

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



**EMPLEO DE ESTANDAR INTERNO EN LA DETERMINACION
DE ARSENICO A NIVEL DE TRAZAS POR
ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS**

TESIS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
ESPECIALIDAD EN QUIMICA ANALITICA**

PRESENTA

EDITH MADAI COLUNGA URBINA

CD. UNIVERSITARIA

MARZO DE 1999

TM

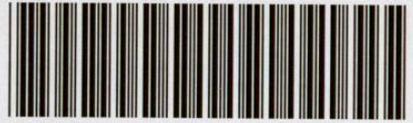
TP245

.A8

C6

1999

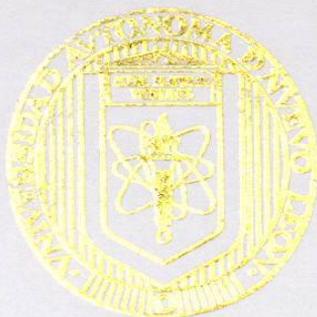
c.1



1080092526

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS



EMPLEO DE ESTANDAR INTERNO EN LA DETERMINACION
DE ARSENICO A NIVEL DE TRAZAS POR
ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS

TESIS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
ESPECIALIDAD EN QUIMICA ANALITICA

PRESENTA

EDITH MADAI COLUNGA URBINA

CD. UNIVERSITARIA

MARZO DE 1999

TM
TP 245
A8
C6
1999



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

EMPLEO DE ESTÁNDAR INTERNO EN LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO A
NIVEL DE TRAZAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UVMIS.

POR

EDITH MADAÍ COLUNGA URBINA

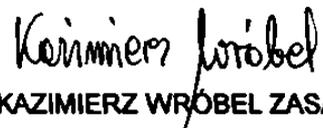
Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS con
especialidad en Química Analítica

DIRECTOR DE TESIS INTERNO
FAC. DE CIENCIAS QUIMICAS U.A.N.L.

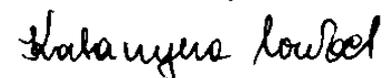


DR. ARMANDO GARCÍA LUNA

DIRECTORES DE TESIS EXTERNOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS. U. DE GUANAJUATO



DR. KAZIMIERZ WRÓBEL ZASADA

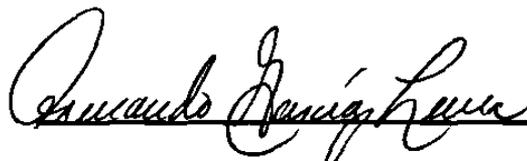


DRA. KATARZYNA WRÓBEL KACZMARCZYK

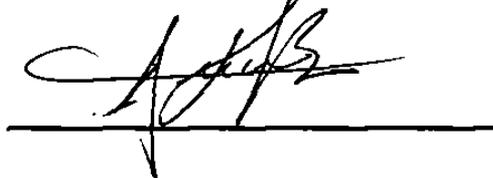
EMPLEO DE ESTÁNDAR INTERNO EN LA DETERMINACIÓN DE
ARSÉNICO A NIVEL DE TRAZAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA
UV/VIS.

Aprobación de la Tesis:

Dr. Armando García Luna
Presidente



Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa
Secretario



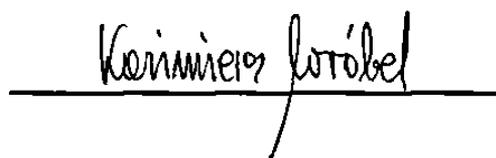
M.C. Perla Elizondo Martínez
Vocal



M.C. Isabel del Carmen Sáenz Tavera
Vocal



Dr. Kazimierz Wróbel Zasada
Vocal

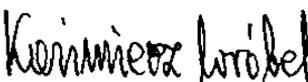


M.C. Martha A. Suárez Herrera
Coordinadora de la Escuela de
Graduados en Ciencias

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente, nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título **“EMPLEO DE ESTÁNDAR INTERNO EN LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO A NIVEL DE TRAZAS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV/ VIS”**, que realizó la C. Edith Madaí Colunga Urbina, para obtener el grado de Maestría en Ciencias Químicas con especialidad en Química Analítica, en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Guanajuato, bajo la dirección de los Doctores Kazimierz Wróbel Zasada y Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk.

ATENTAMENTE


Dr. Kazimierz Wróbel Zasada


Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk

“Cualquier cosa que hagas por pequeña que sea es un paso adelante en el progreso de tu vida, en tus manos hay parte del futuro de la humanidad, recuerda siempre que la gratitud es un deber que nunca puedes olvidar”

AGRADECIMIENTOS

Sirvan estas líneas para expresar mi más sincero agradecimiento a los Doctores Kazimierz Wróbel Zasada y Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk, asesores externos de esta tesis, quienes al brindarme la oportunidad de trabajar en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Guanajuato, me permitieron no solo desarrollar este trabajo sino iniciarme en el interesante campo de la investigación.

Al Dr. Armando García Luna por su interés en la revisión del anteproyecto de tesis y por sus palabras de aliento para concluir esta tarea.

Al Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa, M.C. Perla Elizondo Martínez y M.C. Isabel del Carmen Sáenz Tavera, miembros del Comité de tesis, quienes cedieron parte de su valioso tiempo para la revisión del borrador de este escrito.

Sin el apoyo material y económico que obtuve de la Dirección de Asuntos Académicos de la Universidad Autónoma de Coahuila y de los directivos de la Facultad de Ciencias Químicas de la misma Institución, hubiera sido imposible la realización de esta investigación. Por ello quiero agradecer a la Lic. María del Carmen Ruiz Esparza y a la Lic. Aurora Bustillos Garfias las facilidades que me brindaron para el inicio de este proyecto.

Así mismo, mi agradecimiento al Dr. Pedro Luis López de Alba, Director del Instituto de Investigaciones Científicas de la Universidad de Guanajuato, por el apoyo brindado para concluir estos estudios.

A mis compañeros maestros que de diferente manera me motivaron a seguir adelante.

Un agradecimiento muy especial a mi padre; al Dr. Adolfo Fuentes y a Esther Navarro de Fuentes, por su paciencia, consejos y colaboración en cada uno de los proyectos realizados a lo largo de mi carrera y con especial gratitud a Iliana, Jose y Gustavo por su ayuda desinteresada en la elaboración del material didáctico.

Edith Madai Colunga Urbina

Fecha de graduación: Enero de 1999

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio:

EMPLEO DE ESTÁNDAR INTERNO
EN LA DETERMINACIÓN DE
ARSENICO A NIVEL DE TRAZAS
POR ESPECTROFOTOMETRÍA
UV/ VIS.

Número de páginas: 70

Candidato para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químicas con
Especialidad en Química Analítica.

Área de Estudio: Química Analítica

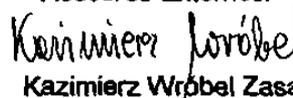
Propósito y Método de Estudio: En el presente trabajo se desarrolla un nuevo procedimiento analítico para la determinación de Arsénico a nivel de trazas por espectrofotometría UV/Vis., basándose en el fundamento del método oficial NOM-AA-46 –1981.

Contribuciones y Conclusiones: Las modificaciones al método oficial consisten en utilizar borohidruro de sodio en la etapa de generación de arsina (mejor cinética de reacción), en incluir una etapa de preconcentración y en emplear el método de estándar interno. Se ha propuesto un esquema de preconcentración basado en inducción de separación de fases por adición de agua. Se modificó la composición de la solución absorbadora para que, después de adición de agua, se obtenga un micro volumen de fase orgánica apolar donde se preconcentra el complejo del analito y el estándar interno. La composición final de la disolución absorbadora (1 mL) resultó ser: dietil ditiocarbamato de plata (0.03 mg.mL^{-1}) en la mezcla de dimetilformamida : cloroformo : dietanolamina 18:16:1 con bromuro de hexadeciltrimetil amonio al 0.02 % y con adición de $30 \mu\text{L}$ de estándar interno al 0.1%. El estándar interno más adecuado resultó ser la Erioglauцина A, se estableció su concentración para que su absorbancia en $\lambda = 623 \text{ nm}$ sea 2.5 veces más alta que la absorbancia del complejo de arsénico en $\lambda = 525 \text{ nm}$ (el más alto estándar de calibración). Se evaluaron las características analíticas del procedimiento propuesto, obteniéndose mejores parámetros analíticos respecto al método oficial (LD $0.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ y $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectivamente). Se llevó a cabo la validación del procedimiento utilizando el material de referencia (SRM 1643d, NIST). El resultado obtenido $54.7 \pm 2.3 \mu\text{g.L}^{-1}$ concuerda con el valor certificado por NIST $56.02 \pm 0.73 \mu\text{g.L}^{-1}$, lo que demuestra la validez del procedimiento desarrollado.

Asesor Interno:


Dr. Armando García Luna

Asesores Externos:


Dr. Kazimierz Wróbel Zasada

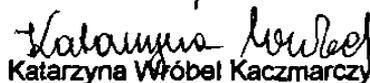

Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. Introducción	1
1.1 Distribución y principales fuentes de arsénico en el medio ambiente	2
1.2 Retención de arsénico en el organismo del hombre, su metabolismo y toxicidad	4
1.3 Resumen de las Normas oficiales, que establecen los niveles máximos permisibles de arsénico en el medio ambiente	6
1.4 Métodos analíticos de determinación de arsénico de interés medio ambiental	7
1.4.1 Determinación de arsénico por métodos electroanalíticos	8
1.4.2 Determinación de arsénico por métodos espectrales	11
1.5 Método espectrofotométrico de determinación de arsénico con dietil ditiocarbamato	18
1.6 Empleo del método de estándar interno en espectrofotometría	20
1.7 Fiabilidad de los resultados analíticos y validación de un método	23
1.7.1 Características analíticas	24

1.7.2 Validación del método: exactitud de los resultados analíticos	26
2. Objetivo	28
2.1 Objetivo General	28
2.2 Objetivos específicos	28
3. Parte experimental	30
3.1 Aparatos y equipo	30
3.2 Reactivos y disoluciones	31
3.3 Metodología y Resultados	32
3.3.1 Generación de arsina	34
3.3.2 Transporte de arsina hasta la solución absorbadora	35
3.3.3 Composición de la solución Absorbadora	38
3.3.4 Selección del estándar interno	38
3.3.5 Etapa de preconcentración	43
3.3.5.1 Evaporación del disolvente	43
3.3.5.2 Separación de las fases inducida por adición de agua	45
3.3.6 Especiación de As (V)/ As (III)	49

3.3.7 Parámetros analíticos y validación del procedimiento propuesto	54
4. Conclusiones	58
Referencias bibliográficas	61

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema del método oficial NOM-AA-46-1981	32
2. Ruta crítica del procedimiento a desarrollar	33
3. Efecto del pH (tampón de citratos) en la generación de arsina en las soluciones de As(III) y As (V)	35
4. Efecto del volumen de borohidruro de sodio al 2% en la señal analítica	36
5. Efecto de la concentración y el caudal de la solución de borohidruro de sodio	37
6. Estructuras moleculares de dos compuestos considerados como posibles estándares internos	40
7. Efecto de concentración de CTAB en la extracción de erioglaucina A	41
8. Espectros de absorción de Erioglaucina A y el complejo (DEDTC) ₃ As en CHCl ₃	42
9. Espectros de absorción de (DEDTC) ₃ As y de 2,3 naftalocianina en CHCl ₃	43
10. Esquema de preconcentración basado en inducción de separación de fases por adición de agua	45

11. Efecto de volumen de agua en el rendimiento de extracción de $(\text{DEDTC})_3\text{As}$ y de EI.	48
12. Efecto de la concentración del ácido tioglicólico en la señal analítica	50
13. Espectros de absorción de $(\text{DEDTC})_3\text{As}$ y de EI obtenidos en las soluciones estándar de As_2O_3 y DMAs	52
14. Espectros de absorción registrados en las soluciones de calibración para As total	55

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Resumen de los métodos electroanalíticos más sensibles para la determinación de arsénico total	10
2. Determinación de Arsénico por espectrofotometría UV/Vis en disolución	15
3. Resumen de procedimientos de separación/preconcentración de especies de arsénico para su posterior determinación utilizando generación de hidruros	17
4. Constantes dieléctricas de disolventes utilizados en la etapa de preconcentración	46
5. La composición de las disoluciones y los resultados de recuperación de Arsénico inorgánico total	54
6. Características analíticas del procedimiento propuesto sin y con empleo de EI	56

NOMENCLATURA

CG	Cromatografía de gases
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
DDTC-Ag	Dietil ditiocarbamato de plata
DEA	Dietanolamina
(DEDTC) ₃ As	Dietilditiocarbamato de Arsénico
DER	Desviación estándar relativa
DMAs	Acido dimetilarsinico
DMF	Dimetilformamida
DPASV	Voltametría diferencial de pulsos con redisolución anódica
DPCSV	Voltametría diferencial de pulsos con redisolución catódica
DPP	Polarografía diferencial de pulsos
DS	Desviación estándar
EI	Estándar interno
GH	Generador de hidruros
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MMAs	Acido monometilarsónico
NOM	Norma Oficial mexicana
SAM	S-adenosil-metionina
SWCSV	Voltametría de onda cuadrada con redisolución catódica
UV/Vis	Ultra violeta/ Visible

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Un elemento conocido desde la antigüedad como veneno es el arsénico. En cuanto a su distribución en la naturaleza, está presente en la atmósfera, ambiente acuático, en suelos y en organismos vivos. La presencia de arsénico en el medio ambiente está relacionada con su contenido natural en la corteza terrestre (entre los elementos, el As ocupa el vigésimo lugar (1)) y con las actividades antropogénicas. Así que el nivel de este elemento en diferentes materiales medio ambientales va a depender de la región geográfica y del factor antropogénico en dicha región.

Recientemente se ha detectado el problema de contaminación del medio ambiente con arsénico en el norte de México. En la región Lagunera (Coahuila - Durango) existen pequeñas poblaciones donde el agua está contaminada por arsénico, solamente mencionaremos algunas de ellas: Santa Ana, Cuauhtémoc y Lagos del municipio de San Pedro, Coah.; Finisterre y el Cántabro de Francisco I. Madero; Horizonte y San Julio de Tlahualilo, Durango (2). El verdadero origen de la fuente de contaminación no se ha determinado pero existen diversos factores que se han considerado como participantes en la contaminación:

- Hasta la década de los 40 se utilizaron en forma intensa plaguicidas a base en arsénico.
- Una planta metalúrgica que desde hace aproximadamente 50 años se encuentra laborando despidiendo polvos y humos que contienen arsénico.

- La presencia natural de minerales que contienen arsénico.
- La presencia de pozos profundos de donde se extrae el agua y en los cuales se ha detectado el elemento a diferentes niveles.

