

UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE QUÍMICA

AVANCES EN EL EMPLEO DE LA ESPECTROMETRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON ATOMIZACIÓN ELECTROTÉRMICA: ESPECIACIÓN NO CROMATOGRÁFICA

Marisol Briceño Torres

2012



AVANCES EN EL EMPLEO DE LA ESPECTROMETRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON ATOMIZACIÓN ELECTRO-TÉRMICA: ESPECIACIÓN NO CROMATOGRÁFICA

Memoria presentada para optar al Grado de Doctor en Química

Fdo: Marisol Briceño Torres

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Manuel Hernández Córdoba, Catedrático de Universidad del Área de Química Analítica y Presidente de la Comisión académica del programa de Doctorado en Química,

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada "AVANCES EN EL EMPLEO DE LA ESPECTROMETRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON ATOMIZACIÓN ELECTROTÉRMICA: ESPECIACIÓN NO CROMATOGRÁFICA" ha sido realizada por Dña. Marisol Briceño Torres, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Manuel Hernández Córdoba y D. Ignacio Francisco López García y que la Comisión Académica en su reunión del 16 de Abril de 2012 ha dado su conformidad para que sea presentada ante la Comisión de Doctorado.

Murcia, 16 de Abril de 2012

Fdo.: Manuel Hernández Córdoba

Facultad de Química
Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia
T. 868 88 4143 – F. 868 88 7457 – **www.um.es/f-quimicas**

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Manuel Hernández Córdoba y D. Ignacio Francisco López García, Catedráticos de Universidad del Área de Química Analítica en el Departamento de Química Analítica

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "AVANCES EN EL EMPLEO DE LA ESPECTROMETRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA CON ATOMIZACIÓN ELECTROTÉRMICA: ESPECIACIÓN NO CROMATOGRÁFICA", realizada por Dña. Marisol Briceño Torres Hernández bajo nuestra inmediata dirección y supervisión en el Departamento de Química Analítica, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, 16 de Abril de 2012

Fdo.: Manuel Hernández Córdoba

Fdo.: Ignacio Francisco López García

Facultad de Química
Campus Universitario de Espinardo. 30100 Murcia
T. 868 88 4143 – F. 868 88 7457 – **www.um.es/f-quimicas**

Quiero agradecer a la “Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado” por el soporte financiero prestado con el cual se cubrió mi formación y manutención para llevar a cabo mis estudios doctorales y culminarlos con la presente tesis doctoral.

Quiero dar las gracias por el apoyo y los momentos compartidos a mis amigos Luisa, Ricardo, Nelson, Esmelkys, Peggy, Ascen, Ines y Salvi.

Agradezco el apoyo recibido por mis compañeros y amigos del Departamento de Ecología y Control de la Calidad de la “Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado”.

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Manuel Hernández Córdoba por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección, por facilitarme siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas y por su asesoramiento durante toda mi estancia doctoral en Murcia.

Mil palabras no bastarían para agradecerle al Dr. Ignacio López García su valiosa tutoría, sus incontables horas de dedicación y ayuda al desarrollo y culminación de este trabajo. Le agradezco considerablemente su paciencia y disponibilidad para compartir conmigo su experiencia y conocimientos. Muchas Gracias.

Agradezco la colaboración y el cariño de los profesores Carmen López Erroz, Pilar Viñas, Natalia Campillo, Marisol García, Maribel Albero, Joaquín Ortuño y demás profesores del Departamento de Química Analítica.

A la colaboración de Miguel Ángel y a Elena.

A mis compañeros y amigos en el departamento: Nerea, Rosa, María C., María B., Yesica, Gema y Nacho.

Un muy sincero agradecimiento….

Dedicatoria.

Dedico esta tesis doctoral a Dios que guía mis pasos e ilumina mi vida.

A mis padres y hermanos.

A Melanie, Jesús y Rhomy.

A Mivi y a mi bella Sara.

Les quiero a todos.

Abreviaturas:

Acrónimo	Descripción
CE	Electroforesis capilar *(capillary electrophoresis)*
CFME	Microextracción en flujo continuo *(continuous-flow microextraction)*
CPE-ETAAS	Extracción en punto de nube acoplada a espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica *(cloud point extraction with electrothermal atomic absorption spectrometry)*
DI-SDME	Microextracción en una gota con inmersión directa *(direct immersion single drop microextraction)*
DLLME	Microextracción líquido-líquido en fase dispersa *(dispersive liquid liquid microextraction)*
DSDME	Microextracción en gota suspendida *(directly suspended droplet microextraction)*
EE	Eficiencia de extracción *(extraction efficiency)*
EME	Microextracción electrocinética en membrana *(electrokinetic membrane extraction)*
ETAAS	Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica *(electrothermal atomic absorption spectrometry)*
ETV-ICP-MS	Espectrometría masa con emisión de plasma acoplado inductivamente y vaporización electrotérmica *(electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry)*
ETV-ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente y vaporización electrotérmica *(electrothermal vaporization inductively coupled plasma optical emission spectrometry)*
FE	Factor de enriquecimiento *(enrichment factor)*
FI-CV-ETAAS	Inyección en flujo acoplada a vapor frío con espectrometría de absorción atómica de atomización electrotérmica *(flow injection cold vapour electrothermal atomic absorption spectrometry)*
FI-SPE-ETAAS	Inyección en flujo acoplada a extracción en fase sólida con espectrometría de absorción atómica de atomización electrotérmica *(flow injection solid phase extraction electrothermal atomic absorption spectrometry)*
GC	Cromatografía de gases *(gas chromatography)*

GC-FID	Cromatografía de gases con detección por ionización a la llama *(gas chromatography - flame ionization detector)*
GC-ICP-MS	Cromatografía de gases acoplada a plasma de acoplamiento inducido con espectrometría de masas *(gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry)*
HF-LLLPME	Microextracción líquido-líquido-líquido en fibra hueca *(hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction)*
HF-LPME	Microextracción en fase líquida con fibra hueca *(hollow fiber liquid-phase microextraction)*
HG-AAS	Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros (HG-AAS) *(hydride generation atomic absorption spectrometry)*
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución *(hydride generation atomic absorption spectrometry)*
HS-LPME	Microextracción en fase líquida en espacio de cabeza *(headspace liquid-phase microextraction)*
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza *(headspace solid-phase microextraction)*
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente *(inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry)*
ICP-MS	Espectrometría de masas atómica con plasma acoplado inductivamente *(inductively coupled plasma - mass spectrometry)*
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inducido *(inductively coupled plasma optical emission spectrometry)*
IL-DLLME	Microextracción líquida en fase dispersa con líquidos iónicos *(ionic liquid dispersive liquid liquid microextraction)*
Ils	Líquidos iónicos *(ionic liquids)*
IL-USA-DLLME	Microextracción líquida en fase dispersa de líquidos iónicos con ultrasonidos *(ionic liquid ultrasound assisted dispersive liquid–liquid microextraction)*
LLE	Extracción Líquido-Líquido *(liquid liquid extraction)*
LLLPME	Microextracción líquido-líquido-líquido *(liquid liquid liquid-phase microextraction)*
LPME	Microextracción en fase líquida *(liquid phase microextraction)*
LPME-BE	Microextracción en fase líquida con retroextracción *(liquid phase microextraction with back extraction)*
PAHs	hidrocarburos aromáticos policíclicos

	(polycyclic aromatic hydrocarbons)
SB-LPME	Microextracción en barra agitadora *(stir bar liquid phase microextraction)*
SDME	Microextracción en una gota *(single drop microextraction)*
SDSME	Microextracción en una gota suspendida *(single-drop solvent microextraction)*
SFO-DLLME	microextracción líquido-líquido en fase dispersa mediate solidificación de una gota orgánica flotante *(dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method)*
SFO-LPME	microextracción en fase líquida mediante solidificación de una gota de disolvente flotante *(liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method)*
SI-DLLME	microextracción en fase dispersa con inyección secuencial *(sequential injection dispersive liquid liquid microextraction)*
SLM	Membrana con líquido soportado *(supported liquid membrane)*
SPE	Extracción en fase sólida *(solid phase extraction)*
SPE-ETAAS	extracción en fase sólida acoplada a espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica *(solid phase extraction with electrothermal atomic absorption spectrometry)*
SPME	Microextracción en fase sólida *(solid phase microextraction)*
TILDLPME	Microextracción líquida en fase dispersa con líquidos iónicos a temperatura contro-lada *(Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction)*

Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral:

Non-chromatographic screening procedure for arsenic speciation analysis in fish-based baby foods by using electrothermal atomic absorption spectrometry

Analytica Chimica Acta 699 (2011) 11-17

Ultrasound-assisted dispersive liquid- liquid microextraction for the non-chromatographic speciation of chromium by using electrothermal atomic absorption spectrometry

Analytica Chimica Acta (enviado)

Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of cobalt and nickel traces by in situ formation of an ionic liquid followed by electrothermal atomic absorption spectrometry

En preparación

Dispersive liquid-liquid microextraction followed by electrothermal atomic absorption spectrometry for the non-chromatographic speciation of arsenic in rice samples

En preparación

A procedure for the non-chromatographic speciation of water-soluble arsenic in edible oils using dispersive liquid liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry

En preparación

Comunicaciones a congresos:

Speciation of chromium in waters by ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry, EUROPEAN CONFERENCE ON ANALYTICAL CHEMISTRY (EUROANALYSIS 16), BELGRADO (2011).

Use of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of chromium released from toys. 3RD INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TRACE ELEMENTS & HEALTH (TRACEL 2011), MURCIA, 2011.

Extraction and speciation of arsenic in rice flour by using electrothermal atomic absorption spectrometry for the final measurement. VI CONGRESO IBÉRICO DE ESPECTROSCOPÍA. XXII REUNIÓN NACIONAL ESPECTROSCOPÍA, OPORTO (PORTUGAL). 2010.

Procedimiento rápido y directo para la especiación de arsénico en alimentos utilizando ETAAS. XXI REUNIÓN NACIONAL DE ESPECTROSCOPIA. V CONGRESO IBÉRICO DE ESPECTROSCOPIA, MURCIA, 2008.

Screening and quantitative non-chromatographic procedures for the speciation of arsenic in rice flour using electrothermal atomic absorption spectrometry. EUROANALYSIS 2009, INNSBRUCK (AUSTRIA). 2009.

Índice



OBJETO 1

INTRODUCCIÓN 7
BIBLIOGRAFÍA 28

CAPÍTULO I. DETERMINACIÓN MEDIANTE ETAAS DE Cr(VI) Y Cr(III) EN AGUAS Y LIXIVIADOS OBTENIDOS DE JUGUETES PREVIA MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA CON TPB ASISTIDA POR ULTRASONIDOS 35
1.1. INTRODUCCIÓN 39
1.1.1. Principios de DLLME 43
1.1.2. Determinación de cromo por DLLME 49
1.2 PARTE EXPERIMENTAL 53
1.2.1. Instrumentación 53
1.2.2. Reactivos 55
1.2.3 Procedimiento 56
1.2.4 Determinación de cromo en muestras de agua 58
1.2.5 Determinación de cromo lixiviado de juguetes 58
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 58
1.3.1 Efecto del pH 58
1.3.2 Efecto de sales inorgánicas 61
1.3.3 Efecto del volumen de fosfato de tributilo 62
1.3.4 Efecto de los ultrasonidos 64
1.3.5 Efecto del volumen de fase acuosa 67
1.3.6 Condiciones para la determinación de Cr(III) 68
1.3.7 Estudios de interferencias 69
1.3.8 Optimización del programa de calentamiento electrotérmico 70
1.3.9 Calibración 72
1.3.10 Determinación de cromo en muestras de agua y juguetes 73
1.4. CONCLUSIÓN 77
1.5. BIBLIOGRAFÍA 77

CAPÍTULO II. PROCEDIMIENTO SEMICUANTITATIVO (SCREENING) NO CROMATOGRÁFICO DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN ALIMENTOS INFANTILES COMERCIALES CON BASE DE PESCADO UTILIZANDO ETAAS E INTRODUCCIÓN DIRECTA DE LA MUESTRA SUSPENDIDA 85
1.1. INTRODUCCIÓN 89
2.2 PARTE EXPERIMENTAL 96
2.2.1. Instrumentación 96
2.2.2. HG-AFS 97
2.2.3 Otra instrumentación 98
2.2.4. Reactivos 99
2.2.5. Recubrimiento del tubo pirolítico 100
2.2.6. Muestras y material de referencia 100
2.2.7. Procedimiento para determinación de arsénico total mediante HG-AFS 101
2.2.8. Procedimiento propuesto 101
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 102
2.3.1 Efecto del medio de suspensión 105
2.3.2. Efecto del modificador químico 108
2.3.2.1. Níquel y Cerio 108

2.3.2.2. Recubrimiento del atomizador....118
2.3.2.3. Elementos del grupo del platino....122
2.3.3 Influencia de la matriz de alimentos en suspensión....126
2.3.4 Capacidad para la especiación....128
2.3.5 Calibración y validación....130
2.4. CONCLUSIÓN....131
2.5. BIBLIOGRAFÍA....133

CAPÍTULO III. DETERMINACIÓN DEL ARSÉNICO SOLUBLE EN DISOLUCIÓN ACUOSA DE MUESTRAS DE ACEITE COMESTIBLE MEDIANTE DLLME Y DETERMINACIÓN POR ETAAS....143
3.1. INTRODUCCIÓN....147
3.2. PARTE EXPERIMENTAL....165
3.2.1. Instrumentación....165
3.2.2. HG-AFS....165
3.2.3 Otra instrumentación....166
3.2.4. Reactivos....167
3.2.5. Muestras y material de referencia....168
3.2.6. Digestión de las muestras de aceite en microondas....170
3.2.7. Arsénico total mediante HG-AFS....170
3.2.8. Arsénico total mediante ETAAS....171
3.2.9. Procedimiento propuesto por DLLME asistida con Ultrasonidos....172
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN....173
3.3.1. Selección del medio extractante....173
3.3.2. Selección del dispersante....175
3.3.3. Efecto de los ultrasonidos y la temperatura....177
3.3.4. Optimización del programa de calentamiento....178
3.3.5. Calibración....182
3.3.6. Capacidad de extracción del procedimiento propuesto....184
3.3.7. Determinación de arsénico en muestras de aceite....185
3.3.8. Naturaleza de las especies extraídas por el procedimiento propuesto....188
3.3.9. Naturaleza del arsénico presente en las muestras estudiadas....192
3.3.9.1. Optimización del procedimiento de separación....193
3.3.9.2. Determinación de arsénico en las fracciones obtenidas....196
3.4. CONCLUSIÓN....197
3.5. BIBLIOGRAFÍA....199

CAPÍTULO IV. ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN ARROZ MEDIANTE SEPARACIÓN POR INTERCAMBIO IÓNICO, PRECONCENTRACIÓN CON DLLME Y DETERMINACIÓN POR ETAAS....205
4.1. INTRODUCCIÓN....209
4.2. PARTE EXPERIMENTAL....218
4.2.1. Instrumentación....218
4.2.2. Tratamiento de los tubos con volframio....220
4.2.3. Reactivos....220
4.2.4. Muestras y material de referencia....221
4.2.5. Digestión de las muestras en microondas....222
4.2.6. Arsénico total mediante HG-AFS....222
4.2.7. Arsénico total mediante ETAAS....223
4.2.8. Extracción de las formas de arsénico en medio alcalino....224
4.2.9. Extracción de las formas de arsénico en medio ácido....224
4.2.10. Separación de especies tras el tratamiento alcalino....224
4.2.11. Separación de especies tras el tratamiento ácido....227
4.2.12. Procedimiento DLLME para As(III) y As(V)....227
4.2.13. Procedimiento DLLME para MA y DMA....228
4.2.14. Procedimiento para la determinación de AB....229

4.2.14.1. A partir del sobrenadante de la suspensión alcalina 229
4.2.14.2. A partir del eluido del cartucho catiónico 229
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 230
4.3.1. Selección del medio de extracción 231
4.3.1.1. Extracción en medio alcalino 232
4.3.1.2. Extracción en medio ácido 240
4.3.2. Separación de las especies de arsénico 243
4.3.2.1. Separación tras el tratamiento alcalino 250
4.3.2.2. Separación tras el tratamiento ácido 253
4.3.3. Preconcentración de las formas de arsénico 258
4.3.3.1. Preconcentración DLLME de As(III) y As(V) 261
4.3.3.1.1. Estudio de las condiciones de complejación y extracción 262
4.3.3.1.2. Curvas de calcinación y atomización 265
4.3.3.1.3. Determinación de As(VI) 268
4.3.3.1.4. Efecto de los iones coexistentes 269
4.3.3.1.5. Calibración 270
4.3.3.2. Preconcentración por DLLME de MA y DMA 271
4.3.3.2.1 Estudio de las condiciones de reacción y extracción 274
4.3.3.2.2. Curvas de calcinación y atomización 279
4.3.3.2.3. Efecto de los iones coexistentes 281
4.3.3.2.4. Calibración 282
4.3.4. Aplicación de los procedimientos propuestos 282
4.4. CONCLUSIÓN 288
4.5. BIBLIOGRAFÍA 289

CAPÍTULO V. DETERMINACIÓN DE Co(II) Y Ni(II) POR EXTRACCIÓN MEDIANTE DLLME EN UN LÍQUIDO IÓNICO FORMADO IN SITU Y DETECCIÓN CON ETAAS 303
5.1. Introducción 307
5.1.1. Composición de los líquidos iónicos 316
5.1.2. Nomenclatura de los líquidos iónicos 319
5.1.3. Propiedades de los líquidos iónicos 322
5.1.3.1. Efecto de la estructura en las propiedades físico-químicas 323
5.1.3.2. Densidad, viscosidad y propiedades de transporte 325
5.1.3.3. Tensión superficial y formación de micelas 327
5.1.3.4. Punto de fusión y estabilidad térmica 328
5.1.3.5. Miscibilidad con agua 329
5.1.4. Los líquidos iónicos en procesos de separación “verdes” 333
5.1.5. Los líquidos iónicos en el tratamiento de la muestra 334
5.1.5.1. Extracción 335
5.1.5.2. Cromatografía 335
5.1.5.3. Electroforesis 336
5.1.5.4. Sensores 336
5.1.6. Los líquidos iónicos como disolventes extractantes 337
5.1.6.1. Aplicación de los líquidos iónicos como medios de extracción clásicos 339
5.1.6.2. Los líquidos iónicos en técnicas de microextracción 343
5.1.7. Observaciones finales 352
5.2. Importancia de los elementos traza en los alimentos 353
5.3. Métodos miniaturizados de preconcentración para la determinación de cobalto y níquel 360
5.4. Microextracción de Co(II) y Ni(II) por formación de complejos neutros con PAN en un líquido iónico formado in situ 365
5.4.1. Introducción 365
5.4.2. Parte experimental 368
5.4.2.1. Instrumentación 368
5. 4.2.2. Reactivos 369
5. 4.2.3. Procedimiento para la determinación de Co y Ni 370
5. 4.2.4. Determinación de Co y Ni en muestras de agua 371

5. 4.2.5. Determinación de Co y Ni en cerveza 371
5.4.3 Resultados y discusión 372
5. 4.3.1. Selección del líquido iónico 372
5. 4.3.2. Selección de un agente antiadherente 373
5. 4.3.3. Efecto del pH y la concentración de PAN 374
5. 4.3.4 Efecto de los volúmenes de fase dadora y aceptora 376
5. 4.3.5 Efecto del tiempo de extracción 377
5. 4.3.6 Efecto salino 377
5. 4.3.7 Estudios de interferencia 378
5. 4.3.8 Optimización de las condiciones de atomización 378
5. 4.3.9 Calibración 381
5.4.3.10 Determinación de cobalto y níquel en muestras de agua y cerveza 383
5.5. CONCLUSIÓN 384
5.6. BIBLIOGRAFÍA 385

CONCLUSIONES 401

Objeto

El trabajo realizado en esta Memoria forma parte de una de las líneas de trabajo que el grupo de investigación "Métodos Instrumentales Aplicados" viene desarrollando dentro de la Universidad de Murcia. Esta línea se ocupa del desarrollo y puesta a punto de procedimientos para el tratamiento de muestras, preferentemente alimentos y bebidas, con el fin de determinar elementos metálicos. La idea general que recogen todos estos procedimientos es la disminución al máximo del tratamiento previo de las muestras para evitar procesos de contaminación, pérdidas de analito e intercambio de formas químicas. Dentro de esta línea una parte del trabajo se ocupa de la determinación de elementos, generalmente tóxicos, a muy baja concentración.

Cuando la concentración de los analitos se encuentra en el nivel del $\mu g\ L^{-1}$ la Espectrometría de Absorción Atómica con Calentamiento Electrotérmico (ETAAS) es una técnica alternativa al Plasma de Acoplamiento Inducido con Espectrometría de Masas (ICP-MS). Cuando o bien el nivel de concentraciones es aun más bajo, a pesar de la gran sensibilidad de ambas técnicas, o bien la matriz de la muestra es muy compleja, es preciso acoplar procesos de preconcentración.

Tan importante como la determinación de los contenidos totales de los elementos resulta, especialmente en el caso de los alimentos, la forma química en que se encuentra el analito en la muestra. Para llevar a cabo una discriminación de las distintas formas químicas de un elemento (especiación) es preciso acoplar procesos de separación. Nuestro grupo dispone de una línea de trabajo sobre la aplicación de procesos cromatográficos a la separación y determinación de especies orgánicas e inorgánicas. Esta Memoria aborda el proceso de especiación recurriendo a separaciones no cromatográficas, entendiendo como tal todas aquellas que no trabajan en flujo continuo.

