

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EMPLEANDO EXTRACCIÓN
ACELERADA CON SOLVENTES Y DETERMINACIÓN CON HG-ICP-OES**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela,
por la Br. Pier Olivera F.,
para optar al título de
Licenciado en Química.

Tutor: Dr. Luís R. Gómez.

Caracas, Mayo de 2010.

ACTA

Los abajo firmantes designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EMPLEANDO EXTRACCIÓN ACELERADA CON SOLVENTES Y DETERMINACIÓN CON IC-HG-ICP-OES". Presentado por la Br. Pier Olivera F. certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciado en Química

Dr. Luís R. Gómez

(Tutor)

Dr. Miguel Murillo.

(Jurado)

Dr. Andrés Escalona

(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

Primero, dar gracias a Dios, por estar en cada paso que damos, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido apoyo y compañía durante todo el periodo de estudio.

Agradecer hoy y siempre a mis padres Pepe y Gloria y hermanos Israel, David, Karen y Sheila, porque si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, así como por su apoyo incondicional, esto no hubiese sido posible

A mi segunda familia; Isabel por ser un modelo a seguir y admirar, Alexander y a mis niñas Katty y Andrea (las adoro); gran parte de este logro es gracias a ustedes.

A Dr. Luis Gómez por la colaboración y ayuda dada en la realización de este trabajo, así como por cada una de sus ocurrencias y anécdotas.

A Rossana por que mas que mi amiga eres mi hermana; gracias simplemente por estar ahí en todo momento. Love U!

A todos aquellos que de alguna manera formaron parte de esta etapa, Mi Nani's, Gabo, Janet & Flia., Celeste & Flia; Zaida & Flia, Familia Daziano R y a toda la Familia Pérez, por cada consejo y palabras de apoyo.

A los Profesores: José Chirinos, Gustavo Pérez, Rosa Amaro; Andrés Escalona; Miguel Murillo, y los demás integrantes del CQA, por la ayuda y colaboración durante este periodo de trabajo.

A la Prof. Valentina de Sola y al Prof. Gastón Escobar, por su apoyo y por haber tenido la suerte de ser su alumna y amiga.

A mis amigos los cuales aunque no pasamos la carrera juntos siempre estuvimos para apoyarnos y animarnos en los momentos difíciles así como para celebrar cada una de las metas alcanzadas: Luis S, Mariana P, Johana V y Milena M.

A mis amigos y hermanos Wladi y Flia, Jimmy y Lenin.

A mis amigos Francia, Nired, Gero, Marie, Claudia, Yay, Helen, Oriana, Carmela, Johanny, Nani, Chepi, Reinaldo, Albertico, Grullita, Daniel M, Marco (PP); Pirulo, Marco S, Jose I, Laurita, Edwin, Sammy, Chuchu, Kamal, Jose C, Raiza, Vane A, Migue, Daniel C, Alexis B, Jesús R, Christian I, Ligia, Indira, Eddy y a todos aquellos que aunque no los menciono pasaron algún momento en un salón de clase, amper, parrilleras, la langosta o me mantuvieron despierta cuando era necesario, en fin por su apoyo incondicional, simplemente gracias.

A mis chicas, por estar en todo momento, para reír, llorar, burlarnos, por estar en los momentos difíciles y los divertidos, por escuchar mil veces el mismo cuento, por su paciencia, por el apoyo, en fin por creer que podemos lograr todo lo que nos proponemos, ya para resumir gracias por estar y por haber coincidido en esta facultad y en la vida. Las quiero!!!!

Un agradecimiento súper especial para un gran amigo y compañero, Leonardo Perozo; que aunque ya no esta físicamente con nosotros, siempre esta presente por haber sido parte de esta etapa.

INDICE.

1.- RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Metales traza, interacción y toxicidad con los sustratos biológicos	2
2.2. Determinación analítica de metales traza	4
2.2.1. Muestreo y almacenado de las muestras	4
2.2.2.- Tratamiento de las muestras	6
Disolución.	7
Digestión.	7
Extracción.	8
• Extracción Soxhlet	8
• Extracción en fase sólida	9
• Extracción con sonda de ultrasonido	9
• Extracción con fluidos supercríticos.	10
• Extracción asistida por microondas.....	10
• Extracción acelerada con solvente.....	11
2.2.3.- Técnicas espectroscópicas para la determinación de metales traza	11
ICP OES.	12
2.2.4. Sistema de Introducción de muestras al ICP OES.....	15
• Introducción de muestras en estado gaseoso.....	15
• Introducción de muestras en estado líquido.....	16
• Introducción de muestras en estado sólido.....	17
2.2.4.1. Sistemas de introducción de muestras en estado líquido en el ICP OES	17
Nebulización neumática.	18
2.2.4.2. Sistema de introducción de muestras al ICP OES en forma de especies metálicas volátiles	22
Generación de hidruros volátiles.....	24

• <i>HG como sistema de introducción en el ICP OES</i>	27
2.3.- El Arsénico y su distribución en el ambiente.....	32
2.3.1.- <i>Principales usos del Arsénico</i>	36
2.3.2.- <i>Toxicidad del Arsénico</i>	38
3.- JUSTIFICACIÓN.....	42
4.- ANTECEDENTES.....	43
5.- OBJETIVOS.....	49
6.- PARTE EXPERIMENTAL	50
6.1.- Descripción de los equipos y reactivos	50
6.1.1.- <i>Molinos de Bolas</i>	50
6.1.2.- <i>Agitador mecánico</i>	51
6.1.3.- <i>Equipo de Extracción Acelerada con Solvente (ASE)</i>	52
6.1.4.- <i>Espectrofotómetro</i>	56
6.1.5.- <i>Sistema de introducción de muestras al espectrofotómetro</i>	57
6.1.6.- <i>Reactivos y materiales</i>	60
6.1.7.- <i>Muestras</i>	61
6.2.- Esquema Experimental	63
6.2.1. <i>Condiciones optimas en el HG–ICP OES para la determinación de As</i>	66
6.3.- Optimización de las condiciones de extracción.....	70
6.3.1. <i>Proceso de extracción con Metanol-Agua (70-30 %)</i>	72
6.3.2. <i>Proceso de extracción con Metanol-Agua (30-70 %)</i>	75
6.3.3. <i>Optimización de la extracción a 100° C</i>	80
6.3.4. <i>Evaluación de los filtros empleados en la extracción</i>	95
6.3.6. <i>Extracción de As en muestras de alga</i>	98
8. CONCLUSION.	101
9. RECOMENDACIONES.....	103
10. BIBLIOGRAFIA.....	104

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Diferentes especies de arsénico presentes en el medio ambiente	32
Tabla 2.- Valores experimentales de LD ₅₀ de especies de arsénico.	39
Tabla 3. Condiciones operacionales óptimas del ICP-OES.....	66
Tabla 4. Concentración Vs señal de emisión, para As en medio acuoso.	67
Tabla 5. Concentración Vs señal de emisión, para As en medio Metanol-Agua.	68
Tabla 6. Condiciones para la extracción con Metanol-Agua 70-30 %.	72
Tabla 7. Preparación de las muestras para la extracción con Metanol-Agua 70-30 % ..	73
Tabla 8. Concentración de As medidas para la extracción Metanol-Agua 70-30 %.	73
Tabla 9. Porcentaje de recuperación para la extracción con Metanol-Agua 70-30 %. ...	74
Tabla 10. Condiciones para la extracción con Metanol-Agua 30-70 %.	75
Tabla 11. Preparación de las muestras para la extracción con Metanol-Agua 30-70 %.	76
Tabla 12.- Concentración de arsénico obtenida para la extracción Metanol-Agua 30-70 %.....	77
Tabla 13. Porcentaje de recuperación para la extracción Metanol-Agua 30-70 %.	78
Tabla 14.- Condiciones experimentales para la extracción a 100 °C.	80
Tabla 15. Preparación de las muestras para la extracción a 100 °C.....	81
Tabla 16. Concentración de arsénico obtenida para la extracción a 100 °C.	82
Tabla 17.- Porcentaje de recuperación para la extracción a 100 °C.....	83
Tabla 18.- Condiciones experimentales para 2 ciclos de extracción.	85
Tabla 19. Preparación de las muestras para la extracción en dos ciclos.	86
Tabla 20. Concentración de As obtenida para la extracción en dos ciclos.....	87
Tabla 21.- Porcentaje de recuperación para la extracción en dos ciclos.....	88
Tabla 22.- Condiciones experimentales para tres ciclos de extracción.	90
Tabla 23. Preparación de las muestras para tres ciclos de extracción.....	91
Tabla 24. Concentración de arsénico obtenida para tres ciclos de extracción.	92
Tabla 25. Porcentaje de recuperación para la extracción para tres ciclos.....	93

Tabla 26. Preparación de muestras para la evaluación de los filtros. Donde FO fue empleando filtro original y FS empleando filtro sustituto.....	96
Tabla 27. Determinación experimental de As para la evaluación de los filtros. Donde FO fue empleando filtro original y FS empleando filtro sustituto.....	97
Tabla 28. Porcentaje de recuperación de As en la evaluación de los filtros.....	97
Tabla 29. Condiciones para la extracción de las muestras de alga.....	99
Tabla 30. Preparación de muestras de algas.....	99
Tabla 31. Concentración de arsénico en el alga sin contaminar.....	99

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Esquema de la antorcha del plasma.	13
Figura 2. Sistema de alimentación y medida del ICP OES.....	14
Figura 3. Nebulizador tipo concéntrico, mostrando una vista frontal y transversal del extremo del capilar.....	21
Figura 4. Corte transversal de un nebulizador tipo flujo cruzado, mostrando una ampliación de la zona central.	21
Figura 5. Esquema de formación de los diferentes derivados volátiles en la reacción de hidrólisis en disolución acuosa del THB.....	26
Figura 6. Sistemas de introducción de vapor químico: A.- Por carga (señal transitoria). B.- Flujo continuo (señal continua) y C.- Inyección de flujo (señal transitoria).....	31
Figura 7. Diagrama simplificado del ciclo del arsénico.	36
Figura 8. Estructura de algunos compuestos de arsénico.....	39
Figura 9. Molino de bolas y esferas de molienda.	51
Figura 10. Agitador Vortex.....	52
Figura 11. Extractor ASE 200.....	53
Figura 12. Espectrómetro de emisión atómica con fuente de plasma de argón, inductivamente acoplado, marca Thermo Jarrell Ash, modelo IRIS.	57
Figura 13. Nebulizador Dual.....	59
Figura 14. Algas para sushi tipo Nori (Porphyra Umbilicalis).....	61
Figura 15. Esquema de procedimiento experimental a seguir.....	63
Figura 16. Diagrama del sistema completo.	65
Figura 17. Curva de Calibración de patrones de As en medio acuoso.....	68
Figura 18. Curva de Calibración de patrones de As en medio Metanol-Agua: (30-70 %).	69
Figura 19. Gráfico de los porcentajes de recuperación para la extracción con Metanol-Agua 70-30 %.	74

Figura 20. Gráfico de los porcentajes de recuperación para la extracción Metanol-Agua 30-70 %	78
Figura 21. Gráfico de los porcentajes de recuperación para la extracción a 100 °C.	84
Figura 22. Gráfico de los porcentajes de recuperación para la extracción a dos ciclos.	89
Figura 23. Gráfico de los porcentajes de recuperación para tres ciclos de extracción. ...	94

1.- RESUMEN

El arsénico, es un elemento metálico altamente tóxico y se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (alrededor del 5×10^{-4} % de la corteza terrestre), si a ello sumamos el hecho de que el hombre a través de la industrialización ha incrementado su presencia en el medio ambiente, representando así un gran riesgo para la salud humana. Ejemplo de ello, es que en una zona contaminada, el excedente del metal puede migrar a través de las lluvias y los ríos a los mares, donde la biota marina tiende con facilidad a bioacumularlo. El consumo de estos alimentos con niveles de arsénico “altos”, puede causar en el humano enfermedades como cáncer de pulmón, de vejiga, de riñón, enfermedades cardíacas, etc.

Por lo tanto, el presente trabajo estuvo enfocado en la determinación de arsénico en productos alimenticios marinos, en especial las algas utilizadas en la preparación de “sushi” y afines. Para ello, se empleó como técnica de tratamiento de muestra la Extracción Acelerada con Solventes y la medida de arsénico se realizó empleando la combinación de la Generación de Hidruros con Plasma Inductivamente Acoplado-Espectrometría de Emisión Óptica.

En los ensayos de optimización de la Extracción Acelerada con Solvente se logró obtener un 92 % de recuperación con un DSR del 3 %. Se logró determinar arsénico en el orden de los 0,6 $\mu\text{g/g}$. En las muestras en estudio de algas Nori, no se encontraron valores detectables de arsénico.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Metales traza, interacción y toxicidad con los sustratos biológicos

En las últimas décadas se han desarrollado técnicas y métodos de análisis que han permitido determinar los metales en órdenes de concentración cada vez más bajos, generando una serie de definiciones como metales traza, ultra-traza, etc. A pesar que la denominación de compuestos o elementos traza pareciera tener una connotación meramente cuantitativa, está supeditada a su influencia sobre un medio determinado, en conjunción con la disciplina que lo esté evaluando. Por ejemplo, desde el punto de vista clínico se define como elementos traza aquellos que representan menos del 0,01 % de masa corporal, desde el punto de vista geológico concentraciones en los suelos menores a 0,1 % y para los botánicos son nutriente menores al 1,0 %. Por lo tanto, podemos concluir que la definición de elementos traza es un concepto relativo. ^[1]

Una vez que los metales traza comenzaron a ser identificados y cuantificados se logró medir sus efectos sobre un sistema determinado, lográndose comprender que pueden jugar un rol importante en la vida de nuestro planeta, para ciertos organismos algunos metales son considerados necesarios, mientras que otros son catalogados como perjudiciales. En todo caso, los elementos trazas sean esenciales o no, pueden ser tóxicos o beneficiosos, dependiendo de su concentración en el organismo. Para cada elemento en particular, existe un rango de concentraciones consideradas óptimas.

El beneficio o la toxicidad de los metales pesados en los sustratos biológicos va a depender de muchos factores: pH, formación de quelatos, concentración de aniones inorgánicos, carga eléctrica, capacidad de coordinación, posibilidad de poseer estados

múltiples de oxidación (valencia), etc. ^[2] Tanto es así, que se ha establecido que una vez que los metales logran introducirse en el medio ambiente, su toxicidad es función en gran medida de la forma química en la cual se encuentra dicho elemento. Esta diversidad de efectos sobre el medio, que se ha relacionado con la forma química específica de un elemento, ha sido aceptada y estudiada por los diferentes campos de la ciencia médica, entre las que podemos mencionar: toxicología, epidemiología, fisiología, farmacología, medicina preventiva, química clínica, química ambiental, biología molecular, etc. Pero, desde el punto de vista fisiológico, uno de los aspectos que más interesa es su toxicidad. Se ha reportado una gran variedad de interacciones perjudiciales entre los metales y los sustratos biológicos, de los que podemos mencionar: bloqueo de los grupos funcionales de moléculas biológicamente importantes, alteración del sistema de transporte de iones o nutrientes esenciales, sustitución de metales o iones esenciales de biomoléculas, modificaciones conformacionales, desnaturalización e inactividad de enzimas, etc. Todas estas interacciones afectan de alguna manera el metabolismo celular (respiración, actividad, síntesis del ribosoma, transporte, etc.). ^[3]

En el orden de ideas descritas en los párrafos anteriores, podemos deducir la importancia de generar o desarrollar métodos y técnicas de análisis sencillas y prácticas para la determinación rutinaria de metales trazas. En el presente trabajo hay un interés particular en la determinación de arsénico en alimentos proveniente del mar, ya que debido a su alta toxicidad en bajas concentraciones, sumada al hecho de ser bioacumulado por organismos marinos, lo hace especialmente interesante. Por lo tanto, haremos un ligero resumen de las normas y técnicas a emplear en la instrumentación analítica para la determinación de metales traza, haciendo énfasis en las empleadas para la determinación de arsénico y las escogidas para el presente trabajo.

2.2. Determinación analítica de metales traza

Un aspecto a tomar en cuenta al momento del análisis de metales y en especial en el orden de traza son: el muestreo, el almacenado, la preservación y el posterior tratamiento de la muestra, ya que esto puede conllevar a cambios en la composición original de las especies en estudio. En cuanto a la determinación cuantitativa propiamente dicha de metal traza, entre las técnicas más utilizada está la espectroscopia atómica. Esta técnica de análisis relaciona la cantidad del analito presente en la muestra con las intensidades de las líneas espectrales de absorción o emisión atómica. Dichas líneas son ocasionadas por las transiciones electrónicas entre los diferentes estados de energía y es característica de cada átomo, propiedad que le confiere una alta especificidad y sensibilidad para el análisis químico ^[4]. A continuación describiremos en detalle algunos aspectos de interés relacionados con la determinación de metales traza.

2.2.1. Muestreo y almacenado de las muestras

Uno de los primeros inconvenientes que se pueden presentar en el análisis de metales traza son: un muestreo poco representativo, mal almacenamiento y posible contaminación, con la probabilidad de producir cambios químicos en la muestra. Para obtener información efectiva y veraz, es necesario mantener la concentración original después de realizar la preparación de la misma ^[5].

En el paso inicial, es decir en la recolección de la muestra, se debe garantizar que esta sea representativa de la población a muestrear. Por ejemplo, la heterogeneidad de la

misma es un factor importante a la hora de escoger el tamaño del lote a analizar, por lo tanto de deben tomar precauciones en tal sentido.

Por otra parte, al momento de la recolección se debe considerar la preservación de la misma. En caso de muestras líquidas se debe prever el efecto “pared”, que se puede presentar si no se escoge correctamente el material contenedor. Cuando esto ocurre, se produce la absorción o adsorción de la muestra en la pared del mismo. Generalmente se utilizan ácidos para la limpieza de estos materiales, por ejemplo, el ácido nítrico, pero si queda algún residuo de este en el contenedor puede ocurrir oxidación de las especies a analizar. Por esto se deben escoger ácidos no oxidantes, como el HCl ^[5].

En el almacenamiento de la muestra también se pueden presentar algunos problemas, la refrigeración generalmente es un procedimiento aceptable pero pueden ocasionarse ciertos cambios en las especies. Por ejemplo, se ha reportado que la Arsenobetaina (AsB) congelada a 4 °C por varios meses puede descomponerse principalmente a óxido trimetilarsinico. También el sellado del contenedor debe tomarse en cuenta debido a que, al exponer la muestra con el contacto del aire, se produce oxidación o puede ocurrir más fácilmente la volatilización ^[5].

La liofilización de la muestra es un de los métodos más comunes y efectivos para la preservación de la mismas, en especial para evitar los cambios en la composición química, cuando se desea llevar sobre una base seca.

En todo caso, si bien es cierto que la recolección, almacenamiento y preservación de las muestras siguen un procedimiento común, va a depender del tipo de muestra, su matriz y los analitos en particular que se desean determinar. Una vez, cumplida estas primeras etapas las siguientes corresponden al pre-tratamiento y posterior tratamiento de la misma (en caso que sea necesario).

2.2.2.- Tratamiento de las muestras

En la mayoría de los casos, para el análisis instrumental de un analito en una matriz determinada, se requiere que este se encuentre en la forma química requerida para el análisis. Esto conlleva no solo a la transformación del analito para alcanzar la forma química apropiada para su medición, sino que puede requerir la transferencia de algunos analitos a una matriz diferente. Esto último puede ser llevado a cabo por procesos de dilución, disolución, digestión, extracción, etc.

Previamente antes de someter la muestra a cualquier proceso de transformación se debe garantizar ciertas condiciones, lo cual llamamos pre-tratamiento. Por ejemplo, en el caso de muestras sólidas húmedas se deben secar, normalmente empleando una estufa a determinadas temperaturas. Sin embargo, en ciertos casos puede ocurrir pérdida de los metales volátiles o descomposición de los analitos de interés, en tales situaciones una de las metodologías más recomendada es la liofilización (secado en frío, con alto vacío). Otro ejemplo es el caso de muestras sólidas heterogéneas, las cuales deben ser pulverizadas a un mismo tamaño de partículas. Una vez garantizadas las condiciones idóneas de la muestra, se requiere llevar en el analito a disolución y para ello existen diversas metodologías:

Disolución. Este procedimiento relativamente sencillo, se puede llevar a cabo cuando es fácil disolver la muestra o al menos parte de ella donde se incluyen los analitos de interés. Las disoluciones deben ser homogéneas, por lo cual es de vital importancia encontrar el disolvente adecuado, basándonos en el viejo aforismo de que “lo semejante disuelve a lo semejante” ya que las interacciones entre el soluto y el disolvente deben ser de la misma naturaleza. Los procesos de disolución pueden ser acelerados agitando o calentando suavemente, permitiendo así que el proceso de solvatación se lleve a cabo completamente. En algunas ocasiones las disoluciones se puede facilitar utilizando ultrasonido, siendo esta una técnica de agitación mediante vibraciones sonoras superiores al nivel auditivo humano ^[6].

Digestión. Es una técnica que nos permite llevar la totalidad de la muestra a estado líquido, bajo condiciones vigorosas, poniendo en contacto la misma con ácidos, bases, agentes oxidantes, etc. Este procedimiento puede implicar algunas complicaciones, como la transformación del analito de interés en especies volátiles, lo cual conlleva a la pérdida y por ende el análisis genera un resultado por debajo del esperado. Para paliar esto, el procedimiento de digestión se puede llevar a cabo en recipientes cerrados. Los tratamientos de digestión varían dependiendo del tipo de muestra sobre la que se está trabajando, una variación de esta técnica es conocida como *calcinación*, la cual consiste en oxidar los compuestos orgánicos, quedando los compuestos inorgánicos en las cenizas resultantes, las cuales se pueden llevar a estado líquido mediante el método de disolución. La digestión también se puede llevar a cabo mediante el uso de radiación de microondas, permitiéndonos así tener mayor control de la temperatura y menor tiempo de tratamiento, además facilita la digestión en recipientes cerrados asegurándonos así un análisis exacto y preciso de metales traza y ultra-traza.

