

Tesis de Posgrado

Sistemas de análisis en flujo continuo acoplados a analizadores discreto para la especiación en línea de Cadmio y Plomo

Fernández, Facundo Martín

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Fernández, Facundo Martín. (1999). Sistemas de análisis en flujo continuo acoplados a analizadores discreto para la especiación en línea de Cadmio y Plomo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3201_Fernandez.pdf

Cita tipo Chicago:

Fernández, Facundo Martín. "Sistemas de análisis en flujo continuo acoplados a analizadores discreto para la especiación en línea de Cadmio y Plomo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3201_Fernandez.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Sistemas de Análisis en Flujo Continuo
Acoplados a Analizadores Discretos para la
Especiación en Línea de Cadmio y Plomo

Facundo Martín Fernández
Mabel Beatriz Tudino



NOTICE: THE
MOUNTAIN



**Sistemas de Análisis en Flujo Continuo
Acoplados a Analizadores Discretos para la
Especiación en Línea de Cadmio y Plomo.**

Tesista: Lic. Facundo Martín Fernández

Director: Dra. Mabel Beatriz Tudino

Tesis presentada para optar al Título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

1999

On-line speciation of Cadmium and Lead by Flow Injection-Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry.

Abstract:

The coupling between an Electrothermal Atomization-Atomic Absorption Spectrometer and a Flow Injection manifold is presented. This system is used for the preconcentration and determination of Cd and Pb in sea water samples. The performance of the method in terms of Detection Limits, Sampling Frequency, Sensitivity and Repeatability are fully discussed. Figures of merit for the preconcentration process such as Preconcentration Efficiency and Enhancement factors are evaluated for different preconcentration materials (Chelex-100 and silica immobilized 8-hydroxyquinoline). The influence of different variables of the flow manifold on the retention of different metal species is also investigated.

The hyphenated technique was employed for Cd and Pb determination in certified reference materials (CASS-3) and South Atlantic sea-water samples. The metal contents in sea water at different sites is compared to those in algal tissues. A correlation was established between the bioaccumulation process and the metal speciation in sea water.

Different sorbents for the isolation of metal-organic complexes were compared for their use in the Flow Injection-preconcentration manifold. A new micro-analytical automatic method is proposed for the sequential solid-liquid extraction of the different fractions of toxic metals.

Keywords: Flow Injection, Graphite Furnace, Atomic Absorption Spectrometry speciation, lead, cadmium, micro-columns preconcentration, chelating materials.

Resumen:

En el presente trabajo se describe un método de análisis que consiste en el acople entre un sistema de preconcentración en flujo y un Espectrómetro de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica. El sistema se emplea en el análisis y especiación de metales tóxicos (Cd y Pb) en muestras de agua de mar. Los resultados obtenidos se analizan, enfatizando especialmente las figuras de mérito: límite de detección, frecuencia de análisis, repetitividad y sensibilidad.

Se realiza además, una evaluación crítica de la performance del sistema de preconcentración (eficiencia, factor de amplificación etc.) utilizando para la separación distintas resinas quelantes (Chelex-100 y 8-hidroxiquinolina inmovilizada sobre sílica). Se estudian las variables que afectan la retención de las distintas especies de los iones metálicos en los materiales antes mencionados y se modela el proceso de partición. Las resinas se comparan también en función de su morfología la que se determina mediante técnicas cromatográficas de exclusión.

El sistema de preconcentración se aplica al análisis de materiales de referencia certificados (CASS-3) y a muestras de agua de mar patagónica (Comodoro Rivadavia). Los resultados se comparan con las concentraciones intracelulares de metales en algas que habitan la zona y se establece una relación entre la bioacumulación de los mismos y su especiación en el ambiente marino.

Se comparan, además, distintos materiales para la retención de complejos orgánicos de los metales tóxicos los que se incorporan a micro-sistemas de análisis automático. Se realiza la valoración de las distintas fracciones mediante extracción secuencial líquido-sólido de cada una de ellas.

Palabras clave: Análisis en Flujo, Horno de Grafito, Espectrometría de Absorción Atómica, especiación, cadmio, plomo, preconcentración, materiales quelantes.

Quiero dedicar este trabajo a:

A Caro, por su amor.

A papá, por su presencia incondicional y su inspiración.

A mamá, por su fuego y su fuerza.

A mi hermano, por ser el mejor.

A Julio, por ser mi amigo.

Agradecimientos

A los miembros del Laboratorio de Análisis de Trazas:

A Mabel Tudino, por no fallarme nunca, por estar siempre ahí, por darme confianza en mi trabajo y por guiarme en los momentos difíciles.

A Osvaldo Troccoli, por mostrarme que no debemos conformarnos con poco, por sus ideas, por sus críticas y por recordarme siempre que debemos ir mas allá de lo académico.

A Liliana d'Huicque, por su ayuda incondicional, por su cariño y aliento y por escucharme cuando hubo conflictos.

A Jorge Stripeikis, por enseñarme a dar mis primeros pasos en ETA-AAS.

A Pancho y a Nano, (los “twins”) por generar un grupo de tesis de los cuál estoy muy orgulloso.

A Moon, por mostrarme lo importante que es hacer investigación sin olvidar la buena docencia.

A Maia, por ser una excelente docente y mejor investigadora. Por trabajar juntos.

A Sergio, por su calidad humana.

A Hernán, por pensar y cuestionar.

A mis compañeros del 3er. piso (Mati, Koko, Galo, Tegli, Costa) por hacer mejores estos años.

A mis amigos de Fisiología de Insectos, por la buena onda

Al Dr. Roberto Fernández Prini, por permitirme utilizar la infraestructura del INQUIMAE.

Al Dr. Horacio Mottola, por la inspiración.

Al Dr. Karel Jerabek, por las medidas ISEC y la por interpretación de los resultados.

Al Dr. Abraham Warshawsky, por su calidez, por su consejo y por sus enseñanzas sobre soportes de extracción.

Al Dr Kaufman de Biosix S.A. por facilitarme muestras de las mas diversas resinas.

A la Dra Mireille Perec, por facilitarme la adquisición de los espectros FTIR.

A la división Polímeros del INTI por el análisis GPC de los ácidos húmicos.

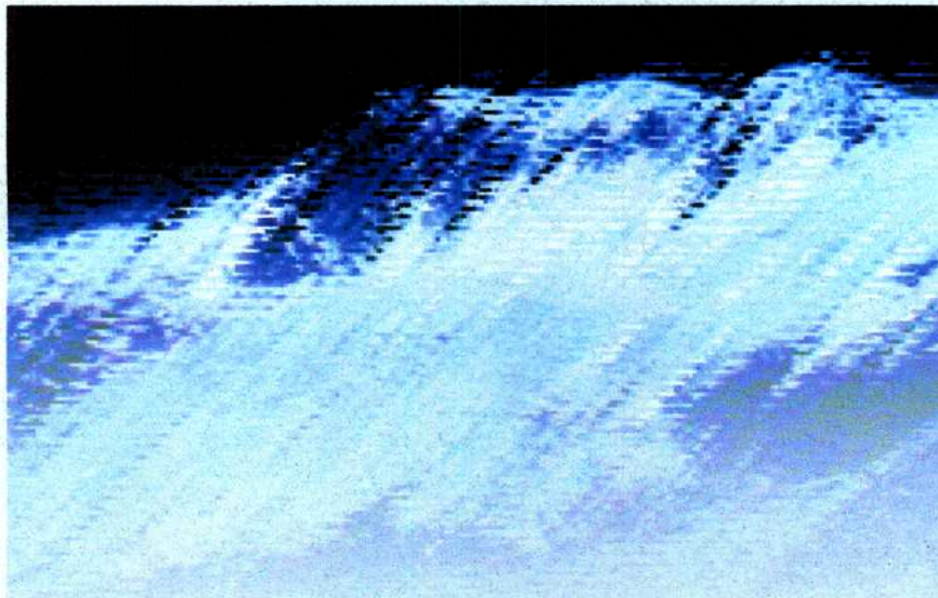
A la Universidad de Buenos Aires, por brindarme la posibilidad de hacer mis estudios de doctorado sin problemas económicos.

INTRODUCCIÓN	9
DOS DÉCADAS DE USO Y ABUSO DE LA PALABRA ESPECIACIÓN.	12
LOS COMIENZOS DEL ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN.	14
EL USO DE VOLTAMETRÍAS EN EL ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN.	15
ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA: ¿UNA CONTRADICCIÓN?	17
CROMATOGRAFÍAS ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍAS ATÓMICAS.	18
ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (FI-AAS): ¿UN BUEN MATRIMONIO PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN?	21
SEPARACIÓN Y PRECONCENTRACIÓN EN FI-AAS.	23
ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN MEDIANTE FI-AAS.	25
ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO ACOPLADO A DETECTORES DE OPERACIÓN DISCRETA: FI-ETA-AAS. ¿QUÉ APORTAN EN EL ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN?	27
1 CAPÍTULO 1: DISEÑO DE UN SISTEMA FI-ETA-AAS PARA LA PRECONCENTRACIÓN DE CD Y PB A NIVELES DE ULTRATRAZAS. ANÁLISIS DE AGUA DE MAR.....	30
1.1 INTRODUCCIÓN	30
1.2 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
1.2.1 <i>Parámetros para la evaluación del proceso de preconcentración.</i>	38
1.2.2 <i>El proceso de preconcentración.</i>	40
1.2.3 <i>Separación del Analito de su Matriz.</i>	42
1.2.4 <i>Elución dentro del horno de grafito.</i>	43
1.2.5 <i>Blancos</i>	44
1.2.6 <i>Operación del Horno de Grafito.</i>	45
1.2.7 <i>Resultados para Materiales de Referencia.</i>	45
2 CAPÍTULO 2: OPTIMIZACIÓN DE LA ETAPA DE SEPARACIÓN. NUEVOS SOPORTES QUELANTES: PRECONCENTRACIÓN CON 8-HIDROXIQUINOLINA INMOVILIZADA SOBRE SÍLICA.....	51
2.1 FACTORES CRÍTICOS EN LA SEPARACIÓN ANALÍTICA DE IONES	51
2.2 INTERCAMBIO IÓNICO Y QUELACIÓN	53
2.3 POLÍMEROS ORGÁNICOS: RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO.	57
2.4 MATERIALES INORGÁNICOS	60
2.5 MATERIALES ORGÁNICOS IMPREGNADOS MEDIANTE INTERACCIONES ESPECÍFICAS E INESPECÍFICAS: "RESINAS IMPREGNADAS"	61
2.5.1 <i>Aplicaciones analíticas de las resinas impregnadas: Desde la Cromatografía de Extracción hasta los sistemas FLA. "Quelación en solución".</i>	62
2.6 LA INMOVILIZACIÓN DE MOLÉCULAS EN QUÍMICA ANALÍTICA.	64
2.7 PARÁMETROS QUE CARACTERIZAN AL SOPORTE SÓLIDO DE LOS MATERIALES INTERCAMBIADORES.	66
2.8 MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE MATERIALES QUELANTES.....	67
2.8.1 <i>Cromatografía de Exclusión Inversa.</i>	67
2.9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	69
2.9.1 <i>Síntesis y caracterización de I-HOx.</i>	69
2.9.2 <i>Comparación de la morfología de Chelex-100 e I-HOx.</i>	71
2.9.3 <i>Optimización de variables en la retención de metales por I-HOx: flujo de operación y pH de preconcentración.</i>	74
2.9.4 <i>Calibrado y Validación con I-HOx.</i>	76
2.9.5 <i>Comparación de las Figuras de Mérito para I-HOx y Chelex-100.</i>	77
2.9.6 <i>Comparación de las velocidades medias de quelación.</i>	78
2.9.7 <i>Experiencias con Resinas Impregnadas.</i>	78
3 CAPÍTULO 3: ESTUDIO DETALLADO DE LAS FIGURAS DE MÉRITO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS MEDIANTE FI-ETA-AAS.....	105
3.1 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	105
3.1.1 <i>Las Reglas de Oro de la validación de métodos analíticos.</i>	106
3.1.2 <i>Distintas clases de validaciones internas.</i>	107
3.2 PRECISIÓN	108
3.3 ROBUSTEZ	109

3.4	EXACTITUD.....	110
3.5	RANGO LINEAL DE LAS CURVAS DE CALIBRADO.....	111
3.6	LÍMITES DE DECISIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN.....	113
3.6.1	<i>Límite de detección:</i>	114
3.6.2	<i>¿Cómo logramos una probabilidad de falso negativo menor al 50%?</i>	115
3.6.3	<i>Determinación de los límites de detección a través de la curva de calibrado.</i>	116
3.7	SENSIBILIDAD.....	119
3.8	SELECTIVIDAD.....	119
3.9	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	120
3.9.1	<i>Análisis de la repetitividad del sistema.</i>	120
3.9.2	<i>Curvas características de detección: cálculo de límites de detección para distintos valores de probabilidad de error del tipo I y II. (α y β)</i>	123
3.9.3	<i>Influencia del tiempo de preconcentración en el LOD y el Ambito Lineal de calibrado.</i>	124
3.9.4	<i>Frecuencia de análisis.</i>	127
3.10	APÉNDICE: CÁLCULO DEL LOD PARA DISTINTOS TIEMPOS DE PRECONCENTRACIÓN:.....	137
4	CAPÍTULO 4: METALES PESADOS: INFLUENCIA DE LA FORMA QUÍMICA EN SU INCORPORACIÓN A ORGANISMOS VIVOS.....	139
4.1	BIODISPONIBILIDAD Y BIOACUMULACIÓN DE METALES PESADOS.....	139
4.2	MECANISMOS DE INCORPORACIÓN DE METALES A ORGANISMOS VIVOS.....	141
4.2.1	<i>Transporte a través de la membrana celular</i>	142
4.2.2	<i>Transferencia de los metales desde la solución a la superficie celular.</i>	143
4.3	BIOACUMULACIÓN Y PRECONCENTRACIÓN POR INTERCAMBIO IÓNICO.....	147
4.4	¿PORQUÉ ESTUDIAR LA BIOACUMULACIÓN DE Cd Y Pb?.....	147
4.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	150
5	CAPÍTULO 5: CARACTERIZACIÓN DE LA FRACCIÓN LÁBIL DE CADMIO.....	158
5.1	ESPECIACIÓN POR DISCRIMINACIÓN CINÉTICA.....	158
5.2	POLÍMEROS NATURALES COMPLEJANTES DE METALES PESADOS.....	160
5.3	ESPECIACIÓN POR EFECTO DE TAMIZ MOLECULAR.....	163
5.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	165
5.4.1	<i>Ligandos que acompañan al cadmio en aguas naturales. Cálculo de concentraciones de especies en el equilibrio en soluciones modelo.</i>	165
5.4.2	<i>Especiación de Cd en presencia de materia orgánica disuelta. Complejación por compuestos húmicos.</i>	168
5.4.3	<i>Labilidad en función de la concentración de ligandos para las soluciones modelo</i>	170
5.4.4	<i>Especiación por discriminación cinética: consideraciones generales.</i>	173
5.4.5	<i>La influencia del flujo de muestra</i>	174
5.4.6	<i>Comparación de técnicas de especiación por discriminación cinética.</i>	180
5.4.7	<i>Efectos adicionales: influencia de la morfología de las resinas sobre los tiempos de contacto.</i>	182
5.4.8	<i>Apéndice al Capítulo 5.</i>	196
6	CAPÍTULO 6: ESPECIACIÓN DE CADMIO POR EXTRACCIÓN SECUENCIAL EN UN SISTEMA FIA-ETA-AAS BICOLUMNA.....	198
6.1	INTRODUCCIÓN:.....	198
6.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	201
6.2.1	<i>Grupos funcionales presentes en los ácidos húmicos. Selección de resinas para su extracción.</i>	201
6.2.2	<i>Capacidad dinámica de distintos materiales para la retención de ácidos húmicos.</i>	205
6.2.3	<i>Curvas de elución de ácidos húmicos. Operación del horno de grafito: influencia del eluyente.</i>	207
6.2.4	<i>Esquema de análisis con dos columnas en serie.</i>	209
6.2.5	<i>Calibrado del Sistema Bicolumna. Blancos. Figuras de mérito.</i>	211
6.2.6	<i>Validación del procedimiento.</i>	213
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	220
7.1	REACTIVOS Y SÍNTESIS.....	220
7.1.1	<i>Reactivos usados para la preconcentración utilizando Chelex-100:</i>	220
7.1.2	<i>Reactivos usados para la preconcentración utilizando I-HOx:</i>	220

7.1.3	Reactivos utilizados en la extracción de metales con Resinas Impregnadas.	221
7.1.4	Síntesis de I-HOx	221
7.1.5	Síntesis de la Resina Impregnada SIR-1	222
7.1.6	Reactivos y preparación de soluciones modelo para estudios de especiación por discriminación cinética.	223
7.1.7	Materiales ensayados para la retención de la fracción Inerte de Cd (CdL_2)	224
7.1.8	Reactivos usados en la retención y elución de CdL_2 de distintas resinas.	225
7.2	APARATOS	225
7.2.1	Instrumentos	225
7.2.2	Componentes del sistema de preconcentración FIA	226
7.2.3	Comando electrónico de las válvulas solenoides del sistema de preconcentración.	228
7.2.4	Componentes del sistema FIA bicolumna para la especiación operacional de Cd. Modificaciones a las microcolumnas. Calibrado de volúmenes en el sistema bicolumna.	229
7.3	PROCEDIMIENTOS	231
7.3.1	Procedimiento de preconcentración de Cd y Pb usando el sistema FI-ETA-AAS usando Chelex-100 como soporte.	231
7.3.2	Procedimiento para la caracterización morfológica de Chelex-100 e I-HOx	232
7.3.3	Procedimiento de Determinación de Capacidad de I-HOx	232
7.3.4	Procedimientos para la extracción en columna con resinas impregnadas.	233
7.3.5	Procedimiento para la determinación de Cadmio con I-HOx como soporte mediante FI-ETA-AAS.	233
7.3.6	Procedimiento para el estudio de la repetitividad volumétrica del sistema.	234
7.3.7	Cálculo de las curvas características de detección.	235
7.3.8	Cálculo de los límites de detección para distintos tiempos de preconcentración:	235
7.3.9	Toma y acondicionamiento de las muestras para los estudios de bioacumulación.	235
7.3.10	Procedimiento de digestión por microondas de algas del Atlántico Sur.	236
7.3.11	Determinación de Metales Pesados en algas y muestras de agua de mar.	237
7.3.12	Titulaciones Complejométricas de Ácidos Húmicos. Modelado y Ajuste de las curvas de Titulación.	237
7.3.13	Determinación de las masas moleculares de la solución de ácidos húmicos.	238
7.3.14	Experiencias para determinar la influencia del flujo de la solución sobre la recuperación de Cd de soluciones que contienen EDTA.	239
7.3.15	Procedimiento para la determinación de la capacidad dinámica de distintas resinas.	239
7.3.16	Procedimiento de preconcentración, elución y análisis con un sistema FIA bicolumna para la especiación de Cd.	240
8	CONCLUSIONES	257
9	REFERENCIAS	261

INTRODUCCION



Los planetas del sistema solar comenzaron a solidificarse en las tinieblas por la condensación de una nebulosa fluida y uniforme. Todo estaba frío y oscuro. Mas tarde, el sol empezó a concentrarse hasta reducirse casi a las dimensiones actuales, y en ese esfuerzo la temperatura subió a miles de grados y empezó a emitir radiaciones en el espacio. Italo Calvino. Las Cosmicómicas (1985)

La creación del universo tal como lo conocemos hoy es un tema sobre el cuál siempre me gustó especular. Desde chico siempre imaginé un gran espacio donde tenues neblinas de gas se condensaban en breves espirales. Probablemente todos estos pensamientos oníricos fueron producidos por una sobredosis de Asimov mezclada con varias inyecciones periódicas de Lovecraft. De vez en cuando sigo pensando en ese gran vacío silencioso que me hacía temblar cuando era chico. Ahora ya no me da vértigo mirar en esas profundidades sino que deseo comprenderlo.

Introducción

Desde los comienzos de la historia, el hombre ha utilizado los elementos naturales (que se distribuían de acuerdo a lo establecido por los ciclos geológicos y atmosféricos) como materias primas para la fabricación de distintos productos que facilitaban sus tareas y mejoraban su calidad de vida. Como resultado de la explotación y procesamiento de estos elementos el hombre ha alterado las características de su hábitat. Así, con el transcurso del tiempo y de las diferentes civilizaciones el hombre se ha “servido” del ambiente en el que vive y lo ha modificado, sin demasiada previsión de las consecuencias de tal modificación.

Durante mucho tiempo se ha asimilado el concepto de “civilización” al de avance tecnológico pero es mucho mas que eso. Civilización define un estado material, intelectual y moral avanzado en el que el hombre adquiere la capacidad de resolver problemas mediante el uso de la razón. Este uso de la razón debería llevar al hombre a evitar la destrucción voraz del ambiente, a cuidarlo y vivir con el en armonía.

A partir de la denominada “revolución industrial” del siglo XVIII, el hombre produce desarrollos tecnológicos fundamentales: la mecanización de la industria y la agricultura, la aplicación de la fuerza motriz, el desarrollo del sistema fabril, las grandes mejoras en los transportes y las comunicaciones, etc. A mediados del siglo pasado, en la llamada “segunda revolución industrial”, se suceden cambios aún más drásticos: la sustitución del hierro por el acero como material industrial básico, el reemplazo del

vapor por los derivados del petróleo, la electricidad, la invención del motor de combustión interna que revoluciona el transporte, etc.

Es interesante notar que muchos de estos grandes desarrollos tecnológicos provinieron del campo de la química sintética: la primer anilina, la fabricación de aspirina, sacarina, fenol, etc. Luego se comenzaron a fabricar productos hoy esenciales tales como el papel a partir de pulpa de madera, los plásticos, los cauchos sintéticos y también se mejoró la refinación de naftas. Con el inicio de la Industria Química a gran escala, la consolidación del sistema fabril y el crecimiento exponencial de los transportes, se inició la generación de grandes cantidades de desechos antes desconocidos en el ambiente.

A comienzos de nuestro siglo, se evidencian los primeros aportes de la física a las distintas áreas del conocimiento. Se descubren los rayos X, el uranio y el radio. Lorentz, Rutherford y Bohr crean las bases de la actual concepción de la materia. Hahn consigue por primera vez dividir un átomo de uranio bombardeándolo con neutrones. A mediados de siglo Fermi pone en marcha el primer reactor nuclear en Chicago dando inicio a la era atómica.

Actualmente, las centrales nucleares son sólo el agente mas visible de la contaminación del medio ambiente y se han convertido en blancos fáciles de los grupos ecologistas. Pero las grandes ciudades y, en mayor medida, las industrias son los responsables de la contaminación del ambiente. Si bien los avances tecnológicos de los últimos dos siglos han sido enormes y no podríamos vivir sin ellos, también ha sido enorme la ignorancia que nos ha llevado a descuidar nuestro hábitat creyéndolo “autodepurable”.

Son varios los agentes responsables de la contaminación de nuestros recursos. En el caso particular de las aguas naturales, los metales resultan de extrema peligrosidad dado que son empleados extensivamente como materias primas y generan desechos que, dadas su dificultad de remoción y facilidad de absorción por los organismos vivos, los transforman en serios “destructores” del ambiente.

Los contaminantes metálicos se agrupan bajo el nombre de “metales pesados”. Los metales pesados son aquellos elementos de la primera serie de transición (incluyendo al Zn, números atómicos 21 al 30), los de la segunda serie de transición (incluyendo al Cd, números atómicos 39 al 48) y los de la tercera serie de transición (incluyendo al Hg, números atómicos entre 72 y 80). Si bien no es correcto, la mayoría

de las veces se incluyen el As y el Pb como metales pesados simplemente por “uso y costumbre”.

Los compuestos que contienen metales pesados tienen la característica única de la persistencia. Se diferencian así de los contaminantes orgánicos ya que, los metales pesados no pueden ser degradados. Además interactúan fuertemente con los organismos vivos resultando, en su mayoría, sumamente tóxicos aún a muy bajas concentraciones. Esta interacción es extremadamente dependiente de la forma química en la que se encuentren, lo que determina que atraviesen o no la pared celular del ser vivo.

Por lo que dijéramos más arriba, muchos químicos analíticos han dedicado esfuerzos a la valoración de metales pesados en aguas naturales y en los organismos en contacto con ellas. Estos, son caminos ineludibles para “calificar” el grado de contaminación de un recurso natural y remediarlo.

El control de la concentración de metales pesados en aguas naturales tiene una importancia fundamental y, en este sentido, la mayoría de los países cuenta con legislación cada vez mas estricta con respecto a la calidad de sus recursos hídricos en función del uso que habrá de dárseles.

A comienzos de la década del '90 nuestro país comenzó a legislar sobre el contenido de contaminantes en aguas, suelos y aires, lo que derivó en la Ley de Residuos Peligrosos (Ley No. 24051), actualmente en vigencia. La observación de los niveles máximos tolerables de cada sustancia peligrosa o tóxica establecidos en la legislación nos obliga a desarrollar y poner en práctica nuevos y mejores métodos de análisis.

Pero, ¿qué quiere decir “método mejor”? La respuesta depende del objetivo para el cuál el método se desarrolla. Si el objetivo es la determinación puntual de la concentración de un metal, los métodos son mejorados en función de su **precisión, exactitud y límite de detección**. Si buscamos la evolución espacial o temporal de la concentración de un elemento (generación de perfiles de concentración), a las condiciones anteriores se les suma la necesidad de procesar una alta cantidad de muestras y de poder discriminar entre distintos rangos de concentración. Se agregan entonces otras figuras de mérito: **la frecuencia de análisis y la sensibilidad**.

En algunos casos, el análisis ambiental, requiere determinar la cantidad “biodisponible” de un elemento dado*, o bien su fracción más tóxica, lo que obliga a

* Entendemos por “biodisponible” la cantidad de un metal pesado asimilable por un organismo vivo.

agregar otro requerimiento: la identidad molecular. En este caso la figura de mérito prioritaria es la **selectividad o especificidad**.

Esta evolución en las exigencias de calidad de los métodos de análisis promovió el desarrollo de nuevas técnicas instrumentales, actividad catalizada por el avance de la microelectrónica y la informática. Para ejemplificar esta evolución podemos recurrir a los cambios producidos en las últimas dos décadas en los límites de detección instrumentales (LOD, "Limit of Detection") de distintas técnicas para la valoración de elementos metálicos "traza" (Tabla I-1). En la Tabla se puede observar que para un mismo elemento y una misma técnica, con el correr del tiempo, los límites de detección mejoran. A modo de ejemplo, se pueden ver cambios en el LOD de un dado elemento obtenidos merced al desarrollo instrumental en técnicas basadas en el mismo principio: la Espectrometría de Emisión Atómica (AES) evoluciona de la llama al plasma y del transductor de fotones a corriente al detector de masas; la Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) desde los nebulizadores/atomizadores continuos (altamente ineficientes en la producción de niebla) a los atomizadores discretos como el horno de grafito donde toda la muestra es introducida en el atomizador. Las voltametrías muestran mejoras importantes en el "muestreo" y "medición" de diferencias de potencial y nanocorrientes. Por otro lado, se introducen mejoras del tipo "químico" consistentes en aislar el elemento de la matriz de la muestra o concentrarlo utilizando separaciones químicas "en línea" (on-line) y "fuera de la línea" (off-line) tal como describiremos luego.

Dos décadas de uso y abuso de la palabra especiación.

La caracterización y cuantificación de la forma química de los elementos se conoce como "especiación". La definición popular de la palabra especiación no proviene del campo de la química sino de la biología, que la utiliza, en general, para describir la evolución de las distintas especies vivientes.

En un sentido químico, la palabra especiación admite diversos usos que es necesario explicitar¹. Desde la década del '70 se han propuesto muchas definiciones utilizándose los términos "especiación" y "análisis de especiación" de modo indistinto. La IUPAC define especiación como *"el proceso que produce evidencia de la forma atómica y molecular de un analito"*. Existen también otras definiciones como la de Caroli² relacionadas con el uso ambiental del término: *"[especiación es] identificar y cuantificar los riesgos que las distintas formas de un analito inorgánico pueden*

producir a la salud y al medio ambiente". A lo largo de nuestro trabajo adoptaremos definiciones mas prácticas. En un sentido general, definiremos la especiación de un elemento químico como la distribución del total de dicho elemento entre las distintas formas químicas en las que pueda existir. Por ejemplo, la especiación del cromo en aguas naturales será la manera en la que éste se distribuye entre Cr(III), Cr(VI) y los complejos orgánicos e inorgánicos de ambas formas.

Desde el punto de vista de la Química Analítica, "especiación" es la forma abreviada para el "análisis de especiación" o sea, la identificación y cuantificación individual de la concentración de las distintas formas químicas de un elemento en diferentes fases; lo que traslada el problema a definir "especies".

Las especies pueden definirse desde distintos puntos de vista: funcional, operacional, o como compuestos químicos específicos.

Son funcionales aquellas especies "disponibles para las plantas" o "móviles" o "biológicamente activas". En la especiación operacional, definimos fracciones de especies y no especies individuales. Estas fracciones están operacionalmente definidas por el proceso de separación, extracción o análisis utilizado : i.e. "soluble en ácido diluido", "intercambiable por carbonatos", "reducible", "oxidable", "inerte", etc. Para que sea de cierta utilidad, una fracción definida operacionalmente debe tener correlación con una fracción definida funcionalmente. Como las distintas fracciones operacionales dependen del proceso de fraccionamiento, debemos ser cuidadosos con la significación funcional de cada una de ellas. Las especies, entendidas como "compuestos químicos definidos" en distintas fases (solución, sólido, etc.) son las mas difíciles de analizar, ya que se requieren instrumentos de alta selectividad y sensibilidad. En su gran mayoría los desarrollos analíticos se han basado primero en distinguir especies con distinto estado de oxidación (Cr(III)/Cr(VI), As(III)/As(V), Se(IV)/Se(VI) etc.) y mas recientemente, especies moleculares mas complejas (complejos de coordinación orgánicos, compuestos organometálicos)³ para todos los estados de oxidación.

En el análisis de especiación, las muestras mas estudiadas han sido las líquidas, seguidas por las gaseosas y finalmente las sólidas. Esto se debe a que la mayoría de los métodos de análisis utilizan la vía húmeda y, en el propio proceso de solubilización, las muestras sólidas sufren transformaciones que les hacen "perder" la información sobre "especies". Mas allá del estado de agregación de la muestra, siempre es necesario ser muy cuidadoso durante la toma y preservación de la muestra para no modificar el sistema logrando así que la etapa de análisis arroje resultados que representen la

situación original. En sistemas inestables como las cuplas redox, se pueden producir cambios en la concentración de las distintas especies y no es raro encontrar que distintos tratamientos previos al análisis produzcan distintos resultados finales en “términos” de especies.

Los comienzos del análisis de especiación.

En los comienzos de la década del '50, los científicos del área de la Geoquímica realizaron la primera especiación operacional en aguas distinguiendo entre los metales solubles y los presentes en el material particulado⁴. Esta distinción se hizo a través de un filtro de membrana de 0.45 micrones de tamaño de poro, lo que permitió la discriminación de los metales presentes en ambas fases. Junto a estas separaciones físicas, el desarrollo de la electroquímica analítica permitió distinguir entre los metales libres y los complejados en solución. Sin embargo, los límites de detección eran pobres y los elementos factibles de valorar, muy pocos. Los primeros esquemas de especiación fueron publicados por Florence^{5, 6} quien diferenciaba entre distintas fracciones de metales utilizando cuidadosos procedimientos manuales de preconcentración, separación y análisis (esencialmente voltametría y espectrometría de absorción atómica).

A mediados de los años '60, se producen nuevos avances en el análisis de especiación: Kolb desarrolla el primer acoplamiento exitoso entre un cromatógrafo gaseoso y un espectrómetro de absorción atómica con llama que utiliza en la determinación de tetra-alquil plomo en gasolinas{Kolb, 1966 #97y Tessier diseña una extracción secuencial de metales en suelos⁷ que todavía hoy se sigue utilizando. A diferencia de la especiación operacional realizada por Tessier, el método de Kolb fue el primero en valorar una especie química en particular. Simultáneamente con estos desarrollos experimentales, se avanza en el uso de algoritmos para el cálculo de la composición de sistemas químicos complejos mediante la resolución de conjuntos de ecuaciones que involucran a las concentraciones en el equilibrio de distintas especies¹. Los resultados obtenidos con esta metodología son dependientes de los parámetros con los que se inicia el proceso iterativo, es decir de la forma en que se “alimenta” el programa de cálculo. En general, se requiere la concentración total de todos los componentes (para lo cuál hace falta un análisis químico previo) y un juego de constantes de equilibrio operacionales confiable.

Todos los esquemas mencionados mas arriba han sido mejorados con el tiempo. En el caso particular del “análisis de especiación” se está trabajando con una gran variedad de técnicas analíticas, algunas de las cuáles describiremos en las secciones que siguen.

El uso de voltametrías en el análisis de especiación .

Los primeros avances en el campo de la especiación provienen de la electroquímica analítica. Estos métodos se utilizaron principalmente con el mismo objetivo que persigue el presente trabajo y del cuál nos ocuparemos extensamente: la determinación del grado de complejación de los metales traza en aguas naturales. Los metales mas estudiados han sido Cu, Zn y Ni⁸⁻¹³, y en menor proporción Fe¹⁴ dada su concentración relativamente alta en las aguas naturales. Los metales más tóxicos como el Cd y Pb, se han comenzado a estudiar recientemente ¹⁵ dada la dificultad que presenta trabajar en concentraciones en el ámbito de 10^{-8} y 10^{-9} M. Todos los trabajos de especiación citados utilizan como técnicas analíticas a las voltametrías de redisolución anódicas o catódicas las que pueden brindar información de distinta índole y a veces no coincidente como veremos luego¹⁶.

El grado de complejación de los metales en aguas naturales viene dado por la cantidad y tipo de los ligandos presentes. Estos ligandos son agrupados según la magnitud de la constante de formación condicional de sus complejos metálicos. Se denomina fracción “L₁” a la constituida por los complejantes orgánicos mas fuertes, fracción “L₂” a aquella que contiene a los complejantes orgánicos mas débiles y “X” a la fracción de complejantes inorgánicos. Las técnicas electroanalíticas no brindan ningún tipo de información estructural sobre estos complejos pero si se pueden ofrecer información sobre su estabilidad termodinámica y su labilidad cinética.

Entre las técnicas voltamétricas más usadas se pueden nombrar:

- Equilibración competitiva con ligandos y determinación por voltametría de redisolución catódica. (CLE-CSV, “ Competitive Ligand Exchange- Cathodic Stripping Voltammetry”). En esta técnica la muestra es titulada con el ion metálico en presencia de un ligando agregado externamente (catecol, dimetilglioxima u 8-hidroxiquinolina). Este ligando se agrega para establecer un equilibrio de competencia por el ion con los ligandos naturalmente presentes. La concentración del complejo formado entre el ligando agregado y el metal es medida mediante CSV, que consiste en adsorber el complejo en la superficie de un electrodo de gota

colgante de mercurio, reducirlo mediante un barrido de potencial negativo y medir la corriente de reducción producida en la reacción. Mediante un tratamiento matemático de la curva de titulación es posible determinar la concentración total de ML_1 y en algunos casos ML_2 (dependiendo de cuan diferentes sean los valores de las constantes de formación condicional).

- Voltametría diferencial de pulso por redisolución anódica con electrodo de gota colgante de mercurio (DPASV-HMDE Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry,-Hanging Mercury Drop Electrode). La primera etapa de la técnica consiste en depositar los iones libres en un electrodo de mercurio por reducción y amalgamación reduciéndose también, los complejos inorgánicos (MX) o aquellos complejos orgánicos que se disocian significativamente en el tiempo de deposición. En general se reducirá todo complejo que pueda difundir y disociarse en la escala de tiempo en la que se realiza la medida, lo que para esta técnica, puede ser una fracción significativa del total complejoado dependiendo de la labilidad del complejo. Esto se debe a que la velocidad de rotación del HMDE es baja (700 rpm aprox.) lo que produce una capa de difusión nernstiana grande que aumenta el tiempo de residencia de los complejos dentro de ella. La fracción que se determina en estas condiciones corresponde a la sumatoria de complejos cuyas constantes de velocidad de disociación son mayores que 0.1 s^{-1} . Son detectables por esta técnica los complejos lábiles y moderadamente lábiles
- DPASV con electrodo rotatorio de carbono vítreo recubierto de un film de mercurio (DPASV-TMF-RGCDE, Thin Mercury Film-Rotating Glassy Carbon Disk Electrode). Esta técnica es similar a la anterior, pero trabaja con una capa difusiva más pequeña debido a la mayor velocidad de rotación del electrodo (5000 rpm aprox.). En este caso se detectan sólo iones libres o complejos lábiles con constantes de disociación mayores que 1 s^{-1} . Al ser la técnica que trabaja en la menor escala de tiempo, es también la que mejor separa los iones “libres” de los complejados.

El análisis de especiación mediante métodos voltamétricos no excluye el análisis espectroscópico. Por el contrario, el uso conjunto de ambas metodologías enriquece el conocimiento sobre la especiación de metales en aguas naturales.

Análisis de Especiación por Espectrometría de Absorción Atómica: ¿Una contradicción?

Ya hemos dicho que el análisis de especiación brinda información cuantitativa acerca de la identidad molecular de los componentes de una muestra. Sin embargo la espectrometría atómica impide, por definición, obtener cualquier tipo de información sobre especies. Entonces ¿es posible el uso de la espectrometría atómica para el análisis de especiación?

El espectrómetro atómico ideal sería aquél donde todos los constituyentes de la matriz de la muestra son eliminados (o bien no perturban al analito), donde el entorno químico de la fuente de producción de átomos no interfiere con el analito, y donde este analito es atomizado o excitado con eficiencia máxima de manera de poder “observarlo” mediante absorción, emisión o fluorescencia. Sin embargo, en el proceso de separar los átomos de las moléculas a las cuales estaban unidos en la muestra original se pierde toda la información concerniente a las especies.

Existen técnicas espectroscópicas no destructivas que brindan información sobre las uniones de las que participan los elementos, como ser la Espectroscopía Electrónica para el Análisis Químico (ESCA, “Electron Spectroscopy for Chemical Analysis”), la Espectroscopía Mössbauer, la Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos X (XPS, “X-ray Photoelectron Spectroscopy”) y la Espectroscopía de Resonancia de Spin Electrónico (ESR, “Electron Spin Resonance”). Sin embargo ninguna de ellas puede trabajar en el universo de las “micro” y “ultramicro” cantidades tal como requieren los estudios de diagnóstico ambiental.

Para que los espectrómetros atómicos puedan realizar análisis de especiación es claro que deben acoplarse a algún otro sistema que produzca algún grado de separación de las distintas formas químicas de un elemento. El ejemplo más claro es el que utiliza el acoplamiento entre un espectrómetro y un cromatógrafo: el espectrómetro detecta las especies que el cromatógrafo separa. El uso de técnicas cromatográficas para separar especies requiere que éstas sean estables en la escala de tiempo de la separación (varios minutos) y además, que no se encuentren inter-relacionadas por equilibrios rápidos. De existir estos equilibrios, las especies se interconvertirán rápidamente y sólo se obtendrá una serie de bandas poco resueltas. Una desventaja de las separaciones cromatográficas es su lentitud y que requieren que el detector se encuentre encendido durante todo el tiempo de la separación lo que puede ser muy costoso en el caso de fuentes espectroscópicas como el plasma de argón.

Otra modificación atractiva a los espectrómetros atómicos es el uso de fuentes de producción de átomos “moduladas”. Esta aproximación, menos extendida que las anteriores, emplea una fuente espectroscópica que opera en dos modos: en uno se liberan sólo átomos libres y en el otro se liberan moléculas o fragmentos moleculares. Un ejemplo clásico es el uso de la Ionización por Electrospray (ESI, Electrospray Ionization) en donde, dependiendo de la potencia empleada en la fuente de ionización, pueden obtenerse desde moléculas intactas hasta átomos “desnudos”¹⁷. Otras fuentes convencionales como los Plasmas Inducidos por Microondas (MIP, “Microwave Induced Plasma”) o las descargas eléctricas (Glow Discharge) operados a distintas potencias pueden producir alternativamente iones o moléculas, lo que hace que, acoplados por ejemplo a detectores de masa sean aptos para el análisis de especiación.

Otro posible enfoque en el análisis de especiación que posee algunos puntos en común con la separación cromatográfica, es el de realizar un tratamiento químico o físico previo al análisis. Las especies pueden “aislarse” utilizando técnicas separativas como la volatilización, la precipitación, la extracción, etc. Existe la ventaja de que estos tratamientos pueden ser automatizados mediante el uso de técnicas de análisis por inyección en flujo (FIA, “Flow Injection Analysis”), lo que los hace limpios, selectivos y económicos. Este enfoque ha dado origen a innumerables trabajos científicos y ha aumentado significativamente las posibilidades de las espectrometrías atómicas en el análisis de especiación¹⁸.

Cromatografías acopladas a Espectrometrías Atómicas.

Este acoplamiento ha sido utilizado principalmente para el análisis de metaloides (As, Se etc.) y compuestos organometálicos¹⁹ y ha dado nacimiento a las “técnicas en tandem”, también llamadas “técnicas hifenadas”[†].

En los esquemas más comunes, la discriminación entre especies se consigue utilizando una técnica separativa que se escoge en función de las características de volatilidad del analito, mientras que la segunda etapa (detección espectroscópica) se elige según la clase de analito y su nivel de concentración en la muestra. Si la técnica separativa es la cromatografía gaseosa, en general se utiliza espectrometría de emisión

[†] El nombre de técnicas hifenadas proviene del inglés “hyphenated techniques”. En inglés hyphen significa guión. Las técnicas hifenadas identifican el acople entre instrumentos mediante guiones (GC-MS por ejemplo).

atómica acoplada a un detector de plasma de microondas (MIP-AED, “Microwave Induced Plasma-Atomic Emission Detector”)²⁰. Si bien el MIP posee alta temperatura para la excitación de átomos, el uso de muestras líquidas puede apagar el plasma. El uso del cromatógrafo de gases deja al analito en estado gaseoso, la forma ideal para su introducción en el plasma de microondas. Los analitos no volátiles pueden ser separados por Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC, “High Performance Liquid Chromatography”) o Electroforesis Capilar (CZE, “Capillary Zone Electrophoresis”). En estos casos se necesita un analizador espectroscópico que permita producir átomos a partir de una fase móvil líquida. La opción más moderna es la Espectrometría de Plasma Acoplado Inductivamente con detección por Espectrometría de Masas (ICP-MS)^{21, 22}. Este analizador posee la ventaja de trabajar de manera continua, lo que lo hace ideal para acoplarlo a un sistema de separación que lo “alimente” de la misma manera. Este tipo de analizador aventaja a los atomizadores electrotérmicos, los que al operar de manera “discreta” requieren una interfaz separador-analizador para realizar la medida.

La existencia de detectores selectivos para ciertos elementos (halogenados, azufre, fósforo, nitrógeno) históricamente ha favorecido el uso de GC respecto de HPLC, a pesar de que la primera requiere transformar (derivatizar) los analitos no volátiles en volátiles antes de inyectarlos. Sin embargo, dado que muchos compuestos organometálicos no son volátiles, la cromatografía líquida ha ganado espacio debido a que la primera reduce notoriamente el manipuleo provocado por la derivatización. Además, la importancia que ha tomado el estudio de biomoléculas complejas que contienen metales de transición ha estimulado y difundido el uso de las cromatografías líquidas y de la electroforesis capilar²³.

Repasemos brevemente algunos de los acoplamientos mas exitosos entre técnicas separativas y técnicas espectroscópicas:

En lo que respecta a las cromatografías gaseosas, aquellas que utilizan columnas capilares (CGC, Capillary Gas Chromatography) se han convertido en las mas populares. Las antiguas columnas empacadas han sido reemplazadas por columnas abiertas del tipo “megabore” (0.54 mm i.d.) y, posteriormente, capilares propiamente dichas (0.22 mm i.d.). Las dimensiones de las columnas capilares (largas y estrechas) a lo que se suma el recubrimiento con polimetoxisilanos les permite obtener una gran cantidad de platos teóricos produciéndose bandas muy angostas y resueltas²⁴. En la actualidad los clásicos detectores cromatográficos están siendo desplazados por otros mas modernos, de los cuales el detector de masa es el mas sofisticado.

Los sistemas CGC pueden acoplarse a su vez a sistemas de evaporación de especies volátiles (sistema de “purga y trampa”). Tradicionalmente este ha sido uno de los métodos más populares de análisis de sustancias volátiles. El sistema se basa en la purga de los compuestos de la solución con un gas inerte y su posterior colección en una trampa fría, desde donde los compuestos son inyectados al sistema GC y posteriormente detectados²⁵. Esta técnica está limitada a sustancias volátiles o que formen hidruros o etiluros, tales como compuestos organo-mercúricos²⁶, organo-arsenicales, alquil-plomo, butil-estaño, etc.

Las moléculas no volátiles o derivatizables (muchas de ellas de interés bioquímico) son analizadas utilizando técnicas de cromatografía líquida. Las técnicas de HPLC modernas son muy versátiles, principalmente debido a la posibilidad de seleccionar diversos soportes sobre los cuales hacer la separación (partición en fase reversa, intercambio iónico, permeación de geles) a lo que se suma la posibilidad de cambiar y mezclar en diferentes proporciones los solventes que se usan como fase móvil.

El uso de una fase móvil líquida trae aparejados inconvenientes, aún para los detectores de absorción atómica continuos convencionales como los de llama (FAAS, “Flame Atomic Absorption Spectrometry”). Las soluciones ricas en sales que salen del cromatógrafo líquido o los solventes orgánicos producen interferencias de diversa índole que modifican la señal. Los detectores de llama, además, poseen baja sensibilidad, lo que puede remediarse usando ICP-OES o ICP-MS, ambos del tipo continuo. Sin embargo, estos últimos también poseen desventajas entre las que podemos mencionar: costo muy elevado del ICP-MS, interferencias presentes en la fase móvil que modifican la señal y baja eficiencia en la producción de niebla como en el caso de la llama donde se pierde hasta un 98% de la muestra. Es más, los últimos estudios relacionados con espectrometrías de plasma tienen una fuerte orientación hacia el desarrollo de nuevos nebulizadores como el Nebulizador de Inyección Directa (DIN, “Direct Injection Nebulizer” o el Nebulizador Hidráulico de Alta Presión (HHPN, “Hydraulic High Pressure Nebulizer”).

Existen técnicas complementarias a la cromatografía líquida como ser la Electroforesis Capilar de Zona (CZE). Esta es una técnica muy atractiva para separar biomoléculas pesadas que posean estructuras similares entre sí. Se han utilizado principalmente para la separación de especies de Se y As y en especial para metalotioneínas. Un problema grave es la detección, que en general se realiza por

espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis). Esta forma de detección no es la adecuada para niveles bajos de metales, lo que obliga a preconcentrar y derivatizar. En la actualidad se está intentando utilizar como detectores espectrómetros de masa o ICP-MS. Sin embargo, el volumen eluido en una electroforesis capilar (del orden de los nanolitros) no satisface la demanda de muestra de estos analizadores.

Análisis por Inyección en Flujo acoplado a Espectrometría de Absorción Atómica (FI-AAS): ¿Un buen matrimonio para el análisis de especiación?

La determinación de especies mediante cromatografías acopladas a distintos espectrómetros atómicos todavía no se ha convertido en una técnica de rutina. La separación y preconcentración de especies mediante técnicas en flujo aparece como una opción interesante frente a las separaciones cromatográficas. En el FIA, la extracción selectiva de la especie de interés se logra con excelentes condiciones de contorno tales como: bajo consumo de reactivos y muestra, simplicidad instrumental, alta frecuencia de análisis, minimización del error de operación y de la contaminación eventual.

El término Análisis por Inyección en Flujo (FIA, “Flow Injection Analysis”) fue utilizado por primera vez por J. Růzicka y su equipo²⁷, si bien existen controversias sobre los orígenes del FIA que algunos autores²⁸ remontan a épocas anteriores al primer trabajo de Růzicka. Originalmente, FIA se definió como: “Un método basado en la inyección de una muestra líquida en una corriente móvil y continua de un líquido portador.”²⁹ Esta definición fue modernizada posteriormente, para incluir los avances en técnicas de gradiente³⁰ y FIA se redefinió como: “...la obtención de información de un gradiente de concentración formado por una zona bien definida de un fluido que es dispersado en la corriente continua de una solución transportadora no segmentada.” Ambas definiciones determinaron las “tres condiciones” ineludibles del FIA:

- La inyección de la muestra se produce en una zona definida de volumen constante en una solución transportadora continua.
- La dispersión de la zona de solución que contiene al analito es controlada por las variables de flujo del sistema (dispersión controlada).
- Los tiempos de circulación de los fluidos son reproducibles.

El análisis por inyección en flujo y su aptitud para manejar soluciones han rejuvenecido a técnicas como la Espectrometría de Absorción Atómica por Llama

(FAAS). El primer trabajo referido a FI-FAAS fue publicado en 1972³¹, aunque aún no se utilizaba este acrónimo. Los primeros trabajos en FI-FAAS aparecidos posteriormente estaban orientados a la reducción del volumen de muestra inyectado en la llama, con el correspondiente aumento de la frecuencia de análisis. Los espectrómetros de llama trabajan con frecuencias analíticas suficientemente altas y sólo en muy pocos casos es importante reducir el volumen de muestra consumido, por lo que no parecía existir una ventaja real en el acople FI-FAAS. Sin embargo se observó que acoplados a un FIA, los espectrómetros de FAAS podían producir señales de absorción menos interferidas. Años mas tarde, otras técnicas de producción de vapor atómico, como la generación de hidruros (HG-AAS) y la de vapor frío de mercurio (CV-AAS) fueron acopladas a sistemas en flujo los que demostraron ser mas tolerantes a interferencias químicas que los sistemas en “batch” (en general el tiempo de medición en FIA hace que las interferencias producidas por reacciones secundarias lentas sean de menor importancia).

Otro “hito” en el desarrollo de técnicas acopladas a FI fue la capacidad de automatizar procedimientos que hasta el momento se realizaban manualmente como la adición de reactivos, la dilución de muestras, la preconcentración, la extracción con solventes, la precipitación e incluso la mineralización en línea.

Probablemente, el desarrollo más importante de los últimos años en espectrometrías atómicas acopladas a FI ha sido el uso de detectores de atomización electrotérmica (“FI-ETA-AAS”, Flow Injection-Electrothermal Atomization-Atomic Absorption Spectrometry). Los sistemas FI-ETA-AAS han mostrado gran versatilidad para separar y preconcentrar en línea diferentes especies metálicas, antes de alcanzar el detector.

Se resumen, por orden de aparición, los principales trabajos relacionados con el acoplamiento FI-AAS como una nueva técnica analítica³²:

1972: primera publicación del grupo de Winefordner³¹.

1979: primeros trabajos en FI-FAAS³³⁻³⁵

1981: Uso de FI-FAAS para análisis de muestras con un alto contenido de sólidos disueltos³⁶. Automatización de un sistema de extracción de metales usando FI-FAAS³⁷.

1982: Primer uso de un sistema FI para HG-AAS³⁸ (determinación de bismuto).

1983-1984: Primeros sistemas de preconcentración en microcolumnas usando resinas de intercambio iónico³⁹⁻⁴². Métodos de calibrado para FI-FAAS⁴³⁻⁴⁵. Primeras aplicaciones de FI a ETA-AAS⁴⁶

1985: Determinaciones indirectas mediante FI-FAAS⁴⁷⁻⁴⁹.

1986: Digestión de muestras en línea⁵⁰. Precipitación con filtración en línea⁵¹. Precipitación en línea⁵².

1988-1989: Preconcentración en línea para la determinación de mercurio por vapor frío⁵³. Preconcentración mediante extracción y sorción en línea⁵⁴. Publicación del primer libro sobre FI-AAS⁵⁵.

1990: Nebulización de suspensiones barrosas (“slurries”) en FI-FAAS⁵⁶

1991: Preconcentración por coprecipitación en línea en FI-FAAS⁵⁷. Se comercializa el primer equipo dedicado a FI-AAS (modelo FIAS-200 de Perkin-Elmer).

1992: Preconcentración *in situ* de arsénico en un horno de grafito⁵⁸.

1993: Segmentación con aire en sistemas FI-ETA-AAS⁵⁹.

El Análisis por Inyección en Flujo ha traído nuevos aires a las técnicas espectrométricas confiriéndoles características propias, tal como detallaremos en este trabajo.

Diversas monografías y libros han recopilado y analizado el “estado del arte” en este tema y el lector es invitado a revisarlas para un panorama mas completo^{55, 60-63}. El análisis histórico muestra que hasta el año 1994 ya habían sido publicados mas de 500 trabajos en FI-AAS y la tendencia seguía en aumento³². Estas publicaciones se han orientado, en su mayoría, a técnicas de absorción atómica como FAAS y HG/CV-AAS, con énfasis en las operaciones de separación y preconcentración del analito previas a la llegada al detector.

Separación y preconcentración en FI-AAS.

Las operaciones de separación y pre-concentración de diversos analitos para su posterior análisis realizadas conforme la química analítica clásica, son extremadamente tediosas, consumidoras de tiempo y proclives a contaminación. Benoit et al.⁶⁴ han hecho un análisis exhaustivo de las fuentes potenciales de contaminación que existen en el análisis instrumental clásico.

Las separaciones que utilizan procedimientos FI han atraído la atención ya que agilizan el análisis químico y reducen drásticamente el tiempo invertido en realizarlo. Aislar el analito de la matriz (separar) y concentrarlo son tareas íntimamente relacionadas de modo que, es posible separar y, simultáneamente preconcentrar si el

volumen de muestra de la cual se separa el analito es mayor que el volumen de la solución en la cuál se lo recibe.

Los sistemas FI-AAS para separación y preconcentración aparecieron casi explosivamente en la escena del análisis químico lo que se evidencia por los numerosos “reviews”⁶⁵⁻⁶⁷ e inclusive libros publicados sobre el tema⁶⁸.

El uso de FIA para separación y preconcentración obliga a redefinir el análisis por inyección en flujo. Si bien muchos trabajos (incluido éste) aducen que sus sistemas de preconcentración “en línea” son FIA, aparecen claras violaciones a la definición de Růzicka. En general se acepta que un sistema FIA debe utilizar una solución transportadora (“carrier”) no segmentada, pero por ejemplo, en los sistemas denominados “FI-HG-AAS” la corriente transportadora es segmentada por burbujas de aire. Cuando los sistemas de preconcentración se acoplan a horno de grafito, la operación es discontinua (FI-ETA-AAS) y el uso de un “carrier” continuo parece una contradicción. Al eluir una microcolumna de intercambio iónico, el analito forma un perfil de elución con el tiempo que hace incorrecto decir que el analito esta contenido en una zona “*bien definida*” en el momento de la inyección.

Una definición mas amplia que la de Růzicka y que permite incluir como sistemas FIA a los ejemplos anteriores es la enunciada por Fang: “[El Análisis por Inyección en Flujo es] una técnica de análisis que permite manipular en forma reproducible, zonas de muestra y reactivos, en una corriente de flujo bajo condiciones de no-equilibrio termodinámico” ⁶⁸. Esta definición mas amplia lleva a precisar dos *principios operativos básicos* del FIA:

- La muestra y los reactivos se manipulan mediante un control preciso del tiempo.
- La concentración del/los analitos se evalúan cuantitativamente bajo condiciones de no-equilibrio termodinámico.

Eliminamos así la necesidad de hablar de soluciones transportadoras continuas y de inyección de la muestra en una zona perfectamente definida.

Los sistemas FIA de preconcentración poseen características muy atractivas que los han hecho populares:

- Altas frecuencias de análisis (muestras por hora), entre uno y dos órdenes mayores que las mismas técnicas realizadas en “batch”, con tiempos de análisis típicos que varían entre 10 y 200 s.

- Altos factores de preconcentración (entre 5 y 50 veces mayores que los procedimientos en “batch”).
- Bajo consumo de muestra. Esto es muy importante en muestras escasas (sangre) o en muestras colectadas en lugares difíciles de acceder (pensemos en agua de mar de la Antártida por ejemplo!).
- Bajo consumo de reactivos, como mínimo uno o dos órdenes menor que en batch.
- Alta precisión (entre 1 y 5 %), derivada de la repetitividad de las medidas en términos de volúmenes de inyección y flujos de reactivos y del aumento en el número de medidas (lo que está relacionado con la alta frecuencia de análisis).
- Facilidad de automatización, lo que hace que puedan ser aplicables a sistemas de control de procesos industriales.
- Bajos riesgos de contaminación debido a que se opera en tuberías cerradas e inertes.
- Aumento de la selectividad ante especies mediante discriminación cinética debida a las condiciones dinámicas de reacción. (Como veremos en capítulos posteriores).
- Disminución del volumen de desperdicio, que proviene de una drástica reducción en la escala de trabajo.

Los sistemas de preconcentración FIA pueden clasificarse según el tipo de fases entre las cuáles ocurre la transferencia de masa: separación líquido→líquido (extracción con solventes, diálisis), separación líquido→gas (difusión, generación de hidruros, generación de vapor frío) o separación líquido→sólido (intercambio iónico, adsorción, extracción por sorción, precipitación y disolución, coprecipitación y disolución, electrodeposición y redisolución), etc.

Independientemente de las fases involucradas, todos estos sistemas se comparan entre sí sobre la base de figuras de mérito que muestran el grado, velocidad y completitud de la separación, como veremos en los próximos capítulos.

Análisis de especiación mediante FI-AAS.

Hemos visto que las separaciones no cromatográficas usando FIA son una aproximación útil al análisis de especiación, sin embargo, de unas 5000 publicaciones existentes en FIA, sólo unas 50 se refieren al tema *especiación* {Campanella, 1996 #163 probablemente debido a la cantidad de variables que es necesario manejar para lograr resultados exitosos.

La extracción selectiva de especies es una de las herramientas que hace posible la especiación a través de FIA. Esta extracción es posible si se encuentran fases adecuadas para las distintas especies o si se buscan condiciones de flujo que habiliten la “discriminación cinética” entre las mismas. Probablemente, el área donde el análisis de especiación en FIA ha sido más exitoso y explotado, es la de la determinación de los elementos en sus diferentes estados de oxidación. Esto puede realizarse mediante el uso de reactivos específicos, la extracción selectiva (aniones/cationes) o la detección específica de distintas especies redox. Otro enfoque, es el uso de detectores en serie: por ejemplo espectrometría molecular y atómica para la determinación secuencial de Cr(III) y Cr(VI).

La especiación de metales en equilibrio con sus complejos es, en cambio, un campo menos explorado. Esta determinación es de gran relevancia en sistemas acuosos, donde los iones metálicos no sólo se encuentran “desnudos”, sino también asociados a aniones inorgánicos, ácidos débiles sintéticos o moléculas provenientes de procesos biológicos de catabolismo. La bibliografía nos muestra que, con el propósito de especiar metales mediante sistemas FIA se han utilizado detectores de flujo como espectrómetros de absorción atómica de llama ^{69, 70}, fluorómetros⁷¹ o absorciómetros UV-Vis⁷², pero nunca detectores espectrométricos de operación discreta, como los ETA-AAS.

La característica fundamental del análisis de especiación es que el método escogido no perturbe el equilibrio entre las especies y evite su interconversión. Si los equilibrios no son muy rápidos, es posible que los tiempos manejados en FIA sean lo suficientes breves como para evitar la interconversión de especies, lo que no ocurre en las técnicas cromatográficas donde puede existir una redistribución de especies en el propio proceso separativo.

Al lector no precavido, podría parecerle que las separaciones líquido-sólido en FIA son una “versión miniaturizada” de las separaciones cromatográficas pero existen grandes diferencias. La diferencia fundamental es conceptual: en cromatografía se busca la separación de *todos* los componentes individuales que posee la muestra, mientras que en las separaciones FIA se busca la separación de *un* componente del resto de la muestra. Por otra parte los requisitos para los equipos cromatográficos son distintos a los FIA en los rangos de presión tolerados y en los flujos volumétricos (presiones mas bajas y un mayor ámbito de flujos de trabajo para los FIA). En lo que respecta al eluyente, el utilizado en FI-AAS es distinto de las fases móviles usadas en las separaciones cromatográficas. Este eluyente debe permitir que el analito sea

“expulsado” de la columna durante la etapa de elución utilizando el mínimo volumen, sin dar lugar a la producción de efectos cromatográficos. Las cromatografías buscan un efecto opuesto: los analitos a separar y *nunca* deben eluir con el frente del solvente.

Análisis por inyección en flujo acoplado a detectores de operación discreta: FI-ETA-AAS. ¿Qué aportan en el análisis de especiación?

Uno de los avances mas importantes de los últimos años en sistemas FI acoplados a espectrometrías atómicas ha sido el empleo de atomizadores discretos como los atomizadores electrotérmicos (ETA) dando lugar a la técnica en tándem conocida como FI-ETA-AAS. Las fuentes de producción de átomos como los atomizadores electrotérmicos tienen una sensibilidad muy superior a la de llama e incluso a técnicas de emisión como espectrometría de plasma con detección óptica. Sin embargo, las interferencias de matriz pueden ser severas dependiendo de las características de la muestra. El acoplamiento entre un sistema FIA que permita “aislar” al analito con simplicidad y “en-línea” y los espectrómetros de ETA-AAS produce una técnica en la que se suman la excelente sensibilidad del productor de átomos y la ausencia de interferencias. Esta alta performance hace que los sistemas FI-ETA-AAS sean competitivos con respecto a otros como el ICP-MS de costo mucho mas elevado ⁷³.

En el siguiente capítulo mostraremos un sistema FI-ETA-AAS diseñado durante el desarrollo del trabajo de tesis en el que la extracción (aislación y concentración) de los metales se realiza sobre resinas quelantes seleccionadas de acuerdo a su aptitud para realizar el secuestro eficiente de los analitos en estudio. Se empleará este sistema para la determinación de metales tóxicos a nivel de ultratrazas en muestras que no resisten el análisis directo por ETA-AAS. El criterio de selección de soportes quelantes se discutirá en capítulos posteriores en los que se analizará además, la posibilidad de especiación de metales en muestras de aguas naturales.

Espectroscopías Atómicas					Voltimetrías					
Metal	Emisión		MS	Absorción		ETA	HG/CV	ASV	CSV	PSV
	Llama	ICP		Llama						
As		0.1 (1989) ⁷⁴ 0.032 CF (1995) ⁷⁵ 0.2 FI (1988) ⁷⁶	0.0015 (1990) ⁷⁷	250 (1971) ⁷⁸ 90-300 (1986) ⁷⁹	80-200 (1986) ⁷⁹		1.5 (1974) ⁸⁰ 20 (1981) ⁸¹ 0.16 CF (1985) ⁸² 80 FI (1985) ⁸³			
Cd	2000 (1976) ⁸⁴	0.07-10 (1986) ⁷⁹	0.012 (1998) ⁸⁵	1 (1976) ⁸⁴ 0.5-1.5 (1986) ⁷⁹	0.01 (1995) ⁸⁶			10 HDME (1977) ⁸⁷ 0.01 DP (1977) ⁸⁷ 0.001 (1977) ⁸⁷ 0.005 GCE (1980) ⁸⁸ 0.2 DP (1998) ⁸⁹	0.011 (1997) ⁹⁰ 0.003 (1996) ⁹¹	2.6 GCE (1979) ⁹² 0.03 GCE (1979) ⁹³ 0.005 GCE (1981) ⁹⁴ 0.06 DP (1980) ⁹⁵
Cr	5 (1976) ⁸⁴	0.08-5 (1986) ⁷⁹		66 (1968) ⁹⁶ 2 (1976) ⁸⁴	0.075 (1995) ⁸⁶					
Cu	10 (1976) ⁸⁴	0.04-5 (1986) ⁷⁹	0.14-0.18 ETV (1996) ⁹⁷	4 (1976) ⁸⁴ 3 (1995) ⁸⁶	0.3 (1995) ⁸⁶			0.1 DP (1979) ⁹⁸ 0.02 GCE (1980) ⁸⁸ 0.2 DP (1998) ⁸⁹	0.02 (1997) ⁹⁰ 0.027 (1996) ⁹¹	0.1 (1979) ⁹² 0.01 (1979) ⁹³ 1.3 (1981) ⁹⁴
Hg				500 (1976) ⁸⁴ 140-170 (1986) ⁷⁹	0.05-2.0 (1986) ⁷⁹		0.040-0.2 (1982) ⁹⁹			
Ni	30 (1976) ⁸⁴	10 (1995) ⁸⁶	0.12-0.13 ETV (1996) ⁹⁷	5 (1976) ⁸⁴ 4 (1995) ⁸⁶	0.2 (1995) ⁸⁶				0.01 (1997) ⁹⁰	
Pb	200 (1976) ⁸⁴	14 (1995) ⁸⁶	0.01-0.05 HG (1988) ¹⁰⁰	10 (1976) ⁸⁴ 10 (1995) ⁸⁶	1 (1995) ⁸⁶		100 (1974) ⁸⁰ 0.1 (1991) ¹⁰¹	2.5 HDME (1977) ⁸⁷ 0.01 DP (1977) ⁸⁷ 0.05 GCE (1980) ⁸⁸ 0.002 DP (1998) ⁸⁹	0.03 (1997) ⁹⁰ 0.008 (1996) ⁹¹	2.5 (1979) ⁹² 0.01 (1979) ⁹³ 0.012 (1981) ⁹⁴ 0.1 DP (1980) ⁹⁵
Se		37 (1995) ⁸⁶ 0.055 HG (1985) ¹⁰²	0.0014 (1992) ¹⁰³ CF-HG	1000 (1970) ¹⁰⁴ 500 (1995) ⁸⁶	0.7 (1995) ⁸⁶		1.8 (1974) ⁸⁰ 0.1-0.3 CF (1985) ¹⁰⁵ 0.7 FI (1985) ¹⁰⁶			
Zn	1000 (1995) ⁸⁶	2 (1995) ⁸⁶		1 (1971) ¹⁰⁷ 1 (1995) ⁸⁶	0.0075 (1995) ⁸⁶			0.1 HDME (1979) ⁹⁸	0.04 (1997) ⁹⁰	0.03 (1979) ⁹³ 0.016 DP (1981) ⁹⁴

ICP: "Inductively Coupled Plasma" (Plasma Acoplado Inductivamente); MS: "Mass Spectrometry" (Espectrometría de Masas); ETA: "Electrothermal Atomization" (Atomización Electrotermal); CV: "Cold Vapor" (Vapor Frío); CF: "Continuous Flow" (flujo continuo); FI: "Flow Injection" (Inyección en flujo); HG: "Hydride Generation" (Generación de Hidruros); ETV: "Electrothermal Vaporisation" (Vaporización Electrotermal); ASV: "Anodic Stripping Voltammetry" (Voltametría de Redisolución Anódica); CSV: "Cathodic Stripping Voltammetry" (Voltametría de Redisolución Catódica); PSV: "Potentiometric Stripping Voltammetry" (Voltametría Potenciométrica de Redisolución); HDME: "Hanging Drop Mercury Electrode" (Electrodo Gotero de Mercurio); DP: "Differential Pulse" (Pulso Diferencial); GCE: "Glassy Carbon Electrode" (Electrodo de Carbono Vítreo).

Tabla I-1: Evolución de los límites de detección (LOD), en ng ml⁻¹ (ppb) para algunos metales pesados.

CAPITULO 1



JUSTIN

The next time you're planning a trip to the backcountry, your enthusiasm sparked by some glossy coffee-table book picturing snowcapped peaks under perfect blue skies, you would do well to keep in mind whence that glorious snowpack came. It is the nature of mountains to wring from the winds what moisture they happen to be carrying. This you already know, of course, if not from high school science classes, then from sodden vacations in the Adirondacks and the North Cascades. But optimism is dangerously immune to simple facts and the hard lessons of experience. It can be difficult to admit that spending time in the unspoiled wilds, more often than not, means doing time within the walls of a dank nylon cell, tentbound.

"On Being Tentbound", Eiger Dreams, Jon Krakauer (1990).

En mas de una ocasión, durante la escritura de esta tesis, tuve ganas de estar en la montaña, sin embargo, pensamientos como éste me hicieron recapacitar.

1 Capítulo 1: Diseño de un sistema FI-ETA-AAS para la preconcentración de Cd y Pb a niveles de ultratrazas. Análisis de agua de mar.

1.1 Introducción

La tolerancia para la concentración de contaminantes en los recursos hídricos se ha hecho cada vez menor. En la última década la determinación de niveles extremadamente bajos (ng l⁻¹ ó inferiores) de metales pesados en agua de mar ha recibido una atención especial en la evaluación del impacto temprano de la actividad humana en el ambiente marino. Las muestras de agua de mar son un desafío analítico importante para el análisis de vestigios inorgánicos puesto que en ellas coexisten bajísimas concentraciones de metales pesados con una matriz altamente salina.

Clásicamente, el análisis de metales pesados en agua de mar se realiza con técnicas instrumentales como Activación Neutrónica (NAA, "Neutron Activation Analysis"), Dilución Isotópica-Espectrometría de Masa (ID-MS, "Isotope Dilution Mass Spectrometry"), Voltametría de Pulso de Redisolución Anódica (DPASV, "Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry"), y Espectrometría de Absorción Atómica¹⁰⁸ (AAS, "Atomic Absorption Spectrometry") o Emisión Atómica (AES, "Atomic Emission Spectrometry"); siendo las tres últimas las mas ampliamente utilizadas. Sin embargo algunas de estas técnicas instrumentales requieren un paso previo de preconcentración y/o separación analito/matriz para mejorar los límites de detección o eliminar las interferencias debidas a concomitantes. Esto produce baja

reproducibilidad en el análisis y contaminación externa debido a la gran manipulación que sufre la muestra.

Como consecuencia de los bajísimos niveles de concentración de los metales pesados en agua de mar, el método de atomización preferido en AAS es la atomización electrotérmica por horno de grafito (GF-ETA-AAS). Se han hecho diversos intentos para analizar agua de mar mediante ETA-AAS sin realizar ningún tratamiento de la muestra¹⁰⁹⁻¹¹² dado que el análisis directo evita el alto blanco asociado con la mayoría de los pretratamientos convencionales y minimiza el manipuleo. Sin embargo, la alta salinidad de la muestra (3 % aprox.) y el extremadamente bajo contenido de metales (ppb-ppt) hacen prácticamente imposible el análisis directo. En ETA-AAS el proceso de volatilización de las sales de la matriz produce pérdidas del analito por expulsión mecánica o co-volatilización en la etapa de calcinación y, una altísima absorción de fondo durante el proceso de atomización. Aún con el uso de correctores secuenciales de alta velocidad, la señal de fondo no puede ser sustraída de modo de obtener resultados repetitivos de la señal atómica. En el caso particular de Cd y Pb (cuyos haluros son altamente volátiles) la co-volatilización simultánea de componentes de la matriz y del analito en la etapa de calcinación lleva a la obtención de resultados pobres¹¹²⁻¹¹⁴.

Una opción para retener los analitos volátiles es la adición de “modificadores de matriz”¹¹³⁻¹¹⁷. La modificación de matriz (o modificación química ¹¹⁸) es una práctica común en el análisis mediante ETA-AAS^{119, 120}. Estos modificadores pueden asimilarse al concepto de “buffers” espectroscópicos: “sustancias químicas agregadas a las muestras y a los patrones de calibrado para reducir o eliminar interferencias”¹²¹. Uno de los principales objetivos al utilizar modificadores de matriz es el de estabilizar térmicamente al analito, es decir, disminuir su presión de vapor. De esa manera, durante la etapa de calcinación se puede eliminar la matriz sin volatilización del analito.

Esta metodología ha sido ampliamente estudiada y aplicada y la bibliografía es muy abundante¹²². Sin embargo, el uso de modificadores de matriz puede producir una señal de fondo importante, lo que obliga a establecer una situación de compromiso entre esta señal y el aumento de sensibilidad. Además, el modificador de matriz puede contribuir significativamente al blanco de reactivos. Si la concentración de sales es muy alta, como en el caso del agua de mar, la adición de un modificador de matriz no es suficiente. Aunque los modificadores de matriz mejoran la performance del análisis de metales pesados en agua de mar mediante ETA-AAS, las figuras de mérito obtenidas no mejoran lo suficiente como para realizar estudios de contaminación temprana en agua

marina, en particular, los límites de detección obtenidos son tres o cuatro órdenes mayores que aquellos en los que el elemento de interés es sometido a algún tipo de separación y preconcentración.

Para preconcentrar los analitos y aislarlos de la matriz se han utilizado distintas técnicas extractivas. Clásicamente, éstas técnicas operan de manera discreta (en “batch”). En el caso particular del agua de mar podemos citar como ejemplo:

- Retención en resinas quelantes conteniendo grupos iminodiacetato^{123, 124}, ditiocarbamato¹²⁵, y 8-hidroxiquinolina^{126, 127}. (extracción líquido→sólido)
- Complejación con pirrolidin-ditiocarbamato de amonio (APDC) seguido de extracción con metil-isobutil cetona (MIBK)^{124, 128-130}. (extracción líquido-líquido).
- Coprecipitación con hidróxidos inorgánicos¹³¹.
- Precipitación reductiva^{132, 133}.

Entre estos métodos, la extracción líquido→sólido es considerada una de las técnicas más confiables debido a su sencillez de operación ¹³⁴. Por otro lado, es una de las técnicas más fácilmente automatizables en sistemas en flujo, y por este motivo, la hemos seleccionado.

Ya hemos visto en el capítulo anterior la importancia que tuvieron y tienen las técnicas FIA en la manipulación de muestras para espectrometría atómica lo que es extrapolable a las técnicas de preconcentración y separación ⁶⁵. En particular, la absorción atómica con llama (FAAS) ha sido muy estudiada dado que FIA trabaja con corrientes continuas de fluidos y la llama es una celda de flujo “per se”¹³⁵⁻¹³⁷. Las técnicas separativas en FIA acopladas a FAAS (FI-FAAS) son útiles para el análisis de los microcomponentes metálicos del agua de mar que se encuentran en rangos de concentración cercanos a 10^{-7} M. Sin embargo, la sensibilidad de estas técnicas no es suficiente para cuantificar metales en niveles de concentración aún menores (ultra-microcomponentes), principalmente debido a la ineficiencia de la etapa de producción de niebla, previa a la introducción de muestra en la llama.

Cuando se requiere producir vapor atómico de manera más eficiente se utilizan fuentes como los atomizadores electrotérmicos, de los cuáles el mas utilizado es el

horno de grafito. La absorción atómica con horno de grafito sigue siendo el método instrumental con mejores límites de detección a un costo razonable para la mayoría de los metales. Los hornos de grafito pertenecen al grupo de los atomizadores “discretos” por lo que los sistemas de preconcentración en línea (“on-line”) deben contemplar la conexión entre un sistema de introducción de muestra continuo y un analizador discreto. Para conectar un sistema FIA con un horno de grafito, primero es necesario diseñar y construir una interfaz eficiente entre el sistema FIA y el espectrómetro. Las dificultades inherentes a la construcción de la interfaz han hecho que sólo en los últimos cinco años los sistemas FI-ETA-AAS hayan alcanzado el grado de madurez necesario como para ser utilizados ampliamente. Han encontrado principalmente, una gran aplicación en el análisis de agua de mar ya que, adecuadamente diseñados, pueden preconcentrar al analito que se encuentra en bajísimas concentraciones, y al mismo tiempo “aislarlo” de la matriz¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Desde el primer trabajo aparecido en 1984¹⁴¹ se han publicado distintos sistemas de preconcentración en línea para ETA-AAS, adaptando muchos de los pretratamientos en “batch” utilizados habitualmente para agua de mar. Los métodos de extracción que se han empleado con sistemas FI-ETA-AAS son: la extracción líquido-líquido, el secuestro “in-situ” de hidruros, la coprecipitación y la extracción líquido-sólido. Describiremos en detalle cada una de estas aplicaciones⁶⁸:

- **Extracción líquido-líquido:** los métodos de preconcentración en batch de metales en agua de mar mas populares han sido siempre los de extracción líquido-líquido (i.e., APDC-MIBK). Estos sistemas se han trasladado a FIA, pero con escaso éxito. Esto se debe a que es necesario manejar solventes orgánicos dentro del sistema de flujo lo que daña irreversiblemente las tuberías con el transcurso del tiempo, aunque estén construidas con materiales inertes.

Los sistemas FIA de extracción líquido-líquido se basan en la mezcla de la muestra y el extractante a través de una confluencia. El extracto obtenido es retenido en un separador adecuado, donde se acumula hasta la etapa de análisis. Los primeros sistemas de extracción líquido-líquido trabajaban “off-line”^{141, 142} utilizando una extracción en Freon 113 de los complejos metal-APDC que luego eran retro-extraídos a la fase acuosa. Se utilizaban dos separadores de fases: primero un separador de membrana y luego un segundo separador gravitacional. Posteriormente, el mismo grupo

de Backström acopló “en línea” el sistema de extracción líquido-líquido, mediante una modificación realizada al primer sistema descripto. Este nuevo sistema requería sólo un separador gravitacional^{143, 144}.

En años posteriores, el trabajo se orientó a optimizar el “talón de Aquiles” de estos sistemas: el separador de fases. Lin et al.¹⁴⁵ describieron un sistema de flujo acoplado directamente al ETA-AAS que utilizaba un separador gravitacional donde se colectaba la fase orgánica (MIBK) en la que se extraían los complejos metal-APDC. Luego de la preconcentración, este separador era evacuado mediante una bomba peristáltica que inyectaba el concentrado dentro del horno de grafito. Los separadores de fases mas recientes han sido descriptos por Tao¹⁴⁶. Esta nueva generación de separadores es mucho más robusta y requiere menos destreza para su operación. Teniendo en cuenta la enorme cantidad de sistemas de extracción líquido-líquido que se han descripto en la química analítica clásica en “batch” es esperable que se produzcan nuevos desarrollos en este campo para lograr una extendida operación “en línea”.

Un sistema de extracción líquido-líquido muy interesante descripto recientemente ¹⁴⁷ no utiliza separadores de fases y se basa en las diferencias con las que se mueven las fases orgánica y acuosa dentro de un sistema de Análisis por Inyección Secuencial (SIA, “Sequential Injection Análisis”).

- **Preconcentración in-situ por secuestro de hidruros:** Otra técnica de preconcentración muy difundida es la retención de hidruros “*in situ*”. Este método consiste en la generación de hidruros de aquellos elementos aptos como para formarlos (i.e. As, Se, Ge, Sb, etc.) en un sistema FI. Estos hidruros volátiles son “secuestrados” dentro de un horno de grafito recubierto de Pd o Pd/Ir el que es calentado a unos 350°C. La retención dentro del horno de los hidruros volátiles se logra introduciendo la salida del sistema FI en el agujero de inyección. Dado que existen numerosos sistemas comerciales para la generación de hidruros en línea, el acople no lleva mucho tiempo y durante un mismo año (1992) se informaron varios sistemas en la bibliografía con una performance similar a los FI-HG-AAS^{58, 148-151}.

- **Preconcentración por coprecipitación en línea:** los sistemas de coprecipitación en línea se basan en el “arrastre” del analito por un precipitado que se genera dentro de la tubería del sistema FIA. Este precipitado es “centrifugado” en línea mediante un reactor anudado (KR, “knotted reactor”) y colectado durante un tiempo definido de manera que

una cantidad fija del analito coprecipite junto a él. Posteriormente el precipitado se redissuelve en un pequeño volumen de un solvente orgánico (60 µl aprox.) y es inyectado dentro del horno.

Estos sistemas son de una gran aplicación en el análisis de trazas de metales en muestras en las cuales coexisten otros metales interferentes en concentraciones mucho mayores a la del analito. La selección adecuada del reactivo coprecipitante hace posible el “arrastré” selectivo del metal. Algunos coprecipitantes usados han sido: Fe(II)-HMDC (hexametilenditiocarbamato)¹⁵², Fe(II)-ditizona¹⁵³ y Fe(II)-APDC¹⁵⁴.

- **Extracción líquido-sólido utilizando microcolumnas:** En lo referente a la preconcentración mediante microcolumnas insertas en un sistema FI-ETA-AAS, se han descrito dos esquemas básicos. El primero utiliza la formación de complejos quelatos en solución entre los metales y ligandos como el dietilditiocarbamato (DDTC) o el amonio-pirrolidin-dietilditiocarbamato (APDC). Los complejos formados con los metales de transición son muy estables y pueden ser adsorbidos en soportes hidrofóbicos tales como sílica-C18 empacada en microcolumnas tal como se informa en la bibliografía¹⁵⁵⁻¹⁶².

En los trabajos mas recientes se ha utilizado con mayor frecuencia otro esquema de trabajo: la complejación en fase sólida con resinas que contienen grupos quelantes ^{59, 163-166}. La complejación en fase sólida ofrece diversas ventajas frente a la quelación en solución: las resinas pueden ser pretratadas y reutilizadas fácilmente, producen bajos blancos analíticos ya que se puede “limpiar” totalmente la columna en cada ciclo de preconcentración y elución, evita la liberación de agente quelante dentro del horno (como ocurre con la quelación en solución), etc. También es posible obtener mas información sobre la composición de la muestra ya que ciertas resinas quelantes que contienen grupos iminodiacetato (Chelex-100), han sido utilizadas en estudios de especiación en aguas naturales ^{70, 167}, por lo que su empleo en línea y en escala de trabajo reducida puede resultar muy atractivo.

Para ambos esquemas de quelación, luego de la preconcentración, el analito es eluido dentro del horno de grafito. Este es un paso crítico de la secuencia de análisis ya que el volumen inyectado en el horno es acotado y condicionante del grado de preconcentración del analito y de su elución completa. El sistema FIA debe ser diseñado para eluir completamente todos los metales en un volumen de eluyente acorde al aceptado por horno de grafito (o incluso menor, como veremos luego). El volumen de

eluyente necesario para la elución completa es función de la fuerza con que los metales son retenidos por el material de relleno de la microcolumna y por el diseño de esta última, el que deberá tender a maximizar la interacción entre el analito y el relleno. Algunos rellenos permiten una elución completa en un solo paso utilizando pequeños volúmenes de ácidos (8-hidroxiquinolina inmovilizada⁵⁹). Otros rellenos como la sílica-C18 requieren volúmenes de elución mayores, generando un perfil de elución ensanchado (en volumen) que presenta una zona de coleo o “tailing” notorio que puede derivar en volúmenes de elución que superan la máxima capacidad del horno.

Si esto ocurre existen distintas soluciones: se pueden usar sucesivos ciclos de elución e inyección con volúmenes mas pequeños ¹⁵⁷, o inyectar parcialmente el volumen de eluido utilizando un sistema de muestreo del mismo (controlado por tiempo o por volumen^{155, 156}), o evaporarlo parcialmente para reducirlo adecuadamente.¹⁵⁹.