Cuando se requiere la especiación de elementos a niveles por debajo del $\mu g\ L^{-1}$ el reto crece exponencialmente porque la concentración de las distintas formas disminuye aún más. En este caso, la influencia de la matriz que acompaña a los analitos comienza a ejercer un gran efecto pudiendo incluso imposibilitar la determinación.

En esta Memoria se han combinado todos estos aspectos. Por una parte se proponen procedimientos donde se reduce el tratamiento de la muestra al mínimo, evitando

así la digestión o mineralización de la misma, de esta forma se pretende preservar el estado de oxidación y/o forma química de los analitos. Cuando la especiación sea precisa se desarrollan procedimientos sencillos que con un mínimo utillaje garantizan los fines buscados. Finalmente, para lograr la sensibilidad necesaria a niveles de ultratrazas se acoplan procedimientos de preconcentración basados en distintas metodologías que pueden incrementar la sensibilidad en varios órdenes de magnitud.

Este es el nexo común de los resultados recogidos en esta Memoria y que se presentan en cinco capítulos.

En el capítulo 1 de esta Memoria se desarrolla un procedimiento especialmente sensible para la determinación de Cr(VI) en aguas y lixiviados de juguetes. El procedimiento se ha diseñado de forma que permite distinguir entre Cr(III) y Cr(VI). Para conseguir esa elevada sensibilidad se ha acoplado un proceso de microextracción dispersiva líquido líquido (DLLME) donde el agente quelatante es la propia fase extractante (fosfato de tributilo). El procedimiento goza de muy buenas características, como por ejemplo no verse afectado por concentraciones elevadas de HCl, lo que resulta adecuado si se quiere aplicar a la determinación del cromo liberado en el lixiviado ácido de juguetes o en muestras de agua de mar.

En el capítulo 2 se presenta un procedimiento de "screening" sobre algunas formas de arsénico (arsenito, arseniato, monometil arsénico, dimetil arsénico y arsenobetaína) presentes en alimentos infantiles con base de pescado. El problema se aborda sin recurrir a la mineralización de la muestra, sino que se preparan suspensiones y mediante la adecuada selección del modificador químico conseguimos distinguir entre las distintas formas de arsénico.

El contenido en las distintas formas de arsénico en aceites de pescado y comestibles se aborda en el capítulo 3. Se ha desarrollado la separación y preconcentración de las formas solubles en agua de arsénico mediante un procedimiento de microextracción líquido-líquido en fase dispersa (DLLME) que podríamos denominar inversa porque se dispersa agua en un disolvente orgánico, el aceite. Además, se han caracterizado las

fracciones lipídicas de arsénico polares y no polares mediante el acoplamiento de separaciones en cartucho de fase sólida.

De todos es sabido que el arroz acumula arsénico en distintas formas, especialmente en la raíz y mucho menos en el grano. Como este cereal es materia prima para multitud de alimentos, entre ellos las papillas infantiles, resulta de interés conocer no solamente cuanto arsénico se encuentra en el arroz, sino además disponer de información sobre su distribución según la forma química. Como siempre, este problema se ha resuelto sin mineralizar la muestra, sino desarrollando un procedimiento cuantitativo de extracción, al que se han acoplado separaciones por intercambio iónico con cartuchos en fase sólida. Para alcanzar la sensibilidad necesaria, a los eluidos después del intercambio iónico se les han aplicado procedimientos de preconcentración basados en la microextracción en fase dispersa a partir de la formación de compuestos neutros de las especies de arsénico con pirrolidínditiocarbamato amónico (APDC) o 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL). Los microvolúmenes de Cl_4C obtenidos conteniendo al analito se llevan al detector de ETAAS. Esto ha permitido cuantificar los niveles de arsenito, arsenato, monometil arsénico, dimetil arsénico y arsenobetaína en arroz y constituye el capítulo 4 de esta Memoria.

Finalmente el capítulo 5 de esta Memoria aborda el empleo de los líquidos iónicos como agentes alternativos al empleo de disolventes para preconcentrar a los analitos, generando de esta forma procedimientos más amigables con el medioambiente. En este sentido se ha utilizado la reacción de metátesis de los precursores de un líquido iónico para conseguir la formación del mismo en la disolución acuosa que contiene al analito. De esta forma el área de las microgotas de fase extractante que se origina es máxima y el equilibrio de reparto se alcanza rápidamente. En esta ocasión hemos estudiado la extracción en el líquido iónico de los complejos neutros formados por Co(II) y Ni(II) con piridilazo naftol (PAN) y se han aplicado los procedimientos desarrollados a la determinación de estos analitos en aguas de distinta procedencia y cerveza. En el primer caso los procedimientos son particularmente adecuados ya que la solubilidad del líquido iónico no aumenta con la fuerza iónica de la disolución debido al efecto del ión común y por tanto permite su aplicación a muestras de agua de mar. En el caso de la cerveza se ha

desarrollado un procedimiento de “limpieza” de la muestra basado en el uso de cartuchos de fase sólida rellenos de intercambiadores iónicos.

Los procedimientos y desarrollos indicados tienen como denominador común la minimización en el proceso de tratamiento de la muestra asi como lograr un mejor aprovechamiento de los recursos materiales de los que se dispone. En los tiempos actuales, parece que el ICP-MS hubiese desplazado por completo a otras técnicas que pueden cubrir prestaciones similares. Sin poner en entredicho la capacidad y potencia analítica que encierra el ICP-MS es evidente que su costo de adquisición y sobre todo, de mantenimiento elevado. Nuestro objetivo fundamental es profundizar en la idea de que una mejora en el proceso de tratamiento de la muestra en conjunción con la sensibilidad de una técnica como ETAAS puede alcanzar prestaciones analíticas iguales o mejores que ICP-MS con una economía de gasto.

Creemos que dejando aparte el auténtico talón de Aquiles de ETAAS que es su carácter secuencial, inherente a su propia naturaleza, los datos y discusiones aquí aportados dejan claro que nuestro objetivo era viable y oportuno para el laboratorio. El objetivo no puede cumplirse en su totalidad pues son muchos las situaciones analíticas que merecen estudio y hacia la que el Grupo de Investigación Applied Instrumental Methods dirigirá sus esfuerzos en un futuro inmediato.

Introducción

INTRODUCCIÓN

A pesar de los avances tecnológicos en el campo analítico experimentados en los últimos años, la mayor parte de los instrumentos existentes no pueden manejar directamente muestras con matrices complejas. Esto obliga a incluir un paso previo de tratamiento de la muestra. La transferencia de material de una fase a otra es el procedimiento más ampliamente utilizado para la separación de una especie química, bien de la matriz, bien de otros componentes con los que coexiste. La extracción líquido-líquido o "con disolventes" está basada en el principio de que un soluto o analito puede distribuirse en una cierta proporción entre dos disolventes inmiscibles, uno de los cuales es por lo general una disolución acuosa (fase dadora) y el otro un disolvente orgánico (fase aceptora).

La espectrometría de absorción atómica (AAS) utiliza la capacidad de los átomos gaseosos libres para absorber la radiación electromagnética a longitudes de onda específicas correspondientes a las diferencias en los niveles de energía en los átomos. A fin de que la absorción se produzca, la energía de la radiación incidente debe ser idéntica a la diferencia de energía entre los estados fundamental y excitado [1-3]. Desde el punto de vista práctico, en general las muestras se tratan para originar disoluciones acuosas que se introducen en un dispositivo llamado atomizador para generar los átomos libres. El primer atomizador fue la llama (FAAS). El empleo de fuentes monocromáticas (lámpara de cátodo hueco) permite el uso de un sistema monocromador de baja resolución, lo que abarata el instrumento. El análisis cuantitativo se realiza por comparación de la intensidad de la fuente de luz antes de entrar al atomizador (haz incidente, I_0) con la emergente (haz transmitido, I) usando un sistema de detección óptica. El logaritmo del cociente de estas dos intensidades, absorbancia (A), es directamente proporcional a la concentración de analito (C) en el atomizador: $A = \log (I_0/I) = k.b.C$, donde k es una constante de respuesta que depende tanto del instrumento como del analito y b es el camino óptico en el atomizador. La representación gráfica de la respuesta del detector frente a concentraciones conocidas de analito permite calcular la ecuación anterior de forma que para una disolución de concentración desconocida, medida su respuesta es

inmediato el cálculo de su concentración. Utilizando la llama se pueden conseguir sensibilidades de orden de µg mL^{-1} para muchos analitos.

Una alternativa a la llama es el uso de atomizadores electrotérmicos para AAS (ETAAS). Estos dispositivos son tubos de grafito comúnmente de 3 a 6 mm de diámetro interior y 20 a 40 mm de longitud que se calientan al actuar como resistencia eléctrica al paso de una corriente eléctrica. En contraste con FAAS, ETAAS permitir el uso de volúmenes de muestra muy pequeños con límites de detección mejores. En efecto, al confinarse la muestra en un volumen pequeño y permanecer en estado neutro y gaseoso expuesta a la radiación procedente de la fuente durante mucho más tiempo que en FAAS, la sensibilidad alcanza el orden de µg L^{-1}. La Figura 1 muestra una comparativa de los límites de detección (LOD) recogidos de la bibliografía para AAS de llama (FAAS) y ETAAS. De modo comparativo se incluyen los LOD para espectrometría de emisión atómica (AES) con plasma inductivamente acoplado (ICP) y para espectrometría de masas acoplada a ICP (ICP-MS). Nótese que la sensibilidad de ETAAS es mejor que la proporcionada por ICP-AES e iguala a ICP-MS en muchos elementos.

Estas excelentes características han permitido el continuo desarrollo y aplicación de ETAAS en una amplia variedad de campos científicos

En 1999 Bernhard Welz afirmaba en un artículo [4] que la Espectrometría de Absorción Atómica estaba de nuevo en estado de buena esperanza a sus 45 años en referencia a los importantes desarrollos que estaban acaeciendo y al nuevo futuro que podía vislumbrarse. Hoy, 13 años después, podemos afirmar que una de sus principales variantes, la Espectrometría de Absorción Atómica con Calentamiento Electrotérmico, ha alumbrado nuevas posibilidades consecuencia de su relación con las técnicas de microextracción.

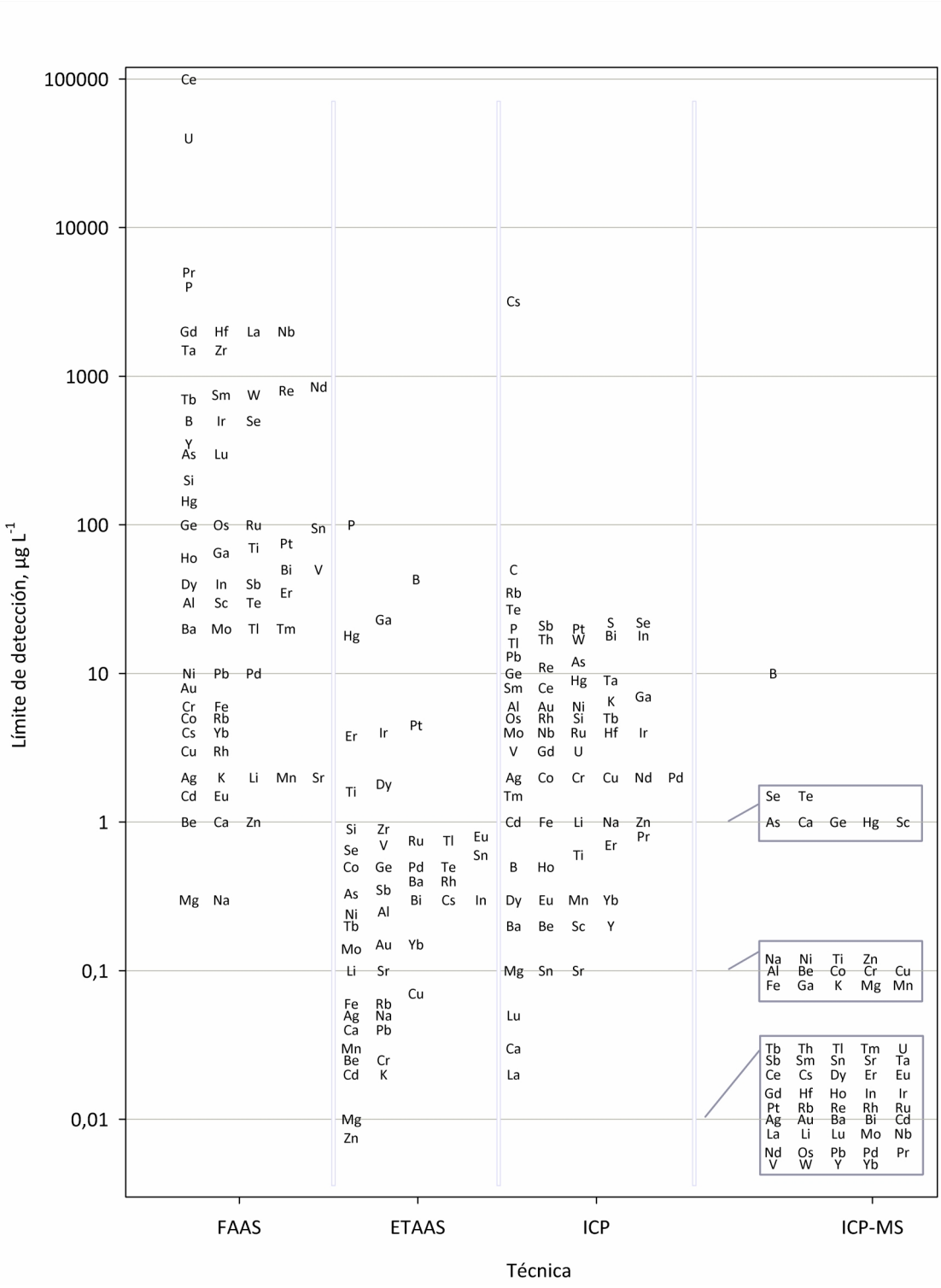


Figura 1: Límites de detección recogidos de la bibliografía para los elementos químicos más habituales por FAAS, ETAAS, ICP e ICP-MS

Pero hagamos un poco de historia. Como ya se ha dicho [4], la Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) no es algo que entusiasme a primera vista, hay que acercarse y mirar al menos dos veces para notar su encanto. Quizás por esto tuvo que pasar casi un siglo desde que los desarrollos de Kirchhoff y Bunsen [5-7] llamaron la atención de Alan Walsh [8], quien reconoció la importancia de los espectros de absorción respecto de los de emisión. Aunque Alkemade y Milatz publicaron dos artículos [9,10] el mismo año que Walsh realizó su primera publicación [11], fue éste último el que con su tesón logró introducir la técnica en el mundo científico trabajando con insistencia y sin desánimo. Cuentan que en 1952, cuando Walsh llamó a su colega John Willis, y le mostró sus primeros experimentos con AAS, la respuesta de su colega no pudo ser más decepcionante: "¿y qué?" [8]. Esta falta de interés se mantuvo durante la presentación del primer espectrómetro de absorción atómica en Melbourne en 1954. La única persona que se entusiasmó con la AAS a primera vista en estos primeros años fue Boris L'vov, quien más tarde publicó un artículo en donde calificó a Walsh como un visionario [12]. En estos primeros años la AAS se utilizaba con llama y se vendía como "usted simplemente aspira la disolución usando este capilar y aquí tiene el resultado". Esta simplicidad llevó al propio Walsh a preguntarse en 1974 [13] si la AAS estaba estancada o embarazada. Evidentemente se trataba de lo segundo. Para entonces ya había nacido un nuevo hijo, el horno de grafito, a cuya difusión contribuyeron L'Vov [14] y el concepto de horno con temperatura estabilizada en plataforma (STPF) desarrollado por Slavin [15] convirtiéndolo en el nuevo motor de la AAS durante la década de 1980.

Cuando la AAS estaba en pleno auge y, los grupos de investigación estaban desvelando los mecanismos de atomización y los efectos de interferencias convirtiéndola en una técnica robusta, un científico de renombre predijo de nuevo el fin de la AAS. Hieftje [16] vaticinó que los desarrollos en espectrometría de emisión con plasma de acoplamiento inducido y espectrometría de masas (ICP-AES e ICP-MS) harían que la AAS pasara por momentos difíciles. Su pronóstico concluía que de seguir así la tendencia, era evidente la desaparición de los instrumentos comerciales de AAS hacia el año 2000.

Sin embargo, esta predicción no se ha cumplido. El sistema de corrección de fondo por efecto Zeeman, la detección multielemental en AAS, la introducción de los detecto-

res en estado sólido, el acoplamiento del Análisis por Inyección en Flujo [17,18], el muestreo sólido o de suspensiones [19-20], las posibilidades de especiación sin proceso cromatográfico [21], calibración en gradiente [22], fuentes de laser sintonizable [23] y fuentes luminosas continuas [24] entre otros llevaron a Welz a afirmar en 1999 [4] que la AAS todavía gozaba de tan buena salud que hasta parecía ser capaz de alumbrar una nueva vida.

En la actualidad, el desarrollo de los sistemas de ICP e ICP-MS individuales o asociados a sistemas cromatográficos han alcanzado un lugar predominante debido a la excelente sensibilidad que ofrecen y el hecho de que es una técnica multielemental. Así en el análisis de rutina y en procesos de especiación podemos decir que resultan imprescindibles. Sin embargo, siguen siendo técnicas de adquisición y mantenimiento costosos que no todos los laboratorios pueden permitirse.

La Tabla 1 muestra el costo anual en dólares estimado (hace algunos años) para un instrumento de cada una de estas técnicas que trabajara durante 1000 horas [25]. En nuestra opinión el costo asignado al fungible de ETAAS es demasiado elevado, cosa por otra parte razonable si tenemos en cuenta que el estudio ha sido realizado por un investigador claramente volcado hacia ICP-MS [26].

Tabla 1: Estimación del costo anual en dólares de algunas técnicas espectroscópicas.

Técnica	*Gases*	*Consumo eléctrico*	*Fungible*	*Total*
FAAS	2500	200	1300	4000
ETAAS	200	400	5000	5600
ICP	3500	1000	2300	6800
ICP-MS	3500	1000	11000	15500

La característica multielemental de las técnicas basadas en plasma provoca que cuando se evalúa el costo por muestra, los datos les sean claramente. La Tabla 2 recoge esta información.

Cuando la actividad a realizar no requiere la determinación multielemental por muestra, sino la determinación del contenido de uno o unos pocos analitos a muy baja concentración, la Espectrometría de Absorción Atómica con Calentamiento Electrotérmico (ETAAS), combinada con las modernas técnicas de microextracción, puede ser una

alternativa al empleo de ICP-MS y satisfacer los requisitos cada vez más exigentes de las normativas internaciones sobre concentraciones límite de determinados elementos en muestras de alimentos o ambientales que pueden representar riesgo para la salud.

Tabla 2: Estimación del costo en dólares por muestra suponiendo 10 o 1 analitos en cada muestra.

Técnica	*10 analitos por muestra*	*1 analito por muestra*
FAAS	0.22	0.02
ETAAS	5.60	0.56
ICP	0.34	0.34
ICP-MS	0.78	0.78

Como ya se ha dicho, pese a los importantes avances tecnológicos la mayoría de los instrumentos analíticos no pueden manejar directamente muestras complejas, por lo que el pretratamiento de la muestra suele ser una etapa obligada antes del análisis instrumental. El objetivo principal del pretratamiento es simplificar y concentrar los analitos de interés, al tiempo que se sitúan en un medio que sea compatible con la técnica analítica de determinación. La extracción líquido-líquido (LLE), basada en la transferencia del analito desde la muestra acuosa a un disolvente inmiscible con ella, es muy utilizada para la preparación de muestras. No obstante, en su práctica convencional presenta algunas deficiencias tales como la formación de emulsiones, el uso de relativamente grandes volúmenes de muestra y disolventes orgánicos tóxicos y, por tanto, la generación de gran cantidades de contaminantes, lo que hace que, en términos relativos y actuales, el empleo intensivo de la LLE clásica sea caro, lento y poco amigable con el medioambiente.

Otra técnica muy empleada para la preparación de la muestra es la extracción en fase sólida (SPE). Aunque se utiliza mucho menos que la extracción con disolventes, su empleo puede considerarse significativo, necesitando, habitualmente, una etapa extra de desorción del analito en un pequeño volumen. Aunque la SPE puede automatizarse el proceso se complica y aumenta su costo [27-28]. En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para adaptar los métodos de separación existentes y desarrollar nuevas metodologías que permitan ahorrar tiempo, trabajo y materiales. La miniaturización ha sido clave para el logro de estos objetivos.

La microextracción en fase sólida (SPME) [29] despertó el interés por las técnicas miniaturizadas. En esta técnica los analitos de polaridad baja o media son extraídos desde muestras acuosas o gaseosas en una fibra polimérica sólida. La extracción se produce por difusión pasiva, y el rendimiento depende del tipo de fibra y del coeficiente de reparto del analito. Es una técnica relativamente rápida, portátil y fácil de utilizar, que se puede automatizar con al menos una parte de la instrumentación analítica disponible. Sin embargo, las fibras son caras y, en algunas aplicaciones, de vida limitada.