Existe un método aun mas drástico en caso de que la digestión no pueda llevarse completamente, este es conocido como *fusión*, el cual consiste en calentar la muestra con aproximadamente 10 a 20 veces su peso de un agente oxidante fuerte, ácido o base que se mantengan en estado sólido a temperatura ambiente (fundente). Al calentar se obtiene una disolución homogénea, la cual al dejar enfriar solidificara como un sólido homogéneo. Posteriormente este sólido se trata con un solvente adecuado para llevarlo a estado líquido. La fusión puede ser utilizada cuando no se puede llevar a cabo una digestión ácida o básica por diversas razones. Tiene el inconveniente de la posible pérdida de metales volátiles ^[6].

Extracción. La extracción propiamente dicha, puede definirse como un proceso de separación en el cual el o los analitos de interés se reparte o distribuye en dos fases diferentes, por efecto de las diferencias de interacción de orden físico-químico de los analitos con ambas fases ^[7]. Este proceso normalmente ocurre entre dos líquidos inmiscibles o entre un sólido y un líquido. Se puede llevar a cabo siempre y cuando se garantice una buena transferencia de los analitos de utilidad a la fase deseada. Nuestro interés particular está orientada a la extracción líquida-sólida, la cual se ha empleado para la separación selectiva de especies metálicas en matrices como suelos, sedimentos, plantas, alimentos, tejidos biológicos, etc ^[8]. A continuación haremos una revisión de los métodos instrumentales para la extracción líquido-sólido.

- **Extracción Soxhlet.** La técnica consiste en una extracción continua, donde el disolvente entra en contacto con la muestra de forma sucesiva. ^[33]. El disolvente hierve en un matraz y sus vapores ascienden por un tubo lateral, condensan en el refrigerante y el condensado gotea a través del sólido, retornando saturados de soluto al balón. Se emplea un equipo bastante sencillo y se usa tradicionalmente para el proceso de

extracción de materia orgánica, ya que es más eficiente que las técnicas tradicionales, sin embargo, se requieren largo tiempos de análisis, grandes cantidades de disolventes, uso de disolventes tóxicos, gran consumo de agua y electricidad. La difusividad del disolvente es lenta, intercambio de energía poco eficaz y extracción poco selectiva ^[9].

- **Extracción en fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction).** Se basa en la partición entre una fase líquida (matriz) y una fase sólida (adsorbente) y se logra pasando la muestra líquida a través de una columna o cartucho que contiene el adsorbente, el cual retiene al analito, y la recuperación subsecuente mediante la elución con el disolvente adecuado. El mecanismo de retención depende de la naturaleza del adsorbente, y puede incluir adsorción simple, procesos para quelatar el analito, intercambio iónico, etc. Los compuestos pueden ser selectivamente pre-concentrados mejorando los límites de detección ^[7].
- **Extracción con sonda de ultrasonido (UPS, Ultrasound probe sonication).** Este método frecuentemente es utilizado para remover partículas de un sustrato o para acelerar procesos de mezclado, sin embargo se ha empleado para acelerar los procesos de extracción. Se emplean baños ultrasónicos estándar operando a 40 KHz, muy fáciles de implementar y tienen una alta eficiencia. Aquí se induce la cavitación acústica, provocada por la formación de burbujas a partir de ondas sónicas en un líquido continuamente comprimido y descomprimido. Como resultado se obtienen temperaturas y presiones extremas generadas puntualmente en seno el líquido, y como consecuencia los

sólidos presentes en el disolvente, pueden ser extraídos dentro del medio líquido con mayor rapidez que en otros métodos clásicos ^[7].

- **Extracción con fluidos supercríticos (SFE, Supercritical Fluid Extraction).** Los fluidos en estado súper-crítico son un avance en la reducción de consumo y exposición a disolventes orgánicos. Una de las propiedades de estos fluidos es su baja viscosidad y bajos coeficientes de difusión, contribuyendo a la rápida transferencia de masa e interacciones de intercambio a nivel molecular. Sin embargo, los fluidos que poseen puntos críticos están limitados, siendo el CO₂ el fluido súper-crítico más utilizado para extracción. El medio en este tipo de extracción no es tóxico, no es inflamable, es relativamente de bajo costo y poseen una temperatura crítica baja ^[9]. Se requiere de instrumentación especial.
- **Extracción asistida por microondas (MAE, Microwave assisted extraction).** En este tipo de extracción la muestra sólida es calentada rápidamente en un solvente polar con energía de microondas. La instrumentación requiere de un generador de microondas de bajo poder enfocado, generalmente de 20-90 W (lo cual es cerca del 10 % de la capacidad máxima permitida por los sistemas comerciales). Se puede emplear para acelerar la extracción de compuestos organometálicos sin afectar los enlaces metal-carbono, mientras se trabaja a presión atmosférica. La extracción asistida por microondas reduce el tiempo necesario para la extracción a sólo minutos. Sin embargo, está afectado por interferencias potenciales debido a la presencia de energía de

microondas absorbida por materiales presentes en la matriz, como materiales ferrosos ^[7,10]

- **Extracción acelerada con solvente (ASE, Accelerated Solvent Extraction).** La extracción acelerada con solvente (también conocida como extracción con líquido presurizado) es una técnica que produce extractos más limpios que los dados por los procedimientos clásicos de extracción de compuestos de matrices complejas que consumen o requieren una mayor cantidad de tiempo para la extracción ^[31]. Para el desarrollo de esta técnica se utilizan disolventes tanto orgánicos como inorgánicos a presiones y temperaturas elevadas, lo que facilita las extracciones de muestras sólidas, haciéndolas rápidas y efectivas.

El proceso consiste en bombear el solvente a través de la celda donde se encuentra la muestra y se calienta por un tiempo preestablecido. La mayoría de los sistemas pueden programarse para aumentar o disminuir la temperatura del disolvente y la celda. Luego se utiliza gas comprimido para presionar el solvente a través del filtro hasta el vial colector ^[11, 12].

2.2.3.- Técnicas espectroscópicas para la determinación de metales traza

En cuanto a la determinación cuantitativa de metales traza, una de la técnica más utilizada es la espectroscopia atómica. De las diferentes formas de atomización de la espectroscopia atómica, la que emplean fuentes de atomización electrotérmica y las de fuentes de atomización con plasma inductivamente acoplado cumplen con la condición

de mayor sensibilidad. Esta última es más adecuada y practica para un análisis rutinario de metales traza y es de nuestro interés particular.

En la última década la fuente de atomización con plasma inductivamente acoplado y detección de masas (ICP MS, inductively coupled plasma mass spectrometry), es capaz de medir concentraciones en el orden de traza y ultra traza, minimizando pasos previos de preconcentración y manipulación de las muestras. La limitante es el alto costo tanto de los equipos como de los análisis realizados por el mismo (consumibles). En contra posición, el plasma inductivamente acoplado con detección óptica (ICP OES, inductively coupled plasma optical emission spectrometry), a pesar de no poseer límites de detección tan bajos como ICP MS, se presenta como una alternativa interesante. Posee una aceptable sensibilidad, un amplio rango dinámico lineal y costos operativos bastante inferiores ^[13].

ICP OES. El plasma se puede definir como la coexistencia en un espacio confinado de iones, electrones y especies neutras de un gas, normalmente inerte como argón o helio. El dispositivo por el cual se forma el plasma es denominado antorcha (Torch, del ingles, como comúnmente es nombrada), la cual consta de tres tubos concéntricos de cuarzo, rodeados de una espira de carga, alimentada por un generador de radiofrecuencias, con el objetivo de suministrar la energía necesaria para mantener el plasma, una vez encendido.

Para generar el plasma se hace circular un flujo de gas argón, alimentado tangencialmente en el espacio anular entre el tubo exterior e interior de la antorcha. Cuando se acciona la radiofrecuencia, la bobina induce un campo magnético oscilante

con líneas de fuerza orientadas axialmente al interior de los tubos de cuarzo. En ese momento, se produce una descarga eléctrica para generar electrones en el seno del gas, los cuales son arrastrados y acelerados por el campo magnético, circulando en el espacio anular del centro de la "torch". Los electrones chocan con las moléculas del gas produciendo la ionización del mismo, siguiendo una reacción en cadena y manteniendo el plasma encendido. El plasma producido de la manera descrita, es observado con una mancha débil en el centro de la base, a través del cual es introducido más gas argón conteniendo la muestra, tal y como se muestra en la figura 1. El plasma puede alcanzar hasta los 10.000 °K, pero las zonas de uso analítico tienen una temperatura entre los 5000 y 6000 °K [13-15]

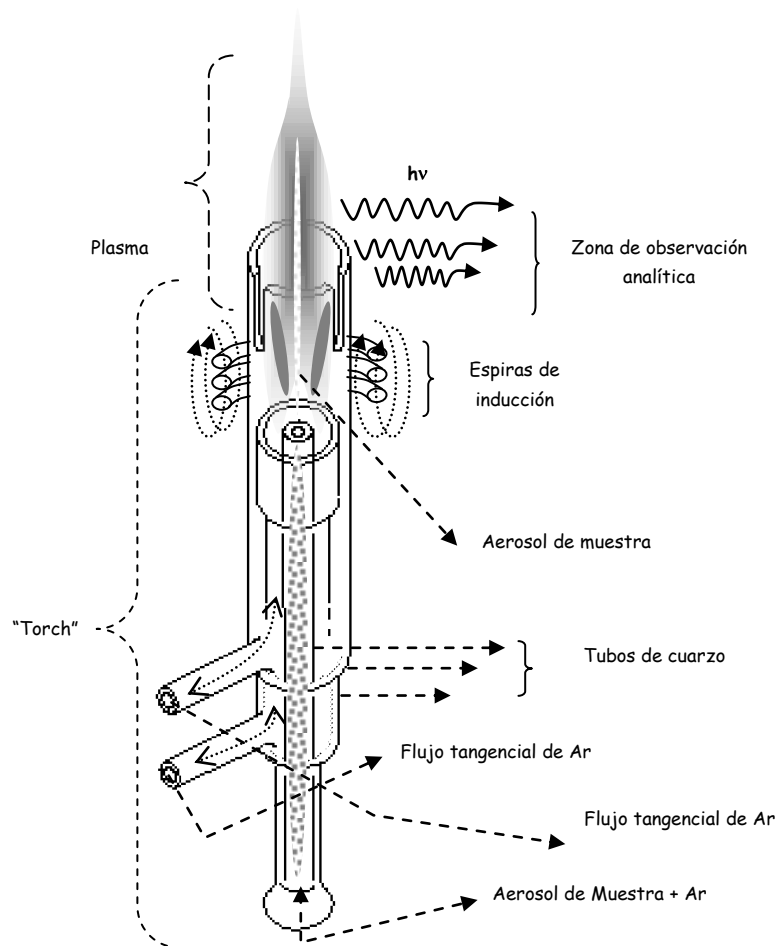


Figura 1. Esquema de la antorcha del plasma.

La muestra normalmente entra al plasma en forma de un nebulizado muy fino, seguidamente sufre una serie de cambios físicos, comenzando desde precalentamiento, desolvatación, pasando a estado gaseoso, fragmentación, rompimientos de enlaces y posteriormente conversión a estado atómico. En la mayoría de los casos, el proceso final es la transformación a ión excitado, debido principalmente a las colisiones con las diferentes especies de argón. Finalmente, la radiación emitida por los átomos o iones excitados en el plasma es enfocada por el sistema óptico, para ser dispersadas por los dispositivos de monocromación y posteriormente enfocada al módulo de detección. Los diseños comerciales modernos, permiten un alto grado de automatización. En la figura 2 se muestra un esquema completo del sistema de alimentación y medida del ICP OES.

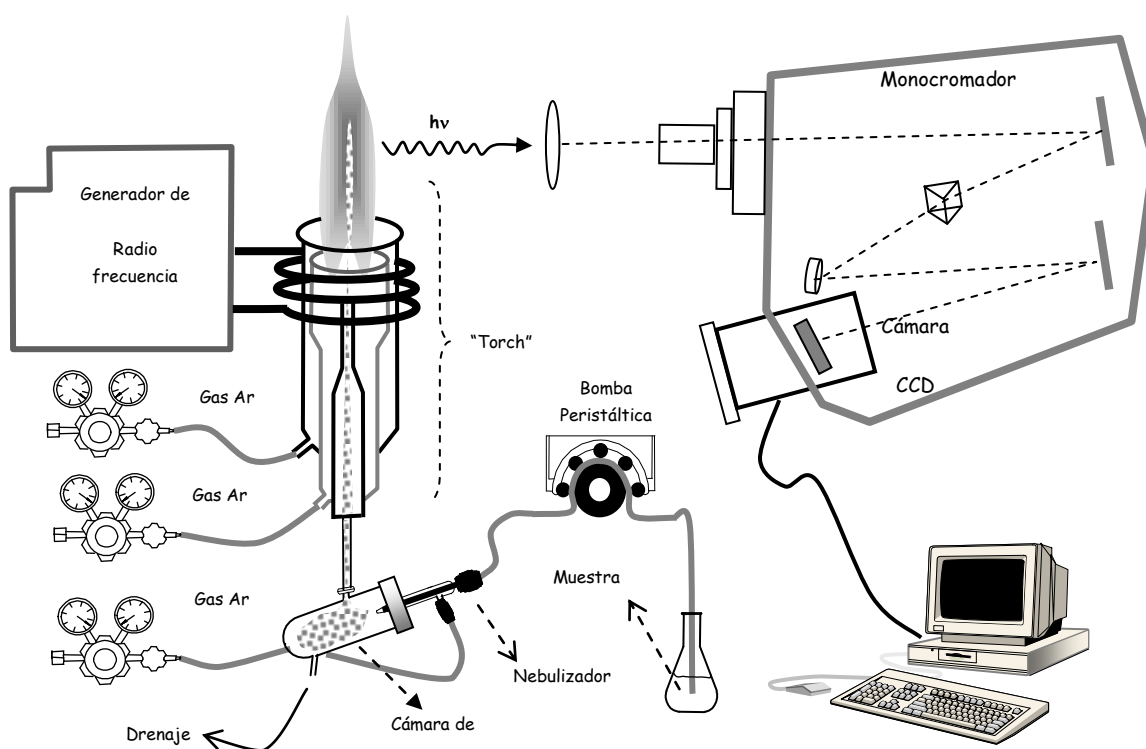


Figura 2. Sistema de alimentación y medida del ICP OES

2.2.4. Sistema de Introducción de muestras al ICP OES.

La introducción de la muestra al plasma es considerado uno de los pasos más críticos del análisis, ya que de ella depende mucho la sensibilidad y reproducibilidad del sistema ^[15]. Las muestras pueden ser inyectadas en cualquiera de sus estados físicos, bien sea gas, líquida y sólida, a continuación haremos una breve descripción de cada uno de ellos.

- **Introducción de muestras en estado gaseoso.** La introducción de muestras en forma gaseosa es el caso ideal, ya que ofrece numerosas ventajas ^[16]: alta eficiencia en el transporte, se eliminan o minimizan muchas interferencias no específicas, no requiere de pasos de desolvatación y evaporación, por lo tanto mayor eficiencia en el transporte de energía del plasma para los proceso de atomización e ionización. El problema fundamenta, es que la mayoría de las muestras para análisis de metales no se encuentran en estado gaseoso o son muy difíciles de volatilizar, por lo tanto, el análisis por esta vía está limitado. Entre los dispositivos de introducción de muestras en forma gaseosa tenemos la generación de vapor químico, del cual hablaremos en detalle en la sección 2.5.

- **Introducción de muestras en estado líquido.** La alimentación de muestras en forma líquida es la más empleada para medir en el ICP OES, y normalmente es introducida al plasma en forma de un aerosol muy fino, producido por unos dispositivos denominados nebulizadores. Posteriormente el aerosol de muestra pasa inmediatamente a una cámara para la selección de las gotas finas, seguidamente entra a tan alta velocidad al plasma que lo penetra físicamente, dejando un orificio a través de este (en la figura 1 es mostrado como una banda moteada sobre el plasma). La introducción de muestra líquida en forma de nebulizado es el sistema más reportado, y existen muchos mecanismos de producirlo, en la sección 2.4 abundaremos más, sobre estos detalles. Posee ciertas virtudes ^[17], como: manipulación sencilla de la muestra, permite realizar diluciones simples, estabilidad y reproducibilidad de la señal y en cuanto a sus limitaciones, se reporta baja eficiencia de transporte y dependencia de la matriz.

- **Introducción de muestras en estado sólido.** Por otra parte, también existe la posibilidad de introducir las muestras en estado sólido, ofreciendo las siguientes ventajas: la muestra normalmente es analizada en su forma natural, al ser poco tratada, la contaminación con reactivos es mínima, los tiempos de análisis se ven reducidos, emplea pequeñas cantidades de muestra, etc. En contraposición, es altamente dependiente de las características físicas de la muestra, la heterogeneidad de la muestra resulta ser muy importante, ya que al consumir pequeñas cantidades de la misma es fuertemente dependiente de este factor, a su vez, esto acarrea problemas de reproducibilidad ^[18]. Entre los métodos de introducción de muestras vía sólida podemos mencionar, ablación con arco, chispa o láser y la nebulización en suspensión coloidal ^[19].

Enfocaremos nuestra atención, a los sistemas de introducción de muestras en forma líquida y gaseosa, ya que son los que empleamos en el presente trabajo.

2.2.4.1. Sistemas de introducción de muestras en estado líquido en el ICP OES

Como mencionamos anteriormente, el empleo de muestras en estado líquido es la manera más común y práctica de introducción al plasma. Normalmente la muestra líquida entra al plasma en forma de gotitas muy pequeñas dispersas en un gas, denominado aerosol o nebulizado.

Un nebulizador eficiente debe cumplir ciertas características ^[20], entre las que podemos mencionar: el nebulizado debe tener alta uniformidad de gotas, en especial lo mas pequeñas posibles, debe poseer una velocidad uniforme y compacta (baja dispersión),

alta eficiencia en el transporte del analito, no debe perturbar considerablemente el plasma, debe nebulizar disoluciones con altas cantidades de sólidos disueltos, debe ser robusto, de fácil manipulación y económico.

Tratando de cumplir con la mayoría de los requisitos anteriores, se han probado varios mecanismos de nebulización, entre los más importantes podemos citar: la nebulización neumática, nebulización ultrasónica, termospray, electrospray y nebulización hidráulica. De los mecanismos de nebulización mencionados anteriormente, la nebulización neumática es la más empleada, esto se debe a lo sencillo, rápido, reproducible, económico y adaptable de los dispositivos empleados para tal fin, por lo tanto haremos una descripción de dicho mecanismo de nebulización.

Nebulización neumática. Durante la nebulización neumática la energía cinética del flujo de líquido y gas nebulizante es aprovechada para producir un aerosol muy fino ^[45]. Consiste en hacer pasar la disolución de muestra a través de un capilar bastante estrecho, la parte final de este se hace combinar con gas a un flujo relativamente alto, como consecuencia de dicha conjunción se logra la dispersión del líquido en gotas muy pequeñas llamadas aerosol primario.

Los nebulizadores neumáticos producen gotas de tamaños muy diversos, las gotas más grandes son poco aprovechadas y van al desecho, no así para las gotas más pequeñas donde el proceso de evaporación de solvente y volatilización de soluto es casi instantáneo. En la nebulización neumática la distribución del tamaño de las gotas es función de las propiedades físicas de la disolución, como viscosidad, densidad y tensión

superficial, así como, de los parámetros operacionales del nebulizador mismo, como caudal del gas, flujo de líquido de muestra, etc. ^[20].

A pesar que la nebulización neumática es la más empleada, debido a lo práctico, sencillo y reproducible, presenta ciertas desventajas. Los dispositivos para producirla consumen cantidades relativamente grandes de muestra, entre 0,5 a 2,0 mL/min, estas elevadas tasas de aspiración impiden el análisis de muestras en cantidades limitadas. Por otra parte, tienen problemas para nebulizar muestras con contenidos elevados de sólidos disueltos y presenta baja eficiencia de nebulización. Es reconocido que el sistema de alimentación de muestras con nebulización neumática es una de las áreas más críticas del instrumento y es considerada el talón de Aquiles de la misma, se estima que apenas menos del 5 % de la cantidad total de muestra inyectada, es la que es aprovechada efectivamente por el plasma ^[14].

Los tipos de nebulizadores neumáticos comúnmente empleados en las configuraciones de los instrumentos de ICP OES son: el nebulizador flujo cruzado y el nebulizador concéntrico. La elevada popularidad de estos nebulizadores se debe a que son simples, estables y fáciles de operar.

En el nebulizador tipo concéntrico, la disolución de muestra pasa a través de un capilar rodeado por una corriente de gas a alta velocidad, produciendo la disrupción del líquido en un aerosol. Presenta una buena sensibilidad y estabilidad, pero es susceptible a bloquearse ^[21], en la figura 3 se muestra un diagrama de dicho nebulizador. Son construidos en diferentes materiales, pero el más común es el vidrio. Se puede conseguir en varias configuraciones de acuerdo al extremo del capilar (nozzle), en función del flujo de gas empleado, el más comercial es el tipo Meinhard.