Una ventaja de los sistemas FIA con microcolumnas es la facilidad con la que pueden automatizarse los procedimientos de preconcentración desde la etapa de acondicionamiento de la columna hasta la etapa final de elución dentro del analizador. Dado que los microprocesadores modernos pueden controlar procesos simultáneos mediante el uso de “ventanas” que operan en distintos planos; es posible operar paralelamente el ciclo de atomización en el detector y el de preconcentración en el sistema de flujo; lo que compensa de algún modo la frecuencia de operación relativamente lenta del horno de grafito (20 muestras h⁻¹ aprox). Es importante aclarar en este punto, que la mayoría de los sistemas de preconcentración FI-ETA-AAS presentados en la bibliografía son automáticos (como en el caso de este trabajo), pero no automatizados. Los métodos automáticos son aquellos en los cuales las operaciones manuales son reemplazadas por operaciones realizadas por máquinas, pero no existen vías de retro-alimentación (“feed-back”), que le permitan al sistema tomar decisiones y modificar su secuencia de operación. Los sistemas automatizados son aquellos que incorporan inteligencia artificial o lógica difusa (“fuzzy logic”) al software de control y por lo tanto poseen cierto grado de decisión que les permite cambiar los parámetros de operación ¹⁶⁸.

Muchos autores que han diseñado sistemas de flujo acoplados a ETA-AAS sostienen que las operaciones de preconcentración son realizadas automáticamente ^{59, 154, 155, 157-159, 163-165, 169, 170}. Sin embargo, al analizar en detalle el funcionamiento de los mismos vemos que solo unos pocos son capaces de realizar automáticamente **todas** las

operaciones ^{59, 154, 155, 157, 159, 169, 170}. El resto, requiere de intervenciones del operador en alguna o algunas de las etapas.

La cantidad de muestra pre-concentrada en estos sistemas se puede controlar de dos formas: temporal o volumétricamente. En el modo temporal, el control se realiza a través de un temporizador que conmuta las válvulas del sistema de flujo a tiempos definidos que se comandan desde el software. El volumen de muestra pre-concentrado depende del tiempo en el que las válvulas se encuentran en la posición de “carga” de la microcolumna (tiempo de preconcentración). En el caso del control por volumen, el sistema posee un lazo (“loop”) de inyección de volumen fijo donde se carga la muestra que luego se descarga en la columna de preconcentración. Los sistemas basados en “loops” de volumen fijo son levemente mas precisos, puesto que no dependen de la reproducibilidad de la velocidad de flujo de la bomba peristáltica. Su principal desventaja es su rigidez que impide cambiar el volumen de muestra durante el análisis (alternativa interesante cuando el nivel de concentración del analito es incierto).

Los sistemas basados en control temporal son mas flexibles puesto que el tiempo de preconcentración se controla desde una computadora tipo PC: un aumento en el tiempo de carga se traduce en un aumento de la cantidad de analito retenido en la columna lo que permite: calibrar en base tiempo, optimizar la sensibilidad y variar de forma continua el límite de detección. Di et al.¹⁶⁴ han desarrollado un sistema con control temporal de la cantidad de muestra pre-concentrada donde la secuencia de elución se realiza manualmente. Shuttler et al.¹⁷⁰ han desarrollado un sistema totalmente automático, también controlado a través de temporizadores, pero que utiliza dos muestreadores automáticos (“autosamplers”) para realizar las operaciones, lo que las complica innecesariamente.

- **Extracción líquido-sólido utilizando reactores anudados:** En los últimos años, se ha desarrollado una opción a las microcolumnas de preconcentración que consiste en la quelación en solución de los metales y la posterior adsorción de los complejos en las paredes de un reactor anudado (KR) de Teflón® ¹⁷¹⁻¹⁷⁵. Estos sistemas presentan la ventaja de ofrecer escasa resistencia al paso de las soluciones lo que permite aumentar los flujos de operación y secuestrar, para idénticos tiempos que los utilizados con los sistemas anteriores, una masa mayor de analito. Además, la vida útil de los reactores anudados es virtualmente indefinida, a diferencia de las microcolumnas de preconcentración cuyo relleno se compacta con el tiempo. La gran desventaja de este

método radica en que la retención de los complejos en las paredes del KR es débil y las eficiencias de preconcentración bajas (inferiores al 40%). Además, la geometría del sistema de flujo es mas complicada, lo que dificulta el proceso de automatización.

En el presente capítulo describiremos los resultados obtenidos con un sistema en flujo continuo sencillo de operar y completamente automático donde el paso de preconcentración (basado en tiempo) se realiza sobre una microcolumna rellena con una resina quelante con grupos activos iminodiacetato (Chelex-100). El sistema desarrollado permite la elución de los metales pesados en un solo paso, sin recurrir a muestreos parciales del volumen eluido.

1.2 Resultados y Discusión.

1.2.1 Parámetros para la evaluación del proceso de preconcentración.

Para evaluar la magnitud y completitud del proceso de separación y preconcentración se utilizan diferentes parámetros de mérito. Los parámetros de mérito más utilizados son: el factor de enriquecimiento, el factor de amplificación, el volumen de muestra consumido en la preconcentración y la eficiencia porcentual de transferencia de masa entre las fases.

Teóricamente se define al factor de enriquecimiento o factor de preconcentración (EF, "Enrichment Factor") como el cociente entre la concentración de analito en el concentrado dividido por la del analito en la muestra original.

$$EF = \frac{C_{eluido}}{C_{muestra}}$$

En general el EF es calculado como el cociente de las pendientes de las rectas de calibrado con y sin preconcentración. Si en alguna de estas curvas de calibrado existe un cambio de sensibilidad (aumento o disminución de la pendiente) provocado por uno o varios reactivos usados en el proceso de preconcentración o elución; es necesario corregir el EF por uno o varios factores de respuesta. El valor de EF modificado por los factores de respuesta (N_x) se conoce como Factor de Amplificación (N_t , "Enhancement Factor") y es el cociente de las concentraciones en ambas fases corregido por los distintos factores de respuesta que produzca el sistema FIA:

$$N_t = N_1 \cdot \dots \cdot N_x \cdot \dots \cdot N_n \cdot EF$$

En el caso del sistema de preconcentración FI-ETA-AAS, la elución se hace con HNO_3 2 M.. La sensibilidad de las determinaciones de cadmio en horno de grafito en

presencia de ácido nítrico es un 27% menor que en agua. Por lo tanto, existe un factor $N = 0.73$ que debe aplicarse al factor de enriquecimiento para obtener el factor de amplificación N_t .

Una cantidad aspecto importante a tener en cuenta del proceso de preconcentración es la cantidad de muestra utilizada para aumentar el factor de enriquecimiento, por lo que resulta importante informar el EF junto con el volumen de muestra utilizado. El uso de un gran volumen de muestra para aumentar el EF disminuye la frecuencia de análisis, lo que obliga a la evaluación simultánea de ambos parámetros. Como veremos en capítulos posteriores, es necesario seleccionar el mínimo volumen de muestra compatible con la sensibilidad deseada.

Una figura de mérito clave de los sistemas de preconcentración es la Eficiencia Porcentual (E%), mejor definida como el factor de transferencia entre fases (P, "Phase Transfer Factor"). Este factor se define como la masa de analito en la muestra original comparada con la masa de analito en el concentrado, resultando:

$$P = \frac{m_{\text{eluido}}}{m_{\text{muestra}}}$$

(Por lo tanto $E\% = P \cdot 100$). La importancia de este factor reside en su capacidad para la evaluación de la eficiencia de transferencia del analito de la fase donora (muestra) a la fase aceptora (resina quelante). El valor de P puede ser menor que la unidad si no se alcanza el equilibrio de transferencia del analito entre las fases. Este hecho no es raro en FIA donde se trabaja con soluciones transportadoras a velocidades lineales de flujo bastante altas que pueden hacer que el tiempo de contacto entre el analito y la resina no sea suficiente como para alcanzar el equilibrio. Este valor de P puede mejorarse de diversas formas, tal como explicaremos en capítulos posteriores, entre las que podemos nombrar: la operación a flujos más bajos (que aumenta el tiempo de contacto resina-analito), la modificación el diseño de la microcolumna (si se que mejora el contacto resina/analito), etc. Otra causa de baja retención es la masa de resina utilizada, que en el caso de microcolumnas es baja (unos pocos mg). Si la cantidad de grupos funcionales contenidos en ésta masa es insuficiente, puede ocurrir saturación de los mismos. Si la E% es muy baja es posible que la columna esté siendo saturada por el analito o por alguno o algunos de los componentes de la matriz. En estos casos las interferencias pueden ser severas en la medida que se manifiesta competencia entre los distintos iones (analito e interferentes) la que estará relacionada con la selectividad que presente el relleno para cada metal involucrado.

Una pregunta muy común entre los analistas no familiarizados con el proceso de preconcentración en FIA es: ¿Cómo es posible realizar el análisis si la transferencia de masa no es total? ($P < 1$) La respuesta es sencilla y de índole práctica: durante el calibrado, la muestra es comparada contra patrones que han sido preconcentrados en idénticas condiciones y por lo tanto son afectados por una idéntica eficiencia porcentual. A pesar de que P sea menor que la unidad, el análisis es posible ya que se trata de un parámetro extremadamente reproducible, tanto para las muestras como para los patrones.

1.2.2 El proceso de preconcentración

El proceso de preconcentración (también llamado de “carga de muestra”) es el centro del procedimiento descripto¹⁷⁶. El sistema de flujo desarrollado junto a los detalles experimentales se describen detalladamente en Materiales y Métodos.

Para la preconcentración se utilizó una metodología química ampliamente estudiada^{123, 134}, ya que la resina Chelex-100 es un material muy bien caracterizado para la retención de metales pesados¹⁷⁷. Su alta capacidad (aprox. 3 meq g⁻¹ resina) la hace muy adecuada para la construcción de microcolumnas donde sólo se puede empacar una masa pequeña. Esta alta capacidad es importante para poder alcanzar buenos factores de preconcentración sin saturar la resina y para minimizar interferencias que se manifiestan por competencia por los sitios activos. Otro motivo que la hace interesante es que las **especies** metálicas que pueden ser capturadas por esta resina (cationes, complejos inorgánicos, complejos orgánicos débiles) están correlacionadas con la biodisponibilidad de dichos metales¹⁷⁸. Como en nuestros laboratorios se desarrollan temas de investigación relacionados con la acumulación de metales tóxicos en organismos marinos¹⁷⁹⁻¹⁸¹ es necesario obtener información analítica de aguas que tenga un correlato biológico, como veremos en los capítulos siguientes.

No obstante, el uso de Chelex-100 posee dos inconvenientes que han sido informados en la bibliografía¹⁵⁶: a) la baja selectividad de los sitios activos presentes en la resina produce una retención parcial de metales alcalino térreos (Ca y Mg), componentes habituales de las aguas naturales y b) el volumen de lecho ocupado por la resina disminuye a la mitad cuando se la acidifica durante la etapa de elución. Estos dos inconvenientes han sido resueltos en este trabajo mediante sencillos arreglos experimentales: a) los metales alcalino térreos son eluidos selectivamente de la columna durante la etapa de lavado que sucede a la preconcentración, y b) el cambio de volumen

de la resina (hinchamiento o “swelling”) que ocurre durante la etapa de elución se compensa con el uso de dos tapones de espuma de goma de alta elasticidad que mantienen el relleno en su lugar, impidiendo la formación de vacíos internos. Por otro lado, estos cambios de volumen pueden no ser tan importantes en FI-ETA-AAS como en FI-FAAS dado que en el primer caso, el eluyente puede ser separado por dos pequeñas burbujas de aire^{166, 182} que se intercalan en su paso, evacuando completamente la columna y no dejando volúmenes muertos sin eluir.

Dado que el sistema de flujo es controlado temporalmente se pudo estudiar la influencia de la cinética de quelación sobre la retención de los iones metálicos. Se realizaron experimentos variando el flujo de la muestra a través de la columna y el tiempo de preconcentración de manera de mantener constante la masa total de analito en contacto con el relleno. No se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de preconcentración, siendo ésta constante para flujos de muestra entre 1 y 5 ml min⁻¹. Los flujos menores demoran innecesariamente los experimentos produciendo una baja frecuencia de análisis y los flujos mayores no pudieron ser utilizados por restricciones mecánicas al paso del líquido. Es de notar que un flujo de muestra de 5 ml min⁻¹ implica un tiempo de contacto (volumen muerto de la columna/flujo de muestra) de aproximadamente 50 milisegundos, lo que asegura la retención selectiva de los “acuo” complejos y de los complejos inorgánicos lábiles, tal cual está reportado en diversos trabajos¹⁸³⁻¹⁸⁶. Este hecho tiene una relevancia crucial puesto que abre la posibilidad de realizar especiación química a través del control simple del tiempo de contacto entre la muestra y la resina o bien la reactividad de la misma. Cuando el tiempo necesario para capturar las especies metálicas en solución (tiempo de agotamiento) es mayor que el tiempo de contacto muestra/relleno, es posible realizar una retención selectiva de las especies metálicas que reaccionan rápidamente con la resina (i.e. acuo complejos, complejos inorgánicos y orgánicos lábiles). Esta especiación puede hacerse con una alta repetitividad puesto que el tiempo de contacto entre la muestra y la resina es reproducible tal como veremos al estudiar la precisión del sistema de flujo en capítulos posteriores.

Para estudiar el punto de saturación del relleno de la columna y la posibilidad de realizar “diluciones en línea”, se realizaron experiencias a diferentes tiempos de preconcentración. La señal de absorción obtenida mostró ser lineal con el tiempo de preconcentración (y por lo tanto con la masa de analito a flujo constante) siendo los límites superiores de 3 ng para Cd y 4 ng para Pb. Ambos límites son varios ordenes

menores que la capacidad total de la resina pero, probablemente, al aumentar la masa del analito, puedan aparecer deficiencias en el transporte de masa o efectos competitivos entre iones por lo que las muestras y los estándares deben mantenerse dentro del intervalo de linealidad. La linealidad de la señal de absorbancia con el tiempo de preconcentración permite realizar calibración en línea con un solo patrón de calibrado variando el tiempo de preconcentración a flujo constante. Se pueden por ejemplo, programar secuencias de calibración automáticas “via” software con tiempos de preconcentración en aumento para un mismo patrón de calibrado. Esto último constituye la característica distintiva de los sistemas con control temporal: la capacidad de variar en forma continua figuras de mérito analíticas tales como la sensibilidad y el ámbito lineal de calibrado. Estas experiencias fueron realizadas tanto para el material de referencia como para los patrones de calibrado no encontrándose diferencias significativas (al 95% de confianza) entre los resultados obtenidos, lo que indica ausencia de saturación de la columna y de efectos competitivos de concomitantes presentes en las muestras analizadas.

1.2.3 Separación del Analito de su Matriz.

Como se ha comentado anteriormente, una etapa final de lavado con buffer acetato de amonio (pH=5.2) remueve todos los iones Ca y Mg retenidos por la columna, dado que a este pH se registra un mínimo en la eficiencia de preconcentración para estos cationes¹²³. A pesar de que algunos autores descartan a la resina Chelex-100 para fines separativos dada su inespecificidad, es importante considerar que aún con resinas mas selectivas (como las que veremos mas adelante), los sitios activos no ocupados por los metales de transición son ocupados por otros iones mas débilmente retenidos pero que se encuentran en concentraciones mayores (como los alcalino térreos). Esto hace que un paso de lavado sea inevitable en la mayoría de los casos⁵⁹. En la Figura 1.1(a) se muestra una señal atómica de Pb correspondiente a la inyección directa de agua de mar (utilizando $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ al 5% como modificador de matriz), además de la curva de agregado patrón sobre la misma muestra. Vemos que la sensibilidad, aún en presencia de modificador de matriz es pobre y que la señal de fondo es muy importante. En la Figura 1.1(b) se muestra la señal correspondiente a una muestra de agua de mar sometida al proceso de preconcentración y su correspondiente curva de calibrado. En este caso vemos que la señal es mucho mas “limpia” y que no existe absorción de fondo importante.

1.2.4 Elución dentro del horno de grafito.

Como habíamos explicado en la introducción, el volumen de elución debe ser compatibilizado entre la completa liberación de los metales de la resina y el admitido por el horno de grafito. Este último depende del tipo de horno utilizado: si la atomización se realiza en hornos sin plataforma (atomización “desde la pared”) el máximo volumen es de 100 μl , y si se realiza en hornos con atomización desde plataforma de L’vov el máximo es 50 μl . Dependiendo el grado de dispersión del eluyente a lo largo del sistema de flujo (lo que depende de cómo se realiza la elución como veremos luego), o de la afinidad por los metales de la resina utilizada, pueden requerirse volúmenes mayores que 100 μl para una elución completa. En éste caso, el volumen de eluido debe reducirse. Se han informado en trabajos previos diversas soluciones para reducir el volumen del eluyente (muestreo del eluido por tiempo o por volumen¹⁸⁷, elución doble¹⁵⁷ y evaporación parcial del eluido¹⁵⁹). La operación de estos sistemas es complicada, poco práctica y muy lenta, aspectos que condicionan la aplicabilidad de éstos métodos.

En nuestro caso, hemos realizado la inyección completa del eluido correspondiente a 8 volúmenes de lecho (80 μl de ácido nítrico 2 M) eliminando la necesidad de sub-muestreos. Una segunda elución con otra porción de 80 μl de ácido mostró la señal correspondiente al blanco, lo que puso de manifiesto la elución completa de los metales. La concentración de ácido nítrico utilizada fue la máxima compatible con una elución completa de los metales, de manera que no registrar efecto memoria. Una concentración 1 M de HNO_3 produce un efecto memoria de aproximadamente un 10% (para 0.1 ppm de Cd). Valores mas altos que 2 M fueron rechazados porque desgastan innecesariamente el tubo de grafito y disminuyen la sensibilidad¹⁸⁸. Una concentración 2M de HNO_3 disminuye la sensibilidad en aproximadamente un 27% para ambos metales por lo que el factor de amplificación es menor que el factor de preconcentración.

La diferencia central de este sistema con aquellos en los que la inyección necesita un sub-muestreo es el pequeño volumen de elución utilizado. Esto es posible debido a la separación del ácido y el carrier por dos burbujas de aire de 20 μl que minimizan la dispersión del reactivo.

La inyección completa del eluido presenta el inconveniente de no permitir replicar la atomización del analito en cada muestra preconcentrada; por lo que se

desarrolló la secuencia de “inyección parcial”, que permite replicar la atomización de una misma solución de eluido. Este procedimiento de elución produjo una desviación estándar relativa (RSD%) entre replicados menor que en el caso de la inyección completa (Tabla 1.1), lo que indica que la precisión del método está dada principalmente por la etapa de atomización. La principal desventaja de la inyección parcial es la disminución de masa inyectada que obliga a aumentar el tiempo de preconcentración para mantener constante la sensibilidad.

1.2.5 Blancos

Al trabajar en nivel de ultravestigios (partes por trillón), las señales correspondientes al/los blancos de reactivos son críticas. Es muy frecuente encontrar que la señal del blanco supera a la de la muestra. En nuestro caso puede ser debido a impurezas en el buffer de preconcentración y/o en el ácido de elución. Es por eso que sólo se han usado reactivos de alta pureza (ácidos destilados, ver experimental) ó purificados previamente. La señal de blanco obtenida está compuesta de varias contribuciones: algunas de ellas fijas y otras variables (relacionadas con el tiempo asignado a cada etapa de la secuencia de control del sistema de flujo). Estas contribuciones serán analizadas en detalle en el capítulo dedicado al análisis de las figuras de mérito ya que el blanco de reactivos es el determinante del límite de detección (LOD). Sin embargo, expondremos aquí un primer análisis.

Para el método propuesto pueden definirse diferentes blancos:

- El blanco de elución, que tiene en cuenta la concentración de metales en el ácido nítrico.
- El blanco de reactivos que tiene en cuenta la contribución de metales presentes en el ácido nítrico y en el buffer. Este blanco es sustraído a las muestras reales siendo la mayor contribución al mismo la del ácido de elución, dado que la solución buffer se purifica en línea.
- El blanco de calibrado que incluye todos los blancos precedentes y además la contribución de los metales presentes en el agua deionizada con la que se preparan los patrones. Las curvas de calibrado fueron corregidas por este valor del blanco que se obtiene preconcentrando DIW de idéntica manera que cualquiera de los patrones.

La concentración de Pb en el DIW fue de $0.017 \pm 0.005 \mu\text{g l}^{-1}$, Cd no fue detectado. Las muestras fueron corregidas por el blanco de reactivos solamente, el que se determinó haciendo fluir a través de la columna solamente buffer de preconcentración

pero no DIW. El blanco de calibrado y el blanco de reactivos pueden ser similares si el DIW que se utiliza es de muy alta pureza.

El rendimiento del procedimiento FIA se resume en la Tabla 1.2. Nótese que la eficiencia de la transferencia de masa ronda el 70% para ambos analitos lo que es atribuible a deficiencias en el recorrido de los fluidos dentro de la columna o a deficiencias en el transporte de masa.

1.2.6 Operación del Horno de Grafito.

Los parámetros de operación del programa de calentamiento del horno se optimizaron mediante diseños experimentales fraccionales del tipo central compuesto¹⁸⁹. Se midieron soluciones sintéticas que simulaban la composición del eluido de la microcolumna inyectando el mismo volumen de solución. Los factores estudiados fueron la temperatura y duración de las etapas de secado y calcinación. Como variable de respuesta se maximizó la absorbancia en el máximo del pico de atomización. El estudio demostró que la principal pérdida de señal para Cd se debe a un tiempo de calcinación largo a altas temperaturas lo que se relaciona con la alta volatilidad de sus sales.

Para encontrar el valor óptimo de las variables del programa de calentamiento se usó el método del “ascenso mas pronunciado” (“steepest ascent”). Este programa se muestra en la Tabla 1.3. Las figuras de mérito para la determinación de Pb y Cd obtenidas con el programa de calentamiento optimizado se muestran en la Tabla 1.1. La etapas de secado del programa de calentamiento son mas largas de lo habitual, debido al gran volumen inyectado. Hemos encontrado que una etapa de secado lenta a temperaturas razonablemente bajas, mejora la precisión, al hacerse mas reproducible el secado de la gota de eluyente. Si la gota de líquido está muy próxima al agujero del tubo del atomizador, el gas inerte (Ar) circulante en el interior del tubo puede producir salpicaduras que disminuyen mucho la vida útil por oxidación exterior y defectos del contacto eléctrico. Obviamente, esto disminuye la sensibilidad y sobre todo, la reproducibilidad de las medidas.

1.2.7 Resultados para Materiales de Referencia.

La trazabilidad del método propuesto se estableció a través del análisis de Cd y Pb en el material de referencia certificado CASS-3 (agua de mar costera). Los resultados

presentados en la Tabla 1.4 muestran que el sistema automático desarrollado provee datos analíticos dentro del rango de los valores certificados.

TABLAS DEL CAPITULO 1:

Performance	Cd (inyección parcial).	Cd (inyección completa)	Pb (inyección completa)
Límite de detección ($\mu\text{g l}^{-1}$) (3σ)	0.001	0.002	0.008
Blanco de reactivos ^a (pg) (n=4)	69 ± 1 (por inyección)	79 ± 2 (5 ml de muestra)	78 ± 3 (40 ml de muestra)
Repetitividad (RSD %)	2.7 ^b	5.0 ^c	4.0 ^c

^a Ver texto para explicación completa.

^b Inyección parcial del eluato: 3 ciclos de preconcentración, 3 disparos del horno de grafito para la misma solución de eluido. $\text{RSD}\% = (s/x)\%$ (n=9). La desviación estándar se calcula entre las 3 medias, obtenidas cada una de los tres disparos de atomización.

^c Inyección completa del eluato ($C=0.100 \mu\text{g l}^{-1}$): 3 ciclos de preconcentración y un disparo de atomización para cada uno. $\text{RSD}\% = (s/x)\%$ (n=3)

Tabla 1.1: Figuras de mérito para la determinación de Cd y Pb mediante el sistema FI-ETA-AAS.

	Cd (inyección parcial)	Cd (inyección completa)	Pb (inyección completa)
Volumen de muestra (ml)	15.0	5.0	5.0-40.0
Factor de Amplificación (N)	33 ^a	33 ^b	240 ^b (40 ml muestra)
Eficiencia Porcentual ^c (E%)	71 ± 3	71 ± 4	67 ± 4
Volumen de elución (μl)	220	80	80
Volumen de inyección (μl)	70	80	80
Número máximo de ciclos de atomización.	3	1	1

^a Calculado como el cociente de masas en la muestra y en el concentrado.

^b .Calculado como el cociente entre la señal de una solución sin preconcentrar y una preconcentrada. Ver Introducción

^c Comparado con la masa total de analito en contacto con la columna. Ver Introducción

Tabla 1.2 : Características del proceso FIA.de preconcentración en línea.

<i>Etapas</i>	Cd (inyección parcial)			Cd (inyección completa)			Pb (inyección completa)		
	Temp. (°C)	Rampa (s)	Escalón (s)	Temp. (°C)	Rampa (s)	Escalón (s)	Temp. (°C)	Rampa (s)	Escalón (s)
Secado 1	90	5	30	90	5	30	90	5	30
Secado 2	120	30	0	120	30	0	120	30	0
Secado 3	160	5	5	160	5	5	160	5	5
Calcinación	280	10	6	350	10	6	350	10	6
Atomización (muestreo de la señal)	1300	0	2	1300	0	2	1600	0	2
Limpieza	1600	2	1				1800	2	1

Tabla 1.3 : Programa de calentamiento del horno de grafito.

Material de referencia	Cd		Pb	
	Certificado / $\mu\text{g l}^{-1}$ (95% conf.)	Encontrado / $\mu\text{g l}^{-1}$ (n=5 ; 95 % conf.)	Certificado / $\mu\text{g l}^{-1}$ (95% conf.)	Encontrado / $\mu\text{g l}^{-1}$ (n=5 ; 95% conf.)
CASS-3, (NRCC).	0.030 ± 0.005	0.033 ± 0.006	0.012 ± 0.004	0.014 ± 0.005

Tabla 1.4: Validación mediante el análisis de un material de referencia

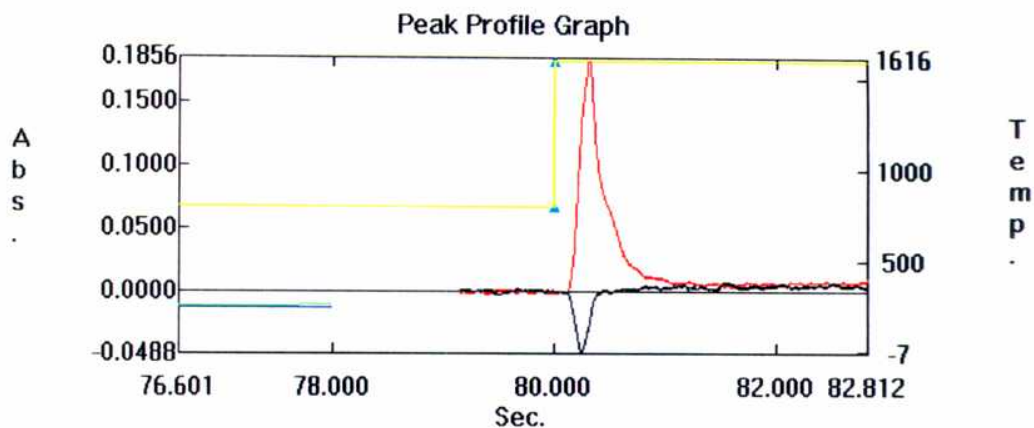


Figura 1.1: Medida directa de Pb en agua de mar. Señal para 40 ppb de Pb con un agregado de 20 microlitros de $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 0.5% como modificador de matriz, la matriz está diluída 1:3. La línea negra corresponde a la señal de absorción atómica y la roja a la señal de absorción de fondo (deuterio).

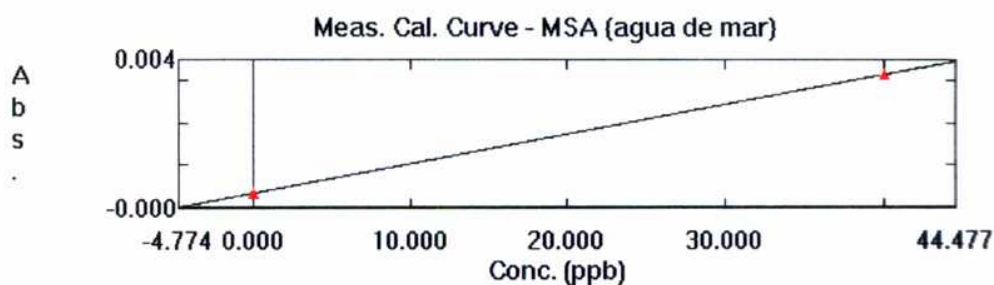


Figura 1.2: Curva de agregado patrón de Pb para la muestra anterior.

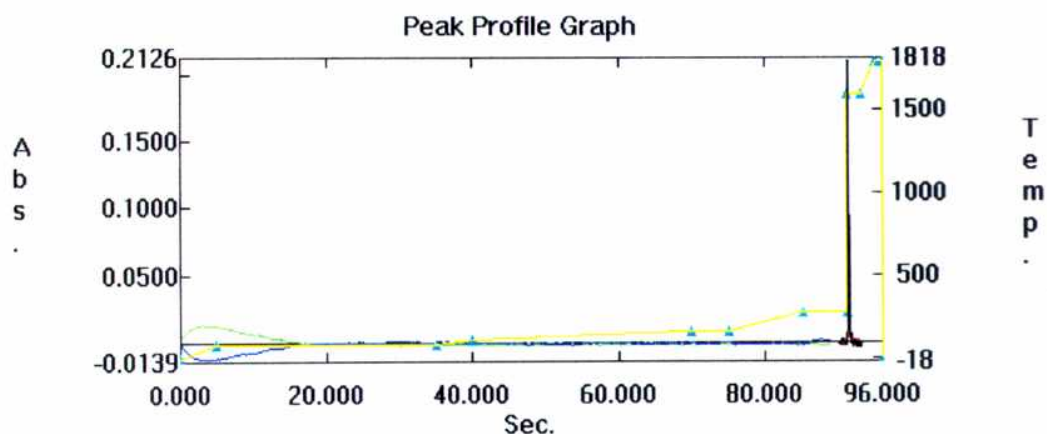


Figura 1.3: Señal para 0.1 ppb de Pb en agua de mar sometida a la separación mediante FI-ETA-AAS (absorbancia del blanco=0.035 AU)

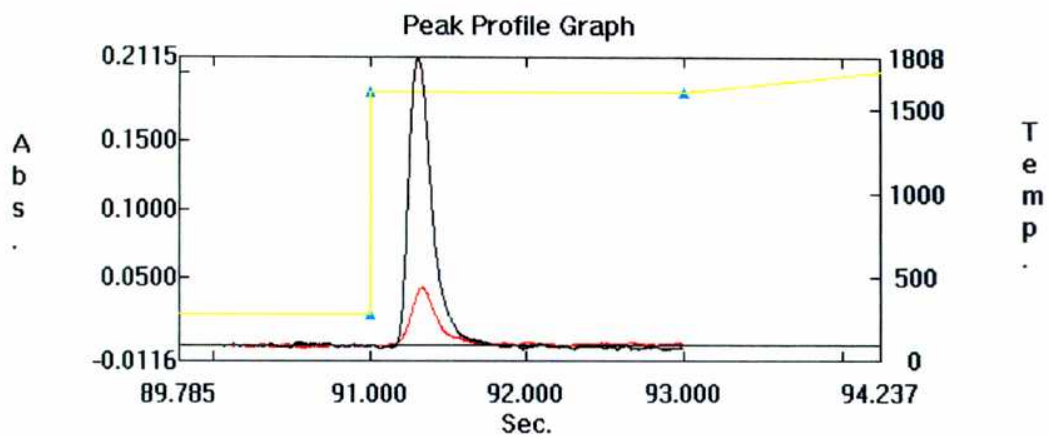


Figura 1.4: Ampliación de la señal mostrada en la Figura 1.3.

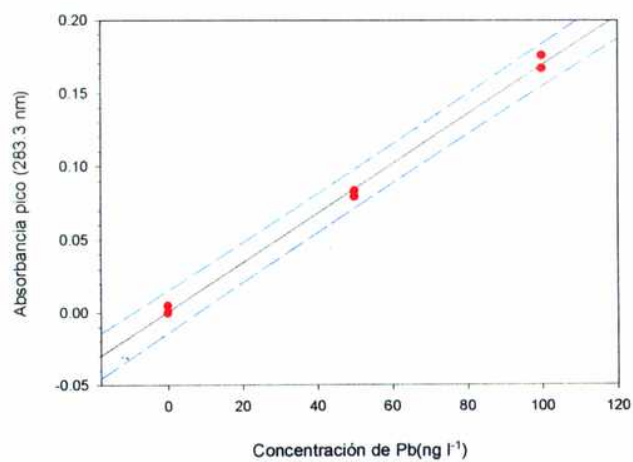


Figura 1.5: Curva de calibrado para Pb utilizando el sistema FI-ETA-AAS.

CAPITULO 2



1705

"Corpora non agunt nisi fluida siue soluta"

"Las sustancias no reaccionan salvo que sean líquidas o estén disueltas", dice un antiguo dicho empírico, sin embargo, los intercambiadores iónicos son una clara excepción¹⁹⁰.

2 Capítulo 2: Optimización de la etapa de separación. Nuevos Soportes Quelantes: Preconcentración con 8-hidroxiquinolina inmovilizada sobre sílica.

La primera referencia histórica al intercambio iónico se encuentra en la Biblia, cuando Moisés pide a Jehová que le dé agua para beber. Jehová muestra a Moisés un árbol que éste derriba dentro del agua impura ("amarga") y el agua impura se convierte en agua pura ("dulce") (Exodo 15:23-25). Es indudable que el método de Moisés de purificación de agua consistió en un método de intercambio iónico a gran escala. Un milenio después, Aristóteles en su obra describió que el agua de mar perdía parte de su salinidad cuando se filtraba a través de "ciertas arenas".

La primer mención al intercambio catiónico como lo conocemos hoy se evidenció cerca de 1850 en el estudio de suelos realizado por dos químicos ingleses (Thompson¹⁹¹ y Way¹⁹²). Estos suelos "intercambiadores" se identificaron luego como arcillas y zeolitas. La primera resina de intercambio sintética (llamada "Permutita") fue sintetizada por los químicos alemanes Harm y Rümpler¹⁹³ en 1903 con un propósito muy ambicioso: la recuperación de oro del agua de mar.

En la década del '40 hubo una gran evolución en el tema de intercambiadores cuando dos químicos ingleses, Adams y Holmes descubrieron que al moler discos de fonógrafo, el material obtenido tenía propiedades de intercambiador iónico lo que llevó al estudio de éste fenómeno con la intención de obtener otros materiales de mejor performance¹⁹⁴. Desde ese momento, grandes empresas alemanas comenzaron a producir resinas de intercambio iónico a escala industrial, lo que fue continuado por empresas norteamericanas e inglesas después de la Segunda Guerra Mundial.

2.1 Factores críticos en la separación analítica de iones.

Actualmente, la separación de iones metálicos es uno de los objetivos más importantes de la Tecnología Química¹⁹⁵. El objetivo de la separación puede ser recuperar los

metales de la muestra que los contiene (metales preciosos en hidrometalurgia por ej.) o purificar la muestra extrayendo los contaminantes metálicos nocivos (purificación de agua). Independientemente del objetivo tecnológico a gran escala, siempre es necesaria una primera etapa de evaluación a pequeña escala, que indique cuál es el contenido de metales en la muestra. Es aquí donde entran en juego la separación y la cuantificación.

Hemos visto que la separación de iones en Química Analítica se realiza con el objetivo de facilitar el análisis modificando la composición de la matriz que acompaña al analito y secuestrando una cantidad suficiente de éste último de modo de poder analizarlo mediante técnicas instrumentales convencionales aún en bajas concentraciones. Un punto crucial de esta separación es la síntesis del material secuestrante. Existen infinidad de materiales capaces de secuestrar metales, bien por intercambio catiónico, por intercambio de aniones complejos de estos metales, por quelación en fase sólida o por sorción de complejos formados en fase líquida. La elección de estos materiales debe estar guiada por el conocimiento exhaustivo del problema químico que se desea solucionar lo que permitirá seleccionar el ligando adecuado que actuará como secuestrante. Además se deberá seleccionar el soporte sobre el cual este ligando estará anclado.

La selección de materiales quelantes debe ser resuelta conjugando los siguientes factores:

- La química del ion metálico en solución considerando: su interacción con los ligandos presentes en fase homogénea, su interacción con otros iones metálicos (reacción superficial), las posibles reacciones de intercambio de ligandos y las reacciones redox.
- La química del grupo funcional en la fase sólida considerando: su densidad superficial, su accesibilidad a distintos solutos, su grado de ionización, y su flexibilidad en solución.
- Las propiedades morfológicas del soporte que se traducirán en propiedades mecánicas tales como el hinchamiento y la generación de “fases gel”.
- La cinética de la reacción entre el ion y la resina incluyendo fenómenos de transporte de masa y de cinética química de la reacción metal-ligando.

Los factores termodinámicos (constantes de intercambio o de partición) son críticos en separaciones en “batch”. En las separaciones FIA se suman además factores como la

velocidad de transporte de los iones y la velocidad de reacción entre el metal y el ligando.

Se presentan a continuación los materiales quelantes mas usados en Química Analítica en la última década y se comparan críticamente algunos de ellos en términos de su utilidad en la preconcentración de metales contaminantes usando el sistema FI-ETA-AAS descrito en el capítulo anterior.

2.2 Intercambio iónico y quelación

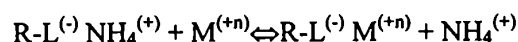
Para comenzar a hablar de materiales secuestrantes de metales intentaremos responder la siguiente pregunta: ¿Cuál es la diferencia entre los “intercambiadores iónicos” y los materiales quelantes?

Esta pregunta no es tan simple de responder y requiere varias consideraciones que analizaremos a continuación.

Comencemos estudiando la naturaleza del proceso de intercambio iónico que se lleva a cabo en un grupo funcional inmovilizado sobre un soporte dado (orgánico, o inorgánico). Tomemos como ejemplo los procesos que ocurren en la separación de cationes de metales pesados usando un material quelante como el del capítulo anterior. La etapa previa al paso de extracción de los metales pesados es el acondicionamiento del grupo funcional de modo de encontrarlo en una forma química que haga posible el intercambio. La carga neta del grupo superficial debe estar contrarrestada por un ion que sea fácilmente intercambiado: en el caso de intercambio catiónico se eligen iones monovalentes (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , H^+).



Una vez que el material se convierte a la forma amonio (por ejemplo), se “carga” la muestra en la columna rellena con el material. El intercambio procederá según la siguiente reacción reversible:



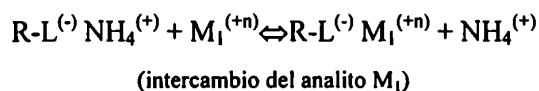
Donde “R-L” simboliza al grupo superficial y M^{+n} simboliza al analito. Esta reacción es reversible y puede ser desplazada hacia ambos lados con un exceso

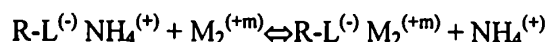
suficiente de alguno de los cationes. Cuanto mayor sea la afinidad del ligando por el analito, más desplazada estará la reacción hacia productos. Una vez finalizada la carga, deberíamos haber producido la separación del analito de la matriz. Si el material intercambiador no posee alta afinidad por los cationes de la matriz, éstos no serán retenidos y la separación habrá sido efectiva.

En el análisis anterior hemos supuesto que sólo un analito es intercambiado por el ligando superficial, sin embargo, esto no es cierto, y todos los cationes presentes en la muestra tenderán a intercambiarse en mayor o menor grado. Las separaciones analíticas se basan en manipular la magnitud del intercambio de los distintos cationes de manera de hacer selectiva la extracción para uno o bien para un grupo de ellos. Como regla general, la fase estacionaria mostrará mayor afinidad por los iones que tengan mayor carga y a igualdad de carga, la selectividad será mayor por aquellos que tengan el menor radio iónico en solución. En el análisis clásico, se ponía muchísimo énfasis en la selectividad de las separaciones de metales, énfasis que fue disminuyendo con la aparición de detectores específicos (AAS por ejemplo).

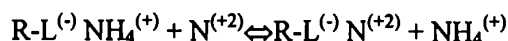
Un caso donde la selectividad del grupo ligante es crucial para la separación se da cuando el analito se encuentra en una proporción extremadamente baja con respecto a los demás metales capaces de ser retenidos. La concentración de ligandos en el intercambiador de iones (una medida de su “capacidad”) puede ser menor que la concentración total de cationes en la fase homogénea por lo que si el material no es selectivo, o mejor aún, no es específico para el analito, se producirá un fuerte efecto de competencia donde las cantidades relativas de los metales retenidos en el sólido no reflejarán las cantidades relativas en la solución y por lo tanto la separación no tendrá utilidad alguna. Veremos algunos ejemplos de este fenómeno al examinar las experiencias de saturación de resinas impregnadas. Si el material intercambiador es operado muy por debajo de su capacidad y es suficientemente selectivo no habrá efectos competitivos. Sin embargo, si trabajamos con cantidades de analitos por debajo de la capacidad de la resina, algunos cationes poco afines (como los alcalino térreos) serán intercambiados en los sitios que el analito no ocupe, esto es, en los sitios “libres”.

Veamos entonces, las reacciones del proceso de intercambio de un analito M_1 junto a las reacciones paralelas de intercambio de concomitantes de distinta afinidad por el intercambiador:





(intercambio de concomitantes M_2 mas afines que los alcalino térreos)



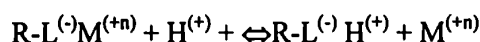
(Los sitios vacíos son ocupados por alcalino térreos "N")

Los metales alcalino térreos pueden ser eliminados de la columna lavándola con un exceso del contraion (amonio) luego de la carga del analito.

Una vez que los metales han sido "cargados" en la columna, deben ser eluidos dentro de la celda de detección (atomizador). Esto se logra con un exceso de otro cation, que invierte el equilibrio de intercambio. En el caso de que el ligando superficial sea un ácido fuerte (grupos sulfónicos), la elución se puede hacer con cualquier metal monovalente en gran exceso (desplazamineto). Si el ligando es un ácido débil (carboxilatos), en general el cation elegido es H^+ , puesto que al efecto de desplazamiento se le suma la afinidad intrínseca del ligando por protonarse.

La elución con ácidos minerales u orgánicos es una práctica muy común en las técnicas de intercambio iónico. La selección del ácido estará determinada por su pureza y por las interferencias que su anion pueda producir en el análisis (i.e., la elución con HCl no será posible si se desea analizar por ETA-AAS un elemento que forma haluros volátiles).

La reacción de elución es:



Otra posibilidad es la de eluir la columna mediante una reacción de intercambio de ligandos, utilizando un ligando más afin por el metal que el ligando superficial del relleno (EDTA por ejemplo):



Esta es una alternativa útil en muchos casos, sin embargo no es muy utilizada en el análisis de ultravestigios dado que se producen blancos altos: es mucho mas sencillo purificar ácidos minerales que soluciones de ligandos como el EDTA.

Hasta el momento hemos hablado de situaciones de equilibrio en las que se deja la muestra en contacto con el material secuestrante durante el tiempo suficiente como para que el equilibrio sea alcanzado. Cuando el análisis se realiza en columna (y más aún como en FIA, en microcolumnas) el equilibrio muchas veces no se alcanza, porque la velocidad a la que pasa la muestra a través de la columna es alta comparada con el tiempo que toma alcanzar el equilibrio. Por este motivo, los coeficientes de partición entre fases obtenidos por experiencias en “batch” sólo sirven como una guía en la selección de materiales. Para el diseño de sistemas en flujo es preferible el uso de información dinámica como la que proviene de experimentos de saturación. Estos experimentos se realizan midiendo la capacidad del relleno intercambiador de iones en una situación donde la muestra atraviesa la columna a un flujo volumétrico controlado. La concentración del analito a la salida de la columna se monitorea en función del tiempo obteniéndose una curva conocida como curva de “aparición” (o de “breakthrough”).

Veamos ahora de qué manera se encuentra unido el catión “M” al grupo fijo “L”. Si bien el proceso por el que se produce la retención es el de intercambio de un ion por otro, el grado de unión entre el metal y el grupo ligante es distinto clasificándose los materiales en intercambiadores iónicos (propriadamente dichos) y materiales quelantes. En el primer caso el metal interacciona con el grupo superficial a través de interacciones esencialmente electrostáticas: el catión se aproxima a la superficie sólida hasta la distancia que le permite su esfera de hidratación y forma un complejo llamado de “esfera externa” constituyendo un “par iónico” ¹⁹⁶. Este es el caso de los metales alcalinos con la mayoría de los intercambiadores.

En los materiales quelantes, el complejo formado entre el catión metálico y los átomos donores (en general O, N, S) es un complejo de “esfera interna”, donde el agua de solvatación es desplazada por los ligandos (para lo cuál hace falta energía adicional). La unión química tiene un gran carácter covalente como la que ocurre en los complejos en fase homogénea. El catión asociado a la superficie posee propiedades químicas distintas al catión no asociado (potencial redox por ejemplo). Sólo algunas moléculas de agua de solvatación son retenidas: aquellas que apuntan en sentido contrario al ligando.

Distinguir si un catión dado forma complejos de esfera interna o externa es posible a través de métodos espectroscópicos como la Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) existiendo sin embargo, evidencia experimental mas simple que esta: si la formación del complejo superficial no depende de la fuerza iónica

de la solución, seguramente estamos en presencia de un complejo de esfera interna. Los complejos de esfera interna son mucho mas estables que los pares iónicos de esfera externa, ya que estos últimos involucran uniones electrostáticas que se ven afectadas por la fuerza iónica de la solución. Notemos que en el análisis de agua de mar los complejos formados por Cd y Pb con los grupos iminodiacetato de la resina quelante son del tipo de esfera interna, puesto que las curvas de calibrado realizadas en agua deionizada produjeron resultados válidos para las muestras certificadas de agua de mar, de alta fuerza iónica (3 % de salinidad).

2.3 Polímeros orgánicos: Resinas de intercambio iónico.

Las resinas de intercambio iónico mas comunes son polímeros de estireno copolimerizados con divinilbenceno. Esta polimerización produce una matriz muy inerte de cadenas hidrocarbonadas entrecruzadas, de las cuales emergen grupos funcionales que se encuentran distribuidos a lo largo de toda la resina. Estos sitios son los responsables del fenómeno de intercambio iónico y sus cargas fijas se encuentran balanceadas por un número equivalente de contraiones móviles. El tipo y fuerza del intercambiador viene determinado por estos grupos funcionales. Existen intercambiadores catiónicos como los que hemos nombrado antes y también intercambiadores aniónicos. Haremos mayor énfasis en los intercambiadores catiónicos, si bien es posible utilizar intercambiadores aniónicos para secuestrar cationes como complejos cargados negativamente.

Las resinas de intercambio son de dos clases: las resinas fuertemente ionizadas (“fuertes”) y las resinas parcialmente ionizadas (“débiles”). Existen una innumerable variedad de intercambiadores los cuáles no describiremos exhaustivamente. Además, muchas resinas son comerciales, de manera que no todas sus características de composición y estructura se encuentran disponibles. Referimos al lector al excelente compendio realizado por Dean⁸⁶ en el que se describen las resinas comerciales más difundidas.

Los grupos funcionales mayormente utilizados son:

- Grupos sulfónicos ($-\text{SO}_3^-$): son grupos fuertemente ácidos y completamente disociados, independientemente del contraión. Se los utiliza para intercambio de cationes.

- Grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$): tienen propiedades ácidas similares a sus análogos en solución. Funcionan como intercambiadores de cationes si el pH es mayor que 6, donde el grupo carboxílico se encuentra deprotonado.
- Grupos iminodiacetato ($-\text{N}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$): tienen una gran preferencia por los metales de transición (Cu, Fe etc). En menor medida capturan también metales alcalino térreos. Su selectividad para los metales divalentes es unas 5000 veces mayor que para los monovalentes. La resina funciona adecuadamente como intercambiador a pH mayor que 4. A pH muy ácido, funciona como intercambiadora de aniones. Estas resinas son muy utilizadas en la separación de trazas de metales pesados y en las separaciones por intercambio de ligandos, en las cuáles un ligando es recuperado de la solución mediante el uso de una resina saturada previamente con un metal divalente.
- Amonios cuaternarios ($-\text{R}_4\text{N}^+$): son grupos fuertemente básicos y completamente disociados cuando el contraión es oxhidrilo o un haluro, en general, cloruro. Una desventaja de estas resinas es que los grupos funcionales tienden a oxidarse (sobre todo en la forma OH), lo que produce una disminución de la capacidad con el tiempo.
- Aminas terciarias ($-\text{R}_3\text{NH}_2^+$) y heterocíclicas (piridinas por ejemplo): funcionan como intercambiadoras de aniones sólo si el pH es menor que su pKa, esto es, si el átomo de nitrógeno se encuentra protonado. Las aminas heterocíclicas pueden actuar como intercambiadoras de cationes por reacciones de coordinación de aquellos metales que se complejen de manera estable con los ligandos (Cu por ej.). Son mas resistentes a los agentes oxidantes y a la temperatura.

Dependiendo del porcentaje utilizado del agente entrecruzante (divinilbenceno, DVB) se logran resinas con distintas propiedades mecánicas y morfológicas. Este porcentaje se explicita, por ejemplo, como "X8" para referirse a un 8% de DVB. Cuanto mayor sea este porcentaje, la matriz se vuelve mas rígida y los grupos funcionales están mas próximos aumentando la selectividad. En general el porcentaje de entrecruzamiento mas utilizado varía entre el 4 y el 8%. En las resinas demasiado entrecruzadas la difusión de los cationes es demasiado lenta y al ser éste es el paso limitante de la velocidad de quelación, se producirá una disminución en la eficiencia de transferencia de masa entre fases (E%).

Otra variable que influencia la velocidad de transferencia es el tamaño de la partícula usada. Las partículas pequeñas producen un intercambio más rápido al presentar una mayor área específica sin embargo, no es posible disminuir mucho el tamaño ya que el flujo de solución a través de la columna empacada se ve disminuido requiriéndose aumentar la presión. El tamaño de partícula mas usado está en el rango de mallas (“mesh”) de 100 a 200 que equivale a un rango de 75 a 150 μm .

Las resinas se comercializan con distintas propiedades mecánicas, siendo las mas comunes:

- Resinas macroreticulares: son un aglomerado de microesferas empacadas al azar que se extienden formando una fase no gelificada. Los canales entre las microesferas forman una estructura rígida de poros que hacen accesibles los grupos funcionales a los solutos. En solventes no acuosos estas resinas se hinchan incorporando grandes cantidades de solvente. Poseen una gran cantidad de poros de gran tamaño, por lo que son útiles en la separación de grandes moléculas orgánicas.
- Resinas microreticulares: son resinas que forman geles elásticos por absorción de solventes polares como el agua. No se hinchan en solventes menos polares.
- Membranas de intercambio iónico: son membranas de poli(tetrafluoretileno) (PTFE) que tienen incorporadas en su estructura esferitas de resinas de intercambio tales como AG 1-X8, AG 50W-X8 o Chelex-100. Son sumamente resistentes a la tracción mecánica y también muy flexibles.

Los metales pueden recuperarse de la solución de dos formas, una de ellas, ya descripta, es el intercambio catiónico. Para realizar el intercambio catiónico se utiliza un sistema de columna, donde el líquido se alimenta manualmente o donde se impulsa con la asistencia de una bomba adecuada a baja presión (sistemas FI) o alta presión (Cromatografía Iónica). Las dimensiones de las columnas varían en cada caso, y son mayores para la alimentación manual que para las otras alternativas.

La segunda manera de recuperar metales de una solución es intercambiando sus complejos aniónicos. Estos complejos pueden retenerse mediante resinas aniónicas. Inicialmente se alimenta la columna con una solución que contiene a los metales y a un complejante del metal (Cl^- por ejemplo) en gran exceso. Luego, los metales se eluyen secuencialmente disminuyendo paulatinamente la cantidad de ligando. También es posible eluir selectivamente los complejos con distintos aniones (formiato, acetato etc.).

Otra forma de retención de complejos es a través de resinas de adsorción o sílicas modificadas utilizando un solvente como eluyente, como veremos mas adelante.

Para ilustrar las múltiples aplicaciones del intercambio iónico, en la Tabla 2.1 hemos recopilado algunas de las aparecidas en publicaciones de Química Analítica en los últimos diez años. Esta recopilación, por supuesto, está sesgada por el interés académico del autor.

Se puede observar una gran variedad de resinas con los mas diversos grupos funcionales: Chelex-100 (una de las mas populares), intercambiadores de complejos aniónicos de metales, intercambiadores de celulosa (polisacáridos modificados), resinas de adsorción de complejos metálicos sin grupos funcionales (XAD) (quelación en solución).

Los metales mas estudiados han sido sin duda los metales divalentes y las tierras raras. En menor medida se estudian los metales trivalentes como el Al^{+3} o el Fe^{+3} , probablemente porque sus equilibrios químicos en solución son mas complicados. La mayoría de los estudios se realizan en aguas de distinto tipo (mar, río, estuario, efluentes etc.). Los trabajos más modernos muestran una leve tendencia hacia el análisis de materiales biológicos líquidos (orina, sangre, suero) o materiales biológicos digeridos por microondas (órganos, organismos marinos etc.)

La detección se realiza en general con técnicas de espectroscopía atómica, en su mayoría acopladas a un sistema en flujo (FI-AAS).

2.4 Materiales inorgánicos

Los primeros materiales reconocidos como intercambiadores fueron los materiales inorgánicos naturales o sintéticos. Los intercambiadores naturales son aluminosilicatos cristalinos que poseen propiedades de intercambio catiónico siendo los mas representativos las zeolitas que incluyen sólidos como la analcita, la chabacita, la heulandita y la natrolita¹⁹⁰. Todos estos materiales tienen una estructura tridimensional relativamente abierta con cavidades que se intercomunican entre sí. La red de las zeolitas está compuesta por tetraedros de SiO_4 y AlO_4 que comparten sus átomos de oxígeno. Puesto que el aluminio es trivalente, el sólido posee una carga negativa por cada átomo de aluminio. Esta carga es contrarrestada por iones alcalinos o móviles. Estos iones actúan como contraiones y pueden ser intercambiados por iones en la solución.

Las zeolitas son minerales bastante blandos que no resisten mucho la abrasión. Su propiedad mas interesante es la uniformidad de tamaño de poros, lo que hace que puedan actuar como tamices moleculares (“molecular sieves”). También existen zeolitas sintéticas con propiedades de tamaño de poro controlado, similares a las naturales.

Existen otros aluminosilicatos con propiedades de intercambio catiónico como algunas arcillas: i.e. la *montmorillonita* y la *beidelita*. Estas arcillas poseen una estructura menos compacta que la de las zeolitas y llevan a los contraiones entre las capas adyacentes de sólido.

Todos los intercambiadores inorgánicos son atacados por los ácidos o bases fuertes, por lo que el pH de trabajo es alrededor de 7.

Muchos óxidos actúan como intercambiadores anfotéricos, siendo el mas común la alúmina. Cuando el pH es menor que su punto isoeléctrico, se convierten en intercambiadores de aniones mientras que a pH mayores que su punto isoeléctrico, intercambian cationes.

En la Tabla 2.2 se muestran algunas aplicaciones de materiales inorgánicos. Se han incluido en esta tabla a los materiales carbonosos como el carbón activado o los fullerenos que actúan como adsorbentes inespecíficos. Se utilizan para complejos de metales con ligandos tales que los hagan adsorbibles, debido a la presencia de anillos aromáticos o átomos mas polarizables que el oxígeno i.e.: azufre.

2.5 Materiales orgánicos impregnados mediante interacciones específicas e inespecíficas: “Resinas Impregnadas”.

La preparación de polímeros intercambiadores de iones es bastante compleja, costosa y lenta, debido a los varios pasos de síntesis que involucra. Para simplificar este proceso se han desarrollado las llamadas “resinas impregnadas” (SIRs, Solvent Impregnated Resins) que fueron empleadas por primera vez en el campo de la Química Analítica en Cromatografía de Extracción^{197, 198}. El concepto de resinas impregnadas es tan sencillo como su manera de prepararlas. Se pueden obtener de este modo materiales con grupos quelantes específicos que serían difíciles de inmovilizar por síntesis química. Debemos aclarar que muchas veces los Químicos Analíticos utilizan resinas impregnadas sin darles ése nombre, lo cuál ha producido cierta confusión.

La preparación de resinas impregnadas consiste en la incorporación de un extractante específico a una matriz polimérica mediante una impregnación física o una

impregnación que involucra una reacción química. En las impregnaciones físicas se usan soportes poco reactivos como los de resinas poliestireno-divinilbenceno. En las impregnaciones químicas se usan resinas reactivas como ser las aniónicas fuertes y débiles (polivinilpiridinas por ej.). Las impregnaciones físicas se denominan inespecíficas y las químicas específicas.

El fenómeno de las SIRs fue científicamente reconocido cuando casi simultáneamente, Warshawsky^{199, 200} y Grinstead²⁰¹, las investigaron para procesos hidrometalúrgicos y tratamiento de efluentes. Una resina impregnada está compuesta por un agente complejante líquido disperso homogéneamente en un medio polimérico sólido. El extractante impregnado se comporta como un líquido exhibiendo además, alta afinidad por la matriz sólida.

La impregnación puede realizarse de dos modos: A) adsorción directa del extractante en resinas tipo gel o macroreticulares, obteniéndose la SIR por contacto directo entre la solución del extractante con las cuentas de polímero. La elección del polímero y del solvente orgánico para solubilizar el extractante depende de la naturaleza del ligando y el medio en el cuál la SIR será utilizada. B) por polimerización de monómeros de estireno y divinilbenceno en presencia del extractante para producir resinas conocidas como del tipo Levextrel²⁰².

2.5.1 Aplicaciones analíticas de las resinas impregnadas: Desde la Cromatografía de Extracción hasta los sistemas FIA. "Quelación en solución".

Las resinas impregnadas se comenzaron a usar a principios de la década del '70 en Cromatografía de Extracción. En esta cromatografía se separan los iones metálicos por complejación en una fase estacionaria que contiene el extractante (complejante) líquido. A diferencia de la Cromatografía de Partición tradicional (donde la interacción con la fase estacionaria se debe a las propiedades de "solubilidad" del analito), en la Cromatografía de Extracción existen muchos cambios químicos durante el proceso de complejación en la fase sólida dado que se forma un compuesto nuevo: el complejo metálico.

Se han usado una gran variedad de soportes y extractantes para Cromatografía de Extracción. Los soportes mas comunes han sido copolímeros de estireno divinilbenceno, polietileno, PTFE, celulosa, alúmina, vidrios, sílica gel y tierra de diatomea. Los extractantes con los que se pueden impregnar estos soportes pueden ser ácidos, básicos o neutros. Los extractantes ácidos (ensayados en este trabajo) son ácidos

dialquilfosfóricos o sus monotio y ditio análogos²⁰³. Los extractantes neutros son los trialquilfosfatos (TBP, Tributilfosfato) o los óxidos de fosfina (TOPO, óxido de trioctilfosfina). Los compuestos básicos son en general aminas secundarias o terciarias o compuestos de amonio cuaternario como el Aliquat 336.

En la actualidad, la Cromatografía de Extracción ha caído en desuso debido a la aparición de técnicas separativas más rápidas como la Cromatografía Iónica o las separaciones FIA. Sin embargo, existe una enorme cantidad de conocimiento químico acumulado que no debe perderse ya que éstos materiales se han utilizado principalmente para separaciones discontinuas en columna y casi no se han usado en separaciones continuas como por ejemplo FI. La Tabla 2.3 muestra algunas de las aplicaciones más modernas en las que se han utilizado SIRs, entre ellas, algunas que incluyen sistemas FIA.

Un tipo de resina ampliamente usada es la que proviene de la impregnación de resinas de adsorción de la familia de las Amberlitas XAD con distintos extractantes. Esta es una impregnación inespecífica por lo que las fuerzas que unen el ligando con el soporte no son muy fuertes (tipo Van der Waals). La desventaja de este tipo de impregnación es que el ligando impregnado se va perdiendo lentamente en los sucesivos ciclos de preconcentración y elución, por lo que su capacidad de extracción disminuye al producirse un “sangrado” del extractante.

Una solución parcial al problema del sangrado es la impregnación mediante interacciones específicas como por ejemplo la de resinas aniónicas con extractantes ácidos. En este caso la impregnación se produce por las interacciones electrostáticas entre el grupo funcional y el extractante. Dado que estas interacciones son mas intensas que las de Van der Waals la impregnación específica es mas permanente y el sangrado menor.

La extracción por “quelación en solución” puede verse como una forma de impregnación. Consiste en la quelación de los metales en solución mediante la confluencia de la muestra con el extractante y la posterior adsorción (“impregnación”) de los complejos formados con una resina tipo XAD. Esta interesante aproximación tiene dos desventajas: A) requiere un sistema de flujo un poco mas complicado y B) la resina de adsorción se impregna con exceso de extractante elevando los valores del blanco.

Otro tipo de resinas impregnadas son las que usan sistemas ternarios del tipo “ABC”. En este caso un soporte dado se impregna con dos extractantes, un ácido y una

base. El ácido es el responsable de complejar a los metales y la base mantiene al ácido impregnado en la fase polimérica.

La ventaja principal de las SIRs es que pueden prepararse en algunas horas pudiéndose impregnar una variedad enorme de extractantes que no pueden ser inmovilizados por síntesis química. Su principal defecto es el sangrado del extractante.

2.6 La inmovilización de moléculas en Química Analítica.

La preparación de resinas impregnadas modifica temporariamente la superficie del soporte para que éste adquiera propiedades quelantes pero también es posible una modificación permanente de una superficie para que adquiera éstas propiedades. Un ejemplo de ello es la unión de moléculas orgánicas (o biológicas) a soportes inorgánicos para producir una nueva clase de materiales: los “orgánico-inorgánicos”.

La mayoría de los materiales orgánico-inorgánicos son vidrios y sílicas funcionalizados, lográndose tal funcionalización mediante la formación de uniones químicas. La inmovilización de reactivos sobre soportes sólidos mediante uniones covalentes presenta muchas aplicaciones científicas y tecnológicas²⁰⁴, a saber:

- La síntesis de fases estacionarias para Cromatografía (Tabla 2.4). En especial, se ha producido una enorme variedad de soportes para Cromatografía de Afinidad.
- La síntesis orgánica de péptidos *via* catálisis de transferencia de fases. La síntesis se logra mediante el uso de bibliotecas combinatorias, en las que los péptidos son sintetizados mediante una molécula unida a una esferita de poliestireno.
- La inmovilización de enzimas con fines médicos (separación de metabolitos) o fines industriales (biotecnología).
- La inmovilización de moléculas “sonda” para la construcción de detectores basados en fibras ópticas (“optrodo”).
- La modificación química de electrodos (“electrodos modificados”), usada en medidas amperométricas de muy alta sensibilidad (electrodos enzimáticos) y en electrocatálisis.

Muchas de estas aplicaciones han utilizado sílicas y vidrios de poro controlado (CPG, Controlled Pore Glass) como soportes lo que ha constituido un tema central en Química Analítica en las últimas dos décadas. Las sílicas poseen características únicas para estos fines: son hidrofílicas y a la vez insolubles en agua, son porosas y a la vez

mecánicamente estables y sobre todo, son fáciles de funcionalizar. La funcionalización de materiales silíceos se hace a través de la adición de silanos orgánicos a los grupos silanol (Si-OH) presentes en la superficie del sólido. Esta “silanización” es la primer etapa de cualquier inmovilización de ligandos.

En lo que respecta específicamente a la separación y preconcentración de metales, las sílicas y vidrios funcionalizados también han sido ampliamente utilizados. En la Tabla 2.5 vemos resumidas algunas aplicaciones de materiales orgánico-inorgánicos para la preconcentración de metales.

Sin duda, uno de los materiales más usados es la sílica unida covalentemente a 8-hidroxiquinolina (I-HOx, “Silica Immobilized 8-quinolinol”). La 8-hidroxiquinolina (también conocida como oxina) forma selectivamente complejos muy estables con los metales de transición. El amplio uso de la oxina inmovilizada sobre sílica se debe a que la reacción de complejación de los metales es extremadamente rápida²⁰⁵. Una desventaja de este material es que no se encuentra disponible comercialmente y por lo tanto debe ser sintetizado en el laboratorio. Este procedimiento sintético es relativamente largo y puede requerir hasta cinco días de trabajo. Como una alternativa a la inmovilización sobre sílica, se ha inmovilizado 8-hidroxiquinolina sobre resinas orgánicas¹²⁷, sin embargo, la recuperación es pobre para muchos iones metálicos (en especial Cr y Cd) y la capacidad no es superior a la obtenida utilizando sílica como soporte.

También se han preparado resinas impregnadas conteniendo oxina. Por ejemplo, resinas XAD impregnadas con 8-hidroxiquinolina y también resinas aniónicas impregnadas con ácido 8-hidroxiquinolin-5-sulfónico²⁰⁶. Sin embargo, mas allá de la sencillez de su preparación, adolecen de las desventajas que se han mencionado anteriormente.

Otra familia de materiales muy usados para preconcentración es la de las sílicas funcionalizadas con cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud, en general con 18 átomos de carbono, llamadas “sílicas C-18”. Estos materiales se usan principalmente en Cromatografía de Fase Reversa (en HPLC) pero también pueden usarse para la captura de metales si se impregnan con extractantes adecuados. Otra opción es combinarlas con un sistema de quelación en solución para retener complejos hidrofóbicos. En el Capítulo 6, se mostrará el empleo de este soporte para preconcentrar complejos de cadmio con ligandos naturales .

2.7 Parámetros que caracterizan al soporte sólido de los materiales intercambiadores.

La mayoría de los trabajos científicos ponen especial énfasis en los grupos funcionales de los materiales intercambiadores y dejan de lado al soporte sólido. En este trabajo compararemos no sólo las propiedades de los grupos quelantes de distintas resinas sino también las propiedades morfológicas de sus soportes. Antes de compararlos puntualmente definiremos algunos parámetros que permiten clasificar a los materiales sobre una base común y que provienen mayormente de la tecnología de soportes para columnas cromatográficas y de los catalizadores sólidos.

- *Area Superficial Específica:* el área superficial específica de un material tiene unidades de $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, y viene dada por la geometría de los elementos que forman el esqueleto del material, en nuestro caso, tamaño y cantidad de poros. A volumen de poro constante, cuanto más pequeños sean éstos, mayor será el área específica del relleno. De manera general la relación entre Area Superficial (SA, “Surface Area”), el Volumen de Poros Específico (SV, “Specific Volume”) y el Diámetro de Poro (PD, “Pore Diameter”) es: $SA \propto \frac{SV}{PD}$. La medición de SA se realiza por técnicas de adsorción de N_2 (modelo BET), por porosimetría de intrusión de mercurio o por técnicas de Cromatografía de Exclusión inversa. Las dos primeras técnicas miden el área del polímero seco mientras que la última mide la del polímero hidratado, brindando ambas informaciones distintas pero complementarias.
- *Relación de fases en la partícula:* es una medida de la capacidad de retención de un material expresada como la relación entre el área superficial específica y el volumen de poros específico. Esta relación depende solamente del tamaño de los poros del material. A igualdad de tamaños de poros, el soporte con mayor volumen de poros presentará un mayor tiempo de contacto entre muestra y soporte. Es decir, el soporte presentará mas “retentividad”.
- *Límite de exclusión de pesos moleculares:* Existe la posibilidad de que los solutos se vean excluidos de la red de poros por un impedimento estérico. Se define el límite de exclusión como el valor de peso molecular del soluto que eluye en un volumen igual al volumen muerto de la columna. (Más correcto que hablar del peso

molecular sería hablar del tamaño hidrodinámico del soluto en solución). Como regla general, cuando el peso molecular de un soluto aumenta, aumenta su tamaño hidrodinámico. Si el diámetro de la molécula en solución es mayor que un tercio del diámetro del poro, la transferencia de masa se verá severamente impedida. Puede asignarse a este límite el nombre de “corte de peso molecular” (MWCO, “Molecular Weight Cut Off”).

2.8 Métodos para la caracterización morfológica de materiales quelantes.

La estructura de los materiales intercambiadores de iones cambia drásticamente cuando se los sumerge en un solvente. Esto se debe a que los materiales incorporan solvente a su red tridimensional y se hinchan. Por esta razón es preferible realizar la correlación de las propiedades funcionales y las propiedades estructurales de un intercambiador de iones utilizando información acerca de su estado en solución acuosa.

El método elegido para la determinación de la estructura de poros y el MWCO de I-HOx y Chelex-100 fue la Cromatografía de Exclusión Inversa (ISEC, “Inverse Steric Exclusion Chromatography”)²⁰⁷. Este tipo de Cromatografía consiste en la utilización del fenómeno de exclusión molecular usado en Cromatografía de Permeación por Geles, (GPC, “Gel Permeation Chromatography”) de manera inversa. El término “inverso” quiere decir que, a diferencia del GPC; los solutos son de dimensiones hidrodinámicas conocidas (“patrones”) y se investigan las propiedades del relleno de columna. La Cromatografía de Exclusión Inversa se usa principalmente para la determinación de datos porosimétricos²⁰⁸ y es uno de los pocos métodos capaces de brindar información de los polímeros en solución.

2.8.1 Cromatografía de Exclusión Inversa.

El procedimiento consiste, como hemos dicho antes, en realizar un experimento cromatográfico inverso con solutos de dimensiones hidrodinámicas conocidas obteniéndose los volúmenes de elución a través de una columna de material desconocido. Estos volúmenes de elución serán menores cuanto mayor sea el peso molecular (tamaño) de los solutos. Los solutos pequeños penetran en la red tridimensional de poros y permanecen allí mas tiempo mientras que los solutos mayores son excluidos de este espacio. Si la separación se hace en condiciones donde no existe interacción entálpica (específica) entre el soluto y el soporte, la partición de un soluto

entre el espacio de poros y la solución dependerá sólo de su diámetro hidrodinámico. En GPC los volúmenes de elución (V_e) vienen dados por²⁰⁷:

$$V_e = V_0 + K(L) \cdot V_p$$

Donde V_0 es el volumen “muerto”, es decir, el volumen en el cuál eluye un soluto que no penetra en los poros, K es el coeficiente de partición del soluto que tiene diámetro L y V_p representa la fracción del volumen de poros que es accesible a ese soluto. Un método para la determinación de V_p consiste en asumir que el polímero esta construido por una serie *discreta* de poros de tamaño previamente fijado:

$$V_e = V_0 + \sum_{i=1}^{i=n} K^i(L) \cdot V_p^i$$

Como primer paso se elige un “conjunto” de diámetros de poro (d_p). El coeficiente de partición K se vincula con el tamaño de poro a través de un modelo. Para poros relativamente grandes (mayores a 5 nm), llamados “macroporos” o “poros reales”, se aplica un modelo de poros cilíndricos de diámetro d_p para el cuál el coeficiente de partición viene dado por:

$$K_c = \left(1 - \frac{L}{d_p}\right)^2$$

Si $L \geq d_p$, el coeficiente K_c vale cero y la molécula es excluida totalmente.

Una vez calculado el juego de coeficientes de partición de cada soluto patrón para cada poro elegido, se usan los volúmenes de poro como parámetros ajustables en una regresión de mínimos cuadrados múltiples, donde la variable a ajustar es el volumen de elución experimental.

El modelo de poros cilíndricos puede no ser suficiente para describir completamente al soporte porque la estructura de muchos polímeros puede ser bastante mas compleja que la prevista por el modelo. Hemos visto que los polímeros utilizados en separaciones analíticas van desde los llamados “tipo gel” (de bajo grado de entrecruzamiento y una gran elasticidad) hasta las resinas “macroreticulares” (polímeros orgánicos con un alto grado de entrecruzamiento y rigidez como la de los soportes inorgánicos).

En polímeros macroreticulares, la caracterización morfológica se realiza a través del modelo de poros cilíndricos. En polímeros tipo gel, el modelo utilizado es el modelo

de Ogston²⁰⁹, que describe a los poros como los espacios de una red uniforme de fibras distribuidas al azar. El coeficiente de distribución en este caso viene dado por:

$$K_o = \exp\left(-\pi \cdot C \cdot \frac{(L + d_c)^2}{4}\right)$$

En esta expresión, C es la concentración de cadenas de polímero en unidades de longitud por unidad de volumen (nm^{-2}) y d_c es el diámetro de las cadenas de polímero (aproximadamente 0.40 nm para los polímeros ensayados en este trabajo). El coeficiente de partición " K_o " no tiene el mismo significado que K_c , sino que representa la fracción del volumen del gel disponible para el soluto²¹⁰ y no una fracción del volumen de poros, como en el caso de K_c .

Para resinas y otros sólidos que no se encuentran en ninguno de los dos extremos de la descripción morfológica, es necesario describir al polímero como una mezcla de macroporos sumados a una fase gel con microporos. Podemos imaginar a un polímero como un sólido constituido por tres fases (Figura 2.1): una zona impenetrable de polímero muy denso (concentraciones de cadena de 2 nm^{-2}) unida a una fase gel (concentraciones entre 2 y 0.1 nm^{-2}) separadas de otras zonas de gel por poros verdaderos.

En este capítulo mostraremos el uso de materiales quelantes de distintas clases en sistemas de preconcentración FIA. Compararemos la resina orgánica de intercambio iónico (Chelex-100), que ya hemos utilizado en el capítulo anterior, con un extractante (8-quinolinol) inmovilizado mediante síntesis química a un soporte inorgánico (sílica gel). Estos dos materiales se hallan entre los que presentan mejor performance para la preconcentración de metales utilizando sistemas FIA²¹¹. También mostraremos la síntesis de resinas impregnadas específica e inespecíficamente con ácidos alquil-ditiofosfóricos, y su utilización para la preconcentración semi-continua de metales en columnas de intercambio iónico.

2.9 Resultados y discusión.

2.9.1 Síntesis y caracterización de I-HOx

Uno de los reactivos inmovilizados sobre sílica mas utilizados es la 8-hidroxiquinolina. Se han informado distintos procedimientos para la inmovilización de 8-hidroxiquinolina sobre sílica^{22, 212}. Estos procedimientos son relativamente lentos (5 días) e involucran

una síntesis secuencial en 4 etapas (silanización con un silano aminado, substitución nucleofílica de un cloruro de ácido con un grupo nitro terminal, reducción del $-\text{ArNO}_2$ a $-\text{ArNH}_2$, formación de la sal de diazonio $-\text{ArN}_2^+$ y copulación con oxina). Todos estos pasos excepto el último, han sido ideados originalmente para la inmovilización de enzimas sobre sílica²¹³ para lo cual se requiere un espaciador entre el soporte y la enzima terminal. Este espaciador, al unirse con oxina, confiere flexibilidad al grupo terminal lo que se pondrá de manifiesto al analizar la morfología de I-HOx en la sección siguiente. Otras síntesis informadas²⁰⁵ utilizan un espaciador mas corto: la sílice se funcionaliza con un silano que en su extremo terminal contiene un grupo ArNO_2 (aminofeniltrimetoxisilano). Sin embargo, este reactivo no se encuentra fácilmente disponible en el mercado por lo que la síntesis usada aquí es preferible. Una importante ventaja de la síntesis empleada en este trabajo consiste en que en el último paso de reacción (diazotación y copulación) el grupo funcional se encuentra unido al soporte por una unión azoica que puede reducirse con facilidad liberando a la oxina lo que permite, una vez liberada, utilizar otro grupo para funcionalizar la sílice como por ejemplo ditizona o ácido salicílico²¹⁴. Otra ventaja de la última etapa de síntesis es que la copulación forma un colorante azoico de color rojo intenso que permite verificar rápidamente el éxito del procedimiento. Si el sólido presenta una coloración anaranjada o amarillenta, la capacidad de quelación será con seguridad, muy baja.

Luego de la etapa de síntesis, se determinó la capacidad del intercambiador, tal como se describe en Materiales y Métodos, obteniéndose un valor de 160 μmoles por gramo. Esta capacidad es mayor que la reportada en otros trabajos²¹² (60 $\mu\text{moles g}^{-1}$) y mucho mayor que la de los materiales que usan vidrio de poro controlado (CPG) como soporte (20 μmoles por gramo promedio). Para los fines utilizados en éste trabajo, la capacidad es suficiente dadas las bajísimas concentraciones de metales en las muestras ($\approx 1.10^{-9}$ M) pudiéndose asegurar que la concentración de ligandos en el volumen de los poros se encuentra en exceso (los datos de extracción de Cu determinados por AAS concuerdan con los datos de microanálisis y sugieren que los complejos formados tienen una estequiometría 1:1).

Los espectros IR de la sílica funcionalizada y sin funcionalizar no mostraron diferencias debido a la intensas bandas de absorción de la sílica (3464.59 cm^{-1} , 1635.84 cm^{-1} , 1086.06 cm^{-1} , 800.56 cm^{-1} y 461.05 cm^{-1}) que enmascaran la absorción de la 8-hidroxiquinolina.

2.9.2 Comparación de la morfología de Chelex-100 e I-HOx.

La mayoría de los trabajos publicados sobre preconcentración, centran su atención en el estudio del grupo funcional que se encuentra en la superficie de las resinas ensayadas y en su afinidad por distintos iones. Sin embargo, poco se ocupan del soporte (“esqueleto”) en el que se sostienen estos grupos. Los soportes de Chelex-100 e I-HOx tienen morfologías muy diferentes entre sí: en el primer caso se trata de un soporte polimérico estireno-divinilbenceno mientras que la I-HOx se ha sintetizado sobre sílica no esférica grado TLC. El análisis morfológico de estos soportes mostrará las propiedades distintivas de cada uno de ellos y de que manera afectan las determinaciones analíticas.

Hemos visto que los materiales de intercambio iónico pueden estar basados en materiales inorgánicos (sílicas, alúminas) o en sustratos poliméricos orgánicos²¹⁵. Mientras que los materiales inorgánicos son rígidos y no se hinchan en ningún tipo de solvente, los materiales orgánicos que son copolímeros de estireno y divinilbenceno o polimetacrilatos, son penetrados por los solventes causando hinchamiento y, por lo tanto, la modificación de su estructura de poros. Este hinchamiento produce diferencias en el volumen intersticial de ambos materiales lo que produce un tiempo de contacto diferente entre el analito y el intercambiador. Además, la inclusión del solvente conduce a la formación de fases tipo gel que hace mas lenta la transferencia de masa.

En la Figura 2.2 se muestran los volúmenes de elución corregidos obtenidos por ISEC para Chelex-100 y para I-HOx. El juego de patrones para la calibración de peso molecular se comporta de manera muy distinta en cada caso: ambos materiales presentan una exclusión clara en el patrón de 6000 Da (límite de exclusión total), sin embargo, el Dextrano de 1500 Da permanece mucho mas tiempo dentro de la red polimérica de Chelex-100 lo que implica que las especies de alto peso molecular ligadas a metales podrán intercambiarlos con Chelex-100 mas fácilmente, al aumentar el tiempo de permanencia dentro de la red de poros. Este aumento del tiempo de permanencia se debe a un mayor volumen específico de poros, como veremos seguidamente.

El área específica de un material intercambiador es un parámetro fundamental ya que junto a la capacidad específica, determinará la densidad superficial de grupos funcionales y por lo tanto el grado de retención de cada especie. Para determinar el área específica y la estructura de poros se compararon las medidas obtenidas por métodos tradicionales sobre los materiales secos y las medidas mediante ISEC. Para medidas de área se utilizó el método tradicional “BET” en ambos materiales, notándose grandes

diferencias: Chelex-100 presenta un área BET nula mientras que I-HOx presenta un área BET de aproximadamente 500 m²/g, similar a la que presenta el soporte sin funcionalizar. Esto indica que para Chelex-100 toda el área se genera por hinchamiento en solución mientras que para I-HOx existe una estructura de poros aún en ausencia de solvente, tal como se espera con un soporte inorgánico. En solución ambos materiales presentan gran área pero, comparativamente; Chelex-100 presenta un área específica mucho mayor que I-HOx. (Tabla 2.6). Por otra parte el área superficial de I-HOx en solución es menor que cuando el material está seco lo que se atribuye a la formación de una fase gel en la interfaz sólido / solución.

La distribución de poros se obtuvo utilizando un modelo de macroporos cilíndricos unidos a una fase gel que se modela según el modelo de Ogston. Los valores medios del tamaño de los macroporos se muestran en la Tabla 2.6. Estos han sido calculados como un promedio pesado del tamaño de los poros y su volumen específico. Es interesante notar que a pesar de ser soportes de características químicas muy distintas, ambos presentan diámetros medios de poro similares, por lo que el comportamiento con respecto a la exclusión de pesos moleculares será similar. Sin embargo como el volumen de estos poros es casi cinco veces mayor para Chelex-100 que para I-HOx, la retentividad (capacidad cromatográfica) del primero será mucho mayor, puesto que su red polimérica es mas intrincada.

La manera mas sencilla de describir la porosidad de un material es utilizando el diámetro de poro medio. Sin embargo, es posible describir mas detalladamente esta estructura considerando a la red de poros como un juego discreto de poros de distintos tamaños. Ambos soportes presentan dos fracciones de macroporos importantes de tamaños similares 4.3 y 8.1 nm, como vemos en la Figura 2.3. Se encuentra aproximadamente un 50% de poros de cada tipo, sin embargo, Chelex-100 presenta casi 6 veces mayor volumen de poro en ambas fracciones mostrando una mayor área específica. En I-HOx existe un leve predominio de los poros de menor tamaño y en Chelex-100 ocurre lo inverso. Debido a que el tamaño de poros es similar, ambos soportes excluirán moléculas del mismo tamaño.

La exclusión de solutos de la red tridimensional del sólido en función de sus pesos moleculares depende del tamaño de los poros. Esta exclusión se describe comúnmente mediante el MWCO, que en este caso es de 1500 Da para ambos materiales. Sin embargo, los solutos sufren una exclusión de los poros que varia de forma continua con el aumento del tamaño del soluto. Si aplicamos el modelo de poros cilíndricos, podemos

calcular los coeficientes de partición " K_c " para cada soluto en cada tipo de poro y sumando la contribución de cada fracción de poros, podemos determinar que porcentaje del volumen de poros se encuentra disponible para cada soluto.