La microextracción en fase líquida (LPME) es una técnica de pretratamiento miniaturizado que surgió a mediados de la década de 1990 como una alternativa a SPME [30-31].Como su nombre indica, en LPME la extracción de los analitos desde la fase acuosa se realiza en un volumen de fase orgánica muy pequeño, de apenas unos pocos microlitros. Supera con creces a LLE e incluso a SPME en algunos aspectos (sus prestaciones no dependen del fabricante de la fibra, mínimas posibilidades de contaminación cruzada, más económica, etc.) [32-33]. Presenta una amplia gama de variantes. Así, en un intento de reducir aún más el consumo de disolvente al tiempo que aumentar el factor de preconcentración se desarrolló la microextracción en una sola gota (SDME) [31-34]. Sin embargo, este procedimiento presenta algunos inconvenientes como el hecho de que la gota se vuelve inestable debido a la agitación mecánica de la disolución, excesivo tiempo para alcanzar el equilibrio entre ambas fases y el debido a la formación de burbujas de aire [35]. La solución a la inestabilidad de la gota puede lograrse confinando la fase extractante dentro de un soporte inerte como una fibra hueca. Nació así lo que se denomina microextracción líquido-líquido en fibra hueca (HF-LPME) [36]. En general, la eficiencia del proceso HF-LPME es superior a la de SDME debido a que la matriz de la fase acuosa no está en contacto íntimo con la fase extractante. La extracción en el punto de nube (CPE) es otra posibilidad que se basa en la separación de fases, que se produce cuando disoluciones acuosas conteniendo tensioactivos no iónicos se calientan por encima de la temperatura crítica llamada punto de nube [37]. La extracción líquido-líquido homogénea (HLLE), por su parte, utiliza fenómenos de separación de fases de una disolución homogénea mediante el empleo de elevadas concentraciones salinas, un tercer disolvente o un tensioactivo perfluorado [38-39]. Más recientemente se ha propuesto una técnica que consiste en la solidificación de la fase extractante (disolvente orgánico

de punto de fusión próximo a la temperatura ambiente) que al ser de menor densidad que la fase dadora flota en el vortex de agitación (LPME-SFO) [40-41]. La combinación de los sistemas de microextracción con los ultrasonidos da lugar a lo que se conoce como microextracción asistida por ultrasonidos (USAEME) [42]. La radiación de ultrasonido es una herramienta eficaz para facilitar el fenómeno de emulsión y acelerar la transferencia de fase debido al aumento de la superficie de contacto. De esta forma, la velocidad de extracción incrementa reduciendo significativamente el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso de pretratamiento. La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) abunda en esta misma dirección. En este caso el empleo de un tercer disolvente miscible tanto con la fase dadora como la aceptora posibilita el fraccionamiento de la fase aceptora en microgotas acelerando el proceso de extracción [43]. La fase aceptora se separa fácilmente por centrifugación.

Parece lógico pensar que toda extracción en fase líquida involucre tan sólo líquidos inmiscibles entre sí. Los disolventes como acetonitrilo, acetona, 2-propanol, carbonato de propileno, metanol, etanol y dimetilsulfóxido, no pueden utilizarse en extracción líquido-líquido (LLE) debido a su miscibilidad con agua en todas las proporciones [44]. Evidentemente, de ser posible la separación de estos disolventes de la fase acuosa, el campo de aplicación de LLE aumentaría extraordinariamente. En este sentido se ha propuesto el empleo de carbonato de propileno como extractante ya que si bien este disolvente y el agua son una misma fase a elevadas temperaturas, al disminuir ésta se obtiene una separación de fases. Durante este proceso secuencial se consigue la separación de los analitos en la fase orgánica [45]. Del mismo modo, la acetona se puede separar de una fase orgánica utilizando una elevada concentración salina (efecto "salting out ") porque se produce un descenso en la solubilidad mutua de los disolventes [46]. A este proceso se le denomina extracción líquido-líquido homogénea (HLLE), como ya se ha indicado. Esta técnica puede utilizarse también con sistemas de tres disolventes como agua/metanol/cloroformo, donde al principio únicamente existe una fase homogénea y después de la adición de una elevada concentración salina se consigue la separación en dos fases quedando el cloroformo sedimentado [47]. En otros casos es un cambio de pH el que produce la separación de fases. Así, en un sistema ternario agua/ácido acético/cloroformo existe una sola fase debido a la solvatación de las moléculas de ácido acé-

tico por pequeñas cantidades de cloroformo. Cuando se añade hidróxido sódico al medio, el acético se neutraliza, disminuye la solvatación y se forma un sistema inmiscible agua/cloroformo [48]. Una modificación sustancial de HLLE que utiliza volúmenes de fase orgánica mucho más pequeños y en la que la separación de fases se produce al tiempo que la extracción, constituye lo que se ha denominado microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), también aludida en el párrafo anterior.

Las técnicas LPME son simples, rápidas, de bajo costo y pueden considerarse como métodos de preparación de muestra "verdes" debido al bajo consumo de disolventes. La selección de la metodología LPME más adecuada depende del tipo de analito que se quiere determinar, la complejidad de la matriz y la compatibilidad del detector con la fase extractante empleada. Sin embargo, con independencia de esta consideración, podemos hacer una comparación crítica entre las técnicas LPME atendiendo al factor de enriquecimiento alcanzado, lo que inevitablemente afectará a la sensibilidad, eficiencia de la microextracción, precisión, selectividad y simplicidad del procedimiento.

Se define el factor de enriquecimiento (EF) como el cociente entre la concentración final de analito en la fase aceptora y su concentración inicial en la fase dadora [49]. En general, cuando se trata de un sistema de dos fases, se obtienen elevados EF con DLLME y DLLME-SFO, donde existe una elevada área de contacto entre los disolventes, mientras que en otras técnicas como DSDME y HF-LPME, para las que el área de contacto es menor, los EF suelen ser más pequeños. También se consiguen elevados EF con el empleo de microextracción en barra agitadora (SBME) debido al movimiento de la barra en la disolución de analito que facilita la transferencia. En el caso de sistemas líquido-líquido-líquido se pueden conseguir elevados FE con analitos ionizables y volátiles o semivolátiles utilizando LLLME, HF-LLLME y HS-SDME.

Se define la eficiencia de extracción (EE) como el porcentaje de la cantidad total de analito inicialmente presente en la fase dadora que se transfiere a la fase aceptora cuando el proceso se detiene para la medida [50]. En este caso es evidente que los mayores valores de EF se han de obtener en las técnicas en las que la fase aceptora se encuentra en forma de gota suspendida como ocurre en DSDME o SFOME. A su vez la EF aumenta con el área interfacial y así los mayores valores se encuentran en DLLME frente

a HF-LPME. Nótese que es posible conseguir elevados valores de EF a partir de moderados valores de EE actuando sobre los volúmenes de fase aceptora. Así por ejemplo podemos aumentar la EE en HF-LLLME utilizando fibras huecas largas [51], lo que inevitablemente provoca un descenso en el valor de EF.

En cuanto a la precisión, los mejores valores se consiguen cuando los procesos de microextracción se mantienen hasta alcanzar el equilibrio químico completo [52], si bien también puede conseguirse adecuada precisión trabajando en condiciones de no equilibrio como ocurre en DSDME y LPME-SFO. Por otra parte, la selectividad más alta se consigue con los sistemas de tres fases como LLLPME, HF-LLLPME y HF-SDME debido a la naturaleza del proceso de extracción involucrado. El empleo de fibra hueca o barra agitadora permite además el paso únicamente de pequeñas moléculas por los poros [52].

Finalmente, otro aspecto importante a discutir es la sencillez de operación. Creemos que el lector, a la vista de lo expuesto, ya tendrá en su mente una idea sobre qué procedimiento resulta más sencillo de aplicar. No obstante podemos decir que será, en principio, aquel procedimiento que utilice menor número de etapas. En este sentido SDME permite realizar la separación, preconcentración, derivatización y limpieza en un solo paso, mientras que otras técnicas como HF-LPME requieren varias etapas. En SBME existe una manipulación excesiva antes y después de la extracción. DLLME exige la inyección conjunta de dispersante y extractante junto con la centrifugación posterior. Sin embargo, en este caso, el proceso de extracción es tan rápido que la elevada frecuencia de muestreo compensa la pequeña manipulación necesaria.

Para escoger la técnica de extracción adecuada hay que considerar muchos factores como es la eficiencia de la extracción, frecuencia de muestreo, costo del equipamiento de laboratorio, complejidad del método, cantidad de disolvente orgánico, nivel de preconcentración, tolerancia a las interferencias, necesidad o no de reacciones previas del analito y robustez del método. La selección no es fácil por la diversidad de características que se comentan a continuación.

En este sentido SDME ha sido propuesta por algunos como un procedimiento con mínimo consumo de muestra, barato y muy bajo consumo de disolvente orgánico [31].

No requiere preacondicionamiento como ocurre en SPME donde la fibra debe pretratarse para conseguir buena eficiencia. Pero también presenta inconvenientes como los que se derivan de la inestabilidad de la gota, su pequeño tamaño que reduce la efectividad de la extracción y la relativamente escasa variedad de disolventes de los que se dispone. Además la reproducibilidad puede ser baja cuando se produce la disolución parcial del disolvente en la fase dadora. Esta técnica no resulta adecuada para matrices complicadas porque disminuye la estabilidad de la gota y la transferencia de fases.

Con HF-LPME se evitan estos inconvenientes. El hecho de que la fibra es de un solo uso evita la contaminación cruzada. El pequeño tamaño de poro de las fibras impide que las partículas de la muestra entren en la fase orgánica. Se ha mostrado como una técnica muy útil para extraer medicamentos y metabolitos desde matrices biológicas y contaminantes desde muestras ambientales. Entre sus desventajas podemos citar que la existencia de la membrana reduce la velocidad de extracción aumentando el tiempo del proceso. Si se trata de HF-LPME de dos fases, el consumo de disolvente orgánico es mayor. La aparición de burbujas en la superficie de la membrana durante la extracción y la adsorción de sustancias hidrofóbicas procedentes de muestras complejas reducen la velocidad de transporte.

DLLME se presenta, en nuestra opinión, como la alternativa más eficaz para resolver estos inconvenientes. Comparada con las otras técnicas presenta tiempos de extracción muy cortos, simplicidad de uso, bajo costo y factores de enriquecimiento muy altos. Entre los inconvenientes que presenta podemos citar la dificultad para poder desarrollar sistemas automatizados y su difícil aplicación en matrices complejas. Buena prueba de su importancia es el gran número de publicaciones y revisiones de las que ha sido objeto en los últimos años [53-60].

Todas estas técnicas de microextracción se aplican tanto en el campo de la determinación de compuestos orgánicos como especies inorgánicas. En esta Memoria nos hemos ocupado de su aplicación a la determinación de iones inorgánicos, campo en el que estas técnicas ofrecen una nueva dimensión al resultar herramientas muy válidas para el pretratamiento y preconcentración de los analitos hasta niveles cuantificables por medio de una instrumentación habitual en todo laboratorio.

Se atribuye a Chamsaz y colaboradores [61] la primera combinación de LPME con espectrometría atómica para la determinación de arsénico por formación de arsina *in situ* y preconcentración en una gota mediante HS-SDME. Desde entonces, el interés por esta combinación ha ido en aumento exponencial, de forma que se han publicado en 2007, 2008 y 2009 un total de 7, 18 y 29 artículos, respectivamente.

Recientemente se ha revisado de forma exhaustiva esta combinación de técnicas recogiéndose las principales características de cada una de las publicaciones realizadas hasta 2010 [62]. A modo de resumen podemos señalar que el mayor interés se ha suscitado sobre el empleo de las técnicas atómicas ETAAS y FAAS, ya que juntas constituyen el 80% del total de publicaciones. Si bien hay que mencionar que aunque FAAS es bastante utilizada por su asequibilidad en el laboratorio, es menos apropiada para el objeto de esta Memoria, mientras ETAAS resulta especialmente adecuada para el trabajo con volúmenes pequeños. En efecto, los elevados factores de enriquecimiento que se consiguen, junto con la facilidad de uso de volúmenes pequeños hace que ETAAS, ETV-ICP-MS, ETV-ICP-OES y GC-ICP-MS se prefieran frente a otras como FAAS, CV-AFS, ICP-MS e ICP-OES ya que de esta forma se evita la dilución del extracto enriquecido (Figura 2). En esta Figura se muestra también de qué forma se ha repartido el interés de los investigadores en la determinación de analitos inorgánicos con estas técnicas atómicas.

Hu y cols. [63-65] han utilizado extensamente pirrolidínditiocarbamato amónico (APDC) para la determinación de selenio mediante HF-LPME y DLLME con ETV-ICP-MS como detector. En sus trabajos, el APDC permite la formación de complejos neutros al tiempo que actúa como modificador químico [63] aumentando la sensibilidad y disminuyendo los efectos de memoria. También se ha utilizado este ligando para la determinación de vanadio con ICP-OES [64].

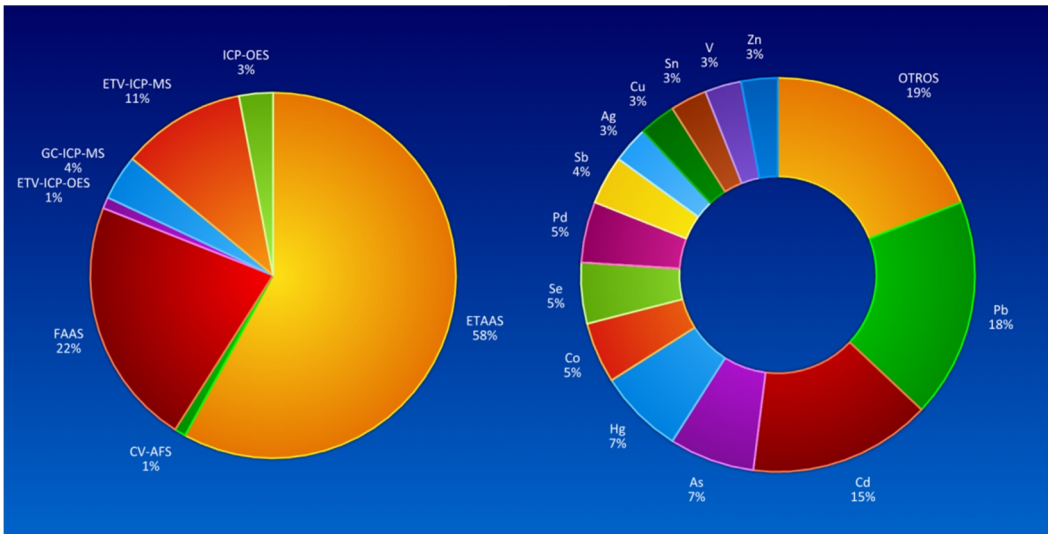


Figura 2: Frecuencia de empleo de las técnicas atómicas y elementos determinados

Otro agente quelatante ampliamente utilizado ha sido el dietilditiocarbamato sódico (DDTC). Así, se ha empleado para la determinación de Cu, Zn, Pd, Hg, Pb y Bi en muestras ambientales y biológicas usando HF-LPME [65].

Los agentes quelatantes en ocasiones permiten realizar procesos de especiación porque forman complejos neutros con los metales dependiendo del estado de valencia del mismo. Fan [66] usó SDME para extraer el complejo de N-benzoil-N-fenilhidroxilamina con Sb(III) en una gota de cloroformo utilizando ETAAS para la medida final. Por reducción de Sb(V) a Sb(III) y posterior extracción se obtiene el contenido total en antimonio y por diferencia el de Sb(V). Los mismos autores han propuesto un procedimiento similar para la determinación de cadmio utilizando ditizona como agente complejante.

SDME en flujo continuo se ha utilizado para la determinación de Be, Co, Pd y Cd en materiales de referencia biológicos [67]. En este caso se utilizó benzoilacetona como extractante y modificador químico en ETV-ICP-MS.

El Azul Victoria R se ha utilizado con DLLME para la determinación de Au(III) mediante la formación de un aducto neutro [68]. El ácido dietilditio fosfórico se ha empleado para la determinación de plomo en aguas naturales mediante DLLME utilizando tetracloruro de carbono como fase orgánica [69].

Además de para extraer metales, las reacciones de complejación también se han utilizado para la determinación de compuestos orgánicos. Zhu y cols. [70] y Zhao y cols. [71] han utilizado el 6-éter-18-corona que forma complejos con sales amónicas, lo que les ha permitido determinar aminas aromáticas con HF-LPME de tres fases. La misma estrategia se ha utilizado por otros autores empleando antibióticos o tetraciclinas en lugar de éteres de corona [72]. Por otra parte, Fan y Liu [73] utilizaron 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) para formar complejos con metilmercurio y fenilmercurio extraíbles mediante HF-LPME de dos fases.

Y, por último, señalaremos que, en la primera aplicación reseñable de la metodología que aquí nos ocupa Chamsaz y cols. utilizó LPME de espacio de cabeza [61] para retener la arsina formada en una disolución. La gota suspendida compuesta de piridina:alcohol bencílico 1:3 contiene dietilditiocarbamato de plata. La arsina reduce Ag^{+} a Ag^{0}. También se ha desarrollado un procedimiento similar para la determinación de cianuro en saliva humana y orina [74].

En definitiva, las aplicaciones de LPME en combinación con varios sistemas de detección atómica han experimentado un aumento espectacular en los últimos años, ampliando el alcance del análisis de elementos traza. El consumo insignificante de fase extractora (y generación de residuos) en las metodologías LPME permite poner de relieve su carácter verde con elevados factores de enriquecimiento. La combinación de LPME con ETAAS resulta muy eficiente debido a que esta última permite un empleo de microvolúmenes en mejores condiciones que cualquier otra.

La Figura 3 muestra el número acumulado de publicaciones entre 2000 y 2011 obtenido a partir de la base de datos Web of Knowledge de Thomson Reuters para trabajos de especiación que incluyen algún proceso de microextracción bien con LPME o SPME (A) y de entre éstos los que se han realizado utilizando como detector alguna técnica de AAS (B). Nótese el gran crecimiento de éstos durante los últimos años.

Si a lo comentado añadimos la posibilidad de especiación podemos afirmar que la AAS se encuentra de nuevo de "moda". El análisis de especiación de elementos, es decir, la determinación de diferentes compuestos o estados de oxidación de un elemento, o la fracción soluble bajo condiciones particulares en vez del contenido total, recibe cada vez mayor atención. El motivo es que la toxicidad o biodisponibilidad de un elemento cambia varios órdenes de magnitud dependiendo de su forma química o solubilidad. Un punto clave en el análisis de especiación es mantener la integridad de la muestra y las especies de interés durante el muestreo, almacenamiento y pretratamiento (disolución, extracción y preconcentración). Otro punto importante en este tipo de análisis es que el contenido de las diversas formas químicas de un elemento a especiar no pasa de ser una

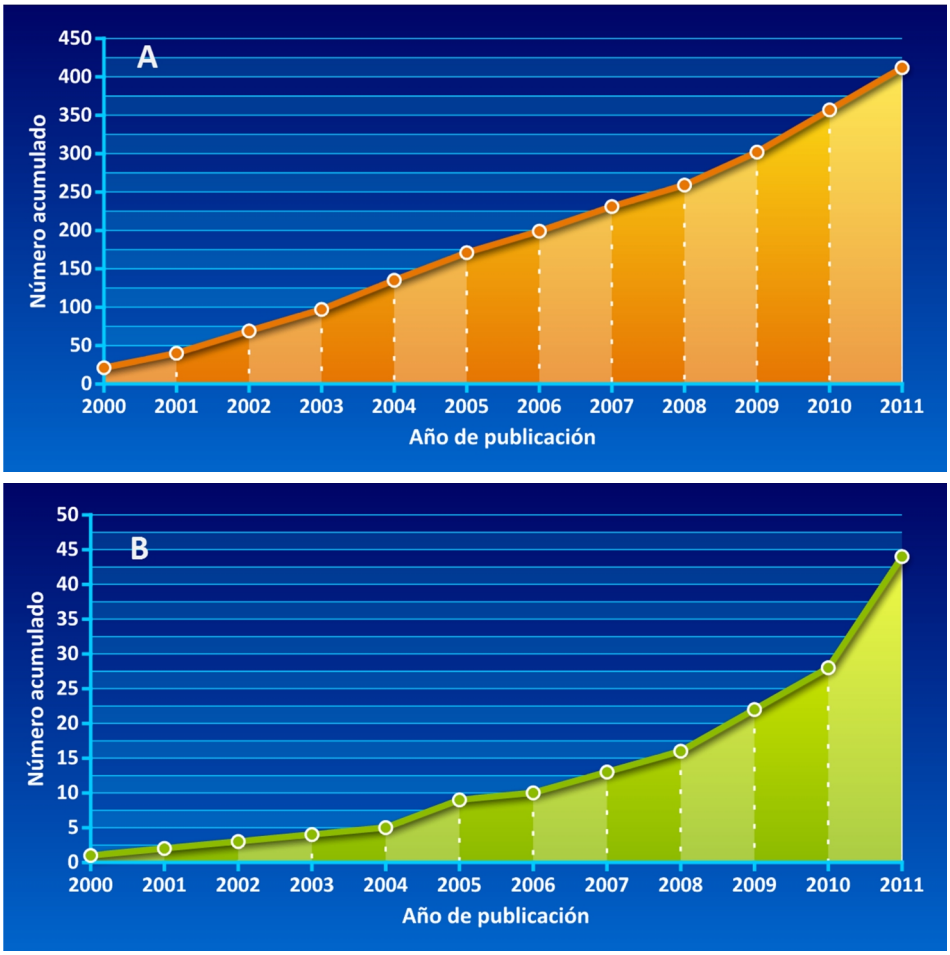


Figura 3: Número acumulado de publicaciones sobre procedimientos de especiación utilizando cualquier procedimiento de microextracción basado en LPME o SPME (A) y dentro de éstos aquellos que lo hacen con alguna técnica de detección por AAS (B).