Por otra parte, el nebulizador tipo flujo cruzado, fue el primer nebulizador utilizado con los fines de alimentación de los equipos de ICP OES. Consiste de un capilar que transporta el líquido en ángulo de 90 grados con respecto a un segundo capilar, que presenta una corriente de gas a alta velocidad, la intercepción de ambos fluidos produce el aerosol. Los dos capilares se encuentran ajustados en un cuerpo de politetrafluoroetileno (PTFE), y la posición relativa de ambos puede ajustarse para obtener una mayor eficiencia en el nebulizado (figura 4). Son menos eficientes que los concéntricos, pero también es menos susceptible a bloquearse y es ideal para disoluciones con alta carga de sólidos disueltos ^[22].

Otros tipos de nebulizadores comunes son el Babington y nebulizador tipo surco en forma de V (V groove, en inglés), ambos pueden ser considerados como nebulizadores tipo flujo cruzado. En el Babington ^[23] el líquido es bombeado sobre la parte externa de una esfera hueca, y una vez ubicado sobre la superficie de la misma, se forma una película muy fina. Un gas es forzado a pasar a través de una rendija desde la parte interna de la esfera, impactando sobre la superficie de la misma, produciendo el aerosol. En el V groove ^[24] la muestra emerge de un capilar y converge con el gas a alta velocidad, la disposición de estos orificios está en forma de V. Son empleados para disoluciones con alto contenido salino y conveniente para disoluciones con sólidos suspendidos, donde los nebulizadores anteriores fallan. También, se reportan otros tipos de nebulizadores, pero son empleados con menos frecuencia, por ejemplo: el Conespray, el Burgener y el Hildebrand, entre otros ^[25].

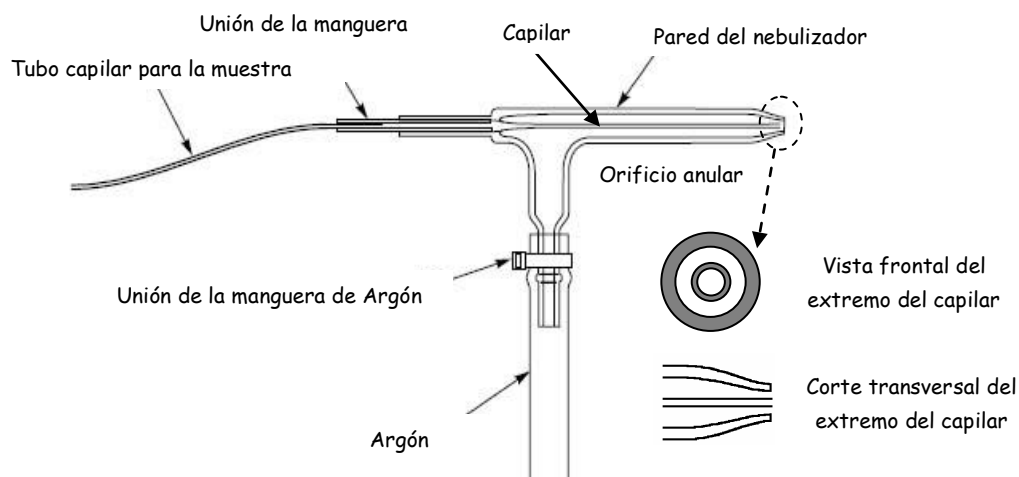


Figura 3. Nebulizador tipo concéntrico, mostrando una vista frontal y transversal del extremo del capilar

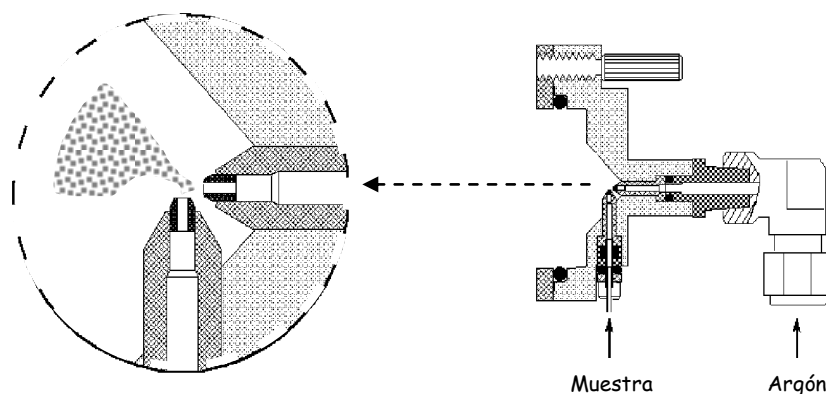


Figura 4. Corte transversal de un nebulizador tipo flujo cruzado, mostrando una ampliación de la zona central.

Un componente importante del sistema de introducción de muestras vía nebulización neumática es la cámara de nebulización, la cual cumple las siguientes funciones: modificar el aerosol primario para uno más eficiente, seleccionar el nebulizado más fino y disminuir la carga del solvente al plasma (aerosol terciario), reducir la turbulencia asociada al proceso de nebulización y amortiguar el pulso generado por la bomba peristáltica ^[27]. Aunque se han diseñado varios tipos de cámaras, existen dos modelos clásicos, la cámara de doble paso o tipo Scott y la cámara ciclónica.

En la cámara de doble paso la selectividad se debe a que el aerosol es obligado a seguir un camino de doble pared, para producir mayor condensación de las gotas más indeseadas por el impacto con las paredes. Es bastante selectiva, prescinde de gotas de diámetros mayores a 20 μm . Se consiguen de diferentes dimensiones, formas y materiales, siendo las de vidrio Pirex y las poliméricas las más comunes. Es considerada muy robusta e ideal para el análisis rutinario.

En cuanto a la cámara ciclónica, el aerosol es forzado a circular por fuerzas centrifugas, las gotas son seleccionadas en el vórtice producido por el flujo tangencial de gas argón. Es menos selectiva que la de doble paso y transporta mayor carga al plasma, poseen un volumen interno mucho menor y por consiguiente una trayectoria más corta ^[28].

2.2.4.2. Sistema de introducción de muestras al ICP OES en forma de especies metálicas volátiles

Como es de común conocimiento, una gran cantidad de metales son capaces de producir especies volátiles o semi-volátiles. La formación de este tipo de compuestos a partir de una especie “condensada” puede ocurrir por vía química, física e inclusive

biológica ^[29-35]. Esta particularidad, concerniente a la formación de especies metálicas volátiles, ha sido aprovechada por las diversas técnicas del análisis químico para mejorar la eficiencia en la medida, tal es el caso, entre otras, de la espectroscopía atómica. Tanto es así, que una de las más amplias aplicaciones, es su empleo como sistema de introducción de muestras, ya que ofrece las siguientes ventajas ^[29]:

- *Separación del analito de interés de la muestra, disminución del efecto matriz, menor interferencia.*
- *Disminución del proceso de tratamiento de muestras, decrece la posibilidad de contaminación.*
- *Mejor eficiencia de atomización, mejorando los límites de detección*
- *Permite pre-concentración, otra posibilidad de aumentar la sensibilidad.*

Esta metodología, se ha afianzado tanto en el ambiente del análisis espectroscópico que es conocida con el nombre de generación de vapor químico (VG, vapor generation).

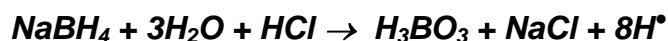
El campo de la generación de volátiles para el análisis elemental es amplio y en permanente expansión, motivado por los continuos descubrimientos de nuevas especies volátiles, métodos para su generación y formas de detección, ejemplo de ello es la generación de hidruros, la alquilación de metales, la formación de haluros y la formación de quelatos volátiles, los cuales han expandido la capacidad análisis de metales traza ^[30,31]: *Alquilación, Generación de haluros, Quelatos volátiles y Generación de hidruros volátiles*. Este último es el más empleado y abundaremos más en detalle a continuación

Generación de hidruros volátiles. La técnica de generación de hidruros volátiles (HG, hydride generation) es el método más antiguamente empleado para la formación de vapor de metales traza. En 1830, James Marsh desarrolló un método basado en la generación química del hidruro de arsénico en varios tipos de muestras, principalmente forenses (reacción de Marsh). A principios de 1970, la generación de hidruro ganó rápidamente aceptación entre la comunidad de químicos analíticos, y hasta ahora, es una de las técnicas más frecuentemente utilizada para la introducción de muestras gaseosas en los equipos de espectroscopía atómica ^[36, 37]

HG se fundamenta en la formación de un hidruro volátil bajo un ambiente fuertemente reductor, para posteriormente ser trasladado por un gas portador a una zona de calentamiento (celda de cuarzo, llama, plasma, etc.), luego el hidruro al ser calentado a una temperatura óptima, produce la atomización e ionización del analito, según sea el caso. Posteriormente se miden los fenómenos de absorción o emisión respectivos. Una variante la constituye la técnica de vapor frío, que aprovecha la facultad del mercurio entre otros elementos, para producir vapores monoatómicos a temperatura ambiente.

Las formas de generar el hidruro volátil son variadas, entre ellas podemos destacar: Reducción con un metal en medio ácido, Generación electroquímica y Reducción con borohidruro de sodio. En la actualidad este último es el sistema más universalmente utilizado para la formación de hidruros volátiles. Este sistema de reacción, puede reducir As, Bi, Ge, Pb, Sb, Se, Sn, Te, Cd y en menor extensión al In y Tl a sus hidruros volátiles ^[38].

La reacción de la formación de hidruros vía reducción con tetraborato de sodio o más comúnmente conocido como borohidruro de sodio (NaBH_4), en un principio se explicó a través de la formación de hidrógeno nascente, por la reacción del borohidruro en medio ácido ^[39]:



Donde M es el metal formador del hidruro, m y n pueden ser iguales o no y corresponde al estado de oxidación del analito en la muestra. Este mecanismo no es completamente aceptado y se han sugerido otras vías, en las cuales se propone la formación de especies volátiles intermediarias. El mecanismo más aceptado se fundamenta en la formación de complejos volátiles de metal borano ^[40], ello ocurre a través de diversos intermediarios de hidroboranos ($\text{XBH}_n\text{Y}_{3-n}$), donde $n = 1, 2, 3$, y las especies X e Y son ligandos neutras o aniónicos, donadoras de electrones. En la figura 5 se muestra un esquema de las diferentes especies intermediarias que se forman en la hidrólisis tanto ácida como básica del borohidruro, las cuales son potenciales formadores de intermediarios volátiles con el metal. Varios de estos intermediarios se han confirmado experimentalmente y este mecanismo está en desacuerdo con el relativo a formación de hidrógeno nascente, que fue el propuesto originalmente ^[41].

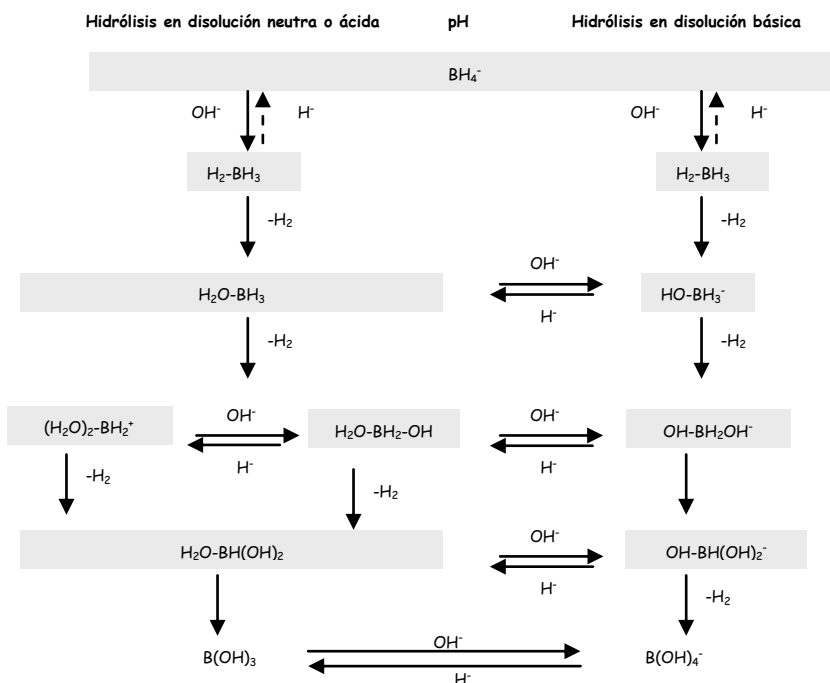


Figura 5. Esquema de formación de los diferentes derivados volátiles en la reacción de hidrólisis en disolución acuosa del THB.

Como desventajas podríamos decir, que el reactivo borohidruro de sodio es capaz de introducir impurezas, por lo tanto debe estar suficientemente puro, además es costoso, en disoluciones acuosas es inestable y por lo tanto debe ser preparado poco antes a ser utilizado. Para algunos metales es altamente dependiente del estado de oxidación y en función de la complejidad de la matriz, es necesario el pre-tratamiento de la muestra, antes de la formación del hidruro. Metales de transición en alta concentración pueden suprimir severamente la formación y liberación del hidruro, no obstante, este efecto puede ser disminuido añadiendo agentes enmascarantes, etc [21-28, 42, 43].

- ***HG como sistema de introducción en el ICP OES***

La combinación de la técnica de generación de hidruros con la espectroscopía de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (HG - ICP OES) es conocida desde hace varios años como una herramienta útil para la determinación de elementos metálicos y en distintos tipos de matrices ^[36,26]. En la actualidad, HG acoplado al ICP OES es relativamente común en los laboratorios de química analítica y se ha aplicado con especial interés a aquellos elementos que a niveles muy bajos de concentración son tóxicos al organismo humano, como es el caso de As, Te, Se, Sb, Hg, entre otros.

Una de las principales ventajas del uso de la generación de hidruros para la introducción de muestra al ICP OES, es el incremento en la sensibilidad con respecto a los modos convencionales de introducción de muestras líquidas, debido fundamentalmente a la alta eficiencia de transporte del hidruro. Por otra parte, se logra una mayor eficiencia de atomización y excitación, ya que se evitan los problemas de consumo de energía en la desolvatación y vaporización de las fases asociadas a las muestras líquidas.

En cuanto a las desventajas de HG-ICP OES podemos citar ^[39,44]:

- La producción de gases de H_2 y H_2O , los cuales pueden causar inestabilidad e incluso extinción del plasma.
- Las condiciones óptimas de generación del hidruro no son las mismas para todos los elementos y su determinación simultánea a partir de una condición de compromiso, afecta la calidad de la detección.

- A pesar que en la generación de hidruro, la separación de la matriz es altamente eficiente, aun existen interferencias espectrales, pero en un menor grado que en la nebulización convencional.
- Pueden ocurrir interferencias en fase gaseosa, durante el transporte y la atomización, afectando fuertemente la eficiencia de la medida.
- Desde el punto de vista instrumental las condiciones en la determinación pueden ser afectadas por el diseño del sistema de generación de hidruro, la concentración de las disoluciones empleadas (ácidos y borohidruro), así como variaciones en el flujo de transporte del hidruro.

Los enlaces de los dispositivos HG - ICP OES pueden llevarse a cabo de diferentes formas y a continuación haremos una breve descripción de cada uno de estos sistemas:

- **Por carga.** También denominados métodos discretos o de “Bach”, consisten en añadir un volumen conocido de muestra en una celda de reacción y posteriormente adicionar el o los agentes precursores de metal volátil. Es posible incluir etapas intermedias como dilución, adición de reactivos, sistemas de agitación y calentamiento. Subsecuentemente el volátil es transportado por un gas al sistema de atomización (figura 6A).

De esta manera se genera una señal transitoria, la cual puede ser integrada como área o altura de pico. Estos sistemas son atractivos, ya que son relativamente fáciles de armar a nivel de laboratorio, pero poco prácticos para automatizar.

- **Por flujo continuo.** Mediante este sistema la muestra y los reactivos formadores del volátil son impulsados por agentes mecánicos, como bombas peristálticas, etc, y mezcladas en una celda de reacción. Una vez formado el compuesto volátil, es transportado a la celda de atomización al igual que el sistema por carga, pero de esta forma la señal que se genera es de manera continua, (Figura 6B).
- **Por inyección de flujo.** Este sistema es muy similar al anterior (flujo continuo), pero se adiciona un bucle o lazo de inyección, el cual suministra un volumen conocido de muestra. El beneficio es la automatización, el uso de pequeños volúmenes de muestra y la disminución del consumo de reactivos. La señal obtenida es de forma transitoria, (Figura 6C).
- **Sistemas de inyección HG ICP-OE, con inyección directa al nebulizador.** Los acoplamientos de HG ICP-OES son cada vez más sofisticados, con marcada tendencia a la posibilidad de automatización. Estos nuevos desarrollos se basan en la combinación o modificación de los nebulizadores convencionales, adaptándoles entradas adicionales para los respectivos reactivos, es conocido con su nombre en inglés DHGN, (direct hydride generation nebulizer).

Los sistemas DHGN, consisten en integrar tanto la muestra como los diferentes elementos formadores del hidruro volátil, dentro de una cámara de nebulización. La reacción ocurre directamente en la cámara,

al entrar en contacto las gotas de aerosol de muestra y de reactantes. La principal ventaja de este sistema es que se puede medir simultáneamente elementos formadores y no formadores de volátiles, y por otra parte, es posible disminuir las interferencias de los diferentes metales de transición en el proceso de formación del hidruro volátil, mediante la disminución de los tiempos de contacto del reductor, aprovechando el hecho, que los elementos formadores de hidruros reaccionan mucho más rápido que sus interferentes.

Para desarrollar estos dispositivos, normalmente se parte de nebulizadores convencionales, a los cuales se le realizan modificaciones para lograr comunicar los diferentes elementos operativos, de allí que estos sistemas de introducción de muestra también son conocidos con el nombre de nebulización en tándem (señala elementos de un mismo tipo que se posicionan en serie, es decir uno atrás de otro, y que cumplen la misma función en un mecanismo). Normalmente se refiere a la combinación de dos elementos, bien sea operando en serie o paralelo, siendo este último el más empleado.

Los arreglos pueden comprender, una cámara de nebulización con dos nebulizadores y dos cámaras con sus respectivos nebulizadores. Los arreglos más comunes, se refieren a una cámara de nebulización modificada con dos nebulizadores y el cual se reseña normalmente como sistema de nebulización dual^[46].

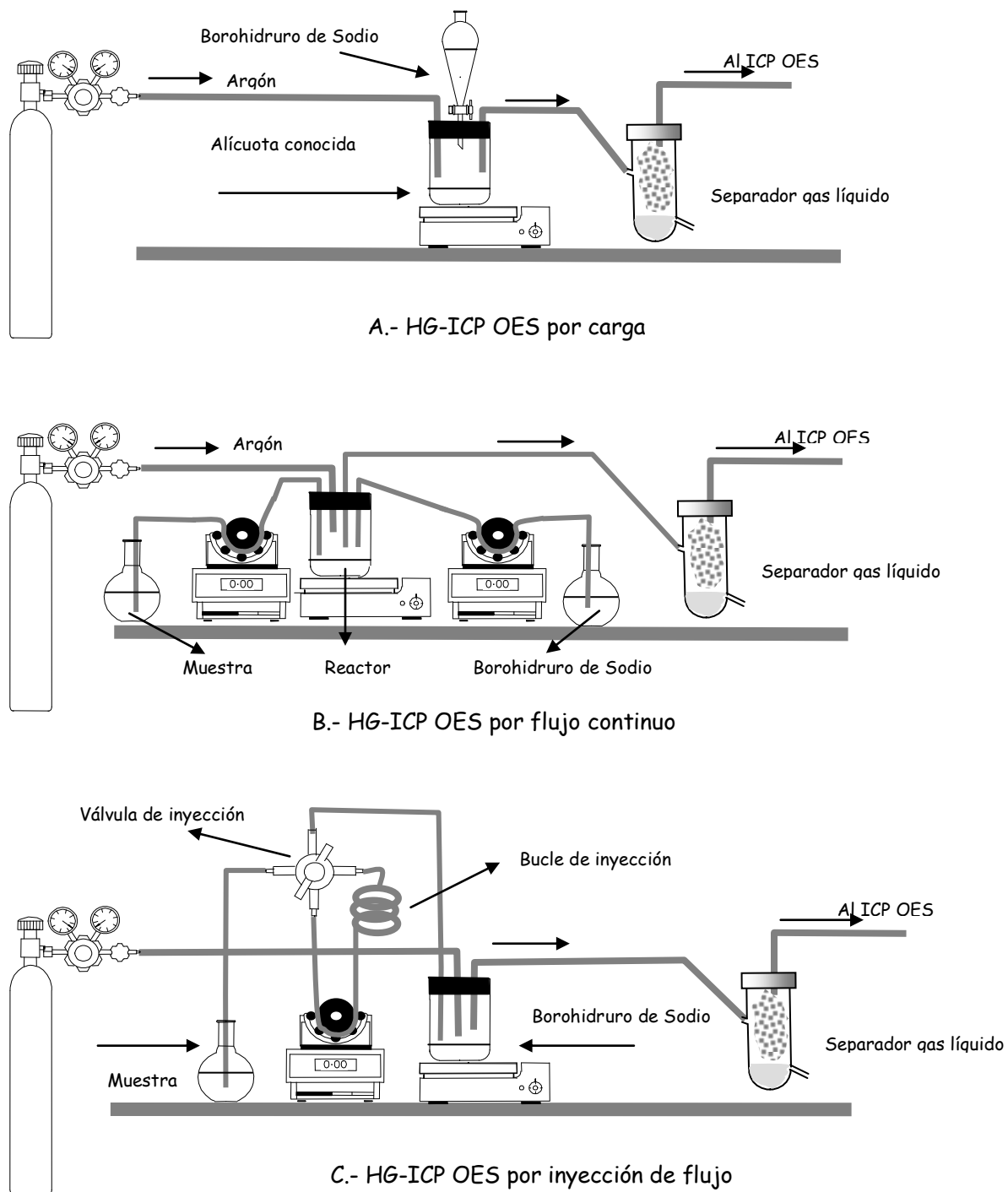


Figura 6. Sistemas de introducción de vapor químico: A.- Por carga (señal transitoria). B.- Flujo continuo (señal continua) y C.- Inyección de flujo (señal transitoria).