Este efecto continuo de exclusión se muestra en la Figura 2.4. Para el patrón de 1500 Da (MWCO), ya existen severos impedimentos estéricos para penetrar la red polimérica, lo que se asigna por convención²¹⁵ a un tamaño igual a 1/3 del diámetro de poro medio. La exclusión total se da para solutos con un diámetro aproximado de 6 nm, lo que corresponde a un peso molecular de 6 KDa (ver Figura 2.4 inserto). Dicho de otra manera, un soluto cuyo peso molecular sea mayor o igual a 6 KDa, no intercambiará con la resina ningún ion metálico. Los primeros datos reportados por el fabricante de Chelex-100⁶ afirman que ésta resina tiene un MWCO en el intervalo 500 a 900 Da. (2.5 nm de tamaño medio de poro). Sin embargo, datos mas modernos del fabricante indican un MWCO de 3500 Da. En el caso de I-HOx, nunca se han reportado descripciones morfológicas.

Una vez estudiada la porción mayoritaria de los materiales, los macroporos, queda aun por estudiar la fase gel de las resinas, que es donde se encuentran los microporos y los grupos funcionales. En la Tabla 2.7 se muestran los resultados del ajuste de la fase gel al modelo de Ogston.

En este modelo, la densidad de una fase gel se describe según la concentración de cadenas poliméricas presentes en esa fase. A modo de ejemplo, una concentración de polímero extremadamente baja es de aproximadamente 0.1 nm^{-2} y corresponde a un gel muy expandido cuya densidad se aproxima a la de una cadena polimérica helicoidal en solución. En el otro extremo, una concentración de polímero de 2 nm^{-2} es una densidad de cadenas muy alta y corresponde a una masa de polímero muy densa y muy poco accesible (inclusive para pequeñas moléculas).

En la Tabla 2.6 vemos que tanto para Chelex-100 como para I-HOx, el volumen de la fase gel (V_g) es pequeño. La Tabla 2.7 muestra la composición de la fase gel para cada resina en distintos solventes: la fase gel de Chelex-100 es muy poco densa y posee una estructura formada por "clusters" de microesferas de masa polimérica muy densa con poros "verdaderos" entre ellas.

El caso de la sílica modificada es diferente ya que su fase gel, aunque escasa, es muy densa. Este material tiene solamente la porosidad permanente del esqueleto de sílica. A diferencia de Chelex-100, en I-HOx la fase gel se encuentra muy poco

hinchada (aparentemente en un entorno hidrofóbico) formando una especie de “film” de grupos quelantes acostados en la superficie de la sílica

En la Tabla 2.6 y 2.7 también se muestran los resultados de medidas ISEC en THF en vez de agua. A pesar de que la operatoria analítica casi siempre se realiza en agua, estas determinaciones en solventes no acuosos sirven para obtener datos morfológicos complementarios y una mejor comprensión de la “anatomía” de ambos materiales.

En THF, un polímero hidrofóbico debería hincharse por inclusión de este solvente. Estos experimentos se pudieron hacer sólo para I-HOx, puesto que Chelex-100 presenta una altísima afinidad por éste solvente lo que produce fusión de sus partículas y hace imposible realizar el experimento. La Figura 2.5 muestra la curva de elución para I-HOx en THF. El ajuste de estos datos según los modelos antes descriptos indica que en THF el polímero soportado sobre la sílica se hincha mucho mas, disminuyendo el volumen de poros y aumentando el volumen de la fase gel. Esto sería compatible con una posición de los grupos funcionales del tipo “cepillo” (Figura 2.6). En agua, los grupos funcionales se encuentran “acostados” unos sobre otros formando un “film”²¹⁶. Este cambio de posición se debe a que las moléculas de oxina se encuentran ancladas en la superficie mediante un espaciador bastante largo y flexible que permite el movimiento del grupo funcional. Todos estos cambios se esquematizan en la Figura 2.6.(Ver también Jerabek²¹⁷)

2.9.3 Optimización de variables en la retención de metales por I-HOx: flujo de operación y pH de preconcentración.

Antes de realizar la calibración con I-HOx, se modificaron las variables del sistema de flujo con respecto al trabajo con Chelex-100. El flujo de muestra utilizado para Chelex-100 (5 ml min^{-1}) fue modificado llegando a un valor de compromiso entre la resistencia al pasaje de muestra que ofrecen las partículas de relleno de la microcolumna y la capacidad de retención de metales de las mismas.

La ecuación de Bernouilli de conservación de energía en flúidos reales indica que la caída de presión en una columna debida a la resistencia opuesta por el relleno se manifiesta en una disminución en la velocidad media del fluido²¹⁸. Para una tubería sin fricción, el aumento en el trabajo entregado por una fuente externa (como la bomba peristáltica) se traduce en un incremento *lineal* en la velocidad del flúido. Sin embargo, si existe una fricción considerable (como en una microcolumna empacada), existirá una pérdida de energía que será directamente proporcional al flujo de operación (V_0) e

inversamente proporcional al cuadrado del diámetro de las partículas de relleno. Si el diámetro de las partículas es menor, mayor será la caída de presión en la microcolumna y mas se alejará el fluido de un régimen ideal, por lo que la velocidad del mismo será menor que el valor ideal. Desde un punto de vista práctico, si se cambia la cantidad de relleno de la microcolumna o bien su diseño, será necesario recalibrar el flujo.

Desde el punto de vista de la operación del sistema de preconcentración, para lograr el mismo flujo (el mismo tiempo de contacto), será necesario aumentar la velocidad de la bomba peristáltica conforme se utilicen rellenos con menor diámetro de partículas. Desde este punto de vista, I-HOx presenta menor resistencia al flujo que Chelex-100 dado que la sílica tiene mayor tamaño de partícula. La resistencia al flujo de ambos rellenos se muestra comparativamente en la Figura 2.7. Sin embargo, éste no es el único factor a tener en cuenta para la selección del flujo de operación de I-HOx.

Cuando se selecciona un flujo óptimo de trabajo, éste aparece como una situación de compromiso entre la máxima frecuencia de análisis y la máxima eficiencia de preconcentración. Un flujo muy alto, si bien aumenta la frecuencia de muestreo, disminuye la eficiencia de preconcentración. Para el caso de Chelex-100 e I-HOx no se detectó una fuerte variación de E% con el flujo de muestra. Sin embargo, fue necesario disminuir el flujo de muestra para I-HOx a pesar de que la caída de presión no es tan grande como con Chelex-100. Diversos autores²¹⁹ recomiendan flujos bajos para obtener una buena capacidad “breakthrough” de preconcentración. Flujos mayores a 2 ml min⁻¹ reducen significativamente la capacidad “breakthrough”. Este efecto es mucho mas crítico en el caso de I-HOx que de Chelex-100 puesto que ésta última posee mayor capacidad por lo que una disminución de ésta no es tan evidente.

El pH al cuál se llevó a cabo la preconcentración con I-HOx fue optimizado al igual que con Chelex-100. Recordemos que en éste ultimo caso se seleccionó un pH levemente ácido, para disminuir la afinidad de la resina por los metales alcalino térreos. Sin embargo, dada la mayor selectividad de la 8-hidroxiquinolina por los metales de transición²²⁰, se pudo trabajar con un pH mas alcalino (8.7), manteniendo una buena separación entre los metales de transición y los alcalino térreos. Además, para la retención simultánea de varios analitos; se requieren valores de pH mayores que 8. Por ejemplo, para colectar eficientemente metales como el Pb y el Mn es necesario un valor de pH cercano a 8.5^{59, 132, 206, 221}, lo que no impide utilizar este soporte en valores de pH mas ácidos. Los metales como Fe, Cu, Ni y Co son extraídos cuantitativamente a valores de pH cercanos a 4 dada su mayor afinidad por los grupos funcionales de la

sílica²¹⁹. Esta eficiente extracción a tan bajos valores de pH puede deberse a que la unión de la sílica a la oxina aumenta la constante de acidez del grupo quelante en dos órdenes, lo que hace a la extracción mas independiente del pH²⁰⁵.

Las sílicas, como los vidrios, son disueltos por los álcalis y no pueden ser usadas a valores de pH mayores que 9 debido a la lenta hidrólisis de los enlaces Si-O-Si. Sin embargo, se ha informado que las sílicas funcionalizadas retienen su capacidad por largo tiempo aunque sean operadas a valores de pH cercanos a 9^{205, 214}. La hidrólisis del esqueleto silíceo es un problema grave cuando se procesan grandes volúmenes de muestra con procedimientos en columna semicontínuos, pero en FIA, los volúmenes de muestra son mucho menores por lo que no se observa una disminución en la performance del sólido aunque se opere a pH levemente alcalino.

2.9.4 Calibrado y Validación con I-HOx.

Se realizaron calibrados con I-HOx como soporte de preconcentración. Los resultados obtenidos fueron sumamente satisfactorios y estuvieron en concordancia con los valores reportados para el material de agua de mar certificada CASS-3 (NRC). Debido a que el flujo de muestra fue menor, se aumentó el tiempo de preconcentración de manera de mantener el volumen de muestra constante (222 s de preconcentración). En la Figura 2.8 se muestran las señales obtenidas para ambos soportes utilizando agua de mar adicionada con Cd. Observamos que la sensibilidad es mejor para I-HOx (50 ppt de Cd producen la misma señal que 70 ppt de Cd preconcentradas con Chelex-100). La señal de background es muy baja en ambos casos, lo que habla de la eficiente separación entre el analito y la matriz. A pesar de que una vez finalizada la etapa de preconcentración la columna se lava con buffer, aparece una señal de fondo de todas formas que se atribuye a la retención parcial de metales alcalino térreos. La separación de los metales alcalino térreos es peor en el caso de Chelex-100 que de I-HOx²²⁰ lo que se atribuye a una mayor diferencia entre las constantes de formación de los complejos de Cd y los de sus interferentes Ca y Mg (Ver Tabla 2.8). Estas constantes no son muy diferentes para Chelex-100 (Tabla 2.8), lo que produce un factor de separación peor[†]. En algunos casos

[†] El factor de separación “α” se define como :

$$\alpha_{M_1}^{M_2} = \frac{Y_{M_2}}{Y_{M_1}} \times \frac{X_{M_1}}{X_{M_2}}$$

donde Y son las concentraciones de metal en la resina y X las concentraciones en la fase líquida. El factor de separación puede medirse a partir de las curvas de “aparición”, midiendo la concentración de metales en el eluido o, estimarse como el cociente de las constantes de formación de los respectivos complejos.

se informan en la Tabla las constantes de formación de los análogos de los ligandos inmovilizados, dado que no existen datos de constantes para las resinas.

2.9.5 Comparación de las Figuras de Mérito para I-HOx y Chelex-100.

En la Tabla 2.9 se muestran las figuras de mérito para la determinación de Cd en agua de mar, preconcentrando los metales con Chelex-100 y con I-HOx respectivamente. Los límites de detección obtenidos son similares, así también como la precisión. Las masas de los blancos son similares para ambos materiales, sin embargo, dado que el buffer utilizado para preconcentrar I-HOx tiene una concentración 0.05 M mientras que el utilizado para Chelex-100 tiene una concentración de 0.1 M, la solución stock del buffer de pH 8.7 presenta mas impurezas que la de pH 5.2. Por otra parte la microcolumna rellena con Chelex-100 requirió un menor número de lavados iniciales que la columna de I-HOx, para alcanzar un nivel de los blancos aceptable. Esto puede deberse a que el procedimiento de síntesis de I-HOx produce un material levemente contaminado con metales, a diferencia de Chelex-100 que se obtiene con la calidad analítica del fabricante. Se debe tener en cuenta que estos lavados iniciales deben repetirse toda vez que se renueva el relleno de la microcolumna.

Ambos sistemas preconcentración muestran algunas diferencias (Tabla 2.10) en sus figuras de mérito. Para establecer comparaciones sobre la misma base, los volúmenes de muestra usados en ambos casos se mantuvieron constantes pero, por los motivos antes expuestos, el flujo de muestra utilizado fue menor en el caso de I-HOx, lo que disminuye unas tres veces la frecuencia de análisis. La alta frecuencia de análisis es la ventaja mas sobresaliente para el sistema que utiliza Chelex-100.

Es interesante notar que la eficiencia de preconcentración es distinta en ambos casos. I-HOx presenta una eficiencia del 100%, esto es, todos los iones que atraviesan la columna son retenidos mientras que la eficiencia para Chelex-100 ronda el 70%. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Fang et al¹⁷⁶ y se deben a la mayor velocidad de quelación de I-HOx (Ver próxima sección). Una eficiencia del 100 % en el proceso de preconcentración, si bien no es necesaria para calibrar, es una virtud interesante, ya que permite la introducción directa de los patrones de calibrado dentro del horno sin requerir de pre-concentración. Además, una alta eficiencia se traduce en un mayor factor de enriquecimiento.

2.9.6 Comparación de las velocidades medias de quelación.

Hemos visto que, en las condiciones en que se realiza el análisis, la eficiencia de transferencia de masa es un 30% mayor para I-HOx que para Chelex-100. Esto se debe a una mayor velocidad aparente del proceso de quelación como se muestra en la Tabla 2.11. Esta velocidad es obviamente la mínima para I-HOx puesto que no se alcanza el valor de flujo al cuál la eficiencia es menor que el 100%. Dependiendo del tipo de intercambiador, la velocidad de quelación es dependiente de la concentración de grupos funcionales en el polímero²²². Sin embargo, a pesar de que la densidad superficial de grupos quelantes es mayor para Chelex, su velocidad normalizada de quelación sigue siendo menor que para I-HOx. Chelex-100 e I-HOx no presentan densidades superficiales de ligandos demasiado distintas, a pesar de que la capacidad de Chelex-100 es casi tres órdenes mayor que la de I-HOx. Esto último se atribuye a que los grupos funcionales de I-HOx se encuentran concentrados en un área específica mucho menor que en Chelex-100. Tampoco podemos asignar las diferencias de velocidad de quelación a los distintos tiempos de contacto[§] entre el analito y el intercambiador ya que son aproximadamente iguales en las condiciones de operación de ambas resinas. En el caso que fueran operadas a flujos similares, el tiempo de contacto para Chelex-100 sería mayor puesto que tiene un volumen intersticial (volumen de poros) también mayor.

2.9.7 Experiencias con Resinas Impregnadas.

Además de las resinas Chelex-100 e I-HOx, se prepararon algunas resinas impregnadas para evaluar su performance en sistemas de flujo y estudiar su selectividad. La resina impregnada SIR-1 (ver experimental) se sometió a ensayos dinámicos de extracción en columnas para estudiar sus características y selectividad. Puesto que esta resina fue impregnada con un ácido alquilditiofosfórico (D2EHTPA) que retiene fuertemente distintos metales²⁰³, los experimentos se realizaron no sólo con distintos iones, sino también a valores de pH mas ácidos que los ensayados anteriormente. El objetivo

[§] El tiempo de contacto se calcula como:

$$\tau = \frac{V_{\text{poros}}}{\phi}$$

Donde V_{poros} es el volumen de poros correspondiente al volumen de resina contenida en la microcolumna y es mayor cuanto mayor es la porosidad y ϕ es el flujo total a través de la columna.

último fue el de obtener una resina capaz de extraer los metales en muestras de agua previamente acondicionadas con ácidos (según normas EPA para la conservación de metales traza en aguas naturales). Si se contase con tal resina sería posible evitar la neutralización previa de la muestra y no sería necesario emplear un buffer de preconcentración que aumenta mucho el valor del blanco de reactivos. Otra posible aplicación sería la extracción de metales de muestras sólidas digeridas (i.e. barros, sedimentos de río etc.), que se encuentran en concentraciones de ácido que pueden llegar hasta 3 M. Las experiencias se realizaron mediante extracción en columnas de dimensiones mayores (volúmenes de lecho de 7 ml aproximadamente) que las utilizadas en FIA para no agregar otra variable al estudio de performance.

En la primer experiencia se realizó la carga de la resina SIR-1 con una mezcla binaria de metales (Cd y Zn), a distintos valores de pH y su posterior elución con EDTA (Ver Materiales y Métodos). Vemos que la resina SIR-1 muestra una alta afinidad y capacidad por los metales ensayados. Esta capacidad está en el mismo orden que la capacidad de Chelex-100 (Tabla 2.12).

Esta tabla muestra además el cociente entre la carga molar de extractante (moles de extractante impregnados) y la capacidad molar para los metales, que tiene un valor cercano a dos, lo cuál sugeriría una estequiometría ML_2 para el complejo. Esta es una diferencia notable con I-HOx y Chelex-100, que forman complejos 1:1. El motivo de esta diferencia es que aquí el ligando no se encuentra inmovilizado, sino que se comporta como una fase líquida impregnada en la fase gel del soporte de la polivinilpiridina, por lo cuál varios ligandos pueden acercarse a un mismo centro metálico²²³.

En las experiencias de extracción se ven efectos de competencia que ocurren cuando se agota la capacidad de la resina. Esto corresponde a la zona donde C/C_0 es mayor que cero. Al alcanzarse condiciones cercanas a la saturación comienzan a producirse fenómenos competitivos: el Zn es expulsado de la columna por el Cd (que actúa como “eluyente” y disminuye su recuperación) produciendo una concentración de Zn en el efluente aún mayor que la de la solución de alimentación (este efecto se conoce como efecto de expulsión o “overshooting”): No se notan diferencias significativas en la extracción de metales de matrices más ácidas, por ejemplo las altamente corrosivas como $HClO_4$ 5 M.

Una aplicación interesante de esta resina es la purificación de los ácidos usados para la elución en el sistema FI-ETA-AAS. Es posible producir un ácido de calidad

similar a la “Suprapur” por purificación de una solución 2M del mismo a través de una columna rellena con SIR-1.

En la figura 2.10 se muestra la separación de otras mezclas binarias. La resina se muestra muy eficiente para la extracción de Pb, inclusive en medio extremadamente ácido (Tabla 2.12). La selectividad entre Pb y Zn manifiesta un efecto similar que para el Cd. La resina SIR-1 también se mostró altamente selectiva por Cd en presencia de Ni, cuando se la opera en condiciones de saturación. Si no se desea obtener un efecto de selectividad y por el contrario se desea una eficiencia similar para todos los metales pesados, SIR-1 podría operarse en la zona de **no** saturación. Este sería el caso para el análisis de Zn y Ni que son los metales menos retenidos. Dado que la capacidad de SIR-1 es muy alta, la operación en ésta zona es suficiente para el análisis de vestigios metálicos. Además, la resina se muestra selectiva para Pb frente a Cd por lo que se puede escribir un orden de selectividad aproximado :

Selectividad: Pb>Cd>Zn>Ni.

Sin embargo, a pesar de que para la extracción en columna la performance de SIR-1 es muy buena, durante la elución se evidencian algunos inconvenientes que impiden su uso en sistemas FIA, que requieren muchos ciclos de extracción sucesivos. La Figura 2.11 muestra que durante la elución se produce un sangrado del extractante (se observa un “pico” de elución de fósforo y azufre). Además, la capacidad para la extracción de Cd disminuye casi tres veces en el segundo ciclo de extracción (datos no mostrados) como resultado de este sangrado en la etapa de elución (en la etapa de extracción no se evidenció sangrado ya que no se detectan azufre o fósforo en los líquidos efluentes). O sea, a pesar de que los metales son eluidos eficientemente la pérdida del extractante disminuye su capacidad en los ciclos futuros. Se sospecha que el agente de elución (EDTA, pH=10) está desplazando al extractante de la columna probablemente por formación de una emulsión o bien que el medio básico del eluyente esté solubilizando al extractante (soluble en fase acuosa sólo si se encuentra deprotonado). Esto ultimo explicaría la ausencia de pérdida de extractante en la etapa de preconcentración (ácida) y el sangrado en la etapa de elución (alcalina). (entre ambas etapas se lava la columna exhaustivamente)

Por los motivos expuestos, no se continuó con el uso de esta resina impregnada en sistemas FIA, aunque se la utilizó para la purificación del ácido de elución. Las nuevas tendencias en el uso de SIRs utilizan otros extractantes menos poderosos que el D2EHTPA, tales como los ácidos alquilsfóricos, que pueden ser eluidos con

soluciones de ácidos concentrados, donde el extractante no es soluble y por lo tanto no hay sangrado.

Soporte o Nombre Comercial	Grupo Funcional	Analitos	Detección	Ref.
β -ciclodextrina polimerizada con 1,2-epoxipropano.	α -piridilazo- β -naftol. (complejo de inclusión)	Cu, Cd, Ni, Mn	AAS	Ref ²²⁴
Acrilamida	Nitrilotriacetato (NTA)	Cu, Cr, Mn, Zn	ETA-AAS	Ref ²²⁵
Acrilica y metacrilica	Carboxilatos	Ca y Mg	ICP-AES	Ref ²²⁶
AG 50W-X8	sulfonato	Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	FI-ICP-MS	Ref ²²⁷
Carboximetilcelulosa	Ester de ácido 8-hidroxiquinolin-5-sulfónico.	Metales traza	ICP-MS	Ref ²²⁸
Celulosa	(Etilendiamin) triacetato	Cd, Co, Cu, Ni, Pb, U, Y	ICP-MS	Ref ²²⁹
Celulosa (CELLPHOS)	fosfato	Cd, Cu, Cr, Ni	FAAS	Ref ²³⁰
Chelex-100	IDA	Metales traza	GPC-ICP-MS	Ref ²³¹
Chelex-100	IDA	Cd, Pb, Zn, Sn, Fe, Cr	FAAS y ICP-AES	Ref ²³²
Chelex-100	IDA	Cu, Ni, Co, Cd	ETA-AAS	Ref ²³³
(en filtro de celulosa)				
Chitina	aniónicos	Fe (como complejos con ácido 8-hidroxiquinolin-5-sulfónico).	UV-Vis	Ref ²³⁴
Dowex 1-X8	Amonio cuaternario	Ru, Rh, Ir, Pd, Pt, Au (complejos clorurados)	ICP-MS	Ref ²³⁵
Epoxi	taninos	Bi, Sn, In, Ti, La, Y, Cr, Be, Ga, V	ICP-AES	Ref ²³⁶
epoxy	imidazol	Au, Ru, Pd	ICP-AES	Ref ²³⁷
Glicidil metacrilato-divinilbenceno	mercapto	Au, Pd, Pt	AAS	²³⁸
HEH	Iso-octyl-fosfonato	Tierras raras (REE)	FI-ICP-AES	Ref ²³⁹
IEA	Imidazolin etil amino	Complejos clorurados de Au, Pd, Pt	ICP-AES	Ref ²⁴⁰

Tabla 2.1 : Algunas aplicaciones selectas de resinas quelantes o de intercambio iónico.

Metacrilato-divinilbenceno	sulfuros	Au, Pd, Pt	AAS	Ref ²³⁸
Metalfix Chelamine	tetraetilenpentamina	Cd, Pb, Cu, Ni, Mn, Cu	ICP-AES	Ref ²⁴¹
Muromac A-1	IDA	Co, Mo	FI-ETA-AAS	Ref ^{242, 243}
P13	γ -amino butirohidroxamato	lantánidos	Cromatografía Iónica con derivatización postcolumna, detección UV.	Ref ²⁴⁴
PAPhA	aminofosónico	Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	FI-FAAS	Ref ²⁴⁵
Poli(vinilpiridina)	ditizona	Pd, Pt	AAS	Ref ²⁴⁶
Poliacrilonitrilo (textil montado en diapositiva 35 mm)	amidoxima	Pb, Cd	XRF, ETA-AAS	Ref ²⁴⁷
Polimero vinílico	8-hidroxiquinolina	Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb	AAS	Ref ²⁴⁸
PS-DVB	Iminodiacetato (IDA)	Cd, Co, Cu, Mn, Pb	ICP-MS	Ref ²⁴⁹
PS-DVB (estireno-divinilbenceno)	IDA	Fe, Ni, Cu, Zn, Pb (muestras biológicas)	ICP-MS	Ref ²⁵⁰
TAR-XVI	4-(2-tiazolylazo) resorcinol	U(VI)	NAA	Ref ²⁵¹
XAD-16	Ninguno (adsorción del complejo)	Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, Co como complejos con DDTC	FAAS	Ref ²⁵²
XAD-2	o-vanillinsemicarbazona	Cu, Zn, Pb	AAS	Ref ²⁵³

Tabla 2.1 (cont.): Algunas aplicaciones selectas de resinas quelantes o de intercambio iónico.

Material	Grupo Funcional	Analitos	Detección	Ref.
Carbon activado	ninguno	V (complejo con 8-hidroxiquinolina)	ETA-AAS	Ref 254
CeO ₂ activado	Ce-OH	Cd, Co, Cu, Mn, Pb, Zn	FAAS, ETA-AAS	Ref 255
Ferrites	Fe-OH	Metales traza	AAS	Ref 256
Fulereno C60	ninguno	Cd (complejo con pirrolidin-1 carboditioato)	FI-FAAS	Ref 257
Fulereno C60	ninguno	Pb (complejo con pirrolidin ditiocarbamato)	AAS	Ref 258
MgO.xH ₂ O	Mg-OH	Tierras Raras	NAA	Ref 259
Silica+carbón activado	ninguno	Complejos de Al, Cr, Cu, Fe, Pb, V, Zn (complejo con DDTC)	ICP-AES	Ref 260

Tabla 2.2: Algunos ejemplos del uso de materiales carbonosos y materiales inorgánicos para la preconcentración de metales.

Extractante	Soporte	Tipo de impregnación	Analitos	Detección	Ref.
1-10 dodecildiaza-18-crown-6/ácido graso/tolueno/fenilhexano	Polipropileno	Fibras huecas recubiertas de membrana líquida, solución receptora de CDTA	Cd, Pb, Cu	AAS y voltametrías	Ref 261
2-(5-Br-2-piridilazo)-5-(dietilamino)fenol	Amberlite XAD-4 y XAD-7	Inespecífica	Er, Yb, Lu	XRF	Ref 262
2-mercaptobenzotiazol	Arcilla	Específica	Hg, Pb, Zn, Cd, Cu, Mn	AAS	Ref 263
7-dodecenil—8-quinolinol	XAD-4	Inespecífica	Ag, Al, Bi, Cd, Cu, Fe, Ga, Mn, Ni, Pb, Ti	FAAS	Ref 264
8-hidroxiquinolina	XAD-2	Inespecífica (quelación en flujo)	Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn	FI-ICP-AES	Ref 265
8-hidroxiquinolina y 2-(5-Cl-2-piridilazo)-5-(dietilamino)fenol	XAD4 y XAD 7	Inespecífica	Tierras Raras (REE)	XRF	Ref 266
Aliquat 336 / quelante sulfónico	Sílica gel	Específica (sistema ABC)	Metales traza	AAS / AES / voltametrías	Ref 267
Alizarin-Red-S	Amberlite XAD-2	Inespecífica.	Pb, Cd, Zn, Ni	AAS	Ref 268
Chromotrope 2R	Resina aniónica IRA-400	Específica	Cu	ETA-AAS	Ref 269

Tabla 2.3: Algunos usos de resinas impregnadas.

DEHTPA (ácido di-(etilhexil)- ditiófosfórico)	XAD-2	Inespecífica	Cu	FAAS	Ref ²²³
DEHTPA (ácido di-(etilhexil)- ditiófosfórico)	XAD-2	Inespecífica	Zn, Cu, Cd	FAAS	Ref ²⁷⁰
Eriochrome Blue-Black R	XAD-2 Amberlyst A-26 (aniónica)	Específica e Inespecífica	Ni	FI-FAAS	Ref ²⁷¹
Na ₂ S/Tiourea	Celulosa	Precipitación	Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Sn, V, Zn	AAS	Ref ²⁷²
PAN	Espuma plástica	Inespecífica	Cu, Zn, Mn, Fe, Co, Pb	ICP-AES	Ref ²⁷³

Tabla 2.3 (cont.): Algunos usos de resinas impregnadas.

Soporte	Grupo Funcional	Analitos	Detección	Ref.
Aminopropil silica gel	Ácido N-fluoren-L- glutámico (monoamida)	Compuestos explosivos, hidrocarburos poliaromáticos	HPLC-UV	Ref 274
Silica (glutaraldehído)	Seroalbúmina	Aminoácidos	HPLC-UV	Ref 275
Silica gel	Celobiohidrolasa	Mezclas racémicas de drogas aminadas.	HPLC-UV	Ref 276
Silica gel	Lisozima	NN'-diacetilcitobiosa	HPLC-UV	Ref 277
Silica gel	L-valina, L-tirosina, L-arginina, L-hidroxiprolina	Aniones inorgánicos	IC	Ref 278
Silica gel	Metal-quelato	Aminoácidos, péptidos y proteínas.	IMAC (Immobilized Metal Affinity Chromatography)	Ref 279

Tabla 2.4: Uso de reactivos inmovilizados sobre sílicas para realizar distintas reacciones de uso analítico.

Soporte	Grupo Funcional	Analitos	Detección	Ref.
CPG	5-cloro-8-hidroxiquinolina	Cu, Zn, Cd, Co, Pb	AAS	Ref 280
CPG	8-hidroxiquinolina	Cd, Pb	ASV	Ref 281
CPG	8-hidroxiquinolina y IDA	Cd, Cu, Mn, Ni, Zn	FI-AAS	Ref 282
CPG	Carboxilatos?	Cu, Cd, Fe, Pb, Zn	FI-AAS	Ref 283
(glutaraldehído)	(hongo <i>Penicillium Notatum</i>)		voltametría	
Polygosil C18	Octadecilo, impregnado con NN-dietil-N'-benzoiltiurea	Pd	ETA-AAS	Ref 165
Silica gel	2,5-dimercapto-1,3,4-tiadiazol	Zn, Cd, Co, Ni, Fe, Pb	AAS	Ref 284
Silica gel	2-[2-(trietixisilil)etiltio]anilina	Pd, Pt, Os, Ru, Au	AAS	Ref 285
Silica gel	5-formil-3-arilazo salicilato	Fe(III)	AAS	Ref 286
Silica gel	8-hidroxiquinolina	Cd (orina)	ETA-AAS	Ref 287
Silica gel	8-hidroxiquinolina	Cd y Zn (relación de isótopos)	ETV-ICP-MS	Ref 288
Silica gel	8-hidroxiquinolina	Co, Ni, Cd	ICP-AES	Ref 289
Silica gel	8-hidroxiquinolina	Cd, Co, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	FI-ETA-AAS	Ref 59
Silica gel	8-hidroxiquinolina	Fe, Mn, co, Ni, Cu, Zn, Cd, Pb	FI-ICP-MS	Ref Ref 290
Silica gel	8-hidroxiquinolina	Tierras Raras	ID-ICP-MS	Ref 291
Silica gel	8-hidroxiquinolina	Cu, Ni, Cd	AAS	Ref 292
	(reacción de Mannich)			
Silica gel	Algas (<i>Stichococcus bacillaris</i> algae)	Cd, Cu, Pb, Zn	FI-UV-Vis	Ref 293

Tabla 2.5: Aplicaciones de las sílicas y vidrios funcionalizados para la preconcentración de metales.

Silica gel	benzimidazol	Mn, Ni, Co, Zn, Cd	FAAS	Ref 294
Silica gel	Fases reversas C16, C8, fenilo, C1 impregnadas en Naranja de Xylenol, PAN, Cadion	Cd, Co, Cu, Fe	FI-UV-Vis	Ref 295
Silica gel	Formilsalicilato, etilendiamina	Fe (III)	AAS	Ref 296
Silica gel	Líquenes (Bryoria sp. y Letharia sp.) y algas (Sargassum sp.)	Metales traza	AAS	Ref 297
Silica gel	octadecilo	Hg (como complejo con Pirrolidin ditiocarbamato) y organo mercurícos	HPLC-Post Column Oxidation-CVAAS	Ref 298
Silica gel	Piridina-2-carboxaldehído fenilhidrazona	Mn, Fe, Cd, Zn, Co, Pb, Cu	“Cromatografía de extracción”	Ref 299
Silica gel	salicilaldoxima	Cu, Ni, Co, Zn, Fe	AAS	Ref 300
Silica gel	8-hidroxiquinolina	Te, Ho, Ce, Nd	ICP-MS	Ref 301
Silica gel	8-hidroxiquinolina	Co	Quimio luminiscente con Ácido Gálico/H ₂ O ₂	Ref 302
Silica Gel	8-hidroxiquinolina	Al	FI-FAAS	Ref 303
Silica gel	Aminopropilo y ligandos tio-substituidos.	Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Ru.	ICP-AES	Ref 304
Silica gel	N-acil-N'-benzoiltiurea	Cu, Zn, Cd	AAS	Ref 305
Silica Gel	Octadecilo (C18)	Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn (complejos con DDTC)	ICP-MS	Ref 306
Silica gel (epoxidada)	etilendiamina	Cu	AAS	Ref 307

Tabla 2.5 (cont.): Aplicaciones de las sílicas y vidrios funcionalizados para la preconcentración de metales.

	S (BET) (m ² /g)	S (ISEC) (m ² /g)	V _p (cm ³ /g)	<dp> (nm) "Macro- poros"	D _a (g/cm ³) Densidad aparente	V _g (cm ³ /g) Volumen del gel
Chelex-100 (H₂O)	0	1994,3	2,817	6,3	0,265 0,241 (Bio Rad)	0,01
I-HOx (H₂O)	505 (500 Merck)	341,4	0,457	5,9	0,633	0,01
Chelex-100 (THF)			Fusión de granos			
I-HOx (THF)	505	85,8	0,101	5,3	0,687	0,368

Tabla 2.6: Parámetros morfológicos obtenidos para Chelex-100 e I-HOx mediante ISEC utilizando distintas fases móviles.

Concentración de polímero (nm/nm ³)	Volumen específico de la fracción (cm ³ /g)		
	Chelex-100 Solvente: H ₂ O	I-HOx Solvente: H ₂ O	I-HOx Solvente: THF
0.1	0.007	0.000	0.017
0.2	0.003	0.000	0.013
0.4		0.000	0.000
0.8		0.000	0.000
1.5		0.000	0.000
2.0		0.010	0.338

Tabla 2.7: Distribución de microporos (fase gel) para I-HOx y Chelex-100 en distintos solventes.

Constante de formación de complejos del análogo al grupo quelante. (log K _f)				Constantes de acidez -log K _a
I-HOx	Cd-Ox: 7.80 Ref ²⁰⁶	Ca-Ox: 3.27 Ref ²⁰⁶	Mg-Ox: 4.50 Ref ²⁰⁶	pK _{OH} =7.0-7.5 (para I-HOx) Ref ²⁰⁵
Chelex-100	Cd-IDA: 5.35 Ref ³⁰⁸	Ca-IDA: 4.56 Chelex-100 Ref ¹⁹⁵	Mg-IDA: 3.60 Ref ³⁰⁸	pK _{a1} =2.89 pK _{a2} =8.50 (para IDA) ^a Ref ³⁰⁹

^aK_{a1} corresponde a la pérdida de segundo protón carboxílico y K_{a2} a la pérdida del protón del grupo imino.

Tabla 2.8: Constantes de formación de complejos de metales de transición y metales alcalino térreos de los análogos de los grupos funcionales de Chelex-100 e I-HOx (ácido iminodiacético (H₂IDA) y 8-hidroxiquinolina inmovilizada (HOx)).

<u>Performance Analítica</u>	Determinación de Cd (Preconcentración con CHELEX-100)	Determinación de Cd (Preconcentración con I-HOx)
Límite de detección (μg l⁻¹) (3σ)	0.002	0.001
Blanco (pg) (media ± s)	79.8 ± 2	80.8 ± 2
Precisión (RSD %)	5.0	5.5

Tabla 2.9: Comparación de las figuras de mérito para la determinación de Cd con Chelex-100 e I-HOx.

<u>Figuras de mérito del sistema de flujo :</u>		
	<u>Chelex-100</u>	<u>I-HOx</u>
Volumen de muestra	5.09	5.14
Factor de enriquecimiento ^b	33	47
Eficiencia (%) ^c	71 ± 4	100 ± 5
Frecuencia de análisis (muestras hr⁻¹)	19.4	6.7
Volumen de elución (μl)	80	80

^a Blanco de la solución buffer y del eluyente.

^b Comparado con la introducción directa de la muestra.

^c Comparado con la masa total de analito cargada en la columna.

Tabla 2.10: Comparación de las figuras de mérito de la preconcentración de Cd con Chelex-100 e I-HOx.

	Chelex-100	I-HOx
Velocidad media de quelación (mol s ⁻¹) (para una [Cd ⁺²]=8.9e-10 M)	1.45e-13	2.06e-13 (mínima)
Densidad superficial de grupos quelantes (mol m ⁻²) (calculada suponiendo superficie plana)	7.57e-7	4.69e-7
Velocidad de quelación normalizada (m ² .s ⁻¹)	1.91e-7	4.39e-7
Fracción del Volumen intersticial ("Void Volume") (calculado como V _{poros} /V _{relleno})	0.75	0.29
Tiempo de contacto al flujo de operación (s)	0.051	0.064

Tabla 2.11: Comparación de las velocidades de quelación, densidad de grupos funcionales y tiempos de contacto para Chelex-100 e I-HOx.

Concentración de HClO ₄ en la matriz.	Resina	Concentración de metales en la solución de alimentación. (mmol l ⁻¹)	Carga de la resina con D2EHTPA (mmol g ⁻¹)	Capacidad total (mmol l ⁻¹)	Cociente Carga-Capacidad	Factor de separación entre metales
0.1	SIR-I	3.29 Cd(II) 5.08 Zn(II)	1.51	0.63	2.38	>> 1000
1	SIR-I	4.07 Cd(II) 5.04 Zn(II)	1.49	0.67	2.23	>> 1000
5	SIR-I	3.30 Cd(II) 5.35 Zn(II)	1.35	0.60	2.25	>> 1000
1	SIR-I	4.30 Pb(II) 5.0 Zn(II)	1.49	0.63	2.37	>> 1000
1	SIR-I	4.1 Cd(II) 4.28 Ni(II)	1.44	0.65	2.24	>> 1000
1	SIR-I	4.06 Cd(II) 4.42 Pb(II)	1.49	0.64	2.35	9.8

Tabla 2.12: Factores de separación y capacidades para la resina Impregnada SIR-1.

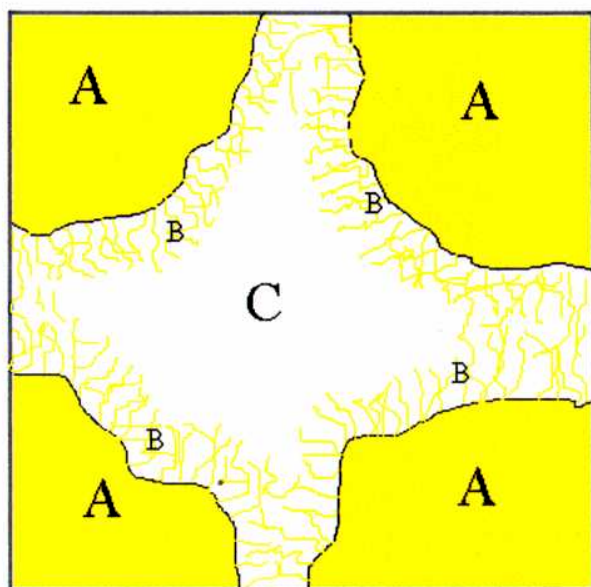


Figura 2.1: Modelo de poros cilíndricos utilizado para interpretar los resultados de ISEC. A) Masa polimérica impenetrable, B) Microporos, fase gel (Modelo de Ogston), C) Macroporos (modelo de poros cilíndricos).

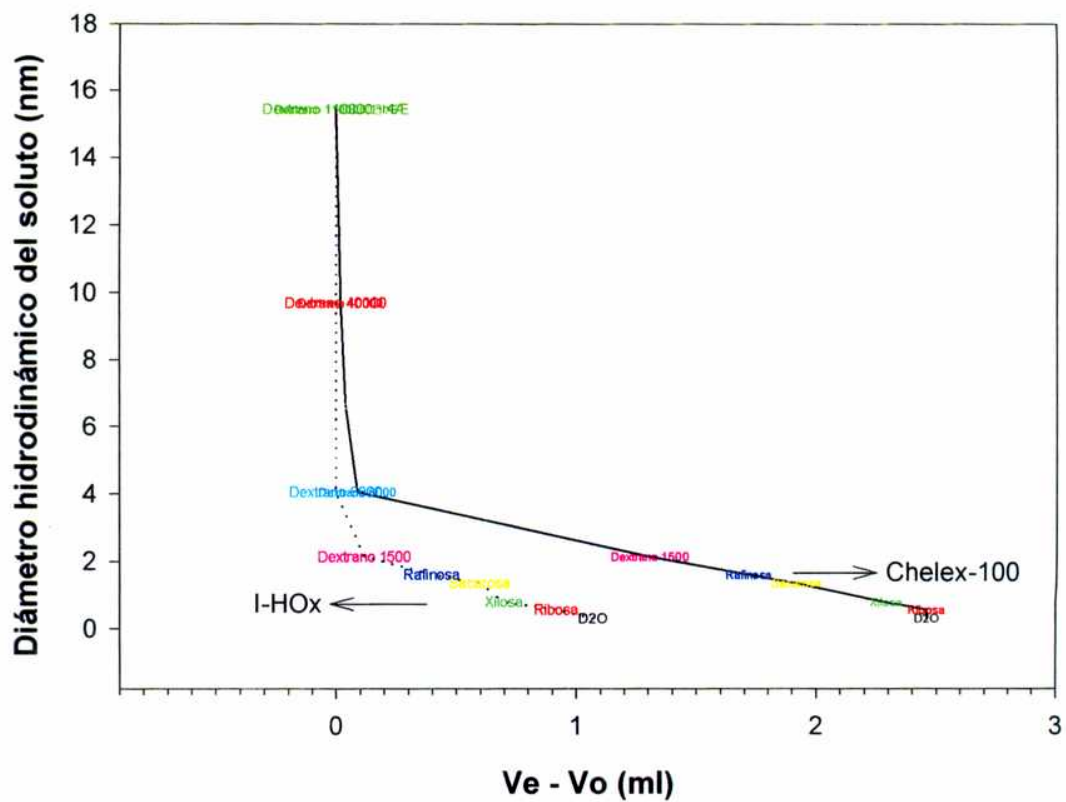


Figura 2.2: Resultados obtenidos mediante ISEC para Chelex-100 e I-HOx, usando como fase móvil una solución 0.2 M en Na_2SO_4 .

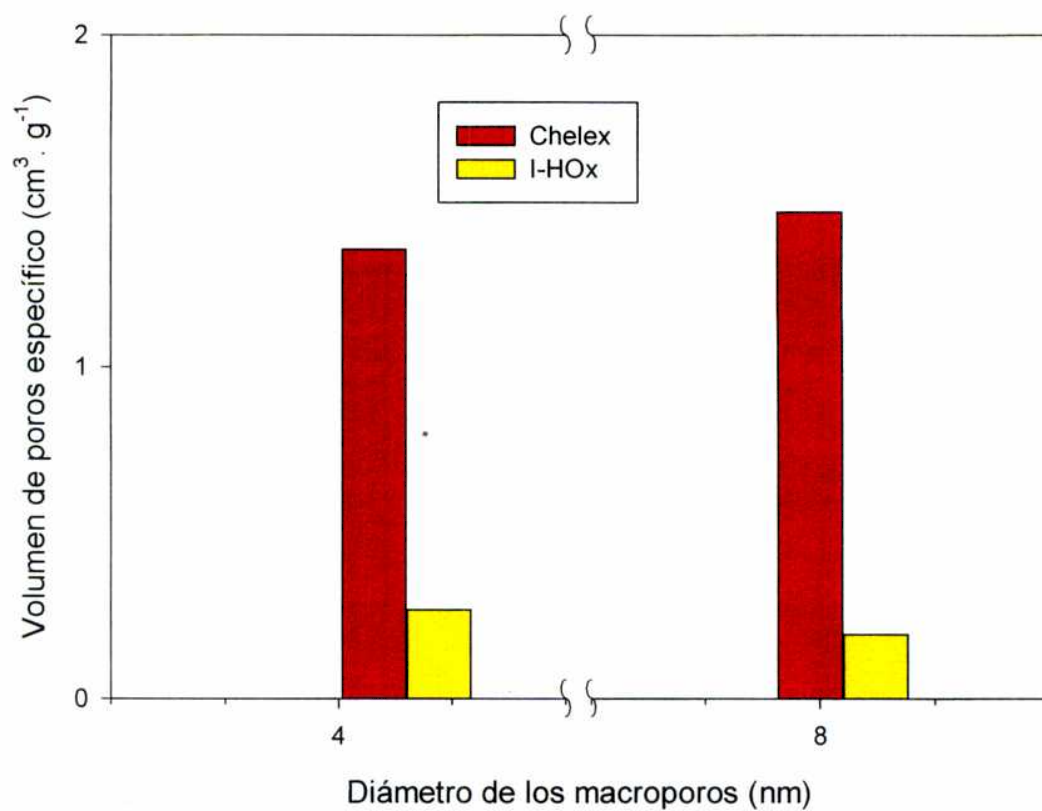


Figura 2.3: Volumen y distribución de macroporos para I-HOx y Chelex-100.

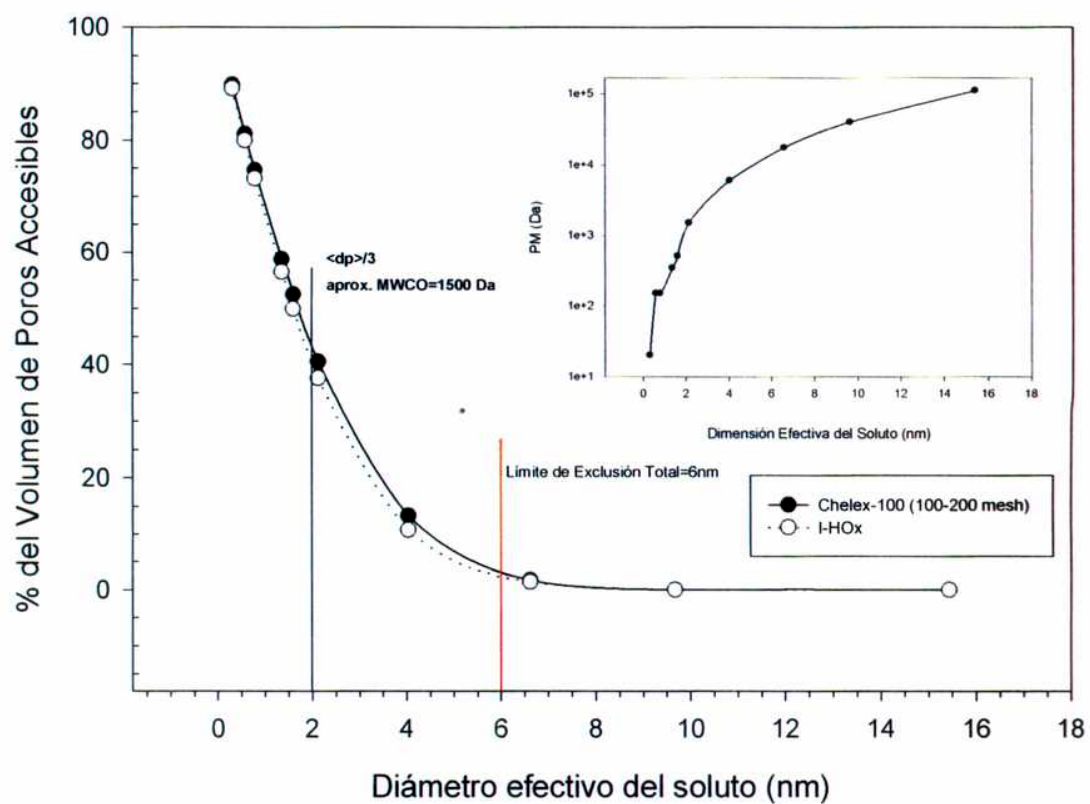


Figura 2.4: Accesibilidad de la red de poros de Chelex-100 e I-HOx a distintos solutos

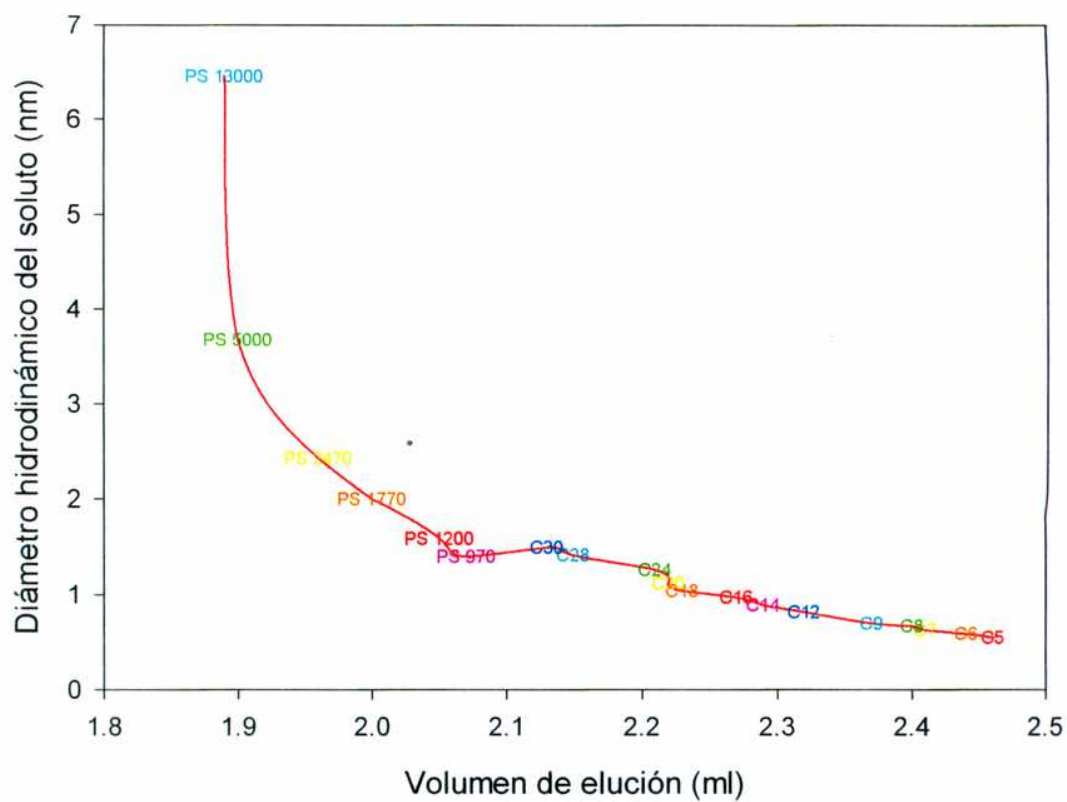


Figura 2.5: Curva de elución ISEC en THF para I-HOx.

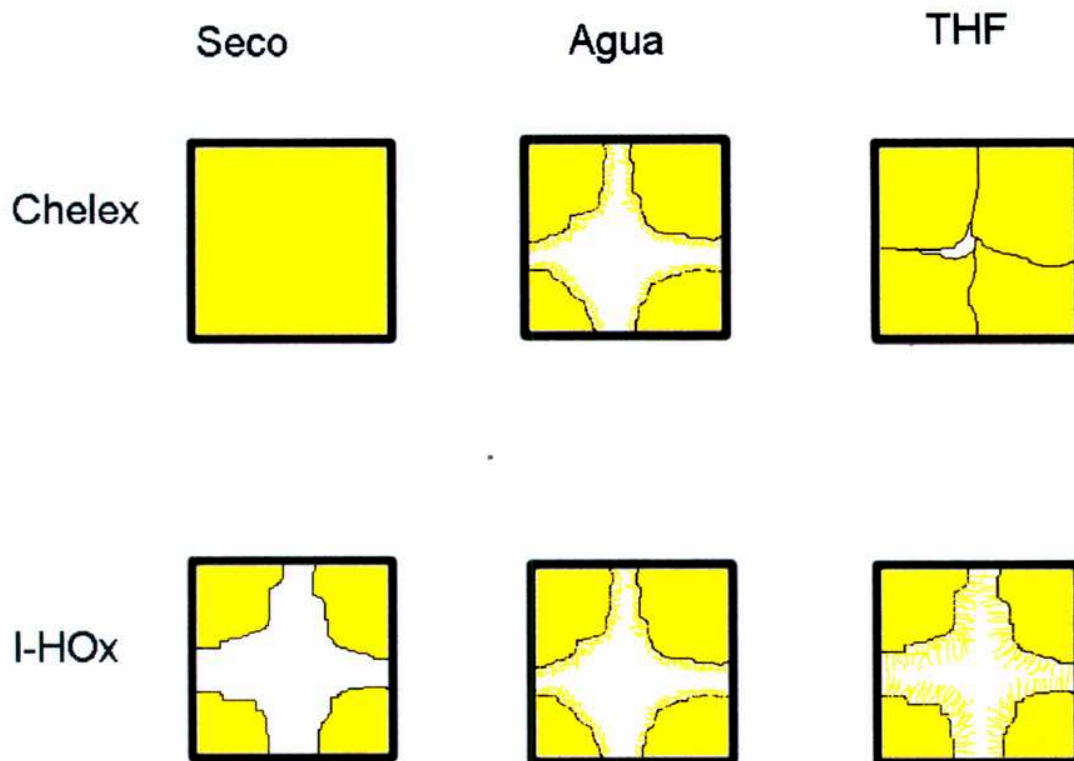


Figura 2.6: Esquema de la morfología de Chelex-100 e I-HOx en distintos solventes.

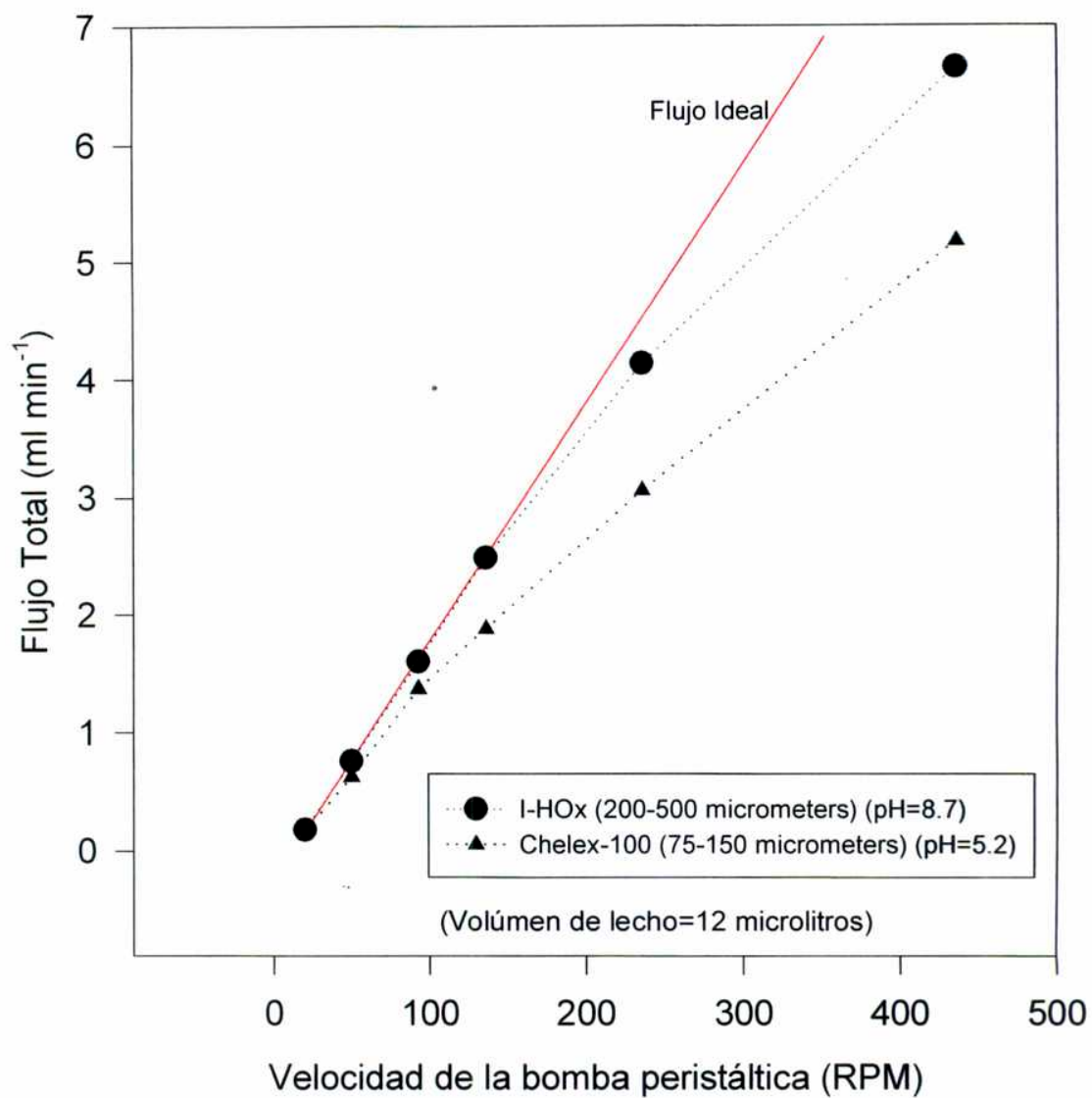


Figura 2.7: Resistencia al flujo de microcolumnas rellenas con Chelex-100 e I-HOx.

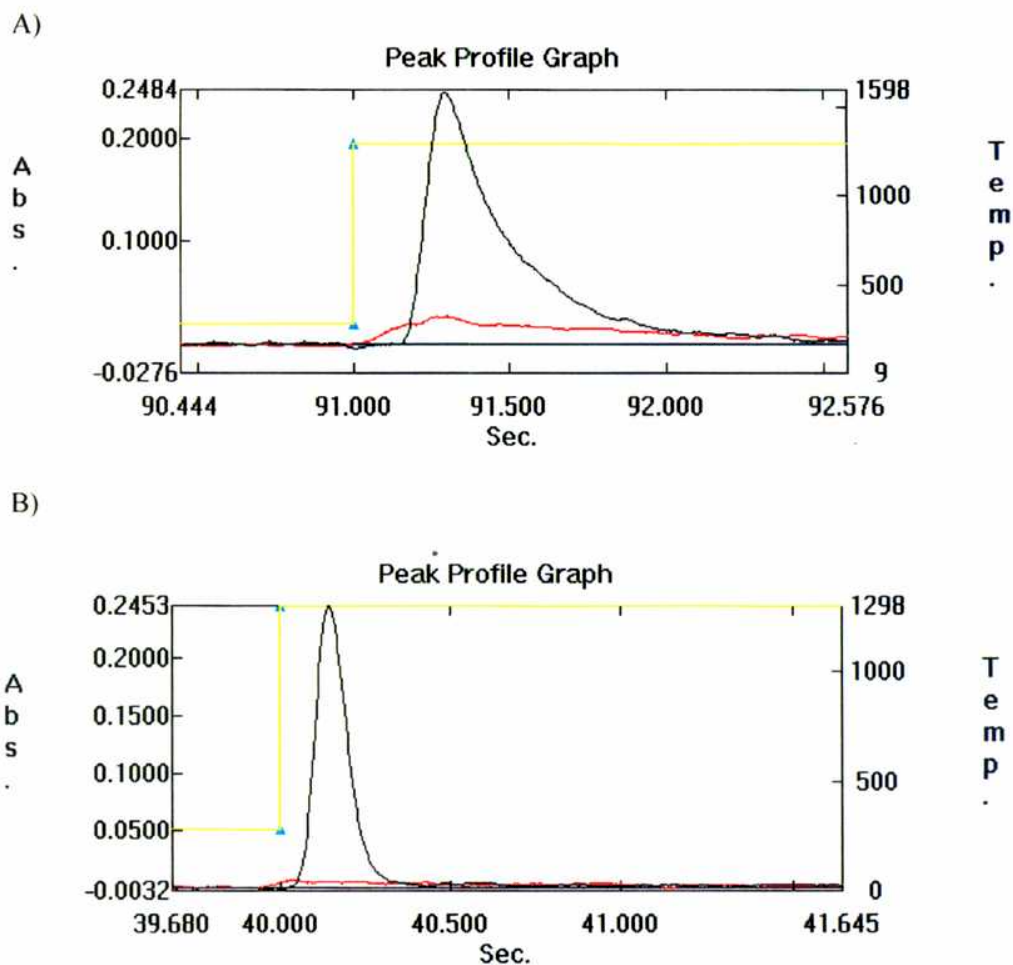


Figura 2.8: Comparación de las señales obtenidas para Cd preconcentrado sobre distintos soportes: A) Chelex-100 (70 ppt), B) I-HOx (50 ppt). (Las diferencias en la escala de tiempo se deben a que se usaron distintos largos de la etapa de secado en el programa de atomización.)

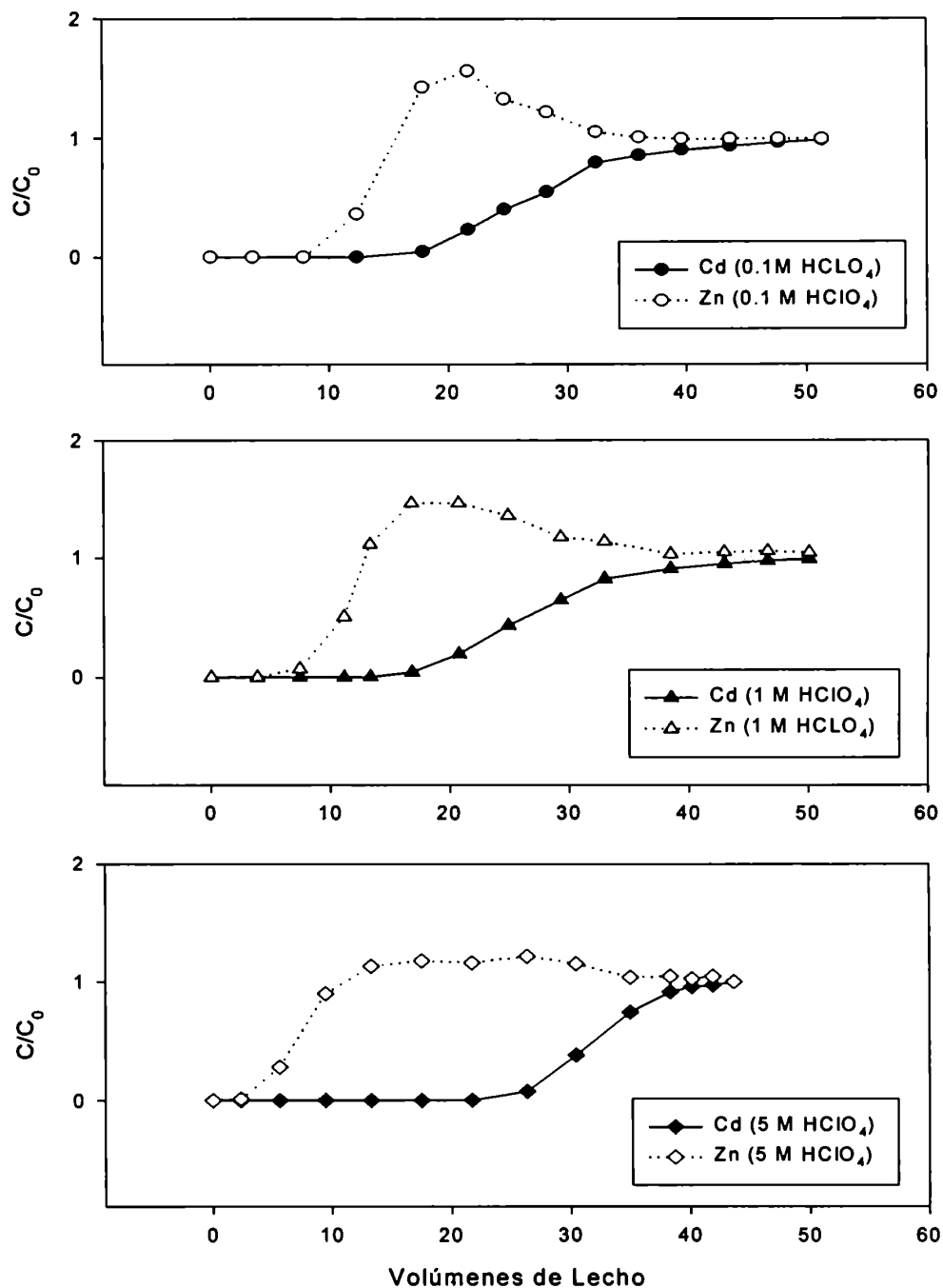


Figura 2.9: Curvas de aparición de Cd y Zn (curvas “breakthrough”) utilizando como soporte de preconcentración a una polivinilpiridina impregnada con ácido di-(2-etil-hexil) ditioposfórico (resina “SIR-1”). Se muestra la extracción a distintas concentraciones de ácido perclórico, de abajo hacia arriba: 0.1, 1 y 5 M.

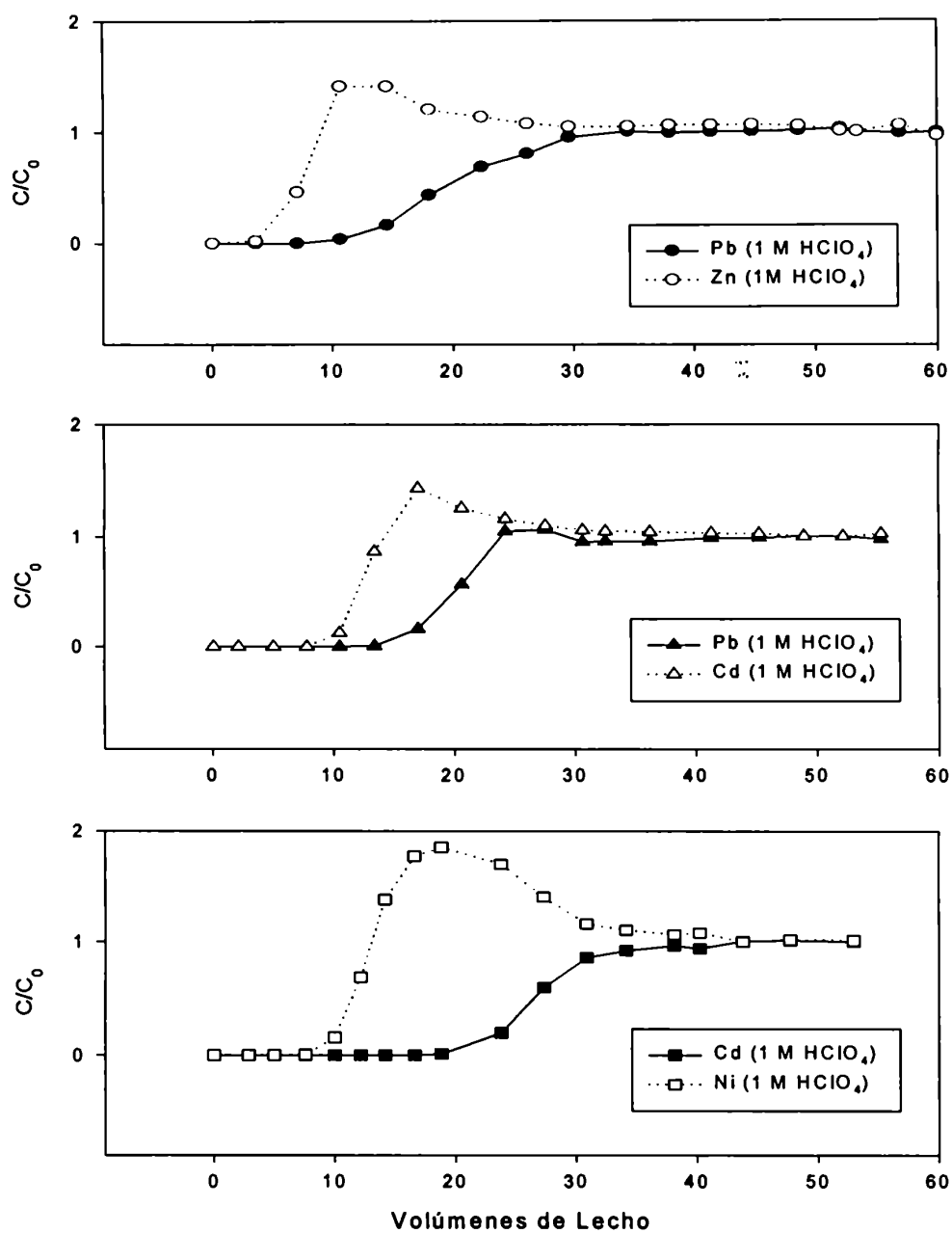


Figura 2.10: Curvas de aparición para distintos pares de metales (Pb/Zn, Pb/Cd, Cd/Ni) utilizando como soporte SIR-1. Todas las extracciones se realizaron desde HClO_4 1 M en todos los casos.

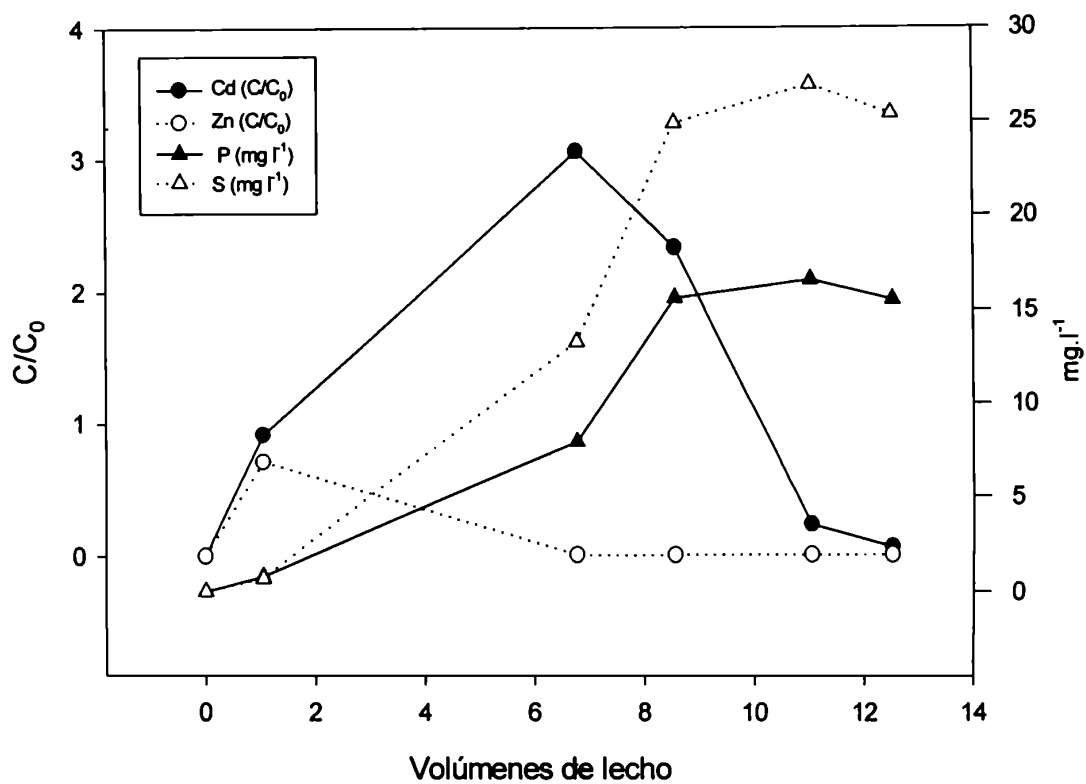
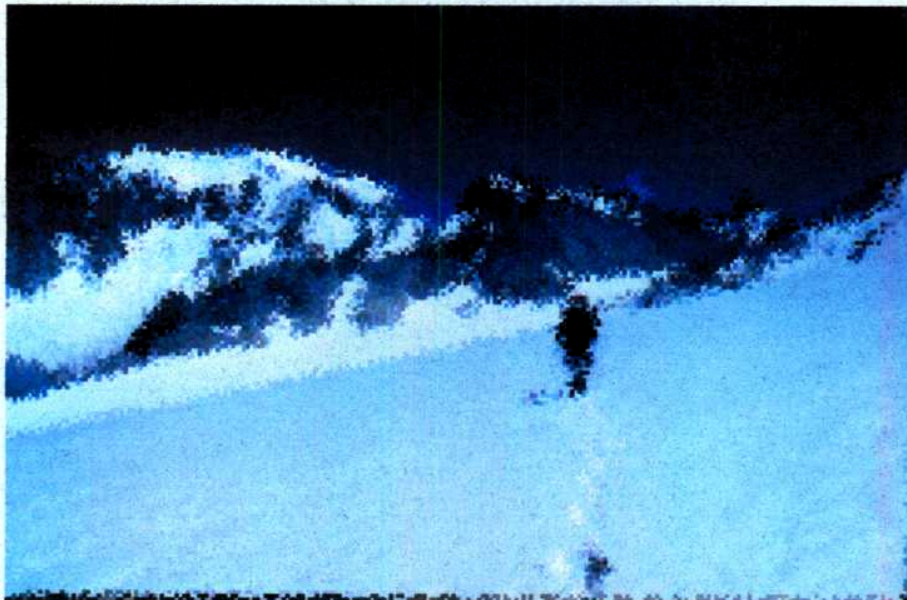


Figura 2.11: Curvas de elución de Cd y Zn de SIR-1 cargada en medio HClO_4 . También se muestra el sangrado del extractante (D2EHTPA), a través de la concentración de azufre y fósforo en el eluido.

CAPITULO 3



"Sumido en la niebla de su vida, espera su Respuesta."

Niebla, Miguel de Unamuno. (1914)

A pesar de que esta frase poética fue escrita para una bella mujer, también dice algo sobre la incertidumbre que rodea nuestras observaciones y la necesidad de extraer respuestas de ellas. El problema de como conocemos la Realidad no sólo ocupa a los poetas, sino también a los Químicos Analíticos, que debemos extraer la información relevante a partir de los datos experimentales.

3 Capítulo 3: Estudio detallado de las figuras de mérito para la determinación de metales pesados mediante FI-ETA-AAS.

3.1 Validación de métodos analíticos

La validación es la última etapa que debe cumplirse cuando se desarrolla un nuevo método analítico. Cuando un método ha sido "puesto a punto" debe demostrarse que puede producir datos que tengan la calidad necesaria para la aplicación para la cuál se lo va a emplear. La validación se realiza para asegurar la calidad de los datos obtenidos y por lo tanto, es parte integral del Aseguramiento de la Calidad del Laboratorio (Quality Assurance). El sistema FI-ETA-AAS ya ha sido descripto exhaustivamente en el Capítulo 1, y en el Capítulo 2, hemos comparado los distintos soportes sobre los cuáles es posible realizar la preconcentración de iones metálicos. En este capítulo nos proponemos ahondar mas en el estudio de las figuras de mérito que caracterizan al método desarrollado y a analizar las contribuciones que las variables experimentales tienen sobre la precisión, la sensibilidad, el ámbito dinámico lineal y el límite de detección. Nos centraremos en la determinación de Cd.

El aseguramiento de la calidad se ha definido como³¹⁰: *"Un sistema de actividades cuyo propósito es proveer al usuario de la seguridad de que está cumpliendo con estándares de calidad definidos"*. El análisis químico es un "servicio" que se presta mediante el informe de un resultado y la interpretación que se da a la información contenida en éste. Los "estándares de calidad definidos" se refieren a estándares de calidad que cumplen ciertos niveles de confianza, lo que involucra una aproximación estadística a la resolución del problema. La validación de

un método analítico consiste en documentar la calidad de un procedimiento de análisis estableciendo los requisitos necesarios para criterios de performance tales como exactitud, precisión etc³¹⁰. La documentación es parte imprescindible en los sistemas de Aseguramiento de la Calidad bajo la forma de procedimientos estándar de análisis (SOP, “Standard Operation Procedures” en las normas ISO por ejemplo).

Pueden hacerse dos tipos distintos de validación de métodos analíticos. Uno de ellos es la validación interna, que se emplea cuando el método desarrollado se utilizará dentro de un solo laboratorio. En la mayoría de los casos (incluido el nuestro) la validación termina aquí. También existe la validación externa o interlaboratorios, que se utiliza cuando los resultados producidos son de interés general o cuando se desea establecer un método oficial de análisis. En este tipo de validación se participa de “rondas interlaboratorio” en las cuáles los resultados emitidos por cada uno de los participantes son comparados entre sí. Este tipo de rondas es objeto de un análisis estadístico particular, que no describiremos aquí.

Los criterios de performance de un método son las llamadas “figuras de mérito”^{**}. Las figuras de mérito principales son la precisión, la exactitud, y el límite de detección. Estas están influenciadas por otras figuras de mérito, también muy importantes, que son la linealidad (o ámbito dinámico lineal, ADL), la selectividad, la sensibilidad y la robustez.

3.1.1 Las Reglas de Oro de la validación de métodos analíticos.

Cuando validamos un nuevo método debemos tener en cuenta tres “reglas de oro”:

- **Validar todo el método:** Muchas veces se valida sólo la etapa de la determinación (por ejemplo, la determinación por absorción atómica). Sin embargo, también es necesario validar los pasos preparativos previos. Los pasos a validar incluyen el muestreo, el almacenamiento, y el acondicionamiento (incluida la disolución si fuese necesaria) de la muestra. En muchos casos asumimos que el muestreo ha sido correcto y sólo nos preocupamos por la etapa de análisis.
- **Validar en todo el rango de concentraciones:** Un método puede trabajar muy bien a altas concentraciones pero fallar a bajas concentraciones, en particular en términos de precisión.

^{**} El nombre “figuras” de mérito viene del inglés “figures of merit”, por lo que una expresión más correcta sería “números de mérito”.

- **Validar en todo el rango de matrices:** Es obvio que un método de análisis de “aguas naturales”, puede no funcionar de la misma forma en agua de mar que en agua dulce. Por ello es necesario identificar las diferentes clases de matrices e incluir un elemento representativo de ellas en el procedimiento de validación.

3.1.2 Distintas clases de validaciones internas.

Existen distintos niveles a los cuáles se puede hacer una validación interna. Ellos son:

- *Validación de Nuevos Métodos:* incluye una etapa exploratoria en la cuál se decide con pocas muestras si el método es adecuado para los fines buscados y luego una fase de validación total. La fase exploratoria se centra en las etapas del procedimiento que son mas delicadas (resolución en HPLC o GC, interferencias en AAS etc.). Cuando la fase exploratoria se considera aprobada, se prosigue con una fase de validación total donde se descartan problemas de exactitud (sesgo) mediante el uso de materiales de referencia certificados.
- *Pruebas de Transferencia:* se aplican cuando el método que ha sido completamente validado en un laboratorio es puesto en práctica en otro laboratorio. En este caso, el segundo laboratorio deberá analizar las mismas muestras que el primero y verificar los resultados. Sin embargo no deberá preocuparse de controlar aspectos metodológicos que ya han sido establecidos. El segundo laboratorio deberá determinar sus propios valores de precisión, que serán ahora sólo dependientes del operador.
- *Pruebas Instrumentales Periódicas:* se usan para investigar si los patrones de calibrado y los instrumentos están funcionando correctamente antes de iniciar una nueva serie de medidas. En general involucran una evaluación de la curva de calibrado (“evaluación de la pendiente”). También hay verificaciones propias del instrumento (estado de la superficie del horno de grafito, cantidad de platos teóricos de una columna cromatográfica) etc.
- *Validación retrospectiva:* si se recolectan resultados durante un largo período de tiempo, se puede determinar la precisión durante el tiempo pasado e investigar si hay tendencias indeseables en los nuevos valores.
- *Control de Calidad:* se realiza analizando muestras de concentración conocida “a ciegas” lo que permite hacer gráficos de control que permiten detectar sesgos positivos y/o negativos en los resultados y la precisión (expresada como rango).

3.2 Precisión

La precisión es una medida de los errores aleatorios. Desde un punto de vista estadístico, la precisión describe la dispersión de los resultados en torno a la media, independientemente de que ésta sea una representación correcta del valor verdadero. La determinación de la precisión requiere de la medida de la desviación estándar.

Existen dos maneras de medir la precisión, la *repetitividad* y la *reproducibilidad*. La repetitividad es la precisión obtenida en circunstancias óptimas, esto es, con el mismo analista y en el mismo día de mediciones con el mismo instrumento. La repetitividad también se conoce como “*variación dentro del experimento*” (within-run variation)³¹¹. La reproducibilidad se determina en días de medición distintos usando curvas de calibrado distintas por usuarios distintos. La reproducibilidad puede ser llamada “reproducibilidad dentro del laboratorio” (within-laboratory reproducibility)³¹¹ para diferenciarla de las medidas de reproducibilidad usadas en rondas interlaboratorio³¹².

En ciertos casos, un laboratorio puede medir su performance en términos de la repetitividad. La repetitividad se calcula replicando entre seis y ocho veces el análisis de una misma muestra por un mismo analista. Con estos resultados se calcula la desviación estándar. Los resultados también pueden expresarse como una desviación estándar relativa (RSD%) también llamada coeficiente de variación (%CV).³¹². Los replicados deben ser auténticos y no sólo simples repeticiones de una misma medida, esto es, deben incluir todas las etapas del análisis. La RSD% debe determinarse en los intervalos superior e inferior de concentración, puesto que la precisión puede empeorar a niveles de concentración muy bajos. En general, la RSD% se mantiene constante a medianas y altas concentraciones, mientras que en el umbral de detección, es mucho mayor. Cuando el ámbito lineal es reducido, como en el caso del horno de grafito, es común que la RSD% se mantenga constante. Este fenómeno de constancia de las varianzas se conoce como heteroscedasticidad. En instrumentos cuyo ámbito dinámico lineal es mucho mayor que el del horno de grafito (en ICP-OES por ejemplo) la desviación estándar relativa no es constante. (Ver Figura 3.1). En estos casos debe utilizarse un método de regresión ponderada que consiste en utilizar los puntos experimentales en una regresión que tiene en cuenta la distinta precisión de cada uno de ellos mediante “factores de peso”.

Para saber si un método es mas preciso que otro, es necesario recurrir al test “F” de igualdad de varianzas. Este test debe ser diseñado de manera que las repeticiones usadas en ambos métodos sean suficientes para discriminar si las precisiones son estadísticamente diferentes o no. Para ello se puede recurrir a tablas estadísticas que indican la potencia del test en función del número de replicas.

Podemos preguntarnos si la precisión de un método dado es suficiente, sin embargo no existe una única respuesta a esta pregunta a menos que se diga el objetivo del análisis. Muchas organizaciones imponen valores mínimos para la repetitividad y reproducibilidad. Por ejemplo la “Canadian Acceptable Methods Guidelines” para el control de medicamentos pide una precisión mejor que el 2% para los principios activos. Para impurezas en medicamentos, estas mismas normas piden una precisión del 5% a un nivel de concentración del 0.2% en el principio activo. Vemos que la precisión requerida depende del rango de concentraciones en el que se encuentra el analito, en general para macro y mesocomponentes, se requieren precisiones cercanas al 1-2%, mientras que para trazas, se toleran repetitividades peores, que rondan entre el 5 y el 10%. Analizaremos las distintas contribuciones a la repetitividad del método de preconcentración mas adelante.