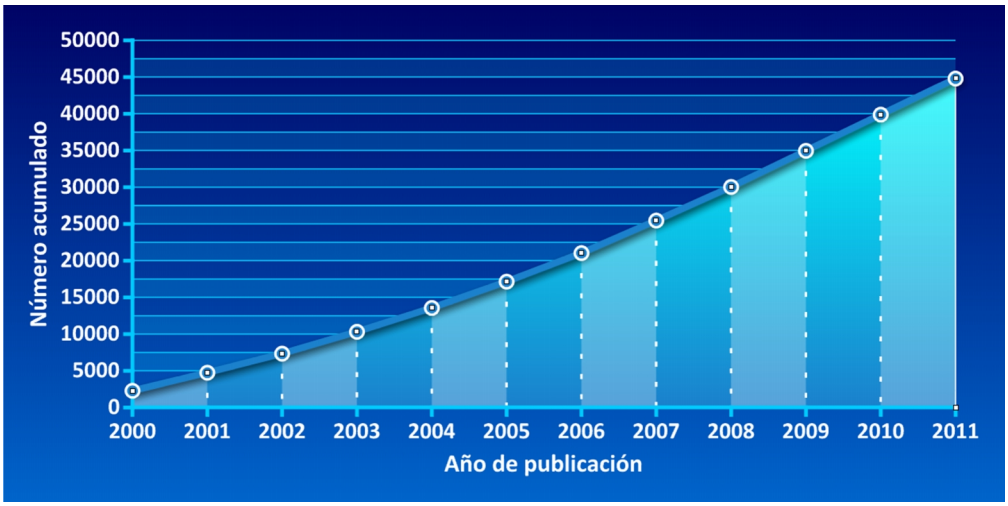


Figura 4: Número acumulado de publicaciones sobre especiación independientemente de la técnica de separación, tipo de analito y detección empleada.

fracción de trazas en muchos casos prácticos. Por tanto, únicamente los detectores más sensibles son adecuados para el análisis de especiación. La Figura 4 muestra el número acumulado de publicaciones sobre especiación entre 2000 y 2011 independientemente de la técnica de separación y detección utilizada. Los datos se han obtenido de la base de datos Web of Knowledge de Thomson Reuters.

Cuando nuestro interés se centra en varios compuestos de un mismo analito, se acopla un dispositivo cromatográfico a un detector atómico o de masas. Aunque el número de técnicas acopladas descrito en la bibliografía es enorme, y en ocasiones confuso [75], se aprecia un tendencia clara. En efecto, si nos fijamos en el número de publicaciones, durante la pasada década la cromatografía de líquidos (HPLC) acoplada a ICP-MS muestra el mayor crecimiento, muy por encima del acoplamiento GC con ICP-MS. Los motivos son claros. Por una parte, mientras que en HPLC solamente se precisa un proceso de extracción/preconcentración para limpiar la muestra y adecuarla a la sensibilidad del detector, en GC hay que incluir una etapa de derivatización para que la especie alcance la volatilidad necesaria. Por otro lado en HPLC existe una mayor variedad de soportes cromatográficos y fases móviles que permiten resolver más fácilmente la separación de especies. Además, el flujo de fase móvil y el caudal de aspiración del ICP son bastante compatibles. Finalmente, el detector ICP-MS tiene un gran sensibilidad y el acoplamiento HPLC-ICP-MS se encuentra comercialmente muy establecido. La seguridad de

los resultados se puede establecer utilizando métodos de dilución isotópica. La Figura 5 muestra el número acumulado de publicaciones sobre especiación entre 2000 y 2011 para trabajos utilizando como detector ICP o ICP-MS (curva a) y de entre ellos los que separan los analitos mediante HPLC (curva b) o GC (curva c).

Sin embargo, HPLC-ICP-MS también tiene desventajas. Por una parte es un instrumento mucho más caro tanto en el precio de compra como en el mantenimiento. A esto hay que añadir la necesidad de un operador muy experimentado. Además la capacidad multielemento de un ICP-MS generalmente no se puede aplicar en un análisis de especiación ya que el instrumento trabaja durante un tiempo prologado en el modo unimasa para conseguir la mayor información de las formas químicas de un elemento en una muestra.

Cuando el análisis de especiación se realiza con fines de investigación los aspectos de costo y tiempo no son los únicos determinantes. Sin embargo, no se puede decir lo mismo cuando esta actividad se ha de realizar en laboratorios de rutina obligados a cumplir los requisitos de calidad exigidos por la legislación. En estas condiciones, el análisis de especiación con HPLC-ICP-MS alcanza un coste que no se puede asumir. Por tanto es necesario investigar en el desarrollo de otras alternativas que permitan alcanzar esos fines a un costo razonable [21]. La Figura 6 muestra el número acumulado de publica-

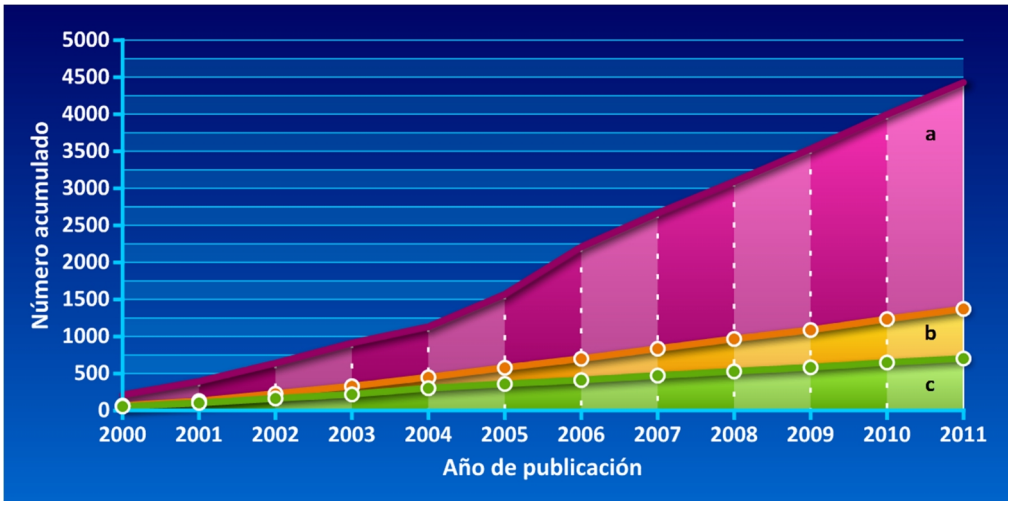


Figura 5: Número acumulado de publicaciones sobre especiación entre 2000 y 2011 para trabajos utilizando como detector ICP o ICP-MS (curva a) y de entre ellos los que separan los analitos mediante HPLC (curva b) o GC (curva c).

ciones sobre especiación utilizando bien alguna técnica AAS (curva a) o bien de emisión, como ICP o ICP-MS, (curva b) entre 2000 y 2011. Nótese que en ambos casos se trata de metodologías en constante expansión.

El primer instrumento específicamente diseñado para el análisis de especiación fue un GC acoplado a un plasma inducido por microondas (MIP). Aunque se han desarrollado interesantes trabajos con esta combinación, al cabo de los años, se ha abandonado el desarrollo en este campo porque la GC requiere un pretratamiento más laborioso de lo deseable. La gran cantidad de etapas involucradas provoca un aumento en el peligro de cometer errores y por tanto en la robustez de la técnica.

Comparativamente, y este es uno de los puntos principales sobre los que se basa la Memoria aquí presentada, la AAS es una técnica analítica muy barata, robusta y fácil de operar, selectiva y con gran tolerancia a interferencias matriciales. Aunque FAAS es la más utilizada, su sensibilidad no alcanza los valores necesarios. La ETAAS sin embargo, goza de la sensibilidad necesaria, pero adolece de un problema fundamental ya que no resulta adecuada para trabajar en flujo. Por tanto no hemos de intentar utilizarla en acoplamientos cromatográficos salvo cuando se determinan especies que forman compuestos volátiles en presencia de agentes reductores.

Evidentemente, la separación cromatográfica es la herramienta ideal, pero en algu-

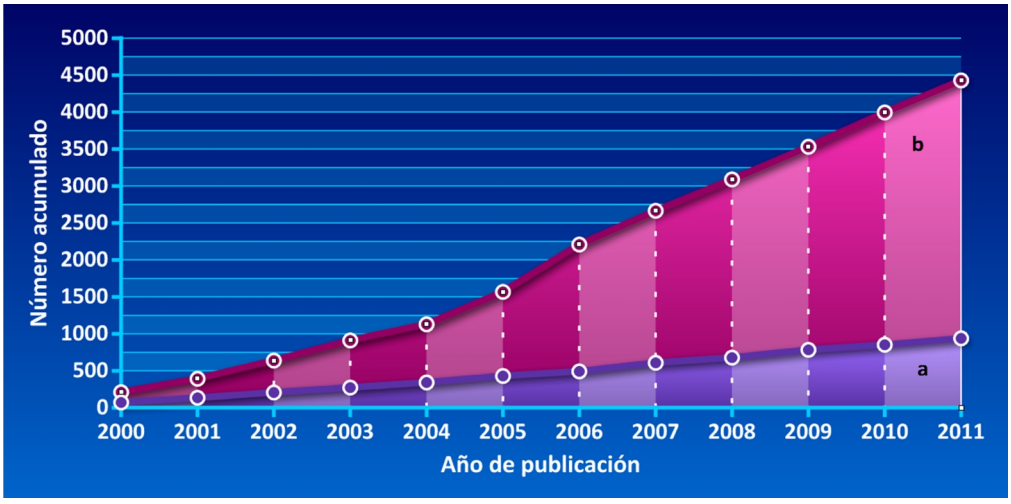


Figura 6: Número acumulado de publicaciones sobre especiación utilizando bien alguna técnica AAS (curva a) o bien de emisión y masas, como ICP o ICP-MS (curva b) entre 2000 y 2011.

nas situaciones (especialmente en trabajo de rutina) puede que no sea necesario separar todos los compuestos de un analito y determinarlos individualmente. Puede que sea suficiente con determinar los más tóxicos o un grupo de ellos como la suma de sus contenidos para distinguir entre, por ejemplo, niveles de toxicidad. Es decir, en ocasiones podemos sustituir la separación cromatográfica por una separación selectiva con las ventajas de poder utilizar una instrumentación más sencilla, acortar el tiempo de análisis y rebajar los costos sin perder seguridad. Quizás las primeras especiaciones, ya históricas, de este tipo sean la separación entre mercurio inorgánico y metilmercurio [76], la diferenciación por reducción selectiva entre arsénico inorgánico, DMA y MA [77] y la separación y determinación de Cr(III) y Cr(VI) [78].

En una amplia revisión sobre métodos no cromatográficos publicada en 2009 [79] se incide en el interés que los métodos basados en AAS, en combinación con adecuadas técnicas de microextracción, tienen en la especiación ya que su selectividad en la detección simplifica los tratamientos previos de las muestras. En efecto, el desarrollo de procesos no cromatográficos de análisis de especiación sigue siendo un área de investigación prometedora, así como su aplicación a los problemas analíticos [80]. En vista de ello, en esta Memoria se proponen algunos procedimientos no cromatográficos de aplicación práctica en la industria alimentaria y medioambiente.

BIBLIOGRAFÍA

1 D. J. Butcher y J. Sneddon, *A Practical Guide to Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, Wiley: (1998) New York.

2 B. Welz, *Atomic Absorption Spectrometry*, (3ra ed), (1999) Wiley, Chichester.

3 K. W. Jackson (ed), *Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry*, Wiley, (1999) New York.

4 B. Welz, *Atomic absorption spectrometry - pregnant again after 45 years*, Spectrochim. Acta Part B, 54 (1999) 2081-2094.

5 G. Kirchhoff, *Über das Verhältniszwischendem Emissionsvermögen und dem Absorptionsvermögen derKörperfürWärmeund Licht*, Poggendorfs Annalen der Physik und Chemie, 109 (1860) 275-301. (Traducción al ingles de F. Guthrie: G. Kirchhoff, *On the relation between the radiating and the absorbing powers of di fferent bodies for light and heat*, Phil. Mag., 20 (1860) 1–21.

6 G. Kirchhoff y R. Bunsen, *Chemical analysis by spectrum observations*, Philos. Mag., 20 (1860) 89-109.

7 G. Kirchhoff y R. Bunsen, *Chemical analysis by spectrum observations*, Philos. Mag., 22 (1861) 329-349.

8 A. Walsh, *Atomic absorption spectroscopy—stagnant or pregnant?,* Spectrochim. Acta Part B, 35 (1980) 643-652.

9 C. Th. J. Alkemade y J. M. W. Milatz, *A double-beam method of spectral selection with flames*, Appl. Sci. Res., B4 (1955) 289-299.

10 C. Th. J. Alkemade y J. M. W. Milatz, *Double-beam method of spectral selection with flames*, J. Opt. Soc. Am., 45 (1955) 583-584.

11 A. Walsh, *The application of atomic absorption spectra to chemical analysis*, Spectrochim. Acta, 7 (1955) 108-117.

12 B. V. L'vov, *Twenty-five years of furnace atomic absorption spectroscopy*, Spectrochim., Acta Part B, 39 (1984) 149-157.

13 A. Walsh, *Atomic absorption spectroscopy-stagnant or pregnant?*, Anal. Chem., 46 (1974) 698A-708A.

14 B. V. L'vov, *Electrothermal atomization - the way towards absolute methods of atomic absorption analysis*, Spectrochim. Acta Part B, 33 (1978) 153-193.

15 W. Slavin, D. C. Manning y G. R. Carnrick, *The stabilized temperature platform furnace*, At. Spectrosc., 2 (1981) 137-145.

16 G. M. Hieftje, *Atomic absorption spectrometry - has it gone or where is it going?*, J. Anal. At. Spectrom., 4 (1989) 117-122.

17 Z. L. Fang, M. Sperling y B. Welz, *Flow-injection online sorbent extraction pre-concentration for graphite furnace atomic absorption spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 5 (1990) 639-646.

18 Z. L. Fang y L. P. Dong, *Flow-injection online co-precipitation pre-concentration for electrothermal atomic absorption spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 7 (1992) 439-446.

19 U. Kurfürst (ed), *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, Berlin, (1998).

20 N. J. Miller-Ihli, *Automated ultrasonic mixing accessory for slurry sampling into a graphite furnace atomic absorption spectrometer*, J. Anal. At. Spectrom. 4 (1989) 295-297.

21 B. Welz, *Speciation analysis. The future of atomic absorption spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom, 13 (1998) 413–417.

22 I. López-García, P. Viñas, J. Gonzalvez y M. Hernández-Córdoba, *Calibration in flame atomic absorption spectrometry using time-dependent concentration profiles*, Spectrochim. Acta B, 55 (2000) 849-854.

23 A. Zybin, C. Schnürer-Patschan y K. Niemax, *Wavelength modulation diode laser atomic absorption spectrometry in modulated low-pressure helium plasmas for element selective detection in gas chromatography*, J. Anal. At. Spectrom., 10 (1995) 563-567.

24 J. M. Harnly, *The future of atomic absorption spectrometry: a continuum source with a charge coupled array detector*, J. Anal. At. Spectrom., 14 (1999) 137-146.

25 R. J. Thomas, *Money to burn, Today's chemist at work*, 9 (2000) 19-25.

26 R. J. Thomas y A. Beginner's, *Guide to ICP-MS*, Spectroscopy, 16(4) (2001) 38-42. http://www.chemistry.uoc.gr/spergantis/Env Anal Chem/pdf/ICPMS Part I Introduction.pdf.

27 L. Xu, C. Basheer y H. K. Lee, *Developments in single-drop microextraction*, J. Chromatogr. A, 1152 (2007) 184-192.

28 F. Pena-Pereira, I. Lavilla y C. Bendicho, *Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review,* Spectrochim. Acta Part B, 64 (2009) 1-15.

29 C. L. Arthur y J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers***,** Anal. Chem., 62 (1990) 2145- 2148.

30 H. Liu y P. K. Dasgupta, *Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop*, Anal. Chem., 68 (1996) 1817-1821.

31 M. A. Jeannot y F. F. Cantwell, *Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle*, Anal. Chem., 69 (1997) 235-239.

32 K. E. Rasmussen y S. Pederson-Bjergaard, *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*, Trac-Trends Anal. Chem., 23 (2004) 1-10.

33 E. Psillakis y N. Kalogerakis, *Developments in single-drop microextraction*, Trac-Trends Anal. Chem., 21 (2002) 54-64.

34 F. Ahmadi, Y. Assadi, S. M. R. Milani Hosseini y M. Rezaee, *Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detector*, J. Chromatogr. A, 1101 (2006) 307-312.

35 G. Shen y H. K. Lee, *Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides*, Anal. Chem., 74 (2002) 648-654.

36 S. Pedersen-Bjergaard y K. E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*, Anal. Chem., 71 (1999) 2650-2656.

37 M. F. Silva, E. S. Cerutti y L. D. Martinez, *Coupling cloud point extraction to instrumental detection systems for metal analysis*, Microchim. Acta, 155 (2006) 349-354.

38 Y. Takagai y S. Igarashi, *Homogeneous liquid-liquid extraction as a simple and powerfull preconcentration method for capillary gas chromatography and capillary electrophoresis*, Am. Lab. 34 (2002) 29-30.

39 S. Oshite, M. Furukawa y S. Igarashi, *Homogeneous liquid–liquid extraction method for the selective spectrofluorimetric determination of trace amounts of tryptophan*, Analyst, 126 (2001) 703-706.

40 M. R. Khalili-Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati y J. A. Jonsson, *A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop*, Anal. Chim. Acta, 585 (2007) 286-293.

41 M. R. Khalili-Zanjani, Y. Yamini, N. Yazdanfar y S. Shariati, *Extraction and determination of organophosphorus pesticides in water samples by a new liquid phase microextraction–gas chromatography–flame photometric detection*, Anal. Chim. Acta, 606 (2008) 202-208.

42 J. Regueiro, M. Llompart, C. Garcia-Jares, J. C. Garcia-Monteagudo y R. Cela, *Ultrasound-assisted emulsification–microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters*, J. Chromatogr. A, 1190 (2008) 27-38.

43 M. Rezaee, Y. Assadi, M. R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi y S. Berijani, *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction*, J. Chromatogr. A, 1116 (2006) 1-9.

44 A. Bidari, E. ZeiniJahromi, Y. Assadi y M. R. M. Hosseini, *Monitoring of selenium. in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by iridium-modified tube graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Microchem. J., 87 (2007) 6-12.

45 K. Murata, Y. Yokoyama y S. Ikeda, *Homogeneous liquid-liquid extraction method. Extraction of iron(III) thenoyltrifluoroacetonate by propylene carbonate*, Anal. Chem., 44 (1972) 805-810.

46 C. E. Matkovich y G. D. Christian, *Salting-out of acetone from water. Basis of a new solvent extraction system*, Anal. Chem., 45 (1973) 1915-1921.

47 L. Tavakoli, Y. Yamini, H. Ebrahimzadeh y S. Shariati, *Homogeneous liquid-liquid extraction for preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons using a water/methanol/chloroform ternary component system*, J. Chromatogr. A, 1196 (2008) 133-138.

48 S. Igarashi, N. Ide y Y. Takagai, *High-performance liquid chromatographic-spectrophotometric determination of copper(II) and palladium(II) with 5,10,15,20-tetrakis (4N-pyridyl) porphine following homogeneous liquid-liquid extraction in the water-acetic acid-chloroform ternary solvent system*, Anal. Chim. Acta, 424 (2000) 263-269.

49 J. M. Kokosa, A. Przyjazny y M. A. Jeannot, *Solvent Microextraction-Theory and practice*, John Wiley & Sons, (2009) New Jersey.

50 K. E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H. Grefslie Ugland y T. Grønhaug, *Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 873 (2000) 3-11.

51 S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen y T. G. Halvorsen, *Liquid-liquid extraction procedures for sample enrichment in capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. A, 902 (2000) 91-105.

52 E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Developments in liquid-phase microextraction*, TrAc-Trends Anal. Chem., 22 (2003) 565-574.

53 A. Zgola-Grzeskowiak y T. Grzeskowiak, *Dispersive liquid-liquid microextraction*, Trac-Trends in Analytical Chemistry, 30 (2011) 1382-1388.

54 M. Rezaee, Y. Yamini y M. Faraji, *Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method*, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 2342–2357.

55 M. Asensio-Ramos, L. M. Ravelo-Pérez, M. A. González-Curbelo y J. Hernández-Borges, *Liquid phase microextraction applications in food analysis*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 7415-7437.

56 A. A. Nuhu, C. Basheer y B. Saad, *Liquid-phase and dispersive liquid–liquid microextraction techniques with derivatization: recent applications in bioanalysis*, J. Chromatogr. B, 879 (2011) 1180–1188.

57 A. Jain y K. K. Verma, *Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review*, Anal. Chim. Acta, 706 (2011) 37– 65.