2.3.- El Arsénico y su distribución en el ambiente

El arsénico es un elemento químico que pertenece al grupo cinco de la tabla periódica en la cual está representado por el símbolo As, su número atómico es 33, posee estados de oxidación -3, +3 y +5 y tiene un peso molecular de 74,922 g /mol. El arsénico metálico es encontrado con poca frecuencia, el estado de oxidación As (-3) solo se encuentra en medios altamente reductores, los iones As (+5) prevalecen en condiciones oxidativas, mientras que los iones As (+3) se encuentran bajo condiciones anaeróbicas. Este elemento es considerado un metaloide ya que posee características metálicas y no metálicas ^[47,48].

Nombre de las	Abreviación	Formula Quimica	pKa
Arsenito (ácido)	As(III)	As(OH) ₃	9,28
Arsenato (ácido)	As(IV)	AsO(OH) ₃	2,3 ; 6,8 ;
Acido metilarsónico	MMA	CH ₃ AsO(OH) ₂	2,6 ; 8,2
Acido dimetilarsínico	DMA	(CH ₃) ₂ AsO(OH)	6,3
Arsenobetaina	AsB	(CH ₃)As ⁺	2,18
Arsenocolina	AsC	(CH ₃)As ⁺	-----

Tabla 1. Diferentes especies de arsénico presentes en el medio ambiente

Existen tres alótropos o modificaciones polimórficas del arsénico. La forma a, cúbica de color amarillo, que se obtiene por condensación del vapor a muy bajas temperaturas. La b, polimórfica negra, la cual es isoestructural con el fósforo negro. Ambas revierten a la forma más estable, la I, gris o metálica, del arsénico romboédrico, al calentarlas o por exposición a la luz. En su forma metálica, es un conductor térmico y eléctrico moderado, quebradizo, fácil de romper y de baja ductibilidad ^[47].

El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre, representando el 5×10^{-4} % de esta. Se le encuentra naturalmente como mineral de cobalto, aunque por lo general está en la superficie de las rocas combinado con azufre o metales como Mn, Fe, Co, Ni, Ag o Sn. El principal mineral del arsénico es el FeAsS (arsenopirita, pila); otros arseniuros metálicos son los minerales FeAs₂ (löllingita), NiAs (nicolita), CoAsS (cobalto brillante), NiAsS (gersdorffita) y CoAs₂ (esmalta). Los arseniatos y tioarseniatos naturales son comunes y la mayor parte de los minerales de sulfuro contienen arsénico. La As₄S₄ (realgarita) y As₄S₆ (oropimente) son los minerales más importantes que contienen azufre. El óxido, la arsenolita (As₄O₆), se encuentra como producto de la alteración debido a los agentes atmosféricos de otros minerales de arsénico, y también se recupera de los polvos colectados de los conductos durante la extracción de Ni, Cu y Sn. Este también se obtiene al calcinar los arseniuros de Fe, Co o Ni con aire u oxígeno. El elemento puede obtenerse por calcinación de FeAsS o FeAs₂ en ausencia de aire o por reducción de As₄O₆ con carbonato, cuando se sublima (As₄)^[47].

La ubicación del arsénico en el medio ambiente se origina por enriquecimiento natural y se intensifica por actividades antropogénicas. Las fuentes más comunes de arsénico en el medio ambiente natural son las rocas volcánicas, específicamente sus productos de la meteorización y cenizas, rocas marinas sedimentarias, yacimientos hidrotermales y aguas geotermales, y los combustibles fósiles, incluidos el carbón y el petróleo^[48].

El promedio de concentración de arsénico en la corteza terrestre es de unos 2-5 mg / kg (USDHHS, 2000). El promedio global de concentración de arsénico en suelos no contaminados es 5-6 mg/kg. Sin embargo estos valores varían dependiendo de la

ubicación geográfica. La actividad volcánica y los procesos de erosión son la fuente principal de arsénico en suelos ^[48]. Su concentración varía ampliamente, encontrándose en un rango de aproximadamente 1-40 partes por millón (ppm) con una media de 5 ppm. Sin embargo, existen suelos que se encuentren cercanos a depósitos geológicos ricos en arsénico, lugares de minería y fundición, o áreas agrícolas donde se halla aplicado pesticidas con arsénico pueden contener niveles elevados de este elemento. En superficies naturales y aguas subterráneas la concentración de arsénico es, generalmente de 1 ppb, pero puede exceder los 1000 ppb en zonas mineras o en lugares donde los niveles de arsénico sean elevados. Las aguas subterráneas presentan mayor concentración de arsénico que las superficiales.

En ciertas zonas del mundo, el agua destinada para la ingestión humana puede tener más arsénico de lo habitual, como el caso de Argentina (Formosa), Chile y México ^[29]. La presencia de arsénico en aguas naturales también depende de la ubicación geológica, hidrogeología, características geoquímicas y los cambios climáticos así como las actividades realizadas por la población. Las fuentes naturales de arsénico en el agua están atribuidas a la gran cantidad de procesos geoquímicos, incluyendo la oxidación del arsénico que contiene sulfuros, la desorción de arsénico de (hidro) óxidos (e.g., hierro, aluminio y óxido de manganeso), reducción de disoluciones de arsénico con (hidro) óxidos de hierro, liberación de arsénico del agua geotérmica, y la concentración por evaporación, así como la lixiviación de arsénico de sulfuros de carbonatos ^[48].

El arsénico es un elemento traza potencialmente toxico que se encuentra en rocas, algas, suelos, aguas naturales y aire. Por otro lado altas concentraciones de arsénico pueden encontrarse en drenajes de minas, cenizas de carbón, desechos de fundición, y suelos tratados con pesticidas de arsénico [32].

Los niveles de arsénico en el aire rondan entre 1-2000 ng de arsénico por m³ de aire, dependiendo de la localización, condiciones climáticas y el nivel de actividad industrial en un área particular. Así, las áreas urbanas tienen un nivel de arsénico en el aire de 20-30 ng/m³. En alimentos marinos, por ejemplo en peces, su concentración es de 0,6-4,5 µg/g, y 0,04-91 µg/g en crustáceos. En el tabaco se encuentra a una concentración bastante elevada de 13 ppm, lo cual se debe al tratamiento de las hojas de tabaco al momento de su manufacturación [47,48].

El arsénico combinado con oxígeno, cloro y azufre es llamado arsénico inorgánico, y en combinación con carbono e hidrógeno es llamado arsénico orgánico. Las formas orgánicas de este elemento son usualmente menos tóxicas que sus formas inorgánicas. La mayoría de los compuestos orgánicos e inorgánicos de arsénico son blancos o polvos incoloros que no se evaporan, no tienen olor y no presentan un sabor particular [5]. En la figura 7 se pueden observar algunas fuentes de arsénico y el ciclo por el cual atraviesan al interactuar con el medio ambiente [7].

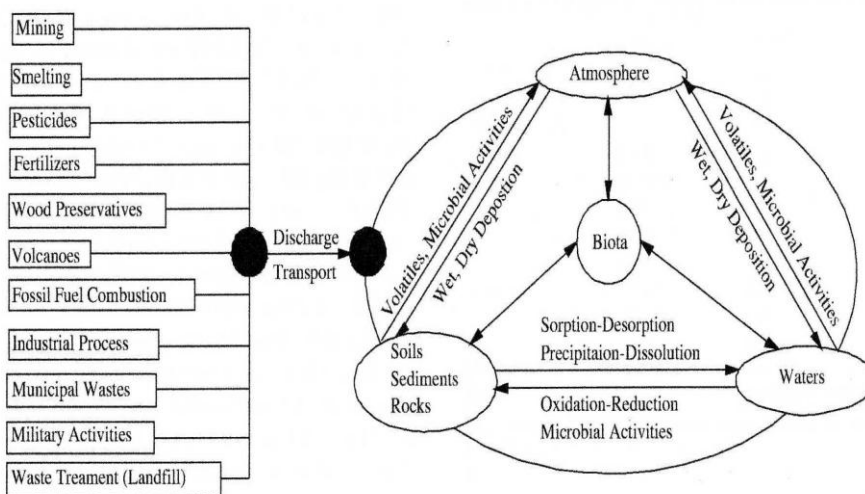


Figura 7. Diagrama simplificado del ciclo del arsénico.

2.3.1- Principales usos del Arsénico

El arsénico elemental no es muy usado sin embargo, es uno de los escasos minerales disponibles con un 99.9999 % de pureza. En el estado sólido se ha empleado ampliamente como material para los láseres Ga-As y como agente acelerador en la manufactura de varios dispositivos. El óxido de arsénico se utiliza en la elaboración de vidrio. Los sulfuros de arsénico se usan como pigmentos y en juegos pirotécnicos. También es utilizado en la fabricación de perdigones, en la industria eléctrica donde el llamado arsénico gris se emplea como material conductor. Pequeñas cantidades de arsénico metálico son añadidas a otros metales para formar aleaciones con propiedades mejoradas. El mayor uso del arsénico en aleaciones es en baterías ácidas de plomo para automóviles. Otro uso importante de los compuestos de arsénico es como semiconductor y para diodos emisores de luz (LED, siglas en inglés). También es utilizado en la industria agrícola en el empleo de esterilizantes, herbicidas, fungicidas e

insecticidas. Además es utilizado como preservativo de alimentos en la industria vinícola ^[5,33].

Actualmente aproximadamente el 90 % de todo el arsénico producido es utilizado como preservativo de madera para hacerla resistente al deterioro. En el pasado el arsénico era principalmente usado como pesticida, particularmente en campos de algodón y en huertos. Los compuestos inorgánicos de arsénicos ya no son utilizados en la agricultura, pero los orgánicos si se siguen usando como pesticidas, principalmente para el algodón ^[5].

Se ha generado un gran interés en el estudio del arsénico debido a que, además de su presencia en el ambiente, algunos compuestos que contienen arsénico son utilizados como aditivos en comida de animales. Esto representa un riesgo para el hombre debido a la posible acumulación de este elemento en los alimentos. Por ejemplo, el ácido 4-hidroxi-3-nitrofenilarsonico es utilizado como promotor de crecimiento en alimento para pollos ^[5].

El arsénico ha sido utilizado históricamente con fines terapéuticos prácticamente abandonados por la medicina occidental aunque recientemente se ha renovado el interés por su uso como demuestra el caso del trióxido de arsénico para el tratamiento de pacientes con leucemia promielocítica aguda ^[34].

2.3.2.- Toxicidad del Arsénico

Los humanos pueden estar expuestos al arsénico a través de la comida, agua y aire. La exposición puede también ocurrir a través del contacto de la piel con suelo o agua que contengan este metal ^[47]. El arsénico ha sido reconocido como tóxico para el ser humano desde tiempos ancestrales, sabiéndose que grandes dosis orales de este elemento podían ser fatales. La mayoría de los casos de intoxicación por arsénico se deben a exposición al arsénico inorgánico ^[5].

Hoy en día es bien sabido que la toxicidad del arsénico depende en gran medida de su especiación, por ejemplo el arsenito es 10 veces mas toxico que el Arsenio y 70 veces mas toxico que las especies metiladas. ^[49]

La toxicidad y cancerogenicidad depende de su especie, en el agua potable se encuentra en la forma de compuestos inorgánicos de arsénico (iAs), mientras que en los mariscos contienen altos niveles de arsénico orgánico, como la arseno betaina (AsBe), arsenocholina y arsenoazucars. ^[50] El arsénico inorgánico es metilado a nivel celular por los mamíferos para obtener ácido monometilarsónico (MMA), ácido dimetilarsónico (DMA) y óxido de trimetilarsénico (TMAO) ^[5]. El AsB generalmente no es biotransformado o dimetilado y la AsC tampoco es dimetilada, pero si es extensivamente metabolizada a AsB. Los arsenoazúcars son metabolizados a DMA y ligeramente a oxodimetilarsenoetanol (oxo-DMAE), TMAO y arsenodiolos ^[50]. En la figura 8 se pueden observar algunas de las estructuras de estos compuestos de arsénico ^[7,51].

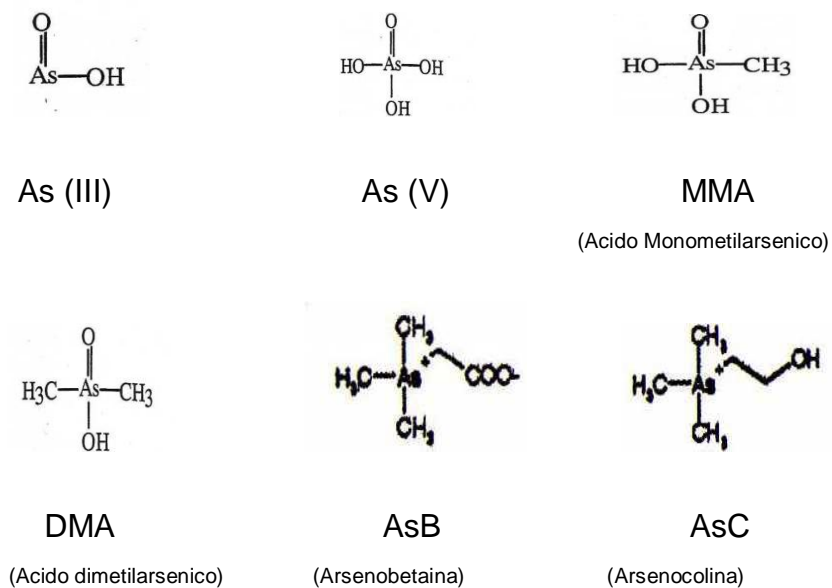


Figura 8. Estructura de algunos compuestos de arsénico

Especies	LD ₅₀ (g/Kg)
As (III)	0,0345
MMA	1,8
DMA	1,2
TeMA	0,89
TMAO	10,6
AsC	> 6,5
AsB	> 10,0

Tabla 2.- Valores experimentales de LD₅₀ de especies de arsénico.

El arsénico ingerido se absorbe a través del tracto gastrointestinal en el torrente sanguíneo y luego se distribuye hacia los órganos. Los efectos sobre la salud debido a la ingestión de arsénico son dolores de estómago, náuseas, vómitos y diarrea, fatiga, ritmo cardíaco anormal, daño de los vasos sanguíneos y en las funciones nerviosas, causando sensación de picazón en manos y pies, infertilidad y abortos en mujeres, pérdida de la resistencia a infecciones, y perturbaciones en el corazón y el cerebro. El efecto más característico debido a la exposición oral de arsénico inorgánico es un patrón de cambios en la piel, el cual incluye hiper-pigmentación e hipo-pigmentación y la aparición de pequeños callos y verrugas en las palmas, planta de los pies y el torso. Algunos de estos callos pueden llegar a convertirse en cáncer de piel. La ingestión de arsénico también puede causar enfermedades vasculares periféricas, y está asociado con aterosclerosis carotídea ^[5]. También produce anomalías cromosómicas en los linfocitos, promoviendo la aparición de genomas celulares y daños por la interferencia que produce este elemento en la etapa de construcción del ADN ^[33].

Estudios epidemiológicos han indicado que la exposición al arsénico a largo plazo en el agua puede aumentar el riesgo de padecer cáncer de piel, pulmón, vejiga y riñón. Sin embargo para las poblaciones que no sufren exposición al arsénico por tareas ocupacionales, la alimentación es la mayor fuente de arsénico ^[50]. Respirar altos niveles de arsénico inorgánico puede causar irritación de la garganta y pulmones. Largas exposiciones a bajas concentraciones pueden llevar a padecer efectos en la piel y también trastornos nerviosos y circulatorios. Una preocupación debido a la inhalación de arsénico inorgánico es el aumento al riesgo de cáncer de pulmón. El contacto directo de la piel con compuestos de arsénico inorgánico puede causar irritación de la misma, aunque este no está relacionado directamente con los efectos en órganos internos ^[5].

Los seres humanos también pueden estar expuestos a diversos compuestos orgánicos de arsénico, pero los datos de los efectos de estos en la salud humana son escasos, por lo que generalmente se considera que los compuestos orgánicos de arsénico son menos tóxicos que su forma inorgánica. Sin embargo, los datos disponibles en estudios de animales dejan muy en claro que dosis específicas de metil y fenil arseniatos pueden producir efectos adversos a la salud que se asemejan a los producidos debido a los compuestos inorgánicos, por lo que los posibles riesgos que pudieran producir los compuestos orgánicos de arsénico no deben ser descartados ^[51]. El consumo provisional tolerable semanal (PTWI, por sus siglas en inglés) para el As inorgánico, indicado por el Comité de Expertos Unidos de FAO/WHO de Aditivos Alimenticios es de 0.015 mg kg^{-1} masa corporal/semana. ^[52].

Las especies inorgánicas de arsénico arsenito (+3) y arsenato (+5) son comúnmente encontrados en aguas naturales mientras que las especies orgánicas tales como el ácido monometilarsenico (MMA) y el ácido dimetilarsenico (DMA) se producen en muestras marinas y biológicas. Por lo tanto la especiación de las especies de arsénico es muy importante y necesaria para el análisis ambiental. El agua contaminada por arsénico es un problema muy serio en algunas ciudades como Bangladesh y la India están expuestos a altos riesgos de salud por ingerir aguas contaminadas con arsénico ^[53].

3.- JUSTIFICACIÓN

La presencia de elementos tóxicos en el orden de traza y ultra-traza es cada vez mayor en los diferentes ecosistemas, un ejemplo de ello lo representa el arsénico, que a pesar de estar de manera natural ampliamente distribuido en el medio ambiente (aguas, suelo y aire), el hombre a través de la industrialización ha contribuido a aumentar su concentración en los mismos por años. Por ello se hace necesario el desarrollo de sistemas de detección y análisis cada vez más rápidos, sencillos y rutinarios.

En el caso particular del arsénico, se ha encontrado que los organismos marinos tienden a bioacumularlo, aumentando los valores normales de arsénico, presentando así un riesgo de toxicidad a la hora de consumir alimentos provenientes del mar.

En este sentido y debido al aumento en el consumo de una gran variedad de alimentos marinos nacionales e importado se hace indispensable el desarrollo de métodos de análisis adecuados para la determinación de arsénico.

4.- ANTECEDENTES

1.- Y. Feng, J. Cao realizaron en el año 1994 una determinación simultánea de arsénico (III) y arsénico (V) en agua empleando plasma inductivamente acoplado-espectrometría de emisión atómica mediante la reducción del arsénico (V) con L-cisteína y generador de hidruros concéntrico sin el separador gas-líquido. En este trabajo, el generador de hidruros concéntrico combinado con la cinética de reducción del arsénico (V) por L-cisteína generó resultados satisfactorios en la determinación simultánea de As (III) y As(V) utilizando ICP-AES con una miniantorcha de 0.65 kW, obteniéndose límites de detección de 0.7 ng/mL para arsénico (III), y de 3.4 ng/mL para arsénico (V). También se obtuvieron desviaciones estándar relativas de 1.21 % para soluciones que contenían 100 ng/mL de As (III), y de 1.45 % para soluciones que contenían 100 ng/mL de As (V) ^[54].

2.- K. Falk, H. Emons realizaron en el año 2000 la especiación de compuestos de arsénico por intercambio iónico HPLC-ICP-MS con diferentes nebulizadores. Aquí investigaron la influencia de distintos nebulizadores, en particular el de flujo cruzado y el de alta presión hidráulica, en el desempeño del estudio analítico, y también parámetros como límite de detección y reproducibilidad. Además, el HPLC-ICP-MS fue validado utilizando materiales de referencia. Los límites de detección se encontraron en el rango de los pg, e incluso por debajo. La optimización del procedimiento analítico empleado dio como resultado suficiente poder de detección y una alta reproducibilidad en la investigación de las especies de arsénico As (III), As (V), MMA, DMA, TMAO, AsB y AsC en

bioindicadores de distintos ecosistemas. El intercambio aniónico, así como el catiónico, no fueron adecuados para el análisis de arsenoazúcares ^[55]

3.- P. A. Gallagher, J. A. Shoemaker, X. Wei, C. A. Brockhoff-Schwegel, J. T. Cred realizaron en el año 2001 una extracción y detección de arsénico en algas mediante extracción acelerada con solvente con separación usando cromatografía iónica y detección con plasma inductivamente acoplado-espectrometría de masas. Se estudiaron los efectos de los parámetros de la ASE (presión, temperatura y composición del solvente) sobre la eficiencia de extracción de las especies de arsénico. La eficiencia de extracción empleando ASE fue independiente de la presión y del tamaño de partícula luego de 3 ciclos, mientras que la composición y temperatura del solvente generaron un incremento en la eficiencia de extracción. Las especies inorgánicas de arsénico presentes en los extractos representaron el 62.5 % y 27.8 % del arsénico total extraído, estando presentes a una concentración de aproximadamente 17 µg/g. También fueron encontradas especies de arsenoazúcares, presentes a una concentración de aproximadamente 8 µg/g ^[51].

4.- B. Mandal, Y. Ogra, K. Anzai, K. Suzuki realizaron en el año de 2004 la especiación de arsénico en muestras biológicas. Aquí examinaron muestras de orina, cabello y uñas de 41 personas del Oeste de Bengal, India, utilizando la cromatografía de líquido de alta eficacia (HPLC) con plasma de argón inductivamente acoplado y espectrometría de masas (ICP-MS). En la orina encontraron AsB (1%), As (III) (11.3 %), As (V) (10.1 %), MMA (6.6 %) y DMA

(13 %). En uñas se encontró As (III) (62.4 %), As (V) (20.2 %), MMA (8.9 %) y DMA (2.8 %). Y en cabellos encontraron As (III) (58.9 %), As (V) (34.8 %), MMA (2.9 %) y DMA (3.4 %) ^[56].