3.3 Robustez

No existen definiciones de “robustez” por organizaciones tales como la ISO o la IUPAC pero sí, en la Química Analítica relacionada con la fabricación de medicamentos^{313, 314}. En general se acepta que la robustez de un método es la medida de la influencia que tienen pequeños cambios en el procedimiento en la obtención del resultado final. Cuanto mas insensible sea un método a pequeños cambios “ambientales” tales como distintos lotes de reactivos, pequeñas variaciones de pH o temperatura, etc., será considerado mas “robusto”.

El término “robustez” fue introducido en Química Analítica por Youden y Steiner³¹⁵. La manera de evaluar la robustez de un método consiste en variar el valor de los parámetros del procedimiento de manera ordenada utilizando un diseño experimental (del tipo Fraccional Factorial por ejemplo) y evaluar los efectos de cada cambio en las variables. Por ejemplo, en la determinación de Cd por horno de grafito nos podríamos preguntar que tan robusto es el sistema con respecto a la temperatura de calcinación utilizada en el programa de calentamiento. Hemos visto en el Capítulo I que la señal obtenida es muy dependiente de esta variable, y debe seleccionarse un

valor óptimo. Si el controlador de temperatura del horno funcionase defectuosamente o la superficie del horno de grafito estuviese dañada, la señal sufriría grandes fluctuaciones. Otro ejemplo, podría ser la concentración del ácido usado para eluir los metales de la microcolumna. Las experiencias mostraron que a partir de una concentración 2 M la elución es completa y por lo tanto, la señal es poco sensible a un aumento en la molaridad del ácido.

Siempre es necesario fijar de antemano los valores extremos entre los cuáles se puede variar el parámetro experimental y seleccionar aquel en donde la señal alcance un máximo o una meseta. Por ejemplo, podemos ensayar la concentración del ácido de elución entre 2 y 3 M para lo cual no observaríamos efectos en la señal. Sin embargo, si el ácido se diluye entre 1 y 3 M observaríamos que a concentraciones de ácido menores que 2 M el sistema no es robusto y la señal se hace dependiente de la forma en la que el eluyente fue preparado. En este ejemplo, la variación alrededor del valor nominal no es simétrica ya que no es lo mismo aumentar la concentración por encima de 2M que disminuirla. (Esta influencia de la concentración de ácido sobre la señal fue mostrada en el Capítulo 1).

3.4 Exactitud

Ahora bien, ¿de qué sirve un método altamente repetitivo que proporciona resultados inexactos?. ¿De qué sirve un método de análisis de ultratrazas de metales que tiene una repetitividad del 5% si los resultados obtenidos son informados siempre por defecto? La respuesta es sencilla: el método sería inútil.

Así como el concepto de precisión está vinculado a los errores aleatorios, el concepto de exactitud está vinculado al concepto de error sistemático, conocido como “sesgo”. La IUPAC³¹⁶ define exactitud como: *“la cercanía entre el valor promedio obtenido por un método de análisis y el valor de referencia”*. Es obvio que no es posible evaluar la exactitud sin un valor de referencia. Existe mucha confusión acerca de las palabras exactitud y sesgo, por lo que las definiremos: El sesgo (Δ) es una medida de la exactitud y se calcula como la diferencia entre la media de los valores obtenidos por el método y el valor aceptado (μ_0):

$$\bar{x} - \mu_0 = \Delta$$

El sesgo tiene dos componentes: el sesgo del método y el sesgo del laboratorio. La única manera de detectar el sesgo propio del laboratorio es utilizando

un método aceptado como insesgado. Todo el sesgo que se detecte en este caso corresponde al propio del laboratorio. Una manera de detectar el sesgo total cuando se desarrolla un método nuevo es mediante el uso de un material de referencia. Los materiales de referencia se obtienen a través de trabajos interlaboratorio donde una misma muestra es analizada por muchos laboratorios empleando distintas técnicas analíticas. Estos materiales son muy útiles en la validación de métodos, pero debemos recordar que es necesario cubrir todo el rango de matrices y de concentraciones, en especial las muy bajas. Para ello puede ser necesario incluir varios materiales de referencia. En el caso del análisis de agua de mar, no es necesario analizar distintos materiales de referencia puesto que la composición del agua de mar es relativamente constante y el nivel de concentración de metales pesados es siempre bajo. Los resultados producidos por el método propuesto se comparan estadísticamente con el valor certificado (para cada analito) mediante un test de hipótesis de igualdad de medias (test “t de Student”). No discutiremos como se emplea y diseña este test, para lo cual se recomienda la excelente obra de Massart et al^{189,312}.

Es común, sobre todo en trabajos de análisis de especiación, que no existan materiales de referencia certificados en “especies” que aseguren la exactitud del método que estamos desarrollando. Para ello se utilizan muestras “fortificadas” o “spiking”. Este procedimiento requiere de una muestra que no contenga al analito, o que lo contenga en niveles no detectables por el método. Esta muestra “blanco” es adicionada con una cantidad conocida de analito (“spike”) que luego se somete a análisis. Los resultados se expresan como porcentaje de recuperación. Mostraremos este procedimiento en el Capítulo 6, para la evaluación de un nuevo método de especiación de Cd en aguas naturales.

3.5 Rango lineal de las curvas de calibrado.

Los químicos analíticos buscamos, en la medida de lo posible, una relación lineal entre la respuesta instrumental y la concentración. En esta relación lineal la variación de la señal con la concentración (pendiente) es constante y por lo tanto, la habilidad para distinguir entre concentraciones similares del mismo analito también lo es. En el caso de que la relación lineal no se cumpla, ésta puede linealizarse como en el caso de los electrodos de ion selectivo. En todo caso, siempre puede seleccionarse el rango de

trabajo como el rango donde la respuesta es lineal, descartando el resto de los puntos de la curva de calibrado.

En general, la manera de verificar la linealidad de la función respuesta consiste en calcular el coeficiente de correlación de la regresión de la señal sobre la concentración junto a un análisis de los residuos. Sin embargo, en la etapa de validación “prospectiva” o validación “total” de un nuevo método, es necesario aplicar el test “F” de falla de ajuste (“lack of fit”)³¹⁷.

En el caso particular de nuestro sistema de preconcentración, la linealidad es función de dos factores:

- La linealidad de la masa de analito retenida en la columna como función de la concentración del analito en los patrones de calibración y del tiempo de preconcentración.
- La linealidad del detector frente a incrementos lineales de la masa de analito introducida dentro del horno de grafito.

Estos factores están encadenados y funcionan “en serie”, de manera equivalente a un circuito eléctrico. Si la masa retenida en la microcolumna no varía linealmente con la concentración del patrón de calibrado, tampoco será lineal la señal producida por el atomizador. Si la masa retenida en la columna sigue una relación lineal con la concentración del analito en solución, pero el detector está saturado habiéndose superado la máxima señal alcanzable, tampoco será lineal la curva de calibrado.

Desde el punto de vista del detector, la linealidad se establece de forma empírica usando una curva de calibrado donde no se preconcentran los patrones. El límite superior del ámbito lineal es función de la longitud de onda utilizada, el ancho de ranura del monocromador, la potencia de la lámpara de cátodo hueco y del programa de calentamiento del horno de grafito³¹⁸. La bibliografía³¹⁸ recomienda que para la determinación de Cd por ETA-AAS se trabaje siempre con señales menores que 0.5 unidades de absorbancia. En la práctica, la linealidad total está limitada por la linealidad del Espectrómetro de Absorción Atómica y no por la del sistema de preconcentración. El límite superior de linealidad obtenido como un todo para el sistema de preconcentración es idéntico al límite de linealidad del detector sin acoplar el sistema de flujo. La elevada sensibilidad de la determinación de Cd por ETA-AAS

hace que el ámbito de linealidad sea pequeño, abarcando menos de un orden en la escala de concentración.

Una ventaja de los sistemas de preconcentración FIA es que es posible variar la masa de analito que es retenida por la columna de intercambio variando el volumen de muestra que entra en contacto con el soporte quelante. Si además el sistema es automatizado, esta operación es sencilla y limpia. El acople de sistemas FIA a ETA-AAS mejora una de las desventajas mas llamativas de estos instrumentos: su reducido ámbito lineal. En secciones posteriores analizaremos la influencia de las variables de flujo en el ámbito lineal de trabajo y otras figuras de mérito.

3.6 Límites de decisión, detección y cuantificación

La característica sobresaliente de un método analítico de vestigios es la mínima concentración que este puede detectar. En especial, la determinación de un analito en muy bajas concentraciones (como en el caso de los metales en agua de mar) nos acerca a la zona “oscura” de la metodología analítica: el trabajo en el límite de detección (LOD, “Limit of Detection”). La evaluación de la detectabilidad de un analito en una muestra debe traer aparejada la evaluación de dos probabilidades distintas:

- *Probabilidad de Falso Positivo (α)*: la probabilidad de afirmar que el analito se encuentra presente cuando esto no es cierto. (Error del tipo I)
- *Probabilidad de Falso Negativo (β)*: la probabilidad de afirmar que no hay analito cuando sí lo hay. (Error del tipo II).

La importancia de cada tipo de error depende del tipo de análisis que estemos realizando: en el caso de la determinación de un metal tóxico en agua es distinto concluir que el tóxico supera los límites permitidos cuando en realidad no lo hace que concluir que el tóxico no está presente cuando en realidad si lo está. En ambas situaciones las medidas a tomar *a posteriori* son distintas y también lo son las consecuencias para el usuario del agua.

Por ese motivo, es necesario tomar en cuenta ambos tipos de error con su peso relativo, en el momento de calcular un LOD³¹⁹. Las probabilidades de falso negativo y

falso positivo se pueden escoger *simultáneamente* en las llamadas “curvas características de detección”, como veremos luego.

3.6.1 Límite de detección:

En los años '70 la IUPAC³²⁰ definió el límite de detección como: “la concentración (x_d) o la cantidad (q_d) que se obtiene a partir de la menor señal medida (y_d) que puede detectarse con certidumbre razonable en un procedimiento analítico”.

La definición hace uso de la palabra “razonable” obligando a una decisión subjetiva del analista. En la actualidad se considera casi sin discusión que “razonable” quiere decir “estadísticamente diferente”.

El cálculo del LOD, se hace en dos etapas:

1. Establecer la mínima señal detectable (y_c).
2. Convertir esta señal en una concentración o en una cantidad mediante una curva de calibrado.

¿Cómo se resuelven estas dos etapas?

Los pasos a seguir son:

- Repetir el blanco de reactivos n veces. (en las definiciones de la IUPAC, se supone $n > 30$, de manera que pueda usarse una distribución normal).
- Con esas n medidas, establecer la media para la señal del blanco ($\bar{y}_{bco}$).
- Obtener la desviación estándar de la señal del blanco (s_{bco}). Esta desviación estándar será una correcta estimación de la raíz cuadrada de la varianza muestral.
- Definir una probabilidad de falso positivo (α), por ejemplo: 5%.
- Obtener el coeficiente $t_{n-1,\alpha}$ de la distribución de Student de una cola^{††}. (Figura 3.2)
- Dado n y el valor de $t_{n-1,\alpha}$, calcular la señal crítica de detección (y_c) como:

$$y_c = \bar{y}_{bco} + t_{n-1,\alpha} \cdot s_{bco}$$

- Transformar y_c a concentración (x_c) con la ecuación de la curva de calibrado:

$$x_c = \frac{t_{n-1,\alpha} \cdot s_{bco}}{\chi}$$

(χ es la pendiente de la curva de calibrado).

- Calcular:

1. El Límite de Decisión es x_c

2. El Límite de Detección: $x_d = LOD = 2 \cdot x_c$

3. El Límite de Cuantificación: $x_q = 10 \cdot x_c$

Las definiciones mas modernas de la IUPAC³²¹ definen los siguientes factores multiplicativos “ k ” según se trate de límites de decisión, detección o cuantificación:

$$y = \bar{y}_{bco} + k \cdot s_{bco}$$

Donde para cada nivel de detección se define un valor distinto de k :

Límite de decisión: $y=y_c, k=k_c=1.645$

Límite de detección: $y=y_d, k=k_d=3.29$

Límite de cuantificación: $y=y_q, k=k_q=10$

El límite de decisión corresponde (con un $n>30$) a una probabilidad de falso positivo del 5% ($\alpha=0.05$), aunque con un n igual a cuatro, esta probabilidad es cercana al 10%.

El límite de decisión no nos protege adecuadamente contra los errores de tipo II (falso negativo), puesto que la señal de una muestra que se encuentra justo en el nivel de la señal de decisión tiene una probabilidad de falso negativo (β) que es del 50%, independientemente del valor de α elegido, tal como se ve en la Figura 3.3. Esto hace muy probable que no detectemos la presencia del analito aunque este se encuentre presente. Por lo tanto, es necesario aumentar la distancia entre la señal crítica y la señal de detección disminuyendo la probabilidad de falso negativo.

3.6.2 ¿Cómo logramos una probabilidad de falso negativo menor al 50%?

Una probabilidad de falso negativo del 50% es bastante alta, y sería deseable balancear ambos tipos de error. Para ello es necesario que las distribuciones de la muestra y del blanco se encuentren mas separadas. Una solución es definir el límite de detección a una distancia igual al doble de la distancia escogida para el límite de decisión. En el caso de la definición IUPAC, se define la “Señal de Detección (y_d)” como aquella que se calcula utilizando un valor de k igual a 3.29 veces s_{bco} . De esa manera, la distancia entre la media de la señal del blanco y la media de la señal de la muestra se duplica y de este modo, la probabilidad de falso positivo y de falso negativo son iguales ($\alpha=\beta=0.05$ para $n>30$) (Figura 3.4.)

^{††} Debe usarse la distribución de una cola porque sólo existe la posibilidad de obtener señales mayores que el blanco y nunca menores (salvo inestabilidad del instrumento).

Es sumamente engorroso realizar 30 réplicas del blanco como sugiere la definición de la IUPAC. Los límites de detección siempre se calculan para valores de n que están entre 3 y 10. En este caso, es necesario obtener las probabilidades a través de la distribución t de Student y no a través de la distribución Normal. Dados los grados de libertad ($n-1$) y dada la probabilidad deseada, se busca el valor de t en tablas y se lo multiplica por dos para obtener k_d ^{††}. Esto implica usar un valor de $k = 2 \cdot t_{n-1, \alpha}$.

En el caso de los límites de detección calculados para el sistema FI-ETA-AAS en los Capítulos 1 y 2, se utilizó un $n=4$ y un valor de $k_d=3$ lo que trae aparejadas probabilidades del 11.5% para ambos errores^{§§}. Si hubiésemos aumentado el número de réplicas a 10 las probabilidades de error hubiesen disminuido al 8.4%. Veremos mas adelante como varían estos límites de detección para cualquier valor del error, inclusive si α es distinto de β .

El límite de cuantificación se define como la concentración que podemos determinar con una desviación estándar relativa aceptable. Si deseamos una RSD% del 5%, debemos usar un valor de $k_q=20$, puesto que $RSD\% = \frac{1}{k_q}$. La definición de la

IUPAC utiliza una RSD% del 10%.

En cualquier caso, los significados y utilidad de los límites aquí definidos es distinta. El Límite de Decisión es el nivel de concentración al cuál uno decidirá *a posteriori*, si el analito ha sido o no detectado. El Límite de Detección es el mínimo nivel al cuál se puede confiar que *a priori* el analito puede ser detectado. El Límite de Cuantificación es el nivel al cuál se puede obtener una determinación cuantitativa satisfactoria (con una buena RSD%).

3.6.3 Determinación de los límites de detección a través de la curva de calibrado.

Hasta ahora nos hemos ocupado de la incertidumbre de las señales pero, para transformarlas en valores de concentración, es necesario utilizar la ecuación de la curva de calibrado. La curva de calibrado también se determina experimentalmente y por lo tanto está sujeta a distintas fuentes de error como por ejemplo, la preparación de los estándares de calibrado, el lavado del material, etc.

^{††} Esto vale si $\alpha=\beta$.

^{§§} Un valor de $k_d=3$ es una práctica estándar y en este caso implica un valor de $t_{0.115,3}=1.5$

La definición de la IUPAC ignora el error en el calibrado. Simplemente se calcula el LOD interpolando el valor de la señal de detección (y_d) en la curva de calibrado, obteniéndose la concentración equivalente al Límite de Detección (Figura 3.5, x_d).

Una alternativa que tiene en cuenta la incertidumbre en los parámetros de ajuste de la recta de regresión es utilizar las hipérbolas de confianza de la regresión, tomando la peor situación posible (Figura 3.5, x_d). Una solución intermedia entre esta situación pesimista y la que acepta un error del tipo II del 50% (límite de decisión) es la que presentaremos aquí. Aplicaremos luego, las ecuaciones descriptas al sistema de preconcentración FI-ETA-AAS.

¿Cómo se calcula el límite de detección teniendo en cuenta la incerteza del calibrado?

La primera etapa del calibrado consiste en una regresión lineal mediante cuadrados mínimos entre la señal de absorbancia (y) y la concentración de iones en la fase acuosa (x). De este ajuste se obtienen los estimadores de los parámetros de la recta de regresión: el estimador “ b_1 ” de la pendiente verídica (β_1) y el estimador “ b_0 ” de la ordenada al origen verídica (β_0) tal que:

$$y = b_0 + b_1 \cdot x + \varepsilon$$

Donde ε es un error aleatorio con media cero y desviación estándar uno.

Una vez hecha la regresión, es posible derivar intervalos de confianza para las futuras señales, puesto que ya contamos con una distribución de probabilidad para la señal a cualquier concentración. Con esta distribución, obtenemos expresiones para la esperanza y la varianza de una señal:

$$E(\hat{y}) = b_0 + b_1 \cdot x$$

$$Var(\hat{y}) = w_x^2 \cdot s_e^2$$

Las variables s_e y w_x tienen el siguiente significado:

$$w_x^2 = \frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(x - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}$$

Donde n es el número de patrones de calibrado y N es el número de réplicas que realizamos de cada muestra. En algunos libros de texto³²² al valor s_e se lo llama $s_{x/y}$. Esta desviación estándar es la desviación estándar de las medidas de absorbancia. Esta desviación estándar mide la bondad del ajuste de los valores experimentales (de absorbancia) a los valores predichos por la curva de calibrado.

El intervalo de confianza para cualquier señal de absorbancia y_0 predicha por la curva de calibrado, viene dado por las hipérbolas de predicción (Figura 3.5) con probabilidad α para la hipérbola superior y probabilidad β para la hipérbola inferior:

$$y_0 = E(\hat{y}) + t_{\alpha, n-2} \cdot \sqrt{Var(\hat{y})} \text{ (hipérbola superior).}$$

$$y_0 = E(\hat{y}) - t_{\beta, n-2} \cdot \sqrt{Var(\hat{y})} \text{ (hipérbola inferior).}$$

En el caso especial de la señal del blanco ($x_0=0$), el intervalo superior para esta señal es la señal de decisión (o señal crítica, ver Figura 3.5). Si elegimos α , podemos calcular el valor de y_c . Una vez obtenido el valor de la señal correspondiente al límite de decisión, podemos calcular el LOD (x_d) para cualquier valor de β despejándolo de la expresión para la hipérbola inferior.

El LOD determinado de esta manera puede ser mejorado aumentando: la precisión de las medidas (disminuyendo s_e), el número de patrones (n) y el número de medidas realizadas para la muestra (N). Además, el valor de LOD es influido por el diseño de la curva de calibrado a través del denominador $(x_i - \bar{x})^2$ y la sensibilidad del método (b_1).

Es importante notar que la desviación estándar del calibrado (s_e) debe ser similar a la que sufrirán cada una de las muestras incógnita. Si el calibrado se realiza con patrones sencillos y la muestra sufre un tratamiento previo el límite de detección calculado puede no representar la realidad.

Las **curvas características de detección**³²³ consisten en un gráfico del LOD vs. β , repetido para distintos valores de N , es decir, del número de réplicas. Estas curvas permiten describir un método analítico en términos de su “capacidad de detección” y poseen la información necesaria para establecer la dependencia del LOD con parámetros tales como la probabilidad de falso negativo y el número de réplicas. Es posible calcular las curvas características de detección utilizando como definición del Límite de Detección la que se obtiene a partir de la curva de calibrado como hemos visto en esta sección. Analizaremos los Límites de Detección calculados

mediante este enfoque y los compararemos con los calculados según la definición de la IUPAC para el sistema de preconcentración FI-ETA-AAS presentado aquí.

3.7 Sensibilidad

En general, la sensibilidad se define como la pendiente de la curva de calibrado. En AAS la sensibilidad también se define como la concentración o masa de analito que produce una absorbancia de 0.004343, es decir, una absorción del 1%. La sensibilidad nos indica qué tan bien podemos distinguir entre dos concentraciones similares. Muchas veces, se dice coloquialmente que un método es “mas sensible” cuando se hace referencia, en rigor, a que el método tiene un menor Límite de Detección. La sensibilidad en si misma no es una de las figuras de mérito principales y tiene importancia cuando se la informa junto a alguna medida de la repetitividad de los datos ya que es mucho mas importante la relación señal-ruido que el valor absoluto de la señal.

La sensibilidad de un método puede depender fuertemente de la matriz en la que el analito se encuentra por lo que es necesario verificar este efecto previo al calibrado. Para saber cuál es la menor diferencia de concentraciones que podemos distinguir a través de una curva de calibrado (d), se ha propuesto la siguiente expresión que tiene en cuenta la relación entre la señal (b_1) y el ruido (repetitividad, “ s ”) ³¹²:

$$d = \frac{\sqrt{2} \cdot (t_{1-\alpha/2} + t_{1-\beta}) \cdot s}{b_1}$$

Para $n=10$ y $\alpha=\beta=0.05$, la ecuación anterior se transforma en:

$$d \cong \frac{6 \cdot s}{b_1}$$

En la zona del límite de detección, d es aproximadamente igual a 2 veces el LOD. Para el sistema de preconcentración (ver Capítulo 1), esto significa que no podemos distinguir una diferencia menor que aproximadamente 3 partes por trillón de Cd y 2 partes por trillón de Pb cuando operamos cerca del LOD.

3.8 Selectividad

Cuando otra sustancia presente en la muestra tiene un efecto sobre la señal que no fue tenido en cuenta en la etapa de desarrollo del método, se producen errores sistemáticos con pérdida de exactitud, es decir, resultados sesgados. No hay mucho

consenso sobre el uso de la palabra “selectivo” y principalmente se usa la palabra “específico” para describir la capacidad de un método para lidiar con potenciales interferencias. La estadística no ayuda mucho en el momento de decidir sobre la especificidad de un método analítico, aunque queda claro que las interferencias pueden producir errores sistemáticos relativos (cambio de la pendiente de la curva de calibrado) y errores sistemáticos absolutos (interferencias de ordenada al origen).

La selectividad del método debe probarse en presencia de distintas matrices y si es posible, utilizando patrones certificados. En el caso del análisis de agua de mar es común encontrar interferencias multiplicativas (disminuyen la señal en un porcentaje relativo y se manifiestan en un cambio de pendiente) y aditivas (en general por fondo espectral). En el proceso de preconcentración, podemos buscar dos situaciones: una situación donde el soporte se muestre selectivo sólo para el ion de interés o una situación donde el soporte se muestre selectivo para un grupo de iones mientras que otros iones son desechados (metales pesados vs. metales alcalino-térreos). El primer caso es el mas difícil puesto que involucra un extractante altamente específico o un extractante medianamente específico operado en la zona de selectividad (saturación). El segundo caso es mas fácil de obtener puesto que se basa en la diferencia de afinidades de “grupos” de metales. Ya hemos probado la selectividad del método en los capítulos anteriores, tanto de la etapa de preconcentración, como de la etapa de detección, por lo que contamos con un método que produce señales totalmente específicas para la determinación de distintos metales pesados.

En sistemas poco selectivos, es necesario reformular los conceptos para todas las figuras de mérito antes descriptas, puesto que es necesario calibrar con algoritmos multivariantes en vez de algoritmos univariantes. Esta extensión de las figuras de mérito es un área candente en Química Analítica e inclusive ha catalizado la Teoría conceptual de la Química Analítica Moderna³²⁴.

3.9 Resultados y Discusión

3.9.1 Análisis de la repetitividad del sistema.

Si operamos dentro del ámbito lineal del instrumento, la señal de absorbancia medida en un instrumento de atomización electrotérmica es dependiente de la masa de analito inyectada dentro del atomizador y de la sensibilidad específica del elemento de interés, que depende a su vez de la matriz que lo acompaña:

$$A_{\text{muestra}} = m_{\text{muestra}} \cdot \chi$$

Donde el subíndice denota que se trata de una muestra incógnita. La sensibilidad específica se mide inyectando un volumen conocido de un patrón de calibrado (*std*) y en este caso la expresamos en unidades de absorbancia/masa:

$$\chi = \frac{A_{std}}{m_{std}}$$

Reemplazando en la primer ecuación obtenemos:

$$m_{muestra} = \frac{A_{muestra}}{A_{std}} \cdot m_{std}$$

Esta simple aproximación no tiene en cuenta la contribución del blanco de reactivos y supone una calibración con un solo punto, pero es útil para analizar la contribución de los distintos factores experimentales a la precisión total. La varianza de la masa de muestra es la suma de las varianzas de la señal de la muestra, de la señal del patrón de calibrado y de la masa del analito preconcentrada e inyectada. Si normalizamos la desviación estándar respecto del valor medido obtenemos la RSD% para cada uno de los parámetros experimentales. La propagación de errores en términos de RSD% es equivalente a la propagación de varianzas³²², por lo que la desviación estándar relativa para la masa de analito en la muestra puede calcularse como:

$$\left(\frac{s_{m_{muestra}}}{m_{muestra}} \right)^2 = \left(\frac{s_{A_{muestra}}}{A_{muestra}} \right)^2 + \left(\frac{s_{A_{std}}}{A_{std}} \right)^2 + \left(\frac{s_{m_{std}}}{m_{std}} \right)^2$$

Lo que significa, traducido a RSD%:

$$RSD_{m_{muestra}}^2 = RSD_{A_{muestra}}^2 + RSD_{A_{std}}^2 + RSD_{m_{std}}^2 \quad (1)$$

O sea, que la incertidumbre que podemos esperar para la determinación de un analito depende no sólo de la señal obtenida para el analito, sino también de la incertidumbre asociada a la masa de analito inyectada como patrón y a la señal de este patrón. Dentro de la RSD% para las señales, agrupamos todos los procesos que ocurren en ausencia de preconcentración, esto es, la imprecisión en el volumen de la jeringa de inyección, en el proceso de calentamiento y en el de atomización. Esta desviación estándar relativa para la determinación de Cd por horno de grafito en

condiciones normales es del 4%; (usando una matriz similar al eluyente de la columna de preconcentración). En condiciones óptimas, la RSD% de las medidas de absorbancia pueden llegar a tener una precisión del 2%.

Sin embargo, cuando la masa de analito inyectado proviene de un proceso de preconcentración, existen fuentes de variabilidad adicionales que no se encuentran en el análisis tradicional. La masa de analito retenida es función del volumen de muestra preconcentrado y por lo tanto, su repetitividad depende de la repetitividad del flujo de la bomba peristáltica, de la repetitividad del control de tiempo y de la velocidad de conmutación de las válvulas solenoides. Ahora necesitamos saber si la etapa FIA de preconcentración aporta una imprecisión significativa al proceso global.

Como ya hemos dicho en el Capítulo 1, la determinación de Cd se realiza restando a las señales obtenidas la señal del blanco, por lo que debemos contemplar esta situación al momento de hablar de precisión. En tal caso, la señal obtenida para una muestra desconocida es función no sólo de la masa de analito que existe en la muestra, sino también de la masa de analito presente en el blanco de reactivos:

$$A_{muestra} = (m_{muestra} + m_{bco}) \cdot \chi$$

Realizando los mismos reemplazos hechos anteriormente, se llega a la siguiente expresión para la precisión en la determinación de Cd en una muestra incógnita:

$$RSD_{m_{muestra}}^2 = RSD_{A_{muestra}}^2 + RSD_{A_{std}}^2 + RSD_{m_{std}}^2 + RSD_{m_{bco}}^2 \cdot \left(\frac{m_{bco}}{m_{muestra}} \right)^2 \quad (2)$$

En este caso se agrega un nuevo término que contiene la desviación estándar de la masa de analito en el blanco de reactivos, ponderado por la relación de masas en el blanco y en la muestra. Esto quiere decir que cuanto menor sea la masa de analito en el blanco con respecto a la de la muestra, mejor será la precisión obtenida. Los resultados se muestran en las Tablas 3.1 y 3.2.

Hemos visto en el Capítulo anterior que la repetitividad global del sistema es de un 5.5% para la preconcentración sobre I-HOx y de un 5.0% para Chelex-100. Remplazando los valores de la RSD% del flujo de muestra en la ecuación 1 y usando como $RSD_{A_{muestra}} = RSD_{A_{std}} = 4\%$ obtenemos un valor de $RSD_{m_{muestra}}$ que es equivalente a la precisión total del método.

La imprecisión del blanco es levemente superior a la de la muestra, probablemente debido a que involucra un mayor cambio en la posición de las válvulas. Sin embargo,

para niveles de concentración típicos encontrados en el calibrado (100 ppt Cd) esta ecuación produce resultados similares a la Ecuación 1 puesto que el factor $\left(\frac{m_{bco}}{m_{muestra}}\right)^2$ vale 0.04. Para valores de concentración cercanos al LOD, la precisión empeora levemente y la RSD% total tiene un valor aproximado del 6% para Chelex-100 y del 5.7% para I-HOx. Los resultados muestran que la desviación estándar relativa es aproximadamente constante en todo el ámbito de concentraciones, como es esperable para un analizador (ETA-AAS) con un ámbito lineal pequeño. La desviación estándar obtenida para el blanco de reactivos en el Capítulo 1 es del 3% aproximadamente, sin embargo, este valor es obtenible en condiciones óptimas, tanto de pureza de reactivos, como de performance del espectrómetro y debe ser considerado como el mejor posible. Una precisión de aproximadamente el 5% es mas realista y se corresponde con la performance normal de trabajo.

Considerando que la mejor precisión obtenible para el análisis directo puede estar entre el 2% y el 4%, vemos que el proceso de preconcentración *no aporta significativamente* imprecisión ya que la precisión del método está dada por la del ciclo de atomización. Los resultados muestran además que el tiempo de preconcentración no es una variable que contribuya significativamente³²⁵ a la precisión ($n=4$, Test $F_{0.05(2),3,3}$)^{***}.

3.9.2 Curvas características de detección: cálculo de límites de detección para distintos valores de probabilidad de error del tipo I y II. (α y β)

En la Figura 3.6 se muestran las curvas características de detección para la preconcentración sobre I-HOx considerando un valor de α de 0.05.

Para calcular estas curvas es necesario utilizar la desviación estándar de las señales de calibrado (s_e). Los límites de detección se calculan para distintos números de repeticiones de las determinaciones (1, 2, 3, 4, 5 e infinitas). En la Figura 3.6 podemos observar que para $N=3$ y $\beta=0.05$ el método tiene un LOD igual a 18 ppt de Cd. Este valor se calcula utilizando como estimador de la dispersión de los datos a la desviación estándar de todos los patrones de calibrado (s_e). Si disminuimos el número de replicas ($N=1$) manteniendo constante β (línea punteada, Figura 3.6), el LOD

aumenta hasta un valor de 26 ppt de Cd. Este valor es uno de los peores obtenibles ya que proviene de la situación mas “conservadora” correspondiente a una sola réplica y a una probabilidad de falso negativo menor que el 0.0005%.

Es interesante la comparación entre los límites de detección calculados mediante la definición de la IUPAC y los calculados mediante el uso de las hipérbolas de confianza del calibrado (Tabla 3.3). La comparación entre los límites de detección calculados de distintas maneras se muestra en la Tabla 3.3. En esta tabla se muestran por comparación los límites IUPAC calculados en condiciones óptimas de repetitividad del blanco ($RSD\%=2\%$) y en condiciones normales ($RSD\%=5.5\%$)

De los resultados mostrados en esta tabla, podemos sacar algunas conclusiones:

- Los límites de detección calculados con las hipérbolas de confianza y probabilidades idénticas α y β , son un orden mayor que los calculados según la definición IUPAC. Esto se debe a que los límites de detección calculados según la definición de la IUPAC (Límites “ 3σ ”) utilizan sólo la desviación estándar del blanco mientras que los calculados mediante las hipérbolas de confianza de la recta de regresión incluyen la variación en **todos** los patrones de calibrado y no solamente el blanco, lo que empeora la precisión.
- Los límites “ 3σ ” son similares a los calculados con las hipérbolas de confianza utilizando como s_x la desviación estándar del blanco y una sola repetición. Si aumentamos el número de repeticiones (N), el LOD disminuye de 1 ppt a 0.5 ppt para una $RSD\%$ del 2% y de 3 a 2 ppt para una $RSD\%$ del 5.5%.
- Para obtener un menor error (5%) se pueden lograr los mismos límites de detección aumentando el número de repeticiones.

Podemos concluir que un límite de detección de 3 ppt de Cd parece un valor acertado, puesto que involucra una desviación estándar razonable y sólo una repetición. Límites mayores, si bien nos dan un margen de seguridad mayor, no representan la detectabilidad del método. Similares resultados se obtuvieron para el sistema que utiliza Chelex-100 como relleno de columna.

3.9.3 Influencia del tiempo de preconcentración en el LOD y el Ambito Lineal de calibrado.

Hemos visto en el Capítulo 1 que existen dos clases de sistemas de preconcentración ^{138, 187}: los sistemas basados en volumen y los basados en tiempo (“volume-based” y “time-based”).

Los sistemas basados en volumen inyectan en la microcolumna un volumen fijo de muestra a través de un tramo de tubería calibrado y fijo que se conecta en una válvula rotatoria de 6 vías (tipo Rheodyne). En el caso de analizar muestras desconocidas con ámbitos de concentración muy variables, este sistema es muy poco flexible puesto que para variar la cantidad de muestra que se preconcentra es necesario cambiar el “lazo” de la válvula inyectora y por lo tanto desarmar el sistema de flujo con una alta probabilidad de contaminación.

Los sistemas basados en tiempo permiten variar de manera continua el volumen de muestra que atraviesa la columna usando temporizadores electrónicos que controlan la conmutación de válvulas en el sistema de preconcentración. En este caso la reproducibilidad del sistema de flujo viene dada por el mayor o menor desgaste de las mangueras de la bomba peristáltica y su repetitividad viene dada por la confiabilidad del sistema de conmutación y de las válvulas solenoides. Como vimos en la primera sección, el sistema de flujo es lo suficientemente repetitivo como para no contribuir a la imprecisión total. Una característica interesante de los sistemas basados en temporizadores es que son altamente flexibles, permitiendo obtener altas o bajas señales cambiando el volumen de muestra preconcentrado adaptando la concentración al ámbito lineal del calibrado.

Los límites de detección se calculan a partir del valor del blanco para distintos tiempos de preconcentración según los métodos antes descriptos. También es posible calcularlos “a priori”, si conocemos las contribuciones del eluyente y del buffer de preconcentración al blanco de reactivos. Para ello necesitamos deducir una expresión que vincule al blanco de reactivos con las variables de flujo y las concentraciones de analito en cada reactivo. Los detalles de la deducción de esta expresión se dan en el Apéndice junto al significado de cada variable y las aproximaciones realizadas (Ecuación 12):

$$LOD = \frac{0,15 \cdot [(t_0 + t_p + t_l) \phi_{buffer} \cdot E\% \cdot c_{buffer} + V_e \cdot c_{eluyente}]}{t_p \cdot \phi_{muestra} \cdot E\%}$$

Esta expresión es útil para analizar cualitativamente las precauciones a tener en cuenta al diseñar un sistema de preconcentración para optimizar el LOD :

- El ácido usado para elución debe ser lo mas puro posible ($c_{eluyente}$ pequeño)

- El volumen de elución (V_e) debe ser el mínimo compatible con la elución total de la microcolumna.
- Los tiempos de preacondicionamiento de la microcolumna y de lavado (t_0 y t_l) deben ser los mínimos compatibles con una preconcentración y separación eficiente.
- El buffer de preconcentración debe ser de altísima pureza (c_{buffer} baja) . Este es uno de los puntos clave del sistema. La purificación del buffer de preconcentración puede hacerse “on-line” y “off-line”¹²⁷.
- La relación de flujos entre la muestra y el buffer ($\phi_{muestra} / \phi_{buffer}$) debe ser alta, sin perjudicar el ajuste de pH.
- Los tiempos de preconcentración (t_p) serán lo suficientemente largos como para alcanzar la sensibilidad deseada pero no tanto como para disminuir el ámbito lineal.

Desde el punto de vista cuantitativo, los límites de detección calculados “a priori” en función del tiempo de preconcentración se ajustan bien a los valores obtenidos directamente a través de las curvas de calibrado, por lo que podemos concluir que la Ecuación 12 responde correctamente a los límites de detección experimentales. La Figura 3.7 muestra los límites de detección calculados “a priori” en función del tiempo de preconcentración junto al intervalo lineal de calibrado. Vemos que mediante la modificación del tiempo de preconcentración podemos variar la sensibilidad deseada de manera de adecuar los límites de detección y el ámbito lineal al juego de muestras analizadas. Una característica única del sistema FIA-ETA-AAS (controlado por tiempo y no por volumen) es que permite variar de manera **continua** los límites de detección y el ámbito lineal. Los sistemas controlados por volumen no flexibilizan de esta manera las figuras de mérito.

Debemos destacar que el tiempo de preconcentración afecta mucho mas pronunciadamente al ámbito lineal que al LOD. Por ejemplo, aumentando el tiempo de preconcentración de 60 s a 90 s, el LOD casi no varía (puesto que aumenta el blanco pero también aumenta la sensibilidad) pero el límite superior de la curva de calibrado pasa de 140 ppt de Cd a 90 ppt de Cd.

3.9.4 Frecuencia de análisis

La frecuencia de análisis es inversamente proporcional al tiempo que demanda un ciclo de extracción/elución y no es influenciado por el tiempo que demanda el programa de calentamiento, que se hace en paralelo y es de menor duración que la preconcentración. Si el programa del horno es mas largo que el ciclo de preconcentración, la frecuencia de análisis estará dada por su duración, pero este no es el caso en el procedimiento propuesto. El tiempo que se invierte en un ciclo de extracción se compone de los tiempos invertidos en las siguientes etapas del análisis: el enjuague del sistema, el acondicionamiento de la columna, la preconcentración, el lavado de la columna, el enjuague de la jeringa del autosamplador, la aspiración del eluyente y la inyección del eluyente. Si el ciclo de extracción es mas largo que el programa de calentamiento, podemos realizar simultáneamente las operaciones de preconcentración y de atomización, por lo que el ciclo de atomización no disminuye la frecuencia de análisis. Esto es válido para cualquier tiempo de preconcentración si los flujos no son modificados (puesto que el mínimo tiempo que demora un ciclo de extracción es de 126 segundos y el programa de calentamiento demora 96 segundos). En la Figura 3.7 vemos que un aumento en el tiempo de preconcentración produce una mejora en la sensibilidad y en el Límite de Detección, pero un empobrecimiento de la frecuencia de análisis, lo que obliga a seleccionarlos como resultado de una situación de compromiso que involucra el sacrificio de uno u otro según el caso.

TABLAS DEL CAPITULO 3:

RSD% para el volumen del Buffer de preconcentración (blanco de reactivos)		
Tiempo de preconcentración (s)	Flujo (ml min ⁻¹)	
	1.21	0.78
60	2.3%	0.9%
120	2.2%	0.6%

Tabla 3.1: Precisión volumétrica del blanco de reactivos.

RSD% para el volumen de muestra preconcentrado		
Tiempo de preconcentración (s)	Flujo (ml min ⁻¹)	
	5.09	1.40
60	0.4%	0.7%
120	0.2%	0.1%

Tabla 3.2: Precisión del volumen de muestra preconcentrado.

Medida de la Repetitividad utilizada	LOD (ng l⁻¹ Cd)	Probabilidad de falso positivo.	Probabilidad de falso negativo.	Forma de Cálculo
Repetitividad del calibrado (s_e)	18	11.5%	11.5%	Hipérbolas de confianza del calibrado (N=1)
Repetitividad del calibrado (s_e)	12	11.5%	11.5%	Hipérbolas de confianza del calibrado (N=3)
RSD% del blanco: 2% (n=4)	1	11.5%	11.5%	Cálculo según IUPAC (Ver Tabla 2.9)
RSD% del blanco: 5.5% (n=4)	3	11.5%	11.5%	Cálculo según IUPAC
RSD% del blanco: 2%	1	11.5%	11.5%	Hipérbolas de confianza del calibrado (N=1)
RSD% del blanco: 2%	0.5	11.5%	11.5%	Hipérbolas de confianza del calibrado (N=3)
RSD% del blanco: 5.5%	3	11.5%	11.5%	Hipérbolas de confianza del calibrado (N=1)
RSD% del blanco: 5.5%	2	11.5%	11.5%	Hipérbolas de confianza del calibrado (N=3)
Repetitividad del calibrado (s_e)	18	5%	5%	Hipérbolas de confianza del calibrado (N=3)
Repetitividad del blanco (s_e)	1	5%	5%	Hipérbolas de confianza del calibrado (N=3)

Tabla 3.3: Distintos límites de detección para la preconcentración de Cd sobre I-HOx.

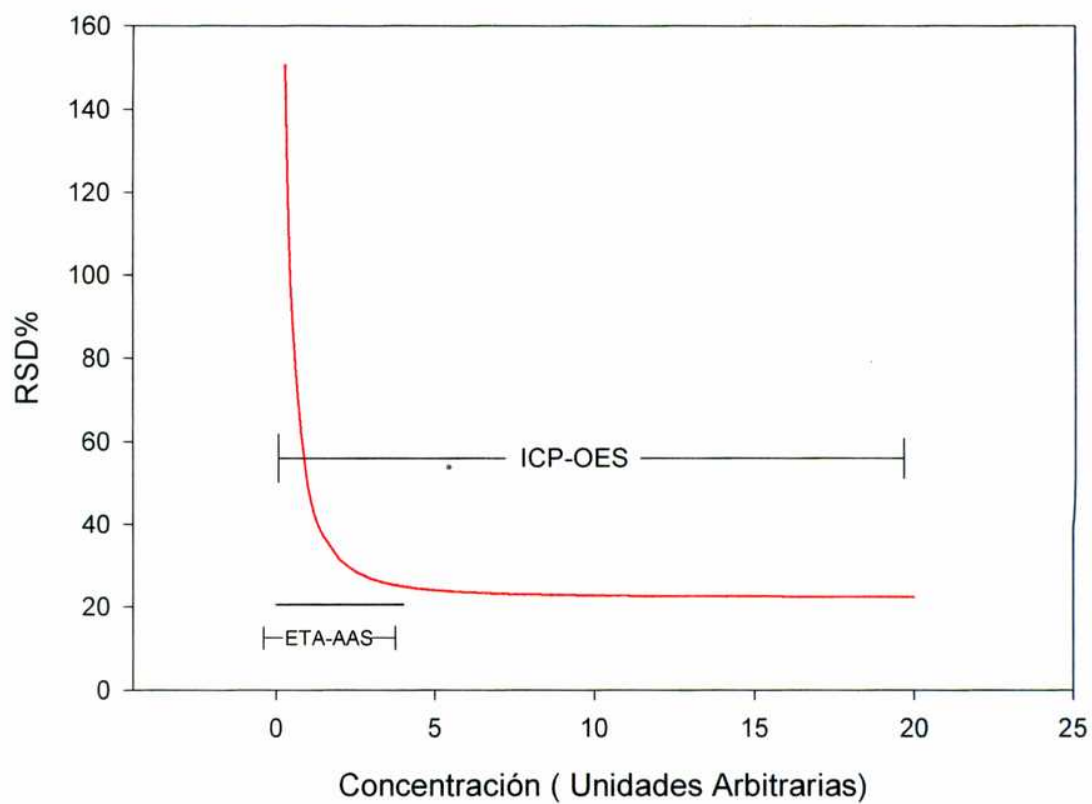


Figura 3.1: Variación de la desviación estándar y la desviación estándar relativa en instrumentos de distinto ámbito dinámico lineal.

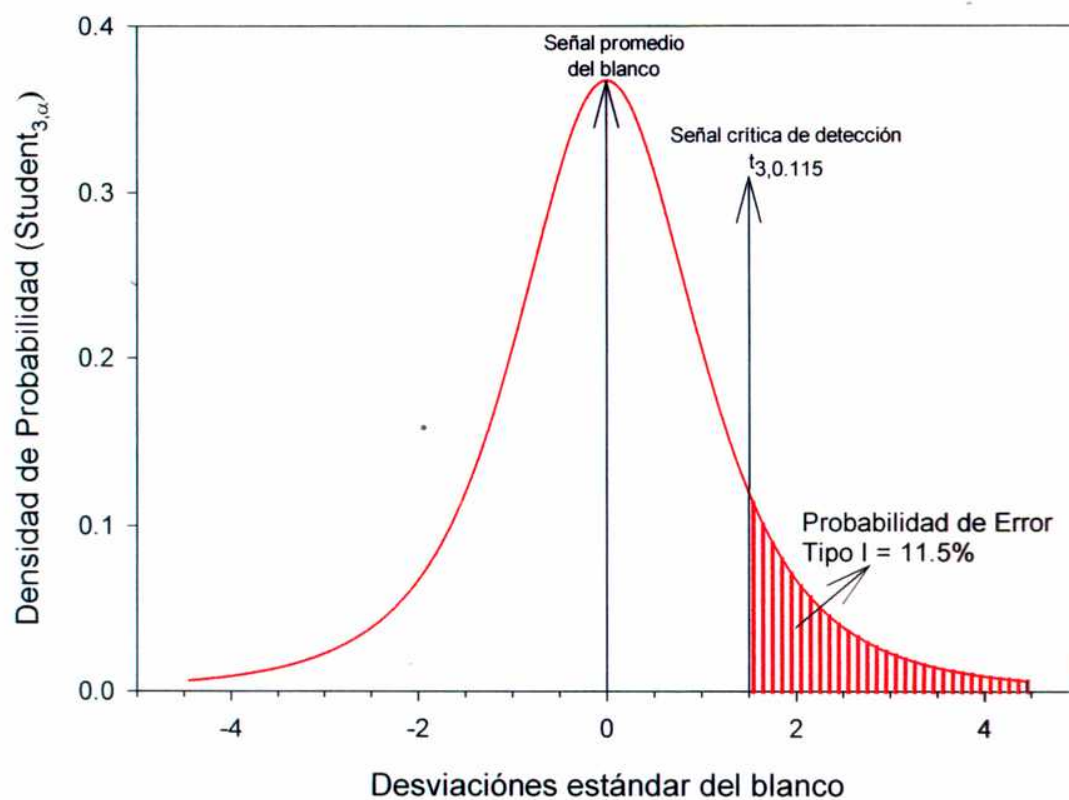


Figura 3.2: Distribución de probabilidad de la señal del blanco de reactivos y probabilidad de falso positivo (α).

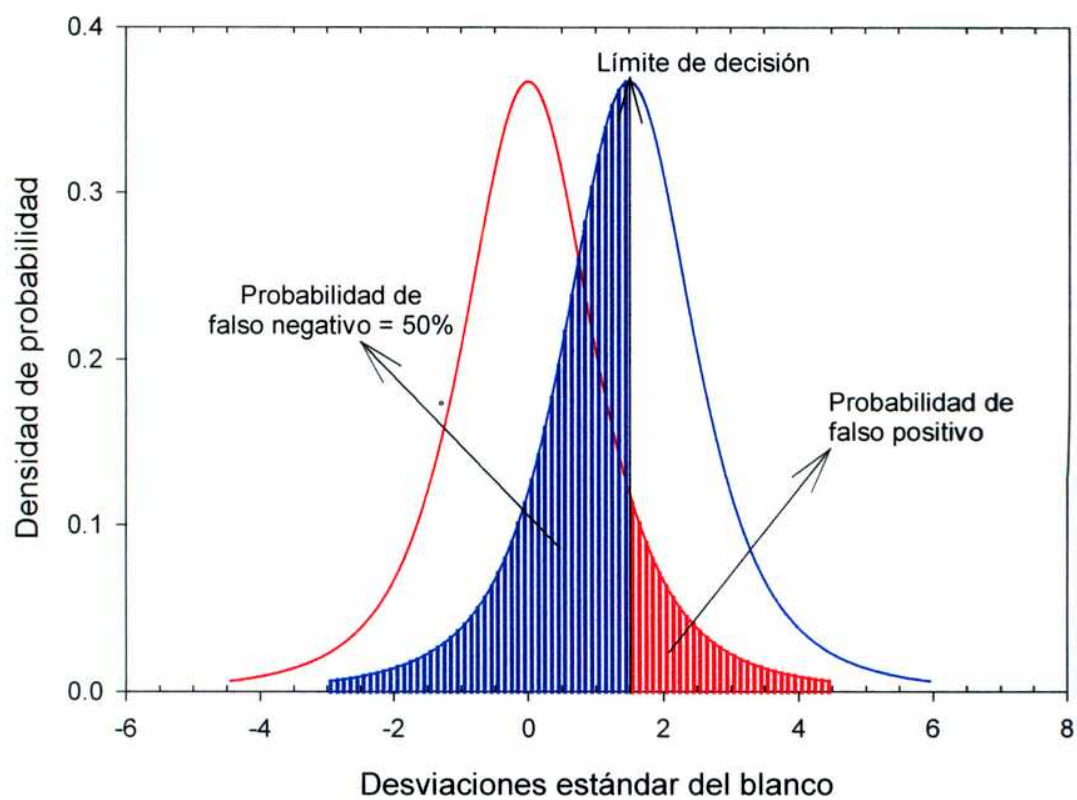


Figura 3.3: Probabilidad de falso negativo según la definición de Límite de Decisión de la IUPAC.

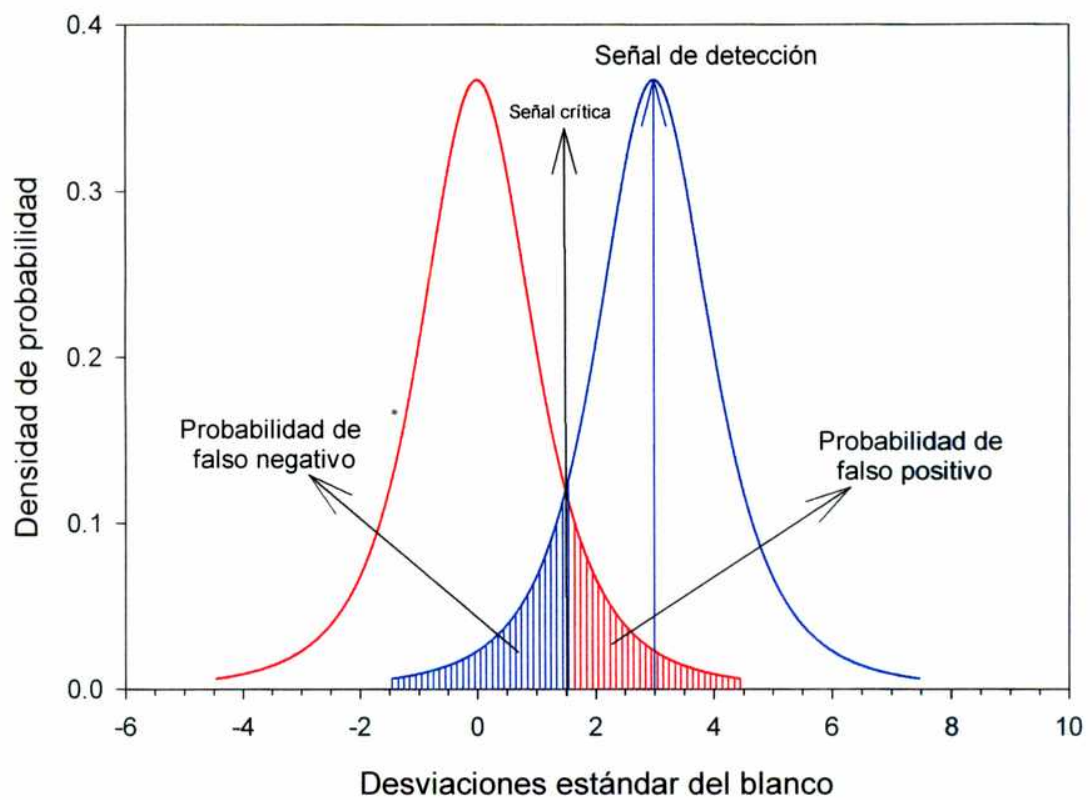


Figura 3.4: Probabilidades de falso positivo y falso negativo para el Límite de Detección.

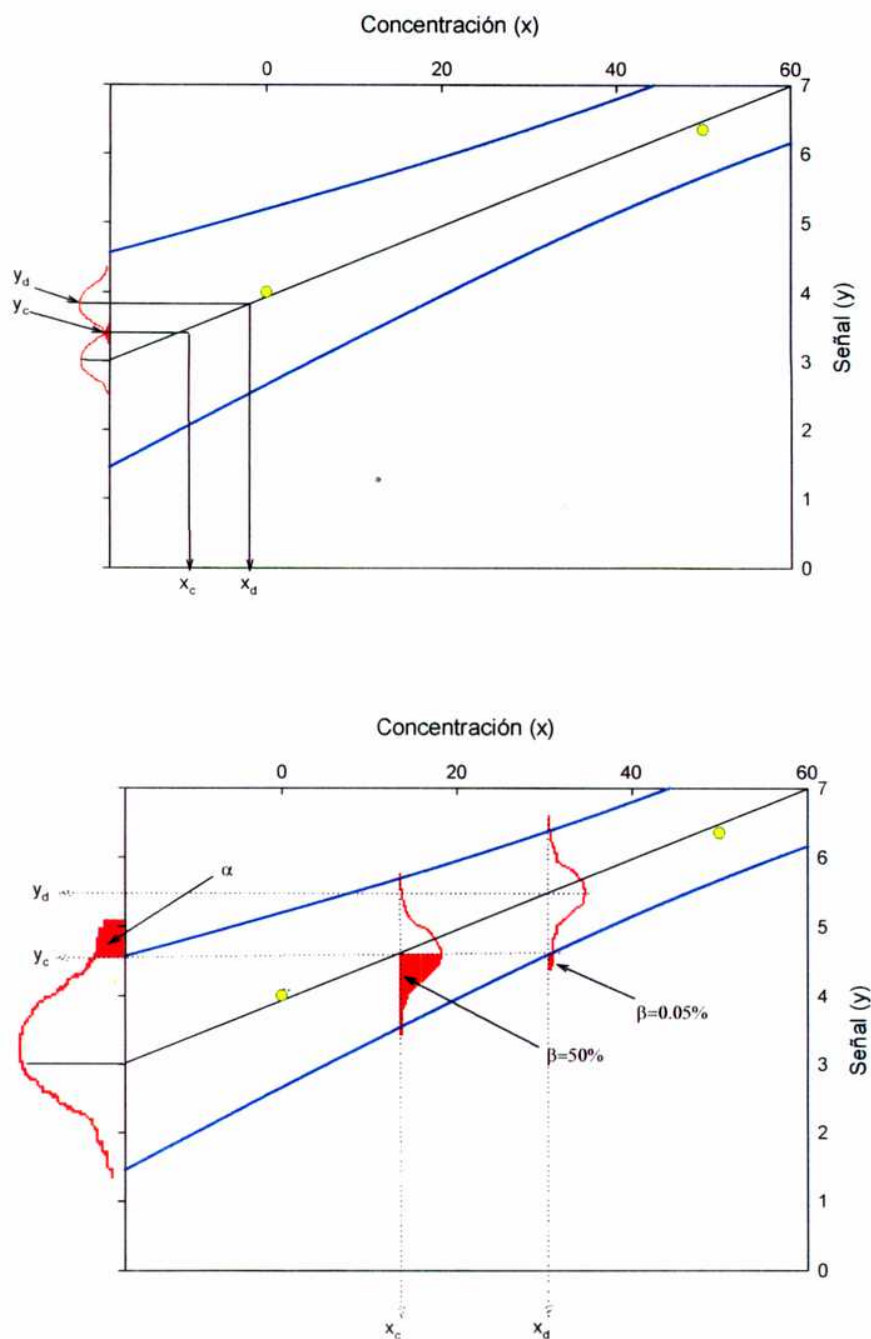


Figura 3.5: Cálculo del Límite de Detección a partir de la señal de detección (y_d). El gráfico superior muestra la forma de cálculo propuesta por la IUPAC. La figura inferior esquematiza el cálculo del LOD utilizando las hipérbolas de confianza de la curva de calibrado.

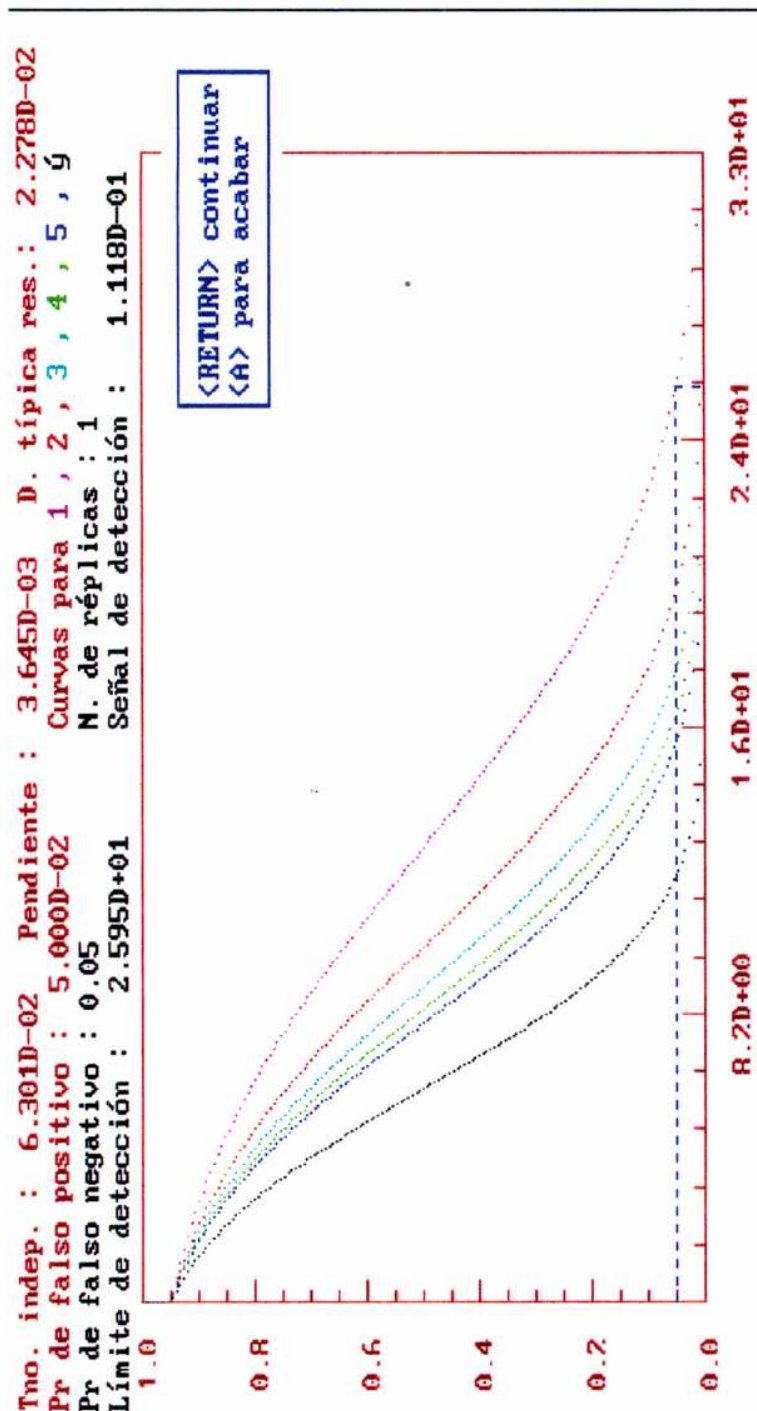


Figura 3.6: Curvas características de detección usando como desviación estándar la desviación estándar del calibrado (s_e).

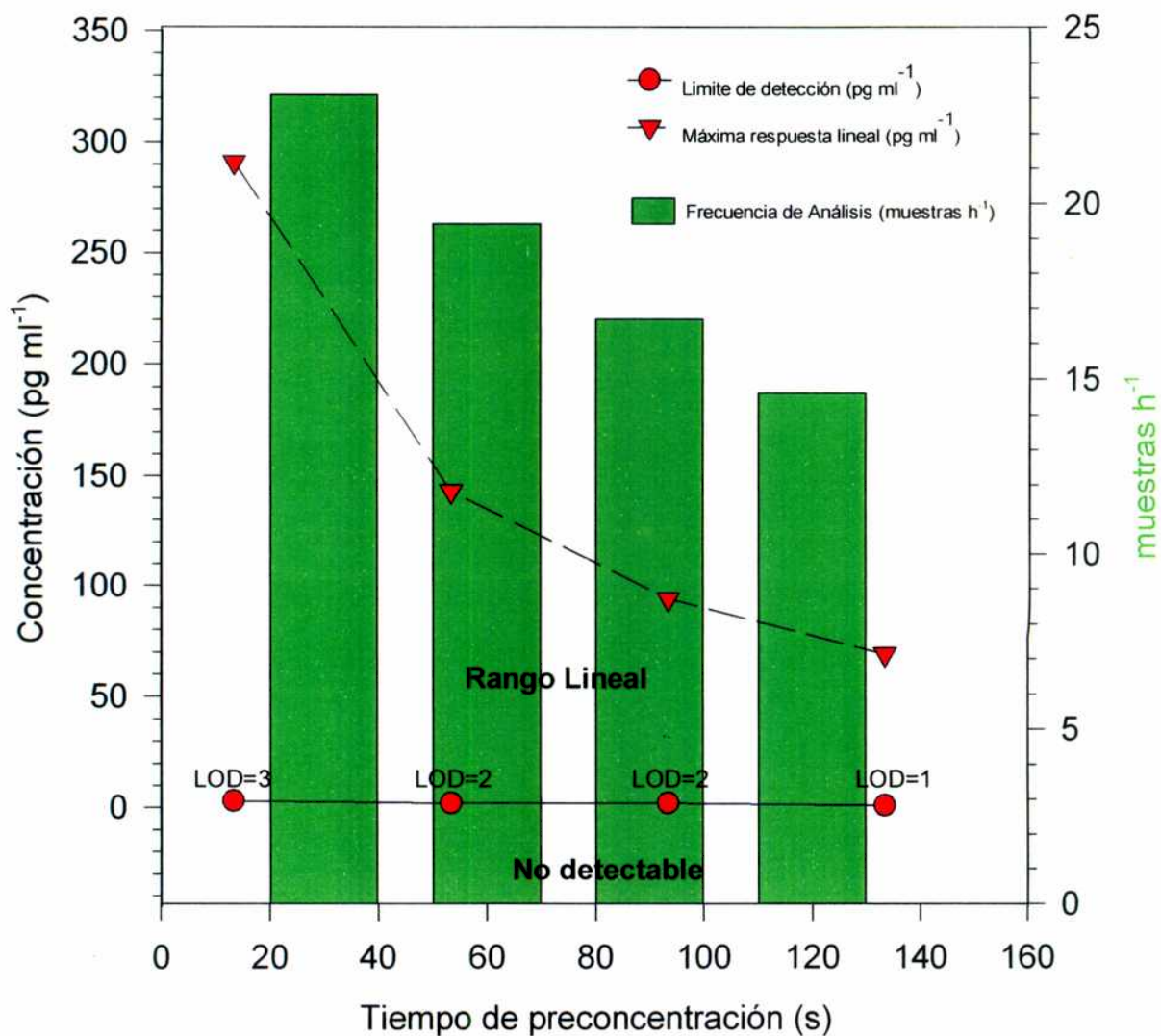


Figura 3.7: Límite de detección, ámbito lineal y frecuencia de análisis para distintos tiempos de preconcentración en el sistema FI-ETA-AAS usando Chelex-100 como soporte.

3.10 Apéndice: Cálculo del LOD para distintos tiempos de preconcentración:

La manera de calibrar un espectrómetro de absorción atómica es mediante la regresión de la concentración de la muestra sobre la señal obtenida, construyendo una función lineal mediante regresión por cuadrados mínimos:

$$A = b.c + A_{bco} \quad (3)$$

Donde A es la absorbancia pico, b es la sensibilidad experimental expresada en AU. ml pg⁻¹, c es la concentración del analito en la muestra o en el standard (en pg ml⁻¹) y A_{bco} es la señal producida por el blanco de reactivos. Siguiendo la definición de la IUPAC vista anteriormente el límite de detección (LOD) se calcula como:

$$LOD = \frac{3.s_{bco,abs}}{b} \quad (4)$$

Para vincular el LOD con el tiempo de preconcentración debemos expresar la sensibilidad y la desviación estándar del blanco en función de variables del sistema de flujo.

Las señales en Absorción Atómica con Horno de Grafito (ETA-AAS) son dependientes de la masa de analito inyectada dentro del atomizador y no de la concentración del analito en la muestra, puesto que el solvente es evaporado en el ciclo de calcinación previo a la atomización. Si el volumen de inyección es constante, la señal se relaciona directamente con la concentración (c). La señal obtenida para una muestra dada es:

$$A_{muestra} = m_{muestra} \cdot \chi \quad (5)$$

Donde $A_{muestra}$ es la señal obtenida para una muestra desconocida que contiene $m_{muestra}$ picogramos de analito y χ la sensibilidad específica en unidades de señal por picogramo de analito (ver sección anterior).

En sistemas de preconcentración acoplados a ETA-AAS, la masa de analito introducida en el horno es la masa de analito retenida en la microcolumna de separación, corregida por la eficiencia del proceso de transferencia de masa.

Siempre que operemos el sistema de flujo en condiciones de no saturación de la resina quelante, la masa retenida es función lineal del volumen de muestra y por lo tanto, del tiempo de preconcentración:

$$m_{muestra} = t_p \cdot \phi_m \cdot E\% \cdot c_{muestra} \quad (6)$$

Donde t_p es el tiempo de preconcentración, ϕ_m es el flujo de muestra, $E\%$ es la eficiencia de preconcentración (0.71) y $c_{muestra}$ es la concentración de analito en la muestra (pg ml^{-1}).

La pendiente de la curva de calibrado (sensibilidad) también es función del tiempo de preconcentración :

$$b = t_p \cdot \phi_s \cdot E\% \cdot \chi \quad (7)$$

La desviación estándar de la señal del blanco se obtiene como :

$$3 \cdot s_{bco,abs} = 3 \cdot s_{bco,masa} \cdot \chi \quad (8)$$

Asumiendo un valor constante de la repetitividad (RSD%) del 5% en el rango de señales usadas en la práctica, $s_{bco,masa}$ se puede calcular como :

$$3 \cdot s_{bco,masa} = 3 \cdot (0,05) \cdot m_{bco} \quad (9)$$

La masa de analito en el blanco de reactivos es una suma de dos contribuciones: la del buffer de preconcentración y la del ácido eluyente. La contribución del buffer de preconcentración depende del tiempo que se lo hace circular a través de las distintas etapas de la secuencia de operación del sistema de flujo: el tiempo de pre-acondicionamiento de la columna (t_0), el tiempo de preconcentración (t_p), y el tiempo de lavado (t_l). La contribución del eluyente ($bco_{elución,masa}$) es fija, puesto que el volumen es constante. Podemos explicitar estas contribuciones para la masa del blanco de la siguiente manera:

$$m_{bco} = \left[\sum_i t_i \cdot \phi_i \cdot E\% \cdot c_i + bco_{elución,masa} \right] \quad (10)$$

Donde :

$$bco_{elución,masa} = V_e \cdot c_{eluyente}$$

Reemplazando m_{bco} en (9) y $3 \cdot s_{bco,masa}$ en (8), obtenemos :

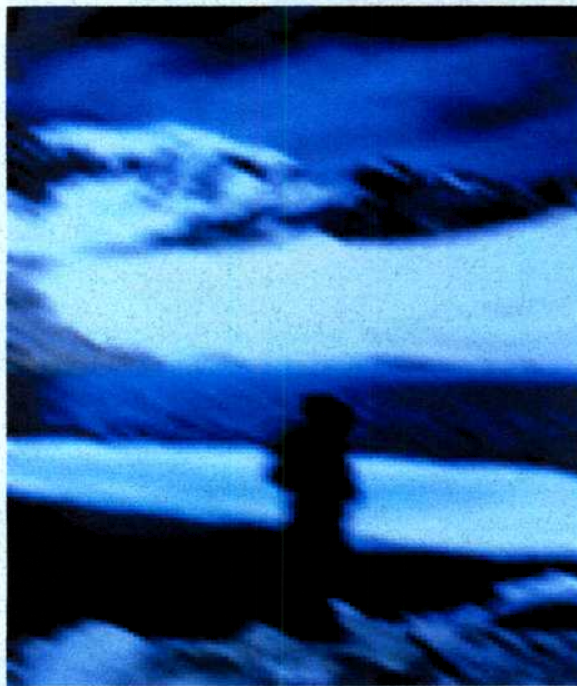
$$3 \cdot s_{bco,abs} = 0,15 \cdot \left[\sum_i t_i \cdot \phi_i \cdot E\% \cdot c_i + V_e \cdot c_{eluyente} \right] \cdot \chi \quad (11)$$

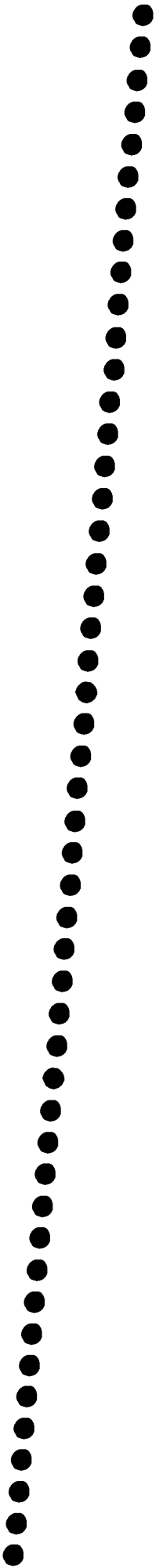
Reemplazando (11) y (7) en (4) obtenemos la ecuación deseada :

$$LOD = \frac{0,15 \cdot [(t_0 + t_p + t_l) \phi_{buffer} \cdot E\% \cdot c_{buffer} + V_e \cdot c_{eluyente}]}{t_p \cdot \phi_{muestra} \cdot E\%} \quad (12)$$

Donde ϕ_{buffer} es el flujo de buffer de preconcentración, y c_{buffer} es la concentración de analito en el buffer.

CAPITULO 4





Quería movimiento, no una existencia sosegada, Quería emoción y peligro, así como la oportunidad de sacrificarme por amor. Me sentía henchido de tanta energía que no podía canalizarla a través de la vida tranquila que llevábamos.

León Tolstoi, *Felicidad Familiar*

4 Capítulo 4: Metales Pesados: Influencia de la forma química en su incorporación a organismos vivos.

4.1 Biodisponibilidad y bioacumulación de metales pesados.

Los organismos vivos tienen un rol central en los ciclos de elementos tales como el carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Junto a estos elementos centrales, también son procesados otros elementos minoritarios entre los que se encuentran los metales pesados. Una vez que los metales pesados son liberados al ambiente por el hombre, pueden ser incorporados a los tejidos de los organismos vivos. El ingreso de contaminantes inorgánicos a los distintos reservorios naturales puede causar en los seres vivos que los habitan, efectos benéficos (solo con algunos metales esenciales), toxicidad crónica y en casos extremos toxicidad aguda o muerte, dependiendo de su concentración. Para los seres humanos, la asimilación de contaminantes por los organismos que los rodean produce una disminución en su calidad de vida debido a la degradación de sus recursos naturales.

Las vías de ingreso de los contaminantes a los seres vivos son diversas. Las plantas terrestres incorporan los contaminantes de los suelos a través de sus raíces y los contaminantes gaseosos a través de sus hojas. Los animales terrestres lo hacen a través de la inhalación o a través de la ingesta de otros organismos a su vez contaminados. Los organismos acuáticos son los mas sensibles a los contaminantes puesto que se encuentran en contacto permanente con la fase acuosa que contiene los tóxicos disueltos. A diferencia de la contaminación de suelos, la contaminación de aguas afecta espacios mayores dado que ocurre en un medio fluido y por lo tanto, los procesos de transporte de contaminantes son mas eficientes. La incorporación de tóxicos a los organismos acuáticos ocurre por contacto directo entre el agua contaminada y el tejido del organismo o bien por transferencia a lo largo de la cadena trófica. Los primeros eslabones de esta cadena, tales como el fitoplancton, el

zooplancton, los crustáceos y las plantas acuáticas son de especial cuidado. La incorporación de metales pesados a sus tejidos puede producir su mortandad repentina o puede propagar la contaminación a todos los organismos que los utilizan como fuente de alimento. Entre los ecosistemas acuáticos, el ecosistema marino es el que brinda la mayor cantidad de alimento a la raza humana y a su vez es, aquel en el cuál se descargan grandes cantidades de desechos de las grandes ciudades e industrias. La “bioacumulación” de metales pesados en nuestros organismos marinos refleja el impacto de la actividad del hombre sobre uno de nuestros recursos mas ricos lo que hace vital su estudio.

El término “bioacumulación” se utiliza para describir la magnitud con la que un organismo concentra un contaminante de su entorno. El factor de bioacumulación (a semejanza del factor de enriquecimiento definido para procesos de intercambio iónico) es el cociente entre la concentración del tóxico en el tejido y en el medio desde el cuál lo incorpora. La “bioacumulación” está modulada por la “biodisponibilidad”. La “biodisponibilidad” de un elemento es el porcentaje de la concentración total de éste que puede ser efectivamente incorporado por un organismo. La biodisponibilidad de un elemento está directamente relacionada con su especiación puesto que las diferentes formas químicas de un mismo elemento pueden ser acumuladas en magnitudes muy diferentes.

La bioacumulación de tóxicos inorgánicos en ambientes marinos ocurre por tres vías principales:

- Absorción directa de la forma biodisponible del elemento en la fase acuosa a través de membranas celulares o tejidos respiratorios.
- Absorción directa de la forma biodisponible del elemento en los sedimentos, por contacto directo o por alimentación por filtración.
- Ingesta de otros organismos contaminados.

A bajos niveles de concentración, ciertos metales pesados como el Cu y el Zn actúan como micronutrientes. Otros metales como el Cd y el Hg son tóxicos siempre, aún a muy baja concentración. Para un dado elemento metálico, el límite de concentración en el cuál éste comienza a ejercer efectos perjudiciales es función de la especie que lo acumula, de su edad y del tamaño del individuo de esa especie. Incluso puede ser función de la época del año en la que ocurre la exposición. Cuando se supera el umbral de toxicidad se manifiestan efectos negativos en la tasa de

reproducción, en la sensibilidad a enfermedades, problemas nutricionales, problemas de crecimiento, cambios en el comportamiento e inclusive defectos a nivel genético³²⁶. Si la concentración es aún superior a éste umbral, se producen disfunciones severas a corto plazo e inclusive muerte.

Este mecanismo de umbral-daño tiene una correlación química directa en los tejidos de los organismos marinos dado que los metales incorporados son retenidos en dos fracciones predominantes de proteínas³²⁷:

- Una fracción de sistemas enzimáticos de alto peso molecular que requieren de metales (micronutrientes) para su funcionamiento. Este es el sitio de acción tóxica de los metales esenciales cuando son incorporados en exceso.
- Una fracción de proteínas de peso molecular intermedio llamadas metalotioneínas que actúan detoxificando al organismo de especies metálicas.

Cuando los metales esenciales como el Cu y el Zn se hallan en exceso su concentración en la primer fracción es anormalmente alta. Si el proceso de acumulación continúa, el exceso aparece en las metalotioneínas. Cuando la contaminación se produce con metales no esenciales como el Cd, la acumulación se produce directamente en las metalotioneínas, que se encargan de anular sus efectos tóxicos. Cuando la capacidad de asimilación de las metalotioneínas se ve superada por cualquiera de los metales en exceso, éstos reaccionan con otras enzimas que son críticas para el funcionamiento del metabolismo, apareciendo los síntomas de toxicidad.

4.2 Mecanismos de incorporación de metales a organismos vivos.

Los mecanismos de absorción de metales por organismos acuáticos son complejos pero podemos resumirlos de manera sencilla en tres etapas. La primera es la migración de la especie bioacumulable hasta la superficie celular y su fijación sobre ésta. La segunda es el transporte a través de la membrana celular. La tercera es la partición del total del elemento incorporado entre los distintos sistemas proteicos descritos anteriormente.

4.2.1 Transporte a través de la membrana celular

Todas las células vivas se encuentran separadas de su entorno por una membrana semipermeable cuya existencia y propiedades básicas se conocen desde hace más de 100 años. La membrana celular está formada por una bicapa de fosfolípidos con sus extremos hidrofílicos mirando hacia los lados internos y externos. Esta bicapa es permeable a moléculas orgánicas liposolubles, pero virtualmente impermeable a iones pequeños. La permeación de los iones es posible debido a la presencia de una gran variedad de proteínas. Algunas de estas proteínas se encuentran asociadas sólo a la capa externa de la membrana y son fácilmente removibles mientras que otras, atraviesan la membrana de lado a lado y sólo pueden ser extraídas si se la destruye. Las propiedades de la membrana celular están dadas por la composición de sus lípidos mientras que las funciones de transporte a través de ella están dadas por sus proteínas.

Las proteínas de membrana son las responsables del transporte de iones a través de la misma. Este transporte presenta cierta selectividad para distintos iones debido en general, a restricciones de tamaño de las estructuras de las proteínas. Las vías por las que los iones pueden atravesar la membrana son diversas³²⁸, a saber:

1. **Disolución hidrofóbica en la membrana.** Sólo posible para especies neutras y/o hidrofóbicas (metilmercurio, tetraetilplomo, tributilestano).
2. **Unión de los iones a proteínas y carbohidratos presentes en la periferia de la membrana.** Los complejos formados son transportados a través de la membrana por endocitosis. Un ejemplo clásico es el transporte de hierro por la transferrina presente en el suero la que es capturada en la superficie celular por receptores de transferrina. El complejo receptor-transferrina migra hasta sitios especializados (“pozos de clatrina”) donde se produce un endosoma que es incorporado a la célula. Otra vía de transporte la constituyen los “ionóforos”. Estos ionóforos son proteínas que unen iones metálicos, pudiendo generar luego un poro transitorio a través de la membrana o directamente migrar a través de ella. Un ejemplo de esta clase de mecanismo es el transporte de K^+ mediado por el antibiótico valinomicina que, una vez que se une el cation, puede difundir a través de la membrana.
3. **Permeación a través de poros.** Los poros son estructuras proteicas que atraviesan la membrana de lado a lado. Pueden ser inespecíficos, en cuyo caso el transporte de iones es simplemente difusivo. También pueden ser selectivos para ciertos

iones. Una de las proteínas mas comunes que conforman estos canales es la porina. Los poros tienen forma de doble embudo con un cono expuesto hacia la superficie extracelular que posee cargas negativas capaces de atraer cationes, luego un “cuello” que presenta selectividad en base al tamaño del ion y por último otro cono que se expande hacia adentro de la célula por donde los iones son ingresados en el medio plasmático. Todos los poros son permeables a varios iones con afinidades y velocidades de transporte variables. La preferencia de un ion respecto de otro se produce en función de la similitud entre el tamaño del ion y el diámetro del poro o en función de lo favorables que resulten las interacciones electrostáticas entre cada ion particular y las paredes del poro. Además, los cambios en el pH extracelular afectan fuertemente la unión de iones a la superficie de la membrana puesto que los H^+ compiten por los grupos funcionales. Desde otro punto de vista, el pH cambia la especiación de los iones en solución.

4. **Transporte activo asociado a hidrólisis de ATP mediante ATPasas.** En muchos casos existen mecanismos activos de incorporación o excreción de ciertos iones. Esto se logra con sistemas proteicos específicos para cada ion. Estos sistemas capturan al ion y lo translocan a través de la membrana. Este cambio conformacional que produce la migración del ion esta acoplado a la hidrólisis de ATP mediante una ATPasa, constituyendo un proceso activo donde se gasta energía. Estas moléculas transportadoras que atraviesan la membrana se conocen como “carriers”.

4.2.2 Transferencia de los metales desde la solución a la superficie celular.

Desde un punto de vista químico, los diferentes mecanismos de incorporación de metales en el interior de una célula comienzan con una reacción superficial entre una especie disuelta en la fase líquida y un grupo funcional en la superficie celular. Esta reacción heterogénea se encuentra sumamente influenciada por la concentración del ion metálico en solución y por la forma química en la que éste se encuentra, es decir, por su especiación.

Cuando un ion metálico difunde hacia la superficie celular de un organismo vivo, encuentra primero una capa protectora de polisacáridos o glicoproteínas (paredes celulares o mucus de células animales). Estas paredes poseen grupos funcionales que contienen oxígenos cargados negativamente, por lo que los cationes se ven atraídos hacia su interior. Moviéndose a través de esta pared los iones se

encontrarán con la membrana celular, entrando en contacto con un gran número de proteínas transportadoras y de poros proteicos. Todas estas moléculas constituyen sitios potenciales de unión para las especies metálicas que hayan migrado.

Este proceso de difusión y unión de los metales desde la solución hasta la superficie celular puede modelarse. El modelo mas aceptado es el Modelo de la Actividad del Ion Libre (“Free Ion Activity Model”, FIAM³²⁹) que predice que la concentración intracelular de iones metálicos es proporcional a la concentración del **ion libre** en la solución que rodea al organismo.

Según el modelo FIAM, la reacción superficial de los iones metálicos consta de cuatro etapas que se esquematizan en la Figura 4.1:

- Migración convectiva-difusiva hasta la superficie celular.
- Difusión del metal a través de la pared celular o mucus glicoproteico.
- Adsorción o complejación superficial sobre la pared celular o sobre proteínas de la membrana celular.
- Internalización del metal mediante transporte a través de poros o moléculas transportadoras.

La reacción entre las especies en solución y el grupo superficial celular viene dada por las siguientes reacciones:

En solución, el ion metálico M puede estar en equilibrio con distintos ligandos L .

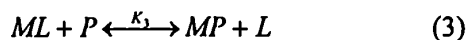


Una vez que el ion difunde, reacciona con el grupo superficial proteico P para dar el complejo superficial MP .



Si la única especie que reacciona con la superficie celular es “ M ”, la adición de un ligando L que forma un complejo ML inerte, disminuye la acumulación del tóxico metálico.