En las poblaciones de los municipios antes mencionados se han presentado problemas de salud tales como pigmentación en la dentadura (pardo obscura), enfermedad de Wo Chao Ping o del pie negro, máculas, pápulas, placas, úlceras, melanoma y carcinoma.

Por lo anterior es evidente controlar los niveles del arsénico en el medio ambiente con el fin de prevenir las posibles intoxicaciones de los seres vivos. Este tipo de control es el punto clave en toda una gama de acciones enfocadas hacia la protección del medio ambiente. Es decir, en primer lugar es necesario determinar el nivel del contaminante en diferentes muestras/regiones para poder dictaminar cuales de estas muestras cumplen y cuales no con las normas respectivas. De esta etapa dependen todas las decisiones sobre posibles procedimientos de tratamiento de aguas, suelos y plantas para su remediación.

1.1. Distribución y principales fuentes de arsénico en el medio ambiente.

En cuanto a la distribución del arsénico en la corteza terrestre, sus compuestos nativos más importantes son los sulfuros, arsenopirita (FeAsS), rejalgar (As_4S_4) y oropimente (As_2S_3). El arsénico está presente junto con los minerales de cobre, plata, zinc, oro, etc. (3)

Además de los compuestos inorgánicos de arsénico, en el medio ambiente se encuentran algunos compuestos orgánicos, como productos de metilación que se llevan a cabo en los organismos vivos (hongos, bacterias, plantas) (4). Entre las especies orgánicas hay que mencionar las siguientes:

- ácido monometilarsónico (MMAs) $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})$
- ácido dimetilarsínico (DMAs) $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$
- arsenobetaina $(\text{CH}_3)_3\text{As}^{(+)}\text{CH}_2\text{COOH}$
- arsenocolina $(\text{CH}_3)_3\text{As}^{(+)}(\text{CH}_2)_2\text{OH}$

Es de destacar la presencia del arsénico en organismos acuáticos (algas, moluscos y peces) donde los niveles de arsénico son significativamente más altos que en el agua. Como ejemplo, la concentración típica de este elemento en agua del mar es aproximadamente $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (en aguas dulces $0.4 - 80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (5), mientras que los niveles encontrados en diferentes pescados varían entre 0.31 hasta $340 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (6). La especie más abundante en los organismos acuáticos es arsenobetaina, aunque en algas se ha demostrado la presencia de arsénico en compuestos derivados de azúcares (7). La presencia de las especies del arsénico en los organismos acuáticos se debe principalmente a acumulación de dichos compuestos, que fueron sintetizados de arsénico inorgánico en bajos niveles de la cadena trófica. Esta afirmación se basa en el hecho de que los organismos en los más altos niveles de la cadena trófica (peces, moluscos) no disponen de rutas de síntesis de arsenobetaina y de compuestos de arsénico con lípidos.

Una fuente importante de arsénico en el medio ambiente son las actividades antropogénicas, como es el caso de la industria del vidrio, fabricación de pinturas, de anilinas, de ciertos productos

farmacéuticos, de papel, textiles, imprenta, etc. Además, el arsénico es componente de algunos insecticidas y herbicidas. Recientemente se ha estimado que, en la emisión de compuestos de arsénico a la atmósfera, la relación de arsénico de origen natural y antropogénico es de 60:40 (8)

1.2. Retención de arsénico en el organismo del hombre, su metabolismo y toxicidad.

Las vías de entrada del arsénico al organismo humano pueden ser: oral, respiratoria y cutánea. La mayor fuente de arsénico para el hombre la constituyen: el agua contaminada, los vegetales y mariscos. Independientemente de la cantidad ingerida, la retención del arsénico en el cuerpo depende de su biodisponibilidad, es decir de las formas fisicoquímicas en las cuales está presente en alimentos, agua y aire. En general puede resumirse, que los compuestos de As(III) son aproximadamente 60 veces más tóxicos que los de As(V) y que los compuestos inorgánicos son cerca de 100 veces más tóxicos que los orgánicos (9). Pentose establece el siguiente orden creciente de la toxicidad de diferentes especies de arsénico: $As(0) < R_4As^+ < R_nAsO(OH)_{3-n} (n=1,2) < As_2O_5 (As(V)) < (RAsO)_n < As_2O_3 (As(III)) < R_3As (R = H, Me, Cl)$ (5)

Una vez adsorbidos en el organismo, las especies arsenicales son transportadas en la sangre y se distribuyen en todo el organismo habiendo una concentración inicial mayor en pulmones y riñones, para posteriormente concentrarse en hígado.

El metabolismo del arsénico inorgánico consiste en procesos de metilación. Esta metilación se lleva a cabo por vía enzimática con participación de metiltransferasas. El donador del grupo metílico para

estas reacciones es S-adenosil-metionina (SAM). Los productos de metilación del arsénico son agentes mutagénicos menos potentes que el arsénico inorgánico. Se ha estudiado el efecto genotóxico de diferentes especies de As en células L5178Y y se observó que el mismo efecto puede ser provocado por:

1-2 $\mu\text{g/mL}$	arsenito de sodio
10-14 $\mu\text{g/mL}$	arsenato de sodio
2500-5000 $\mu\text{g/mL}$	MMA _s
10000 $\mu\text{g/mL}$	DMA _s

Estos resultados demuestran claramente, que la metilación de los compuestos inorgánicos del arsénico es un proceso natural de detoxificación (10).

La principal ruta de eliminación del arsénico del cuerpo es por la orina, donde la mayor parte de elemento está en forma de compuestos metilados (MMA_s y DMA_s) y solo aproximadamente 20% del arsénico total está en forma inorgánica (11).

Hay que destacar, que durante los procesos de detoxificación del arsénico en el organismo, disminuye el nivel de S-adenosil-metionina, que es también cofactor para ADN-metiltransferasas responsables por la metilación de ADN (12). Así que el arsénico, compitiendo con el ADN por la donación del grupo metílico, provoca hipometilación de ADN. Por otro lado la hipometilación de ADN fue observada en células después de la transformación maligna. La anormal metilación de ADN facilita la expresión de los genes conduciendo a la transformación de la célula, lo que sugiere un posible mecanismo de carcinogénesis provocado por el arsénico.

Otros posibles mecanismos de toxicidad del arsénico están relacionados con una significativa afinidad de As(III) (tanto orgánico como inorgánico) con los grupos sulfhidrilo de las proteínas interfiriendo en su actividad e inhibiendo las enzimas esenciales para el metabolismo celular. Entre las enzimas posiblemente afectadas en la presencia del arsénico se pueden mencionar diferentes tipos de oxidasas, transferasas y ureasas (9).

La exposición a largo plazo a los compuestos del arsénico puede causar una toxicidad crónica, que se manifiesta en el síndrome de pie negro, que puede conducir a cáncer de piel, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del sistema nervioso y vascular periférico, etc. Los mayores incidentes que han ocurrido en las regiones donde el agua potable fue contaminada con arsénico fueron en Taiwan (13), Chile (14), Argentina (15).

1.3. Resumen de las Normas Oficiales, que establecen los niveles máximos permisibles de arsénico en el medio ambiente.

Hoy en día existe una serie de normatividades, tanto a nivel regional, como nacional e internacional, que establecen niveles máximos permisibles del arsénico en diferentes muestras ambientales como son: agua potable, aguas residuales, agua de río, agua de embalses, agua de mar, aire, suelos, plantas, etc. Es importante mencionar que todas estas normas consideran el arsénico total. Aunque no hay duda, que la biodisponibilidad y toxicidad del elemento dependen de su especiación, en la actualidad no existen herramientas analíticas adecuadas para poder llevar a cabo un rutinario control de contaminación del medio ambiente con las especies del arsénico.

En cuanto a agua potable, el servicio de Salud Pública de Estados Unidos de América (16) recomendó como aceptable una concentración de arsénico de 10 $\mu\text{g/L}$ y un nivel máximo permisible de 50 $\mu\text{g/L}$. La Comisión de la Comunidad Europea (17) establece la norma de 10 $\mu\text{g/L}$, el Comité de Estándares de Agua potable de Canadá (18) acepta los mismos niveles que Estados Unidos, en México el límite máximo permisible según la normatividad vigente es de 50 $\mu\text{g/L}$ (19). La Norma Mexicana establece también los niveles máximos permisibles de arsénico en agua dependiendo de su uso: 100 $\mu\text{g/L}$ para riego agrícola; 200 $\mu\text{g/L}$ para protección de la vida acuática en agua dulce y 40 $\mu\text{g/L}$ para la vida acuática en agua salada. En agua para suelos destinados a la agricultura el límite máximo permisible es de 200 $\mu\text{g/L}$ y en humedales naturales de 100 $\mu\text{g/L}$ (20).

1.4. Métodos analíticos de determinación de arsénico en materiales de interés medio ambiental.

Como se puede observar en los datos presentados en el punto anterior, el nivel máximo permisible de As en diferentes tipos de muestras medio ambientales es del orden de partes por billón. Así que, para tener un control fiable del medio ambiente se requieren herramientas analíticas sensibles y fiables, que permitan determinar arsénico a estos bajos niveles.

Se realizó la búsqueda bibliográfica de los métodos analíticos utilizados actualmente para el análisis de arsénico clasificándolos en dos grupos: (1) métodos electroanalíticos y (2) métodos espectrales.

A continuación se resumen los resultados de la búsqueda bibliográfica en los dos grupos de métodos mencionados.

1.4.1. Determinación de arsénico por métodos electroanalíticos.

Entre las dificultades que presenta este tipo de análisis las más importantes son las siguientes:

1. Solamente el As(III) es electroactivo.
2. Los métodos directos (sin procedimientos de preconcentración) presentan poca sensibilidad respecto a los niveles normales del elemento en muestras ambientales.
3. Dependiendo del tipo de muestra existen varios problemas de interferencias (otros iones metálicos, como Cu, Cd, Zn; generación de Cl_2 , H_2 en la superficie del electrodo, etc.).

Los problemas antes mencionados fueron estudiados por varios autores y se han propuesto diferentes procedimientos analíticos que permiten una determinación fiable del elemento en muestras reales.

En primer lugar, para poder determinar el arsénico total se llevó a cabo una etapa de reducción $\text{As(V)} \rightarrow \text{As(III)}$ utilizando como posibles agentes reductores cisteína o sulfito de sodio entre otros. Después de la etapa de reducción, el As(III) fue determinado por voltametría de redisolución catódica utilizando electrodo de gota de mercurio colgante (21). Por otro lado, el As(V) puede convertirse en forma electroactiva vía su complejación con pirogalol o catecol (22). Como técnica analítica se utilizó voltametría anódica o de adsorción con etapa de depositación del analito en el electrodo seguido por la

etapa de redisolución (stripping). Una desventaja de este procedimiento son los efectos de memoria observados en electrodos de platino o de plata.

Una mejor sensibilidad en la determinación de arsénico puede lograrse utilizando técnicas de tipo stripping, en las cuales el analito está depositado sobre la superficie del electrodo en un tiempo controlado y posteriormente, para obtener la señal analítica, rediseuelto electroquímicamente (23).

Para eliminar interferencias de matriz se han propuesto diferentes procedimientos de mineralización, principalmente por vía húmeda, en sistemas cerrados y con ayuda de la radiación en la región de microondas (24). Varios autores utilizaron un procedimiento de reducción y destilación en línea: en primer lugar se llevó a cabo la reducción de $\text{As(V)} \rightarrow \text{As(III)}$ y luego, en presencia del ácido clorhídrico, se forma AsCl_3 volátil, el cual puede ser destilado y posteriormente cuantificado por voltimetría de redisolución catódica. Otra alternativa es la formación de compuestos intermetálicos en la superficie del electrodo de gota de mercurio colgante (Cu_3As , As_2Se_3 , etc.) (25).

En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos de los métodos electroanalíticos más sensibles para la determinación del arsénico.

En resumen podemos decir, que las técnicas electroanalíticas no son apropiadas para controlar el nivel del As en muestras ambientales, debido a laboriosos procedimientos y limitada sensibilidad (sin emplear las técnicas de stripping). Estas técnicas electroanalíticas tienen sin embargo muchas aplicaciones en el análisis de efluentes industriales, donde hay concentraciones más altas del arsénico.

Tabla 1

Resumen de los métodos electroanalíticos más sensibles para determinación de Arsénico total.

Técnica	Medio	Mecanismo de reacción	LD, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	DER, %	Ref.
DPP	HCl	$\text{As}^{3+} + 3\text{e} \rightarrow \text{As}^0$	0.3	6.4	26
DPASV (Au)	HCl HClO ₄	Deposición $\text{As}^{3+} + 3\text{e} \rightarrow \text{As}^0$ Stripping $\text{As}^0 \rightarrow \text{As}^{3+} + 3\text{e}$	0.02 (20 min.)	10.0	27
DPCSV	Cu ²⁺ HCl	Stripping $\text{Cu}_3\text{As} + 3\text{H}^+ + 3\text{e} + 3\text{Hg} \rightarrow \text{AsH}_3 + 3\text{Cu}(\text{Hg})$	0.2 (1 min.)	2.9	28
DPCSV	Cu ²⁺ HCl	Deposición $2\text{As}^{3+} + 3\text{Cu}(\text{Hg}) + 6\text{e} \rightarrow \text{Cu}_3\text{As}_2 + 3\text{Hg}$ Stripping $\text{Cu}_3\text{As}_2 + 12\text{H}^+ + 12\text{e} + 3\text{Hg} \rightarrow 2\text{AsH}_3 + 3\text{Cu}(\text{Hg}) + 3\text{H}_2$	1 (2 min.)	6.4	29
DPCSV	Se ⁴⁺ H ₂ SO ₄	Deposición $2\text{As}^{3+} + 3\text{Se}(\text{Hg}) + 6\text{e} \rightarrow \text{Se}_3\text{As}_2 + 3\text{Hg}$ Stripping $\text{Se}_3\text{As}_2 + 12\text{H}^+ + 12\text{e} \rightarrow 2\text{AsH}_3 + 3\text{H}_2\text{Se}$	2 (1.5 min.)	8.3	30
SWCSV	Cu ²⁺ HCl	Deposición $\text{As}^0 + 3\text{CuCl}_3^{2-} + 3\text{e} \rightarrow \text{Cu}_3\text{As} + 9\text{Cl}^-$ Stripping $\text{Cu}_3\text{As} + 3\text{H}^+ + 3\text{e} + \text{Hg} \rightarrow \text{AsH}_3 + \text{Cu}(\text{Hg})$	0.2 (1 min) 0.005 (10 min.)	8.0	31

- DPP – polarografía diferencial de pulsos
 DPASV – voltimetría diferencial de pulsos con redisolución anódica
 DPCSV – voltimetría diferencial de pulsos con redisolución catódica
 SWCSV – voltimetría de onda cuadrada con redisolución catódica
 LD - Límite de Detección
 DER - Desviación Estándar Relativa

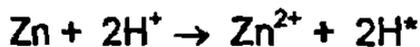
Por otro lado, debido a las diferencias en electroactividad de especies de arsénico, las técnicas electroanalíticas son muy apropiadas para los estudios de especiación del As(V)/As(III).