5.- S. García Salgado, M. A. Quijano Nieto, M. M. Bonilla Simón determinaron en el año 2006 especies solubles tóxicas de arsénico en muestras de algas mediante extracción asistida por microondas-generación de hidruros-plasma inductivamente acoplado-espectrometría de emisión atómica. El método de extracción asistida por microondas fue aplicado a una temperatura de 90 °C durante 5 minutos, permitiendo una recuperación del arsénico extraído de 78-98 %. Las condiciones de la generación de hidruros consistió en HCl 4.0 M, 0.5 % p/v de NaBH₄ y argón a una presión de 350 kPa, permitiendo una determinación de las especies tóxicas de As con una gran exactitud. El análisis cromatográfico utilizando HPLC-ICP-AES como método de detección permitió encontrar en muestras de *Chlorella* una concentración de 6.1 ± 0.4 µg/g para As (III), 11.8 ± 0.5 µg/g para As (V), 15 ± 2 µg/g para DMA y 2.2 ± 0.3 µg/g para MMA. Además fue detectada una especie desconocida de arsénico que fue eluida en el volumen muerto ^[58].

6.- M. J. Mato-Fernández, J. R. Otero-Rey, J. Moreda-piñeiro, E. Alonso-Rodríguez, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez realizaron en el año 2007 la extracción de arsénico en material biológico marino utilizando extracción con líquido presurizado. En este procedimiento usaron una mezcla de metanol/agua y para determinar la concentración de As total en los extractos metanólicos emplearon la espectrometría de absorción atómica

electrotérmica. La extracción se realizó en un solo paso, 2 minutos de tiempo estático, temperatura ambiente y 500 psi de presión. La concentración de As total en las muestras analizadas fue de aproximadamente 4-9 mg/Kg. Además el AsB fue la especie mayoritaria encontrada en las muestras, con una concentración de entre 4 y 8 mg/Kg). La precisión obtenida estuvo entre 4.5 y 6.2 %, y los límites de detección entre 10 y 35 ng/g ^[8].

7.- K. Ohno, T. Yanase, Y. Matsuo, T. Kimura, M. Hamidur Rahman, Y. Magara, Y. Matsui determinaron en el año 2007 la ingesta de arsénico por medio del agua y la comida en la población de un área de Bangladesh afectada por contaminación de arsénico. El arsénico fue cuantificado mediante plasma inductivamente acoplado-espectrometría de masas, y en el caso de la comida sólida las muestras fueron digeridas utilizando un sistema de digestión por microondas. El consumo de agua fue estimado en 3 L/día sin distinción de género, mientras que la comida se estimó en porciones mayores, dividiendo esta última en 4 categorías: arroz cocinado, cereales, comida sólida y comida líquida. Los valores de ingestión de arsénico por agua y comida, en una población de 18 personas estudiadas, fue de 0.15 ± 0.11 mg/día, donde, para hombres fue de 0.18 ± 0.13 mg/día ($n = 12$) y para mujeres 0.096 ± 0.007 mg/día ($n = 6$). La contribución a la ingesta de arsénico total fue, para agua potable 13 %, arroz cocinado 56 %, cereales 16 %, comida sólida 11 %, y comida líquida 4.4 % ^[58].

8.- Jessika Darias Albornoz realizó en 2007 la determinación de especies inorgánicas de arsénico empleando Cromatografía iónica-Generación de Hidruros y Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (IC-HG-ICPOES). También se optimizaron las condiciones cromatográficas y las condiciones de operación del plasma para las medidas de las especies de arsénico (III) y (V), mediante el montaje IC-HG-ICPOES. Se observó la mejor precisión (1.431 %) y la mejor sensibilidad (65.78) para una concentración de ácido de 7 % v/v, en la optimización del sistema ICP-OES-HG. Y con respecto a la optimización cromatográfica, la mejor precisión (1.963 %) y la mejor sensibilidad (62.31) fueron obtenidas para un flujo de aproximadamente 1 mL/min ^[59].

9.- Virguez, Luis, en el 2008, trabaja en la optimización de las condiciones para la separación de compuestos de arsénico, As (III), As (V), MMA y DMA, mediante un sistema acoplado de cromatografía iónica, generación de hidruros y espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado IC-HG-ICP-OES (sistema previamente diseñado). Logra la separación de las cuatro especies de arsénico en menos de 8 minutos, pero no se encontraron límites de detección aceptables. ^[60]

9.- Sauret, Jaime, en el 2008, determinación de las especies tóxicas de arsénico en diversos productos alimenticios de Venezuela. Logra mejorar los límites de detección. Se realizó la extracción de las especies con el método de Extracción Acelerada con Solvente (ASE), y para la determinación de estas se

empleo Cromatografía Iónica (IC) acoplada a Generación de Hidruros-Plasma Inductivamente Acoplado-Espectrometría de Emisión Óptica (HG-ICP-OES).^[61]

5.- OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo fundamental del presente trabajo está enfocado en la determinación de arsénico en productos marinos, específicamente algas (productos de importación) empleadas en la elaboración del “sushi”. Para esto se realizará la extracción de arsénico con el método de Extracción Acelerada con Solvente, y para la determinación de estas se empleará Plasma Inductivamente Acoplado-Espectrometría de Emisión Óptica y utilizando como sistema de introducción de muestra la Generación de Hidruros.

Objetivos específicos:

- Revisión bibliográfica para el estudio de arsénico.
- Determinación de arsénico por Generación de Hidruros-Plasma Inductivamente Acoplado-Espectrometría de Emisión Óptica (HG-ICP-OES).
- Optimización del método de Extracción Acelerada con Solvente (ASE), para la extracción de arsénico presentes en las muestras de algas.
- Determinación de Arsénico en algas tipo Nori (*Porphyra Umbilicalis*).

6.- PARTE EXPERIMENTAL

6.1.- Descripción de los equipos y reactivos

6.1.1.- Molinos de Bolas

Molino de bolas marca SPEX Industries Inc., modelo SPEX MIXER. Es una variante del molino de tarro, el cual tritura las muestras al colocarlas en un recipiente junto con uno o más elementos de molienda, impartándole movimiento al contenedor. Los envases suelen ser cilíndricos, los elementos de molienda comúnmente son esferas. En general, los contenedores y los elementos de molienda se hacen del mismo material. El contenedor se balancea, vibra o sacude, creando de esta manera inercia, la cual provoca que las esferas se muevan de forma independiente, chocando entre sí y contra la pared del recipiente logrando la pulverización de la muestra.

El molino empleado es compacto y eficiente capaz de pulverizar las muestras en el rango de 10 gramos. Es un molino multi-propósito, ya que nos permite reducir rápidamente las muestras a la finura requerida para el análisis, mezclar homogéneamente y realizar emulsiones. En el proceso de molienda partículas de 5 a 250 mm son reducidas en tamaño a 10 - 300 micrones, aproximadamente, dependiendo del tipo de operación que se realice. El propósito de la operación de la molienda es ejercer un control estrecho en el tamaño del producto y por esta razón frecuentemente se dice que una molienda correcta es la clave de una buena recuperación de la especie útil ^[62]. En la figura 9 se muestra una fotografía del equipo.



Figura 9. Molino de bolas y esferas de molienda.

6.1.2.- Agitador mecánico

Agitador mecánico Vortex marca Thermolyne, modelo MAXI MIX Plus M63215. El agitador- mezclador, esta equipado con una sola taza para tubo de mezcla, una almohadilla polimérica y una plataforma de mezcla, es excelente para mezclar los tubos individuales y frascos pequeños a una velocidad fija. En la figura 10 se muestra una fotografía del equipo vortex.

Este agitador mecánico proporciona rápidamente, una mezcla uniforme, por lo que es ideal para tubos de ensayo enzimático, procesos generales de mezcla, ensayos bioquímicos, preparados de diluciones virales, lograr precipitados y ensayos de agitación para suspensiones celulares y muestras de tejidos.

Esta elaborado en aluminio, lo cual garantiza la estabilidad, dos modos de funcionamiento proporcionan una mayor flexibilidad, la operación continua es útil cuando se están mezclando una cantidad de tubos en secuencia. El modo intermitente se activa fácilmente al tocar la taza de apego o la almohadilla con un tubo de ensayo [63].



Figura 10. Agitador Vortex.

6.1.3.- Equipo de Extracción Acelerada con Solvente (ASE)

Equipo fabricado por la firma Dionex Corporation, modelo ASE 200. Este extractor posee capacidad para 24 muestras, 4 posiciones de lavado, celdas para las muestras de 11, 22 y 33 mL de capacidad, viales de recolección de 40 y 60 mL, rango de presión de funcionamiento entre 500 y 1500 psi y temperatura máxima de 200 °C. Se emplea gas nitrógeno para el movimiento de las partes internas y la presurización de la celda durante la extracción.

Este equipo a parte de operarse manualmente, también es posible manejarlo mediante el software (AutoAse, Dionex Corporation), que trabaja para la plataforma de Windows 98. Es posible controlar las diversas condiciones experimentales bajo las cuales se realizan las extracciones (presión, temperatura, número de ciclos, etc.) de 2 formas diferentes: en la modalidad de “*Método*” donde se realizan las extracciones bajo las mismas condiciones para todas las celdas y bajo la modalidad de “*Programación*” donde pueden aplicarse diferentes condiciones para cada celda. En la figura 11 se observa una fotografía del extractor ASE 200.



Figura 11. Extractor ASE 200.

La efectividad de este equipo se basa en las siguientes premisas:

Solubilidad y efecto de transferencias de masas. El empleo de temperaturas elevadas trae como consecuencia el incremento de la capacidad de los solventes de solubilizar los analitos, es decir, una mayor difusión del solvente a través de la matriz de la muestra. Si se utilizara solvente nuevo (fresco) en cada paso de la extracción se aumentaría la transferencia de masas pues se incrementaría el gradiente de

concentración entre la solución de la celda y la superficie de la muestra, obteniéndose una mejora en el rendimiento de la extracción ^[65].

Rompimiento del equilibrio de superficie. La temperatura y la presión tienen un papel muy importante en el rendimiento de la extracción. Cuando se emplean altas temperaturas se puede disminuir la viscosidad del solvente, lo que permite que esté penetre mejor en la matriz aumentando el rendimiento en el proceso de extracción. ^[65]. Esto se debe a que a altas temperaturas se facilita la ruptura de las interacciones entre el soluto y la matriz debido a fuerzas ya sean de tipo Van der Waals, dipolo-dipolo o puentes de hidrógeno entre los solutos y los lugares activos de la matriz, disminuyendo la energía de activación necesaria para procesos de desorción ^[64]. Por su parte, las altas presiones permiten utilizar solventes a temperaturas que estén por encima de su punto de ebullición, manteniendo a este en estado líquido. También facilitan la extracción de muestras en las cuales el analito se encuentra atrapado en los poros de la matriz, forzando así al solvente a entrar en zonas de la matriz que comúnmente no están en contacto cuando se utilizan solventes bajo condiciones atmosféricas ^[65,64].

Como toda técnica, la extracción acelerada con solvente posee ventajas y desventajas. Algunas de ellas se presentan a continuación ^[65]:

Ventajas:

- Permite una extracción más rápida que con los procedimientos de extracción tradicionales (tiempos menores a 15 minutos contra tiempos que van de 2 a 24 horas)
- Se emplea una menor cantidad de solvente (menos de 15 mL para 10 g de muestra contra 50-500 mL)

- Mayor eficacia independientemente de la matriz en la que se encuentra el analito de interés
- Es una técnica automatizada y se pueden extraer muestras de manera secuencial
- Reduce la exposición por parte del operador a vapores provenientes del solvente

Desventajas:

- A pesar de obtener extracciones más completas, se obtiene una menor selectividad
- El equipo necesario posee un costo elevado

Los pasos empleados en la ASE son ^[65]:

1. Precalentamiento: Tiempo en el cual es calentada la muestra antes de introducir el solvente
2. Extracción estática: Tiempo adicional donde la muestra es puesta en contacto con el solvente a una temperatura determinada
3. Descarga de fluidos: Cantidad de solvente que sale de la celda luego del proceso estático expresado como % en volumen de celda
4. Purga: Tiempo requerido para la purga de la celda
5. Ciclos: Es el número de veces en que se repiten los pasos 2 y 3
6. Presión: Cantidad de presión a la que es sometida la celda
7. Temperatura: Temperatura a la que es sometida la celda.

6.1.4.- Espectrofotómetro

Se empleó un espectrómetro de emisión atómica con fuente de plasma de argón, inductivamente acoplado, marca Thermo Jarrell Ash, modelo IRIS. En la figura 12 se observa una fotografía de dicho equipo.

El equipo consta de:

- Un generador de radio frecuencia que opera a 27,12 MHz.
- Una antorcha o “torch” del tipo desmontable, fabricada de tres tubos concéntricos de cuarzo y circundada por tres bobinas de inducción, refrigeradas por agua.
- El sistema óptico está constituido por un monocromador de dispersión cruzada, provisto de una red Echelle de 62 líneas mm^{-1} y una distancia focal de 381 mm. La red anteriormente descrita, en arreglo con un prisma, permite obtener un espectro en dos dimensiones, para trabajar en órdenes superiores.
- El detector es del tipo de estado sólido, denominado detector de inyección a la carga (CID, charge injection detector).



Figura 12. Espectrómetro de emisión atómica con fuente de plasma de argón, inductivamente acoplado, marca Thermo Jarrell Ash, modelo IRIS.

6.1.5.- Sistema de introducción de muestras al espectrofotómetro

- **Nebulizador dual.** Consiste de un dispositivo de nebulización dual, para el análisis de metales tanto formadores como no formadores de hidruros volátiles, el cual fue previamente desarrollado en el Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela ^[46]. En resumen, consiste en un dispositivo en forma de T con tres conexiones, dos para nebulizadores y otra para acoplar a una cámara de nebulización convencional. Posee la ventaja, que permite modificar independientemente, los diferentes parámetros relativos a los flujos de los fluidos de gases y líquidos, de manera tal, que se puede ejercer un mejor control sobre todo el proceso de nebulización, en especial, en la

formación de los hidruros volátiles. Para su confección se escogió el cloruro de polivinilo de 2,0 mm de espesor, ya que es altamente resistente al ataque de los ácidos y fácil de trabajar. En la figura 13 se muestra una fotografía del dispositivo previamente diseñado.

A continuación especificamos la configuración del nebulizador en forma de T, para su mejor entendimiento:

La primera conexión es para acoplarse a una cámara de aerosol y es perpendicular a las otras dos conexiones. La cámara de aerosol a la cual es acoplada, es del tipo convencional de doble paso, de 10,0 cm de largo y 3,0 cm de diámetro, construida en Teflón, y elaborada en los talleres de la Universidad Central de Venezuela. Posee unos deflectores internos del mismo material, para ayudar a la selección de las gotas mas finas.

La segunda conexión, es para la introducción de una mezcla de muestra y ácido. La muestra y la disolución acida son aspiradas con una bomba peristáltica. Ambas disoluciones confluyen en una Y de teflón, previo a un nebulizador flujo cruzado convencional.

La tercera conexión, la cual es colineal a la anterior, se dispuso un nebulizador concéntrico convencional para la introducción de una disolución de borohidruro de sodio en medio básico. Dicha disolución es alimentada con una bomba peristáltica.

En este dispositivo de nebulización dual, los nebulizados de muestra-ácido y disolución de borohidruro se encuentran frontalmente, para la reacción en la formación del hidruro volátil. Las conexiones, fueron elaboradas en las menores dimensiones posibles: 3,0 cm de diámetro interno y desde el extremo de los nebulizadores al punto de reacción, 3,0 cm aproximadamente. La primera conexión unida a la cámara de doble paso, está a 15,0 cm desde el punto de reacción de formación del hidruro, al inyector del plasma.



Figura 13. Nebulizador Dual.

- **Bombas peristálticas.** Bomba peristáltica de la casa Gilson, modelo Miniplus 3 y bomba peristáltica proporcionada por el equipo ICP OES, modelo Iris de la casa Thermo Jarrel Ash.
- **Nebulizadores.** Nebulizador concéntrico o Meinhard convencional de la casa J.A. Meinhard, CA. Área del anillo anular de 0,05 - 0,10 mm² y de diámetro nominal del capilar de 220 - 320 μm. Nebulizador flujo cruzado,

modelo convencional suministrado por el equipo ICP OES modelo Iris, por la casa Thermo Jarrell Ash.

- **Reguladores de presión.** Regulador másico, de la casa Matheson, modelo Flow Controller 8270 y un regulador de presión por membrana, proporcionado por el equipo ICP OES, modelo Iris de la casa Thermo Jarrell Ash.
- **Inyector al plasma.** El inyector, que es el tubo conector entre la cámara y la torch, es de 1,5 mm de diámetro interno, de la casa Thermo Elemental.

6.1.6.- Reactivos y materiales.

- NaBH₄ (Sólido) al 95 % de pureza. Fabricante: Riedel-de Haën.
- HCl al 37 % de pureza. Fabricante: Riedel-de Haën.
- NaOH (Sólido) al 97,8 % de pureza. Fabricante: J T Baker.
- As₂O₃ (Sólido) al 99,5 % de pureza. Fabricante: BHD.
- NH₄H₂PO₄ (Sólido) al 99,0 % pureza. Fabricante: Merck.
- Metanol, grado HPLC. Fabricante: Fluka
- Agua Desionizada, grado 18 MΩ, NANOpure, Barnstead Thermolyne
- Filtro para solventes acuosos, de celulosa, diámetro de poro 0,45 μm. Fabricante: MFS. Filtros para solventes orgánicos, diámetro de poro 0.22 μm membrana hidrofóbica.

6.1.7.- Muestras: Algas para sushi tipo Nori (*Porphyra Umbilicalis*). De procedencia Japonesa, sin muchas especificaciones. Se consiguió en paquetes de 28 gramos, secos y envasados al vacío, en la figura 14 se muestra una fotografía del alga.



Figura 14. Algas para sushi tipo Nori (*Porphyra Umbilicalis*).

El alga Nori es de tamaño pequeño, con pliegues y tiene una coloración rojiza o púrpura que se vuelve negra al secarse y tiende al color verde cuando se cuece. Se consigue comercialmente en forma de láminas u hojas que se obtiene al triturar y prensar. Hoy en día se cultiva o recolecta también en otros países como España, Francia, China, Corea, etc.

Además de utilizarse para la elaboración de Sushi, también es muy práctica tomarla en forma de copos ya que no hay que cocinarlas. Tiene un sabor suave y la espolvorean en postres, sobre arroces, pastas, ensaladas, sopas, etc. Para consumir directamente hay que tostarla ligeramente un par de minutos a fuego lento.

Información nutricional del alga Nori (por 100 g.)

- 24 - 35 % de proteínas.
- 350 - 470 mg. de Calcio.
- 2 - 8 mg. de Yodo.
- 30 - 40 mg. de Hierro.
- 3.200 mg. de Potasio.
- 80 - 90 mg. de Magnesio.
- 10.000 U.I de betacaroteno (provitamina A)

6.2.- Esquema Experimental

Para llevar a cabo el proceso de extracción y medida de arsénico sobre muestras de algas, se siguió el procedimiento experimental mostrado en la figura 15.

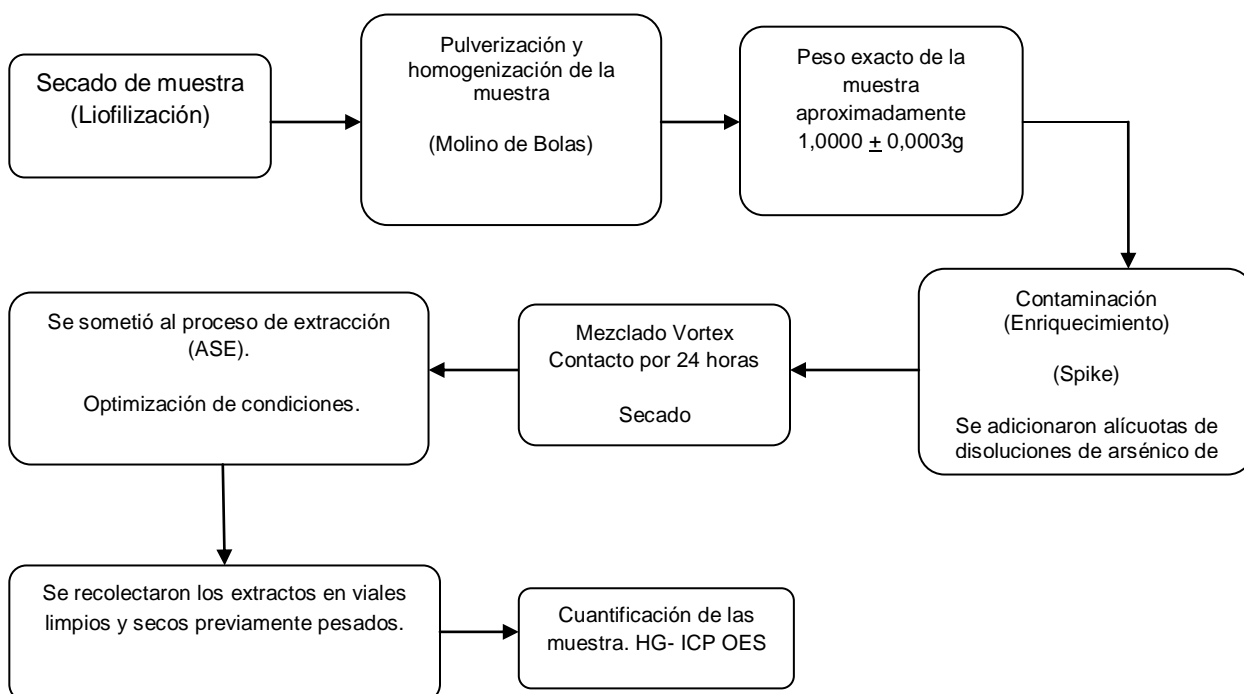


Figura 15. Esquema de procedimiento experimental a seguir.