Sin embargo, el complejo superficial puede generarse también a través de una reacción de intercambio de ligandos si la especie que reacciona es el complejo ML del metal, por lo que la especie tóxica no sólo puede ser M sino también ML .



Despejando las concentraciones de las especies en las ecuaciones (1), (2) y (3) de las correspondientes expresiones de sus constantes de equilibrio (K_1 , K_2 y K_3),

obtenemos la dependencia de la concentración del complejo superficial con la concentración del ion libre:

$$[MP] = K_1 \cdot K_3 \cdot [P] \cdot [M] \quad (4)$$

Vemos que la concentración del complejo superficial depende de la actividad del **ion libre**. Cuanto mayor sea la concentración del ion libre, mayor será la acumulación. Si agregamos ligandos *L* cuyos complejos *ML* pueden reaccionar con los grupos superficiales (reacción 3), éstos también aumentarán la bioacumulación de *M*.

Si “*MP*” se forma en sitios de membrana con una función biológica definida, la formación del complejo superficial producirá una respuesta biológica directa, como ocurre en las branquias de los peces. Si el sitio sólo tiene la función de transporte hacia el citosol, un aumento en la concentración superficial de *MP* producirá un aumento en la concentración intracelular de *M*.

El modelo FIAM hace uso de dos hipótesis que pueden no cumplirse, conduciendo a aparentes excepciones al mismo:

1. La interacción con la superficie celular es a través de una reacción superficial, lo cuál es válido sólo si los metales existen libres o en la forma de complejos hidrofílicos que no pueden atravesar directamente la membrana plasmática.
2. Tras la difusión del metal en solución, las reacciones de complejación superficiales y las de intercambio de ligandos en la superficie celular son mas rápidas que la reacción de incorporación del metal al interior de la célula. De ésta manera la superficie celular se encuentra en “pre-equilibrio” con la solución. Por el contrario, si las reacciones superficiales son lentas, el FIAM no es válido dado que toma en cuenta consideraciones puramente termodinámicas ignorando las consideraciones cinéticas: la velocidad de bioacumulación vendrá dada por la velocidad con la que los metales son transportados hacia la superficie o por la velocidad con la que éstos son liberados de los complejos que formen en solución.

Dado que los grupos proteicos superficiales y las especies en solución se encuentran relacionados por equilibrios múltiples, cualquier especie puede ser potencialmente tóxica. En general se piensa que la única especie tóxica es el ion libre,

pero esto no es completamente cierto: la concentración del ion libre nos da una idea de la reactividad del sistema, del grado de toxicidad y de la facilidad con la que éste puede interactuar con la superficie celular.

El modelo FIAM predice adecuadamente el proceso de bioacumulación en la mayoría de los casos, sin embargo, existen algunas situaciones donde el modelo parece no ser válido a simple vista.

Una de esas situaciones es cuando el metal se encuentra en equilibrio con ligandos lipofílicos como el DDTC o los xantatos. En éste caso, la presencia de un ligando “*amplifica*” la bioacumulación porque el complejo *ML* puede atravesar directamente la membrana celular diferenciándose de complejos formados con ligandos hidrofílicos tales como el EDTA y el NTA.

Otra aparente excepción al FIAM ocurre cuando se forman complejos neutros de bajo peso molecular como por ejemplo AgCl^0 o CdCl_2^0 . Estos complejos sólo se forman si la salinidad es muy baja, ya que con exceso de ligando, como en el agua de mar, se favorece la complejación con un número de coordinación mayor ($\text{Cd}(\text{Cl})_4^{-2}$).

Una situación poco estudiada es la de la aplicabilidad del FIAM en presencia de materia orgánica disuelta (DOM, Dissolved Organic Matter). Este es una situación muy común puesto que muchas veces junto a la descarga de metales pesados también se descargan efluentes cloacales con habilidad para complejar a los iones metálicos, disminuyendo su actividad. En la mayoría de los casos, la materia orgánica disuelta se comporta como una mezcla compleja de ligandos hidrofílicos y por lo tanto, las predicciones del FIAM son válidas

Un análisis de la bibliografía existente referida al modelo FIAM³²⁹ pone de manifiesto una grave deficiencia en la mayoría de los estudios de bioacumulación llevados a cabo en sistemas modelo: la ausencia de métodos de análisis que permitan medir concentraciones de ion libre menores a 10^{-7} M condiciona los metales a estudiar y la aplicabilidad de los resultados a sistemas naturales. Es evidente que los sistemas de preconcentración acoplados a ETA-AAS tienen mucho que ofrecer en el estudio del fenómeno de bioacumulación debido a los bajos límites de detección y a la efectiva aislación del analito.

4.3 Bioacumulación y preconcentración por intercambio iónico.

No es sólo debido a su enorme sensibilidad que los métodos de preconcentración por intercambio iónico acoplados a horno de grafito tienen mucho que ofrecer. Estos métodos de preconcentración tienen similitudes “conceptuales” con el proceso de bioacumulación. Tanto en el proceso de bioacumulación como en el proceso analítico de preconcentración la reacción que une al ion metálico con la superficie procede por intercambio iónico. En ambos casos se trata de una reacción heterogénea de complejación con un primer paso difusivo y un segundo paso de reacción química. Si se buscan condiciones experimentales adecuadas en las cuáles la reactividad del material de intercambio iónico es moderada (flujos de muestra altos, grupos funcionales de afinidad mediana por los metales) la fracción de metales retenidos puede estar relacionada con la fracción de metales capaces de reaccionar con la superficie celular.

No todos los procesos de transporte de membrana son similares a la preconcentración por intercambio iónico: es imposible “simular” mediante intercambio iónico un proceso de transporte activo acoplado a gasto de energía como es el que ocurre con las ATPasas de membrana, pero si es factible simular los procesos de complejación con los grupos funcionales de la pared celular.

Es esta similitud entre los procesos de preconcentración por intercambio iónico y de complejación celular lo que ha llevado a los químicos analíticos a “poner el carro delante de los caballos” y usar materiales biológicos como soporte de preconcentración de metales pesados^{330, 331}.

4.4 ¿Porqué estudiar la bioacumulación de Cd y Pb?

La selección de Cd y Pb como analitos en agua de mar no es casual. A diferencia de metales como el Fe, Cu, Mn y Co que pueden actuar como micronutrientes, el Cd y Pb son elementos denominados tóxicos, cuyos efectos nocivos siempre se incrementan conforme su concentración crece por encima de los niveles de tolerancia.

El cadmio es un elemento raro en la corteza terrestre y hay pocos minerales que lo contienen. En aguas naturales su concentración se encuentra en el rango de 0.010 a 3 ppb. La World Health Organization (WHO) propone como valor guía para aguas de consumo humano una concentración máxima de 3 ppb. Es un metal altamente tóxico ($LD_{50}=1.3\text{mg kg}^{-1}$) que se acumula en los riñones de los mamíferos y

puede causar insuficiencia renal. En los humanos, la exposición crónica a éste metal produce daños en el riñón que se manifiestan por la presencia de proteínas (microglobulinas) en la orina. La aspiración repetida de aerosoles de Cd puede producir enfisema y otras enfermedades agudas de pulmón. Se vuelve volátil a los 400 C, por lo que puede dispersarse como aerosol si se calientan mezclas de metales a esa temperatura.

El cadmio es un metal “moderno” puesto que se lo comenzó a utilizar en los años 60 en aplicaciones tales como la prevención de la corrosión, la estabilización de polímeros, baterías de Ni-Cd, fósforos de TV y pigmentos³³². Tiende a ser menos fuertemente adsorbido y complejo que otros metales divalentes, por lo que es más lábil en suelos (vida media en suelos: 15 a 1100 años) y más biodisponible en aguas. Es uno de los metales que mas fácilmente se traslada a lo largo de la cadena trófica, tanto a través de organismos marinos, como a través de plantas terrestres. Las fuentes de Cd mas importantes son los efluentes cloacales, los fertilizantes fosfatados y las emisiones industriales (combustión de carbón y petróleo)³³³. Otra fuente importante de contaminación son los procesos de obtención minera y de fundición del ZnS, puesto que en general se los encuentra juntos. Un caso masivo de intoxicación crónica con Cd se produjo en Japón en los años 50 donde mas de 200 personas mostraron insuficiencias renales agudas y deformidades en los huesos debido a que tanto el agua que bebían así como el arroz que consumían estaba contaminado con una cantidad de Cd 10 veces superior a la tolerada por humanos. La causa de esta contaminación eran las operaciones de minería que se llevaban a cabo en valles cercanos y que contaminaban las napas de agua.

El plomo también es un elemento no esencial. En aguas naturales su concentración promedio es mayor que la de Cd y se encuentra en el rango de 0.030 a 13 ppb. En especial, en agua de mar, su concentración es uno o dos órdenes mayor que la de Cd (ver Tabla 4.1). El Pb es una neurotoxina y proviene de una enorme variedad de fuentes³³². La World Health Organization (WHO) propone como valor guía para aguas de consumo humano una concentración máxima de 10 ppb. Las principales fuentes de plomo en el ambiente son el petróleo (en el aire por la combustión, pero también en suelos y en aguas por derrames), particulados en chimeneas de escape de combustión de gas-oil o fuel-oil, pinturas de vieja tecnología con alta cantidad de Pb, soldaduras y barnices de interiores de latas de alimentos, caños de Pb usados en la distribución domiciliaria de agua, algunos pesticidas en base

a mezclas Pb/As, todo tipo de munición cuyos proyectiles están fabricados con Pb, minería y fundición del Pb (en especial de yacimientos de PbS, produciéndose la contaminación por drenado de efluentes ácidos que contienen Pb soluble, humos de fundición y material particulado de desecho que contamina aguas y suelos). Comparativamente, el Pb no es tan tóxico ni tan biodisponible^{†††} como el cadmio ($LD_{50}=70 \text{ mg kg}^{-1}$, vida media en suelos: 740 a 5900 años), pero es omnipresente en el ambiente además de ser tóxico acumulativo en mamíferos. La acumulación ocurre en la médula ósea donde se produce la formación de eritrocitos (hematopoyesis). Cinco pasos de la síntesis del grupo hemo, como mínimo, son afectados por el Pb. En particular, la máxima afección se registra sobre dos enzimas: la δ -aminolevulin-dehidrogenasa (ALA-D) y la ferroquelatasa. Esta inhibición de la síntesis del hemo resulta en anemia. La intoxicación crónica con Pb también produce daño renal. La intoxicación aguda con Pb produce edema cerebral, pero dosis menores pueden producir trastornos de comportamiento y dificultades en el aprendizaje.

La absorción de Cd y Pb en plantas produce cambios en la permeabilidad de la membrana celular y unión a grupos sulfidrilos de muchas proteínas y enzimas críticas. Esto produce inhibición de procesos enzimáticos, y trastornos en la respiración, transpiración y fotosíntesis. Tanto el Cd como el Pb son fuertemente acumulados por los organismos marinos tal como se muestra en la Tabla 4.2. El cadmio es mas biodisponible que el plomo, pero el plomo casi siempre se encuentra en mayor concentración. La incorporación de Cd a los organismos marinos se produce a través de difusión a través de poros. Se ha encontrado que los inhibidores de ATPasas producen un aumento en la concentración intracelular de Cd lo que no indica un proceso activo de acumulación sino, mas probablemente, un proceso activo de detoxificación que puede ser inhibido. El plomo se incorpora a las células de la misma manera que el calcio, dada la similitud de sus radios iónicos (0.099 nm para Pb y 0.12 nm para Ca). Además, muchas vías metabólicas permiten que el Pb reemplace al Zn debido a que posee mayor carácter “B” que éste^{†††}.

En los estudios de bioacumulación llevados a cabo en nuestros laboratorios¹⁸¹ hemos elegido como organismo de estudio para la bioacumulación de Cd y Pb, a las macroalgas marinas. Estas algas concentran metales tóxicos con gran facilidad en

^{†††} A diferencia del Cd, el Pb forma muchas sales insolubles en los suelos, con carbonatos, fosfatos, sulfatos y materia húmica.

cantidades subletales, lo que las hace útiles como biomonitores de la contaminación de su entorno³³⁴⁻³³⁷. Por otro lado, como son organismos fijos al lecho oceánico, reflejan la exposición del sitio de muestreo a los contaminantes. En el caso de las algas, los metales sólo pueden ser incorporados a través de su exposición directa al organismo puesto que no hay incorporación a través de la dieta, lo que hace que los resultados sean mas fáciles de interpretar.

Los estudios de bioacumulación de Cd y Pb requieren de herramientas analíticas muy eficientes y confiables puesto que es necesario determinar bajísimas concentraciones de los mismos en agua de mar, así como en los tejidos de las algas, donde, si bien la concentración es mayor, requiere una digestión previa. El sistema FI-ETA-AAS es un método excelente para la determinación de partes por trillón de estos metales en el agua de mar en la que habitan las algas, mientras que para la determinación del contenido intracelular es necesaria la mineralización de la materia orgánica utilizando un método en el cuál no se volatilicen los analitos (recordemos la alta volatilidad de ciertas sales de Cd y Pb). Para ello se ha hecho uso de la digestión por microondas que resulta la técnica mas adecuada para la destrucción de la materia orgánica en el análisis de vestigios inorgánicos.

4.5 Resultados y Discusión.

Estudios previos de bioacumulación en nuestros laboratorios han mostrado que ciertas especies de macroalgas del Atlantico Sur (zona del Golfo Nuevo, Patagonia) tales como Lessonia, Gigartina, Adenocystis, Leathesia y Colpomenia son capaces de acumular arsénico¹⁷⁹. Además, pudo demostrarse que el arsénico es acumulado intracelularmente como especies organoarsenicales, no reactivas para la generación de arsina. En trabajos posteriores¹⁸⁰ se investigó la acumulación de Cd, Pb y Al en la misma zona, por las mismas especies. Muchas de estas especies (Macrocystis, Gigartina) son cosechadas con fines alimenticios ya sea como materia prima en la fabricación de alimentos, o para su consumo directo en alimentos dietéticos. Los resultados muestran que la bioacumulación de Cd y Pb se encuentra directamente ligada a la actividad humana en la zona de muestreo: las algas que habitan los sitios de mayor impacto, presentan mayor contenido intracelular de Cd y Pb.. Este mismo estudio muestra que la concentración de Cd y Pb intracelular esta relacionada con la

^{†††} El carácter B o "S" (ácidos "blandos" de Pearson) de un metal está relacionado con la afinidad por el azufre, nitrógeno y fósforo que posee. Estos metales tienen una esfera electrónica polarizable.

concentración en el agua circundante. Sin embargo, puesto que no fue posible realizar estudios de especiación, sólo están disponibles datos de la concentración total de los iones. Es evidente que si estos iones se encuentran en la forma de especies que pueden ser retenidas por las paredes y membranas celulares, la concentración total de iones tendrá relación directa con la cantidad de esos metales que puede ser acumulada. Por el contrario, si los iones se encuentran en la forma de complejos muy estables o asociados fuertemente a material coloidal en suspensión, la concentración total de los contaminantes carece de utilidad para predecir la magnitud de la bioacumulación.

Para predecir la cantidad de metal acumulado por las algas, es necesario contar con una medida de la reactividad de los iones metálicos en el agua de mar circundante. Diversos autores han sugerido que la fracción “reactiva” o “lábil” de los iones metálicos, se encuentra directamente relacionada con la fracción que puede ser retenida por columnas de intercambio iónico^{5, 6, 167, 183}. Teniendo en cuenta que las similitudes entre el proceso de bioacumulación y el de intercambio iónico son evidentes, la fracción de metales retenida por la microcolumna de intercambio iónico del sistema FI-ETA-AAS bajo ciertas condiciones de contorno, podría resultar una buena estimación de la biodisponibilidad de los metales en el agua de mar objeto de nuestro estudio.

Para verificar esta hipótesis, se buscaron ambientes con grados de actividad humana muy diferentes. De los lugares de muestreo descriptos en la Tabla 4.1 se seleccionaron dos sitios que cumplen estos requisitos: Punta Borja (45° 52' S 67° 29' W) y Punta Maqueda (46° 01' S 67° 34' W). El primero es una playa rocosa muy influida por la proximidad de la ciudad de Comodoro Rivadavia. Esta ciudad, situada en la provincia de Chubut, tiene una población aproximada de 75000 habitantes, se caracteriza por su industria pesquera y por la explotación de petróleo ya que es un puerto de embarque y descarga de grandes barcos-tanque transportadores de combustible. Esto hace que en la zona portuaria los derrames de petróleo (accidentales o por lavado indebido en la cercanía de la costa) sean frecuentes. Además, la ciudad tiene una gran deficiencia en sus plantas de tratamiento de efluentes cloacales, por lo que muchas veces el exceso de aguas servidas es directamente vaciado al mar. Punta Maqueda, por el contrario, es un sitio geográficamente protegido que carece de población y de actividad humana y por lo tanto, resulta útil como sitio control para estimar la concentración basal de Cd y Pb

tanto en las aguas como en los tejidos de las algas. Las diferencias en cuanto a la actividad humana en ambos sitios hacen suponer “a priori” que la especiación de los metales en el agua será diferente.

Los resultados para la determinación de Cd y Pb en los tejidos de las algas se muestran en la Tabla 4.3¹⁸¹. La concentración de los metales corresponde a una etapa de contaminación temprana. Se ve claramente que el plomo es acumulado intracelularmente con mayor preferencia por *E. prolifera* y por *U. lactuca* mientras que el Cd es acumulado preferentemente por *P. columbina*. Estas diferencias pueden ser explicadas solamente en términos de las diferentes vías de incorporación metabólica que no son conocidas hasta el momento. Sin embargo, las diferencias entre las especies, sirven para seleccionar el biomonitor adecuado.

Los resultados del análisis del contenido de metales en el agua de mar circundante muestran que en Punta Borja la concentración total de ambos metales es mayor que en Punta Maqueda, o sea el sitio impactado presenta mayor concentración de metales que el sitio control. En lo que se refiere a la acumulación en los organismos, las algas en el sitio poluído (Punta Borja) acumulan mas plomo que en Punta Maqueda (sitio control), lo que se correlaciona con el mayor contenido de plomo total y lábil en el agua de mar de Punta Borja (Tabla 4.4). La alta bioacumulación de Pb en Punta Borja (Tabla 4.3), determinada por las condiciones ambientales que impone la actividad humana, está de acuerdo con resultados publicados con anterioridad³³⁸.

La bioacumulación de Cd no presenta una explicación tan sencilla (Tablas 4.3 y 4.4). Un hecho llama poderosamente la atención: el contenido de cadmio intracelular presenta una inversión ya que en el sitio control las algas acumulan mas Cd que en el sitio poluído. Este fenómeno puede explicarse observando la concentración de metal lábil en ambos sitios de muestreo : a pesar de que el contenido total de cadmio en Punta Borja es mayor que en Punta Maqueda, en Punta Borja la biodisponibilidad de este metal es menor como lo indica el análisis de la fracción lábil. Los resultados sugieren que las especies bioactivas de Cd en agua de mar están correlacionadas con la fracción “lábil” retenida por la resina Chelex-100.

Muchos autores han sugerido que la complejación de los metales por ligandos orgánicos puede influenciar su especiación y por lo tanto controlar su biodisponibilidad, tal como predice el Modelo del Ion Libre³²⁹. La disminución de la biodisponibilidad del Cd en Punta Borja puede deberse a la presencia de quelantes

con una alta afinidad por este ion que lo secuestren en fases disueltas, coloidales o particuladas inertes. Estos quelantes pueden provenir de la materia orgánica aportada por los efluentes cloacales o por los quelantes naturales que existen en el petróleo como las petro-porfirinas.

La utilidad de un método rápido de especiación operacional es evidente (fueron procesadas mas de 30 muestras, cada una con sus respectivos replicados). Este método, además de poseer una alta frecuencia de análisis, posee la sensibilidad suficiente como para distinguir las variaciones de concentración entre ambos sitios de muestreo. La determinación del *conjunto* de especies que conforman la “fracción lábil” (especiación operacional con correlato funcional) es de suma utilidad. Sin embargo, es importante conocer cuáles especies se comportarán como lábiles y cuáles no, de manera de poder predecir el efecto de ligandos específicos sobre la biodisponibilidad de éstos iones. La caracterización de la fracción lábil de Cd permitiría conocer el efecto que tiene la contaminación con materia orgánica sobre la biodisponibilidad de tóxicos inorgánicos. Resulta paradójico que la contaminación con materia orgánica tenga efectos “protectores” de contaminación por metales pesados para la fauna y flora acuática, disminuyendo la posibilidad de incorporación en sus tejidos.

La presencia de ligandos afecta mas significativamente al Cd que al Pb puesto que aún pequeñas concentraciones de ligandos pueden modificar sustancialmente la cantidad complejada del primero, ya que al encontrarse a niveles de ultratrazas es fácil encontrarse en una situación donde el ligando esté en exceso. En lo que resta de éste trabajo estudiaremos qué ligandos componen la fracción “labil” de Cd y desarrollaremos un procedimiento automático para la determinación de las dos fracciones mayoritarias de éste elemento: la fracción “lábil” y la “inerte” (accesibles y no accesibles al organismo acuático, respectivamente).

TABLAS DEL CAPITULO 4:

Sitio	Ubicación	Actividad Humana	Grado de Exposición	Cd ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Pb ($\mu\text{g l}^{-1}$)
Caleta Cordova	45° 43' S 67° 20' W	Puerto	Mediano	ND	0.616 $\pm$ 0.020
Punta Borja (Comodoro Rivadavia)	45° 52' S 67° 29' W	Industrial, Urbano Puerto.	Mediano Alto Muy alto	0.031 $\pm$ 0.005	1.360 $\pm$ 0.040
Playa Rada Tilly	46° 00' S 67° 33' W	Turístico	Mediano	0.033 $\pm$ 0.006	0.419 $\pm$ 0.014
Punta Maqueda	46° 01' S 67° 34' W	Ninguna	Ninguno	0.063 $\pm$ 0.010	0.708 $\pm$ 0.023

Tabla 4.1: Concentración de Cd y Pb en muestras de agua del Mar Atlántico Sur (costa patagónica). Las concentraciones se determinaron mediante el sistema FI-ETA-AAS descripto en el Capítulo 1.

Metal	Organismo			
	Algas y Macrofitas	Moluscos	Crustáceos	Peces
Cadmio (no esencial)	- Factores de concentración tan altos como 10000x. - Las velocidades de detoxificación son lentas. - Ca, Mg y Sr compiten con los sitios de unión. - La biodisponibilidad disminuye con la presencia de quelantes	- Factores de concentración de 10000x, preferentemente en riñones y glándulas digestivas. - La bioacumulación aumenta al disminuir la salinidad. - La detoxificación se produce a través de metalotioneínas. - Muy lenta la detoxificación	- Los niveles mas altos se encuentran en las vísceras y los mas bajos en los músculos. - Factores de concentración de hasta 600x, con una vida media en el organismo de un año. - El mecanismo mas eficiente de acumulación a altas concentraciones es a través de las branquias y a bajas concentraciones a través de la alimentación. - Se une a metalotioneínas intestinales.	- Los niveles mas altos se encuentran en el hígado y otras vísceras. - La acumulación es mayor en individuos jóvenes, a baja salinidad y alta temperatura del agua. - Detoxificación a través de metalotioneínas. - Las vías de ingreso son a través del agua y la dieta. - La exposición intermitente o en bajas concentraciones del tóxico puede no ser significativa.
Plomo (no esencial)	Factores de concentración entre 1200x y 82000x	- Experimentos a largo plazo muestran acumulaciones entre 200x y 20000x. - La acumulación máxima se produce en las branquias, riñones y tracto digestivo. - Los individuos pequeños y jóvenes muestran una velocidad de absorción alta y de detoxificación lenta. - La acumulación disminuye si aumenta la salinidad. - La acumulación del plomo en los sedimentos es inhibida por altos niveles de Fe. - Las vías de ingreso son a través del agua y de la alimentación.	- Factores de concentración promedio de 100x. - Se localiza en el exoesqueleto y se pierde con las mudas. - La toxicidad y acumulación son mayores a bajas salinidades y altas temperaturas.	Se acumula en el esqueleto con factores de acumulación de 100x.

Tabla 4.2: Características del proceso de bioacumulación de Cd y Pb en distintos organismos marinos.

	U. lactuca		E. prolifera		P. columbina (macro-alga roja)	
	(macro-algas verdes)					
Elemento (µg/g, peso seco)	Punta Borja	Punta Maqueda (sitio control)	Punta Borja	Punta Maqueda (sitio control)	Punta Borja	Punta Maqueda
Pb	3.68 ± 0.25 ^a	1.73 ± 0.33	6.10 ± 0.90	4.10 ± 0.40	<0.2	<0.2
Cd	0.12 ± 0.01	0.55 ± 0.44	0.14 ± 0.02	0.70 ± 0.07	0.68 ± 0.04	8.34 ± 1.

^amedia poblacional $\pm$ desviación estándar (n=6)

Tabla 4.3 : Contenido de Cd y Pb en tejidos de distintas especies de algas (media $\pm$ desv. std.). El valor informado corresponde a muestras tomadas en la misma fecha.

Elemento		Sitio de Colección			
		Punta Borja		Punta Maqueda	
		Media ^a	Rango ^b Anual	Media	Rango Anual
Pb	Metal Total ^c	1.7	1.5-2.3	0.8	0.7-1.1
	Metal Lábil ^d	1.40	1.30-1.50	0.70	0.60-0.90
Cd	Metal Total	0.7	0.6-0.9	0.2	0.1-0.3
	Metal Lábil	0.03	0.01-0.04	0.06	0.06-0.09

Notas :

^a Expresada como el promedio de las medias de 5 determinaciones de cada muestra.

^b Rango de las medias observadas para cada metal en las muestras colectadas bimestralmente en el período 1993-1994.

^c Determinación por extracción con APDC/MIBK.

^d Determinación mediante FI-ETA-AAS usando Chelex-100 como soporte de preconcentración.

Tabla 4.4 : Especiación operacional de Cd y Pb en agua de mar.

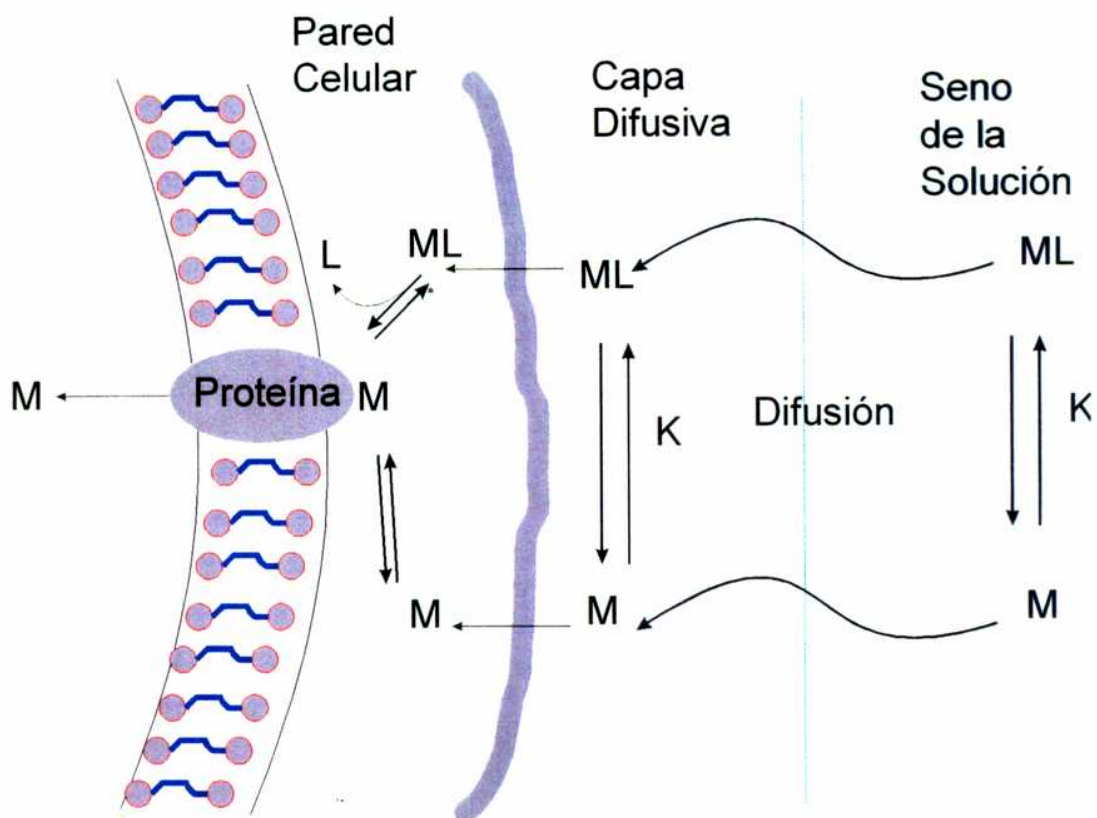


Figura 4.1: Modelo de bioacumulación "FIAM".

CAPITULO 5



*"Would you tell me, please, which way I ought to go from here?"-[said Alice].
"That depends a good deal on where you want to get to", said the Cat.
"I don't much care where"-said Alice.
"Then it doesn't matter which way you go,"said the Cat.
"-so long as I get somewhere, "Alice added as an explanation.
"Oh, you're sure to do that", said the cat, "if you only walk long enough."*

Alice's Adventures in Wonderland, Lewis Carrol (1865).

5 Capítulo 5: Caracterización de la fracción lábil de Cadmio.

En los primeros capítulos nos hemos centrado en el análisis de la performance del sistema FI-ETA-AAS para la determinación de Cd y Pb a través de sus figuras de mérito. Sin embargo la cantidad de iones retenidos en la microcolumna no sólo es función de las variables del sistema de flujo sino también del entorno químico en el que se encuentra el analito, lo que permitirá el análisis de especiación. En el capítulo anterior hemos comprobado que la fracción de Cd retenida por la microcolumna se encuentra relacionada con la fracción de iones metálicos capaces de interaccionar con organismos vivos. Es deseable comprender cuál es la causa de esta correlación, o sea, cuáles son los motivos que hacen que la fracción "lábil" (retenida por quelación en fase sólida), sea también la fracción "biodisponible".

Llamaremos "discriminación cinética" a la capacidad del soporte de preconcentración de discriminar entre especies químicas en función de la velocidad con la que ellas reaccionan con las resinas quelantes. Nuestra hipótesis de trabajo consiste en que sólo aquellos iones que se encuentren como complejos cinéticamente lábiles³³⁹ serán retenidos por los soportes quelantes (Chelex-100 y I-HOx). No debemos confundir "*labilidad cinética*" con "*estabilidad termodinámica*" ya que como veremos, ciertos complejos muy estables termodinámicamente son retenidos en la columna mientras que otros complejos menos estables no lo son debido a su lentitud para reaccionar.

5.1 Especiación por discriminación cinética.

Los iones metálicos que aparecen en medios naturales no sólo se encuentran como acuo-complejos, dado que el medio natural provee una gran variedad de ligandos inorgánicos (cloruros, carbonatos, etc.) y orgánicos (aminoácidos, ácidos húmicos). En el caso de sistemas acuáticos modificados por la actividad humana

debemos tener en cuenta además, la presencia de ligandos sintéticos utilizados en la formulación de productos de uso doméstico que son vertidos a los desagües (i.e. NTA, EDTA).

Como los iones metálicos se encuentran, en general, en bajas concentraciones, es muy probable que los ligandos se encuentren en exceso respecto a ellos. En nuestro trabajo nos ocupamos de metales tóxicos como el Cd, de origen netamente antropogénico³³³ que se encuentra en aguas naturales no poluídas en concentraciones de 10^{-8} M o menores. En este entorno químico, es probable que gran parte del Cd se encuentre formando compuestos de coordinación con los ligandos presentes³⁴⁰.

Desde el punto de vista ambiental es necesario conocer si los iones metálicos se encuentran ó no en la forma de especies que puedan ser incorporadas a los tejidos vivos. El modelo del Ion Libre (Free Ion Model, FIAM³²⁹) predice que la concentración intracelular de iones metálicos es proporcional a la concentración del **ion libre** (acu-complejo) en la solución que rodea al organismo. Este modelo utiliza solamente consideraciones termodinámicas donde la variable principal son las concentraciones en el equilibrio. Una de las condiciones de contorno del FIAM es que las reacciones en la fase acuosa sean mucho mas rápidas que la velocidad de acumulación intracelular. Es por ello que en general se reemplaza la concentración del ion libre por la concentración de todos los complejos inorgánicos lábiles, indistinguibles experimentalmente unos de otros puesto que están relacionados a través de equilibrios muy rápidos.

En el caso de complejos hidrofílicos muy estables con altas velocidades de formación (como los formados con el EDTA), la presencia de ligandos sólo puede disminuir los efectos tóxicos del Cd ya que la reacción de liberación del ion metálico es lenta lo que impide su incorporación al organismo vivo. Existen también ligandos que forman complejos menos estables que los anteriores pero cuyas reacciones de disociación del complejo son muy lentas, con lo cuál el tiempo de liberación del metal puede ser mayor que el de adsorción e incorporación en la célula dejando al tóxico como “no disponible”. Este es el caso de la materia orgánica disuelta, como los ácidos húmicos (HA) dónde las concentraciones del equilibrio se alcanzan con lentitud^{341, 342}. Cuando los metales se encuentran unidos a ligandos para dar complejos cinéticamente inertes, el proceso de bioacumulación no puede ser predicho sólo en base a consideraciones termodinámicas, puesto que aunque el equilibrio esté favorecido

hacia la adsorción sobre la célula, ello puede ocurrir muy lentamente por lo que el metal no se acumula.

Desde el punto de vista de la química analítica aplicada a procesos de bioacumulación, es necesario contar con un sistema de análisis que sea capaz de detectar no solo la estabilidad de los complejos metálicos frente a grupos quelantes superficiales, sino también su labilidad es decir, la velocidad con la que intercambian sus ligandos por otros. Es deseable que sean retenidos sólo aquellos complejos lábiles cuya reacción de intercambio de ligandos con la resina sea favorable, esto es, aquellos que formen complejos de baja o media estabilidad con los ligandos. La idea emergente es utilizar una técnica analítica *rápida* que reproduzca a grandes rasgos el proceso de bioacumulación y que brinde información sobre la especiación de manera operacional (fracción lábil y no lábil).

Este tipo de especiación operacional puede llevarse a cabo por discriminación cinética. La especiación por discriminación cinética es un método cinético de análisis, como lo son también los métodos catalíticos³⁴³. Podríamos clasificar a los métodos de discriminación cinética en flujo como una clase especial de métodos cinéticos de análisis diferencial. Estos métodos utilizan como estrategia las diferencias en las velocidades de reacción de dos o mas analitos (o dos especies de un mismo analito) con un único reactivo, que en nuestro caso es el material quelante.

La discriminación cinética puede llevarse a cabo en un sistema FIA dadas sus características inherentemente dinámicas. A pesar de ello, la mayoría de los métodos de análisis no explotan las características de trabajo en condiciones de no-equilibrio del FIA³⁴⁴ y se centran principalmente en automatizar técnicas que trabajan en el equilibrio.

La caracterización de una fracción como “bioacumulable” dependerá de variables químicas del entorno tales como pH, fuerza iónica, concentración y clase de ligandos y metales concomitantes. Por lo tanto, los resultados siempre deben considerarse como provenientes de una especiación “operacional” y no de una especiación química completa.

5.2 Polímeros naturales Complejantes de metales pesados.

La biodisponibilidad de los metales pesados se ve afectada por ligandos presentes en la materia orgánica natural. La materia orgánica de suelos y aguas consiste en una mezcla de productos de origen animal y vegetal en distintos estadios de

descomposición. Junto a ella es posible encontrar sustancias sintetizadas biológica o químicamente a partir de éstos productos de descomposición³⁴⁵.

La fracción no-húmica de esta materia orgánica esta compuesta por sustancias de estructura conocida con grupos químicos definidos tales como: carbohidratos, proteínas, péptidos, aminoácidos, grasas, ceras, resinas, pigmentos y otras estructuras de bajo peso molecular. En general la vida media de estas sustancias es corta ya que son fácilmente atacadas por la flora bacteriana y es por eso que la mayor parte de la materia orgánica en suelos y aguas, corresponde a sustancias húmicas.

Las sustancias húmicas son amorfas, marrones o negras, ácidas e hidrofílicas ; y poseen un rango de pesos moleculares que abarca desde cientos a varios cientos de miles. Se trata de una mezcla de polímeros de diversos pesos moleculares que tiene como característica principal el de ser “polidispersa”. La polidispersidad (D) describe la homogeneidad de pesos moleculares de una mezcla de polímeros y se define como :

$$D=M_w/M_n$$

Donde M_n y M_w son la masa molecular media en número de partículas y la masa molecular media en peso respectivamente:

$$M_n=\Sigma(N_iM_i)/N_i$$

$$M_w=\Sigma(N_iM_i^2)/N_iM_i$$

(N_i es la abundancia de la fracción con masa molecular M_i). Una polidispersidad mayor o menor que 1 indica que la distribución de pesos moleculares no es homogénea y que es asimétrica con respecto al peso molecular medio.

Las sustancias húmicas se dividen de acuerdo a su solubilidad en tres fracciones mayoritarias :

- Ácidos húmicos (HA), solubles en NaOH 0.5 M, pero insolubles a pH=2.
- Ácidos fúlvicos (FA), que es la fracción de ácidos húmicos solubles a pH=2.
- Huminas, que no pueden extraerse del suelo ni con ácidos ni con bases.

Las sustancias húmicas se hallan en todo tipo de muestras ambientales: suelos, sedimentos, cenizas volcánicas, carbón, agua de mar, lagunas, ríos y estuarios. Su síntesis se basa en residuos vegetales que contienen ligninas, carbohidratos y proteínas.

Desde el punto de vista estructural, las tres fracciones que componen las sustancias húmicas son similares, difiriendo solamente en peso molecular y en el porcentaje relativo de algunos grupos funcionales (los FA son mas livianos y mas ricos en grupos carboxilo). Hasta el presente no existe una estructura exactamente conocida para los HA pero se acepta la presencia de grupos fenólicos, carboxílicos, y quinoideos.

La determinación de pesos moleculares que, como hemos dicho, abarcan un amplio rango se realiza por distintos métodos, entre ellos :

- Presión osmótica, destilación y crioscopia para determinar el M_n .
- Viscosidad y filtración de geles para determinar el M_w .

Puesto que los HA y FA son polidispersos, los valores de M_w en general son mayores que los de M_n ³⁴⁶ ($D>1$), lo que habla de su inhomogeneidad en pesos moleculares. Queda claro que las sustancias húmicas no son un único compuesto químico definido y hasta el presente no se ha logrado consenso sobre ninguna estructura en particular.

Sin embargo, con los avances en técnicas de modelado molecular, se han producido algunas mejoras en la comprensión de su estructura. El enfoque clásico proponía modelar a los HA a partir de compuestos monoméricos conocidos tales como el ácido malónico, el ácido ftálico, el ácido salicílico, o el catecol. Algunos autores han propuesto nuevos monómeros mas complejos que responden mejor a las propiedades físicas y químicas del polímero^{347, 348}. Sin embargo, sólo muy recientemente se ha descrito un monómero sencillo capaz de ser modelado utilizando computadoras de mediano costo³⁴⁹. Esta estructura se llama “bloque constructivo” del polímero de HA y representa una fórmula *promedio* de una molécula real (Figura 5.1). Este monómero presenta siete centros quirales por lo que existen muchas posibilidades para su conformación y por ende, para la caracterización de sus propiedades biológicas y químicas. La polimerización de estos monómeros se hace a través de enlaces tipo amida entre un grupo carboxilo y el grupo amino. La mayoría de los isómeros generan hélices al azar, pero si el isómero es el correcto, se genera una estructura helicoidal compacta y estable. La naturaleza helicoidal del polímero produce un interior donde se agrupan los grupos funcionales hidrofóbicos y una superficie exterior que contiene grupos funcionales carboxilato, amino y fenolato.

Estos grupos pueden estar cargados dependiendo del pH y la fuerza iónica de la solución y tienen gran importancia porque son capaces de coordinar metales de transición.

Desde el punto de vista de la formación de complejos metálicos, las sustancias húmicas se comportan como biopolímeros tridimensionales que generan huecos de diferente tamaño en su estructura. En estos huecos se produce la interacción metal-HA. En general la complejación de metales se produce por quelación entre grupos fenólicos y carboxílicos vecinos. En el caso del Cd, si observamos los complejos formados con los equivalentes monoméricos de los ácidos húmicos, las constantes de formación se encuentran en el rango 10^4 - 10^7 . Sin embargo, se pueden producir grandes diferencias en las constantes de formación dependiendo del origen de los HA.

Los ácidos húmicos poseen una diversidad de sitios capaces de complejar iones, cada uno de ellos con diferente afinidad. En general, se observa que los grupos que generan uniones débiles sólo complejarán metales cuando los grupos generadores de uniones fuertes hayan sido saturados. La manera mas común de describir las propiedades de formación de complejos es a partir de titulaciones complejométricas y el posterior ajuste de las curvas obtenidas mediante algoritmos matemáticos.³⁴⁵.

5.3 Especiación por efecto de tamiz molecular.

La discriminación cinética se basa en diferencias en la reactividad química de los iones en solución y en las características de los grupos funcionales de los soportes quelantes, sin embargo, la **hipótesis básica** de la especiación por discriminación cinética es afirmar que el soluto *entra en contacto* con la resina.

Hemos visto que las resinas de intercambio iónico se comportan como una red tridimensional polimérica que contiene poros de distinto tamaño revestidos por una fase gel. Esta red de poros puede actuar como un “tamiz molecular” y filtrar especies cuyo tamaño sea muy grande como para ser acomodado dentro del polímero. En las aguas naturales existen muchas especies solubles y coloidales cuyos pesos moleculares pueden ser suficientemente altos como para restringir su acceso a los sitios activos que se encuentran dentro de la estructura de poros de los materiales quelantes.

Esta propiedad del soporte extiende las posibilidades dentro del esquema de especiación: Chelex-100 y I-HOx ofrecen la posibilidad de discriminar entre especies

por su reactividad química a distintos pH, así como separar especies metálicas pequeñas de otras macromoleculares o asociadas a coloides por adsorción y oclusión. Por ejemplo, algunos autores han reportado que los iones adsorbidos por partículas coloidales de hidróxido férrico no son retenidos por la resina Chelex-100³⁵⁰.

En aguas naturales, suelos y sedimentos, es necesario distinguir analíticamente entre los metales unidos a material disuelto y a material particulado. Esta distinción no puede realizarse sólo por filtración porque la distribución de tamaños de los componentes acuáticos varía de forma continua entre los angstroms y los micrones³⁴⁵. En éste trabajo, todas las muestras analizadas, fueron filtradas previamente por membranas de poros de 0.45 μm . Sin embargo, el límite arbitrario de 0.45 μm puede no ser suficiente para retener ciertos coloides y, sobre todo, ciertos compuestos macromoleculares formados por sustancias húmicas. El uso de resinas de intercambio iónico para separar especies iónicas de especies coloidales está mucho menos sujeto a posible contaminación que otros como la diálisis o la filtración secuencial⁵. Este método está basado en la suposición de que el tamaño de poro efectivo de la resina es demasiado pequeño como para permitir la entrada de partículas coloidales.

Los solutos con un peso molecular superior al denominado corte de pesos moleculares de la resina (MWCO) son totalmente excluidos y sólo entran en contacto con la superficie externa de las partículas de polímero. Esta superficie externa contribuye sólo en una pequeña fracción a la superficie total del polímero (que esta mayormente compuesta por la superficie del “laberinto” de poros), por lo que la reacción de complejación es despreciable. Los solutos con pesos moleculares menores al MWCO penetran paulatinamente en la red de poros a medida que sus dimensiones hidrodinámicas se hacen mas pequeñas. Esto hace que los tiempos de contacto soluto-resina aumenten progresivamente alcanzando un máximo para moléculas de pequeñas dimensiones. La morfología de las resinas tiene, por lo tanto, un efecto significativo sobre la especiación por discriminación cinética ya que los tiempos de contacto son función del tamaño hidrodinámico del soluto en la solución.

5.4 Resultados y discusión.

5.4.1 Ligandos que acompañan al cadmio en aguas naturales. Cálculo de concentraciones de especies en el equilibrio en soluciones modelo.

Los iones metálicos en aguas naturales están acompañados de una gran variedad de ligandos (Tabla 5.1). Estos ligandos pueden formar complejos de alta, mediana o baja estabilidad con los iones, disminuyendo su actividad y por lo tanto su biodisponibilidad.

Los ligandos inorgánicos se encuentran bien caracterizados y debido a su alta concentración respecto de la de los metales pesados, pueden determinar su especiación. A diferencia de los ligandos inorgánicos, los ligandos orgánicos no se encuentran tan bien caracterizados y la mayoría de las veces, sólo se cuenta con información a través de parámetros colectivos como CDO, TOC y DOC^{§§§}. En muchas aguas, también se encuentran ligandos de fuentes antropogénicas tales como el EDTA y el NTA.

El efecto de los ligandos inorgánicos sobre la especiación de los metales traza es similar en agua de mar y en agua dulce excepto en el caso de los metales de la clase “B”, como el Cd y el Pb, que en agua salada forman complejos clorurados dada la alta concentración de este ligando.

En aguas dulces y saladas, también ocurre complejación por la presencia de compuestos húmicos de origen sedimentario³⁵¹ y, en algunos casos, por ligandos selectivos de ciertos metales pesados como las fitoquelatinas (ligandos de la clase de los sideróforos exudados por algunos microorganismos en condiciones de deficiencia nutricional de hierro). Sin embargo, debido a la alta concentración de metales alcalino-térreos en el agua de mar y a la menor concentración de materia orgánica, la complejación de metales pesados por sustancias húmicas es menor que en aguas dulces. El efecto de los alcalino-térreos sobre el material húmico procede a través del bloqueo de sitios activos por Ca y Mg.. Sin embargo, la complejación por materia húmica en agua de mar puede seguir siendo significativa, como se ha mostrado para Cu y Pb³⁵².

La complejación por ligandos inorgánicos y orgánicos en aguas naturales ocurre simultáneamente. Nos enfrentamos a sistemas en los que ocurren equilibrios múltiples

^{§§§} COD: “Chemical Oxygen Demand”, TOC: “Total Organic Carbon”, DOC: “Dissolved Organic Carbon”.

entre H^+ , ligandos, metales y partículas en suspensión. Estos equilibrios forman una intrincada red de interacciones cuya situación de equilibrio puede modificarse simplemente mediante el cambio de una variable.

Debido a ésta complejidad, la fracción lábil de Cd se estudió a través de soluciones modelo sintéticas las que se fabricaron mediante la adición de distintos ligandos de ocurrencia natural en concentraciones crecientes. La concentración de Cd se mantuvo muy baja ($8,89 \cdot 10^{-10}$ M), en un todo de acuerdo a las concentraciones halladas en aguas naturales (ver Capítulo 4). Muy pocos son los trabajos que utilizan concentraciones en este rango dada la dificultad de detección de las distintas especies¹⁵. Algunos autores¹⁶⁷ han estudiado la influencia de distintos ligandos en la recuperación del Cd por resinas quelantes en concentraciones de metal y de ligando demasiado altas como para ser representativas de un sistema natural, limitación que era impuesta por la instrumentación de dos décadas atrás. La concentración de Cd en aguas naturales se encuentra en el rango de los $ng\ l^{-1}$ y por lo tanto las soluciones modelo deben ajustarse al caso real.

En nuestras experiencias, la concentración de todos los ligandos ensayados se varió entre 10^{-9} M y 10^{-5} M para contemplar situaciones estequiométricas y sobre estequiométricas como en sistemas reales. Como ligandos modelo se escogieron distintos compuestos, cada uno de ellos representativo de un grupo particular, a saber:

- **EDTA:** (ácido etilendiamintetracético) es un poderoso ligando hexadentado que coordina a través de 4 grupos carboxilato y dos nitrógenos formando quelatos sumamente estables del tipo *ML*. Es un contaminante antropogénico y se lo encuentra en concentraciones típicas en el rango de 10^{-8} a 10^{-7} M¹⁴. Se lo ha hallado como contaminante en aguas naturales de Suiza, Alemania y Estados Unidos. Las fuentes de EDTA en aguas naturales son diversas, por ejemplo: productos de limpieza industrial, productos de la industria fotográfica y detergentes de uso doméstico. El EDTA no se degrada en las plantas de tratamiento de efluentes¹⁴ y por lo tanto, los cursos de aguas naturales reciben aportes sustanciales desde las redes cloacales. La concentración de EDTA en aguas naturales puede ser entre 10 y 100 veces mayor que la de Cd.

- **NTA:** (ácido nitrilotriacético). Forma complejos de alta y media estabilidad con metales pesados en relación ML y ML₂. Es un ligante tridentado que coordina a través de tres grupos carboxilos. Su origen principal es el de los detergentes domésticos y su concentración en aguas naturales se encuentra en el rango 10⁻⁹ a 10⁻⁸ M³⁵³. La principal diferencia con el EDTA consiste en la menor estabilidad de sus complejos. Además, al tratarse de un ligante tridentado es sustituido por otros ligandos en la esfera de coordinación del ion metálico más rápidamente que sus análogos hexadentados³³⁹.
- **Glicina:** es el aminoácido mas simple. Es un ligando bidentado asimétrico, que posee un grupo amino y un grupo carboxilo. Se encuentra en sistemas acuosos naturales en mayores concentraciones que los anteriores (10⁻⁷-10⁻⁵ M) y proviene de procesos de degradación de proteínas. Sirve como modelo de un ligando natural de bajo peso molecular que se encuentra en concentraciones medianas.
- **Cloruro:** dada la alta estabilidad de los complejos clorurados de Cd y su alta concentración en agua de mar, se lo ensayó como el ligando inorgánico por excelencia. Su concentración en aguas naturales puede variar entre 10⁻³ M (en aguas dulces) y 0.5 M (en agua de mar).

La Figura 5.2 muestra las concentraciones en el equilibrio en las soluciones modelo calculadas con el programa MINEQL⁺³⁵⁴. Los cálculos se hicieron a dos valores de pH diferentes (5.2 y 9.0), coincidentes con los utilizados para la preconcentración con Chelex-100 (buffer ácido acético/acetato de amonio, pH=5.2 ± 0.2) y con I-HOx (buffer amoníaco/cloruro de amonio, pH= 8.7 ± 0.3). En la Tabla 5.2 se muestran las constantes condicionales de formación de complejos de Cd para todos los ligandos a distintos valores de pH. Estas soluciones modelo se sometieron al proceso de preconcentración usando el sistema FI-ETA-AAS descrito en el Capítulo 1 usando como rellenos de columna Chelex-100 e I-HOx.

Para el caso del EDTA vemos que en relaciones metal:ligando mayores o iguales a 10, el metal se encuentra completamente complejoado, independientemente del pH. Si

aumentamos la concentración de EDTA por encima de 10^{-8} M la concentración de Cd(EDTA)^{-2} permanece constante y la concentración de EDTA libre aumenta. A pesar de que la concentración de Cd(EDTA)^{-2} es constante en todas las soluciones modelo con $\text{p[ligando]} \geq 8$, la cantidad de Cd que se recupera de ellas en el proceso de preconcentración no es la misma. Esto evidencia que dentro de la microcolumna ocurre un proceso fuera del equilibrio, como veremos en la próxima sección.

En el caso del NTA, la complejación tiene mayor dependencia con el pH: a bajo pH ($K_{\text{cond}} \ll K_a$) el Cd se encuentra predominantemente libre, excepto a altas relaciones ligando:metal. Cuando el pH es alcalino la constante de formación condicional tiende a la constante de formación absoluta y la concentración de Cd libre es muy dependiente de la concentración de ligando. Sólo cuando la relación ligando:metal es mayor o igual a 100, el Cd se encuentra totalmente complejoado.

Las soluciones que contienen glicina presentan muy bajas concentraciones de los complejos metal-glicina. En éstos sistemas, cuando el pH es alcalino, es importante la presencia de la especie mono hidroxilada de Cd. Para las soluciones con cloruros vemos que la formación del complejo clorurado nunca supera el 5%. Es esperable que la concentración de los complejos clorurados aumente si se aumenta la concentración de cloruros por encima de éste valor, sin embargo, la pureza de los reactivos impide ensayar concentraciones superiores a las usadas, puesto que el blanco de reactivos se hace muy grande.

5.4.2 Especiación de Cd en presencia de materia orgánica disuelta.

Complejación por compuestos húmicos.

Además de los ligandos mencionados (EDTA, NTA, glicina y cloruro), se estudió la especiación de Cd en presencia de ácidos húmicos puesto que son los ligandos mayoritarios en muchas aguas naturales. Las sustancias húmicas son un desafío mayor que los otros ligandos ensayados ya que se desconocen las constantes de formación de los complejos de Cd. Para calcular la especiación en el equilibrio de Cd es necesario cuantificar las distintas especies. No es posible utilizar constantes de formación informadas por otros autores salvo que la muestra de ácidos húmicos utilizada sea idéntica ya que existe una gran variación de las propiedades químicas de las sustancias húmicas dependiendo de su procedencia³⁵⁵. También es necesario

determinar la composición y peso molecular de la muestra de ácidos húmicos empleada.

El análisis por GPC revela que la muestra comercial de ácidos húmicos está compuesta por una mezcla de dos compuestos, uno de masa igual a 760 Da y el otro de masa 391 Da (Figura 5.3 y Sección 7.3.13). La polidispersidad ("D") de los dos picos obtenidos por GPC fue cercana a uno, lo que indica que corresponden a compuestos prácticamente puros.

La determinación de las constantes de formación de complejos metálicos de HA se lleva a cabo tradicionalmente por titulación de una solución de concentración conocida de los mismos con volúmenes crecientes de una solución del metal en cuestión. La evolución de la titulación se sigue a través de un electrodo de ion selectivo para el metal. En el caso del Cd, no existen electrodos de ion selectivo lo suficientemente sensibles como para detectar concentraciones en el rango de 10^{-9} M, por lo que se desarrolló un procedimiento especial para éste ámbito de concentraciones que se describe en Materiales y Métodos.

Una vez obtenidas las curvas de titulación, éstas se ajustan mediante el uso de un modelo del que se pueda obtener el valor de las constantes de formación de los complejos y la concentración de sitios activos. Puesto que la mezcla de ácidos húmicos está compuesta por dos componentes, el modelo mas sencillo sería el de dos ligandos distintos (Tabla 5.4). Sin embargo, el modelo de dos ligandos con distintas constantes de equilibrio no pudo ajustarse a las curvas de titulación experimentales. Durante el proceso de ajuste, el valor de una de las dos constantes de formación usadas como parámetros variables se acerca asintóticamente a cero lo que indica que ese componente carece de importancia química y se puede recurrir a un modelo mas sencillo que reduce el número de ligandos a uno³⁵⁶. Se optó entonces, por un modelo sencillo de un solo ligando de estequiometría "ML" tal como el usado por otros autores en situaciones similares^{357, 358}(Tabla 5.4). Las curvas de titulación de una solución que contiene 7 mg l^{-1} de HA se muestran en la Figura 5.4.

Los resultados del ajuste de las curvas de titulación se muestran en la Tabla 5.5. El valor de la constante de formación obtenida es de $5,4 \cdot 10^4$ lo que confirma que los complejos Cd-HA poseen una estabilidad intermedia entre los complejos de NTA y los de glicina³⁵⁹. Estos resultados son similares a los informados para Cd^{+2} ³⁶⁰ y para otros metales como el Pb^{+2} y el Zn^{+2} ³⁵⁷. A pH 8.7, la concentración total de ligandos para una solución de 7 mg l^{-1} de HA calculada a partir de los resultados de GPC es 1,1

$\cdot 10^{-5}$ M. A valores de pH iguales a 5.2, la concentración de grupos activos se obtiene del ajuste de la curva de titulación. A ese valor de pH, la concentración efectiva de ligandos cae a $2,8 \cdot 10^{-6}$ M. Esta disminución en la concentración de grupos activos en la solución se debe a la protonación de los grupos funcionales capaces de coordinar al Cd.

De la disminución en la concentración efectiva de ligandos, es posible estimar un valor de pKa para los grupos activos. El valor estimado de pKa es de 5.8 ± 0.3 . Este valor concuerda con el valor de pKa de los distintos grupos funcionales presentes en la estructura tentativa para los ácidos húmicos mostrada en la Figura 5.1.³⁴⁹. Los grupos quelantes de los HA corresponderían a compuestos estructuralmente similares a ácidos carboxílicos insaturados tales como el ácido itacónico ($C_5H_6O_4$, $pK_{a1}=3.85$, $pK_{a2}=5.45$).

Es interesante destacar que la estructura propuesta para el monómero de HA por Sein et al.³⁴⁹ tiene un peso molecular de 741 Da lo que es muy próximo al valor obtenido por GPC para el pico de mayor masa. El pico de menor masa podría ser un producto de hidrólisis del ligando mas pesado, que retuviese la misma clase de grupos funcionales, por lo que la constante de formación sería la misma.

5.4.3 Labilidad en función de la concentración de ligandos para las soluciones modelo

Conocidas las especies y su concentración en cada una de las soluciones modelo, veremos como afectan a la retención de Cd por parte de las resinas quelantes utilizadas en el sistema FI-ETA-AAS. Las Figuras 5.5 y 5.6 muestran la recuperación del Cd de las soluciones modelo, tanto para el sistema que utiliza Chelex-100 como para el que utiliza I-HOx. Para caracterizar la labilidad del cadmio en cada caso, definimos su recuperación ("X") como la fracción de metal retenida en la columna (CdR) con respecto a la concentración total (Cd_0):

$$Recuperación = X = \frac{[CdR]}{Cd_0}.$$

Una primera mirada a los valores de recuperacion con los dos soportes quelantes nos muestra que **I-HOx es mas reactiva que Chelex-100** ya que para el primero, la recuperación es del 100 % para todos los complejos formados con, por ejemplo, NTA a cualquier relación ligante:metal.

En la mayoría de los casos, la presencia de glicina no afecta la recuperación y el cadmio es retenido tanto por Chelex-100 como por I-HOx, excepto con altas concentraciones de glicina (10^{-5} M) donde la recuperación con Chelex-100 como soporte disminuye al 75% aproximadamente.

En presencia de exceso de NTA (10^{-6} - 10^{-5}) la recuperación del Cd frente I-HOx es completa, a pesar de que éste se encuentra completamente complejoado. A menores concentraciones de NTA la concentración del complejo Cd(NTA)^- disminuye y parte del Cd se encuentra libre por lo que la labilidad, con mayor razón sigue siendo completa. La recuperación del Cd frente a Chelex-100 es completa hasta concentraciones de NTA menores o iguales que 10^{-6} M lo que es lógico puesto que el complejo no es la especie predominante. En el rango de concentraciones de NTA entre 10^{-6} y 10^{-5} M la concentración de Cd(NTA)^- es cercana al 20% del total de las especies. Para una concentración de NTA de 10^{-6} M la recuperación frente a Chelex-100 se corresponde con la fracción de Cd sin complejar únicamente. Sin embargo cuando se incrementa la concentración de NTA 10 veces, la recuperación de Cd que debería ser del 80% (correspondiente a una concentración de Cd(NTA)^- cercana al 20%) cae a un valor menor del esperado (50%). Esta discrepancia puede deberse a impurezas en el NTA (como por ejemplo EDTA) que no pudieron ser removidas a pesar del proceso de recristalización al que fue sometido el NTA (ver Materiales y Métodos). Podemos concluir que el complejo Cd(NTA)^- es lábil frente a I-HOx y cuasi-lábil frente a Chelex-100.

El cadmio en presencia de cloruros no manifiesta una disminución en la recuperación sobre Chelex-100 ni sobre I-HOx, independientemente de la concentración de ligandos.

Los sistemas que contienen ligandos que forman complejos muy estables como el EDTA o cinéticamente inertes como los ácidos húmicos presentan los casos mas interesantes.

En soluciones modelo que contienen EDTA la especie predominante para valores de pH iguales a 5.2 y 9.0, es el complejo Cd(EDTA)^{2-} . En soluciones con concentraciones de ligando muy bajas (10^{-9} M) la recuperación no se ve afectada y es del 100%, a pesar de que el complejo se encuentra formado en un 100% a pH 8.7 y en un 85% a pH 5.2. En soluciones con concentraciones de EDTA mayores que 10^{-8} M la recuperación es casi nula independientemente de la resina utilizada. Cuando la concentración de EDTA es igual a 10^{-8} M se observa un efecto interesante: a pesar de

que la formación del complejo es completa, la recuperación no es nula, lo que evidencia que existe disociación del complejo frente a los ligandos superficiales del material quelante.

La recuperación del Cd en presencia de EDTA en una relación metal:ligando 1:10 depende de la resina que se utilice para la discriminación cinética. La recuperación es mayor en el caso de I-HOx puesto que la constante de formación del complejo Cd(oxina)^+ es mayor que la constante de formación del complejo $\text{Cd(iminodiacetato)}^+$ (Tabla 5.3) y por lo tanto es esperable que la sustitución del EDTA por los grupos oxinato inmovilizados en I-HOx sea mas favorable que la sustitución del EDTA por los grupos iminodiacetato de Chelex-100.

Cuando se forman complejos entre ácidos húmicos (HA) y Cd la recuperación es menor con I-HOx que con Chelex-100 a diferencia de los otros casos estudiados. El porcentaje de Cd recuperado de las soluciones modelo que contienen ácidos húmicos se corresponde aproximadamente al porcentaje de Cd que se encuentra como ion libre. Como la preconcentración con I-HOx se lleva a cabo a un pH mas alcalino que con Chelex-100, la formación de complejos a ese pH se ve favorecida, por lo que la concentración de Cd libre es menor³⁶⁰ y por ende su recuperación. Esto sugiere que los complejos Cd-HA no se disocian frente a ninguna de las dos resinas, probablemente debido a inercia en la reacción de intercambio de ligandos lo que también ha sido propuesto por Figura et al con una muestra de ácidos húmicos idéntica¹⁶⁷. Si la constante de acidez de los grupos quelantes en la molécula de HA fuese mayor, la constante de formación condicional de los complejos Cd(HA) sería idéntica a pH 5.2 y pH 8.7, por lo que no existirían diferencias en la recuperación con Chelex-100 o I-HOx.

Los resultados de recuperación del Cd en presencia de HA, EDTA, NTA y glicina frente a Chelex-100 coinciden aproximadamente con los publicados por Figura et al. para la misma resina¹⁶⁷. Las recuperaciones de los complejos de Cd con EDTA, NTA y glicina reportadas por Rodriguez Procopio et al.³⁴² fueron en todos los casos menores a las obtenidos en este trabajo, llegándose incluso a considerar que el complejo Cd(NTA)^- es inerte, a pesar de que su equilibrio de disociación es relativamente rápido ($k_{disoc}=1.6 \text{ s}^{-1}$, Raspor et al.³⁶¹). Obviamente, la definición de “inercia” depende del tipo de soporte utilizado para la retención: los autores han usado una resina de adsorción XAD-8 (matriz acrílica) que contiene una pequeña cantidad de grupos funcionales quelantes. Esta resina es empleada generalmente para

la retención de compuestos orgánicos pero no para la retención de cationes lo que explica su baja capacidad, que resultaría en una baja velocidad de desplazamiento de los ligandos.

Los métodos de especiación que utilizan la partición “en batch” presentan recuperaciones mucho mas bajas que los que utilizan columnas, requiriendo además mayores tiempos de reacción. Esto se debe a que en las técnicas en columna la concentración de grupos quelantes de la resina se encuentra en una relación con respecto al metal que puede ser de $10^5:1$ o superior. En las reacciones en batch³⁶², la relación resina:metal es en general 100:1, por lo que las reacciones de desplazamiento de ligandos son mas lentas. Las constantes de velocidad de disociación de complejos que se obtienen en las experiencias en batch son mucho menores, dado que las constantes son de pseudo primer orden y dependen de la cantidad de resina utilizada.

5.4.4 Especiación por discriminación cinética: consideraciones generales.

Hemos acumulado mucha evidencia experimental acerca del proceso de especiación por discriminación cinética. Queda claro que la clasificación de una especie compleja como “labil” o “inerte” depende no sólo de la clase de ligandos presentes en la muestra sino también de su concentración, de lo que dependerá la discriminación cinética que pueda darse entre varias especies.

La reacción global que ocurre durante el proceso de especiación por discriminación cinética es una reacción de intercambio de ligandos:



Donde R es el grupo quelante de la resina y L es el ligando en solución (se omiten las cargas para simplificar). Las especies “ML” pueden ubicarse en un diagrama ternario según la velocidad con la que ocurre esta reacción (Figura 5.7). En este diagrama las especies se pueden clasificar en lábiles, poco lábiles, cuasi inertes e inertes. Aunque arbitraria, esta clasificación es útil para un análisis rápido. La labilidad de una especie estará determinada por cuatro efectos:

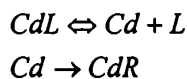
1. Las altas concentraciones de ligando “L” disminuyen la labilidad de una especie porque aumenta la velocidad inversa de reacción. La velocidad de la reacción inversa (“back reaction”) depende del valor de la constante de velocidad de ese paso (k_b) y de la concentración de ligandos L ($k_b \cdot [L]$ en la Figura 5.7). Nótese que la importancia de la relación metal:ligando en la labilidad operacional de Cadmio ya ha sido reconocida previamente³⁶².

2. Los ligandos que forman complejos cinéticamente inertes (ácidos húmicos) cuya reacción de disociación es lenta tienen baja velocidad para el paso “hacia adelante” de la sustitución de complejos, por lo que tienen una baja recuperación (i.e. baja constante del paso “forward”: k_f , Figura 5.7). Si la formación del complejo es completa, la recuperación es cercana a cero.
3. Las resinas muy reactivas, que forman complejos de gran estabilidad con el metal, secuestran completamente a los iones en solución haciendo que muchas especies se comporten como lábiles en un amplio rango de concentraciones de ligandos****. Para realizar especiación por discriminación cinética es preferible una resina de reactividad mediana como por ejemplo Chelex-100.
4. Los complejos poco estables (glicina, cloruros, oxidrilos) son lábiles y se disocian en presencia de los grupos funcionales de la resina. Los complejos de muy alta estabilidad son poco retenidos (i.e. EDTA en relaciones ligando:metal ≥ 100 a todo pH).

5.4.5 La influencia del flujo de muestra

El flujo de la muestra a través de la columna de intercambio determinará el tiempo de reacción (o contacto) entre los complejos y el relleno lo que a su vez, determinará la magnitud de la recuperación. Puesto que es posible variar el flujo a través de la columna, podemos “sintonizar” el sistema para recuperar solamente las fracciones más lábiles de los metales tóxicos obteniendo, de esta manera, un correlato biológico.

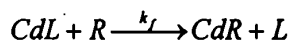
Como primer paso, es necesario explicar la reacción de disociación de los complejos metálicos frente a la resina de intercambio iónico por lo que utilizaremos un modelo cinético. Existen dos mecanismos posibles. Uno de ellos tiene como primera etapa la disociación del complejo metálico y como segunda la complejación del ion liberado por la resina:



Este mecanismo se conoce como mecanismo “ABX” o mecanismo disyuntivo³⁶³⁻³⁶⁵. Otra posibilidad es un mecanismo adjuntivo donde la substitución de ligandos ocurre concertadamente, sin liberación previa del metal.

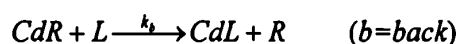
**** Si la retención de los metales es extremadamente fuerte, su elución puede ser incompleta e incluso imposible, recordemos el caso de la resina impregnada con ácidos alquilditioditiofosfóricos, SIR-1.

En nuestro sistema la reacción global de intercambio de ligandos ocurre con una estequiometría global que responde a la siguiente reacción:



Donde L es el ligando y R representa al grupo superficial quelante de la resina. A pesar de que las reacciones de sustitución de ligandos pueden ocurrir a través de los dos mecanismos mencionados (disyuntivo y adjuntivo), por el momento englobaremos todos los procesos dentro de una constante global de velocidad " k_f ". ($f=forward$).

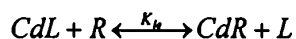
Dado que la reacción de intercambio iónico es muy favorable termodinámicamente, muchos autores desprecian el paso inverso de la reacción de intercambio de ligandos:



Sin embargo, la existencia de este paso se corrobora por dos hechos experimentales corroboran su existencia:

- La resina puede ser eluída con complejantes fuertes concentrados (EDTA 0.5 M por ejemplo).
- Un aumento en la concentración inicial de ligandos produce una disminución en la cantidad de metal retenido en la columna. Si el paso inverso de la reacción no fuese tenido en cuenta, la concentración inicial de ligandos no debería tener efecto sobre la velocidad de reacción y la recuperación sería función sólo de la concentración de complejo tal como plantean algunos autores¹⁸⁶.

Por lo tanto la reacción global debe ser planteada correctamente como:



donde L y R son los grupos quelantes deprotonados y la constante de *equilibrio* de intercambio de ligandos (K_{le}) es:

$$K_{le} = \frac{k_f}{k_b} \quad (le=ligand\ exchange)$$

La velocidad de aparición del complejo es:

$$\frac{d[CdL]}{dt} = -k_f \cdot [CdL] \cdot [R] + k_b \cdot [CdR] \cdot [L]$$

Utilizamos unidades de concentración en moles l^{-1} para todas las especies y en el caso de los grupos funcionales de la resina, calculamos su concentración dentro del volumen de líquido contenido en los poros.

El balance de masa para la solución es:

$$Cd_0 = [CdL] + [CdR]$$

Para simplificar las ecuaciones cinéticas definimos constantes de pseudo primer orden que incluyen las especies cuya concentración permanece aproximadamente constante:

$$k_f' = k_f \cdot [R]$$

$$k_b' = k_b \cdot [L]$$

Podemos suponer que $[R]$ será aproximadamente constante si no trabajamos a saturación de la columna. En las experiencias realizadas nunca se supera el 0.003% de la capacidad por lo que esta suposición es correcta. La concentración del ligando será constante en relaciones ligando: metal iguales o mayores a 10:1 (con una máxima variación del 10%).

Utilizando el balance de masa, las definiciones de constantes de pseudo primer orden y reordenando las ecuaciones, la variación de la concentración de complejo puede expresarse como:

$$\frac{d[CdL]}{dt} = k_f' \cdot Cd_0 - (k_f' + k_b') \cdot [CdR]$$

En la ecuación anterior:

$$\frac{d[CdL]}{dt} = - \frac{d[CdR]}{dt}$$

lo que nos permite integrar la ecuación diferencial si incluimos la definición de recuperación ($X = \frac{[CdR]}{Cd_0}$). Integrando con respecto a la recuperación "X" se obtiene

la siguiente expresión:

$$\ln \left(1 - \left(1 + \frac{[L]}{K_{le} \cdot [R]} \right) \cdot X \right) = -k_f' \left(1 + \frac{[L]}{K_{le} \cdot [R]} \right) \cdot t. \quad (1)$$

Esta ecuación nos dice que un gráfico de $\ln(A \cdot X)$ versus el tiempo de contacto "t" debería dar una línea recta de cuya pendiente es posible calcular k_f' .

Los tiempos de reacción "t" son los tiempos de contacto entre la solución y la resina que se calculan con la siguiente expresión:

$$\tau = \frac{\varepsilon \cdot V_{col}}{\phi}$$

Donde ε es la fracción de volumen muerto de la resina (0.75 para Chelex y 0.29 para I-HOx), V_{col} es el volumen del lecho de la columna y ϕ es el flujo a través de la misma.

Para tener una visión más completa de la influencia de las distintas variables en la retención de los complejos sobre la resina, debemos incorporar dos fenómenos adicionales al modelo:

1. Los mecanismos adjuntivos y disyuntivos de intercambio de ligandos.
2. La dependencia de la concentración de L y R con el pH.

En el Apéndice se detalla como se incluyen estas variables dentro de la expresión (1). La relación entre la recuperación y el tiempo de contacto que se obtiene es la siguiente:

$$\ln \left(1 - \left(1 + \frac{\alpha_L \cdot L_0}{K_{le} \cdot \alpha_R \cdot R_0} \right) \cdot X \right) = -k_f' \left(1 + \frac{\alpha_L \cdot L_0}{K_{le} \cdot \alpha_R \cdot R_0} \right) \cdot t \quad (2)$$

Donde los símbolos tienen el siguiente significado:

- α_L : grado de disociación del ligando en solución (por ejemplo EDTA).
- α_R : grado de disociación de los grupos quelantes de la resina (cantidad de grupos en la forma oxinato en I-HOx por ejemplo).
- L_0 : concentración total de ligandos en solución. (concentración analítica de EDTA por ejemplo).
- R_0 : concentración total de grupos quelantes inmovilizados en el volumen de poros de la resina. (capacidad específica de la resina / volumen de poros específico).
- K_{le} : constante de equilibrio de intercambio de ligandos.
- k_f' : constante de velocidad de pseudo primer orden de la reacción de intercambio de ligandos directa (“hacia delante”).
- X : recuperación.
- t : tiempo de contacto.

La expresión (2) es similar a la expresión (1) pero en este caso los términos se encuentran desarrollados para mostrar las contribuciones del pH. Además, el

significado de k_f' es diferente. Dentro de la constante experimental de partición k_f' se encuentra la contribución de los mecanismos disyuntivo y adjuntivo ya que $k_f' = k_{disoc} + k_{adj} \cdot [R]$.

Si intentamos explicar el proceso de retención en la resina solamente a través de la disociación $ML \rightarrow M + L$ e ignoramos la reversibilidad de la reacción, se cometen los siguientes errores en la determinación de k_f' :

- Al aumentar la concentración de ligandos, no habría cambio en k_f' , sin embargo, el valor de k_f' debe aumentar si la recuperación es la misma.
- Al aumentar K_{MR} , el efecto del paso $MR + L \rightarrow ML + R$ se hace menos notorio y cualquier modelo da los mismos resultados de k_f' .
- Si aumenta la capacidad de la resina o el grado de ionización de sus grupos quelantes (por aumento de pH), k_f' aumenta sólo si usamos el modelo reversible.
- Si aumenta α_L el valor de k_f' disminuye y converge al valor obtenido si solamente consideramos el paso de disociación del complejo sin incluir el paso de vuelta.
- Si ignoramos el mecanismo adjuntivo, sobrevaloramos la labilidad del complejo, puesto que la retención no sólo se debe a la disociación del mismo, sino también a la concentración de grupos funcionales de la resina.

Analicemos la influencia del tiempo de contacto en la recuperación del Cd en una solución del complejo $Cd(EDTA)^{2-}$ con una relación inicial metal:ligando 1:10. (Este sistema se ha seleccionado debido a que, en este caso, la recuperación del analito es intermedia y es posible observar con mayor facilidad las diferencias en recuperación que produce la variación del tiempo de contacto).

Los sólidos que contienen 8-hidroxiquinolina inmovilizada forman complejos 1:1 con los metales de transición ³⁶⁶ y lo mismo ocurre para la resina Chelex-100³⁰⁹, por lo que la estequiometría para las reacciones anteriores es correcta. La constante de equilibrio de intercambio de ligandos (K_{le}) puede calcularse a partir de las constantes de formación de los complejos entre Cd^{+2} y las resinas quelantes usadas, teniendo en cuenta la fracción de ligando libre (α) (Tabla 5.3). El valor de α para los grupos

funcionales de I-HOx a pH=8.7 es cercano a uno, por lo que todos los grupos funcionales son capaces de complejar Cd. La constante de intercambio de ligandos del sistema EDTA/Cd/I-HOX a pH=8.7 vale aproximadamente 1.10^{-4} por lo que la reacción de desplazamiento del EDTA por I-HOx es desfavorable. Sin embargo, debido a la alta concentración superficial de ligandos^{†††} y a la baja concentración de EDTA libre en el sistema ($\approx 10^{-8}$ M), la reacción procede hacia la formación del complejo Cd-oxina.

En la Figura 5.8(a) se muestra la influencia del flujo de la muestra en la recuperación sobre I-HOx. Se observa que, al aumentar el tiempo de contacto (disminuir el flujo), la retención aumenta lentamente. La fracción de Cd retenida puede interpretarse como la fracción lábil. Para flujos muy altos, la fracción lábil tiende asintóticamente a un valor que corresponde al 10% de la concentración de Cd lo que significa que para flujos altos, el complejo $\text{Cd}(\text{EDTA})^{-2}$ se comporta en un 90% como una especie inerte. El uso de altos flujos de muestra previene la disociación del complejo $\text{Cd}(\text{EDTA})^{-2}$ y produce una mejor distinción entre el Cd unido a ligandos y el Cd libre. El valor de flujo de muestra al cuál la concentración de Cd “lábil” tiende a un valor constante aumenta si se disminuye la concentración inicial de EDTA. En el caso de soluciones que tienen una concentración de EDTA diez veces menor a la mostrada en la Figura 5.8, no es posible, desde un punto de vista operativo, acortar los tiempos de contacto lo suficiente como para recuperar menos que el 100%. A la inversa, en soluciones con una relación Cd:EDTA 1:100, no es posible aumentar los tiempos de contacto lo suficiente como para recuperar mas que el 0%.

De la variación de la recuperación de Cd con el flujo de muestra es posible determinar la constante de velocidad de la reacción (k_f'), que da una medida de la labilidad del complejo $\text{Cd}(\text{EDTA})^{-2}$. Si hacemos una regresión lineal utilizando la ecuación (2), de la pendiente podemos calcular un valor de $k_f' = 6 \text{ seg}^{-1}$. Este valor es mayor que la constante de velocidad de disociación del complejo $\text{Cd}(\text{EDTA})^{-2}$ asumiendo un mecanismo puramente disyuntivo.

Diversos autores³⁴² asignan a la reacción de sustitución de ligandos un mecanismo disyuntivo. Si este mecanismo fuera válido la velocidad de retención de un complejo por la resina quelante estaría dada solamente por la velocidad de

^{†††} La concentración de ligandos en el espacio de los poros es aproximadamente 2M.

disociación del complejo metálico. Un mecanismo disyuntivo de intercambio de ligandos implicaría que el agua debe reemplazar secuencialmente a los grupos carboxilos del EDTA hasta disociar completamente el ligando, lo cuál es poco probable³⁶⁷ haciendo que la apertura del anillo quelato sea extremadamente lenta. Además, la recuperación del complejo $\text{Cd}(\text{EDTA})^{-2}$ sería siempre nula, independientemente de la concentración de ligandos. El valor estimado de k_{disoc} del complejo $\text{Cd}(\text{EDTA})^{-2}$ es de 4.10^{-7} s^{-1} ¹⁹⁶ por lo que la disociación directa del complejo no es factible. El complejo $\text{Cd}(\text{EDTA})^{-2}$ puede disociarse a través de un intermediario protonado $\text{Cd}(\text{HEDTA})^{-}$ sin embargo, a pH 8.7 este intermediario no existe en concentración considerable. El valor obtenido de la constante de velocidad de intercambio de ligandos (k_f) es de 2.8 s^{-1} lo que hace pensar en la existencia de otro mecanismo paralelo al disociativo para la retención de la especie Cd-EDTA que, probablemente, sea adjuntivo. Este mecanismo debe ser mas rápido que el mecanismo disyuntivo de manera tal que $k_f \approx k_{\text{adj}}$.

Tal como dijéramos antes, trabajos recientes³⁴² clasifican a los complejos $\text{Cd}(\text{EDTA})^{-2}$ como inertes. Sin embargo, hemos visto en nuestras experiencias que estos complejos pueden ser retenidos frente a resinas de intercambio. La aparente inercia observada es debida a la alta relación metal:ligando usada (1:125) y no a un bajo valor de k_f (justificable solamente con un mecanismo disyuntivo). Además, en el trabajo citado, los complejos con glicina son considerados cuasi-lábiles (con recuperaciones del 40% para los mismos tiempos de contacto), mientras que para I-HOx son completamente lábiles en idénticas concentraciones de ligandos. Si el mecanismo de disociación fuera puramente disyuntivo, los resultados no deberían variar con el tipo de resina utilizada.

5.4.6 Comparación de técnicas de especiación por discriminación cinética.

Como método analítico, la partición en resinas quelantes ha sido utilizada por diversos autores^{16, 167, 184-186, 362, 368}. El método más usado ha sido la partición vía resinas quelantes contenidas en columnas semimicro analíticas^{16, 167} aunque existe una cantidad considerable de trabajos que realizan la especiación en batch³⁶². Las técnicas en columna brindan la posibilidad de obtener tiempos de contacto menores que los de las experiencias en "batch". Con la aparición de las técnicas de preconcentración en

flujo se hizo posible el uso de columnas aún más pequeñas. Los pequeños volúmenes de lecho de estas microcolumnas (10 μl aproximadamente) y los flujos moderadamente altos (0.2 a 10 ml min^{-1}) hacen que los tiempos de contacto puedan variarse entre 10 ms y 3 s³⁴² lo que permite retener con buena selectividad la fracción más lábil seleccionando un flujo de operación lo suficientemente alto. Además, si se varía el flujo, puede obtenerse una estimación de la constante de velocidad de disociación k_f' .

La ventaja de los sistemas FIA que utilizan microcolumnas acopladas a detectores discretos como el horno de grafito es que trabajan con volúmenes de lecho del orden de 10 μl lo que, a los flujos estándar del trabajo en FIA, se traduce en tiempos de contacto del mismo orden que el correspondiente a los métodos voltamperométricos más rápidos. La técnica de partición sobre I-HOx en un sistema FIA presentada en este capítulo tiene tiempos de contacto que pueden variarse entre 0.10 y 0.01 segundos, dependiendo del flujo utilizado. Las técnicas voltamperométricas como la voltametría diferencial de pulso con electrodo colgante de mercurio (DPASV-HMDE) y la voltametría diferencial de pulso con electrodo de film de mercurio (DPASV-TMF-RGCDE)¹⁶ tienen tiempos de contacto que son de 1s y 0.1 s respectivamente¹⁶.

Desde el punto de vista de los tiempos de contacto, la labilidad de las especies en FI-ETA-AAS debería ser similar a la labilidad en DPASV-TMF-RGCDE. Sin embargo, en el primer caso la labilidad es mayor que lo predicho a través de los tiempos de contacto ya que en el proceso de partición interviene el ligando inmovilizado que desplaza al metal de su complejo. Este mecanismo está ausente en las técnicas electroquímicas, que logran una menor recuperación. De esta manera, las técnicas de partición en columnas como las presentadas aquí, aún operadas a muy bajos tiempos de contacto, incluyen dentro de la fracción de metal lábil a algunos complejos de mediana estabilidad. Esta desventaja desde el punto de vista operación-función está compensada por la fácil operación, alta frecuencia de análisis y gran sensibilidad.