1.4.2. Determinación de arsénico por métodos espectrales.

Las técnicas de espectrometría atómica son una excelente herramienta analítica para la determinación de los elementos traza en muestras medio ambientales. Sin embargo, debido a la alta volatilidad del arsénico y a que su más sensible línea espectral está en la región de UV (193.7 nm), existe una serie de problemas tanto instrumentales como experimentales que limitan la sensibilidad de la determinación en el procedimiento convencional de introducción de la muestra (en forma de una solución) (32). En cuanto a técnicas de espectrometría de absorción atómica, se requiere el uso de lámparas de descarga sin electrodos como fuente de energía. Además, para eliminar posibles interferencias de matriz, es necesario contar con el sistema Zeeman, ya que la corrección del fondo con lámpara de deuterio no funciona eficazmente en la región por debajo de 200 nm (33, 34). En la atomización en horno de grafito se estudió el efecto de diferentes superficies de atomización (35) y diferentes modificadores de matriz como sales de paladio, lantano, magnesio, plata o Circonio, pero no se logró el límite de detección mejor que $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (35, 36).

La gran mayoría de los métodos espectrales para determinación de arsénico se basa en la formación de arsina AsH_3 ($\Delta H_f^0 = 15.9 \text{ kcal/mol}$, $T_m = -116.9^\circ\text{C}$, $T_b = -62.5^\circ\text{C}$). La generación de arsina de una disolución de arsénico puede llevarse a cabo utilizando diferentes agentes reductores (37). En los primeros trabajos, la generación se llevó a cabo utilizando zinc y ácido clorhídrico,

adicionando estos en una solución de arsénico tal como se muestra en las reacciones siguientes:



Actualmente el reactivo más utilizado para generar los hidruros es el borohidruro de sodio (NaBH_4) en presencia de ácido clorhídrico, donde la reducción se efectúa de acuerdo a la reacción:



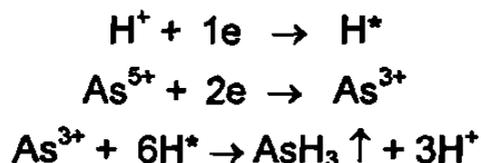
Entre las ventajas que presenta NaBH_4 con respecto a zinc hay que mencionar: un buen rendimiento de formación de hidruro y una buena cinética de reacción. Por otro lado existen algunas desventajas de este sistema: el borohidruro de sodio es una fuente potencial de contaminación, el reactivo es caro, de forma inestable en solución (es necesario usar soluciones recién preparadas) y un producto lateral de la reacción es el exceso de hidrógeno. Para asegurar el pH ácido en la reacción, más frecuentemente se utiliza el ácido clorhídrico, pero dependiendo de la matriz química y del diseño de sistema de generación de hidruros, se pueden emplear otros ácidos inorgánicos (H_2SO_4 y HNO_3) y orgánicos (acético, cítrico, etc.) (38). La reacción de generación de arsina con diferentes agentes reductores es selectiva para un estado de oxidación de arsénico (As(III)), ya que la cinética de generación desde la solución de As(V) es mucho más lenta. Esto proporciona una ventaja, cuando se pretenden realizar los estudios de especiación. Sin embargo, para el análisis total, es necesario llevar a

cabo una etapa de pre-reducción del analito para obtener una forma de oxidación, propia para la reacción de generación. Para ello, en trabajos más recientes se emplean como agentes reductores ya sea yoduro de potasio sin o en presencia de ácido ascórbico (38), yoduro de potasio con adición de zinc y cloruro de estaño (II) (39) o L-cisteína (40,41,42). La generación de arsina con el borohidruro de sodio depende fuertemente del pH y, en condiciones dadas, la selectividad de la reacción está relacionada con los valores de constantes de disociación de ácidos de As(III) y As(V). Así que, se pueden seleccionar las condiciones adecuadas para generar arsina selectivamente de As(III) o no-selectivamente, es decir de arsénico presente en dos estados de oxidación (43).

Recientemente se han publicado varios trabajos, donde el hidruro volátil se genera por vía electroquímica (44,45,46). La reacción electroquímica producida en el ánodo, es la oxidación del oxígeno del agua y formación de iones hidrógeno como se muestra a continuación:



En el cátodo se produce la reducción de H^+ formándose el hidrógeno *in statu nascenti*, así mismo se reduce el As(V) a As(III) y se forma arsina según las siguientes ecuaciones:



Este procedimiento tiene importantes ventajas comparando la generación vía reducción con borohidruro: la cantidad de arsina generada corresponde al contenido total de arsénico en la muestra (no hay necesidad de pre-reducir el As(V)), la reacción no es turbulenta, se evita la contaminación introducida por el borohidruro, no se forma el exceso de H₂ y el procedimiento es fácil de realizar en un sistema de flujo.

La generación de arsina ha sido utilizada con el fin de separar, preconcentrar y cuantificar el arsénico en varios tipos de muestras, utilizando diferentes sistemas de detección como son: espectrofotometría UV/Vis en disolución y en fase gaseosa, espectrometría de absorción y emisión atómica y espectrometría de masas. Cabe mencionar que la generación de hidruros volátiles ha sido utilizada tanto para análisis de arsénico total como para estudios de su especiación.

En cuanto a espectrofotometría UV/Vis en disolución, el esquema general del procedimiento analítico empleado por diferentes autores se presenta a continuación:

1. Tratamiento de muestra: mineralización, lixiviación, digestión enzimática, etc.
2. Generación de hidruro (principalmente por reducción con NaBH₄).
3. Absorción de arsina en una solución que contiene sales de plata.
4. Formación del complejo de arsina con un agente cromogénico.
5. Determinación espectrofotométrica.

En la Tabla 2 se resumen las condiciones experimentales utilizadas por diferentes autores.

Tabla 2

Determinación del arsénico por espectrofotometría UV/Vis en disolución después de generación de hidruros.

Muestra	Especie	Agente cromogénico	LD	Ref.
Suelo	As(III)	DDTC-Ag (520nm)		47
Agua	As(III)	DDTC-Ag (520nm)	0.2µg	48
Agua, Suelo	As(III), As(V), MMAs, DMAs	DDTC-Ag (410, 520nm)	1µg/g	49
Agua, suelo, sedimento	As(III)	AgNO ₃ /HNO ₃ /alcohol polivinílico/ etanol (400nm)	Aguas: 1µg/L, Suelos: 50ng/g	50, 51, 52
Suelo, material biológico	As(III)	Azul de heteropolimolibdeno. (720, 840nm)		53
Sedimento	As(III)	Dibromoclorofenilazo deriv. de clorofosfonazo I (400nm)	0.04µg/L	54

En una serie de trabajos, la arsina fue preconcentrada por atrapamiento en un tubo U sumergido en nitrógeno líquido y, después del calentamiento (80-85°C), introducida a una celda del espectrofotómetro para registrar los espectros de absorción en fase gaseosa (53, 55, 56). Realizando lentamente el calentamiento de la trampa criogénica se ha logrado obtener la separación de hidruros de MMAs y DMAs, los cuales fueron determinados de manera secuencial a una longitud de onda de 194 nm con los límites de detección respectivamente $2.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (55). Utilizando los espectros

obtenidos en fase gaseosa (190-250 nm) y los métodos de calibración multivariante fue posible determinar simultáneamente As, Sb y Se en mezclas, obteniéndose el límite de detección para el arsénico de $22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (53).

En cuanto a la espectrometría de absorción atómica, después de la generación de arsina, el arsénico fue determinado utilizando diferentes atomizadores: llama (57), tubo de cuarzo (44, 57) o tubo de grafito (58). La arsina fue también introducida a plasma ICP (59) o MIP (60) con detección por emisión atómica o por espectrometría de masas. La etapa de detección fue acoplada a generación de hidruros en sistema tipo batch y varios sistemas de flujo (61). En muchos trabajos se realizó también una etapa de preconcentración/separación de especies utilizando cartuchos, columnas cromatográficas, trampa criogénica o extracción líquido-líquido. En la Tabla 3 se recogen procedimientos de separación/preconcentración utilizados por diferentes autores.

La revisión bibliográfica realizada muestra sin lugar a duda, que los procedimientos analíticos basados en generación de hidruros y diferentes técnicas espectrométricas son más adecuados para el análisis de diferentes formas del arsénico en materiales ambientales. La técnica de generación de arsina sin embargo presenta una serie de ventajas. En primer lugar, se obtiene la separación del analito de la matriz y se pueden utilizar grandes volúmenes de la muestra llegándose a altos factores de preconcentración. En consecuencia los límites de detección son generalmente muy bajos. Cabe mencionar que la generación de arsina permite distinguir entre los diferentes estados de oxidación del arsénico.

Tabla 3

Resumen de procedimientos de separación/preconcentración de especies del arsénico para su posterior determinación utilizando generación de hidruros (GH) y técnicas de espectrometría atómica.

Muestra	Procedimiento	Especie	LD, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Ref.
Agua	Preconcentración en cartucho (QMA) – separación por CLAR (col. aniónica PRP-X100) – GH - AAS	As(V) MMAs DMAs	0.6 0.3 0.2	62
Material Biológico	Digestión enzimática. – CLAR (col. Aniónica BAX-10) – mineralización. MW – GH – AAS	As (total) MMAs DMAs Arsenobet.	0.5-5.9	63
Agua de Grifo	CLAR (Dowex 1-X8), CLAR (Dowex 50-X8) – GH – AAS	As(III) As(V) MMAs	0.17 0.31 0.15	64
Agua	CLAR (col. quelante BioBeads SM-7) – GH – AAS	As(III) As(V)	0.02 0.30	65
Agua	CLAR (C18, pares iónicos DMDOAB) – GH – AFS	As(III) MMAs DMAs As(V)		66
Orina	CLAR (C18, ODS(3), T = 70°C) – GH – AFS	11 especies		67
Agua	GH (cisteína)– trampa criogénica – separación por calentamiento - AAS	As(III) As(V) MMAs DMAs	0.050 (1mL)	68
Suelo	Lixiviación (HCl) – Extrac. a CHCl_3 , Lixiviación – reduc. (KI) – Extrac. – GH – AAS	As(III) As total		69
Agua	Extrac. DDTC-Na CCl_4 – re-extr. NaOH – GH – trampa criogénica – CG – AAS	As(III) MMAs DMAs	0.015 0.017 0.013	70

Todavía mas ventajas se observan cuando el procedimiento analítico consiste en acoplar la etapa de generación de arsina con diferentes técnicas de espectrometría atómica:

1. Buena sensibilidad (tanto para el arsénico total como para sus especies, límites de detección más bajos que $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).
2. Mineralización de la muestra no necesaria.
3. Eliminación de la mayoría de interferencias de matriz (separación del analito de la matriz vía formación de hidruro).
4. Poder de determinar diferentes especies del arsénico en una corrida.
5. Posibilidades de trabajar en un sistema de flujo.
6. Fácil automatización.

Sin embargo, la necesidad de disponer de un equipo sofisticado, alto costo, y la falta de la normatividad en cuanto a diferentes especies del arsénico en medio ambiente limitan todavía el uso de estos procedimientos en los laboratorios de rutina.

1.5. Método espectrofotométrico oficial de determinación de arsénico con dietil ditiocarbamato.

Para la determinación de arsénico en aguas naturales, residuales, estuarinas y costeras, la Norma Oficial Mexicana (NOM-AA-46-1981) establece el método espectrofotométrico con dietil ditiocarbamato de plata. Este método se basa en la formación de arsina y su posterior absorción en una disolución de dietil ditiocarbamato de plata, formándose el complejo de color rojo, soluble en agua. El valor de absorbancia obtenido en esta solución ($\lambda = 523$ nm) es proporcional al contenido de arsénico en la muestra. Con el fin de convertir todo el arsénico presente en la muestra a arsénico

trivalente, se adiciona a la muestra yoduro de potasio junto con cloruro de estaño (II). La generación de arsina se lleva a cabo utilizando el zinc metálico en presencia de ácido clorhídrico. La solución absorbadora contiene dietil ditiocarbamato de plata en piridina (4 mL). El volumen de muestra recomendado es de 35 mL, la solución de complejo de arsénico con dietil ditiocarbamato de plata cumple la ley de Beer hasta $300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de arsénico y el límite de detección es de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. En cuanto a posibles interferencias, se mencionan muy pocas, generalmente provocadas por trazas de antimonio. En las condiciones utilizadas para generar AsH_3 se forma también estibina, que acompaña a la arsina hasta la solución absorbadora y forma el complejo rojo con dietil ditiocarbamato de plata. El cromo, cobalto, cobre, mercurio, molibdeno, níquel, platino y plata pueden interferir en la generación de arsina cuando la concentración de alguno de ellos en la muestra sea mayor que $10 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Desde el punto de vista analítico, el método oficial presenta una serie de ventajas como son la alta selectividad y simplicidad del procedimiento. Sin embargo existen también los siguientes problemas:

- El poder de detección no es suficientemente bueno para poder cuantificar el arsénico en agua potable ($\text{LD } 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, el nivel máximo permisible según la Norma Oficial Mexicana $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).
- La generación de arsina presenta una cinética lenta (tiempo de reacción aproximadamente 30 min.).
- Se utilizan cantidades bastante grandes de reactivos (5 mL del ácido clorhídrico concentrado, 3g de zinc, 4 mL de piridina).

1.6. Empleo del método de estándar interno (EI) en espectrofotometría.

En las técnicas analíticas que tienen carácter multicomponente (cromatografía, espectrometrías de emisión y espectrometría de masas) comunmente se utiliza el método de estándar interno. En este método, antes de llevar a cabo el procedimiento analítico, se adiciona a la muestra un compuesto de propiedades fisicoquímicas semejantes a las del analito (estándar interno EI). Durante el procedimiento analítico, el analito y el EI se comportan de manera semejante (rendimiento de extracción, formación de pares iónicos, etc.), entonces cualquier error analítico va a afectar igualmente el contenido de analito y de EI en la muestra. Si la señal analítica se define como relación entre las señales del analito y de estándar interno, esta señal va a ser independiente de los errores analíticos cometidos y va a ser proporcional al contenido del analito en la muestra.