58 M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas y M. Valcárcel, *Sample treatments based on dispersive microextraction*, Anal. Methods, 3 (2011) 1719-1728.

59 C. Bosch Ojeda y F. Sánchez Rojas, *Separation and preconcentration by dispersive liquid–liquid microextraction procedure: recent applications*, Chromatographia, 74 (2011) 651–679.

60 D. Han y K. Ho Row, *Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples*, Microchim. Acta, 176 (2012) 1–22.

61 M. Chamsaz, M. H. Arbab-Zavar y S. Nazari, *Determination of arsenic by electrothermal atomic absorption spectrometry using headspace liquid phase microextraction after in situ hydride generation*, J. Anal. Atom. Spectrom., 18 (2003) 1279-1282.

62 F. Pena-Pereira, I. Lavilla y C. Bendicho, *Liquid-phase microextraction approaches combined with atomic detection: A critical review*, Anal. Chim. Acta, 669 (2010) 1-16.

63 L. Xia, B. Hu, Z. Jiang, Y. Wu, R. Chen y L. Li, *Hollow fiber liquid phase microextraction combined with electrothermal vaporization ICP-MS for the speciation of inorganic selenium in natural waters*, J. Anal. Atom. Spectrom., 21 (2006) 362-365.

64 L. Li y B. Hu, *Hollow-fibre liquid phase microextraction for separation and preconcentration of vanadium species in natural waters and their determination by electrothermal vaporization-ICP-OES*, Talanta, 72 (2007) 472-479.

65 L. Xia, Y.Wu y B. Hu, *Hollow-fiber liquid-phase microextraction prior to low-temperature electrothermal vaporization ICP-MS for trace element analysis in environmental and biological samples*, J. Mass. Spectrom., 42 (2007) 803-810.

66 Z. Fan, *Determination of antimony (III) and total antimony by single-drop microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 585 (2007) 300-304.

67 L. Xia, B. Hu, Z. Jiang, Y.Wu y Y. Liang, *Single-drop microextraction combined with low-temperature electrothermal vaporization ICPMS for the determination of trace Be, Co, Pd, and Cd in biological samples*, Anal. Chem., 76 (2004) 2910-2915.

68 M. Shamsipur y M. Ramezani, *Selective determination of ultra trace amounts of gold by graphite furnace atomic absorption spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction*, Talanta, 75 (2008) 294-300.

69 M. T. Naseri, M. R .M. Hosseini, Y. Assadi y A. Kiani, *Rapid determination of lead in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry*, Talanta, 75 (2008) 56-62.

70 L. Zhu, C. B. Tay y H. K. Lee, *Liquid-liquid-liquid microextraction of aromatic amines from water samples combined with high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 963 (2002) 231-237.

71 L. Zhao, L. Zhu y H. K. Lee, *Analysis of aromatic amines in water samples by liquid-liquid-liquid microextraction with hollow fibers and high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 963 (2002) 239-248.

72 A. Sarafraz-Yazdi, F. Mofazzeli y Z. Es'haghi, *A new high-speed hollow fiber based liquid phase microextraction method using volatile organic solvent for determination of aromatic amines in environmental water samples prior to high-performance liquid chromatography*, Talanta, 79 (2009) 472-478.

73 Z. Fan y X. Liu, *Determination of methylmercury and phenylmercury in water samples by liquid-liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis*, J. Chromatogr. A, 1180 (2008) 187-192.

74 S. Jermak, B. Pranaityte y A. Padarauskas, *Headspace single-drop microextraction with in-drop derivatization and capillary electrophoretic determination for free cyanide analysis*, Electrophoresis, 27 (2006) 4538-4544.

75 R. Lobinski, *Elemental speciation and coupled techniques*, Appl. Spectrosc., 51 (1997) 260A-278A.

76 L. Magos, *Selective atomic-absorption determination of inorganic mercury and methylmercury in undigested biological samples*, Analyst, 96 (1971) 847-853.

77 R. K. Anderson, M. Thompson y E. Culbard, *Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation*, Analyst, 111 (1986) 1143-1152.

78 M. Sperling, S. Xu y B. Welz, *Determination of chromium (III) and chromium (VI) in water using flow injection on-line preconcentration with selective adsorption on activated alumina and flame atomic absorption spectrometric detection*, Anal. Chem., 64 (1992) 3101-3108.

79 M. A. Vieira, P. Grinberg, C. R. R. Bobeda, M. N. M. Reyes y R. C. Campos, *Non-chromatographic atomic spectrometric methods in speciation analysis: A review*, Spectrochim. Acta Part B, 64 (2009) 459–476.

80 A. Gonzalvez, S. Armenta, M. L. Cervera y M. de la Guardia, *Non-chromatographic speciation*, Trac-Trend Anal. Chem., 29 (2010) 260–268.

Capítulo I

Determinación mediante ETAAS de Cr(VI) y Cr(III) en aguas y lixiviados obtenidos de juguetes previa microextracción dispersiva con TBP asistida por ultrasonidos

CONTENIDO

1.1. INTRODUCCIÓN....39

1.1.1. Principios de DLLME....43

1.1.2. Determinación de cromo por DLLME....49

1.2 PARTE EXPERIMENTAL....53

1.2.1. Instrumentación....53

1.2.2. Reactivos....55

1.2.3. Procedimiento....56

1.2.4. Determinación de cromo en muestras de agua....58

1.2.5. Determinación de cromo lixiviado de juguetes....58

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN....58

1.3.1. Efecto del pH....58

1.3.2. Efecto de sales inorgánicas....61

1.3.3. Efecto del volumen de fosfato de tributilo....62

1.3.4. Efecto de los ultrasonidos....64

1.3.5. Efecto del volumen de fase acuosa....67

1.3.6. Condiciones para la determinación de Cr(III)....68

1.3.7. Estudios de interferencias....69

1.3.8. Optimización del programa de calentamiento electrotérmico....70

1.3.9. Calibración....72

1.3.10. Determinación de cromo en muestras de agua y juguetes....73

1.4. CONCLUSIÓN....77

1.5. BIBLIOGRAFÍA....77

1.1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el desarrollo de metodologías rápidas y sensibles, con buena exactitud y precisión se ha convertido en un importante campo de investigación. A pesar de contar con instrumentación analítica sensible, ocurre con frecuencia que la matriz de la muestra origina importantes dificultades y es necesario el pretratamiento de las muestras para llevar a cabo tanto la separación de los analitos de interés como su preconcentración en caso necesario. El pretratamiento de matrices complejas con técnicas convencionales de separación como la Extracción Líquido-Líquido (LLE) o la Extracción en Fase Sólida (SPE) presenta algunos inconvenientes derivados del excesivo consumo de reactivos (principalmente disolventes orgánicos), tiempo de ejecución y dificultad de automatización. Resulta por tanto evidente el interés en el desarrollo de técnicas que sean, además de rápidas y fáciles de usar, económicas, simples, austeras en el consumo de sustancias nocivas y compatibles con la instrumentación analítica disponible en los laboratorios.

El pretratamiento de la muestra supone a menudo un cuello de botella en el proceso de medida, ya que suele ser lento y tedioso. En el análisis rutinario, la extracción líquido-líquido (LLE) es la técnica de preparación de muestra más extensamente usada, ya que con ella se consiguen los fines de aislamiento (limpieza), enriquecimiento y aumento de la señal analítica buscados. Sin embargo, en su metodología convencional se observan algunos defectos derivados del uso de importantes cantidades de disolventes orgánicos (generalmente peligrosos para la salud) y de muestra. Como consecuencia se generan grandes volúmenes de contaminantes al tiempo que el proceso resulta lento, caro, laborioso, poco amigable con el medioambiente y potencialmente proclive a la contaminación de la muestra, especialmente en el análisis de ultratrazas [1,2].

Las tendencias modernas en la Química Analítica se encaminan hacia la simplificación y miniaturización de los procedimientos de preparación de muestras y por ende a una reducción intrínseca de disolventes y reactivos, lo que provoca una drástica reducción de los deshechos de laboratorio [3,4]. En este contexto, como ya hemos comentado en la Introducción de esta Memoria, se han desarrollado recientemente diversas metodologías LLE no convencionales como: microextracción en una gota (SDME), extracción

en película humectante (WFE), extracción en punto de nube (CPE), extracción homogénea líquido-líquido (HLLE), microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) y microextracción dispersiva líquido-líquido basada en la solidificación de una gota orgánica flotante (DLLME-SFO).

La SDME está basada en la formación de una microgota de disolvente orgánico y su suspensión en la punta de una aguja de microjeringa. Esta gota puede estar bien inmersa en la muestra acuosa (quieta o en agitación), bien en el espacio gaseoso inmediatamente superior a la disolución acuosa dentro de un recipiente cerrado [5]. Si el microvolumen de fase aceptora no se encuentra dispuesto como se acaba de comentar sino que se encuentra dentro de una fibra hueca porosa de polipropileno tenemos lo que se denomina microextracción en fase líquida con fibra hueca (HF-LPME) [6]. Existen dos modalidades de este tipo de microextracción HF-LPME dependiendo de la naturaleza de la disolución contenida dentro de la fibra (disolución aceptora). Si se llena con el mismo disolvente orgánico con que se empapan los poros de la fibra, se tiene un sistema de dos fases donde el disolvente orgánico actúa también como disolución aceptora, mientras que si se llena con una disolución acuosa químicamente diferente a la disolución problema, estamos hablando de un sistema de tres fases [7].

El concepto de WFE está basado en la formación de una fina capa de fase orgánica en las paredes interiores de un serpentín de PTFE consecuencia de la interacción hidrofóbica entre el disolvente y el material de teflón [3]. Una vez que los analitos han sido preconcentrados en un pequeño volumen de un disolvente adecuado permite arrastrar la fase aceptora hacia el detector para su cuantificación. El procedimiento CPE está basado en la separación de fases que ocurre en disoluciones acuosas de tensioactivos no iónicos cuando se calientan por encima del llamado punto de nube. En este punto se separa de la fase acuosa una fase rica de tensioactivo, de pequeño volumen, que contiene el analito atrapado por estructuras organizadas de aquel [8].

Por otra parte, la extracción homogénea líquido-líquido (HLLE) utiliza el fenómeno de separación de fases desde una solución homogénea formada por una fase acuosa y un disolvente orgánico que en determinadas condiciones son miscibles. Por modificaciones en la temperatura, pH o fuerza iónica de la disolución se pueden separar ambas fa-

ses [9,10]. Puede considerarse, que el área superficial de la interface entre las dos fases (acuosa y orgánica) inicial es infinitamente grande. Por consiguiente, la agitación vigorosa previa no es necesaria. Generalmente, HLLE ha sido aplicada a sistemas binarios [11] y sistemas de disolventes miscibles ternarios [12].

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) es también un sistema ternario casi homogéneo. En este caso un disolvente inmiscible (fase aceptora) con la disolución acuosa (fase dadora) se dispersa finamente en ella debido a la presencia adicional de un tercer disolvente (dispersante) miscible en ambos. De esta forma se consigue formar en la disolución acuosa una fina "nube" de gotitas de disolvente inmiscible o fase aceptora en donde el analito es extraído rápidamente debido a la enorme superficie de contacto existente. Después de la centrifugación, la fase aceptora se condensa en el fondo del tubo y se retira con ayuda de una jeringa para llevarla al detector. La Figura 1.1 muestra un esquema del proceso y la Figura 1.2 una composición fotográfica en tiempo real sobre la formación de la nube dispersa.

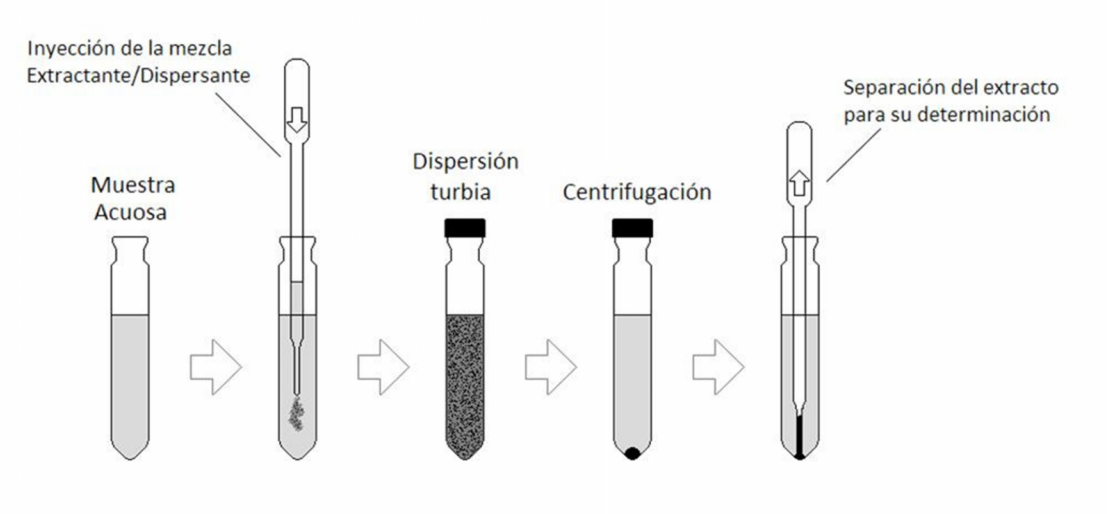


Figura 1.1: Esquema de un proceso de microextracción dispersiva líquido-líquido

En realidad la metodología DLLME es muy parecida a la HLLE de tres disolventes. La principal diferencia se encuentra en que mientras que en HLLE la mezcla de fase dadora y aceptora es completa (homogénea) antes de la separación, en DLLME no se alcanza este grado de mezcla y desde el primer momento se observan microgotas de fase aceptora. Ambas presentan una ventaja fundamental, la rapidez del proceso de extracción

merced a ese íntimo contacto entre fases, aunque DLLME consume menores volúmenes de disolventes. Con este procedimiento, cualquier componente en la fase dadora puede pasar a la fase aceptora directa o indirectamente mediante la previa (o simultánea) reacción de derivatización. De esta manera se produce el aislamiento del analito y su concentración en una magnitud tal que depende de la relación de volúmenes y el coeficiente de reparto del analito en ambas fases.

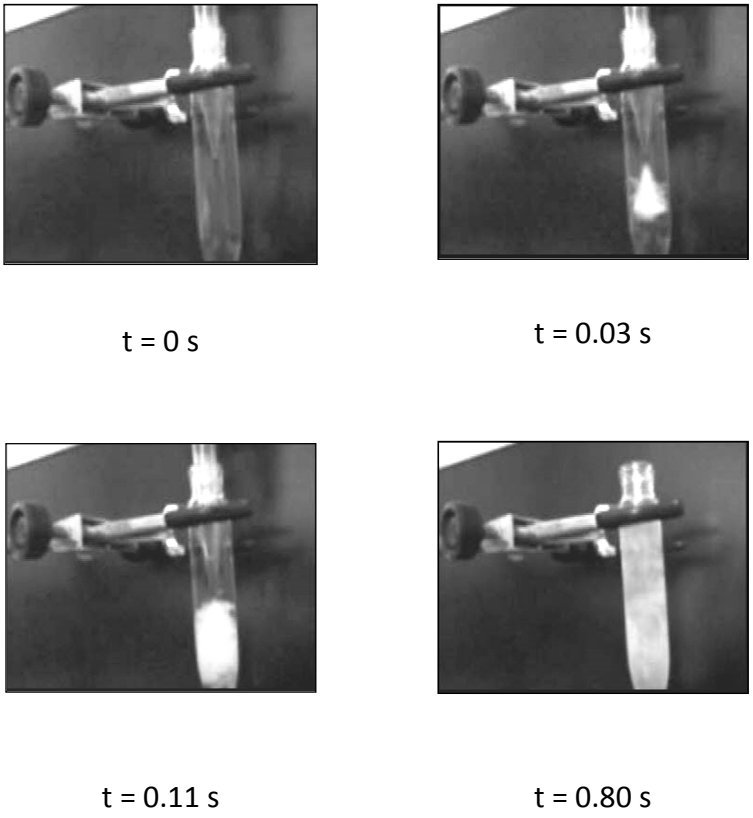


Figura 1.2. Fotogramas de la formación de una fase dispersa utilizando un disolvente orgánico (Cl_4C) y un dispersante (metanol).

Alternativamente, si la fase aceptora es menos densa que el agua y tiene un punto de fusión elevado se puede recurrir a su solidificación bajando la temperatura y recolección en estado sólido, dando lugar a lo que se conoce como microextracción dispersiva líquido-líquido por solidificación de un disolvente orgánico flotante (SFO-DLLME). La fase aceptora se deposita en un tubo cónico donde se calienta suavemente para fundirlo y así manipularlo correctamente para su introducción en el detector [13,14]. La Figura 1.3 muestra una imagen de este proceso.

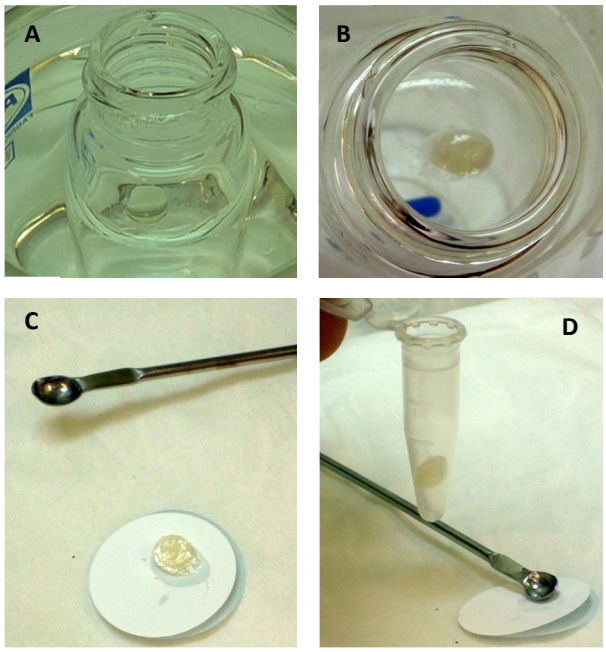


Figura 1.3: Etapas finales de un proceso de microextracción en gota flotante solidificada mostrando la gota en estado líquido por la temperatura (A), la gota solidificada al enfriar (B), su retirada de la disolución con ayuda de una espátula (C) y su colación en un pequeño vial para fundirla antes de llevarla al detector (D).

1.1.1. PRINCIPIOS DE DLLME

Como ya hemos comentado, la DLLME consiste en la inyección en la muestra acuosa conteniendo los analitos de una mezcla apropiada de fase extractante formada por un disolvente orgánico inmiscible en agua y un dispersante miscible en ambos. Como consecuencia, el disolvente orgánico se dispersa y aumenta el área superficial de contacto entre fases con lo que se produce la rápida extracción del analito. Seguidamente, por centrifugación de la dispersión se consigue el reagrupamiento del extractante orgánico

en el fondo del tubo, lo que genera un microvolumen de disolución que contiene el analito y que se llevará a la técnica de separación y/o detección apropiada.

DLLME es una técnica de extracción líquido-líquido miniaturizada en la que se utilizan microvolúmenes de extractante y se alcanza rápidamente el equilibrio de reparto del mismo. El coeficiente de distribución o coeficiente de reparto (K), que se define como el cociente entre las concentraciones de analito en la fase aceptora y dadora una vez alcanzado el equilibrio, ha de ser elevado (mayor de 500) para que la DLLME llegue a buen término, es decir, el analito ha de tener un elevado carácter lipofílico.

En DLLME se define Factor de Enriquecimiento (EF) como el cociente entre la concentración de analito en la fase aceptora al alcanzar el equilibrio y la concentración inicial de analito en la fase acuosa:

$$EF = \frac{[analito]_{aceptora,\,eq}}{[analito]_{dadora,\,inic}}$$

y se define Eficiencia de Extracción (EE) como el porcentaje de analito extraído a la fase aceptora:

$$EE = \frac{n_{aceptora}}{n_{inicial}} \cdot 100 = \frac{V_{aceptora} \cdot [analito]_{aceptora,eq}}{V_{dadora} \cdot [analito]_{dadora,inic}} \cdot 100 = \left(\frac{V_{aceptora}}{V_{dadora}} \right) \cdot EF \cdot 100$$

donde con *n* se indica los moles de analito en cada una de las fases.

El factor que más afecta a la eficiencia de extracción en el proceso DLLME es la naturaleza del extractante. Para su elección hay que tener en cuenta la densidad (ha de ser mayor que la del agua), capacidad para extraer al analito de interés y compatibilidad posterior con el detector. Los hidrocarburos halogenados tales como clorobenceno, cloroformo, tetracloruro de carbono y tetracloroetano son los más utilizados. Al aumentar el volumen de fase extractante disminuye el factor de preconcentración. Por tanto el valor más adecuado para éste volumen es aquel que satisface la situación de compromiso entre elevados factores de preconcentración y el mínimo volumen necesario para

aplicar la técnica de detección seleccionada. Los volúmenes habituales se encuentran en el intervalo de 5 a 100 µL.

El volumen de agente dispersante afecta a la formación de la fase dispersa, es decir, a la eficiencia con la que se dispersa en el disolvente extractante y por tanto a la eficiencia de extracción. Este volumen óptimo depende del volumen de fase extractante y fase acuosa utilizados. En general se emplean volúmenes en el intervalo de 0.5 a 1.5 mL. Aunque se conozca la solubilidad de la fase extractante en agua, la presencia del agente dispersante (acetona, acetonitrilo, metanol, etc.) altera este valor y en consecuencia siempre resulta imprescindible realizar experiencias de laboratorio para encontrar la composición idónea de los tres componentes. Hay que tener en cuenta que el dispersante habitualmente disminuye el coeficiente de reparto del analito, por lo que algunos autores han recurrido recientemente al empleo de ultrasonidos para generar la fase dispersa.