Existen fenómenos secundarios que pueden complicar el análisis de especiación mediante voltametrías. Uno de ellos es la reducción sobre el electrodo de los ligandos presentes en “ML”, lo que puede volver inerte a ML y complicar innecesariamente el trabajo tal como ocurre cuando L es NTA¹⁸⁶. Otro inconveniente es la posible adsorción de compuestos húmicos sobre la superficie del electrodo de mercurio

cuando existe materia orgánica en solución, lo que altera las medidas de DPASV. Cuando se usan resinas quelantes ninguno de estos problemas existen.

5.4.7 Efectos adicionales: influencia de la morfología de las resinas sobre los tiempos de contacto.

La matriz polimérica de los soportes quelantes influye en los tiempos de contacto de los solutos dentro de la microcolumna ya que éstos son función de la fracción de volumen libre (“void volume”) del relleno de la columna (ε):

$$\tau = \frac{\varepsilon \cdot V_{col}}{\phi} \quad (1)$$

Este valor “ ε ” depende no solo del tipo de resina (Chelex-100 es mucho menos densa que I-HOx y por lo tanto su ε es mayor) sino también del peso molecular del soluto.

Las consideraciones cinéticas que realizáramos en apartados anteriores no incluyeron la posibilidad de modificación del tiempo de contacto debido al peso molecular del soluto, sin embargo, existe una “dimensión” adicional en la cual los soportes ensayados actúan selectivamente: el efecto de “tamiz molecular” que produce la matriz tridimensional de los soportes de intercambio iónico puede disminuir el tiempo de contacto entre el soluto y los grupos funcionales quelantes. Si el tamaño del soluto es muy grande, el tiempo de contacto puede ser cercano a cero y, por lo tanto la liberación de los átomos metálicos presentes en el mismo será nula mas allá de su labilidad.

Este efecto adicional de especiación por tamaño puede evaluarse cuantitativamente si el factor de volumen vacío “ ε ” se calcula como una función del diámetro hidrodinámico de los solutos (r) que atraviesan la columna, es decir: $\varepsilon = \varepsilon(r)$.

Para calcular el tiempo de contacto entre un soluto de diámetro hidrodinámico r y Chelex-100 o I-HOx, hacemos uso de los modelos utilizados para describir los macroporos de estas resinas (Capítulo 2, sección 2.1.1). El volumen de poros que un soluto de diámetro^{††††} r debe atravesar antes de eluir de la columna viene dado por:

^{††††} En el Capítulo 2 hemos llamado L al diámetro hidrodinámico, pero evitamos aquí esa nomenclatura para no confundirlo con los ligandos “ L ”.

$$(V_e - V_0)_r = \sum_{i=1}^{i=n} K_r^i \cdot V_p^i \quad (2)$$

Donde V_e , V_0 , K_r^i , L y V_p son el volumen de elución, el volumen muerto del sistema, el coeficiente de partición del soluto de dimensiones r en el poro “ i ” y el volumen de ese poro, respectivamente. Puesto que conocemos el flujo de la muestra a través de la columna, podemos calcular el tiempo de contacto soluto/resina dividiendo el volumen de elución corregido por el flujo de la muestra:

$$\tau = \frac{V_e - V_0}{\phi} \quad (3)$$

Este volumen de elución es función del tamaño molecular: los solutos muy grandes eluyen en un volumen de elución igual al volumen muerto ($V_e \rightarrow V_0$) y por lo tanto su tiempo de contacto con el relleno de la columna es casi cero.

El modelo que hemos usado para describir los poros de I-HOx y Chelex-100 consta de dos fracciones de poros cilíndricos (fracción I y fracción II) de 4 y 8 nm de diámetro respectivamente. Para calcular el tiempo de contacto para un soluto debemos calcular el volumen de elución corregido ($V_e - V_0$) que tendría ese soluto en una experiencia ISEC. Para ello obtenemos coeficientes de partición K para el soluto de tamaño r en las dos fracciones de poros (I y II) aplicando el modelo de poros cilíndricos. Esto produce un juego de coeficientes de partición $K_r^{(I)}$ y $K_r^{(II)}$ para cada soluto. Con estos coeficientes de partición, el volumen de elución corregido por efecto de tamiz molecular puede calcularse como:

$$V_e - V_0 = K_r^{(I)} \cdot V_p^{(I)} + K_r^{(II)} \cdot V_p^{(II)} \quad (4)$$

Si reemplazamos la expresión (4) en la ecuación (3) podemos calcular el tiempo de contacto para cualquier soluto dentro del intervalo de pesos moleculares usados en el calibrado de las corridas ISEC. Es importante destacar que nuestra discusión es válida sólo si la discriminación ocurre por tamaño y no existen otras interacciones

La Figura 5.9 muestra la disminución relativa en los tiempos de contacto para Chelex-100 e I-HOx en función del peso molecular del soluto. Para flujos idénticos, Chelex-100 presenta tiempos de contacto mayores que I-HOx. Esto caracteriza a I-HOx como un soporte con menor resolución en pesos moleculares. Cuando se calculan los tiempos de contacto entre los solutos y la resina, siempre se debe tener en cuenta el efecto de tamiz molecular que produce una disminución en los mismos.

Los complejos de Cd con glicina, NTA, EDTA y cloruros se encuentran por debajo del corte de peso molecular de ambas resinas (1500 Da) por lo que ninguno de ellos se ve completamente excluido, aunque sus tiempos de contacto sufren cierta disminución a medida que aumenta su peso molecular.

Los tiempos de contacto de las resinas con los complejos de ácidos húmicos también se ven parcialmente disminuidos. Los resultados obtenidos por GPC (Figura 5.3) muestran un pico de $M_r = 760$ Da (rango entre 1536-502) y otro de $M_r = 391$ (rango entre 453-238). Para el primer pico, la reducción en el tiempo de contacto es del 25 % si se usa Chelex-100 como soporte y del 40% si se usa I-HOx. El pico de mayor peso molecular sufre un retardo mayor: en el caso de Chelex-100 el retardo es del 35% y de I-HOx del 45%. Este pico presenta, además, una pequeña cola a masas mas altas que se extienden hasta 1500 Da aproximadamente. Para estos compuestos minoritarios el retardo es severo.

En el Capítulo 2 hemos asignado a ambas resinas un corte de peso molecular (MWCO) de 1500 Da, siguiendo la definición de Neue et al.²¹⁵, que define al MWCO como la masa del compuesto cuyo diámetro hidrodinámico es igual a un tercio del diámetro de poro medio de la resina. Esta definición es insuficiente para nuestra discusión en base a tiempos de contacto. Vemos que para un peso molecular igual a 1500 Da, el tiempo de contacto se reduce en un 65% para I-HOx y sólo en un 45% para Chelex-100. Esto se debe a que el volumen de poros de Chelex-100 es mucho mayor. Debemos usar la definición de MWCO sólo como un parámetro indicativo. Para que el tiempo de contacto se reduzca en un 75% (tres cuartos del máximo) el peso del soluto debe ser de 3600 Da para I-HOx y de 4100 Da para Chelex-100.

Estos resultados indican que todos los complejos de HA entran en contacto con la resina sin sufrir una exclusión completa por peso molecular. Una exclusión completa recién ocurriría cuando el peso molecular del soluto supere los 6000 Da (entre 4 y 6 nm de diámetro hidrodinámico). Este podría ser el caso de complejos con ácidos húmicos de mayor peso molecular, pero no el nuestro. Podemos concluir que en las soluciones modelo ensayadas no ocurre exclusión por efecto de tamiz molecular por lo que la especiación se produce sólo por discriminación cinética.

Tablas:

Ligandos	Aguas Dulces Log conc. (M)	Agua de Mar Log conc. (M)
HCO ₃ ⁻	-4 a -2.3	-2.6
CO ₃ ⁻²	-6 a -4	-4.5
Cl ⁻	-5 a -3	-0.26
SO ₄ ⁻²	-5 a -3	-1.55
F ⁻	-6 a -4	-4.2
HS ⁻ /S ⁻² (condiciones anóxicas)	-6 a -3	---
Amino ácidos	-7 a -5	-7 a -6
Acidos orgánicos	-6 a -4	-6 a -5
Grupos superficiales unidos a partículas	-8 a -4	-9 a -6

Tabla 5.1: Rango de las concentraciones de algunos ligandos comúnmente presentes en aguas naturales¹⁹⁶.

	Cd(Cl) ₃ ⁻	Cd(NTA)	Cd(EDTA)	Cd(gly)
pH=5.2	2,51.10 ²	2.10 ⁵	8,00.10 ⁹	1,17.10 ³
pH=9.0	2,51.10 ²	1,59.10 ⁹	6,67.10 ¹⁴	6,67.10 ⁴

Tabla 5.2: Constantes de formación condicionales de los complejos de Cd con los ligandos ensayados en los estudios de especiación.

	K' _f	K _a (R)	α _R
Silica-8-Hidroxiquinolina (I-HOx) Ref ²¹⁹	Cd(I-Ox) ⁺ : 2,70.10 ⁹	K _{a1} =2,81.10 ⁻⁴ K _{a2} =5,62.10 ⁻⁸	α _{ox(-)} ≅ 1 (pH=8.7)
CHELEX-100 (Acido iminodiacético, IDA) Ref ³⁰⁸	Cd(IDA) ⁺ : 2,22.10 ⁵ (a) Cd(IDA): 1,1.10 ² (b)	K _{a1} =1,26.10 ⁻³ K _{a2} =3,16.10 ⁻⁹	α _{IDA(-)} ≅ 1 α _{IDA(-2)} = 5.10 ⁻⁴ (pH=5.2)

^a Suponiendo que el IDA actúa como ligando bidentado. Para una discusión exhaustiva ver Hashemi et al.³⁶⁹

^b Suponiendo que el IDA actúa como tridentado.

Tabla 5.3: Constantes condicionales de formación de los complejos de Cd con los grupos funcionales de Chelex-100 e I-HOx. Constantes de acidez y grados de disociación.

Modelo	Concentración de ligandos (C)	Constante de formación condicional (K)
$M+L_1 \rightarrow ML_1$	Varias concentraciones	Varias constantes de formación
$M+L_2 \rightarrow ML_2$	ajustables de ligandos.	ajustables según la afinidad de los distintos ligandos
$M+L \rightarrow ML$	Ajustable u obtenida de otros datos experimentales (GPC).	ajustable

Tabla 5.4: Distintos modelos ensayados para el ajuste de las curvas de titulación complejométricas de ácidos húmicos con Cd.

Condiciones de la titulación	C (M)	Log (K)
Modelo 1:	1.14 e-5 M	4.73 ± 0.04
7 mg l ⁻¹ , pH=8.7	(obtenido de los datos de GPC)	(ajustado con FITEQL a partir de la curva de titulación a pH=8.7)
Modelo 2	2.78 e-6 M	4.73 ± 0.04
7 mg l ⁻¹ , pH=5.2	(ajustado con FITEQL a partir de la titulación a pH=5.2)	(obtenido de la experiencia 1)

Tabla 5.5: Valores experimentales de las constantes de formación de los complejos Cd-HA.

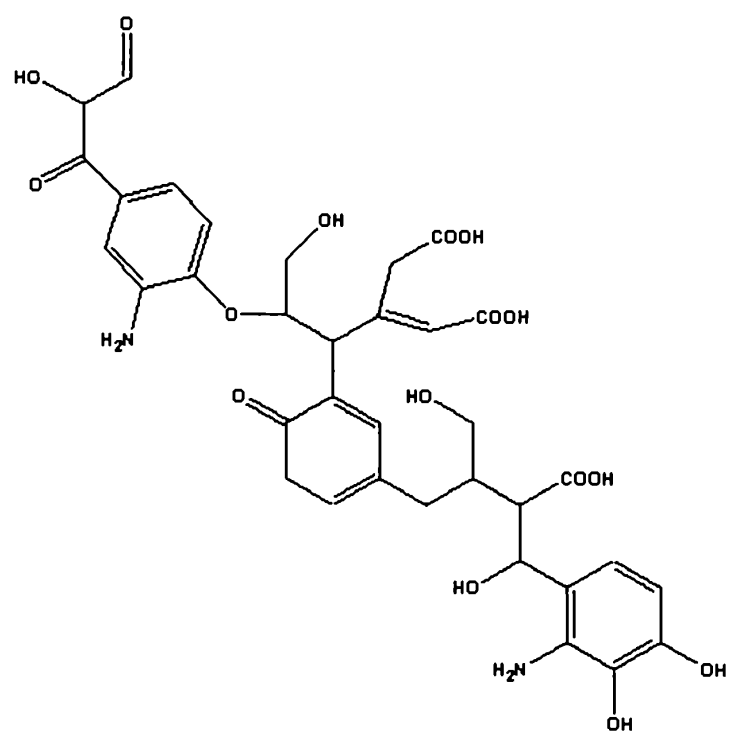


Figura 5.1: Monómero de ácido húmico.

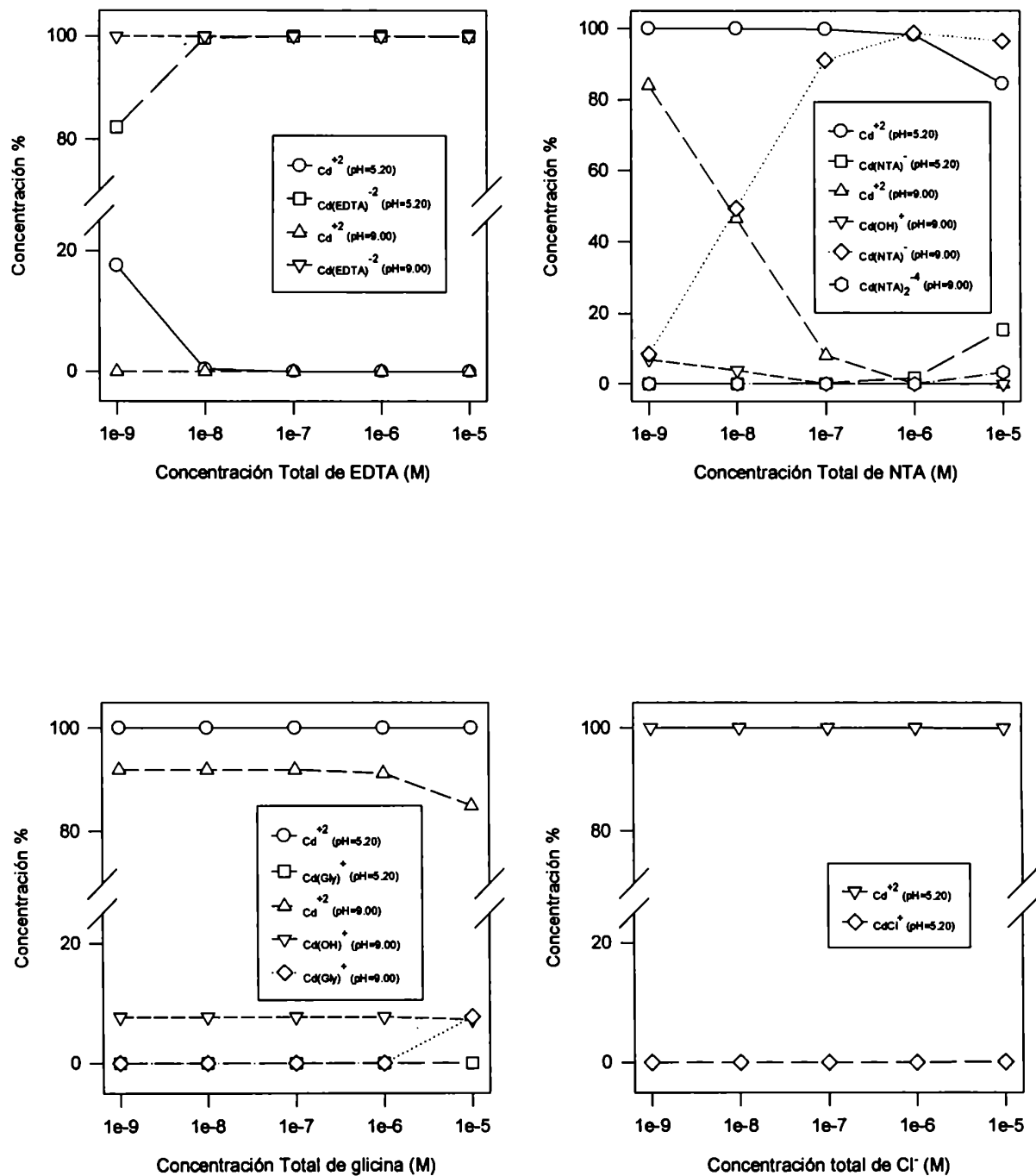


Figura 5.2:Concentraciones en el equilibrio de las especies mayoritarias en las soluciones modelo utilizadas para el estudio del efecto de discriminación cinética.

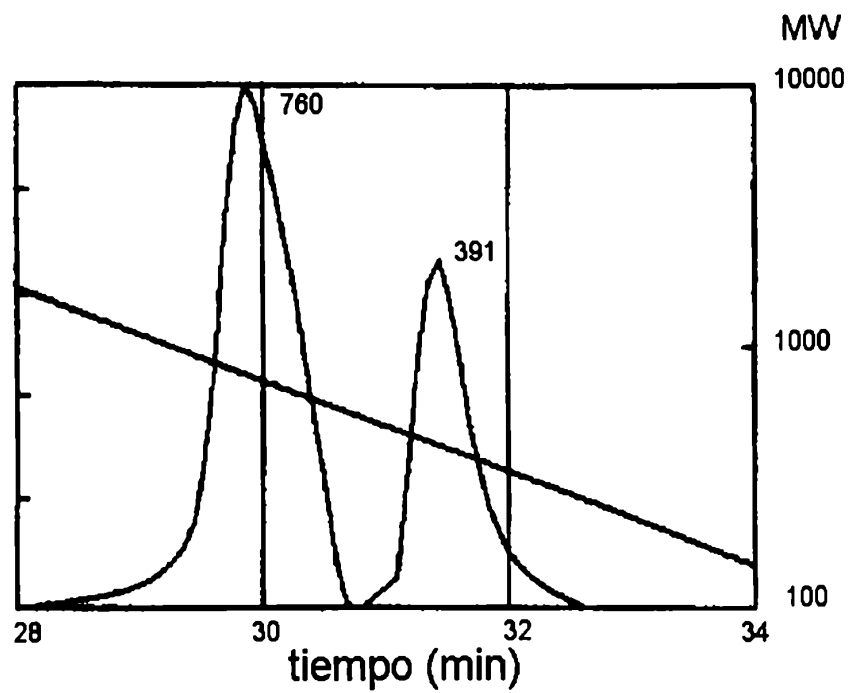


Figura 5.3: Análisis por Cromatografía de Permeación por Geles (Gel Permeation Chromatography) de los ácidos húmicos usados en las experiencias de especiación por discriminación cinética. pH=10, 70 mg l⁻¹ de HA.

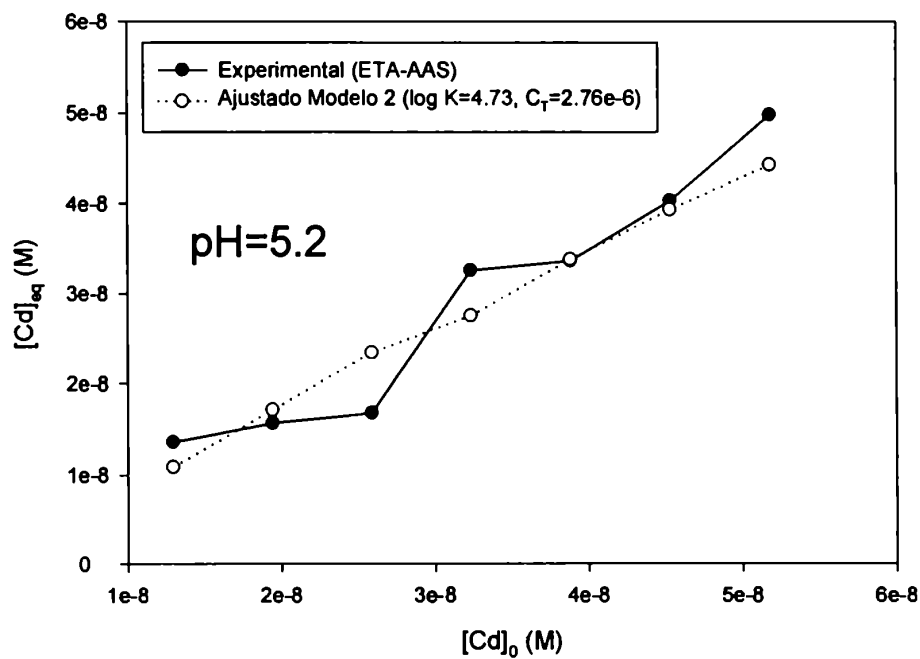
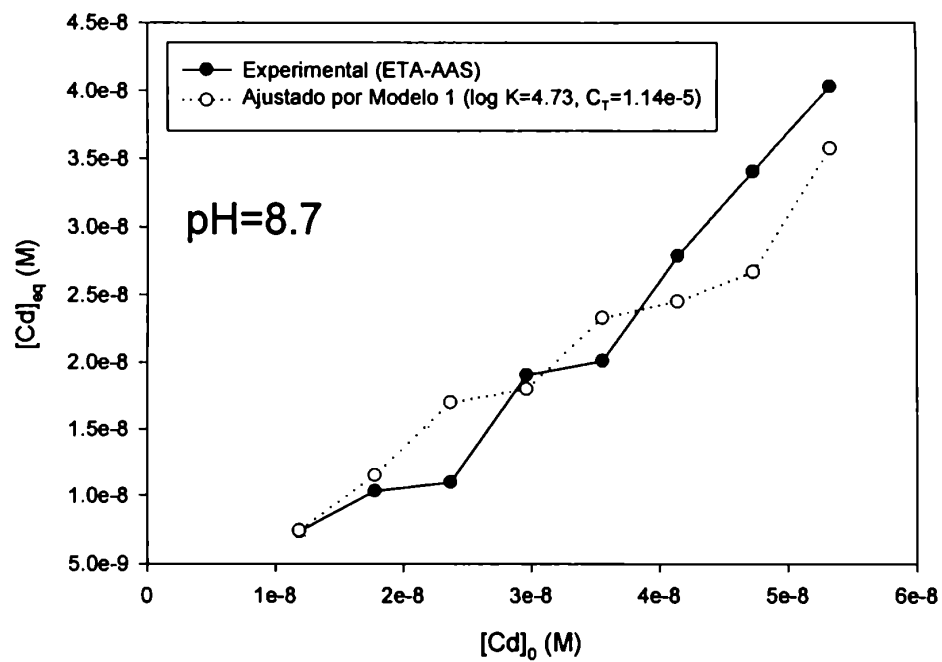


Figura 5.4: Titulación de Acido Húmico, 7 mg l⁻¹, pH=8.7 (arriba) y pH=5.2 (abajo)

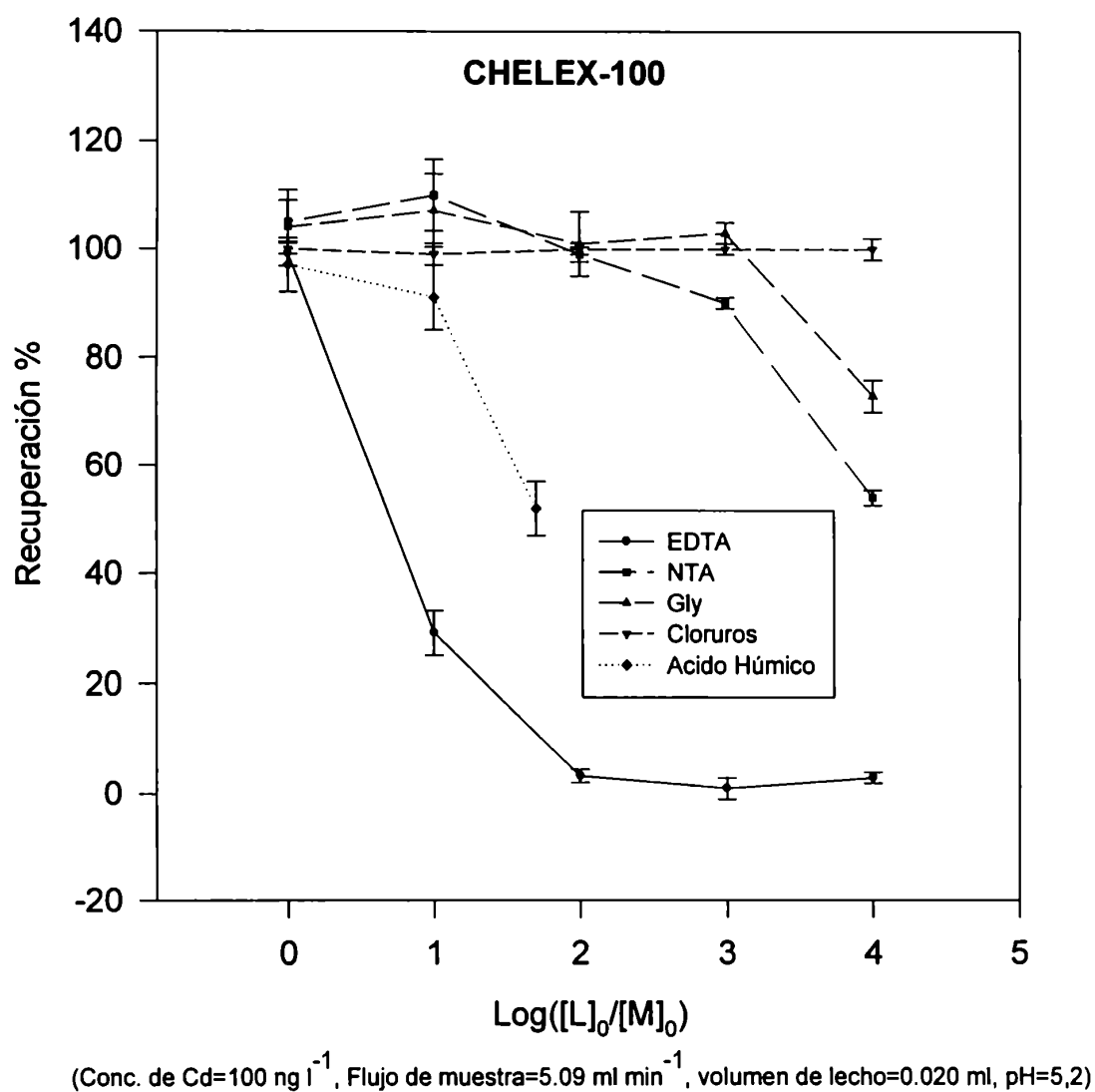
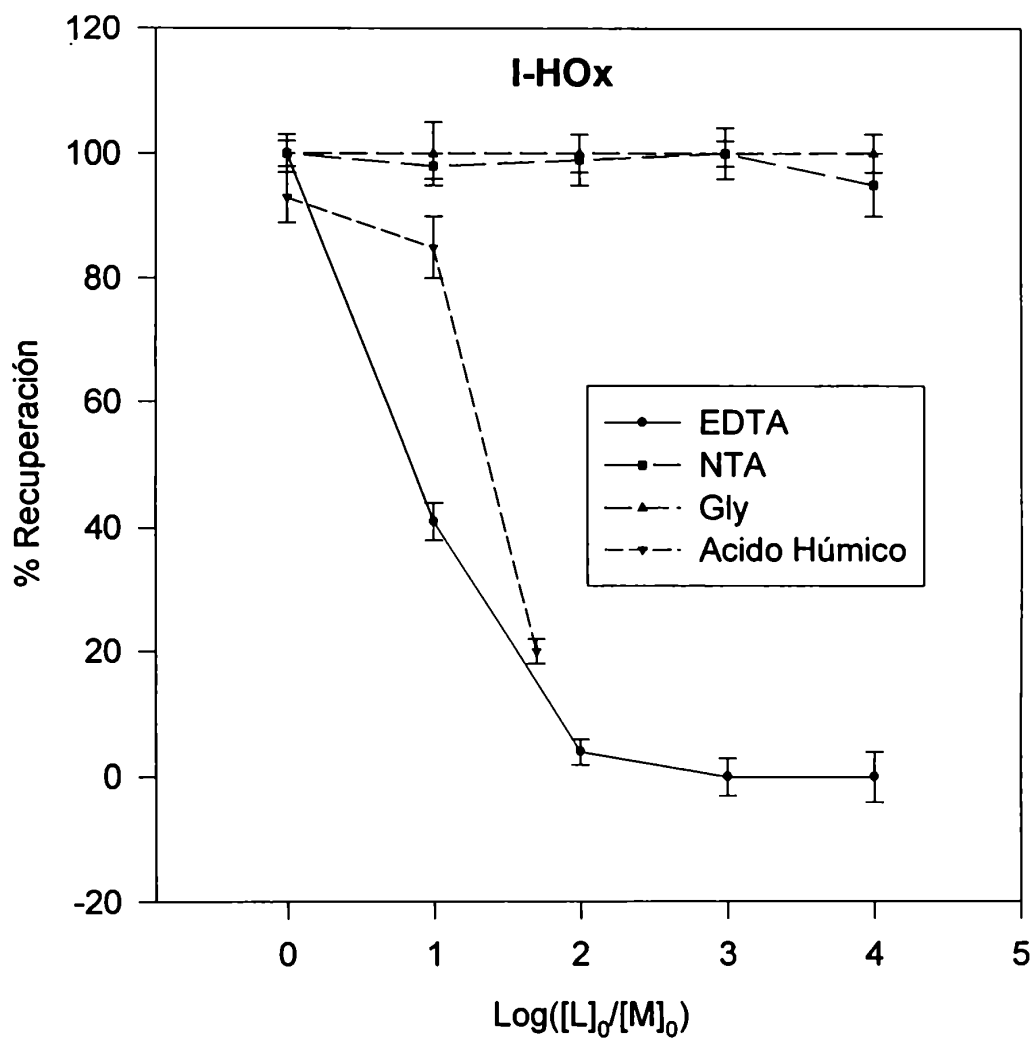


Figura 5.5: Recuperación de Cd en soluciones modelo usando Chelex-100 (100-200 mesh) como soporte de preconcentración. Las concentraciones de ácidos húmicos son 0.2, 2 y 20 mg l⁻¹ respectivamente.



(Conc. de Cd=100 ng l⁻¹, Flujo de muestra=1.4 ml min⁻¹, volumen de lecho=0.020 ml, pH=8,7)

Figura 5.6: Recuperación de Cd en soluciones modelo usando 8-hidroxiquinolina inmovilizada sobre sílica gel (I-HOx) como soporte de preconcentración. Las concentraciones de ácidos húmicos son 0.2, 2 y 20 mg l⁻¹ respectivamente.

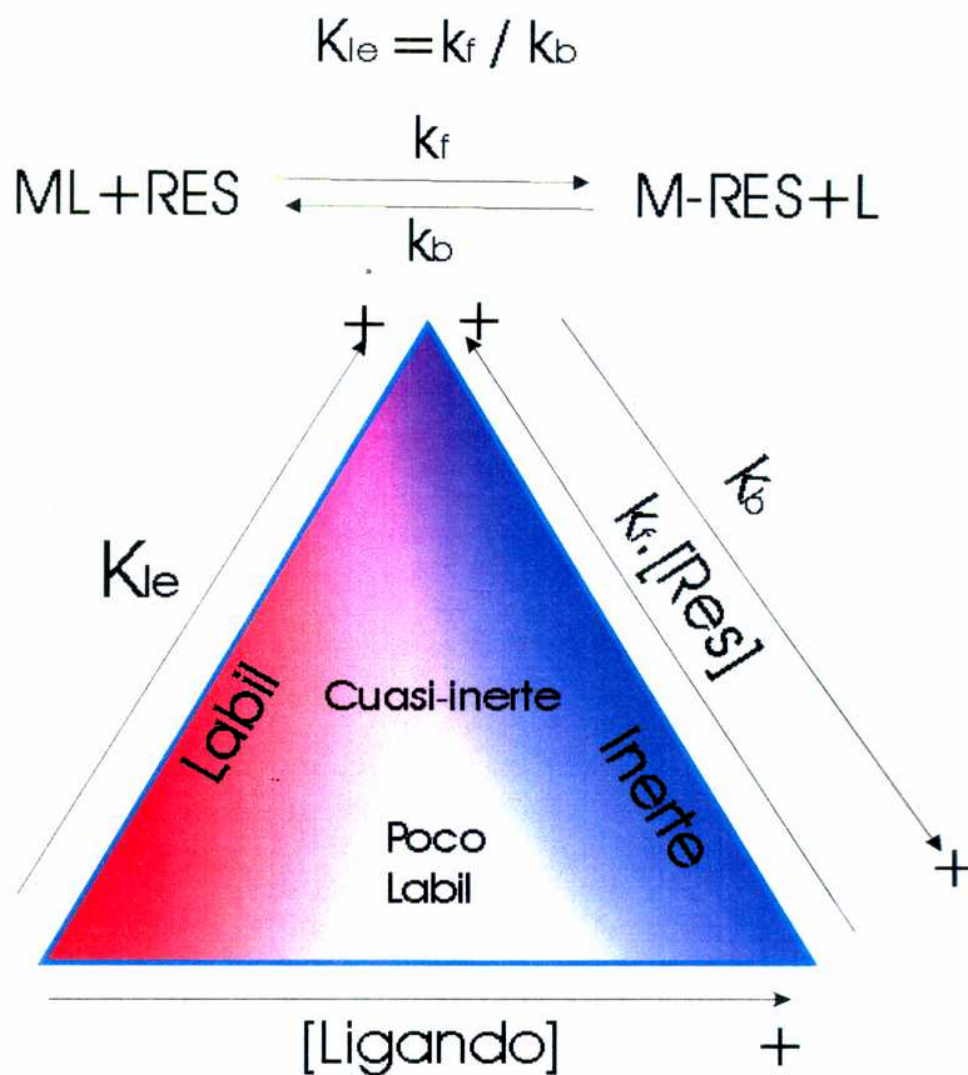


Figura 5.7: Definición de la labilidad de las especies según el esquema de especiación operacional.

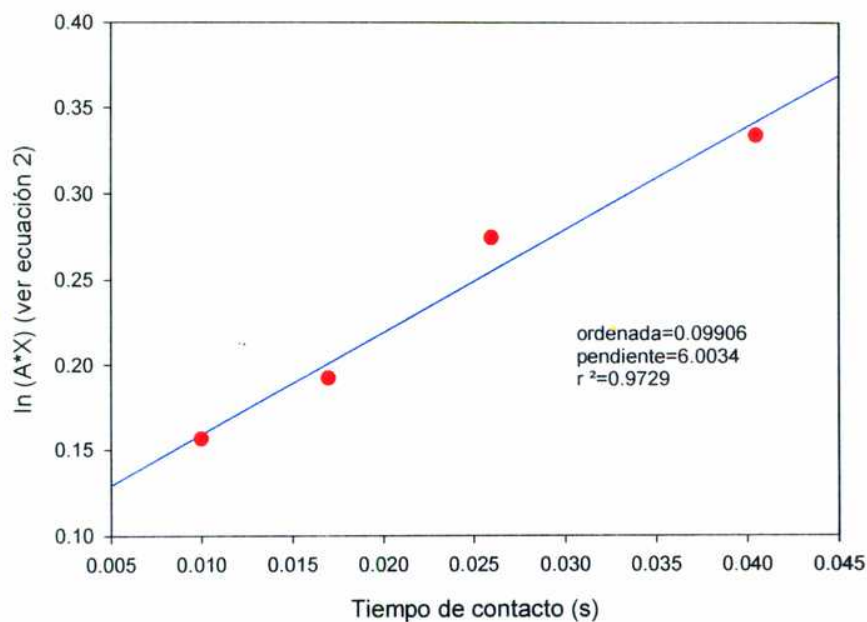
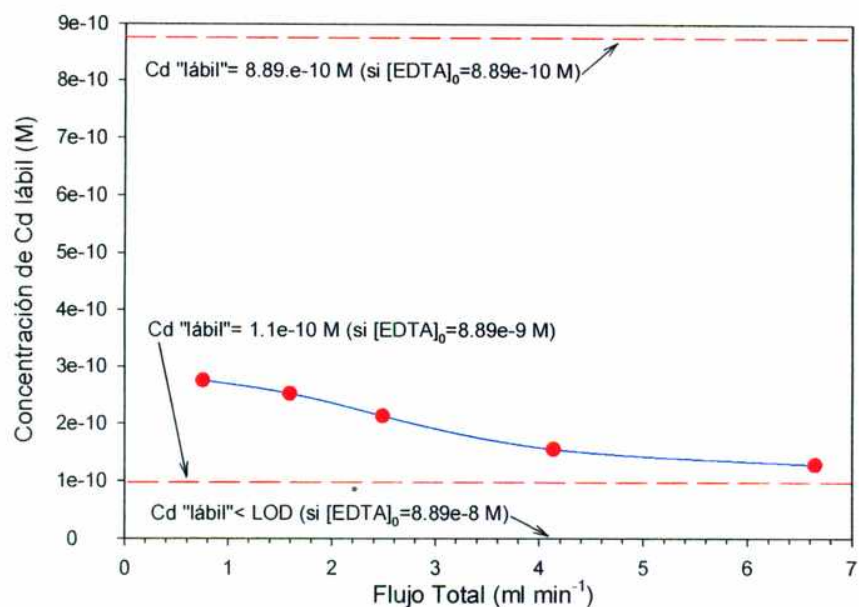


Figura 5.8 (a) (arriba): Influencia del flujo de solución en la labilidad del complejo Cd-EDTA sobre I-HOx. [Cd]₀=8.89e-10 M, [EDTA]₀=8.89e-9 M, K_{lc}=1.1e-4, [R]₀= 2 M
Figura 5.8 (b) (abajo): Determinación de la constante operacional de velocidad de intercambio de ligandos.

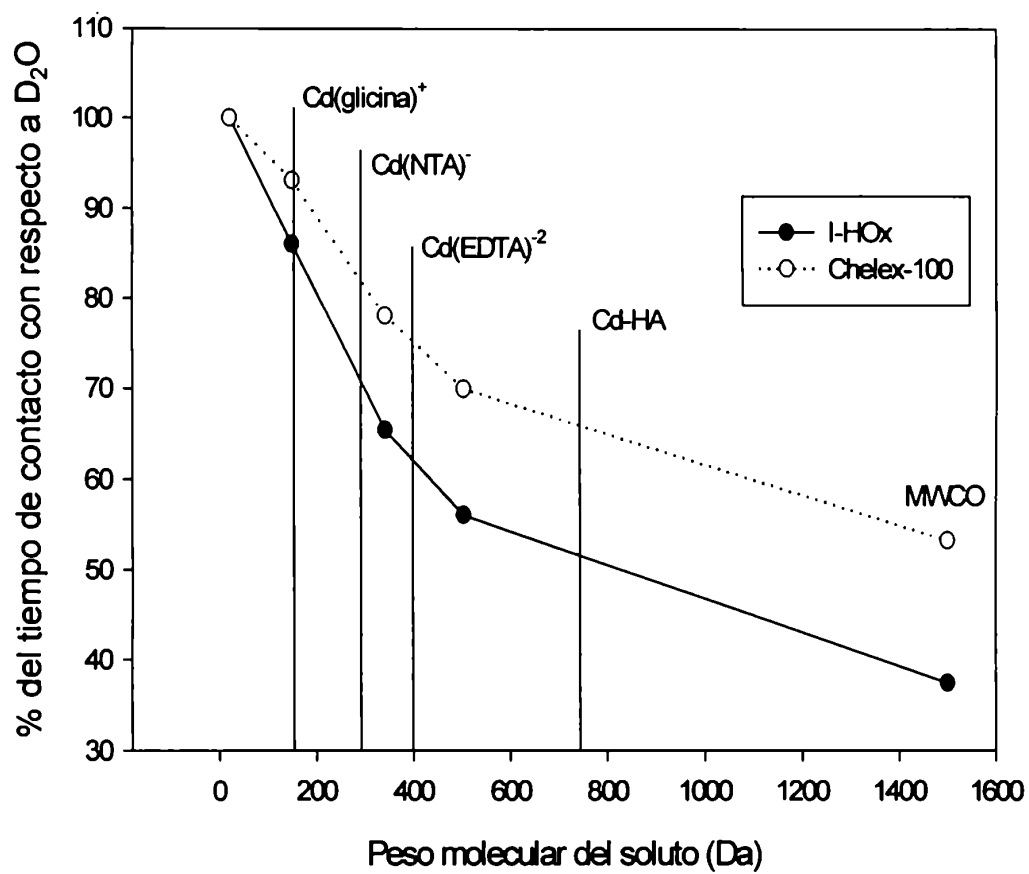
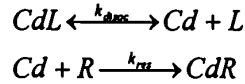


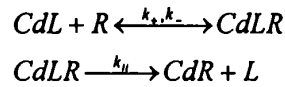
Figura 5.10: Disminución del tiempo de contacto por efecto de tamiz molecular.

5.4.8 Apéndice al Capítulo 5.

Los mecanismos adjuntivo y disyuntivo ocurren simultáneamente como reacciones paralelas. El mecanismo disyuntivo de disociación de CdL involucra dos pasos: el primero es la disociación del complejo CdL para dar metal libre y el segundo paso es la complejación en fase sólida:



El mecanismo adjuntivo involucra la formación de un complejo ternario $Cd-L-R$ como intermediario:



Asumiendo que la etapa lenta para el mecanismo disyuntivo es la disociación del complejo CdL y asumiendo estado estacionario para el intermediario $CdLR$ podemos obtener sendas constantes de velocidad para cada mecanismo:

$$\begin{aligned} k_{adj} &= \frac{k_{ii} \cdot k_+}{k_- + k_{ii}} \\ k_{disj} &= k_{disoc} \end{aligned}$$

Teniendo en cuenta el sistema de reacciones paralelas, y la reacción “reversa” (“back reaction”) de intercambio de ligandos $CdR + L \xrightarrow{k_b} CdL + R$, la velocidad de cambio de la concentración de complejo queda:

$$-\frac{d[CdL]}{dt} = k_{disj} \cdot [CdL] + k_{adj} \cdot [CdL] \cdot [R] - k_b \cdot [CdR] \cdot [L]$$

Reemplazando y agrupando:

$$-\frac{d[CdL]}{dt} = (k_{disoc} + k_{adj} \cdot [R]) \cdot [CdL] - k_b \cdot [CdR] \cdot [L]$$

Si definimos constantes de pseudoprimer orden:

$$\begin{aligned} k'_b &= k_b \cdot [L] \\ y \\ k'_f &= (k_{disoc} + k_{adj} \cdot [R]) \\ \Rightarrow \end{aligned}$$

El cambio en la concentración de cadmio retenida por la resina puede expresarse como:

$$\frac{d[CdR]}{dt} = k_f' \cdot Cd_0 - (k_f' + k_b') \cdot [CdR]$$

Antes de integrar debemos incorporar la dependencia del pH en las constantes de velocidad de pseudo primer orden. En ellas se encuentra la dependencia de “[R]” y “[L]” con el pH. Estas especies son los ligandos libres capaces de formar complejos con el Cd, es decir, las especies deprotonadas (Y^{4-} , en el EDTA y oxinato en I-HOx). Para relacionar su concentración en el equilibrio con la concentración inicial, usamos la definición de la fracción de ligando libre “ α ”³⁷⁰.

$$[R] = \alpha_R \cdot R_0$$

$$[L] = \alpha_L \cdot L_0$$

Las fracciones “ α ” de ligando deprotonado son función del pH a través de las constantes de acidez de los mismos. En el caso del par EDTA/I-HOx, el valor de α_L es 0.5 para el EDTA y α_R es 1 para I-HOx (oxinato) a pH=8.7.

Las constantes de velocidad de intercambio de ligandos no son independientes entre si, puesto que están relacionadas por la constante de equilibrio K_{le} .

$$K_{le} = \frac{[CdR] \cdot [L]}{[CdL] \cdot [R]} = \frac{K_{MR}}{K_{ML}}$$

$$K_{le} = \frac{[CdR]}{[CdL]} = \frac{k_f'}{k_b'}$$

Usando todas las relaciones anteriores e integrando, se llega a la expresión:

$$\ln \left(1 - \left(1 + \frac{\alpha_L \cdot L_0}{K_{le} \cdot \alpha_R \cdot R_0} \right) \cdot X \right) = -k_f' \left(1 + \frac{\alpha_L \cdot L_0}{K_{le} \cdot \alpha_R \cdot R_0} \right) \cdot t \quad (2)$$

CAPITULO 6



Muchos años después, frente al pelotón de fusilamiento, el coronel Aureliano Buendía había de recordar aquella tarde remota en que su padre lo llevó a conocer el hielo.

Cien años de soledad. Gabriel García Márquez. (1967).

Nunca deja de sorprenderme el largo camino que recorreremos guiados por nuestras ambiciones.

6 Capítulo 6: Especiación de Cadmio por extracción secuencial en un sistema FIA-ETA-AAS bicolumna.

6.1 Introducción:

La identificación y cuantificación de los efectos nocivos de metales como el Cd en ambientes acuáticos contaminados es una tarea difícil. Las dificultades se deben principalmente a la gran variedad de contaminantes presentes y a la incertidumbre sobre la concentración de las distintas especies en el sistema. Para entender completamente fenómenos tales como la toxicidad, la biodisponibilidad y el ciclado geoquímico, es necesario determinar la distribución y concentración de sus especies.

La especiación de Cd se ha llevado a cabo en matrices tales como suelos, alimentos, muestras biológicas y aguas naturales. Krishnamurti et al.³⁷¹ desarrollaron una modificación al esquema tradicional de especiación de metales en suelos propuesto por Tessier⁷. Estos autores mostraron que en suelos calcáreos, el cadmio se encuentra unido principalmente a materia orgánica y a complejos formados entre ésta y óxidos de aluminio, hierro y manganeso. Este hecho es muy importante puesto que los suelos son una de las principales fuentes de sustancias húmicas en el ambiente, las cuáles serían responsables entonces, de la fracción orgánica predominante en aguas naturales. Estos autores también han demostrado que la fracción organoligada de Cd en suelos está correlacionada con la fracción disponible en plantas³⁷².

En sistemas biológicos, la especiación de Cd se ha llevado a cabo principalmente mediante cromatografías líquidas acopladas a espectrometrías atómicas. La especiación de Cd en alimentos y muestras biológicas ha producido un gran interés debido a la existencia de oligopéptidos con una alta afinidad por éste metal. Estos oligopéptidos son una clase de proteínas de bajo peso molecular llamadas

metalotioneínas (MT) en el caso de animales y, fitoquelatinas en el caso de plantas. Las metalotioneínas están caracterizadas por secuencias de aminoácidos muy específicas entre las cuales se encuentran veinte pares de cisteínas (Cys) capaces de unir diversos iones metálicos en dos sitios que tienen estequiometrías del tipo M_3Cys_9 y M_4Cys_{11} . Olayinka et al.³⁷³ realizaron la especiación de Cd en alimentos a base de carne de cangrejo utilizando cromatografía líquida de alta performance (HPLC) con detección por Absorción Atómica con Horno de Grafito GF-ETA-AAS, en modo “off-line”. Wang et al.³⁷⁴ especieron Cd en muestras sintéticas del complejo Cd-MT mediante extracción con CO_2 supercrítico y posterior inyección del concentrado en un sistema de cromatografía de exclusión por geles acoplado a un espectrómetro de absorción atómica con llama (GPC-FAAS). High et al.³⁷⁵ han empleado un sistema HPLC a un espectrómetro atómico equipado con un atomizador por termonebulización (Thermospray Nebulization Atomizer) para determinar la especiación de Cd en tejidos de bivalvos sometidos a estudios de bioacumulación. Estos autores determinaron que el 96% del Cd en el tejido del organismo se encontraba unido a metalotioneínas.

La especiación de Cd en aguas naturales está siendo cada vez mas estudiada debido al interés ecotoxicológico y a la disponibilidad de instrumentos cada vez mas sensibles. El cadmio en aguas naturales se encuentra en un rango de concentraciones que varía entre 10^{-11} y 10^{-9} M y puede encontrárselo unido a distintos ligandos en proporciones que van entre el 2% y el 50%. En el caso especial del Cd es sumamente importante determinar qué porcentaje del mismo se encuentra como ion libre y qué porcentaje ligado a moléculas orgánicas ya que éstas no son fácilmente bioacumulables. Hemos visto en el Capítulo 2 que la descarga de grandes cantidades de materia orgánica en agua reduce la cantidad de cadmio que puede ser acumulada por los organismos marinos. Sin embargo, no existe ningún método ampliamente aceptado para determinar la especiación del Cd en aguas naturales. Para interpretar los resultados obtenidos en estudios de bioacumulación es útil contar con una especiación operacional de Cd que distinga entre la fracción lábil y la fracción inerte al proceso de bioacumulación.

La fracción lábil de Cd en aguas naturales puede determinarse mediante partición en columnas quelantes^{167, 182, 342, 362}, métodos potenciométricos³⁷⁶, y métodos voltamétricos³⁴⁰. Los métodos de partición en columnas quelantes y los métodos voltamétricos han sido los mas utilizados, sin embargo, con la aparición de electrodos

de ion selectivo más sensibles, los métodos potenciométricos pueden ser en el futuro una alternativa conveniente.

La concentración de la fracción inerte puede determinarse: de modo indirecto a través de titulaciones complejométricas¹⁵, directamente a través de métodos cromatográficos acoplados a ICP-MS ²³¹ o, como la simple diferencia entre el contenido total y la concentración de la fracción lábil³⁶⁸. Muchos de los métodos existentes para la determinación de la fracción inerte de Cd (no lábil) son insatisfactorios desde el punto de vista analítico. Algunos de ellos utilizan espectroscopías tales como FAAS³⁶⁸, que tienen una sensibilidad insuficiente para el habitual ámbito de concentraciones de Cd en aguas naturales por lo que es necesario pre-concentrar volúmenes de muestra de al menos 500 ml. Aquellos que poseen la sensibilidad suficiente como para trabajar en el ámbito de concentraciones adecuado son muy lentos, con frecuencias de análisis que pueden ser de 1 muestra por hora¹⁵. En otros casos, a pesar de que la sensibilidad es adecuada, el método es interferido seriamente por iones concomitantes tales como el Cu(II), Fe(III) y Pb(II)³⁷⁶, por lo que es necesario enmascararlos. Los problemas de sensibilidad pueden ser solucionados mediante el uso de espectroscopías más sensibles, tales como el ICP-MS acopladas a un método separativo²³¹ pero el análisis es complicado y costoso.

Los métodos FIA acoplados a ETA-AAS son atractivos puesto que combinan la alta sensibilidad del ETA-AAS con la gran flexibilidad en el pre-tratamiento de muestra y la alta frecuencia de análisis de los sistemas FIA. El uso de la Espectrometría Atómica con Atomización Electrotérmica en estudios de especiación de iones metálicos ha sido recientemente revisada³. Las dos técnicas más comunes para la separación de especies organometálicas de aguas naturales son la extracción líquido-líquido y la adsorción sobre soportes poliméricos (por intercambio iónico, adsorción o partición), siendo ésta última la más usada. Una ventaja es que los sistemas de extracción en fase sólida pueden ser encadenados en serie de manera que cada reactivo sólido retenga selectivamente a una cierta fracción de interés. La operatoria de estos procedimientos se facilita si se utilizan sistemas FIA con dos o tres columnas en serie.

Distintos autores han utilizado sistemas de columnas en serie para la determinación de las fracciones lábiles y no lábiles de Cd en aguas naturales. Groschner et al.³⁷⁷ utilizaron un sistema batch con tres columnas que contenían sílica C-18, Dowex 1-X8 y Chelamine, para retener respectivamente la fracción de Cd

orgánico-ligado, la fracción cargada negativamente y la fracción lábil. La detección se realizó off-line mediante ETA-AAS. Liu et al. usaron un sistema FIA con dos columnas, una que contenía la resina aniónica AG-MP-1 para retener complejos orgánicos y otras especies negativas como $\text{Cd}(\text{EDTA})^{-2}$ y otra con Chelex-100 para retener los complejos lábiles de Cd y los iones libres. Este sistema estaba acoplado on-line a un espectrómetro de absorción atómica con llama, por lo que la sensibilidad era insuficiente. Las muestras debieron ser adicionadas con los iones metálicos lo que le da al método escaso valor desde el punto de vista práctico. Lewis et al. usaron un sistema de tres columnas para el análisis de agua de mar empleando materiales de intercambio catiónico, aniónico y otro capaz de retener los compuestos coloidales de Cd (i.e.:CdS coloidal):

En el presente capítulo describimos un sistema automático capaz de determinar directamente la fracción lábil y la fracción orgánico-ligada de Cd. La fracción lábil corresponde al ion libre y a complejos poco estables, como los formados con glicina, que se disocian sobre Chelex-100 y a la que llamaremos “Cd-L₂”. La fracción inerte corresponde a complejos formados entre el Cd y la materia orgánica disuelta en el medio (por ejemplo, ácidos húmicos) que son retenidos en una microcolumna que contiene sílica C-18. Estos complejos son mas inertes que los formados con los ligandos L₂ y se los conoce como fracción “Cd-L₁”.

6.2 Resultados y Discusión.

6.2.1 Grupos funcionales presentes en los ácidos húmicos. Selección de resinas para su extracción.

Con el objetivo de identificar los grupos funcionales presentes en los ácidos húmicos ensayados se obtuvieron espectros IR de su sal sódica. El espectro obtenido presentó las siguientes bandas de importancia, con sus respectivas asignaciones:

- 3433 cm^{-1} (ancha e intensa) correspondiente al estiramiento O-H en estructuras con puente hidrógeno intermolecular tales como grupos carboxílicos o grupos fenólicos.
- 2918 cm^{-1} y 2849 cm^{-1} : corresponde al estiramiento de C-H alifáticos.
- 1576 cm^{-1} : Estiramiento del grupo C=O carboxílico con interacciones intermoleculares muy intensas³⁷⁸.

- 1385 cm^{-1} : Estiramiento de grupos carboxilato unidos a metales tales como Na^+ o a impurezas como Fe(III) , Cu(II) o Cr(III) ³⁵⁷.
- El pico agudo en 871 cm^{-1} corresponde a sustituciones múltiples en el anillo aromático (meta, para o tri-sustituídos).
- La banda ancha a 466 cm^{-1} puede asignarse a la presencia de carboxilos aromáticos similares al ácido benzoico.

Estos datos están de acuerdo con la estructura promedio para HA que hemos mostrado en capítulos anteriores. Las moléculas de ácidos húmicos están conformadas por sub-unidades con grupos fenólicos y carboxílicos. Existen anillos aromáticos, tal como muestra la zona de frecuencias entre 900 cm^{-1} a 400 cm^{-1} , lo que es confirmado por la alta absorción de radiación UV de 254 nm (ver Materiales y Métodos). Aparentemente, tal como describieran Fukushima et al.³⁷⁸, los complejos metálicos se forman por unión a grupos carboxilos. Este hecho está de acuerdo con la estimación de pK_a que hemos hecho para los grupos complejantes presentes en la molécula. La alta absorción de la banda de 1600 cm^{-1} se corresponde con una sustancia húmica de alto grado de descomposición (humificación) y bajo peso molecular³⁷⁹.

Debido a la baja concentración de iones metálicos y sus complejos con sustancias húmicas en aguas naturales es necesaria una etapa de preconcentración previa al análisis. Las sustancias húmicas pueden separarse en base a su peso molecular³⁷⁹ pero lo mas usual es hacer uso de las características químicas de sus grupos funcionales como herramienta para la separación³⁸⁰. Los complejos Metal-Acidos Húmicos en aguas naturales están cargados negativamente debido a la deprotonación de los grupos fenólicos y carboxílicos. Por éste motivo, pueden ser separados por intercambio aniónico a través de resinas aniónicas fuertes o débiles³⁸⁰. Sus características hidrofóbicas conferidas por la presencia de grupos aromáticos, hacen posible que también puedan ser retenidas por adsorción o partición sobre resinas de la familia XAD³⁸¹ (resinas de adsorción) o sobre fases estacionarias usadas en cromatografía tales como la sílica unida a grupos octadecilos (C-18)³⁸². La presencia de grupos fenólicos y carboxílicos permite, además, extraer estas sustancias con resinas que formen pares iónicos con estos grupos funcionales³⁸³. Otra posibilidad, es explotar su alta afinidad por los metales utilizando soportes cromatográficos saturados con cationes tales como el Cu(II) ³⁸⁴. La cantidad e identidad de los compuestos retenidos por alguno de estos materiales debe considerarse como una fracción definida por el

método analítico de separación y por lo tanto, los resultados deben tomarse como provenientes de una especiación operacional³⁸¹.

Dependiendo del tipo de resina utilizada y del pH de la muestra extraída, la fracción aislada poseerá características diferentes. Aquella aislada sobre resinas aniónicas fuertes corresponde a la fracción cargada negativamente. Sin embargo, este tipo de resinas presenta una interacción muchas veces irreversible con los ácidos húmicos lo que depende, principalmente, de las propiedades del soporte polimérico. Aquellas con soportes estireno-divinilbenceno, tales como la AG-MP-1 ensayada en este estudio, sufren mas la unión irreversible a moléculas de HA que las resinas con soportes mas hidrofílicos (acrílicos) como la IRA-958. Otro problema grave de las resinas aniónicas fuertes es su inespecificidad, que las bloquea en presencia de grandes cantidades de sales inorgánicas, como es el caso del agua de mar. En contraste, poseen una alta capacidad que las hace interesantes para su aplicación en microcolumnas que contienen poco relleno.

Las resinas aniónicas débiles presentan ventajas sobre las fuertes ya que la retención de ácidos débiles se ve menos influenciada por la presencia de electrolitos inertes. Una de las resinas mas usadas para separar las especies húmicas cargadas negativamente es la resina DEAE-25 (dietilamino etilcelulosa) ^{381, 385}. Sin embargo, ésta resina se obtura bajo las presiones utilizadas normalmente en FIA. Para la recuperación de fenoles y ácidos carboxílicos, también son importantes las resinas que contienen bases débiles piridínicas (polivinilpiridinas). Las resinas de intercambio aniónico en base a grupos piridina son mas resistentes a la temperatura y a los reactivos oxidantes. Además, retienen menor cantidad de electrolitos como sulfato y cloruro, debido a que la piridina es una base más débil que las aminas alifáticas³⁸³. A pesar de su alta afinidad por los compuestos fenólicos y carboxílicos, este tipo de resinas no se han empleado para la retención de sustancias húmicas. La resina Reillex-425 ensayada en el presente trabajo consiste en un polímero de polivinilpiridinas entrecruzadas. Se la usa principalmente en la remoción de ácidos y fenoles de efluentes industriales. La capacidad para fenoles y ácidos es alta en un amplio rango de pH mientras que los cationes divalentes sólo son retenidos³⁸⁶ en un rango de pH cercano a 4.

De todos los ligandos aniónicos presentes en aguas naturales, solo una fracción es suficientemente hidrofóbica como para ser retenida por resinas tipo XAD lo que se debe a que éstas resinas retienen sustancias húmicas por adsorción a través de fuerzas

débiles del tipo van der Waals. Si la molécula no es lo suficientemente hidrofóbica como para que su adsorción sea favorable, la retención no ocurre. Este carácter hidrofóbico viene dado por la estructura molecular y por el pH. La presencia de grupos aromáticos o de sistemas de dobles uniones conjugadas hace que existan en la estructura molecular nubes de electrones capaces de producir uniones débiles con resinas de adsorción. Además, cuanto mayor sea el grado de protonación de los distintos grupos fenólicos y carboxílicos de la molécula, mayor será su hidrofobicidad, ya que su carga disminuye.

Existen resinas XAD de distinta polaridad, en nuestro caso, empleamos una resina poco polar (XAD-16) con un tamaño de poro que no impide el paso de solutos de gran masa molecular.

La extracción de sustancias húmicas mediante métodos de adsorción o partición es interesante puesto que las fuerzas involucradas no son extremadamente fuertes lo que hace que la etapa de elución sea mas sencilla que con los intercambiadores aniónicos. Sin embargo, las resinas del tipo XAD retienen no sólo moléculas orgánicas, sino también una fracción importante de iones libres debido a la oxidación parcial de la matriz polimérica. Esto es una grave dificultad para el análisis de especiación. Algunos autores han intentado evitar este fenómeno saturando los sitios catiónicos de las resinas XAD-2 con iones trivalentes como por ejemplo el In(III) ³⁸⁰. Sin embargo, la operación es útil sólo si no involucra el pasaje de ácidos a través de la resina como en nuestro caso. Cuando un ácido pasa a través de una resina XAD saturada en In(III) los sitios catiónicos se regeneran y la resina recupera su capacidad de retener cationes.

Otro tipo de materiales que utilizan interacciones de baja energía para retener compuestos hidrofóbicos son los soportes cromatográficos en base a sílica unida a grupos octadecilo (sílica C-18). La cantidad de sustancias húmicas que son retenidas por la sílica C-18 es función de la hidrofobicidad de los solutos y del pH al cuál se procesa la muestra. A altos pH, sólo se retendrán los compuestos más hidrofóbicos, mientras que a bajos valores de pH se retendrá una fracción mayor ya que la carga neta de las moléculas disminuye. Esto permite utilizar al pH de procesamiento de la muestra como una variable que “sintoniza” la retención hacia compuestos mas ó menos hidrofóbicos. La sílica C-18 ha sido utilizada extensamente en la aislación de sustancias húmicas de aguas naturales^{382, 384}. Aparentemente, la retención de las sustancias húmicas depende de su grado de oxidación. La oxidación de estas

sustancias es mas importante cuándo la concentración de oxígeno disuelto es alta (i.e.: aguas superficiales) o cuando la actividad bacteriana es intensa. Las sustancias poco oxidadas (como las provenientes de aguas profundas, con menor cantidad de grupos cetónicos, fenólicos y carboxílicos) son muy retenidas, mientras que cuando la materia orgánica se encuentra muy oxidada la retención disminuye. Este efecto puede compensarse mediante una reducción del pH de procesamiento de la muestra. El fenómeno de retención de sustancias húmicas por las sílicas alquiladas no es completamente conocido pero se supone que consiste en una adsorción sobre el film superficial de grupos octadecilos o bien en una partición de la materia orgánica disuelta en una fase líquida constituida por el recubrimiento alquílico asociado a moléculas del solvente. Es sabido que la extracción de los complejos metálicos de las sustancias húmicas con sílica C-18 no perturba apreciablemente el equilibrio en solución³⁸² lo que lo hace muy atractivo para el análisis de especiación.

Independientemente del grupo funcional presente en las resinas empleadas para la retención de los complejos húmico-metal, éstas deben poseer un MWCO elevado ya que la materia orgánica disuelta puede estar distribuida en fracciones que van entre 100 y 1 KDa³⁷⁹. Por ese motivo, las resinas seleccionadas, resultaron aquellas con el mayor MWCO posible.

6.2.2 Capacidad dinámica de distintos materiales para la retención de ácidos húmicos.

La selección de materiales para la retención de compuestos húmicos debe ser hecha en base a sus propiedades dinámicas ya que la operación en FLA, a diferencia de la operación en "batch", posee características dinámicas. Las determinaciones de capacidad total se realizaron con un sistema que operase a flujos similares a los empleados en las etapas de preconcentración y elución. A diferencia de las determinaciones de capacidad en "batch", que trabajan en condiciones de equilibrio, los experimentos en flujo brindan información de la máxima capacidad de retención de una resina en condiciones de no equilibrio. O sea que, brindan información sobre la capacidad máxima del material ensayado y sobre la velocidad de quelación resultando de suma utilidad en el momento de comparar diferentes materiales quelantes.

Las experiencias realizadas involucran la carga a través de la resina de la solución que contiene los ácidos húmicos, detectando la concentración de los mismos a la salida. Estas experiencias se realizaron a distintos flujos y a distintos pH con el

objetivo de ver la influencia de los equilibrios de ionización de los ligandos en el proceso de retención.

Los resultados de los experimentos de carga y elución a flujos de muestra de 1.40 ml min^{-1} (“curvas de aparición”) se muestran en la Figura 6.1. Los experimentos a mayores flujos produjeron muy bajas eficiencias de sorción por lo que se prefiere trabajar a un flujo bajo. Además la caída de presión en un sistema bicolumna a flujos altos es muy grande produciendo imprecisiones en el flujo y compactamiento excesivo de las resinas.

Todas las resinas ensayadas mostraron una capacidad mucho mayor durante el primer ciclo de carga y descarga que en los ciclos sucesivos lo que indica que existe cierto porcentaje de retención irreversible sobre estos materiales, lo que se manifiesta por el cambio de color de blanco a marrón claro. Sin embargo, el porcentaje de retención irreversible no fue idéntico para todas las resinas siendo máximo para algunas resinas aniónicas fuertes (AG-MP-1). Las capacidades totales se midieron sobre los materiales previamente tratados con varios ciclos de carga y elución de manera de no sobreestimar su capacidad. Los resultados obtenidos para todos los materiales ensayados se muestran en la Tabla 6.1. Estas eficiencias son muy dependientes del pH al cuál se ajusta la muestra por lo que, el acondicionamiento del medio previo a la concentración es imprescindible dado que al pH propio de la muestra los valores de recuperación pueden modificarse y no ser coincidentes con aquellos de los patrones de calibrado.

La resina que presenta la mayor capacidad es la resina Reillex 425, lo que se debe a su altísima afinidad por los fenoles y ácidos carboxílicos y a su gran área específica. Esta resina fue ensayada a un pH levemente ácido ($\text{pH}=5.2$) dado que se debe encontrar en la forma protonada para intercambiar aniones. Además ésta resina puede intercambiar fenoles por un mecanismo de formación de pares iónicos, proceso favorable cuando los grupos piridínicos se encuentran deprotonados³⁸³. La resina puede retener también ciertos metales como el Cu y el Ni a valores de pH mayores que 5, pero no demuestra afinidad apreciable por el Cd³⁸⁰. En el caso de realizarse análisis de Cu o Ni, es necesario que la resina quelante (columna C1) situada antes de la columna C2 retenga el 100% de los iones metálicos. La capacidad a $\text{pH}=8.7$ resultó prácticamente nula, lo que sugiere que la retención procede por un mecanismo de intercambio iónico o a través de la formación de pares iónicos con los grupos carboxilos protonados. Aparentemente no hay una retención significativa de ácidos

húmicos a través de grupos fenólicos, a pesar de que el espectro IR parece sugerir su presencia. La elución de los compuestos húmicos puede hacerse con metanol o NH_4NO_3 2 M, o también puede usarse una mezcla HNO_3 2M / metanol (1:1).

Las resinas aniónicas fuertes AG-MP-1 e IRA-958 fueron las siguientes en orden de capacidades, mostrando valores cercanos a la Reillex-425 en el primer ciclo de carga. Sin embargo, para AG-MP-1, ésta capacidad se redujo a 0.55 mg HA/ml resina luego de cuatro ciclos de carga y descarga, mientras que para IRA-958 la capacidad se mantuvo en un valor de 2.54 mg HA/ml resina. Esta marcada diferencia se debe a que a pesar de que ambas resinas tienen grupos funcionales similares, la adsorción irreversible sobre AG-MP-1 es mucho mayor puesto que su soporte es hidrofóbico (estireno-divinilbenceno). El soporte de IRA-958 es acrílico, mucho más hidrofílico que el anterior. Estas resinas sólo pueden aplicarse a muestras de baja salinidad ya que en presencia de concentraciones elevadas de sales la capacidad disminuye fuertemente. Puesto que actúan por un mecanismo de intercambio iónico, la elución debe hacerse con soluciones concentradas de los aniones NO_3^- , OH^- o Cl^- .

Otros materiales ensayados, fueron la resina de adsorción XAD-16 y la sílica C-18 que funciona por partición. Ambos materiales presentaron muy bajas capacidades a valores altos de pH, probablemente debido a que los grupos carboxilos de los ligandos se encuentran deprotonados, lo que confiere un mayor carácter hidrofílico a las moléculas. A valores de pH ácidos, ambas resinas mostraron buenos valores de capacidad aunque inferiores a los de IRA-958. La resina XAD-16 presenta un problema grave: debido a la oxidación parcial de su soporte polimérico adquiriendo de esta manera funcionalidades quelantes que retienen eficientemente al Cd. De hecho, fue posible obtener curvas de calibrado lineales para los iones Cd(II) preconcentrándolos sobre XAD-16, lo que concuerda con lo observado por otros autores ^{342, 380}. La sílica C-18 no retiene iones libres a pH=5.2, lo que constituye una de sus ventajas. Otra ventaja de la sílica C-18 frente a la Amberlita XAD-16 es su mayor eficiencia de preconcentración para los ligandos libres HA.

6.2.3 Curvas de elución de ácidos húmicos. Operación del horno de grafito: influencia del eluyente.

Para que un material de sorción sea útil en aplicaciones de FI-ETA-AAS debe reunir: una alta capacidad por unidad de volumen junto a una fácil elución con un solvente

que no interfiera en las determinaciones por horno de grafito. Desde este último punto de vista, el solvente mas deseable es el metanol, puesto que se evapora completamente en la etapa de secado y no afecta la sensibilidad, que termina siendo idéntica a la de las soluciones acuosas. La elución con mezclas de sales es posible si el detector empleado utiliza tolera la matriz salina. En el caso particular del horno de grafito, la alta concentración de sales constituye una interferencia seria en la determinación de Cd (línea de resonancia en 228.8 nm) debido a la alta absorción molecular en el intervalo de longitudes de onda entre 200 y 300 nm.

Los ácidos húmicos son compuestos muy difíciles de eluir de cualquiera de los materiales en estudio dado que son polielectrolitos con grupos aromáticos. En la Figura 6.2 se muestran las curvas de elución obtenidas para las distintas resinas cargadas con 35 mg de ácidos húmicos. Vemos que para la resina Reillex-425 sólo se logra una elución parcial con metanol. Con una mezcla NH_4NO_3 2M / NH_3 0.5 M se logra una elución completa pero muy lenta, requiriéndose de 20 volúmenes de lecho para completarla, lo que equivale a 400 μl . Este volumen sólo puede inyectarse en el horno en un mínimo de 4 inyecciones y eluciones sucesivas de 100 μl cada una. Este procedimiento consume mucho tiempo (aprox. 5 minutos), lo que disminuye significativamente la frecuencia de análisis. En conclusión, a pesar de que Reillex-425 presenta la mayor capacidad de retención de HA, no resulta adecuada en sistemas que requieren de pequeños volúmenes de elución.

Tanto AG-MP-1 como IRA-958 pueden ser eluidas con pequeños volúmenes de solución concentrada de NH_4NO_3 . No fue posible eluirlas con metanol, acetato de etilo o soluciones concentradas de NH_3 , HNO_3 o $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. A pesar de que la elución con una mezcla NH_4NO_3 2M / NH_3 0.5 M fue satisfactoria desde el punto de vista del ancho del perfil de elución, la alta concentración de este eluyente produce señales de absorción de fondo muy pronunciadas en el atomizador electrotérmico (1.5 a 2 AU). No fue posible eliminar éstas señales, ni siquiera mediante el uso de modificadores de matriz. Dado que la única posibilidad de elución de estas resinas es el uso de eluyentes aniónicos, no fue posible utilizarlas en nuestro sistema de preconcentración.

Desde el punto de vista de la performance de la elución, la resina Amberlite XAD-16 y la sílica C-18 son los materiales mas promisorios. La elución con acetonitrilo muestra un efecto “pseudo-cromatográfico” que demuestra la complejidad

de la mezcla de húmicos empleada. Tal como era esperable, no hay elución apreciable con el eluyente iónico, siendo la elución con metanol sumamente satisfactoria en términos de la estrechez de los picos. Los perfiles de elución muestran que es posible eluir a la sílica C-18 con 150 µl (7.5 volúmenes de lecho) de metanol y a la resina XAD-16 con un volumen similar. El ancho del pico de elución de la sílica C-18 es mas angosto que el de XAD-16, lo que indica que la elución es más rápida. Dada su fácil elución con un eluyente adecuado para el horno de grafito, la inercia para la retención de cationes y la mas que aceptable capacidad de retención de húmicos, se seleccionó a la sílica C-18 como soporte de extracción de estos últimos.

6.2.4 Esquema de análisis con dos columnas en serie.

Existen pocos sistemas FIA usados para la extracción y preconcentración en línea de sustancias húmicas y sus complejos metálicos. Los sistemas de extracción secuencial mediante columnas citados en la bibliografía, utilizan como detector FAAS⁷⁰ o bien operaciones manuales para el procedimiento de preconcentración con posterior detección del/los analito/s en los eluidos por GF-AAS ³⁷⁷. El uso de dos microcolumnas en serie en un sistema FIA acoplado a un ETA-AAS combina la limpieza obtenida por la automatización del procedimiento, con la alta sensibilidad del detector.

En el esquema de dos columnas propuesto, las especies solubles de Cd presentes en la muestra se dividen en dos fracciones: la fracción M1 que se retiene en la columna C1 rellena con Chelex-100 y la fracción M2 retenida en la columna C2 rellena con C-18^{§§§§}. Las características de ambas fracciones se discutieron anteriormente. En la columna C2 se retienen los complejos de Cd suficientemente hidrofóbicos como para ser extraídos por la sílica C-18, encontrándose los metales asociados a materia orgánica dentro de esta fracción. Los complejos de metales con ligandos de muy alto peso molecular pueden ser excluidos de esta resina debido a su MWCO. Las especies metálicas no retenidas por ninguna de las dos columnas pueden incluir especies coloidales o materia orgánica muy oxidada que no sea lo suficientemente hidrofílica como para ser retenida por C2.

^{§§§§} Para la nomenclatura de las columnas seguimos la utilizada por Liu e Ingle⁷⁰, que las numera de acuerdo al orden en el que se presentan ante la corriente de fluido.

En los sistemas bicolonna es crítico que la resina quelante (i.e.: Chelex 100) sea puesta en la línea de flujo *antes* que la columna de extracción de la fracción M2 (M-L₁) dado que todos los materiales que fueron ensayados para la extracción de M2 presentan cierto grado de adsorción irreversible de ácidos húmicos, por lo que la columna adquiere cierta cantidad de sitios capaces de intercambiar cationes. Si los iones metálicos no son extraídos de la muestra antes de encontrar la columna C2 podrán ser retenidos por ésta resultando la fracción M2 sobrevalorada. Esto es especialmente cierto en el caso de usar resinas que poseen una pequeña cantidad de grupos de intercambio catiónico como en el caso de XAD-16. Si el relleno de la columna C1 posee una eficiencia de preconcentración (P) menor que el 100 %, cierta porción de los iones metálicos pueden ser preconcentrados en el soporte contenido en C2. En nuestro caso hemos elegido C-18 que no presenta adsorción de iones Cd(II) al pH de operación, lo que brinda un margen de seguridad para sesgar positivamente la magnitud de la fracción M2.

Distintos materiales pueden ser empleados como relleno en C1 y C2 dependiendo del flujo deseado y del pH de operación. En la Figura 6.3 vemos todas las posibles combinaciones. Las combinaciones mas factibles, a nuestro entender son:

- Chelex-100 (C1) y C-18 (C2): Ambas resinas deben operarse a valores de pH bajos. La retención de especies negativas y positivas sobre la sílica C-18 es nula y por lo tanto no es necesaria (aunque deseable en términos de performance) una eficiencia de preconcentración del 100%. Una ventaja es que los soportes inorgánicos como la sílica C-18 poseen un MWCO más bajo que los polímeros orgánicos tales como la resina XAD-16.
- Chelex-100 (C1) y XAD-16 (C2): Esta combinación es posible dado que ambas resinas deben operarse a valores de pH levemente ácidos (cerca de 5.5). Sin embargo, es necesario asegurar una eficiencia de preconcentración del 100% sobre Chelex-100 diseñando una microcolumna que, con operación a flujos bajos, asegure un contacto eficiente entre la muestra y la resina.
- I-HOx (C1) y IRA-958 (C2): Esta combinación puede utilizarse a pH neutro o levemente alcalino. Tiene la ventaja de que es posible calibrar la fracción retenida en C2 mediante algún complejo de Cd cargado negativamente como el Cd(EDTA)^{2-} , sin embargo, no es factible usar ésta

combinación de materiales en muestras de alta salinidad debido a la saturación de la resina IRA-958 con los aniones de la matriz. (i.e. Cl^- en agua de mar).

El pH al cuál se opera el sistema es de vital importancia puesto que determina la especiación de los iones metálicos. Algunos autores³⁷⁷ han criticado la preconcentración en condiciones débilmente ácidas como las usadas con Chelex-100 puesto que modifica el equilibrio de complejación de la materia orgánica liberando los metales. Sin embargo, desde el punto de vista de la acumulación de tóxicos es importante determinar la especiación en condiciones de leve acidez de la muestra (metales potencialmente recuperables), puesto que la especiación a esos valores de pH nos indica la máxima concentración de iones metálicos que puede ser retenida por la materia orgánica en condiciones de acidificación de las aguas naturales³⁸⁰. A la inversa, la determinación de la especiación a pH levemente alcalino, puede indicar la máxima capacidad de asimilación de metales del sistema. En cualquier caso, la principal utilidad de la especiación operacional es la de comparar las fracciones M1 y M2 entre distintos sitios de colección de muestras, las cuáles se analizan bajo condiciones idénticas.

6.2.5 Calibrado del Sistema Bicolumna. Blancos. Figuras de mérito.

La determinación cuantitativa del contenido de Cd en ambas fracciones requiere del desarrollo de un protocolo de calibración. La concentración de Cd en la fracción M1 se determinó por calibración con patrones acuosos de Cd(II) que fueron sometidos al procedimiento de preconcentración completo tal como indicamos en el capítulo 1.

La concentración de Cd en la fracción M2 es más difícil de determinar, puesto que no se cuenta con un complejo orgánico de Cd para usar como estándar de calibrado. Se ensayó al complejo Cd-APDC como estándar de calibrado de la columna C2, sin embargo, no fue posible obtener la solución de APDC con suficiente pureza como para que los blancos analíticos fueran admisibles.

La opción de complejar completamente el Cd utilizando franco exceso de ligando no fue posible debido a: el pH de trabajo, la escasa afinidad de Cd por los ácidos húmicos a ese pH, la baja solubilidad de los ácidos húmicos en el agua, la baja concentración de sitios activos en la molécula de HA y la gran posibilidad de saturar C2 a través del ligando en exceso. Sin embargo, puesto que se han determinado las

constantes de formación de los complejos Cd-húmicos, es posible preparar soluciones patrón que contengan Cd(II) y HA, a las cuáles se les asigna un valor de concentración del complejo que es el obtenido a través de cálculos de equilibrio. Este procedimiento debe ser validado, puesto que implica el uso de las constantes de formación condicionales de Cd en un nivel de concentración que es un orden menor que el usado en la determinación de las constantes condicionales de formación de los complejos. En la Figura 6.4 se muestran las curvas de calibrado obtenidas para ambas fracciones en condiciones normales de operación. A los patrones de Cd-HA usados, se les ha asignado la concentración de complejo obtenida por los cálculos de equilibrio. Estas curvas de calibrado permiten calcular las figuras de mérito del sistema que se muestran en la Tabla 6.2.

La repetitividad para la fracción M2 es mejor que para la fracción M1 y coincide con la óptima para determinaciones con horno de grafito. El uso de dos eluciones sucesivas parece no empeorar la precisión. La repetitividad para la fracción M1 es levemente peor, lo que puede deberse a que el eluyente deba atravesar dos microcolumnas, cambiando levemente la precisión en el volumen inyectado. En el caso de la fracción M2, el eluyente sólo atraviesa una microcolumna. El blanco es mayor en el caso de la fracción M2, probablemente debido a que el volumen de eluyente empleado es mayor (Tabla 6.2). A idénticos volúmenes de eluyente, el metanol produce un blanco menor que el ácido nítrico. Los límites de detección son similares con una ligera ventaja para la fracción M2, debido a que la sensibilidad del detector en presencia de metanol es mejor que en presencia de HNO_3 ¹⁸². Estos límites de detección son lo suficientemente buenos como para determinar cualquier especie de Cd en aguas naturales y pueden incrementarse aumentando el volumen de muestra preconcentrado, que en este caso fue de 5.18 ml. Como consecuencia de las mejoras introducidas en las microcolumnas y el menor flujo usado, las eficiencias de preconcentración (P) para ambas fracciones de Cd se encuentran cercanas al 100% dentro del error experimental. Esto produce una mejora en el factor de amplificación que es de 51 para la fracción M1 y de 71 para la fracción M2. Esta diferencia se debe a que la sensibilidad en presencia de ácido nítrico es peor que la que se obtiene con metanol que es idéntica a la del agua destilada.

La frecuencia de análisis disminuye en comparación a la determinación con Chelex-100 a flujos mayores, puesto que es necesario incrementar el tiempo de preconcentración 3.7 veces para mantener la misma masa de analito que la utilizada

con el sistema descrito en el Capítulo 1. Además, la necesidad de una doble elución de la columna C2, hace más lento el análisis. Sin embargo, la lentitud (5 muestras por hora) se ve compensada por la capacidad de obtener información acerca de la especiación de los iones en solución. La frecuencia de análisis es similar a la de un método de cromatografía líquida, sin embargo, la detección es específica para el ion metálico, lo que hace mucho mas selectivo el análisis.

6.2.6 Validación del procedimiento.

En el caso del análisis de especiación de Cd, no existen materiales certificados de pureza y estequiometría conocida que permitan validar el procedimiento completo. La producción de materiales certificados para el análisis de especiación es una tarea ardua, sobre todo porque los métodos de análisis de especiación se encuentran todavía en etapa de investigación y desarrollo^{387, 388}. En especial, en el análisis de especiación se incluyen casi siempre etapas de extracción y derivatización que necesitan ser validadas en términos de recuperación del/los analitos. Los ejemplos más típicos de materiales de referencia certificados son aquellos de compuestos organometálicos (butilestano, metil mercurio) o de compuestos inorgánicos cuya toxicidad cambia con el estado de oxidación ($\text{Cr}^{+3}/\text{CrO}_4^-$ ó $\text{SeO}_4^{-2}/\text{SeO}_3^{-2}$). En general, se ha hecho énfasis en muestras de origen marino (tejido de pescado, aguas etc.) que presentan un peligro directo para la salud humana.

En el caso del método de análisis propuesto, es necesario saber si los valores de concentración asignados a los patrones de calibrado a través de cálculos de equilibrio son válidos. Para ello, deben ser comparados con la concentración experimental de los complejos $\text{Cd}(\text{HA})$. Esta concentración puede determinarse interpolando las señales obtenidas para los patrones de la fracción M2 en la curva de calibrado de la fracción M1 (obtenida con patrones de $\text{Cd}(\text{II})$). Antes de ser interpoladas, las señales de la fracción M2 deben ser corregidas por su respectivo blanco de calibrado y por la diferencia en sensibilidades que existe entre las curvas obtenidas con metanol o HNO_3 como eluyentes. Puesto que la sensibilidad en metanol es mayor, las señales correspondientes a M2 deben ser multiplicadas por un factor 0.73 para referirlas a la curva de calibrado de la fracción M1. Este tipo de validación interna es posible siempre y cuando las eficiencias de preconcentración sobre ambos rellenos sean similares, tal como en este caso.