Debido a la forma de bandas de absorción molecular en la región espectral UV/Vis (bandas anchas con alta probabilidad de solapamiento entre las señales de diferentes componentes), generalmente la espectrofotometría UV/Vis tiene carácter unicomponente. Sin embargo, el procedimiento de derivación de los espectros permite obtener mejor resolución de las señales específicas para cada uno de los compuestos que presentan bandas solapadas de absorción, lo que hace posible el análisis de dos o más componentes en una corrida de muestra, o bien permite utilizar el método de EI.

Una importante limitación de los procedimientos espectrofotométricos es la relativa baja sensibilidad, lo que obliga que se lleve a cabo la etapa de preconcentración/separación del analito en caso de su determinación a nivel de trazas. Por otra parte, si las concentraciones del analito en la muestra son elevadas, es necesaria la dilución. En ambos casos, los procedimientos empleados forman importantes fuentes de posibles errores analíticos.

En base a estos dos hechos que se acaban de mencionar, se ha propuesto el empleo del método de estándar interno en espectrofotometría UV/Vis. (71, 72). Considerando los requisitos que tiene que cumplir un estándar interno (EI) en varias técnicas analíticas (73), se han definido los siguientes parámetros para el estándar interno en espectrofotometría UV/Vis:

- Propiedades fisicoquímicas de analito y de EI semejantes (polaridad, formación de complejos, etc.).
- No hay interacciones entre el analito y EI.
- Baja absorptividad del analito en la región de alta absorptividad de EI.
- Alta absorptividad de analito en la región de baja absorptividad de EI.
- EI no es el componente natural de la muestra.

Siguiendo estos criterios se ha demostrado que, utilizando el método de estándar interno y espectros derivados, los errores debido a dilución de la muestra (71) y errores cometidos en la etapa de preconcentración (72) pueden ser reducidos o eliminados. En caso de determinar el Cr(VI) en aguas naturales, la preconcentración del

analito se llevó a cabo vía extracción seguida por evaporación del disolvente (72) (factor de preconcentración aproximadamente 400), mientras que el análisis de fármacos (azinfos) en formulaciones requiere una dilución de aproximadamente 10^3 veces. En ambos casos se obtuvieron mejores parámetros analíticos (límite de detección, coeficiente de correlación lineal y precisión) con respecto a los mismos procedimientos pero sin utilizar el método de EI. En los trabajos más recientes se aplicó el método de EI en la determinación de miconazol en cremas farmacéuticas (74) y en la determinación de cobre con batocuproína sulfonada en suero y en aguas naturales (75). Se demostró, que en presencia de una matriz química bastante compleja como es el suero humano o la crema farmacéutica, el método de EI también permite mejorar las características analíticas obtenidas en los procedimientos espectrofotométricos.

La más importante ventaja del método de EI es que, el uso de procedimientos analíticos menos rigurosos permite obtener excelentes parámetros analíticos (reducción de errores cometidos en cada una de las etapas definiendo la señal analítica $S = S_{\text{analito}} / S_{\text{EI}}$). Esto a su vez permite simplificar los procedimientos y trabajar con microvolúmenes (en la determinación de cobre en suero se requiere solo 300 μL de muestra, en el análisis de azinfos el factor de dilución de aproximadamente 10^3 se obtuvo utilizando solo 10 mL de metanol).

Resumiendo, el método de EI permite llevar los procedimientos espectrofotométricos a micro escala, obtener muy buenas características analíticas, ahorrar reactivos y acortar el tiempo de análisis.

Por último, cabe comentar que los compuestos seleccionados como EI en los trabajos mencionados anteriormente fueron diferentes

colorantes azules. En el caso de la determinación de cobre, la resolución espectral de bandas de absorción del complejo del analito y del EI (azul de bromofenol) fue suficientemente buena para leer las señales del analito y del EI directamente de los espectros de orden cero sin necesidad de derivar dichos espectros, lo que forma una ventaja adicional del procedimiento desarrollado y permite utilizar este procedimiento en los laboratorios de rutina.

1.7. Fiabilidad de los resultados analíticos: características analíticas y validación de un método.

Uno de los temas más importantes en química analítica actual es lograr fiabilidad de los resultados, es decir, asegurar buena calidad de los resultados. El reto es obtener resultados exactos (correspondientes a los valores reales del analito en la muestra) y precisos (más baja desviación estándar de los resultados sobre el valor medio). Así que, una importante etapa en el desarrollo de un nuevo método analítico es su validación, refiriéndose a una serie de procedimientos para asegurar que las características de funcionamiento del método comprendan y demuestren que el método es científicamente completo bajo condiciones en las cuales ha sido aplicado. Para ello, se evalúan una serie de parámetros analíticos que permiten conocer el alcance del procedimiento desarrollado en cuanto a su poder de detección, intervalo útil de trabajo, precisión, selectividad, etc. Asimismo es necesario llevar a cabo los experimentos para evaluar la exactitud de los resultados analíticos. Los parámetros que se acaban de mencionar son necesarios en el control de calidad de los resultados analíticos. Cabe mencionar que este control puede llevarse a cabo en el mismo laboratorio (control interno) o mediante participación del laboratorio en diferentes esquemas de control externo.

1.7.1. Características analíticas.

Las características analíticas de un método vienen definidas en las recomendaciones de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) en una serie de parámetros. En espectrofotometría UV/Vis, como en la mayoría de las técnicas analíticas, la cuantificación del analito requiere de un proceso de calibración. Para ello, se preparan una serie de disoluciones, que contienen crecientes concentraciones conocidas del analito (cuando menos 5 disoluciones a partir de una misma solución madre) y se realizan lecturas cuando menos por duplicado para cada una de las disoluciones. De los resultados obtenidos se construye una función de calibración (absorbancia vs concentración), cuya pendiente caracteriza la sensibilidad del método. La sensibilidad se define también como la más pequeña diferencia en concentración del analito que puede ser distinguida estadísticamente por la respuesta del instrumento.

La función de calibración cubre un intervalo de concentraciones del analito, el cual tradicionalmente es llamado intervalo de linealidad del método analítico. En otras palabras, la linealidad de un sistema o método analítico es su capacidad para asegurar los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida (función de calibración), son proporcionales a la concentración de la sustancia analizada dentro de un intervalo determinado.

Un parámetro importante es el Límite de Detección (LD), definido como la más baja concentración del analito cuya señal analítica puede ser distinguida de la señal del blanco de manera

estadísticamente significativa. Según las recomendaciones de la IUPAC el LD se calcula como:

$$LD = 3\sigma/s$$

en donde σ es la desviación estándar obtenida en 10 lecturas del blanco y s es la sensibilidad del método (dada por la pendiente de función de calibración). Aunque la concentración correspondiente al LD no puede ser determinada por el método, es un parámetro útil para caracterizar y/o comparar el poder de detección de diferentes métodos.

El Límite de Cuantificación (LC) se define como la mínima concentración del analito en la muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo condiciones experimentales establecidas y se puede evaluar como:

$$LC = 10\sigma/s$$

Otro de los parámetros dentro de las características analíticas de un método es la precisión. Por lo general, en química analítica la precisión (o mejor dicho imprecisión) es una medida del grado de discrepancia entre los resultados de análisis múltiples de una muestra dada. La imprecisión se expresa como desviación estándar relativa de los resultados individuales alrededor del valor promedio para 5-7 lecturas del analito en una solución. La precisión debe ser evaluada en los dos niveles de concentración del analito: uno, bajo, correspondiente aproximadamente al límite de cuantificación y otro, alto, correspondiente a la región media del intervalo de linealidad. Es importante evaluar la precisión a corto plazo (tomando las lecturas consecutivas), o a largo plazo realizando las lecturas por ejemplo en

diferentes días. Así que, la repetibilidad es la precisión de un método analítico expresada como desviación estándar relativa para los valores individuales alrededor del valor promedio, cuando las lecturas individuales se realizan bajo las mismas condiciones que afectan al equipo, laboratorio y analista. Por otra parte, la reproducibilidad es la precisión de un método analítico cuando las lecturas individuales se obtienen en diferentes condiciones que afectan el equipo, laboratorio o analista.

Selectividad de un método se refiere a la extensión a la cual éste puede determinar un analito(s) particular en una matriz química sin interferencias por los otros componentes de la matriz. Un método el cual es perfectamente selectivo por un analito o grupo de analitos se dice que es específico.

Dentro de las características analíticas, es importante evaluar la exactitud del método para asegurar si el resultado analítico corresponde al valor verdadero del analito en la muestra.

1.7.2. Validación del método: exactitud de los resultados analíticos

En el caso ideal, para evaluar la exactitud de los resultados, hay que analizar una muestra real que contenga una cantidad conocida del analito. Este tipo de muestras, que tienen la composición química semejante a la composición de muestras reales a analizar son llamados Materiales de Referencia y Materiales de Referencia Certificados (estos tienen certificado el valor del contenido del analito). La diferencia entre los valores certificados y los valores determinados por el laboratorio indica un error o errores en el procedimiento aplicado (bias de laboratorio).

En caso de no disponer de un material de referencia adecuado, la exactitud de los resultados puede ser controlada utilizando uno o más que uno de los siguientes procedimientos:

- 1) Experimentos de recuperación (concordancia entre la cantidad del analito adicionada a la muestra y la cantidad determinada por el método propuesto $\pm 10\%$).
- 2) Concordancia entre los resultados obtenidos utilizando diferentes procedimientos analíticos ($\pm 10\%$).
- 3) Concordancia entre los resultados obtenidos por calibración externa y el método de adición de estándar ($\pm 10\%$).

CAPITULO 2

OBJETIVO

2.1 Objetivo General

El objetivo principal de este trabajo es desarrollar un procedimiento espectrofotométrico para la determinación de arsénico a nivel de trazas, basándose en el fundamento del método oficial NOM-AA-46-1981. Las modificaciones al método oficial tienen como fin mejorar la cinética de generación de arsina y los parámetros analíticos. De esta manera se espera superar algunas limitaciones del método oficial en su aplicación al análisis de aguas naturales.

2.2 Objetivos Específicos

Los objetivos específicos a lograr durante el desarrollo de este trabajo se definen a continuación:

2.2.1 Propuesta del esquema general del procedimiento a desarrollar basándose en la NOM-AA-46-1981.

- **Modificación del sistema de generación de arsina.**
- **Diseño de etapa de preconcentración.**
- **Empleo de un estándar interno.**

2.2.2 Implementar un nuevo procedimiento según el esquema propuesto.

- **Estudios en la etapa de generación de hidruro.**
- **Selección de un estándar interno adecuado**
- **Implementar las condiciones en la etapa de preconcentración.**

2.2.3 Validación del procedimiento propuesto.

- Evaluación de los parámetros analíticos.
- Estudios de posibles interferencias.
- Análisis de arsénico en un Material de Referencia Certificado.
- Comparación de los resultados obtenidos en muestras reales utilizando el procedimiento propuesto y espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.

2.2.4 Aplicación del procedimiento desarrollado en la determinación de arsénico en aguas naturales.

CAPITULO 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Aparatos y equipo.

1. Espectrofotómetro con arreglo de diodos Milton Roy 3000 con un paquete de software versión 2.01.
2. Espectrómetro de absorción atómica modelo Perkin-Elmer 3110 con horno de grafito HGA-600 y automuestreador AS-60, controlado por el paquete de software WinLab de Perkin-Elmer.
3. Purificador de agua, Labconco Water ProPS (calidad de agua MilliQ).
4. Microcelda de cuarzo Sigma de 50 μL .
5. Vortex Genie 2.
6. Microcentrífuga, Denver Instrument.
7. Bomba peristáltica de ocho canales, Cole-Palmer Instrument Co
8. Material de vidrio: tubos de ensayo, matraces de Erlenmayer á 125 mL, matraces volumétricos de 100, 50, 25 y 10 mL.
9. Material de plástico: copas para automuestreador, tubos Falcón de 50 mL, tubos Eppendorff de 1.5mL, puntas para micropipetas, tubos de Nafion, jeringas de 5mL, etc.
10. Sistema de flujo de aire frío.
11. Micropipetas Eppendorff de 0.5-10 μL , 20-200 μL y 200-1000 μL .

3.2. Reactivos y disoluciones.

Dimetilformamida, (J.T. Baker)

Dietanolamina, (SIGMA)

Cloruro de metileno grado HPLC, (Fisher Scientific).

Cloroformo, (Baker Analyzed)

Tetracloruro de carbono, (Baker Analyzed)

Zinc, 20 mallas, libre de arsénico, (SIGMA)

Borohidruro de sodio al 2%, en NaOH al 0.1%, (SIGMA)

Dietilditiocarbamato de plata $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, (SIGMA), en cloroformo

Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), al 0.02% (SIGMA)
en cloroformo.

Para la preparación de las siguientes soluciones se utilizó agua Milli Q.

Erioglaucina A al 0.1% (Baker)

Yoduro de Potasio al 15 % (SIGMA)

Cloruro de estaño ($\text{SnCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, libre de As), al 40% (SIGMA)

Acido Clorhídrico 9M (J.T. Baker)

Solución estándar de arsénico (III) de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (SIGMA).

La solución de trabajo ($2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) se preparó diariamente a partir de la solución anterior.

Acetato de plomo al 10% (J.T. Baker)

Acido cítrico $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (SIGMA)

Citrato de sodio sal trisódica, $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (SIGMA)

Acido tioglicólico (Sigma) $0.067 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, (SIGMA)

Solución estándar de As (V) de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (SIGMA)

L- Cisteína al 6%, (SIGMA)

Material de referencia (SRM 1643d - elementos traza en aguas naturales) del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, E.U. de A.

3.3 METODOLOGIA Y RESULTADOS

La idea original del presente trabajo es modificar el método oficial NOM-AA-46-1981 (esquema presentado en la Fig. 1) con el fin de mejorar sus características analíticas. Para ello se propone incluir en el procedimiento analítico una etapa de preconcentración vía evaporación del disolvente de la solución absorbedora hasta sequedad y redisolución del complejo de arsénico con dietil ditiocarbamato en un micro volumen. Para eliminar los errores analíticos cometidos en esta etapa se propone utilizar el método de estándar interno. Se modifica también el sistema de generación de arsina con el fin de mejorar la cinética de la reacción. La ruta crítica del procedimiento a desarrollar se presenta en la Figura 2.