El esquema presentado en la figura 15 indica que para iniciar el proceso de análisis se requiere que la muestra se encuentre libre de humedad, ya que los resultados se deben reportar sobre la base seca. Para evitar pérdida de los elementos volátiles, el sistema de secado más recomendado es la liofilización. En nuestro caso particular, la muestra utilizada se adquirió seca y libre de humedad, es decir previamente liofilizada y almacenada al vacío.

La siguiente etapa fue pulverizar la muestra, esto nos permitió acondicionarla de una manera más homogénea y por otra parte se alcanzó un tamaño de grano muy fino (tipo talco), que nos permitió aumentar el área superficial, lo cual a su vez, aumentó el contacto entre la muestra y el solvente, lo que implica una mejora en la eficiencia de extracción.

Seguidamente, para cada extracción se pesó una cantidad fija de alga (Aprox. $1,0000 \pm 0,0003$ g). Para efecto del cálculo de los porcentajes de recuperación, algunas muestras de algas fueron contaminadas con arsénico de distintas concentraciones. Para ello, alícuotas de concentración conocida de arsénico se pusieron en contacto con un peso determinado de alga, mezclándose homogéneamente en un dispositivo Vortex. Se dejaron en contacto por 24 horas y una vez transcurrido ese tiempo, las muestras secas fueron sometidas al proceso de extracción. Los extractos obtenidos son recolectados en viales, los cuales fueron previamente pesados, para así por diferencia de peso obtener el volumen final de los mismos.

Finalmente el arsénico fue medido en los diferentes extractos por la técnica HG- ICP OES. Para ello el extracto y una disolución de ácido clorhídrico son aspirados por canales diferentes a través de una bomba peristáltica. Seguidamente son mezclados en una unión tipo Y, para finalmente la mezcla ser transformada en aerosol por un nebulizador flujo cruzado. La finalidad de esta mezcla es de proveer un medio suficientemente ácido, para favorecer la formación del hidruro volátil. Por otra parte, el borohidruro de sodio es alimentado por una bomba peristáltica y transformada en aerosol por un nebulizador tipo concéntrico. Ambas disoluciones entran en contacto de manera frontal, para la formación del hidruro volátil, pasando a la descarga del plasma a través de la cámara de aerosol convencional.

En la figura 16 se muestra un diagrama del sistema de extracción y de medida en conjunto.

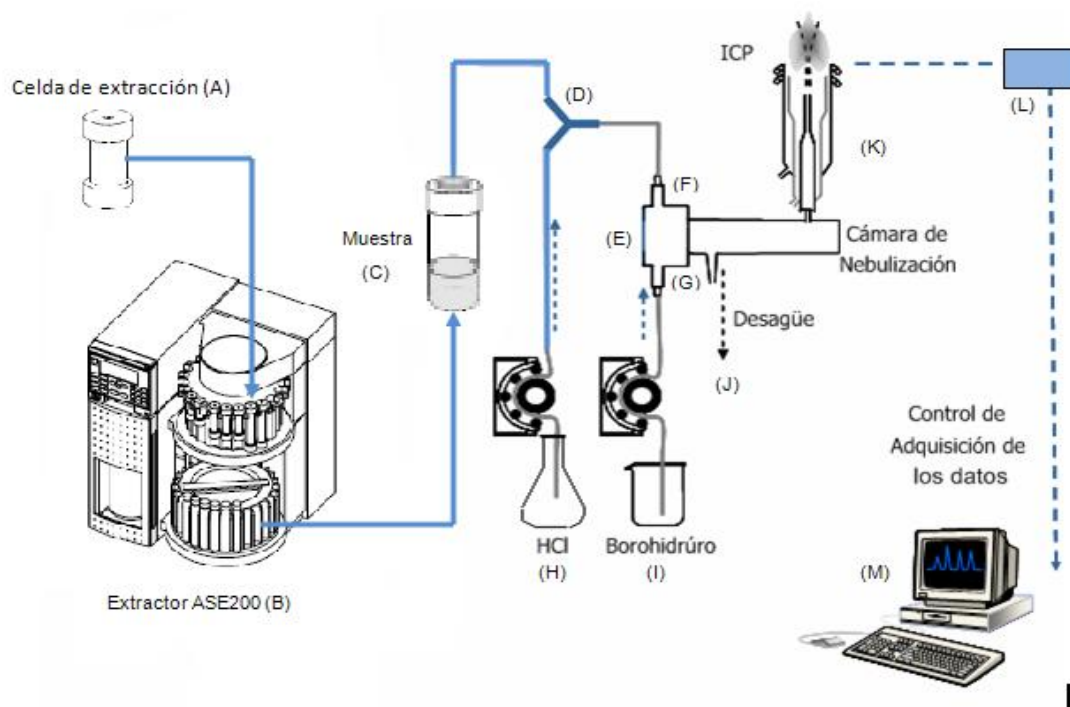


Figura 16. Diagrama del sistema completo. A.- Celda de Extracción. B.- Extractor acelerado con solvente, ASE 200, C.- Vial de recolección de Muestra. D.- Unión en Y. E.- Sistema de nebulización dual. F.- Nebulizador flujo cruzado. G.- Nebulizador concéntrico. H.- Disolución ácida. I.- Disolución de borohidruro de sodio. J.- Desagüe nebulizador. K.- Fuente del plasma. L.- Detector (CID). M.- Sistema de adquisición de data.

Para poder evaluar el sistema de extracción, es necesario que el dispositivo de medida este previamente acondicionado. Por lo tanto, la primera etapa consistió en reevaluar del sistema de medida (HG-ICP OES), ya que a pesar de que había sido previamente desarrollado y optimizado ^[59], fue desmantelado y hubo necesidad de re optimizarlo. A continuación se presenta la optimización del sistema de medida.

6.2.1. Condiciones optimas en el HG-ICP OES para la determinación de As

Para encontrar las condiciones óptimas de operación del HG-ICP OES, se empleó un estándar de arsénico de 5,00 mg/L y se reajustaron los diferentes parámetros instrumentales disponibles. En la tabla 3 se muestran las condiciones de operación reajustadas del HG-ICP OES.

GENERADOR DE RF	1350 W
FLUJO DE GAS AUXILIAR	0,9 L/min
VELOCIDAD BOMBA PARA MUESTRA	0,6 mL/min
LONGITUD DE ONDA DE TRABAJO	189,042 nm
CONCENTRACIÓN NaBH₄ en NaOH 0,05 %	0,2 %
CONCENTRACIÓN HCl	7 %
VELOCIDAD BOMBA PERISTÁLTICA (EXTERNA)	0,30 mL/min
FLUJO DE NEBULIZADOR (EXTERNO)	0,400 mL/min

Tabla 3. Condiciones operacionales óptimas del ICP-OES.

Ya que el sistema de nebulización y atomización del ICP OES es susceptible al empleo de solventes orgánicos y en vista de que emplearemos en la etapa de extracción solventes de tal naturaleza, consideramos conveniente realizar la curva de calibración bajo diferentes condiciones para los patrones. La primera curva fue realizada con patrones preparados en disolución acuosa y la segunda curva con patrones elaborados en disolución metanol agua en proporción de 30-70 % respectivamente.

- **Curva de calibración con patrones de As en medio netamente acuoso**

En Tabla 4 se muestran las señales de emisión promedio en unidades arbitrarias (UA) para un rango de concentraciones entre 0,1 y 1,0 mg/L de arsénico (III) en disolución acuosa y en la figura 17 los resultados obtenidos de la curva de calibración. La menor concentración de 0,1 mg/L, correspondió aproximadamente al límite de cuantificación encontrado bajo estas condiciones, mientras que el valor superior de 1,0 mg/L fue escogido arbitrariamente.

Concentración (mg/L)	Señal (UA)
0,1021	1,584
0,2131	4,942
0,5124	11,420
1,0351	25,726

Tabla 4. Concentración Vs señal de emisión, para As en medio acuoso.

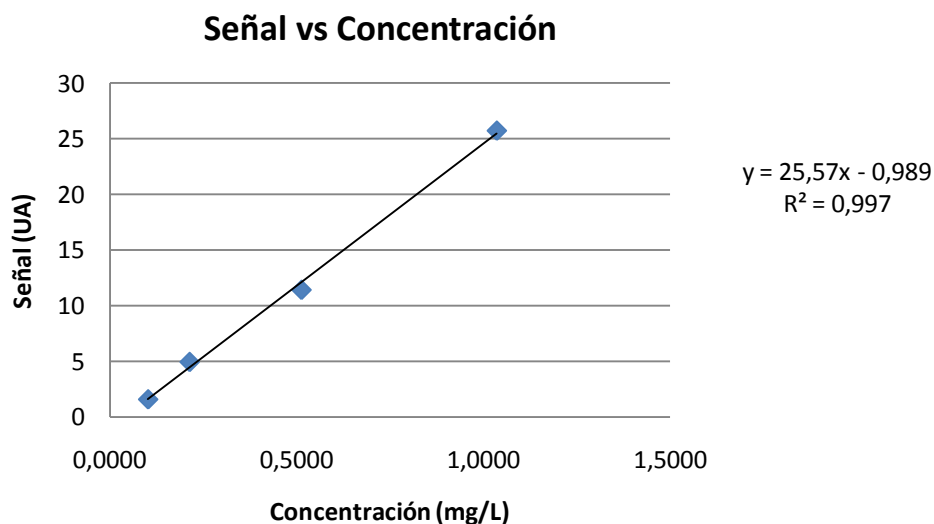


Figura 17. Curva de Calibración de patrones de As en medio acuoso.

- **Curva de calibración con patrones de As en medio Metanol-Agua (30-70 %)**

En estas condiciones se encontró una mejor relación señal ruido, por lo tanto los rango de concentración fueron entre 0,02 y 0,5 mg/L de arsénico (III). En Tabla 5 se muestran para el rango de concentración, las señales de emisión promedio en unidades arbitrarias (UA) y en la figura 18 los resultados obtenidos de la curva de calibración.

Concentración (mg/L)	Señal (UA)
0,0261	1,238
0,0547	2,262
0,2089	7,761
0,5183	16,690

Tabla 5. Concentración Vs señal de emisión, para As en medio Metanol-Agua.

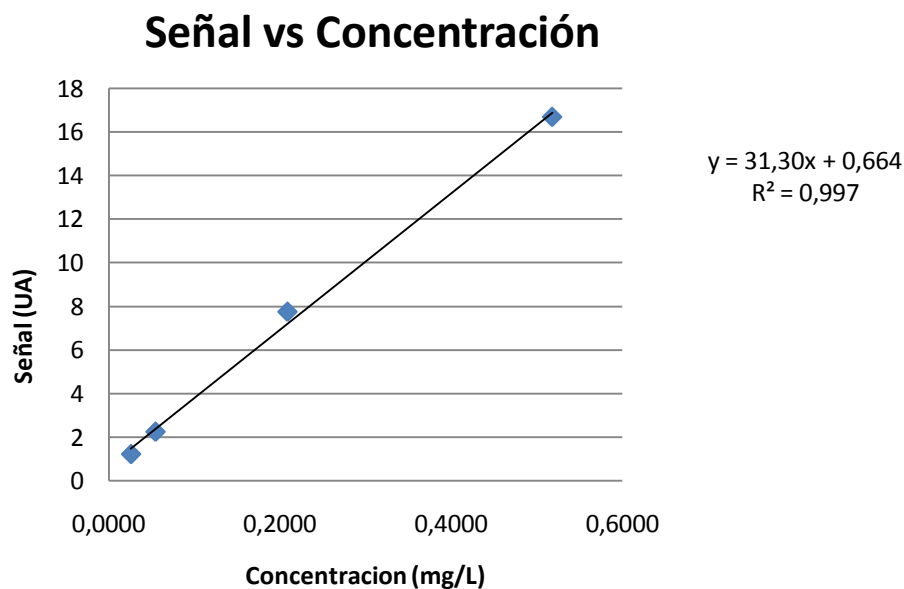


Figura 18. Curva de Calibración de patrones de As en medio Metanol-Agua: (30-70 %).

Al observar los datos obtenidos para cada una de las curvas de calibración, notamos que la señal medida para los patrones en disolución acuosas difieren con respecto a los preparados en disolución metanol agua (30-70 %). Las intensidades de la señal en el disolvente metanol-agua aumentaron considerablemente, debido a una mejora en la nebulización (probablemente). La diferencia en las pendientes de ambas curvas es indicativo de que hay un efecto matriz a considerar y es por ello que decidimos trabajar con la curva de calibración en el solvente metanol-agua, ya que además de presentar una mayor sensibilidad, corresponde a la matriz donde serán obtenidas las muestras (después de la extracción). Conciérne ahora, evaluar las condiciones de extracción.

6.3.- Optimización de las condiciones de extracción

Este tipo de técnica nos permite variar el tipo de solvente utilizado, modificándolo de acuerdo al analito y la matriz en estudio. En nuestro caso particular, se encontró de la revisión ⁽⁷⁾ que para este tipo de muestras el solvente ideal consiste de una mezcla de metanol agua en diversas proporciones. Adicionalmente con el objetivo de trabajar en las óptimas condiciones de extracción, el equipo nos permitió modificar diferentes parámetros operacionales: temperatura, presión, el tiempo de extracción estático y el número de ciclos. En referencia a trabajos anteriores ^(66,67,68) encontramos estudios sobre la optimización de este proceso de extracción. Los trabajos realizados por separado de *Del Valle Franco Noelia (1999)*; *Cumana Jaime (2000)* y *Velásquez Johany (2005)*, empleando un diseño factorial 2k, les permitieron observar el comportamiento de la superficie de respuesta, modificando simultáneamente los diversos parámetros. Llegaron a la conclusión que las variables de mayor importancia y que más influyen en el proceso de extracción son la temperatura y la cantidad de ciclos realizados. La presión y el tiempo de extracción resultaron variables de menor importancia.

En base a lo descrito en el párrafo anterior consideramos mantener fija la presión a 1500 psi y un tiempo fijo de extracción de 5 minutos, los cuales son los máximos permitidos por el equipo. Mientras que los parámetros a variar fueron:

- Tipo de solventes a emplear
- Temperatura
- Ciclos realizados

Para evaluar las condiciones de extracción se escogió el porcentaje de recuperación. Para ello, una misma muestra de alga fue contaminada (enriquecida) con diferentes concentraciones de arsénico, que oscilaron entre 0,5 y 5,0 $\mu\text{g/g}$. Estos valores fueron escogidos de manera tal que la concentración en el extracto pudiera ser medida en la curva de calibración, partiendo del hecho de que la recuperación fuese del 100 %. Por ejemplo, el valor mínimo de 0,5 $\mu\text{g/g}$ fue seleccionado para que en el extracto final (entre 20 y 25 mL aproximadamente), pudiera dar una señal ligeramente superior al primer punto de la curva de calibración. El valor superior de 5,0 $\mu\text{g/g}$ fue escogido arbitrariamente (10 veces superior al primero). Hay que hacer notar que los extractos de algas fueron medidos antes y después de contaminar.

El primer parámetro a evaluar fue el tipo de solvente a emplear, ya que si bien es cierto que los analitos a extraer son altamente solubles en solventes polares como metanol-agua, hay una discrepancia en la bibliografía ^[7, 69, 70, 71] referente a la proporción entre ellos a emplear. En algunos casos dependiendo del tipo de materia orgánica de la muestra, es recomendable emplear una mayor proporción de metanol que agua, en otros casos la proporción se invierte e inclusive en algunas muestras llegan a emplear solo agua. Es por ello, que en la primera etapa evaluamos la proporcionalidad entre los solventes metanol-agua, manteniendo fijos los demás parámetros (los valores de estos fueron tomados de las referencias previamente citadas).

A continuación se presenta el estudio del proceso de extracción a dos diferentes condiciones de solvente.

6.3.1. Proceso de extracción con Metanol-Agua (70-30 %)

En la tabla 6 se muestran las condiciones experimentales utilizadas en el este proceso de extracción, mientras que en la tabla 7 se presentan los datos en la preparación de las muestras con las respectivas cantidades de los patrones de arsénico añadidas.

Hay que hacer notar, que una vez realizadas las extracciones, los extractos son sometidos a un proceso de evaporación en un baño de maría (lentamente). La idea es reducir la cantidad de metanol, para posteriormente complementar el volumen con agua, hasta lograr una proporción aproximadamente igual a la empleada con los patrones para la curva de calibración. En la tabla 8 se reportan las concentraciones de arsénico obtenidas experimentalmente, para cada una de las muestras.

Una vez obtenidas las concentraciones experimentales de arsénico en las muestras, se procedió a calcular el porcentaje de recuperación (sobre la base sólida), estos valores se observan en la tabla 9 y se representan gráficamente en la figura 19.

Solvente	Metanol-Agua (70:30)
Temperatura	40 °C
Presión	1500 psi
Tiempo de estática	1 min
Numero de ciclos de extracción	1
Tiempo de extracción total	16 min

Tabla 6. Condiciones para la extracción con Metanol-Agua 70-30 %.

Muestras de alga	Peso alga (g)	Concentración As (mg/L)	Alícuota añadida (mL)	Concentración de As añadido en el alga (µg/g)
1 (sin contaminar)	1,0541	0,0000	0,00	0,000
2 (sin contaminar)	1,0231	0,0000	0,00	0,000
B-a	1,0173	0,1083	5,00	0,532
B-b	1,0134	0,1083	5,00	0,534
C-a	1,0665	0,2518	5,00	1,180
C-b	1,0012	0,2518	5,00	1,257
D-a	1,0171	0,5048	5,00	2,482
D-b	1,0111	0,5048	5,00	2,496
E-a	1,0022	0,7515	5,00	3,749
E-b	1,0269	0,7515	5,00	3,659

Tabla 7. Preparación de las muestras para la extracción con Metanol-Agua 70-30 %

Muestra de alga	Volumen del extracto (mL)	Concentración de As en el extracto (mg/L)	Concentración de As en el alga (µg/g)
1 (sin contaminar)	25,4	ND	ND
2 (sin contaminar)	24,9	ND	ND
B-a	23,7	< 0,02	< 0,5
B-b	22,3	< 0,02	< 0,5
C-a	21,1	0,035	0,69
C-b	23,4	0,032	0,74
D-a	21,1	0,075	1,55
D-b	22,1	0,075	1,65
E-a	23,2	0,104	2,41
E-b	23,5	0,101	2,31

Tabla 8. Concentración de As medidas para la extracción Metanol-Agua 70-30 %.

Muestra	% de Recuperación
B-a	----
B-b	----
C-a	58,6
C-b	58,7 62,49
D-a	62,5
D-b	65,9
E-a	64,3
E-b	63,2

Tabla 9. Porcentaje de extracción con Metanol-

recuperación para la Agua 70-30 %.

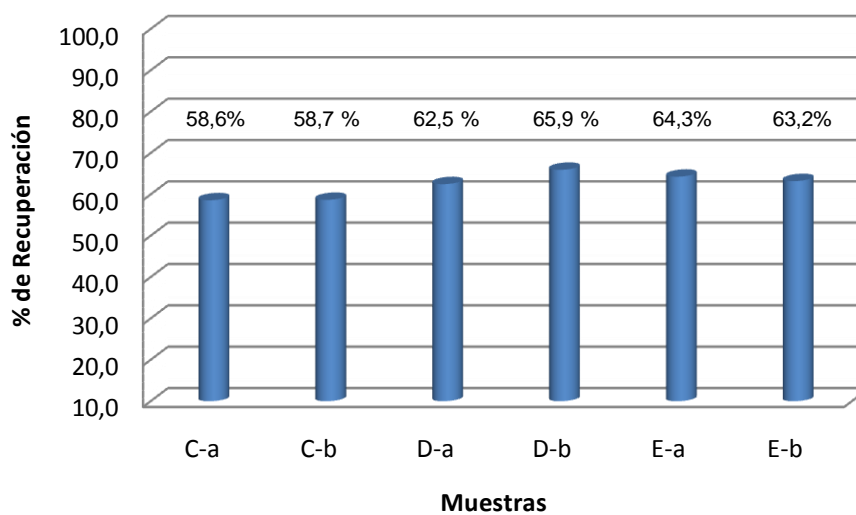


Figura 19. Gráfico de los porcentajes de recuperación para la extracción con Metanol-Agua 70-30 %.

6.3.2. Proceso de extracción con Metanol-Agua (30-70 %)

En la tabla 10 se muestran las condiciones experimentales utilizadas para el segundo procedimiento de extracción, mientras que en la tabla 11 se presentan los datos para la preparación de las muestras con las concentraciones de los patrones de arsénico añadidos. En la tabla 12 se observan las concentraciones de arsénico obtenidas experimentalmente para cada una de las muestras. En este caso los análisis fueron hechos por triplicado, para poder determinar parámetros estadísticos con mayor precisión. Los porcentajes de recuperación se muestran en la tabla 13 y se grafican en la figura 20.

Solvente	Metanol-Agua (30:70)
Temperatura	40 °C
Presión	1500 psi
Tiempo estática	5 min
Numero de ciclos de extracción	1
Tiempo de extracción total	16 min

Tabla 10. Condiciones para la extracción con Metanol-Agua 30-70 %.