En la Tabla 6.3 se muestran los valores de concentración de los complejos Cd(HA) determinados de dos maneras distintas: los calculados mediante los valores de constantes de formación y concentración de grupos quelantes obtenidos por titulación (ver Capítulo 5) y los obtenidos experimentalmente a través de la curva de calibrado de la fracción M1. Los resultados obtenidos experimentalmente son comparables a los obtenidos mediante cálculos de equilibrio dentro del error de cada método, lo que implica que los resultados son consistentes y que el método produce datos confiables. Estas soluciones modelo que contienen mezclas de Cd y HA en distintas proporciones pueden, por lo tanto, utilizarse como patrones de calibrado para el análisis de especiación. En la Figura 6.4 se muestran curvas de calibrado típicas obtenidas para el sistema bicolumna. Este sistema puede calibrarse utilizando patrones con mezclas Cd / Cd(HA) o simplemente con patrones de Cd(II) que son retenidos en la primer columna (C1), las señales producidas por la elución de C2 pueden referirse a las señales de C1, a menos del factor de sensibilidad. Este método es mas simple, puesto que la preparación de los patrones de calibrado es mucho mas rápida y no se requiere equilibrar los patrones como en el caso de los que contienen HA.

TABLAS DEL CAPITULO 6

Resina	pH de preconcentración	Eficiencia de preconcentración de HA% $V_{\text{muestra}}=250 \text{ BV}$ (5.18 ml)	Capacidad Total (mg HA/ ml resina)
Reillex 425	5.2	79 ± 3	2.95
Sílica-C18	5.2	66 ± 2	1.68
XAD-16	5.2	59 ± 2	2.22
IRA-958	8.7	47 ± 2	2.54
AG-MP-1	8.7	33 ± 1	0.54
XAD-16	8.7	30 ± 1	1.27
Sílica C-18	8.7	10 ± 1	0.17

Tabla 6.1: Eficiencias y capacidades totales de preconcentración de HA en experimentos dinámicos sobre distintas resinas.

Figura de mérito	Fracción de Cd	
	Fracción retenida en C1 (Chelex-100)	Fracción retenida en C2 (sílica C-18)
Límite de detección (ng l ⁻¹) (3σ)	12	10
Blanco (pg) (media ± s)	111 ± 24	151 ± 14
Precisión a 50 ng l ⁻¹ (RSD %)	7%	4 %
Volumen de muestra	5.18	5.18
Factor de amplificación	51	71
Eficiencia (%)	100 ± 6	102 ± 9
Frecuencia de análisis (muestras hr ⁻¹)	5.2	
Volumen de elución (μl)	80	140 (en dos inyecciones de 70)

Tabla 6.2: Figuras de mérito del sistema de especiación por extracción secuencial en flujo.

Estándar	Concentración de Cd-HA predicha por cálculos de equilibrio (expresado como ng l ⁻¹ de Cd)	Concentración de Cd-HA experimental (expresado como ng l ⁻¹ de Cd) (media ± rango, n=3)
200 ng l ⁻¹ Cd + 7 mg l ⁻¹ HA	26 ± 2	26 ± 3
400 ng l ⁻¹ Cd + 7 mg l ⁻¹ HA	52 ± 4	50 ± 3

Tabla 6.3: Validación de los resultados producidos por el sistema FI-ETA-AAS bicolonna.

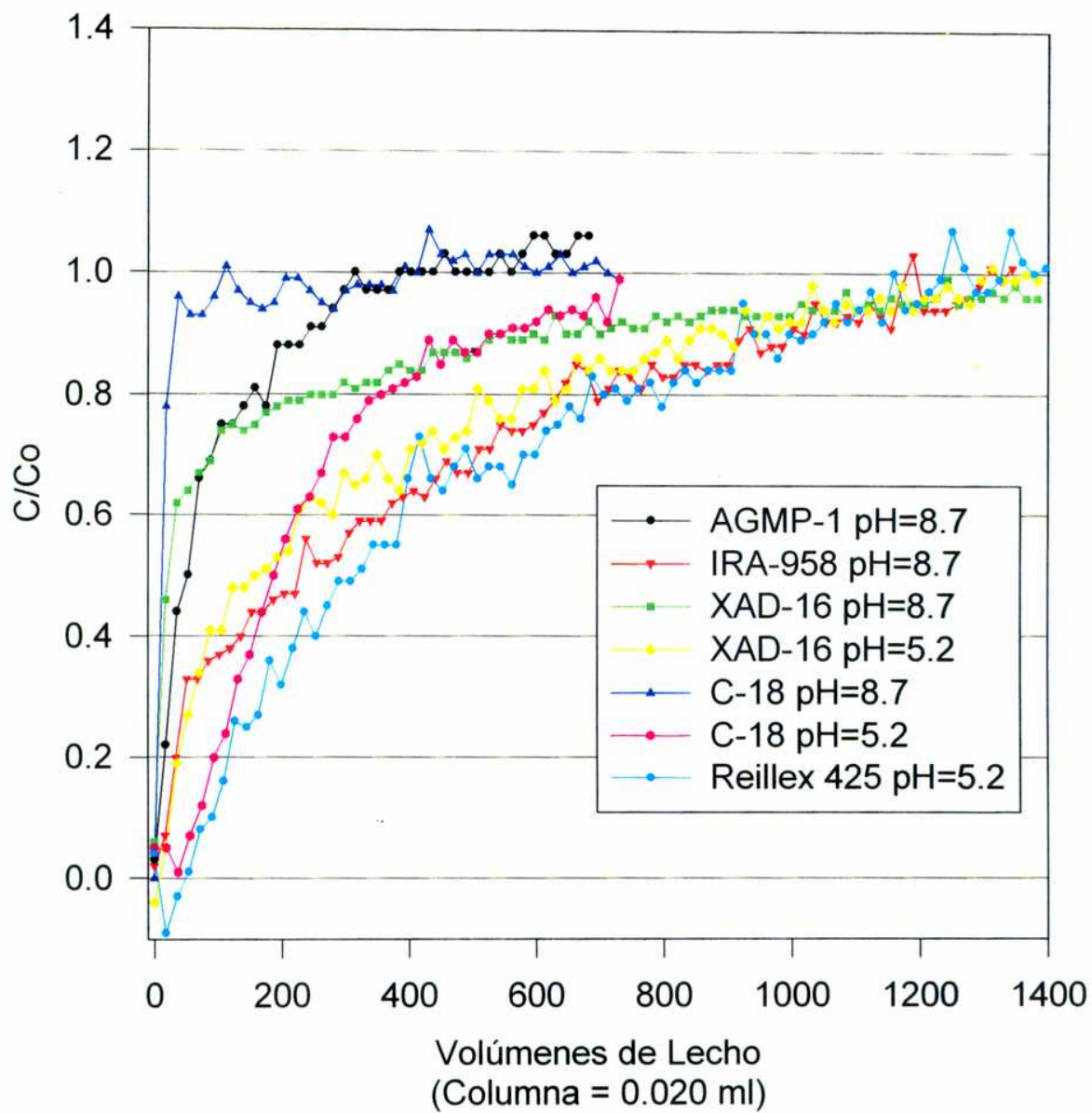


Figura 6.1: Curvas de “aparición” de una solución 7 mg l^{-1} de HA a 1.40 ml min^{-1} .
Volumen de lecho de la microcolumna=0.020 ml.

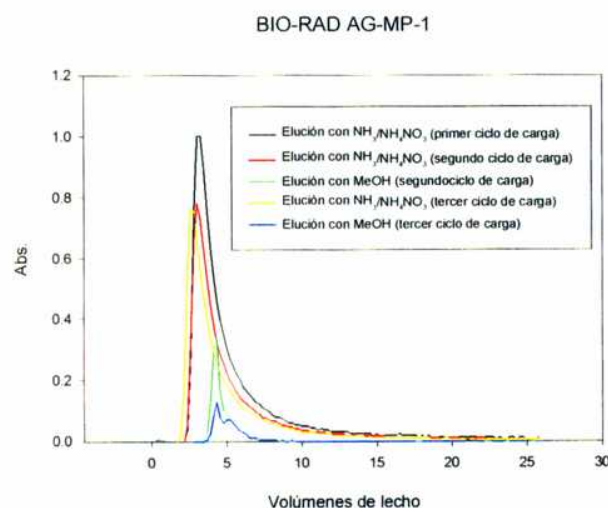
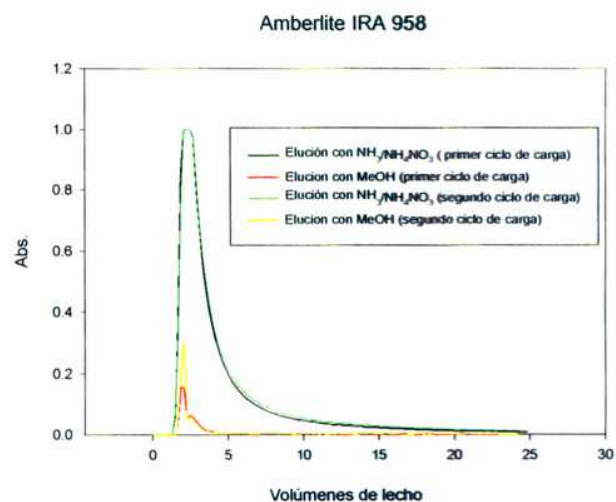
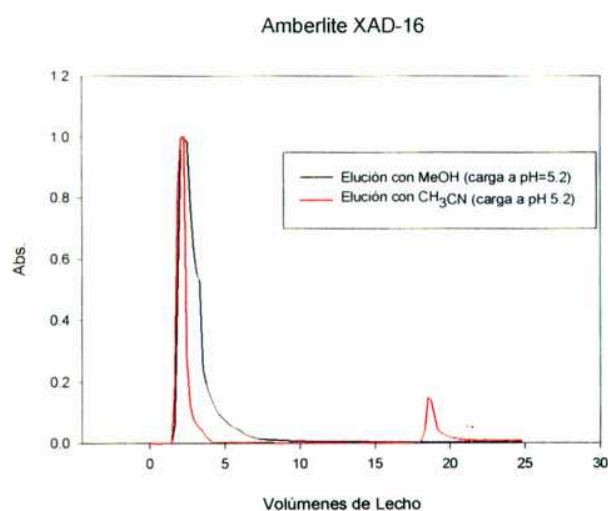
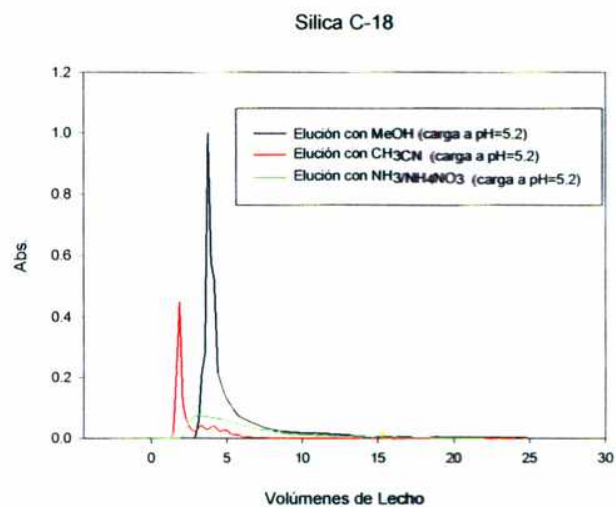
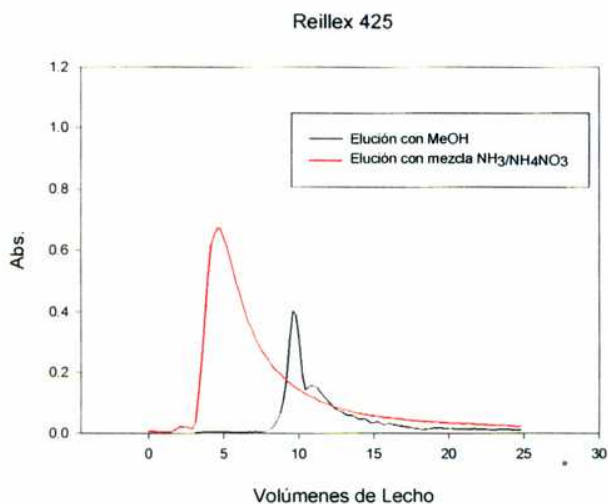


Figura 6.2: Elución de los ácidos húmicos retenidos por las distintas resinas. El flujo de elución es de 0.26 ml min^{-1} .

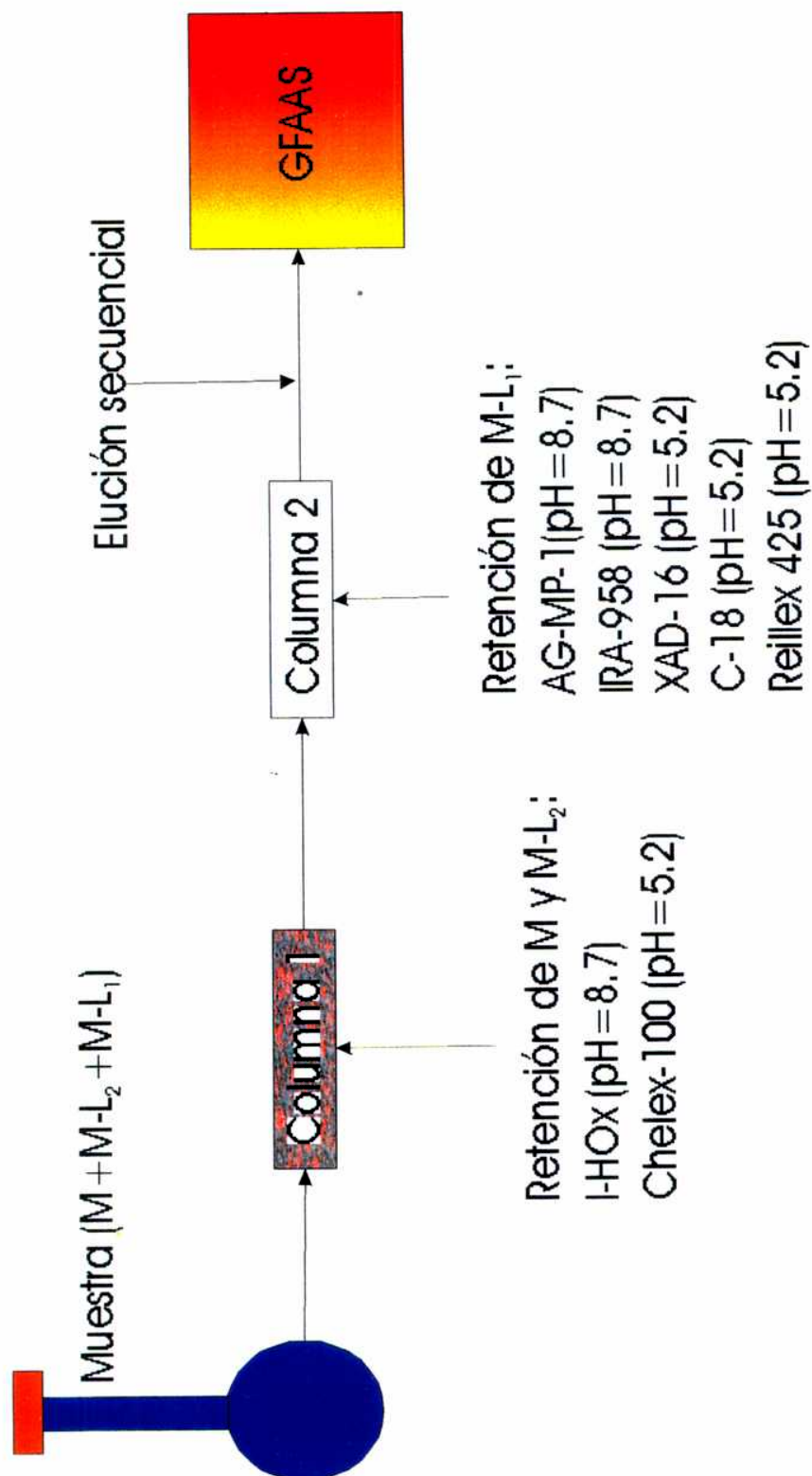


Figura 6.3: Posibles combinaciones de resinas en el sistema bicolumna de extracción secuencial.

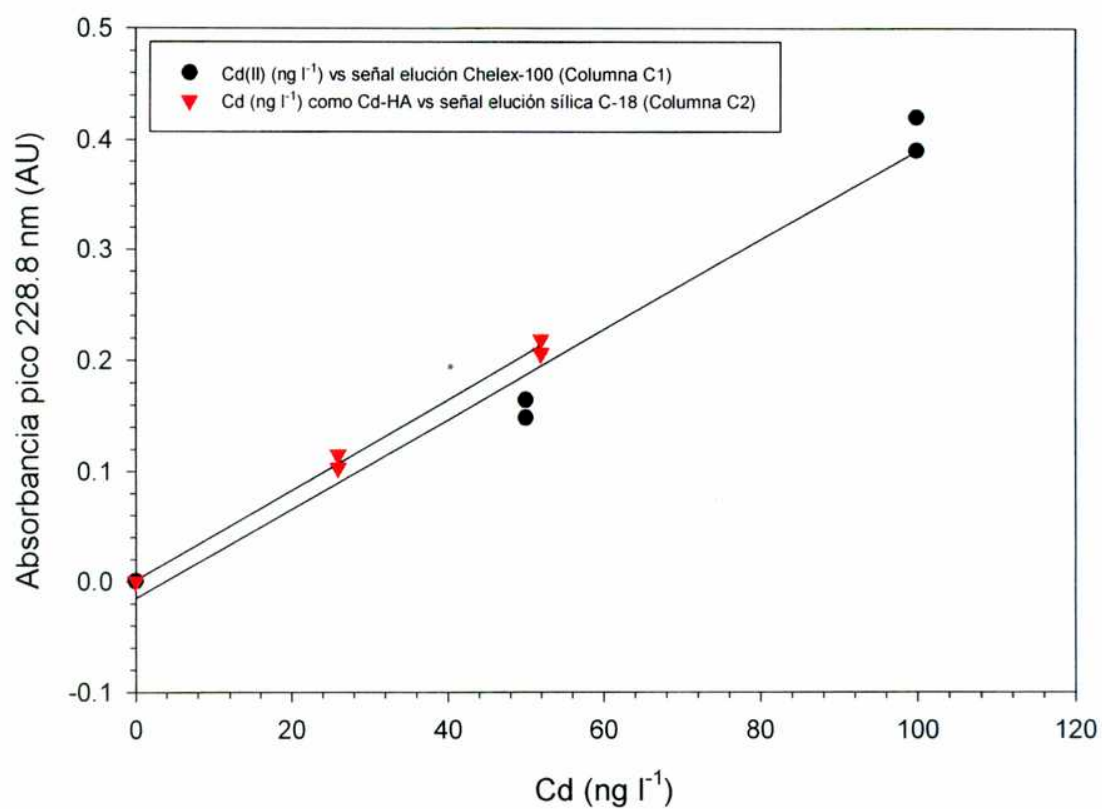
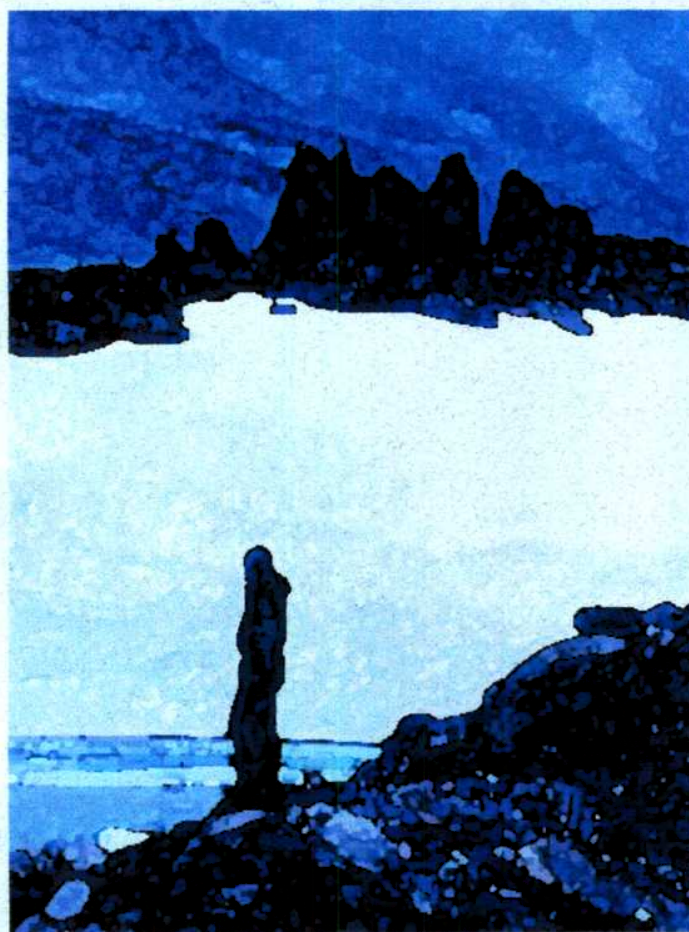


Figura 6.4: Calibración del sistema bicolumna.

MATERIALES Y METODOS



7 Materiales y Métodos.

7.1 Reactivos y Síntesis.

7.1.1 Reactivos usados para la preconcentración utilizando Chelex-100:

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima pureza disponible y como mínimo de calidad analítica. Todas las operaciones de preparación de soluciones se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar. El agua doblemente deionizada (DIW, 18 MΩ cm) fue obtenida con un deionizador MilliQ (Millipore, Bedford, MA, USA). Como resina quelante se utilizó Chelex-100 (100-200 mesh, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) según recomendaciones de Chakrabarti et al³⁶². Previamente a su uso, la resina fue purificada por lavados sucesivos con ácido nítrico 5M y finalmente con DIW. Luego la resina se convirtió a la forma amónica equilibrándola con una solución de amoníaco 1M. Como eluyente se utilizó una solución de ácido nítrico 2M preparada a partir de ácido nítrico concentrado (65%) calidad Suprapur (Merck, Darmstadt, Alemania). Este ácido es preparado por destilación “sub-boiling”³⁸⁹. Como buffer de preconcentración se usó un buffer ácido acético/acetato de amonio 1M, pH 5.2 ± 0.2. Este buffer se purificó a través de una columna rellena con Chelex-100. A partir de esta solución se preparó una dilución 0,1 M. Las soluciones patrón de Cd (50 a 200 ng/l) y Pb (50 a 300 ng/l) se prepararon por dilución de soluciones stock de los correspondientes metales. Las diluciones se realizaron en matraces volumétricos de Nalgene (Nalge Company, Rochester, NY, USA) para evitar pérdidas por adsorción sobre la superficie del recipiente. Previo a su uso, todo el material de laboratorio empleado se lavó con ácido nítrico (1+1), se enjuagó con DIW, se volvió a lavar con una solución caliente de APDC al 5% y se enjuagó de nuevo. Una vez en uso, sólo se realizaron enjuagues con DIW para evitar otras contaminaciones. Para validar el método se utilizó el material de referencia certificado CASS-3 del National Research Council of Canada (NRCC).

7.1.2 Reactivos usados para la preconcentración utilizando I-HOx:

Como buffer de preconcentración se utilizó un buffer amoníaco/cloruro de amonio 0.05 M. Este buffer se preparó a partir de una solución stock 1 M preparada a partir de amoníaco calidad para análisis y ácido clorhídrico calidad Suprapur. Esta solución fue

purificada haciéndola pasar tres veces a través de una columna de Chelex-100 (100-200 mesh) de 10 ml de volumen de lecho. Esta solución stock se almacenó en frascos limpios de Nalgene® a 5 °C. Como ácido de elución se utilizó (al igual que con Chelex-100) una solución de HNO₃ 2 M. Se verificó la trazabilidad de los datos obtenidos analizando un material de referencia certificado de agua de mar (CASS-3, NRC, Canadá).

7.1.3 Reactivos utilizados en la extracción de metales con Resinas Impregnadas.

Las soluciones de iones metálicos se prepararon a partir de estándares de sus correspondientes percloratos grado analítico (Sigma, St. Louis, MO, USA) valorados previamente contra estándares para absorción atómica. Se utilizaron los metales como sus correspondientes percloratos para evitar fenómenos de complejación en la fase acuosa.

La solución de elución de los metales se preparó disolviendo 29.3 g de ácido etilendiaminotetracético (EDTA, BDH, Poole, UK) en 500 ml de una solución 0.4 M en amoníaco. No se utilizó la sal disódica de EDTA para evitar interferencias por absorción de fondo en AAS. La elución con ácidos fuertes como los usados para Chelex-100 no es posible debido a la altísima estabilidad de los complejos con el extractante.

7.1.4 Síntesis de I-HOx

Se siguieron los lineamientos de la síntesis propuesta por Hill²¹⁴ y utilizada por Sturgeon¹²⁶(Figura M-1). Como soporte se utilizó sílica gel grado TLC (Silicagel 60, Merck) con un área nominal de 500 m²/g y un tamaño de partícula de 200 a 500 µm (35 a 70 mesh aprox.). Previamente la sílica se lavó con agua regia (2 porciones de 100 ml), se secó a 450 C durante 12 horas y luego se la mantuvo en un desecador. La silanización se realizó mezclando una solución al 4% de 3-aminopropiltrimetoxisilano (Merck) preparada en acetona anhidra (secada con Na₂SO₄) con 100 g de sílica, dejándola reaccionar en un recipiente sellado durante 4 horas a 45 °C. El producto (aminopropil sílica gel), se filtra, se lava con acetona seca y se lo seca durante 12 hs en una estufa de vacío a 60 C. Posteriormente, se mezcla con 200 ml de CHCl₃ (Merck) que contienen disueltos 10g de cloruro de p-nitro-

benzoilo (Merck) y 8 ml de piridina (Merck). Se los deja reaccionar 48 hs. a 50 °C en un recipiente cerrado y se obtiene un producto marrón. El producto se filtra, se lava por decantación con CHCl_3 y se seca a 60 °C en una estufa de vacío durante 12 hs. El grupo nitro terminal se reduce mezclando el derivado benzoilado con 200 ml de una solución al 5% de ditionito de sodio (Merck) en agua deionizada y se lo deja reaccionar en un recipiente sellado durante 12 hs a 45 °C. El producto se lava por decantación con agua deionizada. El grupo amino terminal se diazota con 200 ml de una solución al 2% en NaNO_2 (Merck) en ácido acético al 1% durante 30 minutos en un baño de hielo a 0 °C. El producto obtenido se lava con agua deionizada helada por decantación. Para la copulación con la 8-hidroxiquinolina (Merck) se mezcla el sólido con una solución de oxina al 2% en etanol absoluto produciéndose un brusco cambio de color a púrpura intenso. La oxina inmovilizada sobre sílica se lava por decantación usando alícuotas de 100 ml de etanol hasta que éste no presenta coloración roja. Antes de ser usada en la extracción de metales la oxina inmovilizada se lava con 5 alícuotas de 100 ml de HNO_3 4M y luego se la equilibra con agua deionizada hasta pH 6. Se observa una cierta decoloración luego de este lavado que indica cierta degradación del producto. El sólido se guarda seco hasta el momento del uso. Una vez usado puede almacenarse en solución de pH 5.

7.1.5 Síntesis de la Resina Impregnada SIR-1

La resina SIR-1 se preparó impregnando Poli-(4-vinilpiridina) (Reillex HP, Reilly Industries Inc., Indianapolis, USA) con ácido di-(2-etil-hexil) ditiofosfórico (D2EHTPA). La síntesis y purificación de D2EHTPA a partir de P_2O_5 y los correspondientes alcoholes se realizó según Warshawsky et. al.³⁹⁰. Reillex HP es un polímero de divinilbenceno entrecruzado con un 25% de poli(4-vinilpiridina). Es una resina de tipo macrorreticular (30-60 mesh), con un área superficial de 76 m^2/g , un contenido de humedad del 55% en peso y un tamaño promedio de poros de 100 nm. La impregnación se realizó por inmersión de 1.5 g de polímero en 6.5 g de acetonitrilo destilado conteniendo 1.0 g de D2EHTPA. La mezcla se deja en un balón durante toda la noche a temperatura ambiente, luego se filtra por vacío en un filtro de vidrio sinterizado y se lava con 100 ml de tetrahidrofurano (THF) destilado. Los líquidos de lavado no se descartan y se determina la cantidad de ligando retenida por el polímero por evaporación del solvente y pesada por diferencia.

7.1.6 Reactivos y preparación de soluciones modelo para estudios de especiación por discriminación cinética.

Las soluciones de los ligandos EDTA, NTA, glicina y cloruro fueron preparadas a partir de sus reactivos calidad para análisis (Merck) y estandarizadas volumétricamente según los procedimientos recomendados en cada caso por la bibliografía⁸⁶. En el caso de EDTA y NTA se usaron los ácidos correspondientes como reactivos de partida, para evitar el agregado de otros cationes diferentes al Cd. Para su almacenamiento se prepararon soluciones 0.1 M que se almacenaron en frascos de polietileno previamente lavados con ácido nítrico 2M. El NTA obtenido comercialmente (99.9%) presenta ligantes mas fuertes como impurezas que deben ser eliminados por recristalización para no sobrevalorar su capacidad quelante en las experiencias. El NTA, previo a su uso fue purificado por recristalización en caliente de una solución 0.1 mM de Cd, lavado con agua y finalmente con etanol³⁹¹. La solución de ácidos húmicos se preparó a partir de ácidos húmicos grado técnico (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) (Lote #01902AR). Para su almacenamiento se preparó una solución que contiene 70 mg/l de HA disolviendo 0.100 g de la sal sódica de HA en 1 litro de amoníaco 0.1 M (calidad p.a. purificado por una columna de Chelex-100). La solución resultante se filtró a través de un filtro de membrana Millipore de 0.22 μm de poro y el residuo fue descartado. La solución resultante fue purificada del siguiente modo: 250 ml de la solución se ponen en un vaso de precipitados con agitación constante durante cuatro días con un gramo de Chelex-100 (100-200 mesh) que se encuentran contenidos en una membrana de diálisis (Medicell Int., USA). La solución se guarda a 4 C al abrigo de la luz. Las soluciones de trabajo se prepararon por agregado de volúmenes adecuados de las soluciones 0.1 M a patrones de calibrado conteniendo 0.100 $\mu\text{g/l}$ de Cd lo que equivale a una concentración de $8.90 \cdot 10^{-10}$ M. Se varió la concentración de ligandos de manera de obtener relaciones ligando : metal que varfen entre 1:1 y 1:10000 para EDTA, NTA, Cl y glicina y entre 1:1 y 1:50 para HA. Antes de someter las soluciones al procedimiento de preconcentración se las ajusto a pH=6.5 mediante el agregado de porciones de 10 μl de HNO_3 o NH_3 2M.

Los diagramas de especiación en el equilibrio se construyeron utilizando el programa MINEQL+³⁵⁴, exportando los resultados producidos en formato ASCII y volviéndolos a importar en entorno WINDOWS mediante EXCEL 7.0.

7.1.7 Materiales ensayados para la retención de la fracción inerte de Cd (CdL₂)

Para la retención de los complejos Cd-IIA se ensayaron los siguientes materiales:

AG-MP-1 (Bio-Rad, Richmond, CA USA): Es una resina aniónica fuerte con un soporte estireno divinilbenceno. Posee un MWCO muy alto y se utiliza para la separación de sustancias de alto peso molecular.

IRA-958 (Rohm & Haas, Philadelphia, USA): Es una resina aniónica fuerte, pero su soporte es acrílico-divinilbenceno. Al ser mas polar, es mas resistente a la adsorción irreversible de compuestos orgánicos.

Sílica C-18 (Aldrich 37763-5): es un sólido usado para columnas de partición preparativas en la aislación de compuestos orgánicos de muestras biológicas.

Amberlite XAD-16 (Rohm & Haas, Philadelphia, USA): es una resina de adsorción. Posee una matriz estireno-divinilbenceno con gran área. La resina tipo “XAD-16” posee un tamaño de poro mayor a las tipo “XAD-2” y “XAD-7”, lo que se traduce en un MWCO mayor.

Reillex 425 (Reilly Industries Inc., Indianapolis, USA): es una resina aniónica débil que contiene vinil-piridinas polimerizadas (polivinilpiridinas). Puede intercambiar cationes o aniones según el pH.

Las características de cada resina se muestran en la Tabla M-1. Se incluyen también los parámetros obtenidos para Chelex-100 e I-HOx. Todas los soportes de extracción se lavaron previo a su uso con HNO₃ 2M y luego se sonicaron con metanol durante 15 minutos. Los rellenos sílica C-18 y Amberlite XAD-16 se cargaron en las microcolumnas como una suspensión en agua y acetona (1:1). Los demás rellenos se cargaron como una suspensión en agua. Previo al experimento de saturación definitivo, las resinas se sometieron a tres ciclos de carga y elución de manera de bloquear toda posible absorción irreversible en los soportes.

7.1.8 Reactivos usados en la retención y elución de CdL₂ de distintas resinas.

La solución de HA 7 mg l⁻¹ empleada en la determinación de capacidad dinámica se preparó por dilución de la solución descrita en la sección 7.1.6. Las microcolumnas rellenas con XAD-16 y sílica C-18 se eluyeron con metanol (grado HPLC, Merck), acetonitrilo (grado HPLC, Merck) o acetato de etilo (calidad para análisis, Merck). Las columnas aniónicas se eluyeron con una mezcla 0.5 M en NH₃ y 2 M NH₄NO₃ preparada a partir de NH₃ y HNO₃ grado Suprapur (Merck). Los buffers empleados para ajustar el pH fueron idénticos a los descriptos anteriormente.

7.2 Aparatos

7.2.1 Instrumentos

Las determinaciones de metales se realizaron acoplando un sistema de flujo (ver mas adelante) con un espectrómetro de absorción atómica Shimadzu 6501 con accesorio de horno de grafito GFA 6000 y muestreador ASC 6000. Este equipo se encuentra controlados por una PC con microprocesador tipo AT 486. Se utilizaron tubos de grafito de alta densidad que permiten un máximo de 100 µl de volumen de inyección. La determinación de Cd y Pb se realizó a través de curvas de calibrado basadas en medidas de altura de pico del transiente de atomización, a 228.8 y 283.3 nm respectivamente. Para las determinaciones de capacidad de I-HOx la concentración de Cu se determinó con un Espectrómetro de Absorción Atómica Varian AA-5 con mechero de aire acetileno. Se lo operó en las condiciones estándar descriptas por el fabricante. Las medidas de metales en los eluidos de las resinas impregnadas se realizaron en un espectrómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer 5100, utilizando atomización por llama de aire acetileno en las condiciones instrumentales descriptas por el fabricante. Las medidas de sangrado del extractante de las resinas impregnadas se realizaron a través de la determinación de azufre y fósforo con un Espectrómetro de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES) marca Spectra. Las determinaciones elementales mediante microanálisis se realizaron en un analizador Carlo Erba EA 1108. Las determinaciones porosimétricas se realizaron mediante Cromatografía de Exclusión Inversa con un sistema convencional de alta presión que utiliza una bomba de pistón (VLD-30, CSAV, Praga, Rep. Checa), una válvula Rheodyne 7125 y un detector de índice de refracción (RIDK101, Laboratori

Pristroje, Praga, Rep. Checa). Las medidas de área BET³⁹² se realizaron con un aparato Digisorb 2600 (Micrometrics, USA). Los espectros infrarrojos se realizaron con un Espectrómetro de FT-IR 510 P (Nicolet Instruments, USA) en pastillas de KBr. La digestión de algas se llevó a cabo con un digestor de microondas operando a presión normal (semiabierto) modelo Microdigest 301 (PROLABO). Las medidas de masas moleculares de los ácidos húmicos se realizaron mediante GPC con un cromatógrafo Shimadzu L6A equipado con un detector de índice de refracción RID-6A (Shimadzu) y un integrador C-RS Chromatopac GPC Program. Los espectros de las soluciones de ácidos húmicos se obtuvieron con un espectrofotómetro Hewlett Packard 8452A equipado con una celda de 1 cm de paso óptico. La determinación de la capacidad dinámica de los distintos materiales para la retención de la fracción orgánico-ligada de Cd se realizó usando como detector de flujo un detector UV-Visible para HPLC modelo SPV-AV (Shimadzu), equipado con una celda de flujo de 8 µl. Este detector se conectó a una placa de adquisición A/D Keithel DAS-800.

7.2.2 Componentes del sistema de preconcentración FIA.

En la Figura M-2 podemos apreciar el sistema de preconcentración acoplado al espectrómetro Shimadzu 6701 (Kyoto, Japon). Nótese la bomba peristáltica sobre el equipo y a su lado el sistema de flujo con válvulas solenoides. Sobre el brazo robótico del muestreador automático, se encuentra la columna de preconcentración. En segundo plano puede verse la PC utilizada para el control de todas las operaciones bajo entorno Windows. En la Figura M-3 se muestra un esquema de bloques del sistema de preconcentración. La microcolumna de preconcentración fue intercalada en el extremo del brazo robótico del muestreador, lo que se conoce como configuración “en el extremo” (“in tip configuration”)⁶⁸. Esta columna se fabricó con un tip de micropipeta Eppendorf (0.5 a 10 µl, Cat. No. 0030 001.168) que tiene un volumen total de 25 µl, en el que se empacaron 10 µl de resina Chelex-100 (Figura M-4). La microcolumna se conectó al extremo terminal de la cañería de inyección del muestreador, lo que reduce el volumen de eluyente necesario (la elución es en contracorriente como se verá luego). La resina se retuvo en la columna comprimiéndola entre dos tapones de esponja de poliestireno. Estos tapones compensan parcialmente los cambios de volumen producidos por el cambio de pH del medio (elución / preconcentración). La tubería original de la punta de inyección del

muestreador fue remplazada por un trozo de tubería de PTFE de 0.5 mm de diámetro interno y 1.0 cm de longitud. Por lo tanto el volumen total a ser eluido (volumen de resina + tip de inyección + tapones de esponja) fue de 15 μ l. La solución buffer para acondicionamiento de la muestra se purificó en línea a través de una columna de 6 cm de largo y 2.5 mm de diámetro interno rellena de Chelex-100. A pesar de que el buffer había sido purificado previamente, ésta columna fue agregada para asegurar la ausencia de cualquier contaminación posterior. Las dos microcolumnas se rellenaron con una suspensión de Chelex-100 en forma de sal amónica utilizando una jeringa y fueron utilizadas por lo menos en 50 ciclos de preconcentración-elución antes de ser renovadas, sólo por precaución, tras 5 horas de operación.

El sistema FIA se ensambló con acoples Cheminert (“fitings”) de volumen muerto nulo (Valco Instruments Co., Houston, TX, U.S.A.) y tubería de PTFE (0.8 mm i.d.). Se utilizó una bomba peristáltica Ismatec MS Reglo (Ismatec, Glattbrugg, Germany) de cuatro canales, controlada a través del puerto de salida analógico. Para conmutar las corrientes de los distintos reactivos ó muestras se utilizaron válvulas solenoides de tres vías (Cole Parmer, Illinois, U.S.A.). Tanto V1 como V2 son válvulas de una entrada y dos salidas de volumen muerto nulo con las partes mojadas confeccionadas en PEEK; V3 es una válvula con 2 entradas y una salida con las partes mojadas construidas en PTFE. Las válvulas solenoides y la bomba peristáltica fueron conmutadas por un temporizador con 4 “relays” de salida controlado por el puerto paralelo de la PC (ver apéndice). El software para controlar la duración de los distintos eventos durante la secuencia de preconcentración (Tabla M-2) fue escrito en Visual Basic 1.0 (ver luego) y permite el control de todas las etapas con una resolución de tiempo de 0.01 s. Cada etapa descrita en la Tabla M-2 consiste en un patrón de flujo diferente a través de las válvulas y por lo tanto el software permite la programación de etapas independientes unas de otras, así como el control remoto de la bomba peristáltica. La conexión entre el sistema FIA y el espectrómetro se realizó conectando una de las entradas de V3 con la jeringa del circuito de flujo del muestreador y la salida de V3 con el de la microcolumna de preconcentración en el brazo del muestreador.

7.2.3 Comando electrónico de las válvulas solenoides del sistema de preconcentración.

El temporizado de las etapas del ciclo de preconcentración se logra con un circuito comandado a través de un puerto de la PC. El puerto mas sencillo de programar es el puerto paralelo LPTx pero también se puede utilizar un puerto serial COMx.

El esquema del circuito de control para una de las válvulas solenoides (en total son 4 válvulas) se muestra en la Figura M-5. Este circuito consta de dos integrados MC1413P (Mottorola, ULN2003A), que contienen siete transistores NPN en configuración Darlington. Estos comandan 4 relays conectados a la alimentación de las válvulas solenoides y al control analógico de la bomba peristáltica. La señal de comando para el circuito temporizador se envía desde la PC, escribiendo en la dirección &H378 desde el Visual Basic a través de la rutina "InpOut" (<http://www.download.com>) declarada al principio del programa. Cada una de las etapas del proceso se controla con un temporizador ("Timer") independiente, ya incorporado dentro de las herramientas de Visual Basic. El usuario programa la secuencia de flujo de cada etapa y la duración de cada una dentro del casillero correspondiente (Figura M-6). El software tiene también la posibilidad de conmutar manualmente las solenoides, en el caso de que se desee limpiar alguna sección de tubería especial o simplemente forzar al sistema de flujo a una configuración dada. Es posible utilizar el sistema de preconcentración sin conocimientos previos de programación o de electrónica básica, puesto que la interfaz es "amigable".

7.2.3.1 Programa de control

Se anexa a continuación el programa realizado en Visual Basic.

```
Declare Function Inp Lib "InpOut.dll" (ByVal Port%) As Integer
Declare Sub out Lib "InpOut.dll" (ByVal Port%, ByVal Value%)
Dim datos As Single

Sub Command1_Click ()
    Text1.Text = " TEMPORIZANDO"
    Timer1.Enabled = -1
End Sub

Sub Timer1_Timer () (se replete para los 5 temporizadores en el Form)
    Static contador1 As Integer
    Option1(0).Value = 1

    If Check1(0).Value = 1 Then
        a = 1
    Else
        a = 0
    End If
    If Check1(1).Value = 1 Then
        b = 2
    Else
        b = 0
    End If
    If Check1(2).Value = 1 Then
        c = 4
    Else
        c = 0
    End If
    If Check1(3).Value = 1 Then
        d = 8
    Else
        d = 0
    End If
    e1 = a + b + c + d
```

<pre> out &H378, c1 contador1 = contador1 + 1 If contador1 = Val(t1.Text) Then contador1 = 0 Timer2.Enabled = -1 Timer1.Enabled = 0 Else Exit Sub End If End Sub Sub Command3_Click () Text1.Text = "MODULO MANUAL" Timer1.Enabled = 0 Timer2.Enabled = 0 Timer3.Enabled = 0 Timer4.Enabled = 0 Timer5.Enabled = 0 If Check2(0).Value = 1 Then </pre>	<pre> a = 1 Else a = 0 End If If Check2(1).Value = 1 Then b = 2 Else b = 0 End If If Check2(2).Value = 1 Then c = 4 Else c = 0 End If If Check2(3).Value = 1 Then d = 8 Else d = 0 End If c1 = a + b + c + d out &H378, c1 End Sub </pre>
--	---

7.2.4 Componentes del sistema FIA bicolumna para la especiación operacional de Cd. Modificaciones a las microcolumnas. Calibrado de volúmenes en el sistema bicolumna

El sistema FIA bicolumna se ensambló a partir del sistema usado para la preconcentración de la fracción lábil de Cd y Pb¹⁸². Debido a la presencia de una columna adicional, la caída de presión fue mayor y por lo tanto se modificaron las columnas para que resistan una mayor presión de trabajo. En la Figura M-7 se muestra un esquema del sistema de flujo completo (A) y de las microcolumnas utilizadas (B). La microcolumna C1 se rellenó con Chelex-100 (Bio-Rad) para la retención de iones metálicos y especies lábiles. Esta columna se torneó a partir de una pieza de acrílico cilíndrica de 3.0 cm de largo por 1.6 cm de diámetro externo a la que se le fabricaron roscas hembra del tipo ¼-28. La parte interna de esta pieza de acrílico se perforó para producir un lecho de 11.5 mm de largo y 1.5 mm ID en el caso de C1 (BV=20 µl). En el caso de C2, esta columna se rellenó con sílica C-18 (Aldrich Cat. No. 37763-5) y el lecho de la columna se construyó de 11.5 mm de largo por 2 mm de ID (BV=36 µl). La columna C2 se conectó al tipo de inyección del brazo del autosamplador mediante un trozo de tubería de PTFE de 0.5 mm ID de 10 cm de largo (20 µl). Este pedazo de tubería reemplazó a la tubería original del instrumento. Por el otro extremo, la columna C2 se conectó a la columna C1 mediante un trozo de 39.5 cm de la misma tubería (80 µl). La microcolumna C1 se conectó a la válvula solenoide V3 mediante un trozo de tubería de 100 µl de volumen. Estos volúmenes

fueron cuidadosamente medidos de manera que los distintos líquidos usados para eluir las especies contacten sólo los rellenos deseados. La columna C1 se rellenó con 10 µl de Chelex-100 en la forma amónica a través de una suspensión inyectada con una jeringa acoplada a un adaptador especial que puede unirse a la microcolumna. Los tapones de esponja de poliuretano originalmente usados para retener a la resina Chelex-100 fueron reemplazados por dos tapones de lana de vidrio silanizada previamente lavada con HNO₃ (Aldrich). Estos tapones no brindan el efecto elástico de compensación del cambio de volumen de Chelex-100, pero son mas resistentes al ataque de ácidos. Cuando la resina Chelex-100 es eluída con ácidos, su volumen se reduce en un 30-40% aproximadamente, generándose un pequeño volumen vacío (3 µl aprox.). este pequeño volumen vacío no afecta la reproducibilidad de las medidas, puesto que de todas formas, la columna entra en contacto con pequeños volúmenes de aire que son usados para impulsar el eluyente hacia la microcolumna. La progresiva compactación del relleno de las microcolumnas es causa de graves imprecisiones en la determinación puesto que la elución puede hacerse incompleta si el contacto entre el eluyente y la columna es insuficiente. Para evitarlo, la aspiración del eluyente se hizo en sentido contrario al sentido de elución. Esta inversión en el sentido de flujo, disminuye el compactamiento de las resinas, que es mucho mas severo en el caso de soportes inorgánicos como C-18, puesto que son menos elásticos.

La columna C2 se rellenó con 20 µl de sílica C-18 (previamente lavada con metanol y HNO₃), usando el mismo procedimiento que para Chelex-100. Las microcolumnas empleadas se diseñaron de manera de reducir la dispersión del eluyente y permitir una elución completa con un mínimo volumen, de manera de aumentar el factor de enriquecimiento sin incrementar el volumen de muestra usado. No es posible reducir más el diámetro interno de las microcolumnas, puesto que la carga de las resinas se hace muy dificultosa. Las microcolumnas se sujetaron al brazo del autosamplador a través de pequeños precintos plásticos.

La microcolumna C2 es la que se encuentra más próxima al tip de inyección. En el sistema anterior de preconcentración, la columna reemplaza al tip de inyección. En este sistema, la columna se encuentra inmediatamente por encima del trozo de tubería que sirve de tip de inyección, conectado a éste a través de conectores de cero volumen muerto (Valco). Esto permite que la conexión del sistema FIA de

preconcentración al espectrómetro sea mucho mas sencilla y rápida, ya que no es necesario re-alinear la posición de inyección del autosamplador.

7.3 Procedimientos

7.3.1 Procedimiento de preconcentración de Cd y Pb usando el sistema FI-ETA-AAS usando Chelex-100 como soporte.

Las diferentes operaciones del sistema FIA junto a la circulación de los fluidos se muestran en el Figura M-8. Todos los pasos se realizaron sin intervención manual. Los flujos de buffer y de muestra se muestran en la Tabla M-2. Estos fueron optimizados para aumentar la frecuencia de análisis sin afectar la eficiencia de preconcentración⁶⁵(E%) o crear altas contrapresiones en la microcolumna, lo que produce fugas en el sistema de flujo. La muestra y el buffer se mezclaron a través de una confluencia en forma de T. El pH de la solución resultante fue de 5.2, tanto para las muestras como para los patrones de acuerdo a lo descrito por Sturgeon et al.¹²⁴. El ajuste de pH se realizó en línea para evitar operaciones externas contaminantes. Durante la etapa de pre-lavado (a) las cañerías del sistema se enjuagaron con la nueva muestra para eliminar remanentes de la muestra anterior. En la etapa (b) la columna de preconcentración se lavó con buffer para convertir la resina a la forma amonio (recuérdese que la resina queda en la forma protonada luego del último ciclo de elución). La etapa (c) es la etapa de preconcentración propiamente dicha: se utilizaron distintos tiempos de preconcentración dependiendo del analito (tiempos mas largos para la determinación de Pb) y de su concentración, de manera de alcanzar la sensibilidad deseada. La etapa (d) es similar a la etapa (b); ésta etapa remueve todos los restos de la matriz remanentes en la columna y eluye selectivamente los metales alcalinos y alcalinos térreos que son retenidos por los sitios libres de la resina, reduciendo de esta manera la absorción inespecífica de fondo¹²³.

La etapa (e) es la etapa de elución: V3 se conmuta para conectar la columna de preconcentración con la jeringa del muestreador. La bomba se detiene para evitar el gasto innecesario de reactivos y el brazo del muestreador inicia la operación aspirando el eluyente a través de la punta de inyección donde está insertada la microcolumna. Se evaluaron dos secuencias diferentes de elución: en el modo de “inyección completa”, se aspiran 80 µl de HNO₃ 2M en sentido contrario al de la circulación de líquidos del

paso (c) y se eluyen directamente dentro del horno de grafito, liberándose los metales por protonación de los grupos complejantes. La elución en sentido contrario a la preconcentración evita que el relleno de la columna se compacte y maximiza la interacción entre el relleno y el eluyente, dado que éste último contacta dos veces la resina. Antes y después de aspirar el eluyente, la columna es enjuagada con DIW. Este enjuague evita que el ácido de elución se neutralice parcialmente con el buffer remanente en la columna y que se eluya gran cantidad de nitrato de amonio dentro del horno.

En el otro modo de inyección, “inyección parcial”, se aspiran 220 μl de HNO_3 a través de la columna los que se homogeneizan en el recipiente de mezclado del muestreador. Sólo una fracción de dicho eluido (70 μl) es inyectada en el horno, permitiendo así replicar el paso de análisis para un mismo ciclo de preconcentración. En este caso también se hacen etapas de lavado antes y después de la elución. Todas las etapas de elución se programan a través del software del espectrómetro.

7.3.2 Procedimiento para la caracterización morfológica de Chelex-100 e I-HOx

Las experiencias de ISEC se llevaron a cabo usando como fase móvil una solución 0.2 M de Na_2SO_4 en agua o alternativamente THF. El volumen de la columna utilizada para contener a Chelex-100 e I-HOx fue de 4.04 ml. Se obtuvieron los volúmenes de elución a través de un contador de gotas y un integrador (DC 1002 e IT 1002 respectivamente, Laboratorni Pstroje, Praga). Esto permite una precisión volumétrica de 0.01 ml.. Se utilizó un juego de oligosacáridos, dextranos (fase móvil acuosa) y de alcanos lineales y poliestirenos (fase móvil THF) como patrones de peso molecular (Pressure Chemicals Co. Pittsburg), que fueron inyectados disueltos en la fase móvil correspondiente.

7.3.3 Procedimiento de Determinación de Capacidad de I-HOx

Las determinaciones de capacidad se realizaron utilizando Cu como ion indicador, dada la alta constante de formación de sus complejos con oxina. Para ello se puso en contacto un volumen conocido de una solución de una solución que contiene 60 mg/l de un patrón de Cu (como $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) con una masa conocida de la sílica funcionalizada. El pH de la solución se reguló en 5.0 mediante un buffer acetato de sodio/ácido acético de concentración 0.1 M. La mezcla se dejó equilibrar durante 1 h

con agitación constante. Una vez finalizado el período de equilibración, se filtró la sílica mediante un filtro de vidrio sinterizado y se midió la concentración de Cu en el sobrenadante. La capacidad se calculó a partir de los moles de cobre retenidos medidos por diferencia entre la concentración final y la concentración inicial. Se realizaron curvas de agregado patrón y curvas de calibración con el objeto de demostrar que la presencia de buffer no afecta las medidas realizadas. Los ensayos se hicieron por triplicado obteniéndose una concordancia del 5%. La capacidad obtenida fue de 160 micromoles de Cu por gramo de sílica funcionalizada. Los experimentos también se llevaron a cabo sobre blancos de la sílica no funcionalizada, no observándose adsorción de Cu, dado que a al pH elegido no existe complejación por los grupos silanol no funcionalizados. Los resultados de capacidad se corroboraron mediante el análisis elemental, que produjo resultados concordantes.

7.3.4 Procedimientos para la extracción en columna con resinas impregnadas.

Se realizaron experiencias en columnas de vidrio Pyrex de 7ml de volumen de lecho (0.5 g de SIR) equipadas con robinetes de Teflon. Las columnas se acondicionaron en el mismo medio en el cuál se realiza la extracción (concentraciones variables de HClO_4). Se alimentó la columna con la solución de metales (Pb, Cd, Zn, Ni) y se colectaron fracciones provenientes de la salida de la columna cada tres volúmenes de lecho. Se continuó con esta operación hasta que las concentraciones de los metales en la solución de alimentación fuesen idénticas a las concentraciones en el efluente (situación de estado estacionario). Luego, se lavó la columna con agua deionizada hasta no encontrar metales en la solución de lavado. La solución de elución utilizada fue la de EDTA amoniacal descripta anteriormente. Finalizada la elución, la columna se lavó con solución de amoníaco 0.2 M y con DIW hasta pH neutro. Los factores de selectividad y las capacidades se calcularon a partir de las curvas “breakthrough” obtenidas, utilizando planillas de cálculo desarrolladas “ad hoc” en Excel 7.0.

7.3.5 Procedimiento para la determinación de Cadmio con I-HOx como soporte mediante FI-ETA-AAS.

La sílica funcionalizada se cargó en la microcolumna como una suspensión en agua. Para ello se utilizó una jeringa dotada de una pequeña porción de tubería de Tygon en

su extremo, la que actuó como conexión entre la jeringa y la microcolumna. Se trató de no comprimir innecesariamente la sílica en el proceso de empacado para evitar obstrucciones al flujo de líquidos. A diferencia de Chelex-100 que es un polímero orgánico levemente elástico, la sílica es absolutamente rígida, por lo que si se hace mucha presión sobre el relleno en el momento de empacar la columna, esta se obtura. Al igual que en el caso de Chelex-100, se prepararon microcolumnas nuevas para cada experiencia.

El procedimiento de calibrado y la instrumentación fueron idénticos a los utilizados con Chelex-100. Los flujos de muestra y buffer utilizados se redujeron cinco veces ($1.40 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ y $0.78 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ respectivamente) tal como se explica en el Capítulo 2. Los flujos se calibraron por pesada cada dos meses de operación para corregir el desgaste de la tubería de la bomba peristáltica.

7.3.6 Procedimiento para el estudio de la repetitividad volumétrica del sistema.

Para determinar la precisión volumétrica del sistema de preconcentración, se calibraron los volúmenes de blanco y de muestra. Esta calibración se realizó por pesada del volumen de agua que atraviesa el sistema para la muestra y para el blanco de reactivos. Se ejecutó el ciclo normal de conmutación de las válvulas, utilizando agua bidestilada en todos los canales y pesándola al final de la experiencia. En la Figura M-9 A) se muestra el recorrido normal de los fluidos. La etapa “a” es la etapa de enjuague de las tuberías, la “b” es la etapa de preacondicionamiento de la columna, la etapa “c” es la etapa de preconcentración, la etapa “d” es la etapa de enjuague de la columna y la última etapa es la de elución de la columna y el análisis. Para determinar la precisión de la masa del **blanco**, es necesario bloquear el canal de la muestra (Figura M-9 B), y para determinar la precisión de la **muestra** se bloquea el canal del blanco (Figura M-9 C). Las experiencias se realizaron a distintos flujos y distintos tiempos de preconcentración para determinar si alguno de estos factores afecta la precisión volumétrica (los flujos bajos se utilizan cuando el relleno es I-HOx). Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado y los datos se procesaron en Excel 7.0.

7.3.7 Cálculo de las curvas características de detección.

Las curvas características de detección se calcularon para curvas de calibrado construidas utilizando Chelex-100 e I-HOx como soportes de preconcentración. Los cálculos se realizaron con el programa DETARCHI³⁹³ y con Excel 7.0. Para obtener los valores de los estadísticos “t” de Student en Excel, se utilizaron las funciones estadísticas TDIST y TINV.

7.3.8 Cálculo de los límites de detección para distintos tiempos de preconcentración:

Las curvas de límite de detección en función del tiempo de preconcentración usando como soporte de preconcentración Chelex-100 se calcularon usando los siguientes parámetros experimentales:

Volumen de elución: 80 µl,

Concentración de Cd en el buffer: 20 ppt,

Concentración de Cd en el eluyente: 250 ppt,

Sensibilidad específica: 0.00057 AU.pg⁻¹

Flujo de buffer: 1,21 ml min⁻¹,

Flujo de muestra: 5,09 ml min⁻¹,

Eficiencia de transferencia de masa: 71%

Tiempo de pre-acondicionamiento (t_0): 30 segundos.

Tiempo de preconcentración: **variable** entre 30 y 120 segundos

Tiempo de lavado (t_l): 15 segundos.

Para el cálculo de la frecuencia de análisis se utilizó además:

Duración del enjuague de la jeringa: 30 segundos

Duración de la inyección : 16 segundos (velocidad de elución 0.005 ml s⁻¹)

Duración del programa de atomización: 96 segundos.

Como límite superior de la curva de calibrado, se consideró un valor máximo de absorbancia por encima del cuál ésta comienza a curvarse (Absorbancia máxima: 0.450 AU).

7.3.9 Toma y acondicionamiento de las muestras para los estudios de bioacumulación.

Se colectaron muestras de las especies de algas bentónicas: *U. Lactuca* (Chlorophyceae), *E. Prolifera* (Chlorophyceae) y *P. Columbina* (Rhodophyceae). Las

algas se colectaron en dos sitios de muestreo en el Golfo San Jorge: Punta Borja y Punta Maqueda (ver Tabla 4.1 y Figura M-10). Las muestras de *U. Lactuca* y *E. Prolifera* (algas verdes) fueron colectadas de las comunidades encontradas en las piletas rocosas producidas por la bajante de la marea en el litoral marítimo. Las muestras de *P. Columbina* (alga roja) se colectaron de los cantos rodados y rocas de las playas. Para reducir la variabilidad inherente de las poblaciones de macroalgas y la variabilidad de factores alométricos tales como largo y peso, muestras de distintos individuos del mismo lugar fueron mezcladas y seleccionadas según el procedimiento recomendado por Langston y Spence³⁹⁴.

Las muestras de las plantas frescas (entre 500 y 1000 g de peso) se guardaron en bolsas de polietileno inmediatamente después de su colección y se conservaron en hielo para su transporte hasta el laboratorio. Una vez en el laboratorio, fueron lavadas con agua deionizada y secadas por liofilizado en frío. Las muestras liofilizadas se molieron hasta pasar por un tamiz de malla de 212 μm y se guardaron en bolsas plásticas en un desecador hasta que se las sometió al proceso de digestión por microondas.

Las muestras de agua de mar se colectaron al mismo tiempo y en el mismo lugar que se colectaron las algas. Para investigar las variaciones estacionales, las muestras de agua se colectaron durante un año cada dos meses. Las muestras se filtraron por un filtro de 0.22 μm de poro (Millipore), y se almacenaron en botellas de PTFE de 1 litro, que fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del análisis. Previo al análisis, las muestras se neutralizaron con amoníaco calidad para análisis que previamente había sido purificado a través de una columna de Chelex-100.

7.3.10 Procedimiento de digestión por microondas de algas del Atlántico Sur..

Todos los reactivos usados para la digestión de las algas fueron de grado analítico. Se utilizó ácido nítrico y sulfúrico (Merck) y peróxido de hidrógeno (Riedel de Haen, Hannover, Alemania).

Se pesó una masa conocida (400-600 mg) del alga molida y seca y se la digirió mediante un horno de microondas en un recipiente de PTFE con ácido nítrico al 70% (p/p) y con peróxido de hidrógeno al 35% (p/p). El programa de calentamiento y la adición secuencial de reactivos se muestran en la Tabla M-3.

La trazabilidad del método se verificó a través de la digestión y análisis de los materiales de referencia certificados "*Ulva Lactuca*" (BCR 279, Community Bureau

of Reference, EU, 1987) y “hojas de manzana” (NIST 1515, National Institute of Standards and Technology, USA, 1993). Estos materiales fueron tratados de manera idéntica a las muestras y los resultados obtenidos estuvieron de acuerdo con los valores certificados (95% confianza).

7.3.11 Determinación de Metales Pesados en algas y muestras de agua de mar.

Los metales pesados en los digeridos de algas fueron determinados mediante espectrometría atómica con horno de grafito utilizando $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ al 5% como modificador de matriz. La concentración total de metales disueltos en muestras de agua de mar se determinó por extracción con APDC en MIBK y posterior análisis por AAS³⁹⁵. La desviación estándar relativa para el procedimiento de extracción y análisis fue del 20% (n=5). La fracción lábil de Cd y Pb se determinó mediante el sistema FI-ETA-AAS en las condiciones ya descritas utilizando como soporte de preconcentración Chelex-100. Las condiciones de operación fueron idénticas a las expuestas en el Capítulo 1. Debido a los contenidos relativamente altos de Pb, los tiempos de preconcentración debieron ser disminuídos. En promedio se utilizaron tiempos de preconcentración de 60 segundos para la determinación de Cd y de 30 segundos para la determinación de Pb.

7.3.12 Titulaciones Complejométricas de Ácidos Húmicos. Modelado y Ajuste de las curvas de Titulación.

Cuando las velocidades de formación de los complejos entre el ion metálico y los ligandos son lentas, la determinación de las constantes de equilibrio de formación de estos complejos no pueden determinarse por técnicas rápidas y deben separarse los componentes previo a su determinación. Una manera eficiente de separar los componentes es mediante extracción líquido-sólido³⁵⁷.

Para la determinación de las constantes de estabilidad condicionales de los complejos Cd-HA se utilizó el siguiente protocolo de titulación:

- Se preparan 10 soluciones que contienen una concentración fija de HA (70 mg l^{-1} o 7 mg l^{-1}) en envases plásticos para evitar efectos de adsorción.
- Se agregan concentraciones crecientes de Cd mediante una micropipeta automática y se ajusta el pH al valor deseado. (5,2 y 8,7) mediante la adición de buffer acético/acetato de amonio 1 M o bien buffer amoníaco/cloruro de

amonio 1M. (también se corre un blanco y un testigo). La fuerza iónica de la solución fue 0.05 M en todos los casos.

- Se agitan las soluciones durante 5 minutos mediante un vortex.
- Se espera 4 Hs, debido a la lenta cinética de reacción.
- Se separan los complejos Cd-HA mediante el agregado de 50 mg de una resina adecuada (Amberlite XAD-16 a pH ácido, Bio-Rad AG-MP1 a pH alcalino). Se verifica la remoción completa de los HA cuando la solución sobrenadante es transparente.
- Se centrifugan las soluciones y se analiza Cd en el líquido sobrenadante mediante ETA-AAS.

Una vez obtenidos los puntos de la curva de titulación, se calculan los moles agregados de Cd a la solución y los moles encontrados en el sobrenadante. Estos datos son ajustados utilizando distintos modelos (uno o varios ligandos) y distintas condiciones iniciales (concentración de sitios activos y constantes condicionales estimadas)³⁹⁶. Las constantes de equilibrio y la concentración de sitios activos junto a sus incertidumbre son ajustadas a partir de las curvas de titulación experimentales mediante el programa de regresión FITEQL³⁵⁶. La estimación de la incertidumbre en las constantes se realiza mediante propagación de errores teniendo en cuenta los errores experimentales en la determinación de la concentración de Cd en el sobrenadante (RSD%=5%) y en la concentración de Cd agregada durante la preparación de las soluciones patrón (RSD%=1%). Los resultados obtenidos con el método propuesto concordaron con los obtenidos por Figura et. al. para una solución de HA de 70 mg/l titulada a pH=10.0, lo que valida los resultados.

7.3.13 Determinación de las masas moleculares de la solución de ácidos húmicos.

Se analizó la solución stock de 70 mg/l de HA en NH_3 0.1 M mediante Cromatografía de Permeación por Geles (GPC). Se utilizaron los equipos descriptos en Instrumentos. Se utilizó una columna ASAHIPAK 3230-520 y como fase móvil un buffer de pH=10 $\text{NaHCO}_3/\text{NaOH}$ 0.05 M (para una discusión interesante de las fases móviles ver la referencia³⁷⁸). El flujo de operación fue de 1 ml min^{-1} y el volumen de inyección fue de 200 μl a temperatura ambiente. Se realizó una curva de calibración (M_w vs. V_e) utilizando como patrones a oligosacáridos como el pululano SHODEX ($MW=5800$), la maltotriosa (504), la maltosa (360) y la glucosa (180). Se obtuvo una curva de

calibrado lineal y los resultados de masas estuvieron en concordancia con el rango informado por Rodríguez Procopio et al.³⁴² que es de 600 a 1000 g/l.

7.3.14 Experiencias para determinar la influencia del flujo de la solución sobre la recuperación de Cd de soluciones que contienen EDTA.

Soluciones con una concentración de Cd igual a $1.78 \cdot 10^{-9}$ M y una concentración de EDTA igual a $1.78 \cdot 10^{-8}$ M fueron preconcentradas con un sistema de flujo idéntico al usado en la determinación “en línea”. Las muestras se preconcentraron sobre una microcolumna conteniendo 8 μ l de I-HOx. Se varió la velocidad de giro de la bomba peristáltica para conseguir un rango de tiempos de contacto entre 10 y 45 milisegundos. Los tiempos de preconcentración se modificaron de manera de mantener constante el volumen de muestra que atraviesa la columna. Los tiempos de contacto se calcularon teniendo en cuenta la masa molecular del complejo Cd-EDTA ($M_r=400.4$), lo que produce una fracción de volumen muerto (ϵ) igual a 0.15 (aproximadamente un 53% del volumen total de poros se encuentra disponible).

Una vez realizada la preconcentración, los metales se eluyeron de la columna manualmente mediante una jeringa plástica con 200 μ l de HNO_3 2M que fueron recogidos en viales de PVC. El contenido de Cd en estas soluciones fue analizado mediante ETA-AAS y comparado contra una solución de Cd a la que no se le agregó EDTA y que fue sometida al mismo proceso. Del cociente entre ambas señales se calculó la recuperación porcentual. Las experiencias a distintos flujos también se repitieron para Chelex-100, sin embargo no fue posible observar variaciones significativas en la retención.

7.3.15 Procedimiento para la determinación de la capacidad dinámica de distintas resinas.

La capacidad de retención de ácidos húmicos de los distintos materiales se determinó en condiciones dinámicas mediante experiencias de saturación. (experiencias breakthrough). Para ello se monitoreó de manera continua la salida de una microcolumna que era cargada con una solución de HA. Los HA se detectaron por espectrofotometría UV-visible. En la Figura M-11(A) se muestran los espectros de HA a distintas concentraciones. Como se ve, existe un máximo de absorción alrededor de 250 nm (absorción de grupos aromáticos). A pesar de que la solución de HA es una

mezcla binaria, es posible la determinación de estos compuestos mediante una curva de calibrado (Figura M-11 (B)). La máxima sensibilidad se obtiene con detección a 254 nm, pero a esta longitud de onda, los sistemas FIA presentan bastante efecto Schlieren (cambio del índice de refracción de la solución transportadora). Si el detector es lo suficientemente sensible, puede usarse con buen grado de precisión, longitudes de onda mas cercanas a la zona del visible. Los experimentos de “carga” y “descarga” de las microcolumnas se realizaron con detección a 500 nm, donde la sensibilidad es menor pero no se ve un cambio en la línea de base cuando el “carrier” se conmuta entre el eluyente y la solución de HA usada para los ensayos (7 mg/l, pH variable según la resina usada).

El esquema instrumental usado para la determinación de la capacidad de las resinas de se muestra en la Figura M-12. El sistema de flujo consistió en una válvula inyectora rotativa de 6 vías (Valco Instruments Co., Houston, TX, U.S.A.) conectada mediante tuberías de PTFE de 0.5 mm ID a una microcolumna de 20 µl de volumen de lecho y dimensiones idénticas a las usadas en el sistema de preconcentración. La salida de esta columna se conectó al detector UV-Visible para HPLC (Shimadzu). La adquisición de datos se hizo conectando la salida analógica de este detector a una placa de adquisición de datos controlada por una computadora Pentium 133 MHz. La placa de adquisición fue operada a una frecuencia de 1 Hz durante 2400 s, lo que produjo vectores de 2400 puntos por inyección. La inyección de la solución de HA se sincronizó con la adquisición de datos usando como “gatillo” de la adquisición al teclado de la computadora. Los vectores de datos obtenidos fueron grabados en formato ASCII. Estos vectores fueron importados y tratados en Matlab 4.0 para su integración numérica lo que permitió determinar la capacidad dinámica de las distintas resinas.

7.3.16 Procedimiento de preconcentración, elución y análisis con un sistema FIA bicolumna para la especiación de Cd.

En la Figura M-13 se muestra la secuencia de operaciones que ocurren durante el proceso de separación y preconcentración. Los flujos de muestra y buffer, así como los tiempos usados en el programa de temporización se muestran en la Tabla M-4.

Las etapas A, B, C y D son similares al proceso de preconcentración de la fracción lábil. En el sistema bicolumna se produce una extracción secuencial: primero

la fracción lábil es extraída en la primer columna (C1) que contiene Chelex-100, luego la muestra atraviesa la segunda columna que contiene sílica C-18 (C2) donde son retenidas las especies orgánicas de Cd. La diferencia principal en el procedimiento de análisis bicolumna con respecto al monocolumna reside en la etapa de elución (etapas E, F, G y H), puesto que las especies son eluidas secuencialmente. En estas etapas todos los fluidos son transportados por la jeringa del autosamplador que está conectada al sistema de columnas a través de la válvula V3. Durante la elución la bomba peristáltica y las válvulas solenoides se detienen completamente.

Primero son eluidas con metanol las especies retenidas en la columna C2, que corresponden a la fracción Cd-L₁. La elución se realiza con dos porciones de 70 µl. Antes de aspirar el metanol, el instrumento aspira 40 µl de aire, luego aspira el metanol y por último otros 20 µl de aire. El segmento de aire aspirado previamente al metanol tiene el fin de asegurar la inyección completa del eluyente dentro del horno. El segmento de aire aspirado luego del metanol sirve para asegurar que el metanol contacte completamente la columna C2. Luego de que estas porciones son aspiradas, se las inyecta lentamente (4 µl s⁻¹) dentro del horno de grafito. El solvente de elución debe ser inyectado lentamente porque esto mejora la elución de C2. Una vez inyectados los primeros 70 µl de metanol, se ejecutan las etapas de secado y calcinación del horno de grafito y luego el proceso de elución de C2 se repite una vez mas, de manera que el volumen total de metanol empleado para eluir C2 es de 140 µl de metanol. No fue posible eluir la columna C2 en una sola etapa debido a que las sustancias húmicas son retenidas fuertemente por este material. Una vez que se completan las dos inyecciones de metanol, se inicia el ciclo de secado, calcinación y atomización final. La altura de la señal obtenida es proporcional a la concentración de Cd en todo el volumen de eluido. La elución de C2 con metanol regenera a la sílica C-18.

El paso siguiente es la elución de C1 en donde se retienen los iones Cd⁺² libres y los iones Cd provenientes de los complejos Cd-L₂ que se disocian. La columna C2 está separada de C1 por un tramo de tubería de 80 µl de volumen, de esta manera el metanol nunca entra en contacto con el relleno C1. Si el metanol entrase en contacto con la resina Chelex-100, ésta empezaría a disolverse lentamente y el volumen de relleno contenido disminuiría. La columna C1 se eluye con 80 µl de HNO₃ 2 M. Antes del ácido, se aspiran 40 µl de aire y luego del ácido se aspiran 95 µl de aire que

tienen la función de empujar al ácido hasta la columna C1 que se encuentra al principio de la línea de flujo y lejos del extremo de inyección. Una vez aspirado el ácido, se lo inyecta dentro del horno y se inicia el ciclo completo de calentamiento. La altura de la señal observada es proporcional al contenido de Cd en la fracción lábil de éste metal. El ácido aspirado para eluir C1 también entra en contacto con C2, sin embargo, esta resina no retiene Cd, puesto que es retenido completamente en C1.

Resina:	Soporte y grupo funcional	Tamaño de partícula (mesh)	Area BET	Volumen de poros	Tamaño de poro medio	MTWCO (Da)	Densidad
Nombre Comercial							
Chelex-100	STY-DVB-iminodiacetato	100-200	-----	2.8 cm ³ g ⁻¹	6 nm	3500 (BioRad) 4100 ^a	0.65
Silica I-Hox	silica-oxina	35-70	505 m ² /g	0.46 cm ³ g ⁻¹	6 nm	3600 ^a	ND
BIO RAD AG-MP-1	STY-DVB. Amonio cuaternario (trimetilo)	100-200	23 m ² /g	ND ^b	ND	>100000 (BioRad)	0.7
Amberlite IRA-958	Acritico-DVB. Amonio cuaternario	Molida y tamizada a 100- 200	ND	ND	ND	ND	ND
Aldrich	silica-C18 (para columna preparativa)	100 promedio	Similar a I-HOX	Similar a I-HOX	Similar a I-HOX	Similar a I-HOX	ND
C-18	STY-DVB hidrofóbica,	Molida y tamizada a 100- 200	800 m ² /g	1.82 cm ³ g ⁻¹	10 nm	50000 aprox.	0.65 a 0.72 g/cm ³
Amberlite XAD-16							
Reillex 425.	Poli-4-divinilpiridinas Entrecruzadas con DVB	Molida y tamizada a 100- 200	90 m ² /g	ND	60 nm	>100000	0.6 g/cm ³

^a para una disminución del 75% del tiempo de contacto.

^b ND: No disponible

Tabla M-1: Propiedades de los materiales usados para realizar extracción de las distintas especies de Cd.

Etapas	Operación	Figura	Tiempo /s. (Análisis de Cd , inyección parcial).	Tiempo /s. (Análisis de Cd, inyección completa)	Tiempo /s. (Análisis de Pb inyección completa)	Flujo de la muestra (ml min ⁻¹)	Flujo del buffer (ml min ⁻¹)
1	Enjuagado de la tubería con muestra.	M-8 (a)	30	30	30	0	0
2	Acondicionamiento de la columna	M-8 (b)	30	30	30	0	1.21
3	Preconcentración de la muestra	M-8 (c)	180	60	60~600 ^a	5.09	1.21
4	Lavado de la columna ^b	M-8 (d)	30~90	30~90	30~90	0	1.21
5	Aspiración de HNO ₃ 2M. (80~200 µl).	M-8 (e)	10	5	5	0	0
6	Mezcla del eluido.	M-8 (e)	38			0	0
7	Inyección	-	16 ^c	16	16	0	0

^a El tiempo de preconcentración fue diferente en el material de referencia y en las muestras debido a la alta concentración de Pb en las mismas.

^b El tiempo de lavado de la columna depende de la muestra. Se lo ajustó entre 30 y 90 s dependiendo de la señal de background obtenida.

^c Por cada inyección.

Tabla M-2 : Programa de temporización del procedimiento FIA de separación y preconcentración.

Reactivo		Etapas	Potencia %	Tiempo (min)
HNO ₃ (ml)	H ₂ O ₂ (ml)			
5	-	1	40	5
-	1	2	30	5
5	-	3	40	5
-	5	4	30	5
5	-	5	40	5
5	-	6	30	1

Tabla M-3: Condiciones de operación del digestor por microondas para la disolución de muestras de algas del Atlántico Sur.

Operación	Figura	Tiempo de duración de la etapa (s)	Flujo de muestra a través de la columna (ml min ⁻¹)	Flujo de buffer a través de la columna (ml min ⁻¹)	Volumen aspirado por la jeringa (μl)	Volumen inyectado por la jeringa (μl)
Lavado de la tubería	M-12 (a)	111	0	0	-	-
Acondicionamiento de Chelex-100	M-12 (b)	111	0	0.78	-	-
Carga de los analitos en cada columna	M-12 (c)	222	1.40	0.78	-	-
Lavado de los componentes de la matriz retenidos	M-12 (d)	111	0	0.78	-	-
Aspiración de metanol ^a	M-12 (e)	-	8 (x2)	0	40 aire + 70 MeOH + 20 aire	---
Elución de C2 ^a	M-12 (f)	28 (x2)	0	0	---	112 μl (sólo 70 son de MeOH)
Aspiración de ácido	M-12 (g)	-	14	0	40 aire + 80 HNO ₃ 2M + 95 aire.	---
Elución de C1	M-12 (h)	50	0	0	---	215 μl

^a Estos pasos se repiten dos veces, usando la opción Boost del instrumento, donde el volumen inyectado se evapora entre inyecciones.

Tabla M-4: Secuencia de operaciones del procedimiento de especiación de Cd con el sistema FI-ETA-AAS bicolumna.

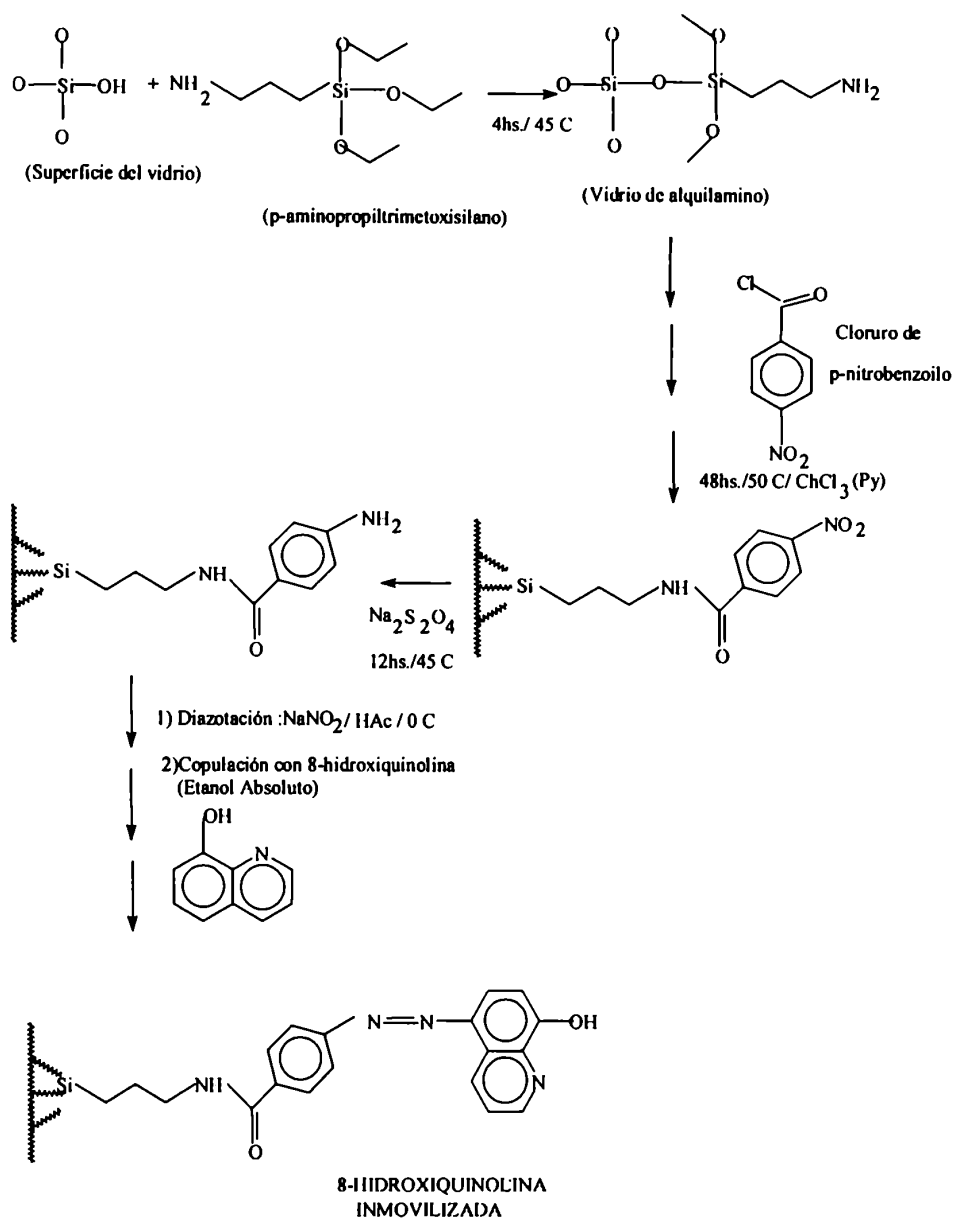


Figura M-1: Esquema de la síntesis empleada para la inmovilización de 8-hidroxiquinolina sobre sílica gel.