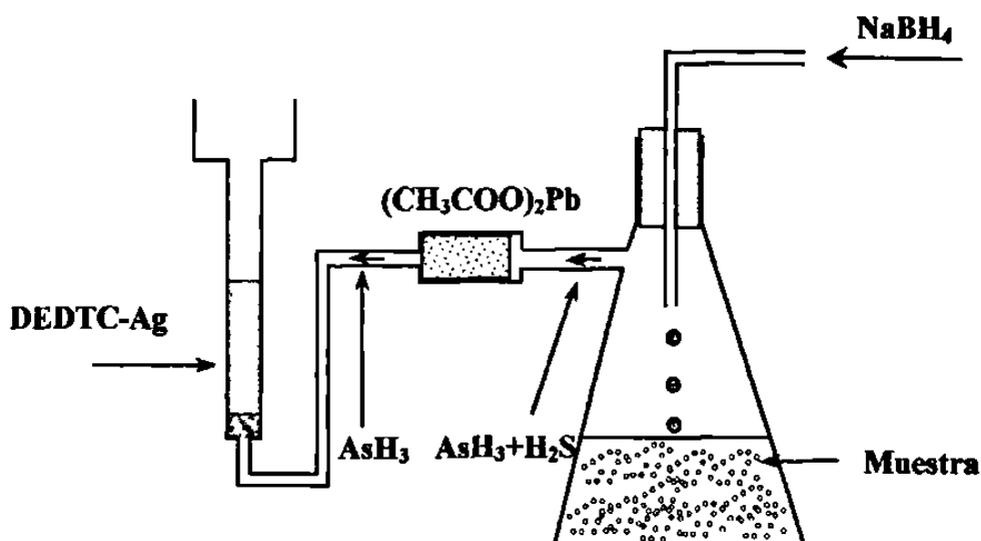


Fig. 1. Esquema del método oficial NOM-AA-46-1981.

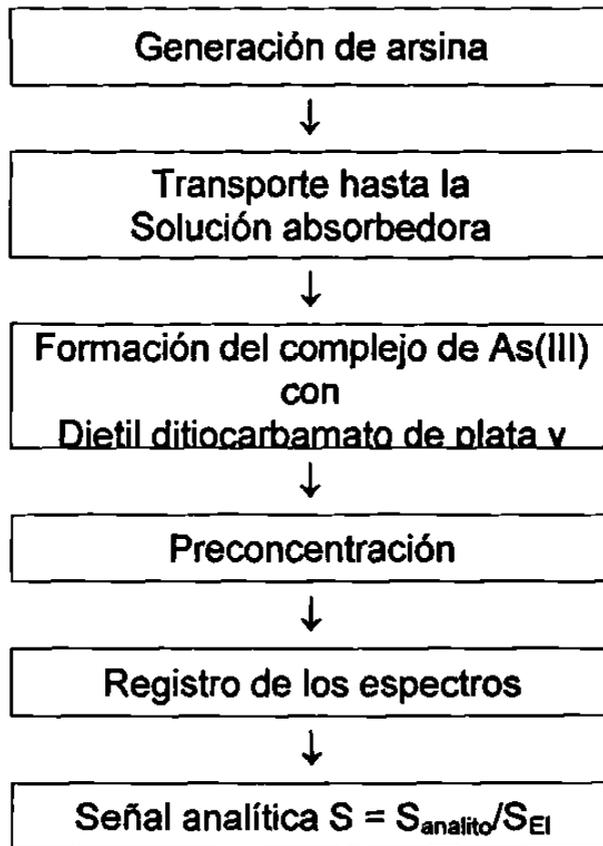


Fig. 2. Ruta Crítica del procedimiento a desarrollar.

En los siguientes capítulos se presentan resultados de los estudios sistemáticos para la selección de las condiciones experimentales en cada una de las etapas.

3.3.1. Generación de arsina

En el método oficial la arsina se genera utilizando el zinc en un medio de ácido clorhídrico (con adición de SnCl_2 y KI para reducir el As(V) a As(III)). Como ya se ha mencionado, la desventaja de este sistema es que la cinética es muy lenta (30 minutos para generación cuantitativa) y grandes cantidades de zinc.

En los ensayos preliminares, se utilizó el sistema de generación de arsina recomendado por la NOM-AA-46-1981. Además de las limitaciones antes mencionadas, se tuvieron problemas en la etapa de preconcentración (ver la Figura 2). Después de llevar a cabo la evaporación del disolvente de la solución absorbadora y después de la redisolución del residuo en cloruro de metileno, se observó una descomposición de dietil ditiocarbamato de plata (el exceso que se queda después de la reacción con arsénico). Parece probable, que esta descomposición fue causada por trazas de ácido clorhídrico transportadas en fase gaseosa junto con arsina.

Para eliminar estos problemas que se acaban de mencionar, en los estudios posteriores, para la generación de arsina, se utilizó el borohidruro de sodio en medio de tampón de citratos (43) ya que esta reacción presenta buena cinética y asegura alto rendimiento de formación de arsina. El ácido cítrico no es volátil, entonces no se transporta hacia la solución absorbadora, permitiendo evitar el efecto del ácido en la descomposición del exceso de dietil ditiocarbamato de plata en la solución final.

Se estudió el efecto de pH del tampón de citratos en la generación de arsina desde las soluciones de As(V) y de As(III) . Como se puede observar en la Figura 3, la generación selectiva para As(III)

se obtiene en el intervalo de pH entre 4 y 6. Para los fines analíticos se seleccionó el pH de tampón 4.5, ya que en estas condiciones después de la adición de borohidruro de sodio (en una solución de hidróxido de sodio al 0.1 %) se obtuvo un pH final por debajo de 6.

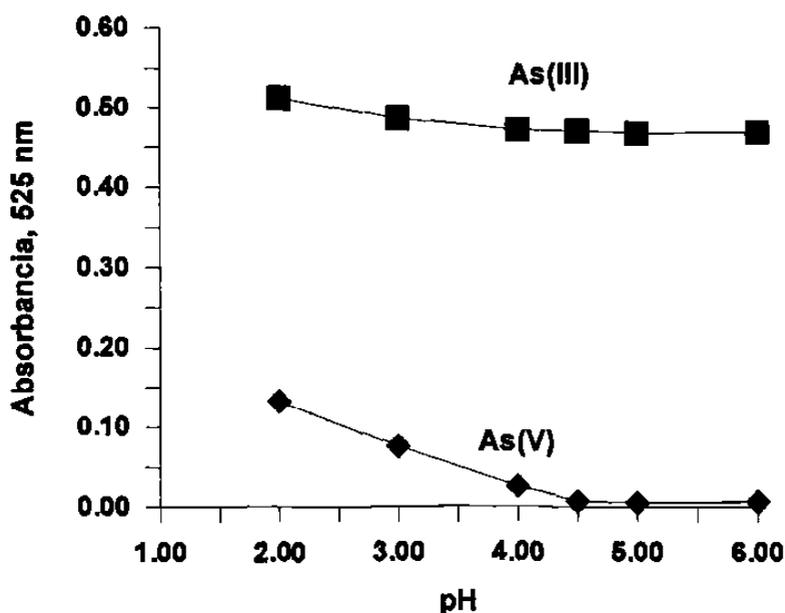


Fig. 3. Efecto del pH (tampón de citratos) en la generación de arsina en soluciones de As(III) y As(V) (4 μg de As).

3.3.2 Transporte de arsina hasta la solución absorbadora

En los primeros experimentos, no se utilizó el flujo adicional de gas de arrastre, es decir el transporte se llevó a cabo con el exceso de hidrógeno formado en la reacción con borohidruro. Se estudió el efecto de volumen de borohidruro de sodio al 2% (en hidróxido de sodio al 0.1%) adicionado a la muestra en la señal analítica de arsénico. De los resultados obtenidos (Figura 4) se seleccionó el volumen de 8 mL. Se

calculó que en estas condiciones el volumen de hidrógeno formado es aproximadamente 2.5 veces más grande que el volumen muerto del sistema utilizado (matraces Kitasato de 125 mL, volumen de muestra 40 mL) lo que asegura el transporte cuantitativo de arsina sin necesidad de utilizar el flujo adicional de gas de arrastre. Sin embargo, en estas condiciones se gastan grandes cantidades del borohidruro, que es un reactivo caro. Por otro lado se observó que, el exceso de hidrógeno provoca reducción de plata formándose plata coloidal en la solución final (turbidez).

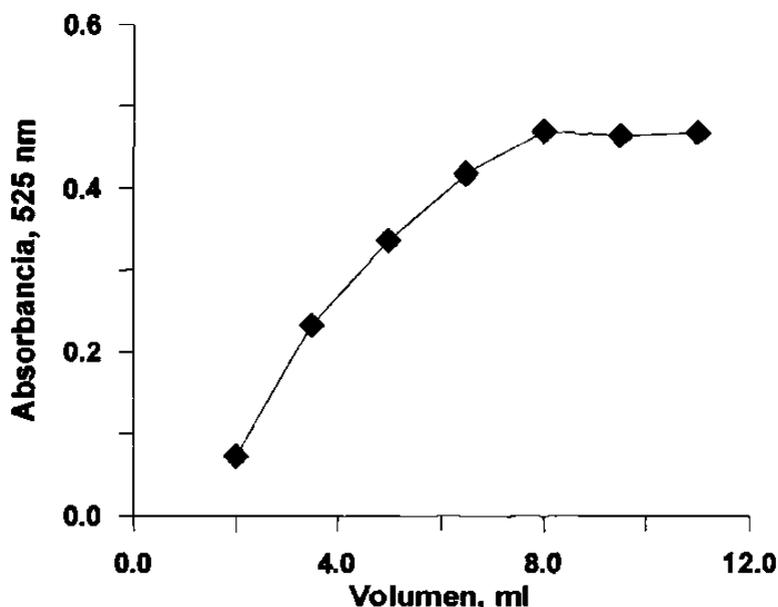


Fig. 4. Efecto de volumen de borohidruro de sodio al 2% (en 0.1% hidróxido de sodio) en la señal analítica de 4 μ g de arsénico.

Con el fin de minimizar la cantidad del borohidruro adicionado, a continuación se llevaron a cabo los experimentos en donde la arsina fue transportada en flujo de nitrógeno. Utilizando el flujo de gas de

arrastre de $50 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ se estudió el efecto de la cantidad de borohidruro adicionado en la señal de $6 \mu\text{g}$ de arsénico. La cantidad del reactivo fue controlada por tiempo de adición de borohidruro al 2.0 y al 1.0% a dos diferentes caudales (0.5 y $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). De los resultados obtenidos (Fig. 5) se seleccionó la concentración al 1% y caudal de $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ con el tiempo de 12 minutos, que corresponde a 0.06g de borohidruro, mucho menos que en los experimentos sin flujo de nitrógeno (0.16g).

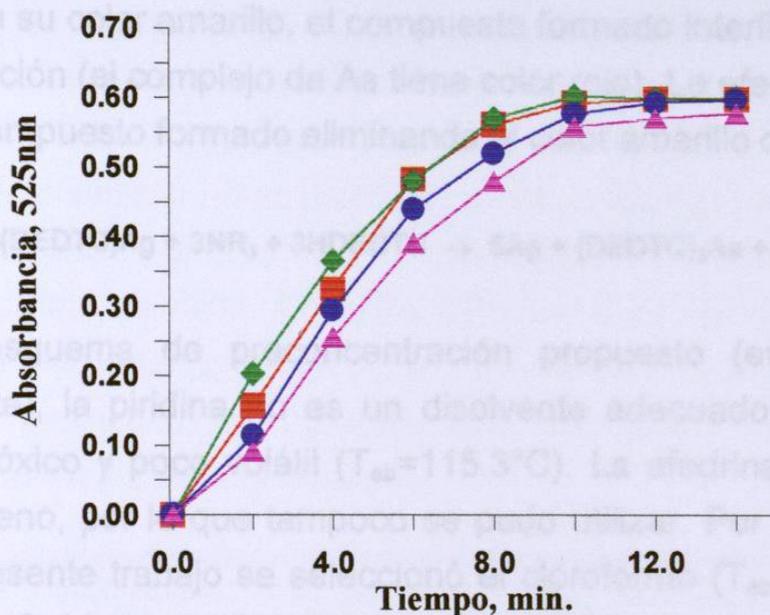


Fig.5. Efecto de la concentración y el caudal de la solución de borohidruro de sodio en la señal analítica de $6 \mu\text{g}$ de arsénico (flujo de N_2 : $50\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$):

- ▲ - NaBH_4 1 %, $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
- - NaBH_4 1 %, $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
- - NaBH_4 2 %, $0.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
- ◆ - NaBH_4 2 %, $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$

3.3.3 Composición de la solución absorbidora.

En el método oficial, la solución absorbidora es una disolución de dietil ditiocarbamato de plata en piridina o en cloroformo con adición de efedrina al 0.2%. Es necesario mencionar que, en presencia de arsina ocurre la descomposición del dietil ditiocarbamato de plata formándose un compuesto amarillo según la reacción (76):



Debido a su color amarillo, el compuesto formado interfiere en la etapa de detección (el complejo de As tiene color rojo). La efedrina reacciona con el compuesto formado eliminando el color amarillo de la solución:



En el esquema de preconcentración propuesto (evaporación del disolvente), la piridina no es un disolvente adecuado ya que es un agente tóxico y poco volátil ($T_{\text{eb}}=115.3^\circ\text{C}$). La efedrina es un agente alucinógeno, por lo que tampoco se pudo utilizar. Por estas razones, en el presente trabajo se seleccionó el cloroformo ($T_{\text{eb}}= 61.2^\circ\text{C}$) y en lugar de efedrina se utilizó dietanolamina (77).

3.3.4 Selección del estándar interno.

De acuerdo con el esquema general del procedimiento propuesto, el Ei se adiciona a la solución absorbidora. Tomando en cuenta los requisitos para Ei en espectrofotometría, el compuesto seleccionado tiene que ser soluble en esta disolución y no puede afectar la estabilidad del complejo de analito. Además su espectro de

absorción en la región UV/Vis debería ser lo menos posible solapado con la banda de absorción del analito. Es necesario mencionar que, el arsénico (III) forma complejos polinucleares con dietil ditiocarbamato (43) por lo que su banda de absorción es muy ancha y en estas condiciones se observa una importante disminución de la precisión utilizando espectros derivados. Así que, se buscó un EI, cuyo espectro de absorción presente una banda de absorción bien resuelta con la banda del complejo de analito y de esta manera las señales del analito y de EI pudiesen obtenerse de los espectros de cero orden.

En la búsqueda de un apropiado EI se tomó en cuenta una serie de colorantes. El complejo de As(III) con dietil ditiocarbamato de plata tiene color rojo ($\lambda_{\text{max}} = 525 \text{ nm}$), así que el EI podría ser un colorante amarillo o un colorante azul. Sin embargo, el color amarillo queda excluido debido a la presencia del exceso de dietil ditiocarbamato de plata. Entre los colorantes azules se han probado los siguientes: azul de toluidina, azul de metileno, azul de metileno B, azul de bromotimol, indigoazul, azul de anilina, azul de timol, erioflaucina A y 2,3-naftalocianina.