En DLLME, el tiempo de extracción es el tiempo que transcurre entre la inyección de la mezcla del solvente y el dispersante y la centrifugación. En realidad el tiempo de extracción tiene poco efecto en la eficacia del proceso debido a que el transporte del analito desde la fase acuosa (muestra) a la fase aceptora puede ser muy rápido, y el estado de equilibrio se alcanza de forma casi instantánea, lo que supone una notable ventaja.

La DLLME se ha utilizado extensamente en la determinación de distintos analitos en muestras acuosas [15] con multitud de técnicas de detección. Sin embargo, su empleo en matrices más complejas como materiales biológicos o alimentos se encuentra muy poco desarrollado debido a la necesidad de un pretratamiento de la muestra antes de aplicar la microextracción dispersiva.

Desde la primera configuración propuesta para DLLME, se han realizado grandes esfuerzos para conseguir enfoques más simples y eficientes que puedan ampliar las aplicaciones de la técnica. Estos estudios se han concentrado en la evolución de DLLME sobre tres temas principales: (a) los disolventes, (b) la mejora de la dispersión y (c) la simplificación de los procedimientos.

En lo que se refiere al empleo de disolventes, la investigación se ha centrado en la reducción de los volúmenes de extractante y dispersante [16,17], ampliación de sus capacidades extractantes con el empleo de disolventes menos densos que el agua y el uso de nuevos disolventes.

Una de las limitaciones del procedimiento DLLME convencional es la naturaleza de los disolventes extractantes, ya que han de ser más densos que el agua a fin de permitir la separación de fase por centrifugación. Para evitar esta limitación y facilitar el empleo de disolventes menos densos que el agua se han propuesto diferentes configuraciones en las que se habilita un estrechamiento del tubo en la parte superior para corregir una más cómoda separación del extractante [18-20].

La mejora en la dispersión del extractante en la muestra es otro aspecto fundamental que puede incrementar con el empleo de fuentes de energía externa. En este sentido, se ha desarrollado una nueva modalidad basada en el uso de la energía de ultrasonidos (USA-DLLME) para mejorar la dispersión tanto con el empleo de disolventes orgánicos [21] como líquidos iónicos [22], lo que le aporta al procedimiento un aspecto más amigable con el medioambiente. Alternativamente se puede sustituir el empleo del agente dispersante habitual (disolvente orgánico miscible) por un tensioactivo que provoca, en presencia de ultrasonidos, una emulsión (USAEME) [23]. Finalmente la emulsión se rompe en el proceso de centrifugación.

Aparte de las mejoras acerca de los disolventes y el proceso de dispersión, la simplificación de los procedimientos también es un aspecto clave en la evolución DLLME. Esta simplificación se enfoca principalmente hacia la etapa de separación, que quizás sea el mayor desafío de la técnica.

En este sentido se han publicado procedimientos con el empleo de disolventes menos densos que el agua que tienen la propiedad de solidificar a temperaturas próximas a la ambiente y por tanto se pueden separar de la disolución acuosa por simple enfriamiento después de la dispersión [24]. No siempre ha sido posible llevar a cabo esta idea por la dificultad de aglomerar todas las microgotas de disolvente durante el proceso de enfriamiento y, en ocasiones, ha sido inevitable recurrir a la centrifugación [25]. Otra

modificación interesante es el empleo de una jeringa como vaso de reacción, lo que facilita la separación de las fases cuando se emplean líquidos iónicos [26]. El empleo de una microcolumna empaquetada con bolitas de PTFE sirve para retener el disolvente dispersado en un flujo continuo de muestra. El proceso finaliza con la elución del disolvente retenido mediante el empleo de un pequeño volumen de otro disolvente adecuado [27]. Alternativamente, en ocasiones puede romperse la emulsión con el empleo de un disolvente adecuado evitando así la etapa de centrifugación [28].

Algunos de estos avances están muy limitados a situaciones concretas. Sin embargo el empleo de ultrasonidos se muestra como una alternativa general al empleo del dispersante que ha tenido amplia aceptación. La Figura 1.4 muestra el extraordinario crecimiento que ha experimentado el número de publicaciones sobre este tema en apenas tres años. Los resultados se han obtenido desde Web of Knowledge en una búsqueda realizada el 8 de Diciembre de 2011 sobre ultrasound → dispersive → determination → microextraction entre 2000 y 2011. La Figura 1.5 muestra la distribución por países de procedencia de los autores responsables de estas publicaciones. La hegemonía en este campo de la República Popular China resulta evidente. Aunque la mayoría de los artículos se refieren a la determinación de compuestos orgánicos, generalmente contaminantes ambientales y alimenticios, se recogen ocho publicaciones referentes a la determinación de especies inorgánicas. En este sentido se han publicado procedimientos con el empleo de disolventes orgánicos para la determinación con espectrofotometría visible ultravioleta de Ag [29], B [30] y Cu [31], Au [32] por ETAAS y compuestos organoarsenicales [33] y S [34] por GC-MS. Con el empleo de líquidos iónicos como extractantes se ha propuesto la determinación de Rh por FAAS [35] y Cd por ETAAS [36].

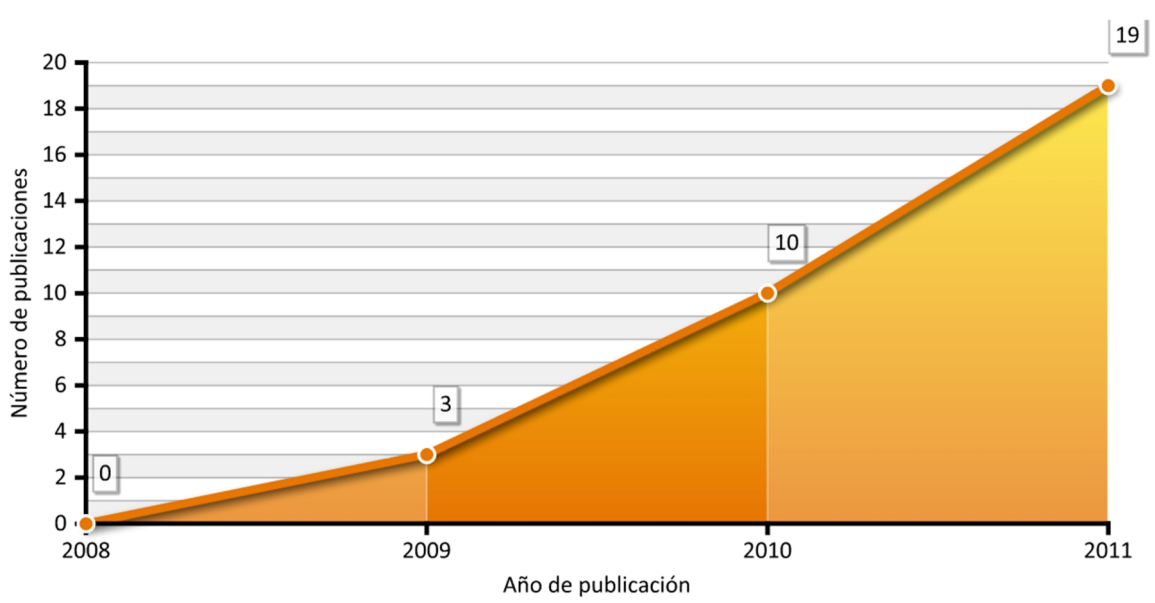


Figura 1.4: Publicaciones recogidas en *Web of Knowledge* en una búsqueda realizada el 8 de Diciembre de 2011 sobre *ultrasound* → *dispersive* → *determination* → *microextra* entre 2000 y 2011.

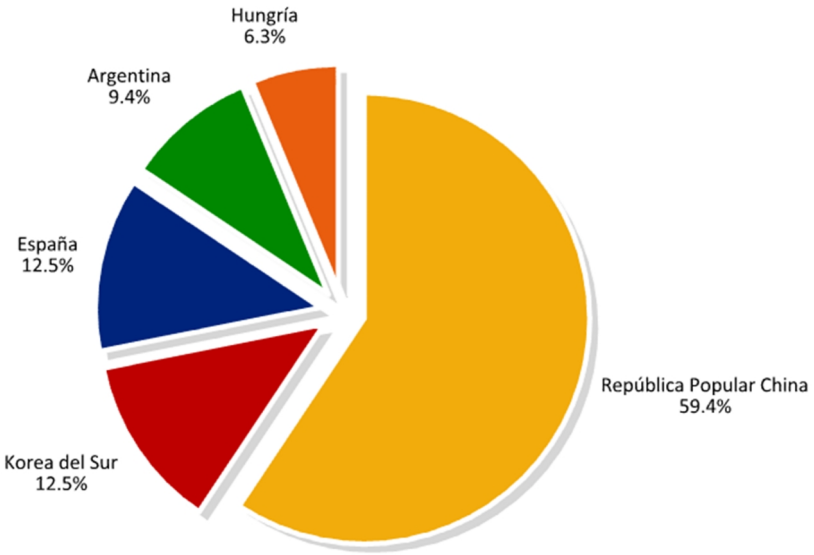


Figura 1.5: Distribución por nacionalidad de los autores de las publicaciones recogidas en la Figura 1.4

1.1.2. DETERMINACIÓN DE CROMO POR DLLME

El cromo es un gran contaminante medioambiental consecuencia, por lo general, de los usos industriales en procesos de niquelado, acerías, industria de electrorecubrimiento, conservación de la madera y fertilizantes artificiales [37]. Las dos formas principales de cromo en el medio ambiente son Cr(III) y Cr(VI) presentando efectos fisiológicos muy diferentes [38]. Así, mientras que Cr(III) está considerado como un elemento traza esencial para el mantenimiento de los niveles de glucosa, lípidos y proteínas en los mamíferos [39,40], Cr(VI) es una especie tóxica para los sistemas biológicos. En efecto, las especies solubles de Cr(VI) son altamente irritantes y tóxicas para los tejidos humanos debido a su elevado potencial de oxidación y su facilidad para atravesar las membranas biológicas [41], y por tanto existe un enorme interés en el desarrollo de procedimientos suficientemente sensibles y selectivos para su determinación [40].

La agencia de protección del medioambiente de los Estados Unidos de América (EPA) recomienda que la concentración de Cr(VI) en agua destinada al consumo humano debe ser menor de 50 µg L^{-1}. Por otro lado, algunos óxidos de cromo se utilizan como pigmentos en pinturas que más tarde sirven para decorar los juguetes infantiles. El contacto con esta pintura puede provocar alergias en la piel o bien, en el caso de que esos juguetes se lleven a la boca, cosa muy frecuente en los niños, la entrada al organismo de posibles formas tóxicas de cromo.

Los juguetes deben estar diseñados y fabricados de forma que no supongan un peligro o puedan producir efectos perjudiciales como consecuencia de la exposición de los seres humanos a las sustancias químicas o mezclas de sustancias que contengan. Las normas estándar de juguetes (ASTM F963 and EN71) se encargan de identificar esos peligros, que no pueden ser fácilmente reconocidos por el público, y que pueden encontrarse en un uso normal de los juguetes. Estas normas incluyen restricciones a los niveles solubles de antimonio, arsénico, bario, cadmio, cromo, mercurio, selenio y plomo total en los recubrimientos de la superficie de los juguetes. La regulación de estos niveles también se encuentra en la norma ISO global para juguetes IS 8124-3. En la actualidad, los niveles de cromo total soluble en el recubrimiento superficial de los juguetes no deben sobrepasar los 60 µg g^{-1}, aunque las directivas de seguridad en los juguetes

88/378/EEC revisada en 2009/48/EC están actualizando esta legislación y ampliándola a más sustancias y compuestos orgánicos. La norma comentada se refiere a cromo total y especifica en el caso de cromo (VI), y dependiendo del tipo de juguete, los valores máximos de este ión que pueden pasar a disolución acuosa y que aparecen recogidos en la Tabla 1.1.

Tabla 1.1: Límites de migración de cromo que no deben excederse en juguetes

Tipo de juguete	Cr(III), µg g^{-1}	Cr(VI), µg g^{-1}
   1. Polvo, quebradizo o flexible	37.5	0.02
  2. Liquido o pegajoso	9.4	0.005
  3. Con pintura superficial o de polímeros tintados	460	0.2

Estos valores obligan al empleo de procedimientos muy sensibles. A modo de ejemplo podemos decir que para 250 mg de una muestra lixiviada en 5 mL conduce a una disolución de apenas 0.25 µg L^{-1} de Cr(VI), lo que requiere el empleo de técnicas tan sensibles como ICP-MS.

Se trata por tanto de desarrollar una metodología analítica que permita la especiación de cromo (ya que el cromo (III) no es tan tóxico) en el líquido lixiviado sin que este proceso altere las formas originales.

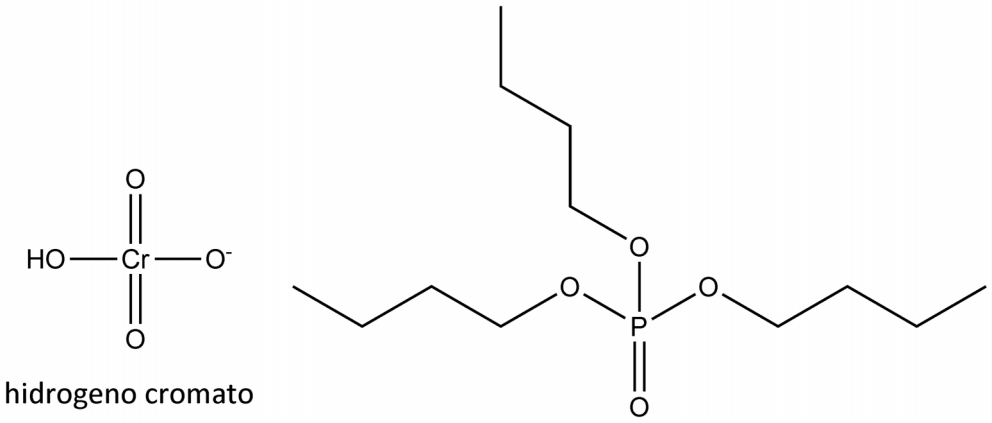
Para la determinación de cromo existe un amplio repertorio de técnicas analíticas: Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) [38], Análisis por Inyección en Flujo (FIA) combinado con Plasma de Acoplamiento Inductivo con detección por Espectrometría de Masas (ICP-MS) [42], Cromatografía de Líquidos [43] y métodos espectrofotométricos basados en la reacción de Cr(VI) con 1,5-difenilcarbazida [44].

Como la evaluación de la toxicidad de cromo en matrices sólidas [45] y líquidas [46] requiere estudios de especiación que en ocasiones se realizan a niveles de concentración muy bajos, se precisa de procedimientos de preconcentración que permitan enriquecer el analito al tiempo que eliminan efecto de matriz.

La extracción liquido-líquido (LLE) es probablemente el procedimiento convencional más ampliamente utilizado para la determinación de contaminantes orgánicos en muestras de agua [47]. En general LLE requiere el empleo de grandes cantidades de disolventes orgánicos tóxicos en procesos, en la mayoría de los casos, muy tediosos. Ya hemos discutido que en los últimos años, las técnicas de microextracción líquido-líquido han suscitado un gran interés ya que, siendo similares a LLE, trabajan a una escala miniaturizada y por tanto requieren mucho menos disolventes extractante [2]. Por ejemplo, en el caso de microextracción en una gota (SDME) apenas son necesarios unos 3 µL para llevar a cabo el proceso [48]. Utilizando como soporte una fibra hueca es posible realizar procesos liquido-líquido-líquido donde además de extraer al analito se incorpora una etapa de retroextracción que aumenta la selectividad [49]. Como ya hemos comentado la DLLME es un proceso en dos etapas donde en la primera se realiza la inyección de una mezcla apropiada de fase extractante con agente dispersante en una fase acuosa con lo que se forma una fina suspensión de microgotas de fase aceptora, que al tener una superficie de contacto tan alta permiten una rápida transferencia del analito. En una segunda etapa la fase dispersa condensa mediante centrifugación y el microvolumen recogido se lleva directamente al detector [2,50- 55].

Cuando se trabaja con DLLME se pueden utilizar, como ya se ha comentado, diversas técnicas para la dispersión del líquido iónico: control de la temperatura [56], ultrasonidos [36], agitación mecánica [57] o disolvente orgánico dispersante [58].

El Cr(VI) forma un compuesto neutro con fosfato de tributilo (reactivo orgánico, líquido a temperatura ambiente e insoluble en agua) en medio ácido [59-61].



hidrogeno cromato

fosfato de tributilo

La estequiometría de la reacción es 1:n para Cr:TBP, donde n puede ser 2 ó 3 y se justifica según el siguiente proceso que resulta muy selectivo para Cr(VI):

$$HCrO^{-}_{4(ac)} + 2H^{+}_{(ac)} + Cl^{-}_{(ac)} + nTBP_{(org)} \rightleftarrows \left[HCrO_3Cl, nTBP\right]_{(org)} + H_2O_{(ac)}$$

En esta Memoria hemos utilizado esta circunstancia para desarrollar un procedimiento de DLLME asistido por ultrasonidos donde la fase aceptora es el mismo reactivo quelatante y en el que resulta innecesario el empleo de dispersante ya que este papel lo realizan los ultrasonidos.

En una primera extracción se calcula el contenido en Cr(VI). Para la determinación de Cr(III) se ha recurrido a su oxidación a Cr(VI). En esta Memoria hemos encontrado los mejores resultados trabajando a pH neutro con permanganato potásico para, en una segunda extracción con TBP, determinar el contenido total de Cr(VI)+Cr(III). Por diferencia se conoce el contenido en Cr(III). La centrifugación de la fase dispersa permite conseguir la separación del TBP como se muestra en la Figura 1.6. El extracto se lleva directamente al detector de ETAAS. Se exponen a continuación de forma detallada tanto la instrumentación empleada como la optimización de las condiciones experimentales.

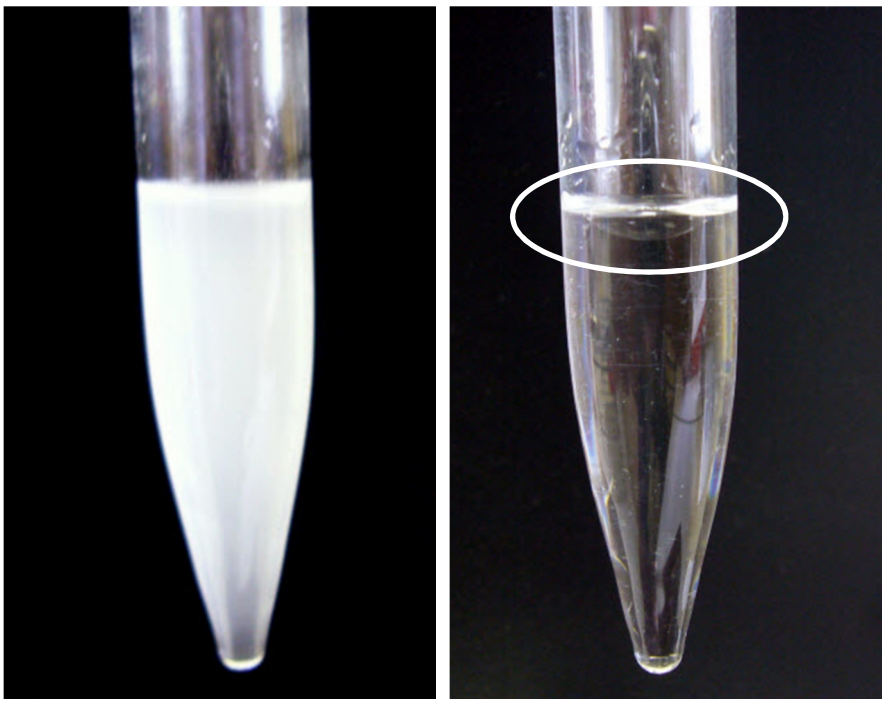


Figura 1.6: Fotogramas mostrando la fase dispersa de TBP en la disolución acuosa consecuencia de la aplicación de ultrasonidos y la fases separadas tras la centrifugación. Nótese el microvolumen de TBP sobrenadando sobre la fase acuosa.

1.2 PARTE EXPERIMENTAL

1.2.1. INSTRUMENTACIÓN

Se ha utilizado un espectrómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer modelo 600 (Perkin-Elmer, Shelton, USA) como el que se muestra en la Figura 1.7 equipado con un sistema de corrección de absorción de fondo basado en el efecto Zeeman. El equipo consta además de un atomizador para tubos de grafito de calentamiento transversal (THGA) y un automuestrador modelo AS-800. Los tubos de grafito pirolítico utilizados disponen de plataformas de L'Vov y se han comprado directamente al fabricante del equipo (referencia B050-4033). Se utilizó gas argón como gas inerte a un flujo constante de 250 mL min^{-1} en todas las etapas del programa de calentamiento, excepto durante la de atomización, donde se cortó el flujo de gas interno. Las medidas se realizaron utilizando una lámpara de cátodo hueco de cromo (Perkin-Elmer) como fuente de radiación. Los parámetros instrumentales aparecen resumidos en la Tabla 1.2.