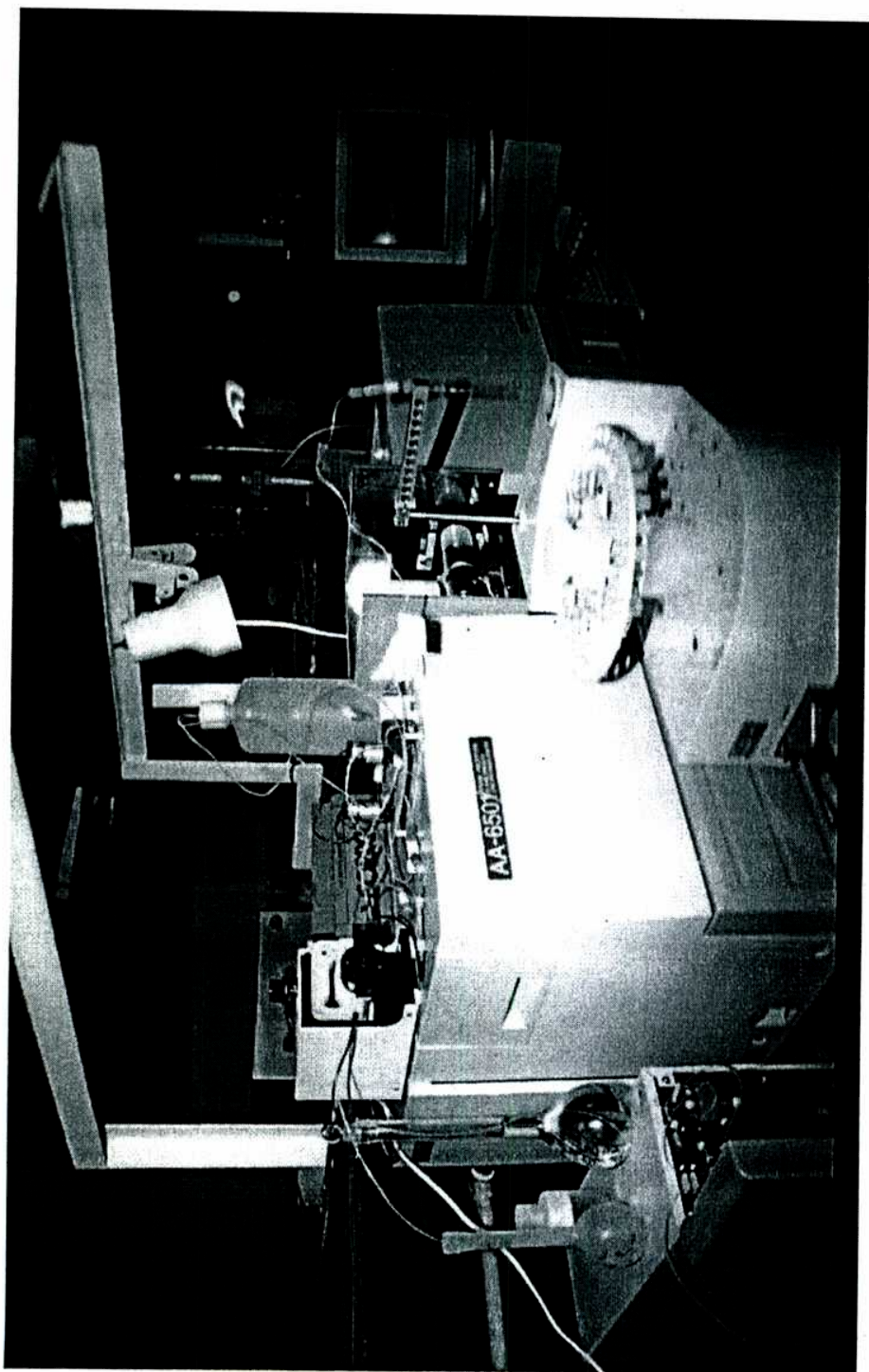


Figura M-2: Foto del sistema de preconcentración acoplado al Espectrómetro Shimadzu 6701.

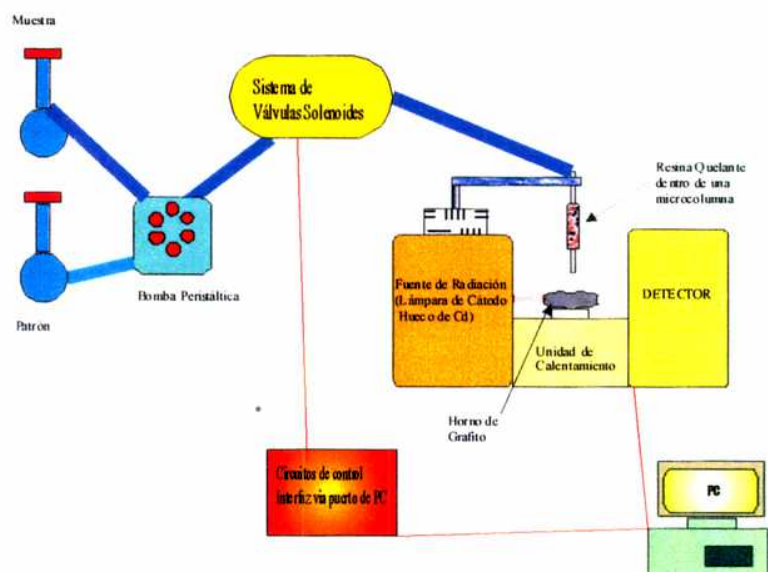


Figura M-3: Esquema de bloques del sistema de preconcentración acoplado a un Espectrómetro de ETA-AAS.

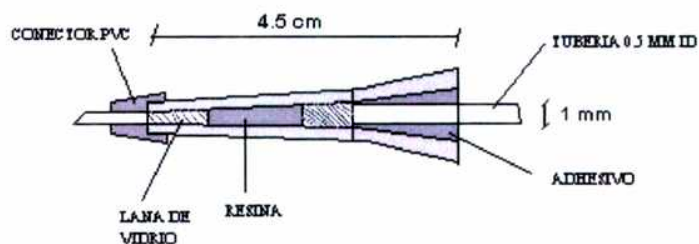


Figura M-4: Microcolumna de preconcentración.

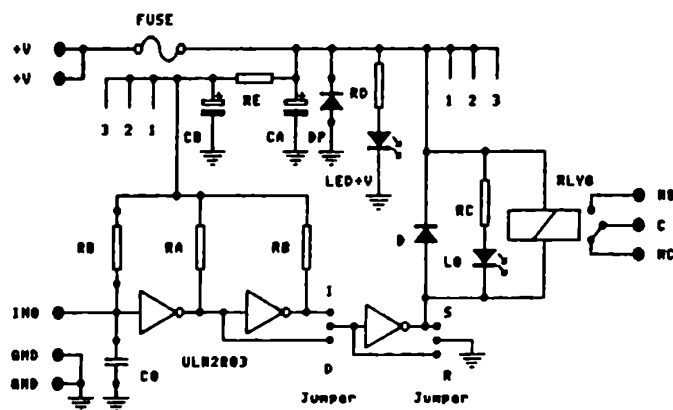
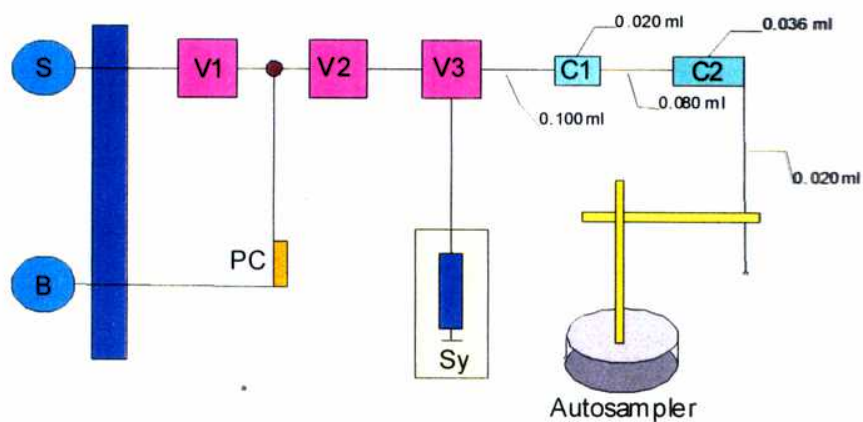


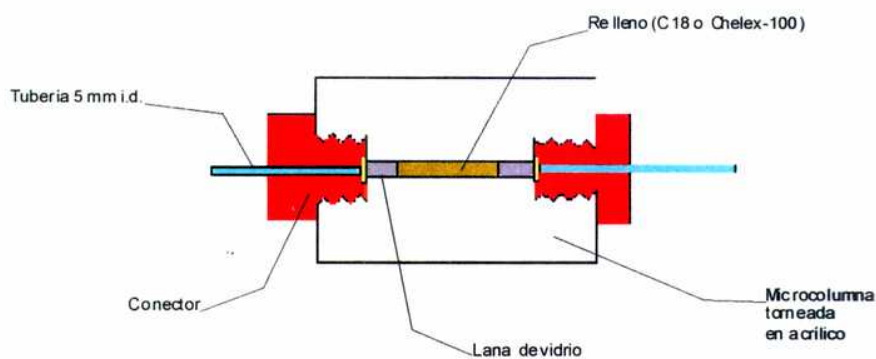
Figura M-5: Circuito utilizado para controlar las válvulas solenoides de tres vías.

TEMPORIZANDO...					
Tiempo [seg.]	Relé 1 (bomba)	Relé 2 (preconc.)	Relé 3 (GFAAS)	Relé 4 (enjuague)	ETAPA:
30	☒ ON	☒ ON	☒ ON	☒ ON	☐ Enjuague
30	☒ ON	☒ ON	☒ ON	☒ ON	☐ Pre-acondic.
120	☒ ON	☒ ON	☒ ON	☒ ON	☐ Preconcentra
15	☒ ON	☒ ON	☒ ON	☒ ON	☐ Lavado
6000	☒ ON	☒ ON	☒ ON	☒ ON	☐ Fin
EMPEZAR EMPEZAR Comutacion Manual ☐ R1 ☐ R2 ☐ R3 ☐ R4					

Figura M-6: Interfaz gráfica de temporización en Visual Basic. Ventana de comunicación entre el usuario y la PC. Secuencia típica de conmutación de válvulas.



A)



B)

Figura M-7: A) Esquema general del sistema FI-ETA-AAS bicolumna y B) detalle del sistema de dos columnas

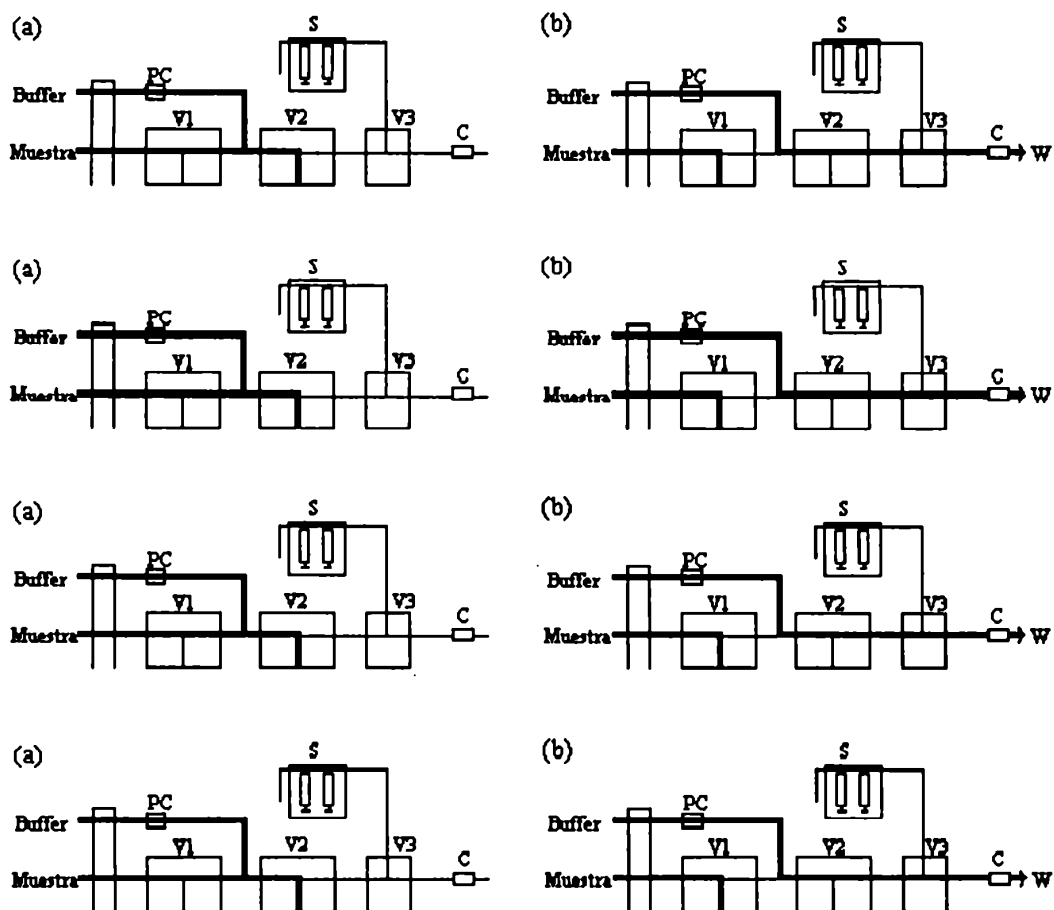


Figura M-8: Sistema de inyección en flujo y secuencia de operaciones para el análisis por preconcentración y GF-AAS. Las líneas gruesas muestran el camino de los fluidos en las distintas etapas. (a) Enjuague de la tubería con muestra, (b) acondicionamiento de la columna, (c) preconcentración de la muestra, (d) lavado de la columna, (e) elución dentro del horno de grafito. (El largo de la tubería entre V2 y V3 se mantuvo en un mínimo).

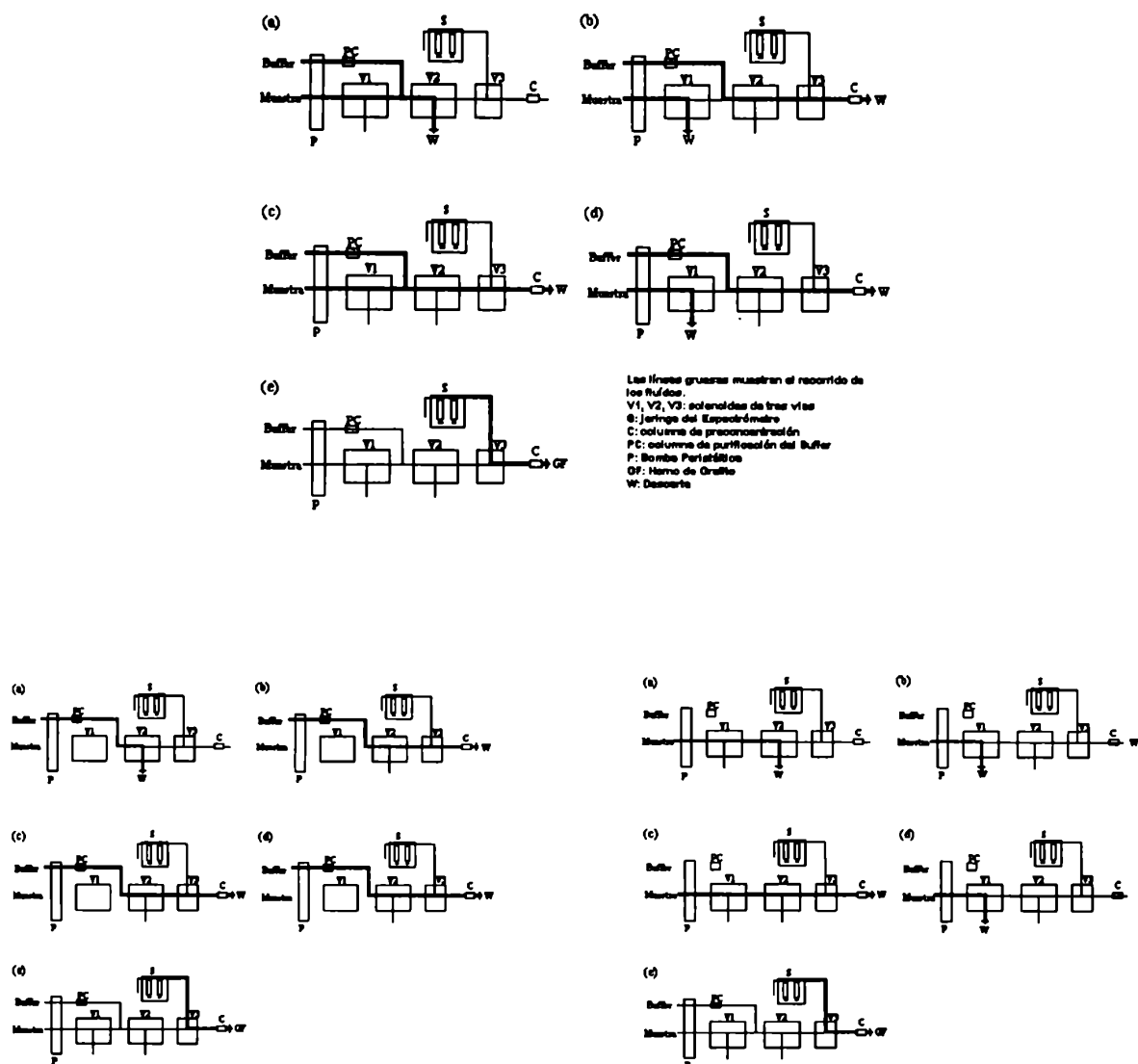


Figura M-9: Arriba: Circulación normal de los fluidos durante el análisis de Cd. Inferior izquierda: Circulación de los fluidos en las experiencias para determinar la precisión del volumen del blanco de reactivos. Inferior derecha: Circulación de los fluidos en las experiencias para determinar la precisión del volumen de muestra.



Figura M-10: Mapa de los sitios de muestreo de algas

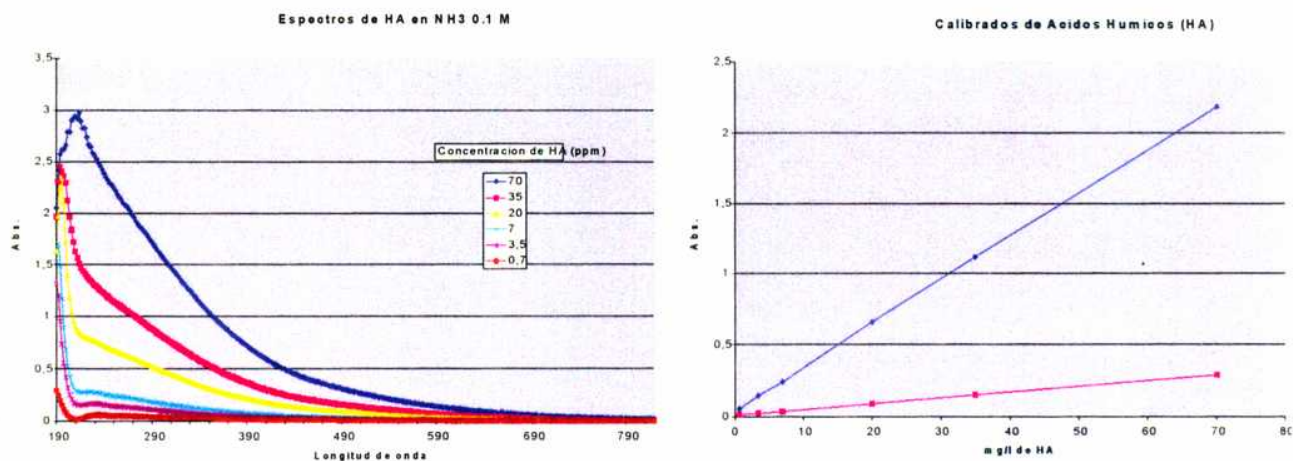


Figura M-11: Espectros y curvas de calibrado para HA

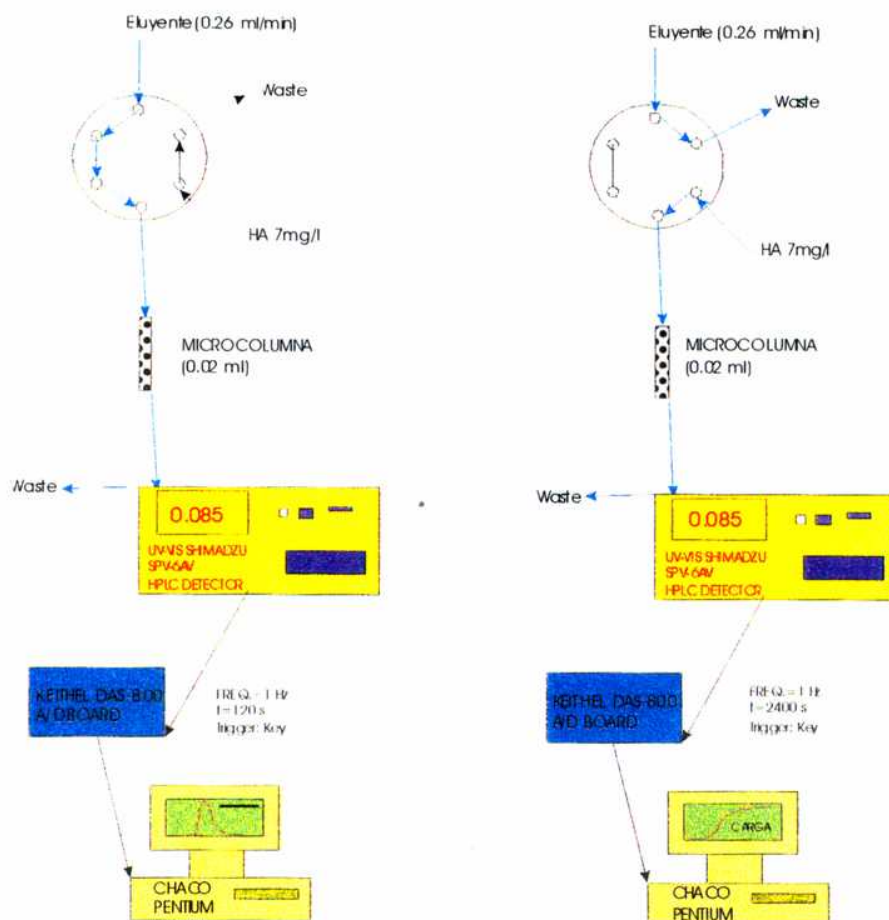


Figura M-12: Sistema de determinación de la capacidad dinámica para HA de distintas resinas.

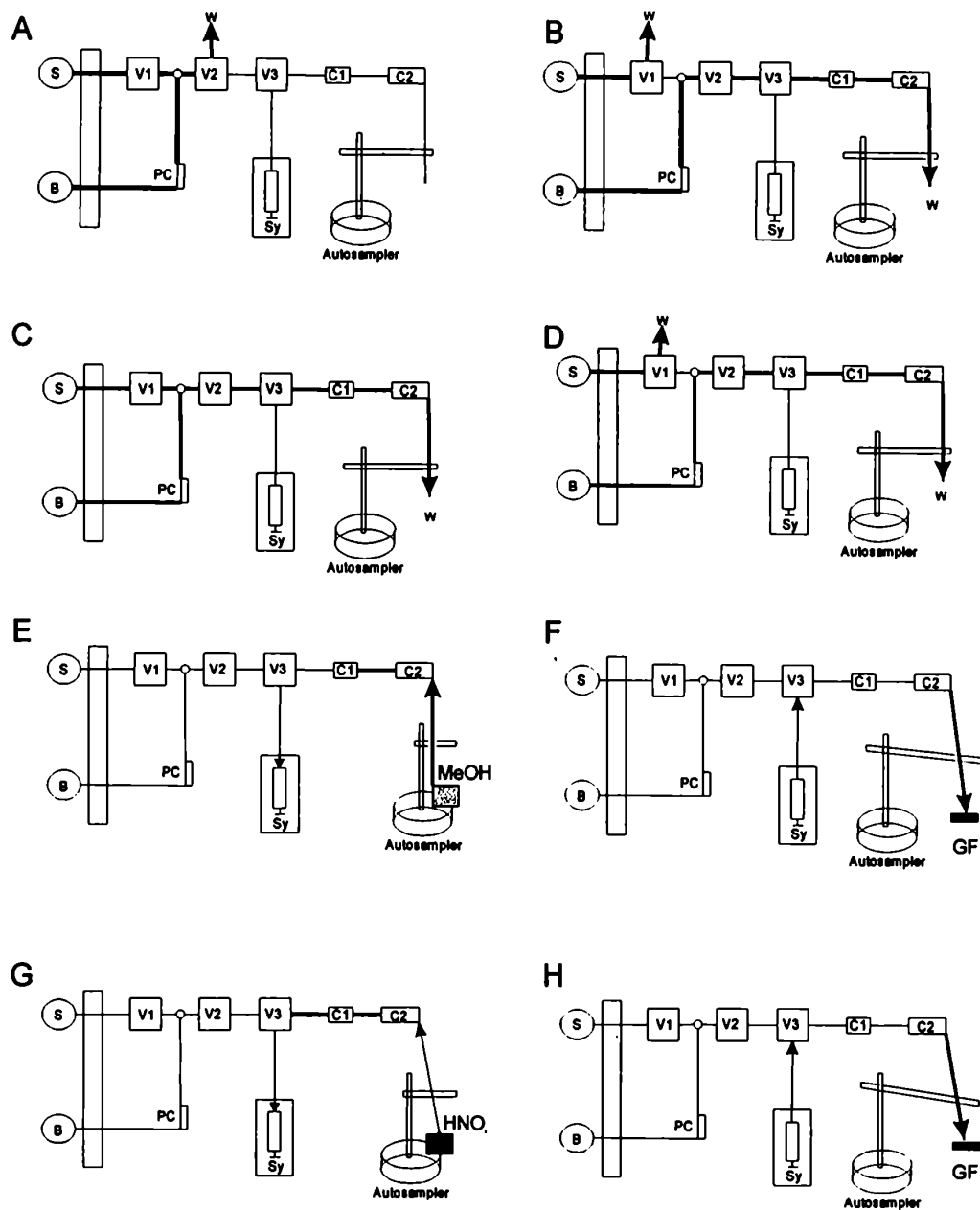


Figura M-13: Procedimiento de preconcentración para el sistema FI-ETA-AAS bicolumna, poner abreviaciones. V1, V2, y V3: válvulas solenoides de tres vías. S: muestra, B: buffer, C1 y C2: microcolumnas de preconcentración, Sy: jeringa del autosampler, W: descarte.

CONCLUSIONES Y REFERENCIAS



8 Conclusiones

Los resultados presentados en el Capítulo 1 muestran la capacidad de automatización y los bajísimos niveles de concentración detectables mediante el acople entre sistemas FIA y detectores de alta performance. Hemos visto que las dificultades informadas previamente para Chelex-100 como material de relleno de columnas de preconcentración, pueden ser solucionadas siguiendo el diseño experimental que se propone. Los riesgos de contaminación se reducen en gran medida puesto que no es necesaria ninguna intervención del operador en el proceso. Es posible el análisis de ultravestigios (nivel de sub-ppb) si los reactivos son purificados en línea y el sistema se mantiene aislado, como ocurre cuando se realizan las reacciones químicas dentro de tuberías. Esto último reduce a un mínimo el consumo de reactivos y muestras y la cantidad de desperdicio.

En la Tabla C.1 se compara la performance de la resina Chelex-100 con I-HOx. Cada material tiene distintas aplicaciones y puede ser ventajoso dependiendo del objetivo con el que se lo utilice. No es nuestra intención seleccionar uno de estos materiales, sino conocer profundamente las características de cada uno de ellos de modo de obtener un panorama mas amplio de sus posibles aplicaciones. En lo referente al análisis de agua de mar mediante FI-ETA-AAS, Chelex-100 es preferible dada su alta capacidad, lo que permite su uso a mayores flujos, si bien resulta menos selectiva para los metales de transición que I-HOx. La resina impregnada SIR-1 presenta muy buena performance durante la extracción pero, durante la elución de los metales, se produce pérdida simultánea del extractante impidiendo su uso en FIA.

En el Capítulo 3 hemos visto que los sistemas FIA de preconcentración basados en tiempo son mas flexibles en el momento de manejar y optimizar las figuras de mérito. El aporte a la precisión total del método asignable al sistema FIA es despreciable comparado con la asignable al atomizador electrotérmico. Los límites de detección se encuentran en el rango de las partes por trillón de Cd, lo cuál es suficiente para determinar este tóxico con probabilidades de falso positivo y falso negativo cercanas al 5%. La frecuencia de análisis para la preconcentración sobre Chelex-100 es alta (20 muestras h^{-1}). El ciclo de atomización no produce una disminución de este valor, ya que tiene una duración inferior al ciclo de preconcentración.

La aplicación del sistema de preconcentración a estudios de bioacumulación fue mostrada en el Capítulo 4 donde se demostró la importancia ambiental de la fracción

“lábil” (cinéticamente lábil o termodinámicamente inestable). La reactividad y toxicidad de los iones en aguas naturales viene dada por su especiación química que puede estimarse de manera rápida mediante un esquema operacional con correlato biológico.

La fracción operacionalmente lábil está constituida por complejos poco estables o cinéticamente lábiles, tal cuál mostramos en el Capítulo 5. Sin embargo, la labilidad en un experimento de partición en resinas quelantes es función no sólo de la estabilidad de los complejos sino también, del pH de operación, de la resina quelante utilizada y sobre todo de la concentración de ligandos libres que pueden demorar la deposición de los metales sobre la resina. Por otro lado, las resinas pueden actuar discriminando especies por su tamaño en un mecanismo similar al de la Cromatografía por Permeación en Geles. Este efecto de tamiz molecular hace que el tiempo de reacción (“tiempo de contacto”) entre la resina y el soluto se vea disminuido. Esto ocurre si el soluto posee un tamaño superior al MWCO de la resina. Los métodos de especiación cinética por partición en resinas quelantes poseen ciertas ventajas sobre los métodos electroquímicos, entre ellas, la capacidad de variar el tiempo de contacto de manera continua y la ausencia de efectos de adsorción. Los métodos voltamétricos, por otro lado, no incluyen a complejos lábiles dentro de la fracción determinada por lo que discriminan mejor entre fracciones.

Una opción a la determinación de la fracción inerte de Cd por métodos voltamétricos es el uso de sistemas de extracción secuenciales incorporados en sistemas FIA, tal como el que hemos descripto en el Capítulo 6. Estos sistemas presentan buenos límites de detección aunque las frecuencias de análisis empeoren debido al esquema de operación mas complicado. La fracción de Cd unida a compuestos húmicos puede ser extraída de la solución mediante distintos materiales. Sin embargo, no todos estos materiales son útiles para los sistemas FI-ETA-AAS (Tabla C-2). Es preferible el uso de rellenos con una capacidad intermedia que no presenten adsorción de cationes o retención irreversible de los compuestos húmicos. La extracción secuencial de las distintas especies es un método de análisis de especiación operacional muy robusto con excelentes límites de detección, lo que permite el análisis de muestras poco contaminadas. Dada la definición operacional de especies, este tipo de análisis es útil principalmente en la comparación de distintos sitios de muestreo como lo informado en el Capítulo 4.

Los resultados presentados en esta Tesis permiten concluir que el acople de sistemas de preconcentración en flujo a analizadores discretos produce un método de

análisis confiable, con óptimas figuras de mérito, que puede ser utilizado para la determinación de la concentración de iones metálicos en distintos tipos de muestras y para la determinación de la especiación de los mismos.

	Chelex-100	I-HOx
Capacidad	Alta	Baja
Eficiencia	Mediana	Alta
Separación de metales	Buena	Optima
Alcalino Térreos		
Frecuencia de análisis	Buena	Regular
Velocidad de Quelación	Mediana	Optima
Tiempo de contacto muestra/analito.	Alto	Mediano
Porosidad	Alta	Baja
Exclusión de Pesos Moleculares	Aceptable	Aceptable
Resistencia al flujo	Regular	Buena
Elasticidad	Buena	Nula

Tabla C.1: Comparación de los materiales ensayados para la preconcentración de la fracción lábil de Cd y Pb.

Resina	Adsorción inespecífica	Retención de cationes	Capacidad Dinámica	Capacidad Total	Volumen de Elución	Compatibilidad del Solvente de elución en GF-AAS
Reillex 425	Baja	Baja	Muy Buena	Muy Buena	Grande	Aceptable
Silica-C18	Muy baja	Nula	Buena	Buena	Pequeño	Muy Bueno
XAD-16	Baja	Alta	Aceptable	Muy Buena	Pequeño	Muy Bueno
IRA-958	Mediana	Nula	Aceptable	Muy Buena	Mediano	Mala
AG-MP-1	Alta	Baja	Pobre	Baja	Mediano	Mala

Tabla C-2: Comparación de los materiales ensayados para la retención de la fracción inerte de Cd.

9 Referencias

- (1) Ure, A. M.; Davidson, C. M. **Chemical Speciation in the Environment**; Blackie Academic & Professional, Chapman & Hall: Glasgow, 1995.
- (2) Caroli, S., *Microchem. J.*, **51**, (1995) , 64.
- (3) Das, A. K.; Chakraborty, R., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **357**, (1997) , 1.
- (4) Donard, O. F. X.; Caruso, J. A., *Spectrochimica Acta Part B*, **53**, (1998) , 157.
- (5) Florence, T. M., *Water Research*, **11**, (1977) , 681.
- (6) Florence, T. M., *Trends Anal. Chem.*, **2**, (1983) , 162.
- (7) Tessier, A.; Campbell, P. G. C.; Bisson, M., *Anal. Chem.*, **7**, (1979) , 844.
- (8) Donat, J. R.; Bruland, K. W., *Mar. Chem.*, **28**, (1990) , 301.
- (9) van den Berg, C. M. G.; Donat, J. R., *Anal. Chim. Acta*, **257**, (1992) , 281.
- (10) Xue, H.; Sigg, L., *Limnol. Oceanogr.*, **38**, (1993) , 1200.
- (11) Xue, H.; Sigg, L., *Anal. Chim. Acta*, **284**, (1994) , 505.
- (12) Xue, H.; Kistler, D.; Sigg, L., *Limnol. Oceanogr.*, **40**, (1995) , 1142.
- (13) Xue, H.; Oestreich, A.; Kistler, D.; Sigg, L., *Aquatic Sciences*, **58**, (1996) , 59.
- (14) Xue, H.; Sigg, L.; Gunter Kari, F., *Environ. Sci. Technol.*, **29**, (1995) , 59.
- (15) Xue, H.; Sigg, L., *Anal. Chim. Acta*, **363**, (1998) , 249.
- (16) Donat, J. R.; Lao, K. A.; Bruland, K. W., *Anal. Chim. Acta*, **284**, (1994) , 547.
- (17) Stewart, I. I.; Barnett, D. A.; Horlick, G., *J. Anal. At. Spectrom.*, **11**, (1996) , 877.
- (18) Hieftje, G. M., *Spectrochimica Acta Part B*, **53**, (1997) , 165.
- (19) Lobinski, R., *Spectrochimica Acta Part B*, **53**, (1998) , 177.
- (20) Lobinski, R.; Adams, F. C., *Trends Anal. Chem.*, **12**, (1993) , 41.
- (21) Vela, N. P.; Olson, L. K.; Caruso, J. A., *Anal. Chem.*, **65**, (1993) , 585A.
- (22) Hill, S. J.; Bloxham, M. J.; Worsfold, P. J., *J. Anal. At. Spectrom.*, **8**, (1993) , 499.
- (23) Spuznar, J.; Witte, C.; Lobinski, R.; Adams, F. C., *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **351**, (1995) , 351.
- (24) Lobinski, R., *Analusis*, **22**, (1994) , 37.
- (25) Ceulemans, M.; Adams, F. C., *J. Anal. At. Spectrom.*, **11**, (1996) , 201.
- (26) Ernteborg, H.; Baxter, D. C.; Sharp, M.; Frech, W., *Analyst*, **120**, (1995) , 69.
- (27) Růžicka, J.; Hansen, E. H., *Anal. Chim. Acta*, **78**, (1975) , 145.
- (28) Mottola, H. A., *Anal. Chem.*, **53**, (1981) , 1312A.
- (29) Růžicka, J.; Hansen, E. H. **Flow Injection Analysis**, 1 ed.; John Wiley & Sons: New York, 1981.
- (30) Růžicka, J.; Hansen, E. H. **Flow Injection Analysis**, 2 ed.: New York, 1988.
- (31) Sarbeck, J. R.; St. John, P. A.; Winefordner, J. D., *Mikrochim. Acta*, **1972**, (1972) , 55.
- (32) Fang, Z.; Xu, S.; Tao, G., *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **11**, (1996) , 1.
- (33) Wolf, W. R.; Stewart, K. K., *Anal. Chem.*, **51**, (1979) , 1201.
- (34) Yoza, N.; Aoyagui, Y.; Ohashi, S.; Tateda, A., *Anal. Chim. Acta*, **111**, (1979) , 163.
- (35) Zagatto, E. A. G.; Jacintho, A. O.; Krug, F. J.; Reis, B. F.; Bruno, R. E.; Araujo, M. C. U., *Anal. Chim. Acta*, **104**, (1979) , 279.
- (36) Mindel, B.; Karlberg, B., *Lab. Pract.*, **30**, (1981) , 719.
- (37) Nord, L.; Karlberg, B., *Anal. Chim. Acta*, **125**, (1981) , 199.
- (38) Astrom, O., *Anal. Chem.*, **54**, (1982) , 190.
- (39) Olsen, S., *Dan. Kemi.*, **64**, (1983) , 68.

- (40) Fang, Z.; Xu, S.; Zhang, S., *Fenxi Huaxue*, **12**, (1984) , 997.
- (41) Fang, Z.; Ruzicka, J.; Hansen, E. H., *Anal. Chim. Acta*, **164**, (1984) , 23.
- (42) Fang, Z.; Xu, S.; Zhang, S., *Anal. Chim. Acta*, **164**, (1984) , 41.
- (43) Tyson, J. F.; Appleton, J. M. H.; Idris, A. B., *Anal. Chim. Acta*, **145**, (1983) , 159.
- (44) Tyson, J. F.; Appleton, J. M. H., *Anal. Proc.*, **20**, (1983) , 260.
- (45) Tyson, J. F.; Idris, A. B., *Analyst*, **109**, (1984) , 23.
- (46) Danielsson, L. G.; Nord, L., *Anal. Proc.*, **20**, (1983) , 298.
- (47) Gallego, M.; Valcarcel, M., *Anal. Chim. Acta*, **169**, (1985) , 161.
- (48) Martinez-Jimenez, P.; Gallego, M.; Valcarcel, M., *At. Spectrosc.*, **6**, (1985) , 65.
- (49) Martinez-Jimenez, P.; Gallego, M.; Valcarcel, M., *At. Spectrosc.*, **6**, (1985) , 137.
- (50) Burguera, M.; Burguera, J. L., *Anal. Chim. Acta*, **179**, (1986) , 351.
- (51) Valcarcel, M.; Gallego, M.; Martinez-Jimenez, P., *Anal. Proc.*, **23**, (1986) , 233.
- (52) Petersson, B. A.; Fang, Z.; Ruzicka, J.; Hansen, E. H., *Anal. Chim. Acta*, **184**, (1986) , 165.
- (53) Fang, Z.; Zhu, Z.; Zhang, S.; Xu, S.; Guo, L.; Sun, L., *Anal. Chim. Acta*, **214**, (1988) , 41.
- (54) Ruzicka, J.; Arndal, A., *Anal. Chim. Acta*, **216**, (1989) , 243.
- (55) Burguera, J. L. **Flow-Injection Atomic Spectroscopy**; Marcel Dekker: New York, 1989.
- (56) De Andrade, J. C.; Strong, F. C.; Martin, N. J., *Talanta*, **37**, (1990) , 711.
- (57) Fang, Z.; Sperling, M.; Welz, B., *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **6**, (1991) , 301.
- (58) An, Y.; Willie, S. N.; Sturgeon, R. E., *Spectrochim. Acta Part B*, **47**, (1992) , 1403.
- (59) Azeredo, L. C.; Sturgeon, R. E.; Curtius, A. J., *Spectrochim. Acta Part B*, **48**, (1993) , 91.
- (60) Fang, Z.-l. **Flow-Injection Atomic Absorption Spectrometry**; John Wiley & Sons: Chichester, 1995.
- (61) Tyson, J. F.; Bysouth, S. R.; Grzeszczyk, E. A.; Debrah, E., *Anal. Chim. Acta*, **261**, (1992) , 75.
- (62) Atienza, J.; Herrero, M. A.; Maquieira, A.; Puchades, R., *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **23**, (1992) , 1.
- (63) Jackson, K. W.; Chen, G., *Anal. Chem.*, **68**, (1996) , 231R-256R.
- (64) Benoit, G.; Hunter, K. S.; Rozan, T. F., *Anal. Chem.*, **69**, (1997) , 1006.
- (65) Fang, Z., *Spectrochim. Acta Rev.*, **14**, (1991) , 235.
- (66) Carbonell, V.; Salvador, A.; de la Guardia, M., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **342**, (1992) , 529.
- (67) Welz, B., *Microchemical Journal*, **45**, (1992) , 163.
- (68) Fang, Z. **Flow Injection Separation and Preconcentration**; VCH: Weinheim, 1993.
- (69) Milosavljevic, E. B.; Ruzicka, J.; Hansen, E. H., *Anal. Chim. Acta*, **169**, (1985) , 321.
- (70) Liu, Y.; Ingle, J. D., *Anal. Chem.*, **61**, (1989) , 525.
- (71) Canizares, P.; Luque de Castro, M. D., *Anal. Chim. Acta*, **295**, (1994) , 59.
- (72) Quintela, M. J.; Gallego, M.; Valcarcel, M., *Analyst*, **118**, (1993) , 1199.
- (73) Moens, L.; Jakubowski, N., *Anal. Chem. News & Features*, (1998) , 251A.
- (74) Hwang, J. D.; Guenther, G.; Diomiguardi, J., *Anal. Chem.*, **61**, (1989) , 285.
- (75) Dedina, J.; Tsalev, D. L. **Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry**; J. Wiley and Sons: New York, 1995.

- (76) Barnes, R.; Wang, X., *J. Anal. At. Spectrom.*, **3**, (1988) , 1083.
- (77) Voellkopf, U.; Günsel, A.; Janssen, A., *Atomic Spectroscopy*, **11**, (1990) , 135.
- (78) Kirkbright, G. F.; Ranson, L., *Anal. Chem.*, **43**, (1971) , 1238.
- (79) Hunt, D. T. E.; Wilson, A. L. **The Chemical Analysis of Water, General Principles and Techniques**, 2 ed.; The Royal Society of Chemistry: London, 1986.
- (80) Thompson, K. C.; Thomerson, D. R., *Analyst*, **99**, (1974) , 595.
- (81) Welz, B.; Melcher, M., *Spectrochim. Acta Part B*, **36**, (1981) , 439.
- (82) Sturman, B. T., *Applied Spectroscopy*, **39**, (1985) , 48.
- (83) Ikeda, M., *Anal. Chim. Acta*, **167**, (1985) , 289.
- (84) Veillon, C. In *Trace Analysis, Spectroscopic Methods for the Elements*; Winefordner, J. D., Ed.; J. Wiley & Sons: New York, 1976.
- (85) Yoshiki, S.; Shun-ichi, I.; Shoji, A.; Takeshi, F.; Toyokazu, K.; Hajime, O.; Eiichiro, N.; Shiro, G.; Yukiyo, F.; Hiroshi, H.; Ueda, K.; Masakazu, M., *Anal. Chim. Acta*, **363**, (1998) , 11.
- (86) Dean, J. A. **Analytical Chemistry Handbook**; Mc Graw Hill: New York, 1995.
- (87) Nurnberg, H. J., *Electrochim. Acta*, **22**, (1977) , 935.
- (88) Landy, M. P., *Anal. Chim. Acta*, **121**, (1980) , 39.
- (89) Chang, Y.; Lin, Y.; Jerzy, M., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **360**, (1998) , 550.
- (90) Colombo, C.; Van den Berg, A.; Constant, M. G., *Anal. Chim. Acta*, **337**, (1997) , 29.
- (91) Collado Sanchez, C.; Perez Pena, J.; Gelado Caballero, M. D.; Herrera Melian, J. A.; Hernandez Brito, J. J., *Anal. Chim. Acta*, **320**, (1996) , 19.
- (92) Jagner, D., *Anal. Chem.*, **51**, (1979) , 3.
- (93) Arén, K.; Jagner, D., *Anal. Chim. Acta*, **107**, (1979) , 29.
- (94) Jagner, D.; Josejson, M.; Westerlund, S., *Anal. Chim. Acta*, **129**, (1981) , 153.
- (95) Kriger, L., *Anal. Chim. Acta*, **120**, (1980) , 19.
- (96) Wilson, L., *Anal. Chim. Acta*, **40**, (1968) , 503.
- (97) Chapple, Graeme; Byrne, John, P., *J. Anal. At. Spectrom.*, **11**, (1996) , 549.
- (98) Gillain, G.; Duyckaerts, G.; Disteché, A., *Anal. Chim. Acta*, **106**, (1979) , 23.
- (99) Allen, H. E.; Minear, R. A. In *A Reference Handbook Published on Behalf of the World Health Organization Regional Office for Europe*; Pergamon Press: Oxford, 1982; Vol. 2.
- (100) Wang, X.; Viczian, M.; Lasztity, A.; Barnes, R., *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **3**, (1988) , 821.
- (101) Tsalev, D. L.; Sperling, M.; Welz, B. **Colloquium Atom. Spektrometrische Spurenanalytik**; Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH: Überlingen, 1991.
- (102) Parker, L. R.; Tioh, N. H.; Barnes, R., *Applied Spectroscopy*, **39**, (1985) , 45.
- (103) Buckley, W. T.; Budac, J.; Godfrey, D.; Koenig, K., *Anal. Chem.*, **64**, (1992) , 724.
- (104) Nakahara, T., *Anal. Chim. Acta*, **50**, (1970) , 51.
- (105) Chang, C., *Anal. Chem.*, **57**, (1985) , 1482.
- (106) Nakata, F.; Yasui, Y.; Matsuo, H.; Kumamaru, T., *Anal. Sci.*, **3**, (1985) , 417.
- (107) Christian, G.; Feldman, F., *Applied Spectroscopy*, **25**, (1971) , 660.
- (108) Riley, J. P. **Chemical Oceanography**; Academic Press: London, 1975.
- (109) Fabricand, B. P.; Sawyer, R. R.; Ungar, S. G.; Adler, S., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **26**, (1962) , 1023.
- (110) Segar, D. A.; Gilio, J. L., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **2**, (1973) , 291.
- (111) Segar, D. A., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **45**, (1973) , 107.
- (112) Cruz, R. B.; van Loon, J. C., *Anal. Chim. Acta*, **72**, (1974) , 231.

- (113) Welz, B.; Akman, S.; Schlemmer, G., *Analyst*, **110**, (1985) , 459.
- (114) Welz, J., *J. Anal. At. Spectrom.*, **2**, (1987) , 793.
- (115) Guevremont, R., *Anal. Chem.*, **52**, (1980) , 1574.
- (116) Guevremont, R., *Anal. Chem.*, **53**, (1981) , 911.
- (117) Calmano, W.; Ahlf, W.; Schiling, T., *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **323**, (1986) , 865.
- (118) Ediger, R. D., *At. Absorpt. Newsl.*, **14**, (1975) , 127.
- (119) Tsalev, D. L.; Slaveykova, V. I.; Mandjukov, P. B., *Spectrochim. Acta Rev.*, **13**, (1990) , 225.
- (120) Ni, Z.; Shan, X., *Spectrochimica Acta Part B*, **42**, (1987) , 937.
- (121) IUPAC, C. o. S. a. O. O. P. f. A., *Pure Appl. Chem.*, **45**, (1976) , 107.
- (122) Tsalev, D. L.; Slaveykova, V. I., *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, (1992) , 147.
- (123) Kingston, H. M.; Barnes, I. L.; Brady, T. J.; Rains, T. C., *Anal. Chem.*, **50**, (1978) , 2064.
- (124) Sturgeon, R. E.; Berman, S. S.; Desaulniers, A.; Russell, D. S., *Talanta*, **27**, (1980) , 85.
- (125) Miyazaki, A.; Barnes, R. M., *Anal. Chem.*, **53**, (1981) , 364.
- (126) Sturgeon, R. E.; Berman, S. S.; Willie, S. N.; Desaulniers, J. A. H., *Anal. Chem.*, **53**, (1981) , 2337.
- (127) Willie, S. N.; Sturgeon, R. E.; Berman, S. S., *Anal. Chim. Acta*, **149**, (1983) , 59.
- (128) Sturgeon, R. E.; Berman, S. S.; Desaulniers, J. A. H.; Mykytiuk, A. P.; McLaren, J. W.; Russell, D. S., *Anal. Chem.*, **52**, (1980) , 1585.
- (129) Angino, E. E.; Billings, G. K.; Andersen, N., *Chem. Geol.*, **1**, (1966) , 145.
- (130) Angino, E. E.; Billings, G. K., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **30**, (1966) , 153.
- (131) Smillie, R. H.; Hunter, K.; Loutit, M., *Water Res.*, **15**, (1981) , 1351.
- (132) Nakashima, S.; Sturgeon, R.; Willie, S.; Berman, S., *Anal. Chim. Acta*, **207**, (1988) , 291.
- (133) Kuban, V., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **346**, (1993) , 873.
- (134) Boniforti, R.; Ferraroli, R.; Frigieri, P.; Heltai, D.; Queirazza, G., *Anal. Chim. Acta*, **162**, (1984) , 33.
- (135) Ma, R.; Van Mol, W.; Adams, F., *Anal. Chim. Acta*, **309**, (1995) , 395.
- (136) Ma, R.; Van Mol, W.; Adams, F., *Anal. Chim. Acta*, **285**, (1994) , 33.
- (137) Lancaster, H. L.; Marshall, G. D.; Gonzalo, E. R.; Ruzicka, J.; Christian, G. D., *Analyst*, **119**, (1994) , 1459.
- (138) Fang, Z.; Tao, G., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **355**, (1996) , 576.
- (139) Fang, Z., *Spectrochimica Acta Part B*, **53**, (1998) , 1371.
- (140) Burguera, J. L.; Burguera, M., *Analyst*, **123**, (1998) , 561.
- (141) Backstrom, K.; Danielsson, L. G.; Nord, L., *Analyst*, **109**, (1984) , 323.
- (142) Bengtsson, M.; Johanson, G., *Anal. Chim. Acta*, **158**, (1984) , 147.
- (143) Backstrom, K.; Danielsson, L. G., *Anal. Chem.*, **60**, (1988) , 1354.
- (144) Backstrom, K.; Danielson, L. G., *Anal. Chim. Acta*, **232**, (1990) , 301.
- (145) Lin, S.; Hwang, H., *Talanta*, **40**, (1993) , 1077.
- (146) Tao, G.; Fang, Z., *Spectrochim. Acta Part B*, **50**, (1995) , 1747.
- (147) Peterson, K. L.; Logan, B. K.; Christian, G. D.; Ruzicka, J., *Anal. Chim. Acta*, **337**, (1997) , 99.
- (148) Tao, G.; Fang, Z., *J. Anal. At. Spectrom.*, **8**, (1993) , 577.
- (149) Sinemus, H.; Kleiner, J.; Stabel, H.; Radzuik, B., *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, (1992) , 433.
- (150) Shuttler, I. L.; Feurstein, M.; Schlemmer, G., *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, (1992) , 1299.

- (151) Zhang, L.; McIntosh, S.; Carnrick, G. R.; Slavin, W., *Spectrochimica Acta Part B*, **47**, (1992), 701.
- (152) Fang, Z.; Dong, P., *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, (1992), 439.
- (153) Dong, L.; Fang, Z., *Fenxi Shiyanshi*, **11**, (1992), 9.
- (154) Chen, H.; Xu, S.; Fang, Z., *J. Anal. At. Spectrom.*, **10**, (1995), 533.
- (155) Sperling, M.; Yin, X.; B, W., *J. Anal. At. Spectrom.*, **6**, (1991), 295.
- (156) Sperling, M.; Yin, X.; Welz, B., *J. Anal. At. Spectrom.*, **6**, (1991), 295.
- (157) Porta, V.; Abollino, O.; Mentasti, E.; sarzanini, C., *J. Anal. At. Spectrom.*, **6**, (1991), 119.
- (158) Liu, Z.; Huang, S., *Anal. Chim. Acta*, **281**, (1993), 185.
- (159) Welz, B.; Sperling, M.; Sun, X., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **346**, (1993), 550.
- (160) Wang, M.; Yuzefovsky, A. I.; Michel, R. G., *Microchem. J.*, **48**, (1993), 326.
- (161) Ma, R.; Van Mol, W.; Adams, F., *Anal. Chim. Acta*, **293**, (1994), 251.
- (162) Colbert, D.; Johnson, K. S.; Coale, K. H., *Anal. Chim. Acta*, **377**, (1998), 255.
- (163) Beinrohr, E.; Cakrt, M.; Rapta, M.; Tarapci, P., *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **335**, (1989), 1005.
- (164) Di, P.; Davey, D. E., *Talanta*, **42**, (1995), 1081.
- (165) Schuster, M.; Schwarzer, M., *Anal. Chim. Acta*, **328**, (1996), 1.
- (166) Silva, M. M.; Arruda, A. Z.; Krug, F. J.; Oliveira, P. V.; Queiroz, Z. F.; Gallego, M.; Valcárcel, M., *Anal. Chim. Acta*, **368**, (1998), 255.
- (167) Figura, P.; McDuffie, B., *Anal. Chem.*, **51**, (1979), 120.
- (168) Valcarcel, M.; Luque de Castro, M. D. **Flow-Injection Analysis. Principles and Applications**, 1 ed.; Ellis Horwood: Chichester, 1987.
- (169) Lee, M. L.; Tolg, G.; Beinrohr, E.; Tschopel, P., *Anal. Chim. Acta*, **272**, (1993), 193.
- (170) Yuan, D.; Shuttler, I. L., *Anal. Chim. Acta*, **316**, (1995), 313.
- (171) Fang, Z.; Xu, K.; Dong, P., *Talanta*, **41**, (1994), 2165.
- (172) Sperling, M.; Yan, X.; Welz, B., *Spectrochim. Acta Part B*, **51**, (1996), 1891.
- (173) Yan, X.; Van Mol, W.; Adams, F., *Analyst*, **121**, (1996), 1061.
- (174) Yan, X.; Adams, F., *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, (1997), 459.
- (175) Ivanova, E.; Yan, X.; Adams, F., *Anal. Chim. Acta*, **354**, (1997), 7.
- (176) Fang, Z.; Xu, S.; Zhang, S., *Anal. Chim. Acta*, **200**, (1987), 35.
- (177) Laboratories, B.-R., *Technical Bulletin*, (1986), 1.
- (178) Buckley, J. A.; Yoshida, G. A.; Wells, N. R.; Aquino, R. T., *Water Res.*, **19**, (1985), 1549.
- (179) Muse, J. O.; Tudino, M. B.; d'Huicque, L.; Troccoli, O. E.; Carducci, C. N., *Environ. Pollut.*, **58**, (1989), 303.
- (180) Muse, J. O.; Tudino, M. B.; d'Huicque, L.; troccoli, O. E.; Carducci, C. N., *Environ. Pollut.*, **87**, (1995), 249.
- (181) Muse, J. O.; Stripeikis, J. D.; Fernandez, F. M.; d'Huicque, L.; Tudino, M. B.; Carducci, C. N.; Troccoli, O. E., *Environ. Pollut.*, **104**, (1999), 315.
- (182) Fernandez, F. M.; Stripeikis, J. D.; Tudino, M. B.; Troccoli, O. E., *Analyst*, **122**, (1997), 679.
- (183) Figura, P.; McDuffie, B., *Anal. Chem.*, **52**, (1980), 1433.
- (184) Lu, Y.; Chakrabarti, C. L.; Back, M. H.; Gregoire, D. C.; Schroeder, W. H.; Szabo, A. G.; Bramall, L., *Anal. Chim. Acta*, **288**, (1994), 131.
- (185) Lu, Y.; Chakrabarti, C. L.; Back, M. H.; Grégoire, D. C.; Schroeder, W. H., *Anal. Chim. Acta*, **293**, (1994), 95.
- (186) Cheng, J.; Chakrabarti, C. L.; Back, M. H.; Schroeder, W. H., *Anal. Chim. Acta*, **288**, (1994), 141.

- (187) Welz, B.; Yin, X.; Sperling, M., *Anal. Chim. Acta*, **261**, (1992), 477.
- (188) Danielsson, L. G.; Magnusson, B.; Zhang, K., *At. Spectrosc.*, **3**, (1982), 39.
- (189) Massart, L.; Vandeginste, B. G. M.; Deming, S. N.; Michotte, Y.; Kaufman, L. **Chemometrics: a Textbook**; Elsevier: Amsterdam, 1988.
- (190) Helfferich, F. **Ion Exchange**; McGraw Hill: New York, 1962.
- (191) Thompson, H. S., *J. Roy. Agr. Soc. Engl.*, **11**, (1850), 68.
- (192) Way, J. T., *J. Roy. Agr. Soc. Engl.*, **11**, (1850), 313.
- (193) Harm, F.; Rimpler, A. 1903; 59.
- (194) Adams, B. A.; Holmes, E. L., *J. Soc. Chem. Ind.*, **54**, (1935), 1T.
- (195) Warshawsky, A. In *Syntheses and Separations using Functional Polymers*; Sherrington, D. C., Hodge, P., Eds.; John Wiley and Sons: New York, 1988.
- (196) Stumm, W.; Morgan, J. J. **Aquatic Chemistry**, 3 ed.; John Wiley and Sons: New York, 1996.
- (197) Braun, T.; Gersini, G. **Extraction Chromatography**; Elsevier Scientific: Amsterdam, 1975.
- (198) Minczewski, J.; Chastowska, J.; Dybczynski, R. **Separation and Preconcentration Methods in Inorganic Trace Analysis**; Ellis Horwood: Chichester, 1980.
- (199) Warshawsky, A., *Inst. Min. & Metal. Trans.*, **83**, (1974), 101.
- (200) Warshawsky, A. In *Ion Exchange and Solvent Extraction*; Marinsky, J. A., Marcus, Y., Eds.; Marcel Decker: New York, 1981; Vol. 8, pp 229.
- (201) Grinstead, R. R., *J. Nucl. Inorg. Chem.*, **36**, (1974), 391.
- (202) Kroebel, R.; Meyer, A., Lyon 1974.
- (203) Alimarin, I. P.; Rodionova, T. V.; Ivanov, V. M., *Russian Chemical Reviews*, **58**, (1989), 1500.
- (204) Mottola, H. A. In *Chemically Modified Surfaces*; Mottola, H. A., Steinmetz, J. R., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1992.
- (205) Marshall, M. A.; Mottola, H. A., *Anal. Chem.*, **55**, (1983), 2089.
- (206) Abollino, O.; Mentasti, E.; Porta, V.; Sarzanini, C., *Anal. Chem.*, **62**, (1990), 21.
- (207) Jerabek, K. In *Strategies in Size Exclusion Chromatography*; Potschka, M., Dubin, P. L., Eds., 1996; Vol. 635.
- (208) Jerabek, K., *Anal. Chem.*, **57**, (1985), 1595.
- (209) Ogston, A. G., *Trans. Faraday Soc.*, **54**, (1958), 1754.
- (210) Jerabek, K., *Anal. Chem.*, **57**, (1985), 1598.
- (211) Elsholz, O.; Schulze, G., *Fresenius'J. Anal. Chem.*, **353**, (1995), 119.
- (212) Sugawara, K. F.; Weetall, H. H.; Schucker, G. D., *Anal. Chem.*, **46**, (1974), 489.
- (213) Weetall, H. H., *Biochim. Biophys. Acta*, **212**, (1970), 1-7.
- (214) Hill, J. M., *J. Chromatogr.*, **76**, (1973), 455.
- (215) Neue, U. D.; Zoubair, M.; El Fallah, A. **HPLC COLUMNS: Theory, Technology and Practice**; New York, 1997.
- (216) Mottola, H. A., *Trends in Anal. Chem.*, **9**, (1990), 297.
- (217) Jerabek, K.; Revillon, A.; Puccilli, E., *Chromatographia*, **36**, (1993), 259.
- (218) Perry, J. H. **Chemical Engineers Handbook**, 3era. ed.; Mc Graw Hill: New York, 1950.
- (219) Marshall, M. A.; Mottola, H. A., *Anal. Chem.*, **57**, (1985), 729.
- (220) Greenway, G. M.; Nelms, S. M.; Skhosana, I.; Dolman, S. J. L., *Spectrochimica Acta Part B*, **51**, (1996), 1909.
- (221) Honjo, T.; Kitayama, H.; Terada, K.; Kiba, T., *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **330**, (1988), 159.
- (222) Helfferich, F., *J. Phys. Chem.*, **69**, (1965), 1178.

- (223) Strikovskiy, A. G.; Jerabek, K.; Cortina, J. L.; Sastre, A. M., *Reactive and Functional Polymers*, **28**, (1996) , 149.
- (224) Su, X. D.; Liu, L. Z.; Shen, X. H., *Fenxi Huaxue*, **23**, (1995) , 1361.
- (225) Ozcan, M.; Akman, S.; Erbil, C.; Sarac, S., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, (1996) .
- (226) Muraiev, D.; Noguerol, J.; Valiente, M., *Reactive and Functional Polymers*, **28**, (1996) , 111.
- (227) Packer, A. P.; Gine, M. F.; Miranda, C. E. S.; dos Reis, B. F., *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, (1997) , 563.
- (228) Huang, K. S.; Jiang, S. J., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **347**, (1993) , 238.
- (229) Jarvis, K. E.; Williams, J. G.; Alcántara, E.; Wills, J. D., *J. Anal. At. Spectrom.*, **11**, (1996) , 917.
- (230) Padilha, P. M.; Rocha, J. C.; Moreira, J. C.; Campos, J. T. S.; Federici, C. C., *Talanta*, **45**, (1997) , 317.
- (231) Itoh, A.; Kimata, C.; Miwa, H.; Sawatari, H.; Haraguchi, H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, (1996) , 3469.
- (232) Malla, M. E.; Alvarez, M. B.; Batistoni, D. A., *Quim. Anal.*, **15**, (1996) , 129.
- (233) Itoh, J.; Komata, M.; Kondou, Y., *Bunseki Kagaku*, **45**, (1996) , 859.
- (234) Hoshi, S.; Tomizuka, T.; Enjo, C.; Haga, Y.; Uto, M.; Akatsuka, K., *Anal. Sci.*, **11**, (1995) , 729.
- (235) Jarvis, I.; Totland, M. M.; Jarvis, K. E., *Analyst*, **122**, (1997) , 19.
- (236) Su, Z. X.; Chang, X. J.; Zhan, G. Y.; Luo, X. G.; Pu, Q. S., *Anal. Chim. Acta*, **310**, (1995) , 493.
- (237) Chang, X. J.; Su, Z. X.; Yang, D.; Gong, B.; Pu, Q. S.; Li, S. K., *Anal. Chim. Acta*, **354**, (1997) , 143.
- (238) Egawa, H.; Jyo, A.; Chen, C. W., *Nippon Kagaku Kaishi*, **5**, (1994) , 442.
- (239) Liang, Y. Z.; Yin, N. W., *At. Spectroscopy*, **16**, (1995) , 243.
- (240) Zu, Z. X.; Pu, Q. S.; Luo, X. Y.; Chang, X. J.; Zhan, G. Y.; Ren, F. Z., *Talanta*, **42**, (1995) , 1127.
- (241) Lopez Artiguez, M.; Carmean, A.; Repetto, M., *At. Spectrosc.*, **17**, (1996) , 83.
- (242) Sung, Y. H.; Liu, Z. S.; Huang, S. D., *Spectrochim. Acta Part B*, **52**, (1997) , 755.
- (243) Sung, Y. H.; Liu, Z. S.; Huang, S. D., *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, (1997) , 841.
- (244) Liu, C. Y.; Lee, N. M.; Wang, T. H., *Anal. Chim. Acta*, **337**, (1997) , 173.
- (245) Yebra Biurrun, M. C.; Bermejo Barrera, A.; Bermejo Barrera, M. P.; Barciela Alonso, M. C., *Anal. Chim. Acta*, **303**, (1995) , 341.
- (246) Shah, R.; Devi, S., *Anal. Chim. Acta*, **341**, (1997) , 217.
- (247) McComb, M. E.; Gesser, H. D., *Anal. Chim. Acta*, **341**, (1997) , 229.
- (248) Landing, W. M.; Haraldsson, C.; Paxeus, N., *Anal. Chem.*, **58**, (1986) , 3031.
- (249) Nickson, R. A.; Hill, S. J.; Worsfold, P. J., *Anal. Chim. Acta*, **351**, (1997) , 311.
- (250) Huang, C. C.; Yang, M. H.; Shih, T. S., *Anal. Chem.*, **69**, (1997) , 3930.
- (251) Lee, C. H.; Suh, M. Y.; Joe, K. S.; Eom, T. Y.; Lee, W., *Anal. Chim. Acta*, **351**, (1997) , 57.
- (252) Soylak, M.; Elci, L., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **66**, (1997) , 51.
- (253) Jain, V. K.; Sait, S. S.; Shrivastav, P.; Agrawal, Y. K., *Talanta*, **45**, (1997) , 397.
- (254) Kimura, M.; Yoshimi, Y., *Nippon Kagaku Kaishi*, **5**, (1991) , 361.
- (255) Vassileva, E.; Varimezova, B.; Hadjiivanov, K., *Anal. Chim. Acta*, **336**, (1996) , 141.
- (256) Navratil, J. D., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **183**, (1994) , 135.
- (257) Petit de Pena, Y.; Gallego, M.; Valcarcel, M., *J. Anal. At. Spectrom.*, **12**, (1997) , 453.

- (258) Gallego, M.; Petit de Pena, Y.; Valcarcel, M., *Anal. Chem.*, **66**, (1994) , 4074.
- (259) Yeh, S. J.; Tsai, C. s.; Yang, H. T., *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **192**, (1995) , 163.
- (260) Ji, H. N.; Liao, Z. H.; Sun, J. M.; Jiang, Z. C., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **360**, (1998) , 721.
- (261) Parthasarathy, N.; Pelletier, M.; Buffle, J., *Anal. Chim. Acta*, **350**, (1997) , 183.
- (262) Masi, A. N.; Olsina, R. A., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **357**, (1997) , 65.
- (263) Dias, N. L.; Polito, W. L.; Gushikem, Y., *Talanta*, **42**, (1995) , 1031.
- (264) Isshiki, K.; Tsuji, F.; Kuwamoto, T., *Anal. Chem.*, , (1987) , 2491.
- (265) Porta, V.; Sarzanini, C.; Mentasti, E.; Abollino, O., *Anal. Chim. Acta*, **258**, (1992) , 237.
- (266) Masi, A. N.; Olsina, R. A., *X Ray Spectrom.*, **25**, (1996) , 221.
- (267) Kocjan, R., *Chem. Anal.*, **41**, (1996) , 501.
- (268) Saxena, R.; Singh, A. K.; Sambi, S. S., *Anal. Chim. Acta*, **2959**, (1994) , 199.
- (269) Hernandez Torres, O.; Arias Leon, J. J., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **54**, (1993) , 15.
- (270) Cortina, J. L.; Miralles, N.; Aguilar, M.; Sastre, A. M., *Solvent Extraction and Ion Exchange*, **12**, (1994) , 371.
- (271) Olbrych-Sleszynska, E.; Brajter, K.; Matuszewski, W.; Trojanowicz, M., *Talanta*, **39**, (1992) , 779.
- (272) Kenawy, I. M. M.; Hafez, M. A. H., *Analisis*, **24**, (1996) , 275.
- (273) Guo, W. Y.; Zeng, X. J., *Huaxue Fence*, **30**, (1994) , 289.
- (274) Brindle, R.; Albert, K., *J. Chromatogr. A*, **757**, (1997) , 3.
- (275) Tittelbach, V.; Gilpin, R. K., *Anal. Chem.*, **67**, (1995) , 44.
- (276) Hermansson, J.; Grahn, A., *J. Chromatogr. A*, **687**, (1994) , 45.
- (277) Su, W.; Gregory, R. B.; Gilpin, R. K., *J. Chromatogr. Sci.*, **32**, (1994) , 279.
- (278) Nesterenko, P. N., *J. Chromatogr.*, **605**, (1992) , 199.
- (279) Zachariou, M.; Hearn, M. T. W., *J. Chromatogr.*, **599**, (1992) , 171.
- (280) Elmahadi, H. A. M.; Greenway, G. M., *Microchem. J.*, **53**, (1996) , 188.
- (281) Armalis, S.; Johansson, G., *Anal. Chim. Acta*, **339**, (1997) , 155.
- (282) Greenway, G. M.; Nelms, S. M.; Skhosana, I. K.; Dolman, S. J. L., *Spectrochim. Acta Part B*, **51**, (1996) , 1909.
- (283) Maquieira, A.; Elmahadi, H. A. M.; Puchades, R., *Analyst*, **121**, (1996) , 1633.
- (284) Lessi, P.; Dias, N. L.; Moreira, J. C.; Campos, J. T. S., *Anal. Chim. Acta*, **327**, (1996) , 183.
- (285) Seshadri, T.; Haupt, H. J., *Anal. Chem.*, **60**, (1988) , 47.
- (286) Mahmoud, M. E.; Soliman, E. M., *Talanta*, **44**, (1997) , 1063.
- (287) Chen, S. C.; Shiue, M. Y.; Yang, M. H., *Fresenius'J. Anal. Chem.*, **357**, (1997) , 1192.
- (288) Gregoire, D. C.; Lee, J., *J. Anal. At. Spectrom.*, , (1994) .
- (289) Lan, C. R.; Yan, M. H., *Anal. Chim. Acta*, **287**, (1994) , 111.
- (290) McLaren, J. W.; Lam, J. W. H.; Berman, S. S.; Akatsuka, K.; Azeredo, A. M., *J. Anal. At. Spectrom.*, **8**, (1993) , 279.
- (291) Esser, B. K.; Volpe, A.; Kenneally, J. M.; Smith, D. K., *Anal. Chem.*, **66**, (1994) , 1736.
- (292) Lan, C. R.; Yang, M. H., *Anal. Chim. Acta*, **287**, (1994) , 101.
- (293) Mahan, C. A.; Holcombe, J. A., *Spectrochim. Acta Part B*, **47**, (1992) , 1483.
- (294) Dias, N. L.; Gushikem, Y.; Polito, W. L.; Moreira, J. C.; Ehirim, E. O., *Talanta*, **42**, (1995) , 1625.
- (295) Zolotov, Y.; Maksimova, I. M.; Morosanova, E. I.; Velikorodny, A. A., *Anal. Chim. Acta*, **308**, (1995) , 378.

- (296) Mahmoud, M. E.; Soliman, E. M., *Talanta*, **44**, (1997) , 15.
- (297) Ramelow, G. J.; Liu, L.; Himel, C.; Fralick, D.; Zhao, Y.; Tong, C., *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **53**, (1993) , 219.
- (298) Falter, R.; Schoeler, H. F., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **353**, (1995) , 34.
- (299) Simonzadeh, N.; Schilt, A. A., *Talanta*, **35**, (1988) , 187.
- (300) Sarkar, A. R.; Datta, P. K.; Sarkar, M., *Talanta*, **43**, (1996) , 1857.
- (301) Halicz, L.; Gavrieli, I.; Dorfman, E., *J. Anal. At. Spectrom.*, **11**, (1996) , 811.
- (302) Hirata, S.; Hashimoto, Y.; Aihara, M.; Vitharana-Mallika, G., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **355**, (1996) , 676.
- (303) Mohammad, B.; Ure, A.; Littlejohn, D., *J. Anal. At. Spectrom.*, **7**, (1992) , 695.
- (304) Schilling, T.; Schramel, P.; Michalke, B.; Knapp, G., *Mikrochim. Acta*, **116**, (1994) , 83.
- (305) Pesco, C.; de Campos, E. A.; Costa, C. M. M., *Mikrochim. Acta*, **127**, (1997) , 229.
- (306) Bortoli, A.; Gerotto, M.; Marchiori, M.; Mariconti, F.; Palonta, M.; Troncon, A., *Microchem. J.*, **54**, (1996) , 402.
- (307) Taylor, I.; Howard, A. G., *Anal. Chim. Acta*, **271**, (1993) , 77.
- (308) Chabereck, S.; Martell, A. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, (1952) , 5052.
- (309) Figura, P.; McDuffie, B., *Anal. Chem.*, **49**, (1977) , 1950.
- (310) Taylor, J. K.; Oppermann, H. V. **Handbook for the Quality Assurance of Metrological Measurements.**; Lewis Publishers, 1988.
- (311) Horwitz, W., *Pure Appl. Chem.*, **60**, (1988) , 855.
- (312) Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J. In *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*; Elsevier: Amsterdam, 1997; Vol. 20A, pp 867.
- (313) Pharmacopeia, U. , 1988.
- (314) Health Protection Branch, D. D. G., Acceptable Methods. , 31 julio 1992.
- (315) Youden, W. J.; Steiner, E. H. **Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists.**; AOAC: Arlington, 1975.
- (316) Currie, L. A.; Svehla, G., *Pure Appl. Chem.*, **66**, (1994) , 595.
- (317) Boqué, R.; Rius, F. X. In *Avances en Quimiometría Práctica*; Cela, R., Ed.; Servicio de Publicación e Intercambio Científico. Universidad de Santiago de Compostela: Santiago de Compostela, 1994.
- (318) Varma, A. **Handbook of Furnace Atomic Absorption Spectrometry**; CRC Press: Boca Ratón, Florida, 1990.
- (319) Ortiz, M. C.; Sarabia, L. A. In *Avances en Quimiometría Práctica*; Cela, R., Ed.; Servicio de Publicación e Intercambio Científico. Universidad de Santiago de Compostela: Santiago de Compostela, 1994.
- (320) IUPAC, *Spectrochim. Acta Part B*, **33**, (1978) , 242.
- (321) Currie, L. A., *Pure Appl. Chem.*, **67**, (1995) , 1699.
- (322) Miller, J. C.; Miller, J. N. **Estadística para Química Analítica**; Addison Wesley Iberoamericana: Wilmington (Delaware), 1993.
- (323) Liteanu, C.; Rica, I. **Statistical Theory and Methodology of Trace Analysis**; Ellis Horwood: Chichester, 1980.
- (324) Booksh, K. S.; Kowalski, B. R., *Anal. Chem.*, **66**, (1994) , 782A.
- (325) Zar, J. H. **Biostatistical Analysis**, 2da. ed.; Prentice Hall International: Londres, 1988.
- (326) Bodek, I.; Lyman, W. J.; Reehl, W. F.; Rosenblatt, D. H. **Environmental Inorganic Chemistry, Properties, Processes and Estimation Methods**; Pergamon Press: New York, 1988.

- (327) Brown, D. A.; Jenkins, K. D.; Perkins, D. M.; Gossett, R. W.; Hershelman, G. P. In *Biennial Report, 1981-1982, Southern California Coastal Water Research Project*; Bascom, W., Ed.: Long beach CA, 1982.
- (328) Simkiss, K.; Taylor, M. G. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1995; Vol. 3.
- (329) Campbell, P. G. C. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1995; Vol. 3.
- (330) Drake, L. R.; Rayson, G. D., *Analytical Chemistry News & Features*, , (1996) , 22A.
- (331) Madrid, Y.; Cámara, C., *Trends in Analytical Chemistry*, **16**, (1997) , 36.
- (332) Alloway, B. J.; Ayres, D. C. **Chemical Principles of Environmental Pollution**, 2da ed.; Blackie Academic and Professional: London, 1997.
- (333) Robards, K.; Worsfold, P., *Analyst*, **116**, (1991) , 549.
- (334) Barnett, B. E.; Aschcroft, C. R., *Environmental Pollution*, **9**, (1985) , 193.
- (335) Bryan, G. W.; Hummerstone, L. G., *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **53**, (1973) , 705.
- (336) Fuge, R.; James, K. H., *Mar. Pollut. Bull.*, **5**, (1974) , 9.
- (337) Phillips, D. J. H., *Environmental Pollution*, **13**, (1977) , 281.
- (338) Capodaglio, G.; Coale, K. H.; Bruland, K. W., *Limnol. Oceanogr.*, **29**, (1990) , 221.
- (339) Jordan, R. B. **Reaction Mechanisms of Inorganic and Organometallic Systems**; Oxford University Press: New York, 1991.
- (340) Donat, J. R. , Anaheim, CA 1995; ACS; GEOC 107.
- (341) Cabaniss, S. E.; Shuman, M. S., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **52**, (1988) , 185.
- (342) Rodriguez Procopio, J.; Ortiz Viana, M.; Hernandez Hernandez, L., *Environ. Sci. Technol.*, **31**, (1997) , 3081.
- (343) Mottola, H. A. **Kinetic Aspects of Analytical chemistry**; John Wiley & Sons.: New York, 1988.
- (344) Hansen, E. H., *Anal. Chim. Acta*, **261**, (1992) , 125.
- (345) Choudry, G. G. **Humic Substances, Structural, Photophysical, Photochemical and Free Radical Aspects and Interactions with Environmental Chemicals.**; Gordon Breach and Science Publishers: New York, 1984.
- (346) Wu, K. J.; Odom, R. W., *Anal. Chem. News and Features*, , (1998) , 456A.
- (347) Schnitzer, M.; Khan, S. U. **Soil Organic Matter**; Elsevier: New York, 1978.
- (348) Hayes, M. H. B.; P, M.; Malcomb, R. L.; Swift, R. S. **Humic Substances II: In search of Structures**; Wiley: New York, 1989.
- (349) Sein, L. T.; Varnum, J. M.; Jansen, S. A., *Environ. Sci. Technol.*, **33**, (1999) , 546.
- (350) Mak, M. K. S.; H, L. C., *Inorg. Chim. Acta*, **70**, (1983) , 237.
- (351) Skrabal, S. A.; Donat, J. R.; Burdige, D. J., *Limnology and Oceanography*, , (1997) , en prensa.
- (352) Turner, D. R.; Whitfield, M.; Dickinson, A. G., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **45**, (1981) , 855.
- (353) Sigg, L.; Xue, H. **Metal Speciation: Concepts, Analysis and Effects**; ECSC, EEC, EAEC: Brussels and Luxembourg, 1994.
- (354) Schecher, W. D.; Mc Avoy, D. C. ; Environmental Research Software: Hallowell, ME, 1994.
- (355) Cabaniss, S. E.; Shuman, M. S., *Geochim. Cosmochim. Acta*, **52**, (1988) , 195.

- (356) Herbelin, A.; Westall, J. ; Department of Chemistry, Oregon State University, 1996.
- (357) Fukushima, M.; Nakayasu, K.; Tanaka, S.; Nakamura, H., *Anal. Chim. Acta*, **317**, (1995) , 195.
- (358) Midorikawa, T.; Tanoue, E.; Sugimura, Y., *Anal. Chem.*, **62**, (1990) , 1737.
- (359) Zur, C.; Ariel, M., *Anal. Chim. Acta*, **88**, (1977) , 245.
- (360) Mathutu, A. S.; Ephraim, J. H., *Anal. Chim. Acta*, **42**, (1995) , 1803.
- (361) Raspor, B.; Branica, M., *J. Electroanal. Chem.*, **59**, (1975) , 99.
- (362) Chakrabarti, C. L.; Lu, Y.; Grégoire, D. C.; Back, M. H.; Schroeder, W. H., *Environ. Sci. Technol.*, **28**, (1994) , 1957.
- (363) Bernasconi, C. F. **Investigation of Rates and Mechanisms of Reactions. Part I: general Considerations and reactions at Conventional Rates. Chapter VI**, 4ta. ed.; Wiley Interscience: New York, 1985.
- (364) Ramachadran, B. R.; Halpern, A. M., *J. Chem. Ed.*, **74**, (1997) , 975.
- (365) Gellene, G. I., *J. Chem. Ed.*, **72**, (1995) , 196.
- (366) Jezorek, J. R.; Freiser, H., *Anal. Chem.*, **51**, (1979) , 366.
- (367) Huheey, J. E. **Inorganic Chemistry: Principles of Structure and Reactivity**; Harper and Row: New York, 1972.
- (368) Vasconcelos, M. T.; Leal, M. F., *Anal. Chim. Acta*, **353**, (1997) , 189.
- (369) Hashemi, P.; Olin, A., *Talanta*, **44**, (1997) , 1037.
- (370) Butler, J. N. **Ionic Equilibrium, a Mathematical Approach**; Addison Wesley: Readind, MA, 1964.
- (371) Krishnamurti, G. S. R.; Huang, P. M.; Van Rees, K. C. J.; Kozak, L. M.; Rostad, H. P. W., *Analyst*, **120**, (1995) , 659.
- (372) Sillanpaa, M.; Jansson, H. ; FAO: Roma, 1992.
- (373) Olayinka, K. O.; Haswell, S. J.; Grzeskowiak, R., *J. Anal. At. Spectrom.*, **4**, (1989) , 171.
- (374) Wang, J.; Marshall, W. D., *Analyst*, **120**, (1995) , 623.
- (375) High, K. A.; Azani, R.; Fazekas, A. F.; Chee, Z. A.; Blais, J. S., *Anal. Chem.*, **64**, (1992) , 3197.
- (376) Trojanowicz, M.; Alexander, P. W.; Brynn Hibbert, D., *Anal. Chim. Acta*, **370**, (1998) , 267.
- (377) Groschner, M.; Appriou, P., *Anal. Chim. Acta*, **297**, (1994) , 369.
- (378) Fukushima, M.; Tanaka, S.; Nakamura, H.; Ito, S.; Haraguchi, K.; Ogata, T., *Anal. Chim. Acta*, **322**, (1996) , 173.
- (379) Burba, P.; Shkinev, V.; Spivakov, B. Y., *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **351**, (1995) , 74.
- (380) Hiraide, M., *Analytical Sciences*, **8**, (1992) , 453.
- (381) Peuravuori, J.; Pihlaja, K., *Anal. Chim. Acta*, **363**, (1998) , 235.
- (382) Donat, J. R.; Statham, P. J.; Bruland, K. W., *Mar. Chem.*, **18**, (1986) , 85.
- (383) Kawabata, N.; Ohira, K., *Environ. Sci. Technol.*, **13**, (1979) , 1396.
- (384) Donat, J. R., *Mar. Chem.*, **57**, (1997) , 1.
- (385) Hiraide, M.; Tillekeratne, S. P.; Otsuka, K.; Mizuike, A., *Anal. Chim. Acta*, **172**, (1985) , 215.
- (386) Sugii, A.; Ogawa, N.; Iinuma, Y.; Yamamura, H., *Talanta*, **28**, (1981) , 551.
- (387) Quevauvillier, P., *Analyst*, **120**, (1995) , 597.
- (388) Quevauvillier, P., *Spectrochimica Acta Part B*, **53**, (1998) , 1261.
- (389) Dabeka, R. W.; Mykytiuk, A.; Berman, S. S.; Russell, D. S., *Anal. Chem.*, **48**, (1976) , 1203.

- (390) Bromberg, L.; Lewin, I.; Gottlieb, H.; Warshawsky, A., *Inorg. Chim. Acta*, **197**, (1992) .
- (391) Shuman, M. S.; Shain, I., *Anal. Chem.*, **41**, (1969) , 1818.
- (392) Nelson; Eggertsen, *Anal. Chem.*, **30**, (1958) , 1387.
- (393) Ortiz, M. C.; Sarabia, L. A. : Universidad de Burgos, España, 1992.
- (394) Langston, W. J.; Spence, S. K. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1995; Vol. 3.
- (395) Brooks, R. R.; Presley, B. J.; Kaplan, I. R., *Talanta*, **14**, (1967) , 809.
- (396) Morel, F. M. M.; Hering, J. G. **Principles and Applications of Aquatic Chemistry**; Wiley Interscience: New York, 1993.

F.M.F (octubre 1999)