Se obtuvieron los espectros de absorción del analito ((DEDTC)₃As) y de los colorantes antes mencionados en el cloroformo. En el caso de colorantes del grupo de los sulfonados (compuestos cargados negativamente), se adicionaba el surfactante catiónico (bromuro de hexadeciltrimetilamonio CTAB o bromuro de benciltributilamonio BTAB) para formar pares iónicos con el colorante y de esta manera solubilizarlo en cloroformo. Obteniéndose mejor resolución de las señales del analito y de colorante para erioflaucina A y para 2,3-naftalocianina (Fig. 6), los que fueron seleccionados para los estudios posteriores.

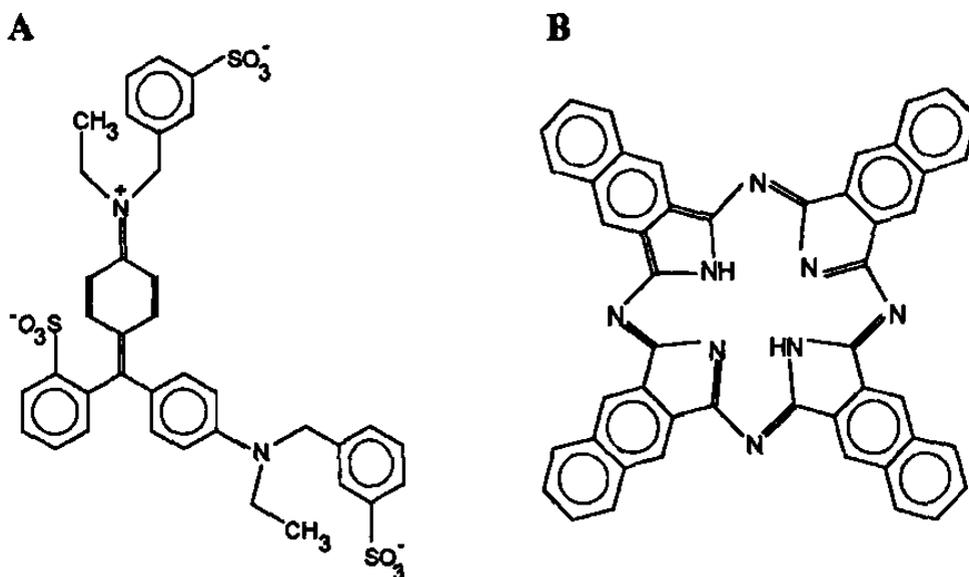


Fig. 6. Estructuras moleculares de dos compuestos considerados como posibles estándares internos: **A** – erioglaucina A y **B** – 2,3-naftalocianina.

En cuanto a la erioglaucina A, es un compuesto que contiene grupos sulfonados en su estructura, entonces está cargado negativamente en la solución acuosa. Para su extracción a fase apolar (cloroformo) se utilizó un surfactante catónico (formación de pares iónicos). Se estudió el efecto de la concentración de CTAB en la extracción del colorante. De los resultados obtenidos (Fig. 7) se seleccionó la concentración de CTAB al 0.02% ya que en estas condiciones se obtuvo un alto rendimiento de extracción.

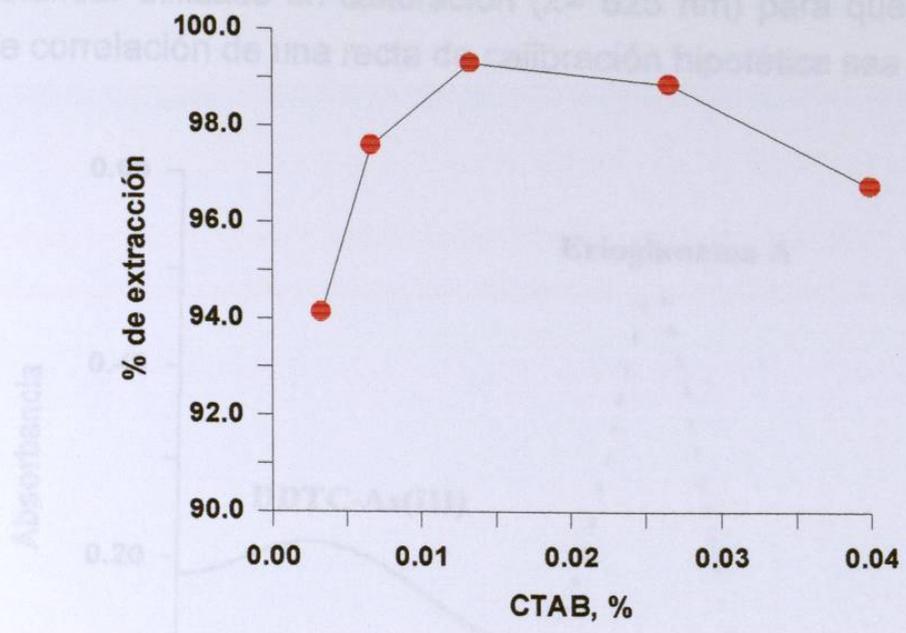


Fig.7. Efecto de concentración de CTAB en la extracción de erioglaucina A ($2.5 \cdot 10^{-3}\%$) a cloroformo.

La erioglaucina A presenta una banda de absorción con el máximo en 623 nm, donde existe una pequeña contribución espectral del complejo de analito (Fig. 8.). Así mismo, a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción del analito (525 nm), existe una pequeña contribución espectral del colorante. En estas condiciones, las señales de absorbancia en 525 nm y en 623 nm no son las señales netas del analito y de EI formando una fuente de error analítico. Sin embargo se calculó que, controlando la relación entre las alturas de las señales del analito (A_{525nm}) y de EI (A_{623nm}) se puede obtener una buena linealidad de la curva de calibrado. Se realizaron cálculos de coeficiente de correlación de la función de calibración suponiendo diferentes alturas de la señal del EI (A_{623nm}) y del analito (A_{525nm}) llegándose a la conclusión que la altura de la señal del EI tiene que ser 2.5 veces más alta que la señal del analito en el más alto

estándar utilizado en calibración ($\lambda = 525 \text{ nm}$) para que el coeficiente de correlación de una recta de calibración hipotética sea 0.9997.

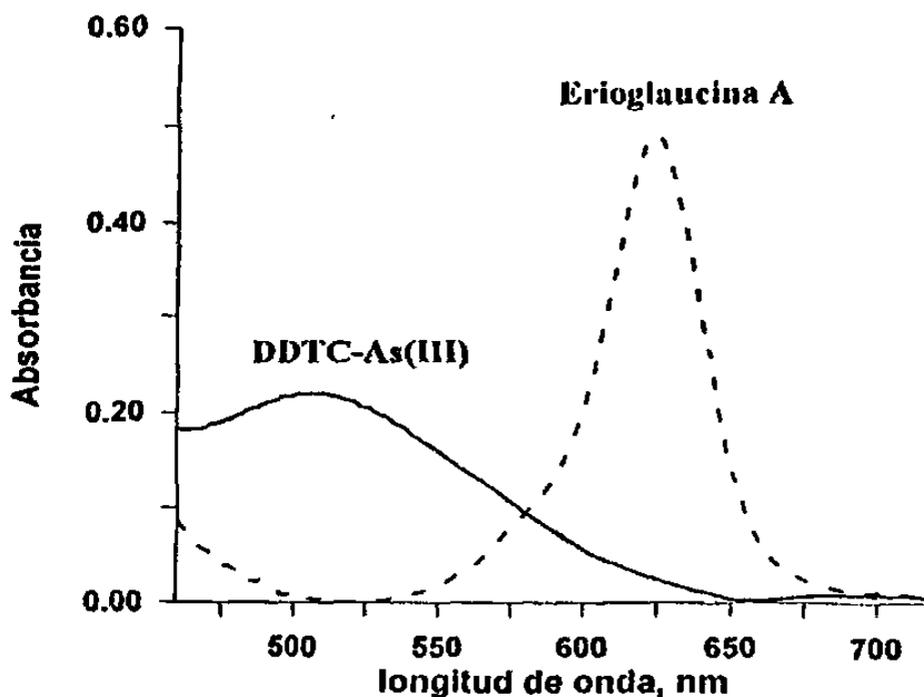


Fig. 8. Espectros de absorción de: (- - -) erioglaucina A y (—) complejo $(\text{DEDTC})_3\text{As}$ en cloroformo.

Otro colorante tomado en cuenta como posible EI fue 2,3-naftalocianina. La ventaja en este caso es que este compuesto no tiene carga eléctrica y fácilmente se extrae a la fase orgánica apolar sin necesidad de adicionar el surfactante. Además, no existe ninguna contribución espectral del analito a longitud de onda correspondiente al máximo del EI (780 nm) (Fig. 9.). En este caso se pueden obtener las señales netas de los dos compuestos de los espectros de cero orden (analito 525 nm, EI 780 nm). Sin embargo, para la concentración de arsénico cero, el valor de la señal analítica va a ser igual a la relación de las absorbancias del EI obtenidas en 525 nm y 780 nm ($S_{\text{As}, 0\mu\text{g/l}} = A_{\text{EI}, 525\text{nm}}/A_{\text{EI}, 780\text{nm}}$).

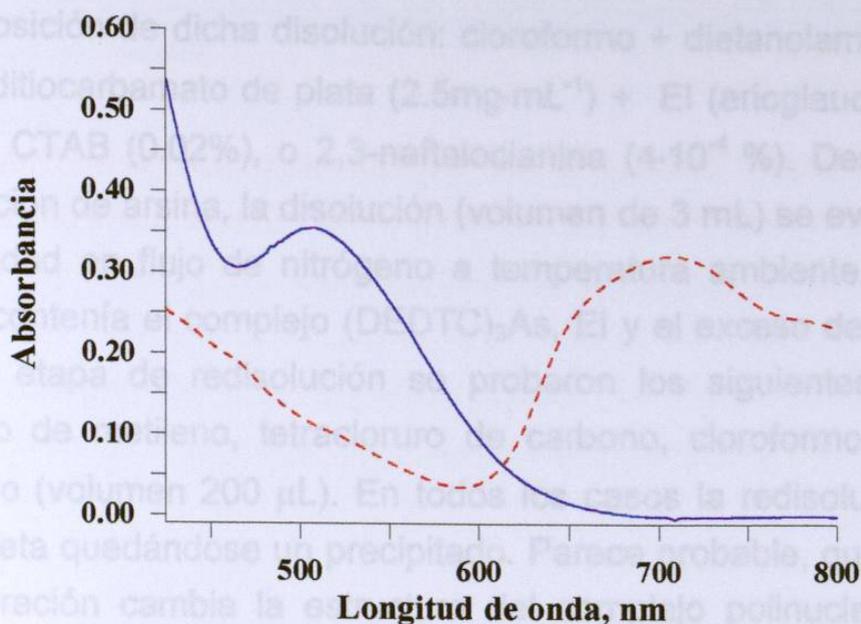


Fig. 9. Espectros de absorción de (—) (DEDTC)₃As, (0.8 μg As) y de (- - -) 2,3 -naftalocianina al 4·10⁻⁴% en cloroformo.

3.3.5. Etapa de preconcentración

3.3.5.1. Evaporación del disolvente

De acuerdo con la ruta crítica presentada en la figura 2, después de la generación de arsina y su absorción en la solución de dietil ditiocarbamato de plata, la preconcentración del analito se lleva vía evaporación de la solución absorbadora seguida por redisolución del residuo en un micro volumen. Para controlar los errores analíticos cometidos en esta etapa (baja precisión en medir pequeños volúmenes, cambios de volumen debido a alta volatilidad del

disolvente, etc.) se adicionó el estándar interno a la solución absorbadora. Los experimentos se realizaron utilizando la siguiente composición de dicha disolución: cloroformo + dietanolamina (20%) + dietil ditiocarbamato de plata ($2.5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) + EI (eriglaucina A ($2\cdot 10^{-4}\%$) + CTAB (0.02%), o 2,3-naftalocianina ($4\cdot 10^{-4}\%$). Después de la absorción de arsina, la disolución (volumen de 3 mL) se evaporó hasta sequedad en flujo de nitrógeno a temperatura ambiente. El residuo seco contenía el complejo $(\text{DEDTC})_3\text{As}$, EI y el exceso de DEDTCAg . En la etapa de redisolución se probaron los siguientes solventes: cloruro de metileno, tetracloruro de carbono, cloroformo, dioxano y tolueno (volumen $200\ \mu\text{L}$). En todos los casos la redisolución no fue completa quedándose un precipitado. Parece probable, que durante la evaporación cambia la estructura del complejo polinuclear de dietil ditiocarbamato con As(III) , la cual no se restablece disolviendo el residuo seco. Por otro lado, el precipitado puede ser formado por productos de descomposición de dietil ditiocarbamato de plata (76). Con el fin de eliminar el precipitado, se disminuyó la concentración de dietil ditiocarbamato de plata en la solución absorbadora. Se seleccionó la concentración de $0.1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (la recomendada en el método oficial es de $2.5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) calculando que esta concentración asegura el exceso de reactivo del orden de 10^6 veces respecto a la concentración del analito. Sin embargo el precipitado no desapareció.

Resumiendo, no se ha logrado encontrar las condiciones adecuadas para llevar a cabo la preconcentración según el esquema propuesto.

3.3.5.2. Separación de las fases inducida por adición de agua.

A continuación, se ha propuesto otro esquema de preconcentración basado en inducción de separación de las fases por adición de agua (78). Se modificó la composición de la solución absorbidora para que, después de la adición de agua, se obtenga un micro volumen de fase orgánica apolar donde se preconcentra el complejo del analito y el EI (el esquema presentado en la Figura 10).

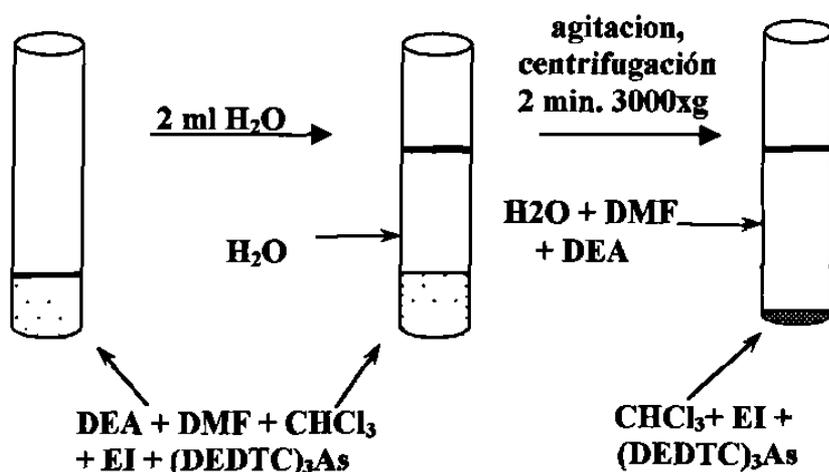


Fig. 10. El esquema de preconcentración basado en inducción de separación de las fases por adición de agua.