Muestras de alga	Peso alga (g)	Concentración As (mg/L)	Alícuota añadida (mL)	Concentración de As añadido en el alga (µg/g)
1 (sin contaminar)	1,0582	0,0000	0,00	0,00
2 (sin contaminar)	1,0385	0,0000	0,00	0,00
3 (sin contaminar)	1,0682	0,0000	0,00	0,00
F-a	1,0375	0,1083	5,00	0,522
F-b	1,0016	0,1083	5,00	0,541
F-c	1,0925	0,1083	5,00	0,496
G-a	1,0112	0,2518	5,00	1,245
G-b	1,1569	0,2518	5,00	1,088
G-c	1,0671	0,2518	5,00	1,180
I-a	1,0058	0,7515	5,00	3,736
I-b	1,0441	0,7515	5,00	3,599
I-c	1,0205	0,7515	5,00	3,682
J-a	1,0509	1,0812	5,00	5,144
J-b	1,0689	1,0812	5,00	5,058
J-c	1,0256	1,0812	5,00	5,271

Tabla 11. Preparación de las muestras para la extracción con Metanol-Agua 30-70 %.

Muestra	Volumen del extracto (mL)	Concentración de As en el extracto (mg/L)	Concentración de As en el alga ($\mu\text{g/g}$)
1 (sin contaminar)	24,9	ND	ND
2 (sin contaminar)	24,6	ND	ND
3 (sin contaminar)	25,2	ND	ND
F-a	21,5	< 0,02	< 0,5
F-b	22,4	< 0,02	< 0,5
F-c	21,6	< 0,02	< 0,5
G-a	22,4	0,037	0,82
G-b	22,2	0,039	0,76
G-c	21,9	0,038	0,77
I-a	22,5	0,121	2,71
I-b	21,9	0,127	2,66
I-c	22,2	0,122	2,66
J-a	22,3	0,169	3,59
J-b	21,9	0,176	3,60
J-c	22,3	0,167	3,63

Tabla 12.- Concentración de arsénico obtenida para la extracción Metanol-Agua 30-70 %.

Muestra	% de Recuperación		
F-a	----	Promedio	----
F-b	----	s	----
F-c	----	% DSR	----
G-a	65,6	Promedio	67
G-b	69,6	s	2
G-c	65,3	% DSR	3,5
I-a	72,7	Promedio	73
I-b	73,9	s	1
I-c	72,2	% DSR	1,2
J-a	69,7	Promedio	70
J-b	71,3	s	1
J-c	68,9	% DSR	1,7

Tabla 13. Porcentaje de recuperación para la extracción Metanol-Agua 30-70 %.

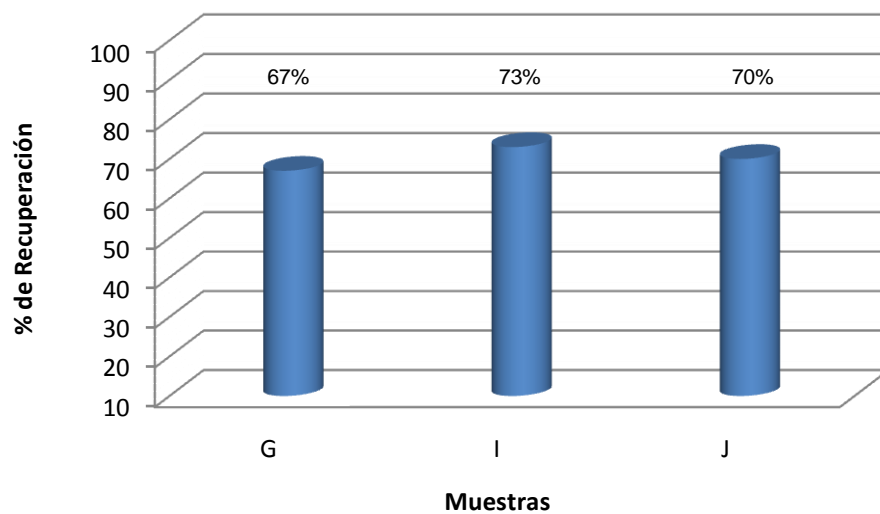


Figura 20. Gráfico de los porcentajes de recuperación para la extracción Metanol-Agua 30-70 %.

En la primera extracción se empleó una mayor proporción de metanol con respecto al agua, lo cual según la bibliografía revisada es muy utilizado en los procesos de extracción con “alto” contenido de material orgánico. Bajo estas condiciones se encontraron porcentajes de recuperación variables, que van desde 58 a un 66 % (aproximadamente). La contaminación correspondiente a la concentración de 0,5 µg/g no fue posible medir, ya que en el extracto los valores estaban por debajo de lo determinable en la curva de calibración. Esto se debe a que solo se recupera alrededor del 60 % del arsénico añadido. Por otra parte, este procedimiento presenta un paso adicional engorroso que lleva tiempo, el cual consiste en la evaporación del metanol, para de esta manera alcanzar las condiciones bajo las cuales se realizó la curva de calibración.

Para el segundo procedimiento de extracción el porcentaje de recuperación varió entre un 67 y un 73 %, estos resultados nos indican que con el uso de esta mezcla de solventes obtuvimos valores de recuperación ligeramente superiores a los obtenidos con las condiciones anteriores. Por otra parte, muestra una menor diferencia entre los porcentajes de recuperación al variar las concentraciones de contaminación. La precisión se encuentra alrededor de un 2 al 3 % como DSR. Otro hecho a destacar es que no hay necesidad de tratar los extractos, previo a la medida.

En vista a lo anteriormente descrito, concluimos en trabajar con la mezcla metanol-agua al 30-70 % y por lo tanto procedimos a cambiar los diferentes parámetros operacionales, con la idea de optimizar el procedimiento de extracción con este tipo de solventes.

6.3.3. Optimización de la extracción a 100°C.

- La primera opción fue aumentar la temperatura de 40 a 100 °C, en la tabla 14 se presentan las condiciones experimentales de extracción.

Solvente	Metanol-Agua (30:70)
Temperatura	100°C
Presión	1500 psi
Tiempo estática	5 min
Numero de ciclos de extracción	1
Tiempo de extracción total	16 min

Tabla 14.- Condiciones experimentales para la extracción a 100 °C.

En la tabla 15 se presentan los datos para la preparación de las muestras con las concentraciones de los patrones de arsénico añadidas. En la tabla 16 se observan las concentraciones de arsénico obtenidas experimentalmente en cada una de las muestras y los porcentajes de recuperación se muestran en la tabla 17. En la figura 21 se muestra un esquema gráfico de los porcentajes de recuperación.

Muestras de alga	Peso alga (g)	Concentración As (mg/L)	Alícuota añadida (mL)	Concentración de As añadido en el alga (µg/g)
1 (sin contaminar)	1,1298	0,0000	0,00	0,00
2 (sin contaminar)	1,0873	0,0000	0,00	0,00
3 (sin contaminar)	1,0834	0,0000	0,00	0,00
K-a	1,0234	0,1083	5,00	0,529
K-b	1,0231	0,1083	5,00	0,529
K-c	1,0876	0,1083	5,00	0,498
L-a	1,0632	0,2518	5,00	1,184
L-b	1,0546	0,2518	5,00	1,194
L-c	1,1020	0,2518	5,00	1,142
M-a	1,0342	0,5048	5,00	2,441
M-b	1,0081	0,5048	5,00	2,504
M-c	1,0465	0,5048	5,00	2,412
N-a	1,0675	0,7515	5,00	3,520
N-b	1,0023	0,7515	5,00	3,749
N-c	1,0985	0,7515	5,00	3,421
O-a	1,0765	1,0812	5,00	5,022
O-b	1,0834	1,0812	5,00	4,990
O-c	1,0021	1,0812	5,00	5,395

Tabla 15. Preparación de las muestras para la extracción a 100 °C.

Muestras	Volumen del extracto (ml)	Concentración de As en el extracto (mg/L)	Concentración de As en el alga (µg/g)
1 (sin contaminar)	26,0	ND	ND
2 (sin contaminar)	24,6	ND	ND
3 (sin contaminar)	25,4	ND	ND
K-a	26,7	< 0,02	< 0,5
K-b	25,8	< 0,02	< 0,5
K-c	24,4	< 0,02	< 0,5
L-a	24,9	0,035	0,81
L-b	24,9	0,034	0,80
L-c	25,4	0,035	0,81
M-a	23,1	0,075	1,66
M-b	23,6	0,073	1,70
M-c	23,5	0,076	1,70
N-a	24,7	0,108	2,49
N-b	23,4	0,102	2,39
N-c	22,6	0,112	2,31
O-a	25,9	0,152	3,66
O-b	25,9	0,154	3,68
O-c	25,4	0,142	3,60

Tabla 16. Concentración de arsénico obtenida para la extracción a 100 °C.

Muestra	% de Recuperación		
K-a	----	Promedio	----
K-b	----	s	----
K-c	----	% DSR	----
L-a	68,41	Promedio	69
L-b	67,26	s	2
L-c	71,32	% DSR	3,0
M-a	68,22	Promedio	69
M-b	67,97	s	1
M-c	70,31	% DSR	1,8
N-a	70,80	Promedio	67
N-b	63,67	s	4
N-c	67,46	% DSR	5,3
O-a	72,96	Promedio	71
O-b	73,74	s	4
O-c	66,65	% DSR	5,5

Tabla 17.- Porcentaje de recuperación para la extracción a 100 °C.

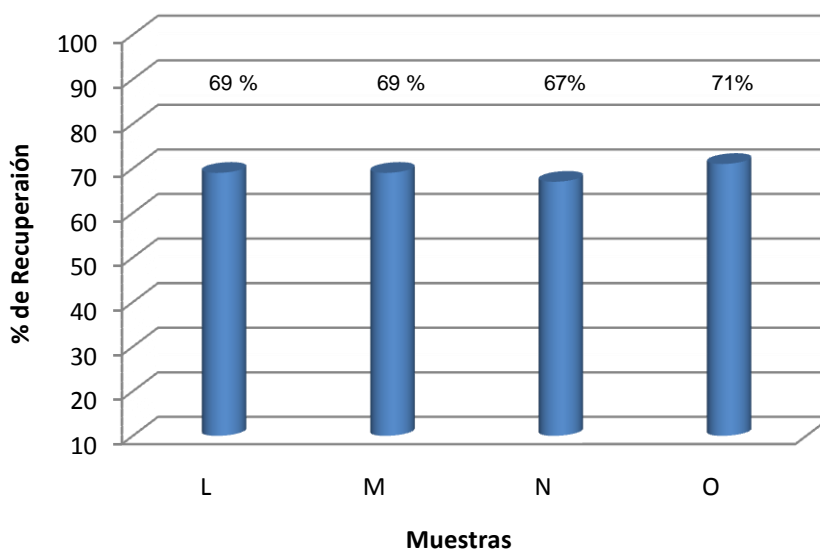


Figura 21. Gráfico de los porcentajes de recuperación para la extracción a 100 °C.

Los resultados observados en la tabla 17, no muestran un aumento considerable en el porcentaje de recuperación, el cual está alrededor del 70 %, lo que indica que un cambio de temperatura de 40 a 100 °C no aumenta de manera importante la recuperación. La reproducibilidad se mantiene más o menos estable.

El próximo parámetro por evaluar es el número de ciclos de extracción.

- La segunda opción fue aumentar un ciclo adicional de extracción, en la tabla 18 se presentan las condiciones experimentales de extracción.

Solvente	Metanol-Agua (30:70)
Temperatura	100°C
Presión	1500 psi
Tiempo estática	5 min
Numero de ciclos de extracción	2
Tiempo de extracción total	32 min

Tabla 18.- Condiciones experimentales para 2 ciclos de extracción.

En la tabla 19 se presentan los datos para la preparación de las muestras con las concentraciones de los patrones de arsénico añadidas. En la tabla 20 se observan las concentraciones de arsénico obtenidas experimentalmente para cada una de las muestras y los porcentajes de recuperación se muestran en la tabla 21. En la figura 22 se muestra un esquema gráfico de los porcentajes de recuperación.

Muestras de alga	Peso alga (g)	Concentración As (mg/L)	Alícuota añadida (mL)	Concentración de As añadido en el alga (µg/g)
1 (sin contaminar)	1,1178	0,0000	0,00	0,00
2 (sin contaminar)	1,0133	0,0000	0,00	0,00
3 (sin contaminar)	1,0724	0,0000	0,00	0,00
K-a	1,0321	0,1083	5,00	0,525
K-b	1,0232	0,1083	5,00	0,529
K-c	1,0789	0,1083	5,00	0,502
L-a	1,0623	0,2518	5,00	1,185
L-b	1,0934	0,2518	5,00	1,151
L-c	1,0987	0,2518	5,00	1,146
M-a	1,0294	0,5048	5,00	2,452
M-b	1,0079	0,5048	5,00	2,504
M-c	1,0501	0,5048	5,00	2,404
N-a	1,0632	0,7515	5,00	3,534
N-b	1,0021	0,7515	5,00	3,750
N-c	1,1021	0,7515	5,00	3,409
O-a	1,0689	1.0812	5,00	5,058
O-b	1,0756	1.0812	5,00	5,026
O-c	1,0018	1.0812	5,00	5,396

Tabla 19. Preparación de las muestras para la extracción en dos ciclos.

Muestras	Volumen del extracto (mL)	Concentración de arsénico en el extracto (mg/L)	Concentración de arsénico en el alga (µg/g)
1 (sin contaminar)	24,9	ND	ND
2 (sin contaminar)	25,1	ND	ND
3 (sin contaminar)	25,7	ND	ND
K-a	25,9	< 0,02	< 0,5
K-b	24,3	< 0,02	< 0,5
K-c	25,1	< 0,02	< 0,5
L-a	25,3	0,038	0,87
L-b	21,6	0,037	0,83
L-c	22,3	0,038	0,87
M-a	24,9	0,078	1,78
M-b	24,6	0,079	1,81
M-c	25,8	0,081	1,80
N-a	25,8	0,119	2,73
N-b	25,3	0,109	2,61
N-c	25,0	0,122	2,52
O-a	26,2	0,169	4,04
O-b	23,4	0,168	4,02
O-c	24,9	0,154	3,93

Tabla 20. Concentración de As obtenida para la extracción en dos ciclos.

Muestra	% de Recuperación		
	K-a	----	Promedio
K-b	----	s	----
K-c	----	% DSR	----
L-a	73,61	Promedio	74
L-b	71,89	s	2
L-c	76,26	% DSR	3,0
M-a	72,65	Promedio	73
M-b	72,33	s	1
M-c	74,99	% DSR	2,0
N-a	77,11	Promedio	74
N-b	69,61	s	4
N-c	73,81	% DSR	5,1
O-a	79,89	Promedio	78
O-b	80,02	s	4
O-c	72,84	% DSR	5,3

Tabla 21.- Porcentaje de recuperación para la extracción en dos ciclos.

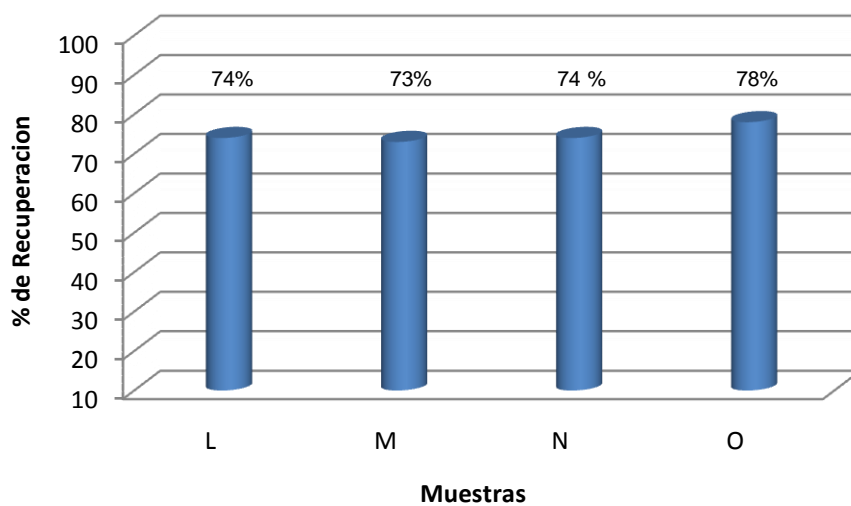


Figura 22. Gráfico de los porcentajes de recuperación para la extracción a dos ciclos.

Con este procedimiento se genera un incremento del 6 % sobre el porcentaje de recuperación, lográndose un promedio entre 75 a 76 %.

En vista de los resultados obtenidos, procedimos a incrementar a un nuevo ciclo de extracción.

- Como tercera opción se procede a realizar un ciclo más de extracción. En la tabla 22 se presentan las condiciones experimentales de extracción.

Solvente	Metanol-Agua (30:70)
Temperatura	100°C
Presión	1500 psi
Tiempo estática	5 min
Numero de ciclos de extracción	3
Tiempo de extracción total	48 min

Tabla 22.- Condiciones experimentales para tres ciclos de extracción.

En la tabla 23 se presentan los datos para la preparación de las muestras con las concentraciones de los patrones de arsénico añadidas. En la tabla 24 se observan las concentraciones de arsénico obtenidas experimentalmente en cada una de las muestras y los porcentajes de recuperación se muestran en la tabla 25. En la figura 23 se muestra un esquema gráfico de los porcentajes de recuperación.

Muestras de alga	Peso alga (g)	Concentración As (mg/L)	Alícuota añadida (mL)	Concentración de As añadido en el alga ($\mu\text{g/g}$)
1 (sin contaminar)	1,1348	0,0000	0,00	0,00
2 (sin contaminar)	1,0124	0,0000	0,00	0,00
3 (sin contaminar)	1,0254	0,0000	0,00	0,00
K-a	1,0215	0,1083	5,00	0,530
K-b	1,0231	0,1083	5,00	0,529
K-c	1,0906	0,1083	5,00	0,497
L-a	1,0582	0,2518	5,00	1,190
L-b	1,0236	0,2518	5,00	1,230
L-c	1,1023	0,2518	5,00	1,142
M-a	1,0292	0,5048	5,00	2,452
M-b	1,0079	0,5048	5,00	2,504
M-c	1,0501	0,5048	5,00	2,404
N-a	1,0688	0,7515	5,00	3,516
N-b	1,0021	0,7515	5,00	3,750
N-c	1,1001	0,7515	5,00	3,416
O-a	1,0801	1.0812	5,00	5,005
O-b	1,0855	1.0812	5,00	4,980
O-c	1,0024	1.0812	5,00	5,393

Tabla 23. Preparación de las muestras para tres ciclos de extracción.

Muestras	Volumen del extracto (mL)	Concentración de As en el extracto (mg/L)	Concentración de As en el alga ($\mu\text{g/g}$)
1 (sin contaminar)	24,9	ND	ND
2 (sin contaminar)	25,1	ND	ND
3 (sin contaminar)	25,7	ND	ND
K-a	26,6	< 0,02	< 0,5
K-b	25,7	< 0,02	< 0,5
K-c	24,5	< 0,02	< 0,5
L-a	24,8	0,038	0,89
L-b	24,7	0,037	0,89
L-c	25,5	0,038	0,88
M-a	23,3	0,079	1,80
M-b	23,5	0,079	1,83
M-c	23,6	0,081	1,83
N-a	24,8	0,118	2,75
N-b	23,6	0,113	2,67
N-c	22,4	0,125	2,55
O-a	25,8	0,168	4,01
O-b	25,5	0,172	4,05
O-c	25,2	0,158	3,96

Tabla 24. Concentración de arsénico obtenida para tres ciclos de extracción.

Muestra	% de Recuperación		
	K-a	----	Promedio
K-b	----	s.	----
K-c	----	% DSR	----
L-a	74,64	Promedio	77
L-b	72,54	s.	1
L-c	77,12	% DSR	1,5
M-a	73,28	Promedio	75
M-b	73,25	s.	2
M-c	75,93	% DSR	3,1
N-a	78,17	Promedio	74
N-b	71,23	s.	2
N-c	74,62	% DSR	2,1
O-a	80,18	Promedio	75
O-b	81,32	s.	3
O-c	73,51	% DSR	4,6

Tabla 25. Porcentaje de recuperación para la extracción para tres ciclos.

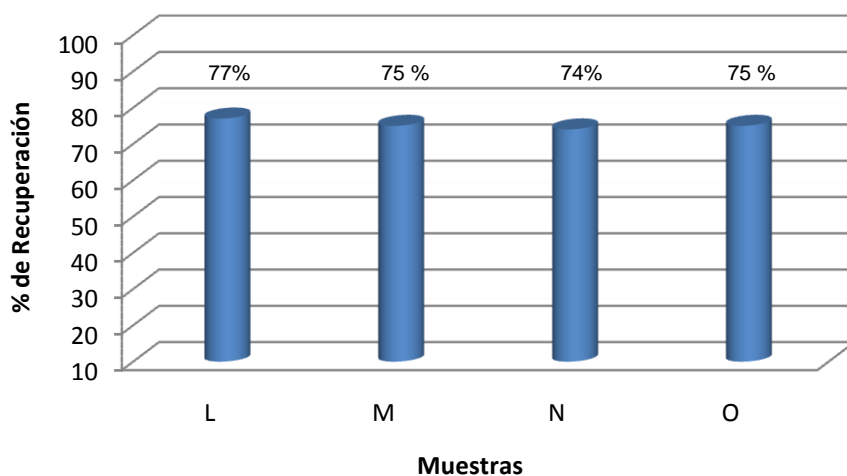


Figura 23. Gráfico de los porcentajes de recuperación para tres ciclos de extracción.