Centrífuga Unicen 21 (Madrid, España) con rotor y adaptador para tubos falcon de 15 mL hasta 4000 rpm. Baño termostático de ultrasonidos ATU mod. ATM 40-0.7LC (Valencia, España) de 50 W a 40 kHz.

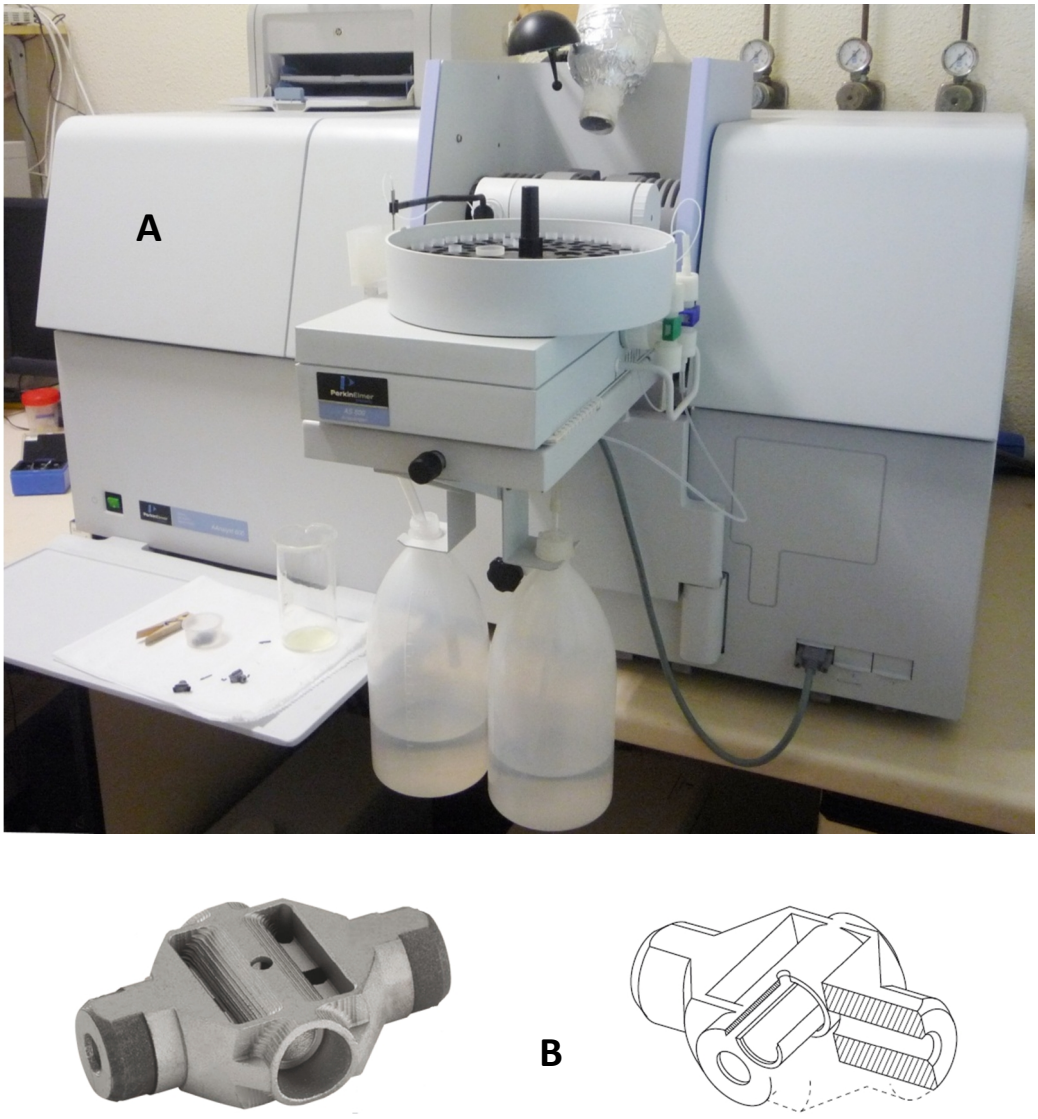


Figura 1.7: Detector y tubos de grafito pirolítico con calentamiento transversal. Se muestra un dibujo esquemático del atomizador para que se aprecie la forma de la plataforma de L'Vov.

Tabla 1.2: Parámetros instrumentales recomendados para la determinación de cromo			
Parámetro			
Corriente de la lámpara, mA		30 (HCL)	
Longitud de onda, nm		357.9	
Rendija, nm		0.7	
Tipo de atomizador		Tubo de grafito pirolítico con plataforma de L'Vov insertada	
Volumen inyectado, µL		30	
Modificador químico		ninguno	
Corrección de fondo		Zeeman	
Programa de calentamiento			
Etapa	Temperatura, °C	Rampa, s	Mantenido, s
1: Secado	120	1	20
2: Secado	300	10	20
2: Calcinación	1200	10	15
3: Atomizacion[a,b]	2200	0	5
4: Limpieza	2600	1	5

[a] Flujo de gas detenido; [b] Etapa de lectura de señal.

1.2.2. REACTIVOS

Todas las disoluciones se prepararon con agua pura (18 MΩ cm) obtenida con un sistema Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA). Para reducir el peligro de contaminación se utilizó material de vidrio y plástico (polipropileno) lavado con ácido nítrico al 1 % v/v y enjuagado con agua antes de su empleo. Para realizar el proceso DLLME se utilizaron tubos de vidrio ya que la adherencia del TBP es menor en este material. Las disoluciones estándar (1000 µg mL^{-1}) de cromo (III) y (VI) se prepararon a partir de $Cr(NO_3)_3 \bullet 9H_2O$ y $K_2Cr_2O_7$ (Fluka, Buchs SG, Switzerland), respectivamente, en agua pura. Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de las disoluciones estándar por dilución adecuada. El fosfato de tributilo se obtuvo de Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Germany) y se utilizó sin someterlo a ningún proceso de purificación. El resto de los productos químicos utilizados fue de Fluka. La disolución 0.03 mol L^{-1} de $KMnO_4$ se preparó en agua a partir del corres-

pondiente producto de Fluka y se utilizó para la oxidación de Cr(III) en las condiciones recomendadas.

1.2.3 PROCEDIMIENTO

En un tubo de vidrio de 15 mL se colocan 10 mL de una disolución acuosa conteniendo Cr(III) y Cr(VI) entre 0.005 y 0.25 µg L^{-1}. Se añade 1 mL de HCl 5 mol L^{-1} y 200 mg de NaCl. A continuación se añaden 80 µL de TBP. La mezcla se somete a ultrasonidos durante 10 minutos. La dispersión se forma rápidamente como se puede apreciar en la Figura 1.8. La mezcla se centrifuga durante 5 min a 4000 rpm. Con esto se consigue la separación del TBP que queda sobrenadando (42 ± 1 µL). Con una jeringa de tipo cromatográfico se toman 30 µL que se llevan al tubo de grafito del detector que se someten al programa de calentamiento que aparece en la Tabla 1.2. De esta forma se cuantifica el contenido en Cr(VI).

Para determinar el contenido total de cromo, a partir de otra alícuota de 10 mL de disolución acuosa, a pH neutro se añade gota a gota disolución de $KMnO_4$ 0.03 mol L^{-1} hasta ligera coloración rosa. Se deja estar durante 10 minutos. A continuación se añade 1 mL de HCl 5 mol L^{-1} y 200 mg de NaCl y se procede como se ha detallado anteriormente para la determinación de Cr(VI). De esta forma se determina el contenido total de cromo (Cr(III)+Cr(VI)). El contenido de Cr(III) se conoce por diferencia.

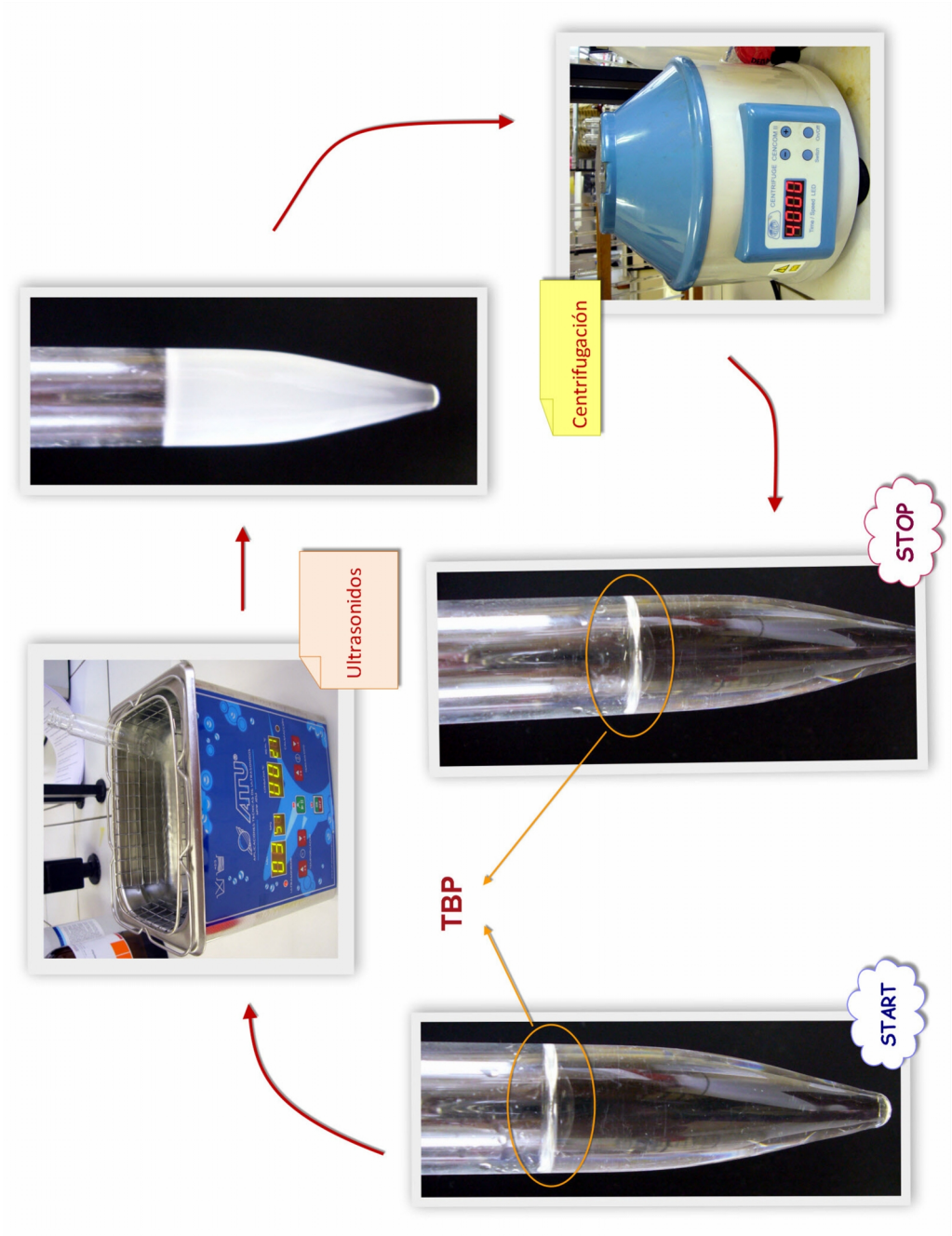


Figura 1.8: Esquema completo del proceso de microextracción propuesto

1.2.4 DETERMINACIÓN DE CROMO EN MUESTRAS DE AGUA

Las muestras de agua potable se tomaron de la red de distribución urbana en distintos puntos de la ciudad de Murcia. Las de agua mineral se compraron en supermercados de esta localidad y las muestras de agua de mar se tomaron de la costa mediterránea de la Región de Murcia y se almacenaron en frasco de PTFE a 4 °C sin ningún tratamiento, siendo analizadas en las siguientes 48 horas. En todos los casos se procedió como se indica en 1.2.3 para 10 mL de muestra de agua.

1.2.5 DETERMINACIÓN DE CROMO LIXIVIADO DE JUGUETES

Los juguetes se compraron en comercios de la Región de Murcia y tras lavarlos con agua ultrapura se secaron a temperatura ambiente, se trocearon en partículas pequeñas los constituidos en su superficie por polímeros coloreados, mientras que los que eran pintados se rasparon cuidadosamente con el fin de obtener una muestra representativa de la pintura superficial. A continuación a 300 mg de la muestra se añadieron 15 mL de HCl 0.1 mol L^{-1}, y se mantuvo la mezcla durante 2 horas a 37 °C con agitación. Pasado este tiempo la disolución se filtró por membrana de 0.45 µm. Se tomaron 10 mL de la disolución filtrada que se sometieron al tratamiento descrito en 1.2.3.

1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.3.1 EFECTO DEL pH

El Cromo (VI) puede estar presente en disolución acuosa como cromato (CrO_4^{2-}), dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$), hidrogeno cromato ($HCrO_4^-$), ácido crómico (H_2CrO_4), hidrógeno dicromato ($HCr_2O_7^-$), tricromato ($Cr_3O_{10}^{2-}$) y tetracromato ($Cr_4O_{13}^{2-}$) [62]. Sin embargo, en medio ácido y a temperatura ambiente únicamente $HCrO_4^-$, $Cr_2O_7^{2-}$ y H_2CrO_4 son las especies predominantes [63]. La mayoría de los estudios indican que la abundancia de una

u otra depende del pH y de la concentración total de cromo. En general se acepta que a pH comprendido entre 2 y 6 las especies mayoritarias son $HCrO_4^-$ y $Cr_2O_7^{2-}$ [64], mientras que a pH menor de 1 la especie mayoritaria es la forma H_2CrO_4 [65]:

$$Cr_2O_7^{2-} + H_2O \rightleftarrows 2HCrO_4^- \qquad K_1 = 10^{-2.2} \qquad 2 < pH < 6 \qquad \{1\}$$

$$H_2CrO_4 \rightleftarrows H^+ + HCrO_4^- \qquad K_2 = 4.1 \qquad pH < 1 \qquad \{2\}$$

En estudios previos sobre la extracción de Cr(VI) con TBP en medio nítrico se ha encontrado un comportamiento lineal entre el logaritmo de la relación de distribución del cromo en ambas fases (D) y el logaritmo de la concentración de protones. Esta circunstancia, que puede apreciarse en la Figura 1.9 evidencia la participación de la $[H^+]$ en el proceso de extracción. Teniendo en cuenta también la ecuación {2} parece evidente que, en medio ácido nítrico, la especie que se extrae con TBP debe ser H_2CrO_4 según:

$$HCrO_4^- + H^+ + nTBP_{(org)} \rightleftarrows \left[H_2CrO_4, nTBP\right]_{(org)} \qquad \{3\}$$

Los resultados obtenidos previamente [61] confirman esta hipótesis. Sin embargo, cuando se ajusta el pH a 0.3 con ácido nítrico o sulfúrico el porcentaje de extracción de Cr(VI) es del 60 %, mientras que cuando se utiliza HCl para ajustar el pH el porcentaje de extracción aumenta hasta el 100 %. De ello se deduce que el cloruro juega un papel importante en el proceso de extracción. En efecto, D varía con [HCl], $[Cl^-]$ y $[H^+]$. Todo ello indica que el proceso de extracción ocurre según:

$$HCrO_4^- + 2H^+ + Cl^- + nTBP_{(org)} \rightleftarrows \left[HCrO_3Cl, nTBP\right]_{(org)} + H_2O \qquad \{4\}$$

Estos resultados, que se han obtenido a partir de mezclas de volúmenes iguales de disolución acuosa y TBP en hexano coinciden con otros estudios realizados a partir de mezclas de volúmenes iguales de fase acuosa y una fase orgánica compuesta por keroseno con distintas concentraciones de TBP [59]. En el primer caso, el valor de n calculado a partir de las gráficas de –log(D) frente a log[TBP] resultó ser de 2.3 en medio 0.5 mol L^{-1} de HCl. En el segundo estudio el valor de n resultó ser 3 en medio 1 mol L^{-1} de HCl. En ambos estudios se concluye que la estequiometría es constante a pH entre 0 y 1 ajustado con HCl, aunque D disminuye al aumentar el pH. Al mismo tiempo se observa

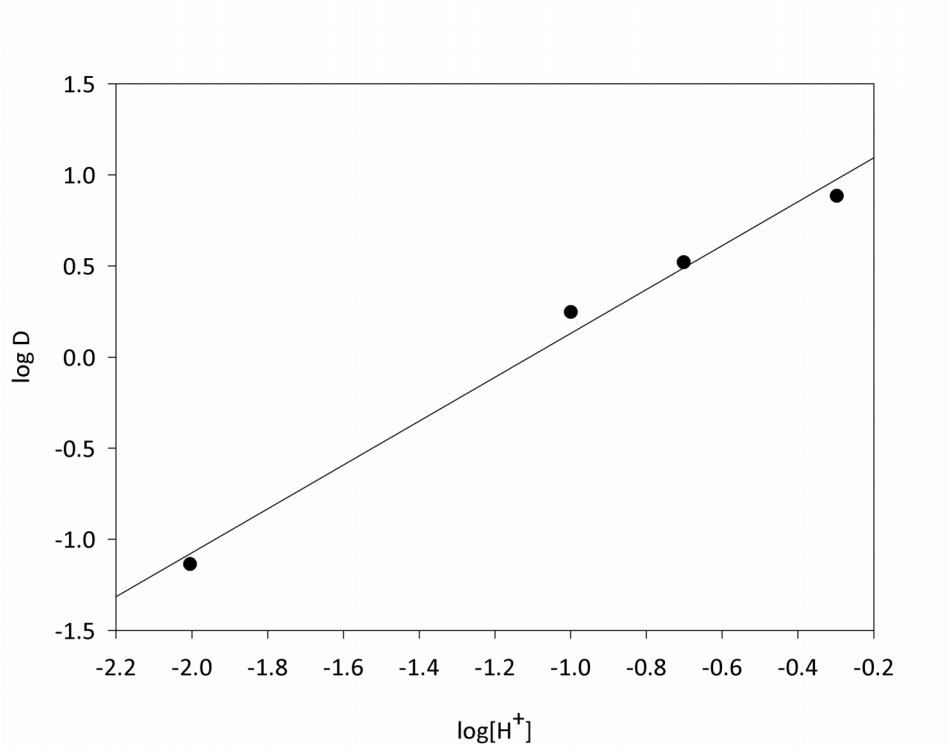


Figura 1.9: Efecto de la acidez en la relación de distribución de Cr(VI) en la extracción desde una fase acuosa a una fase orgánica compuesta por una disolución de TBP en hexano. (Adaptado de [61]).

claramente que la relación de distribución aumenta con la concentración de TBP en la fase extractante.

En esta Memoria el TBP se ha utilizado sin diluir, por lo que la relación de distribución será máxima. En estas condiciones hemos estudiado el efecto del pH del medio en la señal de cromo cuando 10 mL de fase acuosa conteniendo al analito se mezclan (mediante una fina dispersión) con 80 µL de TBP. La Figura 1.10 muestra los resultados obtenidos cuando el valor de pH se ajusta con HCl (curva a) y HNO_3 (curva b). Nótese como la señal es máxima y constante a partir de una concentración de HCl 0.5 mol L^{-1} (pH=0.3), lo que indica una extracción cuantitativa. Cuando se utiliza ácido nítrico para el ajuste del pH los valores de señal para cromo son menores como, a la vista de lo anteriormente comentado, era de esperar. Por tanto se ha seleccionado la adición de 1 mL de HCl 5 mol L^{-1} a 10 mL de fase acuosa para alcanzar el pH óptimo.

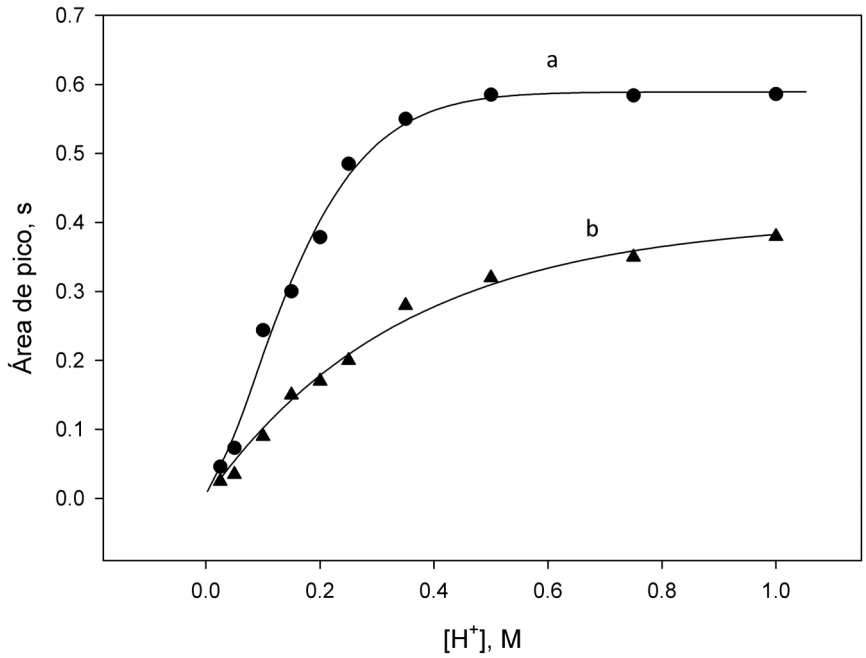


Figura 1.10: Efecto de la concentración de protones añadida como HCl (curva a) y como HNO_3 (curva b) en la señal debida a 0.14 µg L^{-1} de Cr(VI) sometidos al proceso DLLME propuesto.

