- [64]. Thayer, J.S. Global bioalkylation of the heavy elements in metals ions in biological systems, (H. Sigel and A. Sigel eds). Marcel Dekker, Inc. (1993), 1-36.
- [65]. Thirunavukkarasu O.S., Viraraghavan T, Subramanian K.S., Tanjore S.; (2002). *Urban Water* 4: 415-421.
- [66]. Thomas D.J.; (2007). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 222: 365-367.
- [67]. Thomas D., Ma. H., Feng Z., Xia Y., Le X.C., Ni Z., Allen J., Collins B., Schereinemachers D., Mumford J.L.; (2001). *J. Toxicol. Environ. Health A.* 64 (6): 473-484.
- [68]. Vahter M.; (1999). *Sci. Prog.* 82:69-88.
- [69]. Vahter M., Couch R., Nermell B., Nilsson R. (1995). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133:262-268.
- [70]. Vahter M., Concha G. (2001). *Pharmacol. Toxicol.* 89: 1-5.
- [71]. Vahter M.; (2002). *Toxicology* 181-182: 211-217.
-

- [72]. Varcárcel M., Luque de Castro M.D.; *Autoatic Methods of Analysis*. Elsevier, (1988).
- [73]. Varcárcel M., Luque de Castro M.D. *Flow Injection Analysis: Principles and Aplications*. Ellis Horwood, Chichester, 1987.
- [74]. Villa-Lojo M.C., Alonso-Rodriguez E., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodriguez D. (2002). *Talanta*, 57:741-750.
- [75]. Whitehead E.C. (Ed.). *Continuous-Flow Analysis Symposium in: Advances in automated analysis*. Technicon Internacional Congress-1976, Mediad Incorporated, Tarrytown, New York, 1977.
- [76]. WHO (2001). World Health Organization. *Arsenic and arsenic compounds*. Environmental Health Criteria 22 (second edition). Geneva.
- [77]. Wildfang E., Healy S.M., Aposhian H.V.; (2000). *Molecular Biology and Toxicology of metals*. J Koropatric. RK Zalups (Eds). Mercer University of School of Medicine and London Regional Centre 75-112.
- [78]. Wildfang E, Zakharyan RA, Aposhian HV (1998). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 152: 366-375.
- [79]. Yamanaka K., Hayashi H., Tachikawa M., Kato K., Hasegawa A., Oku N., Okada S.; (1997). *Mutat. Res.* 394: 95-101.
- [80]. Zakharyan R.A., Sampayo-Reyes A., Healy S.M., Tsaprailis G., Board P.G., Liebler D.C., Aposhian H.V.; (2001). *Chem. Res. Toxicol.* 1: 1051-1057.