Para un tercer ciclo de extracción no se encontró un aumento apreciable en el porcentaje de recuperación, por otra parte el tiempo de extracción total aumentó a 48 minutos por muestra, haciendo en el análisis algo largo y tedioso. Por lo tanto, decidimos establecernos con las condiciones experimentales anteriormente alcanzadas, es decir la descrita en la tabla 18, con un máximo de dos ciclos de extracción.

Hasta esta etapa de la experimentación, la recuperación máxima obtenida no llegaba al 80 %, estaba en el promedio de un 76 %. En aras de aumentar este valor, hicimos una exploración para tratar de aumentar la efectividad en la extracción de arsénico. Nos dedicamos a analizar las influencias que pudiera tener los agentes no relacionados a los parámetros de extracción, entre ellos los consumibles relacionados con el material empleado en el contenedor de la celda, es decir, los dedales que envuelven la muestra y los filtros que se colocan en el fondo de la misma.

Notamos que los dedales y filtros originales se habían agotado y fueron sustituidos por unos elaborados en nuestros laboratorios. El dedal fue confeccionado con recortes de una hoja de papel de celulosa de algodón, marca Advantec, grado N^o. 5 A (equivalente al whatman 41), de un grosor de 0,22 mm. Pero el filtro estaba construido de un material particularmente grueso de composición desconocida y característicamente estos quedaban de un color “verdoso” intenso después de la extracción. Es por ello que enfocamos nuestra atención en la sustitución de estos filtros.

Reflexionando sobre que la eficiencia en la extracción de arsénico pudiera estar relacionado con absorción o adsorción irreversible por parte del filtro y en vista que no se podía hacer alguna extracción en ausencias de estos, decimos elaborar unos con recortes hechos del mismo material empleado para los dedales, es decir de papel de celulosa de algodón, marca Advantec de un grosor de 0,22 mm. Por ello procedimos a evaluar ambos filtros.

6.3.4. Evaluación de los filtros empleados en la extracción

Con las condiciones establecidas en la tabla 18 se preparó un estándar de arsénico y fue medido con el filtro original y con el filtro sustituto. Para ello decimos emplear una matriz más inerte que el alga, en su reemplazo empleamos arena de río muy bien lavada. En la tabla 26 se presenta la preparación de las muestras con el filtro original y el sustituto, en la tabla 27 la determinación experimental de arsénico para la evaluación de los filtros y en la tabla 28 por porcentajes de recuperación.

Muestras	Peso arena (g)	Concentración Patrón As (mg/L)	Alícuota agregada (mL)	Concentración de As añadida al alga (µg/g)
1 FO (sin contaminar)	1,2312	0,0000	0,00	0,0000
2 FO (sin contaminar)	1,0965	0,0000	0,00	0,0000
3 FO (sin contaminar)	1,1342	0,0000	0,00	0,0000
4 FO	1,1762	0,5048	5,00	2,1459
5 FO	1,0923	0,5048	5,00	2,3107
6 FO	1,1256	0,5048	5,00	2,2424
7 FS (sin contaminar)	1,1256	0,5048	0,00	0,0000
8 FS (sin contaminar)	1,1324	0,5048	0,00	0,0000
9 FS (sin contaminar)	1,0754	0,5048	0,00	0,0000
10 FS	1,0399	0,5048	5,00	2,4272
11 FS	1,0510	0,5048	5,00	2,4015
12 FS	1,0745	0,5048	5,00	2,3490

Tabla 26. Preparación de muestras para la evaluación de los filtros. Donde FO fue empleando filtro original y FS empleando filtro sustituto.

Muestras	Volumen (mL)	Concentración de As en el extracto (mg/L)	Concentración de As en el alga ($\mu\text{g/g}$)
1 FO (sin contaminar)	28,3	ND	ND
2 FO (sin contaminar)	28,6	ND	ND
3 FO (sin contaminar)	29,3	ND	ND
4 FO	28,3	0,0691	1,6635
5 FO	29,6	0,0621	1,6837
6 FO	29,1	0,0664	1,7180
7 FS (sin contaminar)	26,2	ND	ND
8 FS (sin contaminar)	26,5	ND	ND
9 FS (sin contaminar)	26,4	ND	ND
10 FS	26,0	0,0912	2,2799
11 FS	26,2	0,0904	2,2538
12 FS	26,3	0,0859	2,1037

Tabla 27. Determinación experimental de As para la evaluación de los filtros. Donde FO fue empleando filtro original y FS empleando filtro sustituto.

Muestras	Recuperación (%)	
4 (filtro original)	78	Promedio = 76%
5 (filtro original)	73	S = 3
6 (filtro original)	77	% DSR = 3,3
7 (filtro sustituto)	94	Promedio = 92
8 (filtro sustituto)	94	S = 3
9 (filtro sustituto)	90	% DSR = 2,7

Tabla 28. Porcentaje de recuperación de As en la evaluación de los filtros.

Como primera reflexión pudimos observar que las muestras preparadas en la matriz de arena de de rio con el filtro original, presentaron el mismo porcentaje de recuperación de las algas, las cuales habían sido medidas con el mismo filtro (del orden del 76 %). Es decir, que una vez optimizado el sistema de extracción, el efecto de aumentar la efectividad en el porcentaje de recuperación no es atribuible al tipo de matriz empleada. Por lo tanto, inferimos que el problema en la efectividad de la extracción pudiera estar influenciado por agentes externos al tipo de muestra o pudiera ser atribuido a las pérdidas naturales que ocurre en el ejercicio de la extracción.

Por otra parte, al hacer las extracciones con el nuevo filtro, se notó un aumento considerable del porcentaje de recuperación (16 %), llegando a un valor promedio del 92 %. Es decir que el filtro si era un factor determinante en la pérdida de efectividad del porcentaje de recuperación. No decidimos, repetir la experiencia con el dedal, ya que este estaba constituido del mismo material con que se elaboró el nuevo filtro.

En base a lo anteriormente examinado, procedimos a medir las muestras de algas bajo las condiciones de extracción establecidas en la tabla 18 y empleando el nuevo filtro elaborado.

6.3.6. Extracción de As en muestras de alga

Se realizo el proceso de extracción sobre el alga (sin contaminar) con la finalidad de poder observar alguna cantidad de arsénico en este tipo de algas, en la tabla 29 se observan las condiciones experimentales de trabajo, en la tabla 30 la preparación de estas muestras y en la tabla 31 los resultados obtenidos.

Solvente	Metanol-Agua (30:70)
Temperatura	100°C
Presión	1500 psi
Tiempo estática	5 min
Numero de ciclos de extracción	2
Tiempo de extracción total	32 min

Tabla 29. Condiciones para la extracción de las muestras de alga.

Muestras	Peso Alga (g)	Volumen de extracto (mL)
1	1,0140	23,2
2	1,0062	23,5
3	1,0106	23,2

Tabla 30. Preparación de muestras de algas.

Muestras	Concentración en el extracto (mg/L)	Concentración en el alga (µg/g)
1	ND	ND
2	ND	ND
3	ND	ND

Tabla 31. Concentración de arsénico en el alga sin contaminar.

De la tabla 40, podemos notar que en extracto de las muestra de algas en estudio, no se observó señal alguna de arsénico.

Tomando en cuenta que el porcentaje de recuperación anda en el orden del 90 %, para poder medir arsénico en los extractos, estos deberían presentar una concentración del orden del 0,03 mg/L (30 ppb, en una alícuota promedio de 25 mL), que llevados a la muestra sólida (alga) corresponde a un valor de 0,7 mg/Kg. Por lo tanto las algas estudiadas tienen un valor muy por debajo de 0,7 mg/Kg en arsénico.

8. CONCLUSION.

- Para la determinación de arsénico en muestras de algas, la Extracción Acelerada con Solventes arrojó resultados de recuperación del orden del 92 % con un DSR del 3%. Se logró implementar el método de extracción empleando solventes de relativo de bajo costo (metanol- agua al 30-70 % respectivamente), con tiempos de extracción de 32 minutos por muestra, pero pudiendo analizar hasta 12 muestras secuencialmente y de manera automatizada. De manera tal que pudiese ser considerada ideal para un análisis rutinario en el control de este tipo de procesos.
- El valor encontrado del porcentaje de recuperación (92 %) en conjunto con la técnica de medida (HG ICP OES), arrojó una cantidad mínima a medir sobre la muestra seca del orden de 0,6 mg/Kg. Este valor límite es ligeramente superior a los reportados recientemente para arsénico inorgánico por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria*. El valores para la exposición alimentaria humana publicados recientemente por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria* han sido disminuido a 0,03 mg/Kg para pescado y 0,1 mg/Kg para mariscos, no estableciendo aún valores para algas, pero es de esperar que sean superiores, ya que el consumo de este tipo de algas, son mucho menores que los de pescados y mariscos.

- Los valores de arsénico para las algas en estudio (Nori), no arrojaron valores detectables, muy por debajo de 0,7 mg/Kg.

* Publicado: 22 de 2009 por European Food Safety Authority. Última actualización: 1 de Febrero del 2010.

<http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3164/doc32428.html>

9. RECOMENDACIONES.

- Los valores detectados están por encima de los mínimos establecidos para la exposición alimentaria de arsénico, por lo cual es necesario disminuir aun mas los limites de detección, empleando otra técnica de cuantificación o mejorando el sistema utilizado en este trabajo.
- La extracción acelerada con solvente si bien es una técnica relativamente eficiente desde el punto de vista de la extracción propiamente dicho, está diseñada para emplear volúmenes relativamente grandes. Esto es bien representado por los volúmenes donde recolectan los extractos, del orden de 25 mililitros, es decir hay una gran efecto de dilución. Si pudiéramos recolectar los extractos en volúmenes menores, pudiéramos disminuir la cantidad detectable. Es por ello que las técnicas modernas de tratamiento de muestra tienden a emplear volúmenes cada vez más pequeños (SPE, MAE, etc).

10. BIBLIOGRAFIA.

- [1] Academia de Ciencias Exactas, Físicas, Químicas y naturales de Zaragoza; Química Clínica de Elementos Traza en Nuestra Comunidad; El Selenio. Ilmo. Sr. D. Ángel García de Jalón. Acto de su recepción solemne, Académico Numerario. Zaragoza 2001.
- [2] F.E. Brinckman y P.J. Sadler; Springer Verlag; The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes; Berlin; 1986.
- [3] H. Babich y G. Stotzky; Appl. Environment. Microbiol; 33, 681; 1977.
- [4] Skoog, Holler, Nieman. *Principios de Análisis Instrumental*. Editorial Mc-Graw Hill. Quinta Edición. España, 2001.
- [5] Selene C. H., Chou J., De Rosa C. T. Case studies - Arsenic. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 206 (2003) 381-386.
- [6] Rubinson K., Rubinson J., Analisis Instrumental, Editorial Prentice Hall. Primera edición, 2001.
- [7] Dietz C., Sanz J., Sanz E., Muñoz-Olivas R., Cámara C. *Current perspectives in analyte extraction strategies for tin and arsenic speciation*. Journal of Chromatography A, 1153 (2007) 114-129.
- [8] Mato-Fernandez M. J., Otero.Rey J. R., Moreda-Piñeiro J., Alonso-Rodriguez E., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo S., Prada-Rodriguez D. *Arsenic extraction in marine biological materials using pressurized liquid extraction*. Talanta, 71 (2007) 515-520.
- [9] Velásquez J. *Comparación de técnicas de extracción: Soxhlet y acelerada con solvent (ASE) de hidrocarburos aromáticos policíclicos en particulado atmosférico*

depositado en túneles del area metropolitana de caracas y su análisis por HPLC-UV y FLD. Tesis especial de grado, Facultad de Ciencias, UCV (2005).

[10] K., Landriault M., Fingas M., Llompert M. *Accelerated solvent extraction (ASE) of environmental organic compounds in soils using a modified supercritical fluid extractor. Journal of Harzardous Materials*, 102 (2003) 93-104.

[11] Herrero M., Martín-Álvarez P. J., Señoráns J. F., Cifuentes A., Ibáñez E., *Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from Spirulina platensis microalga*, *Food Chemistry* 93 (2005) 417–423.

[12] Bruce E. Richter,* Brian A. Jones, John L. Ezzell, and Nathan L. Porter; *Anal. Chem*, *Accelerated Solvent Extraction: A Technique for Sample Preparation*, 1996.

[13] A. Montaser; *Inductively coupled Plasma Mass spectrometry*, Wiley-VCH.1998.

[14] D. Gologhtly, *In Inductively Couple Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, VCH; 2^{da} Edición; 1992.

[15] S. Greenfield y A. Montaser; *Common RF Generators, Torch and simple Introduction Systems*, A. Montaser.

[16] D. Heitkemper y K. Wolnik; *Injection of Gaseous Simple into Plasmas*; A. Montaser y D. Gologhtly, *In Inductively Couple Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, VCH; 2^{da} Edición; 1992.

[17] A. Gustasson; *Liquid Sample Introduction into Plasmas*, A. Montaser y D. Gologhtly, *In Inductively Couple Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, VCH; 2^{da} Edición; 1992.

[18] C. McLeod, M.Routh y M. Tikkanen; *Introduction of solids into Plasmas*, A. Montaser y D. Gologhtly, *In Inductively Couple Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, VCH; 2^{da} Edición; 1992.

- [19] R. Gordon, R. Belmore, J. Beaty y I. Aginsky; *Solid Sampling Literatura Manual, Termo Jarrel Ash Corporation*.
- [20] L. Barry Sharp; *J Anal. At Spectrom*; Vol 3; 1988.
- [21] M. Ramsey, M. Thompsom y B. Coles; *Anal. Chem*; 55; 1983.
- [22] A. Gustasson; *Sprectochim Acta* 39B; 1987.
- [23] J. Wolcott y C. Sobel; *Appl. Spectrosc*; 36;1982.
- [24] M. Wichman, R.Fry, N.Nohamed; *Appl. Spectrosc*; 37; 1983.
- [25] A. Montaser, M. Minnich, J. Malean y H, Liu; *Simple Introduction in ICPMS In Inductively Couple Plasmas Spectrometry*, Wiley-VCH;1997.
- [26] R. Sturgeon y Z. Mester. *Applied Spectroscopy*; 56; 2002.
- [27] S. Maestre, J. Van Staden y H. Vliet; *J. Anal At. Spectrom*; 2. 1987.
- [28] L. Kempster, J. Staden, H. Vliet; *J. Anal. At. Spectrom*; 2; 1987.
- [29] D. Heitkemper, K. Wolnik. F. Fricke y J. Caruso; *Injection Of Gaseous Simple into Plasmas, In Inductively Couple Plasmas in Analytical Atomic Spectrotrometry*, Wiley-VCH; 2^{da} Edicion; 1992.
- [30] S. Rapsomanikis; *Analyst*; 119;1994.
- [31] M. Heisterkamp y F. Adam; *J. Anal. At. Spectrom*; 14; 1999.
- [32] Bruce A. Manning and Dean A., Martens *Speciation of Arsenic(W) and Arsenic(V) in Sediment Extracts by High-Performance liquid Chromatography-Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometry*
- [33] Molina H. *Determinación de As por EEA con ICP con generación de hidruros*. Trabajo especial de grado, Facultad de ciencias, UCV (2002).

- [34] Instituto Químico Biológico, <http://www.iqb.es/farmacologia/notas/ato02.htm>.
- [35] E. Denkhaus, A. Gulloch, X. Guo y B. Huang; *J. Anal. At. Spectrum*; 16; 2001.
- [36] M. Thompson, B. Pahlavanpour, S. Walton y G. Kirkbrigh; *Analyst*, 103;1978.
- [37] R. Sturgeon y Z. Mester; *Applied Spectroscopy*, 56;2002.
- [38] J. Dedina y L. Tsalev; *Hidryde Generation Atomic Absortion Spectroscopy*, Jhon Wiley and Sons Ltd; 1995.
- [39] W. Robins Y J. Caruso, *Ana. Chem*; 51; 1979.
- [40] Alessandro D'Ulivo; *Spectrochim. Acta*; B59;2004.
- [41] S. Pergantins, W. Winnik, E. Hietman y W. Cullen; *Talanta*; 44; 1997.
- [42] T. Ashino y Kunio Tacada, *Anal. Chim. Acta*,297;1994.
- [43] B. Welz y M. Sucmanova; *Anal. Chem*; 118;1993.
- [44] T.Nakahara; *Anal. At. Spectrosc*; 6;1983.
- [45] A. Canals, V. Hermandis y R. Browner; *Spectrochim. Acta*; 45B; 1990.
- [46] Luís R. Gómez . Gracybell D. Márquez .José R. Chirinos. *Dual nebulizer sample introduction system for simultaneous determination of volatile elemental hydrides and other elements*. 2006.
- [47] Lenntech. *Agua residual y purificación del aire*. Holding B. V. Rotterdamseweg, 402 M. 2629 HH. Delft, Holanda. <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/As.htm>.
- [48] Wang S., Mulligan N. C. *Occurrence of arsenic contamination in Canada: Sources, behavior and distribution*, Science of the Total Environment, 366 (2006) 701– 721

- [49] P. Smichowski, L. Valiente., *Selective Hydride Generation of Inorganic Arsenic Species and Subsequent Determination by Flow Injection-Hydride Generation-Atomic Absorption Spectrometry (FI-HG-AAS)*.
- [50] Yoshiaki Nakajima¹, Yoko Endo¹, Yoshinori Inoue², Kenzo Yamanaka³, Koichi Kato, Hideki Wanibuchi⁴ and Ginji Endo., *Ingestion of Hijiki seaweed and risk of arsenic poisoning*
- [51] Gallagher P., Shoemaker J., Wei X. Brockhoff-Schwegel C., Creed J. *Extraction and detection of arsenicals in seaweed via accelerated solvent extraction with ion chromatographic separation and ICP-MS detection*. Fresenius J. Anal. Chem., 369 (2001) 71-80.
- [52] Cava-Montesinos P., Nilles K., Cervera L. M., de la Guardia M., *Non-chromatographic speciation of toxic arsenic in fish*, Talanta 66 (2005) 895–901
- [53] Kritsana Jitmanee, Mitsuko Oshima, Shoji Motomizu., *Speciation of arsenic(III) and arsenic(V) by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry coupled with preconcentration System*.
- [54] Feng Y., Cao J. *Simultaneous determination of arsenic (V) and arsenic (III) in water by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using reduction of arsenic (V) by L-cysteine and a small co-centric hydride generator without a gas-liquid separator*. Analytica Chimica Acta 293 (1994) 211-218.
- [55] Falk K., Emons H. *Speciation of arsenic compounds by ion-exchange HPLC-ICP-MS with different nebulizers*. J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 643-649.
- [56] Mandal B., Ogra Y., Anzai K., Suzuki K. *Speciation of arsenic in biological samples*. Toxicology and Applied Pharmacology 198 (2004) 307-318.
- [57] García Salgado S., Quijano Nieto M.A., Bonilla Simón M. M. *Determination of soluble toxic arsenic species in alga samples by microwave-assisted extraction and high*

performance liquid chromatography-hydride generation-inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Journal of Chromatography A, 1129 (2006) 54-60.

[58] Ohno K., Yanase T., Matsuo Y., Kimura T., Hamidur Rahman M., Magara Y., Matsui Y. *Arsenic intake via water and food by a population living in an arsenic-affected area of Bangladesh*. Science of the Total Environment 381 (2007) 68-76.

[59] Darías, J., *Optimización de una metodología para la determinación de especies inorgánicas de arsénico empleando cromatografía iónica y espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado con generación de hidruros*. U.C.V. (2006)

[60] Virguez, L., *Desarrollo de un método para la determinación de especies de arsénico empleando extracción acelerada con solventes y posterior separación y determinación con IC-HG-ICP-OES*. 2008.

[61] Sauret, J., *Determinación de especies tóxicas de arsénico en muestras marinas, mediante extracción acelerada con solvente y determinación por cromatografía de intercambio iónico con generación de hidruros- Plasma inductivamente acoplado- Espectrometría de emisión óptica*, 2009.

[62] <http://www.spexcsp.com/sampleprep/catalog/aid37.html>

[63] <http://www.thermo.com/com/cda/product/detail/1,,10134637,00.html>

[64] Richter B., Jones B., Ezzel J., Porter. *Accelerated Solvent Extraction: A technique for sample preparation*. Analytical Chemistry 68 (1996) 1033-1039.

[65] Velásquez J. *Comparación de técnicas de extracción: Soxhlet y acelerada con solvente (ASE) de hidrocarburos aromáticos policíclicos en particulado atmosférico depositado en túneles del área metropolitana de Caracas y su análisis por HPLC-UV y FLD*. Tesis especial de grado, Facultad de Ciencias, UCV (2005)

- [66] Del Valle Franco, Noelia; *Evaluación de las técnicas de extracción con fluidos supercríticos (SFE) y acelerada con solvente (ASE) en rocas madre y yacimiento de Venezuela para su aplicación en el análisis geoquímico*; 1999.
- [67] Cumana Ríos, Jaime; *Evaluación de la técnicas de extracción Soxhlet y acelerada con solvente en muestras de ripios de pozos de petróleo*; 2000.
- [68] Velásquez, Johany; *Comparación de técnicas de extracción Soxhlet y acelerada con solvente (ASE) de hidrocarburos aromáticos policíclicos en particulado atmosférico depositado en túneles del área metropolitana de Caracas y su análisis por HPLC-UV y FLD*, 2005.
- [69] Application note 355, DIONEX; *Rapid extraction and determination of arsenicals in fish tissue and plant material using accelerated solvent extraction (ASE)*.
- [70] I Pizarro, M Gomez, C Camara, M A Palacios; *Arsenic speciation in environmental and biological samples extraction and stability studies*. 2003.
- [71] Kalam A Mir, Allison Rutter, Iris Koch, Paula Smith, Ken J Reiner, John S Poland; *Extraction and especiation of arsenic in plants grown on arsenic contaminated soils*, 2007.