Como disolvente apolar se seleccionó el cloroformo y, como modificadores, se probaron dimetilformamida y dimetilsulfóxido, que forman disolución con cloroformo y dietanolamina, pero son solubles en agua (Tabla 4).

Tabla 4

Constantes dieléctricas de disolventes utilizados en la etapa de preconcentración.

Disolvente	Constante dieléctrica
Agua	78.4
Dimetilsulfóxido	46.7
Dimetilformamida	36.7
Cloroformo	4.1

En primer lugar se estudió la disolución absorbadora con dimetilsulfóxido, probando diferentes relaciones de dimetilsulfóxido : cloroformo : dietanolamina. Sin embargo, los espectros de dietil ditiocarbamato de arsénico (III) fueron muy irreproducibles (el color cambiaba de rojo hasta verde). Cabe mencionar que, la estructura polinuclear de este complejo es muy sensible a los cambios de polaridad y probablemente la polaridad del dimetilsulfóxido fue demasiado alta.

Utilizando el disolvente menos polar, la dimetilformamida, los espectros del complejo de As(III) fueron reproducibles. La dimetilformamida, como solvente básico, asegura estabilidad del complejo de arsénico en la solución absorbadora. Se probaron diferentes relaciones de disolventes en la disolución absorbadora (volumen total de 1mL) con el fin de establecer la composición que asegure el volumen final de la fase apolar de aproximadamente 150 μ L (después de adición de 2 mL de agua). El volumen final de 150 μ L ((DEDTC)₃As, EI, cloroformo y trazas de los disolventes polares)

permite registrar el espectro utilizando una micro celda de 50 o 100 μL . Cabe mencionar, que se evaluó el nivel de ruido en la lectura ($\lambda = 523$ nm) para dos celdas de 50 μL y de 1.5 mL obteniéndose un aumento de la señal de ruido de aproximadamente 20% con la micro celda, lo que no afecta de manera significativa la precisión de la determinación.

Con este esquema se llevaron a cabo los experimentos con los dos posibles estándares internos, seleccionados previamente. Como ya se mencionó antes, en el caso de erioglaucina A, su extracción a fase apolar se llevó a cabo en presencia de CTAB al 0.02% (Fig. 7) obteniéndose muy buenos resultados: buenos rendimientos de extracción y señales reproducibles del analito y de EI. En el caso de 2,3-naftalocianina se observó que, después de adición de agua y de la centrifugación para separación de las fases, el colorante se preconcentró en la capa entre las fases acuosa y apolar. Se sabe que, el complejo de As(III) y 2,3-naftalocianina forman coloides en la fase orgánica, pero probablemente el tamaño de agregatos formados por el colorante es mucho más grande que el tamaño de agregatos del complejo de analito. En consecuencia, al aplicar 1000 RPM/g durante la centrifugación, en la etapa de separación de fases se observó que la distribución del color en el cloroformo no fue uniforme. Este efecto causa problemas a la hora de separación de las fases y se obtuvieron señales irreproducibles de EI. En base a estos resultados, en el procedimiento propuesto, se seleccionó la erioglaucina A como el estándar interno.

Se estudió el efecto de volumen de agua en el rendimiento de extracción de $(\text{DEDTC})_3\text{As}$ y del EI obteniéndose el rendimiento de extracción cercano al 100% a partir del volumen de 1.5 mL (Fig. 11). Para fines analíticos se utilizaron 2 mL de agua.

La composición final de la disolución absorbadora (1mL) resultó ser: dietil ditiocarbamato de plata ($0.03\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en la mezcla de dimetilformamida : cloroformo : dietanolamina 18:6:1 de bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 0.02% y con adición de $20\ \mu\text{L}$ de EI al 0.01%. Como se discutió en el capítulo sobre la selección del EI, se estableció la concentración de erioglaucina para que su absorbancia en $\lambda = 623\ \text{nm}$ sea 2.5 veces más alta que la absorbancia del complejo de arsénico en $\lambda = 525\ \text{nm}$ (el más alto estándar de calibración). Utilizando estas condiciones, se obtuvo la preconcentración del analito y de EI de aproximadamente 6 veces. Tomando en cuenta todo el procedimiento (volumen de muestra 40 mL, absorción de arsina en 1ml de solución absorbadora y preconcentración en aproximadamente $150\ \mu\text{L}$ de fase apolar) el factor de preconcentración es aproximadamente 250.

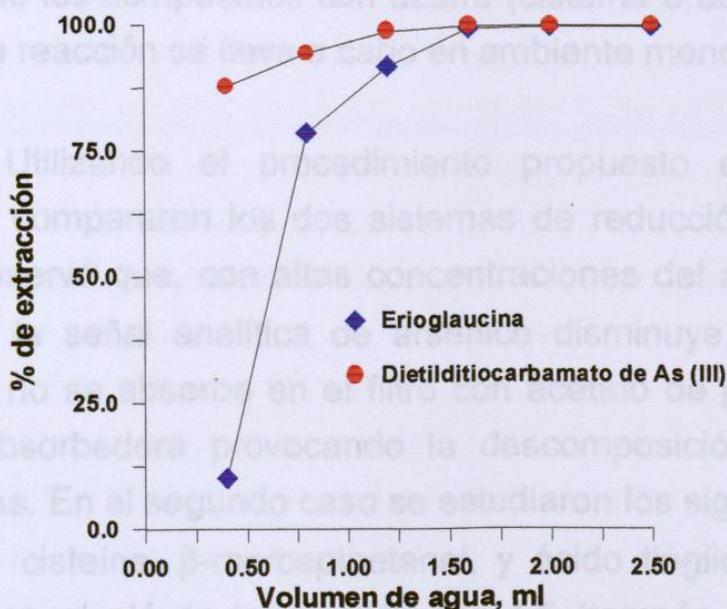


Fig. 11. Efecto de volumen de agua en el rendimiento de extracción de $(\text{DEDTC})_3\text{As}$ ($40\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}\ \text{As}$) y de EI ($2\cdot 10^{-4}\%$).

3.3.6. Especiación de As(V)/As(III)

El procedimiento desarrollado permite determinar selectivamente el As(III). En aguas naturales pueden encontrarse diferentes especies orgánicas e inorgánicas de As(III) y As(V) (ver Introducción). En cuanto a las formas inorgánicas de los dos estados de oxidación, para su cuantificación en la muestra, es necesario llevar a cabo previa reducción del As(V) hasta As(III). De acuerdo con los datos bibliográficos, esta pre-reducción puede llevarse a cabo en dos tipos de sistemas:

1. Utilizando como reductor el mismo borohidruro de sodio, yoduro de potasio o cloruro de estaño(II) siempre en presencia de altas concentraciones del ácido clorhídrico ($2-6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (38).
2. Utilizando los compuestos con azufre (cisteína o ácido tioglicólico), donde la reacción se lleva a cabo en ambiente menos ácido (43).

Utilizando el procedimiento propuesto en el presente trabajo, se compararon los dos sistemas de reducción. En el primer caso se observó que, con altas concentraciones del ácido clorhídrico ($2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) la señal analítica de arsénico disminuye. El exceso del ácido, que no se absorbe en el filtro con acetato de plomo llega a la solución absorbadora provocando la descomposición del complejo $(\text{DEDTC})_3\text{As}$. En el segundo caso se estudiaron los siguientes agentes reductores: cisteína, β -mercaptoetanol, y ácido tioglicólico. En estos experimentos el pH de la solución fue 4.5 (tampón de citratos). La desventaja importante de los reductores con el átomo de azufre es la formación del ácido sulfhídrico el cual llegando a la solución

procedimiento propuesto, se obtuvieron las señales analíticas de arsénico en las cuatro soluciones. Tomando como 100% la señal obtenida en las soluciones de As(III), las señales de As(V) fueron $96.5 \pm 1.0 \%$ y $98.1 \pm 0.8 \%$ respectivamente ($n = 3$), demostrando muy buen rendimiento de la reacción de pre-reducción.

En cuanto a las formas orgánicas de arsénico, estas son menos tóxicas que el arsénico inorgánico. Si se pretende evaluar el nivel de las formas de arsénico que pueden tener efectos nocivos en la salud, es imprescindible cuantificar las especies inorgánicas, mientras que la cuantificación de las especies orgánicas no es tan importante. En el presente trabajo, se estudiaron posibles interferencias de DMAs (ácido dimetilarsínico) en especiación de As(III)/As(V) inorgánicos. Este compuesto se tomó como ejemplo de especies orgánicas en aguas naturales, ya que ha sido reportado como la especie orgánica más común en este tipo de muestras (43). El DMAs reacciona con borohidruro de sodio formando dimetil hidruro de arsénico ($\text{As}(\text{CH}_3)_2\text{H}$); esta especie volátil pasa a la solución absorbadora y forma el complejo rojo con DEDTCa. Sin embargo, debido a la presencia de dos grupos metílicos, el espectro de este complejo tiene otra forma diferente a los espectros del complejo formado con el As(III) inorgánico. Utilizando los estándares de As(III) inorgánico y de DMAs se llevó a cabo el procedimiento propuesto y se registraron los espectros del complejo del analito y de EI en la solución final (cloroformo). En la Figura 13, se ve claramente la diferente forma de las bandas de absorción de los complejos formados con dos diferentes especies de As(III). Debido a una pequeña contribución espectral del complejo con dos grupos metílicos en 525 nm, la presencia de DMAs en la muestra puede provocar interferencias en la cuantificación de arsénico inorgánico.

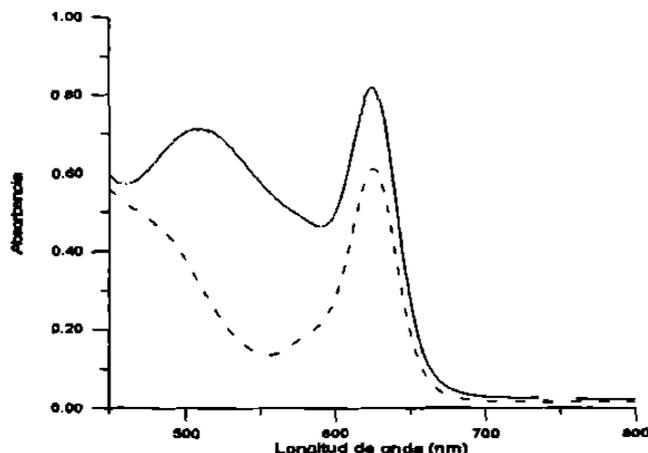


Fig. 13. Espectros de absorción de complejo de dietil ditiocarbamato con arsénico y de EI obtenidos de las soluciones estándar de: (—) As₂O₃ (1.6µg As) y (- - -) DMAs (2µg As) .

En base a los resultados presentados hasta ahora, se diseñó el siguiente esquema de especiación de arsénico en aguas naturales:

1) Determinación de As(III) inorgánico:

- ◆ Adición de tampón de citratos (pH 4.5, concentración final 0.1 mol·L⁻¹), ya que en estas condiciones el procedimiento propuesto es selectivo para cuantificación de As(III) (Fig.3).
- ◆ Generación de arsina.
- ◆ En presencia de DMAs en la muestra, se comete el error positivo debido a la contribución espectral del complejo con dos grupos metílicos en 525 nm (Fig.13).

2) Determinación de As(III) y As(V) inorgánicos:

- ◆ Ajuste a pH 4.5 con tampón de citratos (concentración final 1.2 mol·L⁻¹).

- ◆ Reducción de As(V) a As(III) con ácido tioglicólico (concentración final $0.1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).
 - ◆ Generación de arsina.
 - ◆ En presencia de DMAs en la muestra, se comete el mismo error positivo debido a una pequeña contribución espectral del complejo con dos grupos metílicos en 525 nm (Fig.13).
- 3) Evaluación del error cometido en los puntos 1 y 2 debido a presencia de DMAs:
- ◆ Oxidación de As(III) inorgánico hasta As(V) utilizando permanganato de potasio (concentración final $0.1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) en medio del ácido clorhídrico (concentración final $1.2\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (43).
 - ◆ Ajuste a pH 4.5 con citrato de sodio (concentración final $0.1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).
 - ◆ Generación de arsina.
 - ◆ La señal obtenida va a corresponder a la contribución espectral del complejo con dos grupos metílicos en 525 nm, lo que permite estimar la interferencia en la determinación de As(III) y As inorgánico total llevada a cabo en los puntos 1 y 2.

Para verificar si el esquema propuesto permite reducir interferencias de DMAs en la determinación de arsénico total inorgánico, se llevaron a cabo los experimentos de recuperación utilizando las soluciones de tres especies de arsénico a concentraciones conocidas. En cada una de las soluciones se determinó el arsénico total inorgánico (3 replicas). En la Tabla 5 se muestran la composición de las soluciones y los resultados de recuperación obtenidos sin corregir las interferencias y utilizando corrección de acuerdo con el punto 3 del esquema propuesto. En esta

tabla se puede ver, que el esquema propuesto para estimar interferencias permite obtener los valores de recuperación satisfactorios.

Tabla 5

Composición de las disoluciones y los resultados de recuperación de As inorgánico total (cada valor presentado es el valor promedio \pm DE obtenido para tres réplicas).

Composición de la solución: c_{As_i} $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$			Recuperación \pm DE, %	
NaH_2AsO_3	KH_2AsO_4	DMAs	Sin corrección	Con corrección
20	20	20	115 ± 5	102 ± 9
40	0	20	110 ± 3	104 ± 6
0	40	20	112 ± 6	98 ± 12

3.3.7. Parámetros analíticos y validación del procedimiento propuesto (análisis de arsénico inorgánico total).

Para el proceso de calibración externa se prepararon seis disoluciones de 40 mL que contenían: 0; 3.75; 7.50; 15.0; 25.0 y ; 40.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de As(III), se adicionó tampón de citratos (0.1mol·L⁻¹, pH 4.5), ácido tioglicólico (concentración final 0.1mol·L⁻¹) y se introdujeron 0.06g de borohidruro de sodio (NaBH₄ al 1% en sosa al 0.1%, caudal 0.5 mL·min⁻¹, tiempo 12 min.). La arsina formada fue absorbida en 1mL de la solución absorbidora (con EI) y se agregaron 2 mL de agua.

evaluaron tomando absorbancia del complejo (DEDTC)₃As ($\lambda = 525$ nm) como la señal analítica (sin EI). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

Características analíticas del procedimiento propuesto sin y con empleo de EI.

Parámetro	Sin EI	Con EI
Coefficiente de correlación (R^2)	0.9993	0.9994
Límite de detección (LD), $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.3	0.3
Límite de cuantificación (LQ), $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.8	1.0
Rango dinámico, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.8-40	1.0-40
Precisión a nivel de $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As (CV, %)	5.4	4.2
Precisión a nivel de $40.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ As (CV, %)	1.7	0.4

En esta tabla se puede observar, que el empleo del método de estándar interno permite mejorar significativamente la precisión de los resultados. El poder de detección no se ve mejorado debido a una incompleta resolución de las bandas de absorción del complejo de analito y de EI (Fig. 4). Sin embargo, el límite de cuantificación del procedimiento propuesto (sin o con empleo de EI) es mucho mejor que para el método oficial ($25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)(80).

A continuación se llevó a cabo la validación del procedimiento utilizando el Material de Referencia (SRM 1643d: elementos traza en aguas naturales, NIST). En primer lugar se verificó experimentalmente que este material no contiene DMAs. Posteriormente, el arsénico fue

determinado en muestra SRM 10 veces diluida (4 ml de la solución de referencia se diluyó hasta 40ml, 3 réplicas). El resultado obtenido $54.7 \pm 2.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ concuerda con el valor certificado por NIST $56.02 \pm 0.73 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que demuestra validez del procedimiento desarrollado para determinación de arsénico inorgánico total.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolló un procedimiento extracto-espectrofotométrico para la determinación de arsénico en aguas naturales a nivel de trazas. Este procedimiento es una modificación al método oficial NOM-AA-46-1981, propuesto con el fin de mejorar sus parámetros analíticos (el límite de detección del método oficial $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Las modificaciones realizadas son las siguientes:

- a) Utilizar borohidruro de sodio en la etapa de generación de arsina,
- b) Incluir en el procedimiento analítico una etapa de preconcentración,
- c) Emplear el método de estándar interno.

Se utilizó el borohidruro de sodio, ya que este reactivo asegura una mejor cinética y mejor rendimiento de formación de arsina respecto al sistema donde la reducción se lleva a cabo utilizando el zinc en presencia del ácido clorhídrico.

En la etapa de preconcentración se aprovechó el efecto de inducción de separación de las fases (polar y apolar) por adición del agua.

El método de estándar interno se utilizó con el fin de eliminar los errores analíticos cometidos en el procedimiento.

Los estudios sistemáticos realizados en este trabajo nos permitieron llegar a las siguientes conclusiones:

1. El esquema de preconcentración del analito propuesto, que incluye la etapa de adición de agua para inducción de separación de fase polar y fase apolar, ha permitido lograr el factor de preconcentración total de aproximadamente 250 veces.
2. Con las modificaciones propuestas al método oficial se logró mejorar el poder de detección del procedimiento: LD obtenido es de $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, mientras que en el método oficial se reporta $25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.
3. El estándar interno más adecuado resultó ser erioglaucina A cumpliendo con el requisito de semejante comportamiento de EI y de analito durante las etapas del procedimiento. Con el uso de este estándar interno se obtuvo significativamente mejor precisión del procedimiento. Sin embargo, debido a que los espectros del complejo de As(III) con dietil ditiocarbamato y de erioglaucina A son ligeramente solapados en las regiones donde se obtiene la señal del analito y de estándar interno, no se observó mejoramiento en el límite de detección del procedimiento con respecto a este mismo, pero sin empleo de EI (Tabla 6).
4. En el esquema propuesto para los estudios de especiación de las formas inorgánicas As(III)/As(V) se obtuvo muy buenos valores de recuperación. (Tabla 5).

5. Se verificó experimentalmente que, la presencia de DMAs causa los errores positivos en la determinación de As(III) y As total inorgánicos. Se propuso el procedimiento para estimar y, en su caso, reducir las interferencias observadas.
6. La validez del procedimiento para la determinación de arsénico inorgánico total en muestras de agua fue demostrada utilizando el Material de Referencia Certificado (SRM1643d – elementos traza en aguas naturales).
7. El procedimiento desarrollado puede ser recomendado para la determinación de arsénico en aguas naturales no contaminadas ($< 25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), pero con bajos niveles del arsénico orgánico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. National Research Council. Arsenic; National Academic of Sciences: Washington, D.C., 1977, p.16
2. Taylor A., Health Aspects of Minerals and Trace elements in Drinking Water. La situaciòn ambiental en Mèxico, 1996, p. 185
3. Fergusson J., Inorganic Chemistry & The Earth, Chemical Resurces Their Extract Use & Environ Impact, 1993, p. 347
4. Cullen, W.R. and K. J. Reimer, Arsenic Speciation in the Enviroment, Chem. Rev., 1989, 713-764
5. Penrose, W.R., CRC Crit. Rev. Enviroment. Control, 1974, p.465
6. Cullen, W.R. and K.J. Reimer, Arsenic Speciation in the Enviroment, Chem. Rev., 1989, 723 – 727
7. Shiomi, K., Shinagawa, A., Hirota K., Yamanaka H., and T. Kikuchi, Agric. Biol. Chem., 1984, 48, 2863
8. Chilvers, D.C. and P.J. Peterson, "Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment", T.C. Hutchinson, K.M. Meema Eds., Wiley, N.Y., 1987, p. 279

9. Goodman and Gilman's, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9a, 1996, p.1659
10. Moore M.M., Harrington-Brock K. and C.L. Doerr, *Mutat. Res.*, 1997, 386 (3): 279 –290
11. Hopenhayn - Rich C., Biggs M.L., Kalman D.A. Moore L.E. and A.H. Smith, *Environ. Health Perspect.*, 1996, 104, (11): 1200 – 1207
12. Zhao C.Q., Young M.R., Diwan B.A., Coogan T.P. and M.P. Waalkes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, 94 (20): 10907 – 10912
13. Chiou H.Y., Huang W.I., Su C.L., Chang S.F., Hsu Y.H. and C.J. Chen, *Stroke*, 1997, 28 (9): 1717 – 1723
14. Biggs M.L. Kalman D.A. Moore L.E. Hopenhayn - Rich C. and A.H. Smith, *Mutat. Res.*, 1997, 386 (3): 185 – 195
15. Burgera M. and J.L. Burgera, *Talanta*, 1997, 44, 1581 – 1604
16. U.S. EPA., *Quality Criteria for Water*, Report EPA 400/5 - 86 - 001, Office for Water Regulations and Standards, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C., 1986

17. WHO, Guidelines for Drinking Water Quality, **1992**, vol. 3
18. Federal Provincial Working Group on Drinking Water, Guidelines for Canadian Drinking Water Quality, Canadian Government Publishing Centre, Supply and Services Canada, Hull, Quebec, Canada, catalogue No 1148 - 10 / 1978, **1979**
19. NOM -127-SSA - 1- 1994, Diario Oficial de la Federación, **1996**, 41 – 44
20. NOM-001- Ecol -1996, Diario Oficial de la Federación, **1997**, 68 – 86
21. Esteban M., Ariño C., Ruisánchez I., Larrechi M.S., and F. Rius., Anal. Chim. Acta, **1994**, 285, 193 – 208
22. Mrzljak R.I., Bond A.M., Cardwell T.J., Cattrall R.W., Newan O.M., Champion B.R., and J. Hey, Analyst, **1994**, 119, 1051 – 1053
23. Jaya S., Prasada T. and G. Prabhakara, Talanta, **1987**, 34(6): 574 – 576
24. Sheppard B.S., Heitkemper D.T., and C.M. Gaston., Analyst, **1994**, 119, 1683 – 1686

25. Eguiarte I., Alonso R.M., and R. Jiménez., *Analyst*, **1996**, 121, 1835 – 1838
26. Meyers D.J. and J. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **1996**, 45, 267
27. Forserberg G., O'Laughlin, Mergargle R.G. and S.R. Koirtyohann, *Anal. Chem.*, **1975**, 47, 1586
28. Henze G., Joshi A.P. and R. Neeb, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **1980**, 300, 267
29. Sadana R.S., *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 304
30. Holak W., *Anal. Chem.*, **1980**, 52, 2189
31. Hong Li and R. Smart, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 325, 25-32
32. Riley K.W., "Spectral Interferences by Al on the Determination of As Using The Grafite Furnace: Choice of Resonance Lines", *At. Spectrosc.*, **1982**, 3, 120-121
33. Ni Z., RaoZ. and M. Li, "Elimination of aluminium interference in arsenic determination at the 193.7 nm line using Zeeman background correction and platform atomization, *Ca. J. Appl. Spectrosc.*, **1996**, 41(1), 129 –133

34. Ni Z.M., Rao Z. and M. Li, "Minimization of phosphate interference in the direct determination of arsenic in urine by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 34 (1-2), 177-182
35. Alvarez-Cabal Cimadevilla, Wröbel K. and A. Sanz - Medel, "Capabilities and limitations of different techniques in electrothermal atomic absorption spectrometry for direct monitoring of arsenic, cadmium and lead contamination of sea water", *J.Anal. At. Spectrom.*, **1995**, 10, 149 -154
36. Bermejo-Barrera P., Moreda-Pineiro J., Moreda-Pineiro A., and A. Bermejo-Barreda, "Comparison of different chemical modifiers for the direct determination of arsenic in sea water by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 355(2), 174 – 179
37. Dedina J. and D. Tsalev, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, **1995**, 130, 186 – 187
38. Anderson R.K., Thompson M. and E. Culbard, "Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. Part I. Reaction media, *Analyst*, **1986**, 111, 1143 – 1152
39. *Métodos Normalizados para Análisis de Aguas Potables y Residuales*, **1992**, Ed. Díaz de Santos, 3-83

40. Xiao-Chun L., Cullen W.R. and J. Reimer, *Anal. Chim. Acta*, **1994**, 285, 277-285
41. Young-Lai and Ping-Jian, *Anal. Chim. Acta*, **1994**, 293, 211-218
42. Briddle I., Alarabi H., Karshman S., Xiao-Chun and S. Zheng, *Analyst*, **1992**, 117, 407-411
43. López A., Torralba R., Palacios M.A. and C. Cámara, "Generation of AsH₃ from As(V) in the absence of KI as prereducing agent: speciation of inorganic arsenic", *Talanta*, **1992**, 39, 1343 – 1348
44. Lin Y., Wang X., Yuan D., Yang P., Huang B., and Z. Zhuang, *J. Anal. at Spectrom.*, **1992**, 7 (2):287 –292
45. Shickling C., Yang J. and J.A.C. Broekaret, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1996**, 11(9): 739 –745
46. Ding W.W. and R.E. Sturgeon, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1996**, 11(6): 421 – 425
47. Newes-Vetessy Z., Veres S. and A. Csikkel-Szoloki, *Magy. Kem. Foly.*, **1985**, 91(8):368 – 373

48. Veres S. and A. Csikkel-Szoloki, *Magy. Kem. Foly.*, **1989**, 95(2): 87-90
49. Pang S. and S. Li, *Fenxi Huaxue*, **1990**, 18 (2): 146 –149
50. Du H. and B. Wang, *Fenxi Huaxue.*, **1992**, 20 (6): 623-627
51. Wang B. and W. Zhang, *Fenxi Huaxue*, **1988**, 16 (5): 419 – 423
52. Wang B. and J. Niu, *Lihua. Jianyan. Fenxi Huaxue.*, **1989**, 25 (4): 205 – 207
53. Cabredo Pinillos S., Sanz Asensio J. and J. Galban Bernal, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 300 (1-3): 321-327
54. Shi W. and B. Wang, *Fenxi Huaxue.*, **1991**, 19 (10): 1128 – 1132
55. Sanz Asensio J., Pérez Clavijo M. and M.T. Martínez Soria, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 343 (1-2): 39 – 47
56. Xu B., *Lihua. Jianyan. Fenxi Huaxue.*, **1990**, 26 (1): 57 – 60
57. Hall G., Gauthier G., Pelchat J.C. Pelchat P. and J.E. Vaive, *J. Anal. Spectrom.*, **1996**, 11 (9): 787 – 796

58. Donaldson E.M., *Talanta*, **1988**, 35 (1): 47 – 53
59. Mester Z. and P. Fodor, *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 756 (1-2): 292 –299
60. Shickling C., Yang J. and J.A.C., *J. Anal. At. Spectrom.*, **1996**, 11 (9): 739 –745
61. Hanna C.P., Tyson J.F. and S. McIntosh, *Clin. Chem. (Winston Salem, N.C.)*, **1993**, 39 (8): 1662 – 1667
62. Gómez M., Cámara C., Palacios M.A., and A. López-Gonzalvez, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1997**, 357 (7): 844 – 849
63. Lambie K.J. and S.J. Hill, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 334 (3): 261 – 270
64. González Soto E., Alonso Rodríguez E., López Mahia P., Muniategui Lorenzo S. and D. Prada Rodríguez, *Anal. Lett.*, **1995**, 28 (15): 2699 – 2718
65. Chwastowska J., Sterlinska E., Zmijewsaka W. and J. Dudek, *Chem. Anal. (Warsaw)*, **1996**, 41 (1): 45 –53
66. Mester Z. and P. Fodor, *J. Chromatogr. A.*, **1996**, 756 (1-2): 292-299

67. Le X.C., Ma M. and N.A. Wong, *Anal. Chem.*, **1996**, *68* (24): 4501 –4506
68. Howard A.G. and C. Salou, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, *333* (1-2): 89-96
69. Chappell J., Chiswell B. and H. Olszowy, *Talanta*, **1995**, *42* (3): 323-329
70. Hasegawa H., Sohrin Y., Mataui M., Hojo M. and M. Kawashima, *Anal. Chim. Acta*, **1994**, *66* (19): 3247 – 3252
71. Wròbel-Zasada K., Wròbel-Kaczmarczyk K., López de Alba P.L. and García- López M.A., *Talanta*, **1996**, *43*, 1055 – 1060
72. Wròbel-Zasada K., Wròbel-Kaczmarczyk K., López de Alba P.L. and - López Martínez L., *Talanta*, **1996**, *44*, 2129 – 2136
73. Kikta E.J. and A.E. Stange, *J. Chromatogr. A.*, **1977**, *138*, 41
74. Wròbel-Zasada K., Wròbel-Kaczmarczyk K., De la Garza Rodríguez I.M., López de Alba P.L. and L. López Martínez, *J. Pharm. Biol. An.* (En prensa)
75. Wròbel-Zasada K., Wròbel-Kaczmarczyk K., Cruz-Jiménez G. and F. Romero, *Anal. Chim. Acta*, (En Prensa)

76. Bode H. and K. Hachmann, *Z. Anal. Chem.*, **1967**, 229, 18 – 30
77. Hulanicki A. and S. Glab, *Chem. Anal. (Warsaw)*, **1970**, 15, 1089
78. Mueller B.J. and R.J. Lovett, *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 1405 – 1049
79. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental Chemistry, *Anal. Chem.*, **1980**, 52, 2242
80. NOM-AA-46-1981, *Diario Oficial de la Federación*, **1982**, 7-11