1.3.2 EFECTO DE SALES INORGÁNICAS

Como se ha comentado, Cl^- y H^+ participan en la formación de la especie extraíble en TBP. En consecuencia es preciso estudiar la influencia que, para una concentración de H^+ dada tiene el cambio en la concentración de Cl^-. La Figura 1.11 muestra el efecto que la concentración de cloruro, añadida al medio como cloruro sódico, tiene en la señal medida para disoluciones de 0.1 µg L^{-1} de Cr(VI) sometidas al tratamiento de preconcentración propuesto. Nótese como la señal aumenta muy ligeramente desde 0 hasta 0.7 mol L^{-1} de NaCl, mientras que para concentraciones similares de nitrato sódico, nitrato potásico y sulfato sódico la señal, no solo no aumenta, sino que desciende ligeramente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos previamente por otros autores [59] trabajando sobre la extracción de Cr(VI) con disoluciones de TBP en keroseno. El descenso en la señal como consecuencia del empleo de sales como nitrato y sulfato se debe al efecto competitivo de estos aniones sobre la extracción de cromato. El aumento que se produce en presencia de NaCl es debido al desplazamiento hacia la derecha del equili-

brio de extracción mostrado en la ecuación {4}. Para conseguir la concentración de cloruro apropiada se recomienda la adición de 0.3 g de NaCl para 10 mL de muestra.

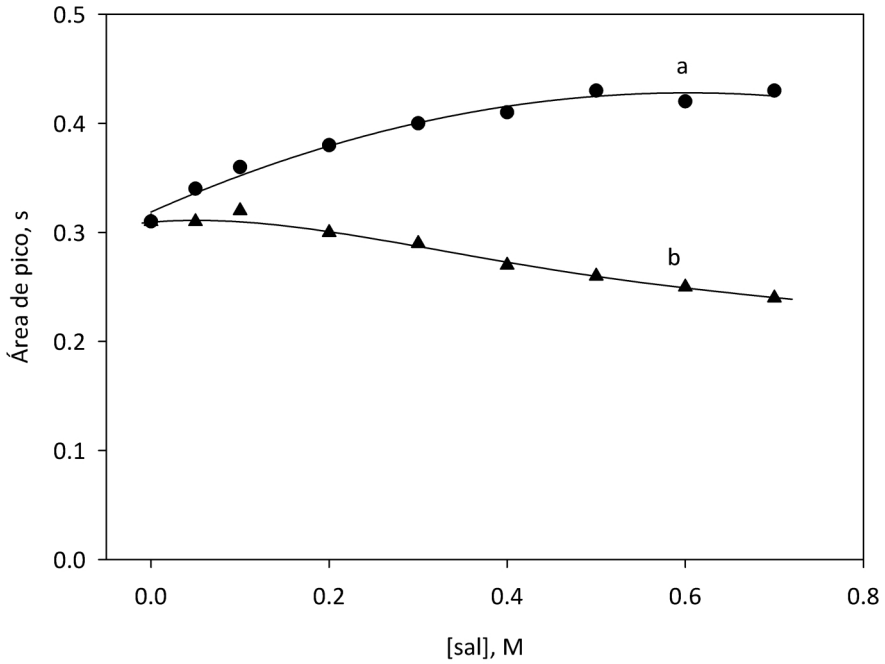


Figura 1.10: Efecto de la concentración salina en la señal debida a 0.1 µg L^{-1} de Cr(VI) aplicando el procedimiento propuesto. La curva a corresponde al efecto de la adición de NaCl. La curva b corresponde al efecto de la adición de KNO_3. Resultados similares al comportamiento mostrado en la curva b se apreciaron para nitrato sódico y sulfato potásico.

1.3.3 EFECTO DEL VOLUMEN DE FOSFATO DE TRIBUTILO

El fosfato de tributilo ($C_{12}H_{27}O_4P$, CAS nº 126-73-8, masa molecular = 266.32 g) tiene una densidad de 0.97 g mL^{-1} y una solubilidad en agua de 6 g L^{-1}. La temperatura de ebullición es 289 °C. A temperatura ambiente se presenta como un líquido incoloro o amarillo pálido, soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. Se utiliza en la industria química como disolvente y plastificante, en particular para los ésteres de celulosa (nitrocelulosa y acetato de celulosa), PVC y poliestireno. Mezclado con alcohol isopropílico se utiliza como agente antiespumante en los detergentes, pinturas y adhesivos. También se utiliza como aditivo en lubricantes oleosos. El fosfato de tributilo también tiene la capacidad para formar complejos con algunos metales, que son solubles en disolventes orgánicos y en el fluido de dióxido de carbono supercrítico. Por esta razón, el fosfato de tri-

butilo se utiliza para extraer los metales de tierras raras de sus minerales y en química nuclear, para separar los componentes del combustible nuclear gastado.

Su ligera solubilidad en agua provoca que el volumen restante tras la dispersión sea menor que el añadido. En este sentido se comprobó que en las condiciones experimentales propuestas, el volumen de TBP sobrenadante tras el proceso de microextracción resultó ser de 30, 42, 53 y 64 µL aproximadamente para volúmenes iniciales de 60, 80, 100 y 120 µL, respectivamente, cuando el volumen de fase acuosa es de 10 mL. Con el fin de conseguir la máxima sensibilidad en la determinación se ha seleccionado un volumen final que permita la inyección de al menos 30 µL de TBP en el atomizador, lo que supone el empleo de 80 µL de TBP. Cantidades mayores provocan una dilución innecesaria en la concentración de cromo extraída y solamente serían recomendables para casos en los que se requiera el empleo de mayores volúmenes de fase acuosa.

El TBP está catalogado por la Unión Europea con la frases de riesgo 22 (nocivo por ingestión) y seguridad 25 (evítese el contacto con los ojos). En la normativa NPFA 704 se le ha asignado un "diamante de fuego" compuesto por un nivel 2 (peligroso para la salud humana), 1 (en inflamabilidad) y 0 en reactividad.

Vemos que, aun tratándose de una sustancia tóxica, no es especialmente peligrosa si se toman las medidas oportunas. En el procedimiento propuesto la cantidad de TBP utilizada es mínima y la mayor parte de ella se consume durante el proceso de medida. Sin embargo, en cada determinación se generan aproximadamente 12 µL de residuo de TBP. El disolvente puede recuperarse si se trata de forma conveniente.

En esta Memoria hemos estudiado el procedimiento más adecuado para reutilizar el TBP sobrante de las determinaciones. En este sentido y tal y como se ha propuesto [59], se comprobó que la retroextracción con disolución acuosa de NaOH 0.5 mol L^{-1} conduce a un TBP exento de cromo y adecuado para su empleo. Hemos comprobado que la dispersión con el empleo de ultrasonidos de 500 µL de TBP en 5 mL NaOH 0.5 mol L^{-1} por duplicado conduce a un TBP en donde el contenido en cromo es inferior al 0.2 % del contenido original resultante de los procesos de microextracción.

1.3.4 EFECTO DE LOS ULTRASONIDOS

Durante los últimos 20 años hemos asistido a un asombroso aumento de la aplicación de la energía ultrasónica en diferentes campos de la Ciencia. Esta afirmación resulta particularmente cierta en el caso de la Química Analítica. El sonido, incluyendo el ultrasonido, se transmite por cualquier medio físico mediante ondas que comprimen y estiran el espaciado molecular de ese medio. Cuando las ondas sónicas atraviesan el medio, la distancia entre moléculas varía. Cuando la presión negativa causada para una onda ultrasónica que cruza un líquido es bastante grande, la distancia entre las moléculas del líquido excede la distancia molecular mínima requerida para sostener intacto el líquido, rompiéndose su estructura y generando huecos o burbujas (burbujas de cavitación) [66,67]. Con el empleo de una potencia sónica baja (1-3 W cm^{-2}) se forman burbujas de tamaño variable de forma periódica con la onda sónica (cavitación estable) que no se rompen. Cuando la potencia sónica es superior a 10 W cm^{-2} las burbujas se expanden hasta que su radio se hace al menos el doble, estallando en otras más pequeñas. Este fenómeno es el que se utiliza para las aplicaciones químicas de los ultrasonidos. Podemos considerar que cada burbuja que estalla es un microreactor en el que se alcanzan varios miles de grados y presiones de miles de atmósferas de forma instantánea [68]. Esto provoca la termólisis del soluto generando radicales y reactivos altamente eficaces (radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno). Si además en el medio hay un sólido, el tamaño de partícula disminuye por disrupción del sólido y, al aumentar la superficie de contacto, mejora la solubilidad.

Algunos de los factores más importantes en la energía ultrasónica merecen un breve comentario. Al aumentar la frecuencia de las ondas sónicas desde el nivel del kHz al MHz, la efectividad de la cavitación disminuye a no ser que se aumente mucho la potencia del generador. A modo de ejemplo podemos decir que necesitamos diez veces más potencia para un mismo efecto de cavitación en agua utilizando un generador de 400 kHz que con uno de 10 kHz. En efecto, al aumentar la frecuencia de los ciclos las moléculas de agua no se llegan a separar lo suficiente para formar burbujas. La intensidad de la onda sónica depende de la amplitud de la onda, aumentando con ésta. Para conseguir cavitación se requiere una intensidad mínima, lo que supone que no siempre se requie-

ren enormes intensidades para lograr el efecto deseado. Una amplitud excesiva simplemente se puede traducir en un rápido deterioro del transductor sónico, aunque en medios viscosos puede ser necesario el empleo de intensidades más altas que en disoluciones acuosas. En estudios de extracción de metales desde sólidos hacia líquidos se ha observado que el rendimiento del proceso aumenta con la intensidad hasta alcanzar un máximo a partir del cual no aumenta el rendimiento por incremento de la intensidad. Así por ejemplo, la extracción de cromo de materiales biológicos resulta posible con una sonda ultrasónica de 20 kHz y una potencia de 100 W.

La temperatura juega un doble papel. Por una parte reduce las fuerzas de Van der Waals, enlaces por puente de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo entre moléculas, pero por otra parte, al aumentar la temperatura se dificulta la eficacia de la cavitación. Esto es debido a que a temperatura alta la presión de vapor del disolvente disminuye y las burbujas de cavitación se llenan con más facilidad de vapor del disolvente fraccionándose antes de lo que lo harían en su ausencia, disminuyendo su eficacia. Por tanto, la temperatura óptima es una situación de compromiso entre estas dos situaciones. En nuestro caso hemos utilizado un baño de ultrasonidos termostatizado entre 5 y 80 °C con un generador de 40 kHz y un transductor de 50 W que aplica potencia constante en un baño de 0.7 L.

De estudios previos publicados por otros autores [59] se sabe que la formación de la especie $\left[HCrO_4Cl,nTBP\right]_{(org)}$ es un proceso exotérmico cuya eficiencia aumenta con la temperatura. Por nuestra parte hemos estudiado el efecto que el tiempo de actuación de los ultrasonidos y la temperatura tienen en la extracción del complejo de Cr(VI) con TBP. La Figura 1.11 muestra los resultados obtenidos para la extracción de 0.1 µg L^{-1} de Cr(VI) con TBP aplicando el procedimiento propuesto. Como puede apreciarse, a temperatura ambiente la señal se hace máxima y constante a partir de 8 minutos de aplicación de ultrasonidos. Cuando la temperatura del baño de agua en el que se aplican los ultrasonidos es de 50 °C la señal alcanza su valor máximo a partir de 5 minutos y requiere 3 minutos cuando se trabaja a 80 °C. En todos los casos la disolución de cromo se encontraba a la temperatura de trabajo antes de añadir el TBP. Los valores de señal representados en la Figura 1.11 se han corregido con el cambio de volumen que se observa al

aumentar la temperatura. En efecto, al incrementar la temperatura aumenta la solubilidad del TBP en la fase acuosa, lo que provoca la obtención de un menor volumen de extracto. Al mismo tiempo, durante el proceso de centrifugación se produce el enfriamiento de la disolución y se aprecia finalmente una ligera opalescencia en las experiencias a temperatura elevada. Este efecto no se observa cuando el tratamiento con ultrasonidos se realiza a temperatura ambiente. A la vista de estos resultados se recomienda el empleo de 10 minutos de ultrasonidos a temperatura ambiente.

Para lograr la separación de la fase dispersa se procede a realizar la centrifugación del líquido. Hemos comprobado que la centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos es suficiente para alcanzar el objetivo deseado como se muestra en la Figura 1.6. Hay que hacer constar que aunque el TBP queda sobre la fase acuosa, la disposición en forma de una gota bien definida, permite su cómoda retirada con el empleo de una micropipeta o una jeringa de tipo cromatográfico.

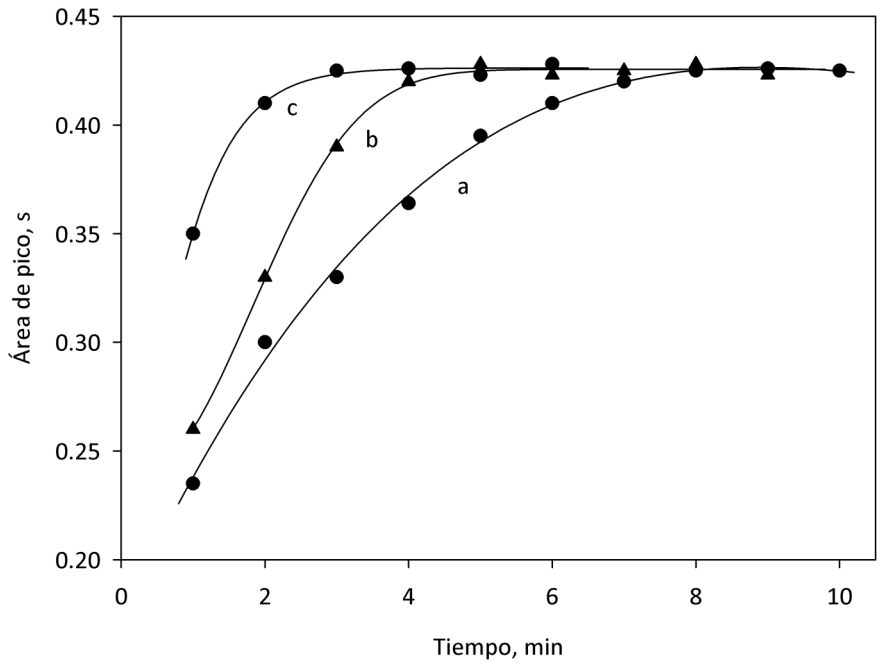


Figura 1.11: Efecto del tiempo de acción de los ultrasonidos a temperatura ambiente, 50 y 80 °C (curvas a,b y c, respectivamente) en la extracción de 0.1 µg L^{-1} de Cr(VI).

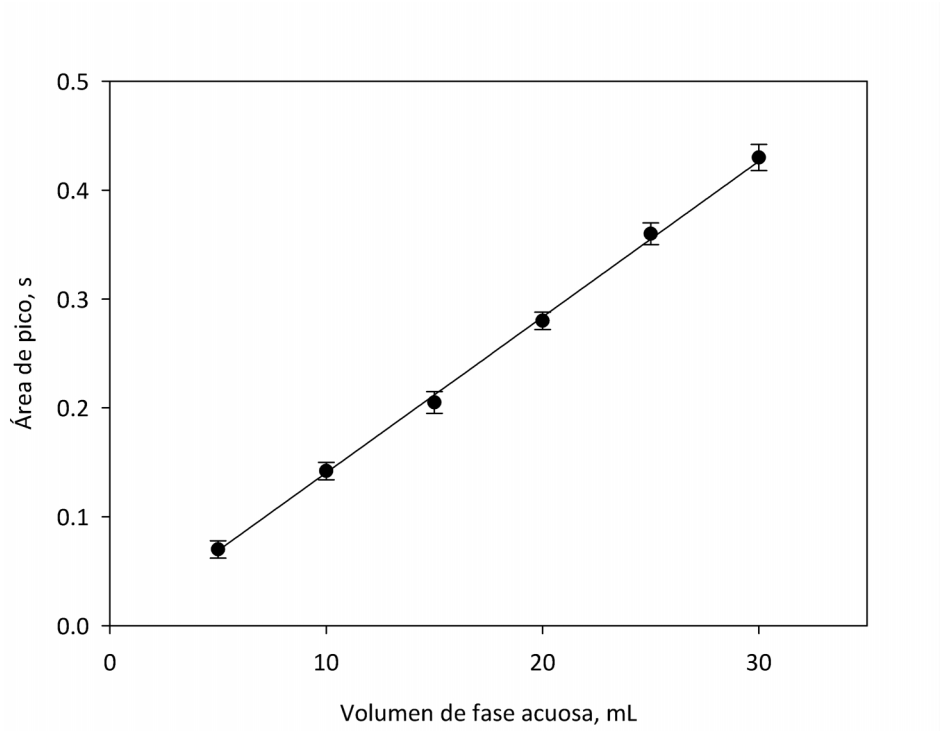


Figura 1.12: Efecto del volumen de fase acuosa en la extracción de 0.1 µg L^{-1} de Cr(VI). Volumen inyectado en el atomizador: 10 µL. Los segmentos corresponden a las desviaciones estándar calculadas para 3 experiencias en cada volumen.

1.3.5 EFECTO DEL VOLUMEN DE FASE ACUOSA

Se ha estudiado el efecto en la señal de Cr(VI) extraído en TBP cuando disoluciones de igual concentración pero de distinto volumen se dispersan con 60 µL de TBP siguiendo las condiciones recomendadas en la parte experimental. La Figura 1.12 muestra los resultados obtenidos. Los valores de señal están corregidos por el cambio de volumen de fase extractante que se aprecia al aumentar el volumen de la fase acuosa. Nótese como existe un comportamiento lineal hasta 30 mL. En todas estas experiencias se inyectaron en el atomizador únicamente 10 µL de TBP ya que el volumen recogido para 30 mL de fase acuosa apenas supera este valor.

Como puede apreciarse existe un comportamiento lineal entre la señal y el volumen de la fase acuosa. Desde el punto de vista práctico, a no ser que los contenidos en Cr(VI) de la muestra sean tan bajos que así lo justifique, recomendamos el empleo de 10 mL de fase acuosa para 80 µL de TBP. En estas condiciones se obtienen 42 µL de TBP de los que podemos inyectar 30 µL en el atomizador. Para poder conseguir estos fines a partir de

30 mL de fase acuosa es preciso el empleo de 100 µL de TBP. En estas condiciones el tiempo de aplicación de ultrasonidos recomendado de 10 min sigue siendo válido y no es preciso aumentarlo.

A partir del cociente entre la pendiente obtenida para una recta de calibrado resultante de aplicar el procedimiento de preconcentración recomendado y la pendiente para Cr(VI) en fase acuosa se obtiene un factor de preconcentración o enriquecimiento de 240.

Los estudios de porcentaje de extracción realizados a partir de dos extracciones consecutivas de una misma disolución acuosa de Cr(VI) revelaron un valor próximo al 100 % (99 ± 4), lo que nos permite calificar la extracción como de cuantitativa en las condiciones recomendadas.

1.3.6 CONDICIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE Cr(III)

Experimentalmente se comprobó que el Cr(III) no forma complejo con TBP ni siquiera en elevadas concentraciones. Por tanto, si bien la especie de mayor interés desde el punto de vista toxicológico es el Cr(VI), la determinación de Cr(III) también puede tener interés para conocer la distribución de especies en el contenido de cromo total. Se han ensayado distintos procedimientos para la oxidación de Cr(III) a Cr(VI) propuestos por otros autores. Los procesos de oxidación con peróxido de hidrógeno [69] y persulfato [70] en medio ácido condujeron a valores por defecto incluso después de 15 minutos de reacción. Sin embargo, con el empleo de permanganato [71], los resultados fueron cuantitativos después de 10 minutos de reacción si el medio es neutro o ligeramente alcalino [72]. En efecto, como puede apreciarse la reacción:

$$5Cr^{3+} + 3MnO_4^- + 8H_2O \rightarrow 5HCrO_4^- + 3Mn^{2+} + 11H^+$$

precisa un ambiente poco ácido para que se desplace hacia la derecha. La Figura 1.13 muestra los resultados obtenidos en el estudio que el efecto del pH tiene en la oxidación de cromo (III) a cromo (VI) por medida del compuesto $\left[HCrO_4Cl,nTBP\right]_{(org)}$ extraído. Nóte-

se que la señal es máxima y constante a partir de pH = 5. En este sentido recomendamos el empleo de pH neutro y la adición gota a gota de $KMnO_4$ 0.03 mol L^{-1} hasta ligera coloración violeta y dejar estar durante 10 minutos para conseguir la completa transformación de Cr(III) en Cr(VI). Posteriormente se acidula la disolución como se recomienda en la Parte Experimental y se procede a la determinación del Cr(VI) con TBP. El exceso de permanganato no interfiere en la determinación.

1.3.7 ESTUDIOS DE INTERFERENCIAS

Se realizaron experiencias para evaluar el efecto que tiene en la señal medida para concentraciones conocidas de cromo la presencia de los componentes mayoritarios habituales en aguas naturales: NO_3^-, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, K^+, Ca^{2+} y Mg^{2+}. Concentraciones hasta 0.1 mol L^{-1} de cada una de estas especies no provocan cambios significativos en la señal medida.

Otros metales también pueden influir debido a que pueden formar complejos con

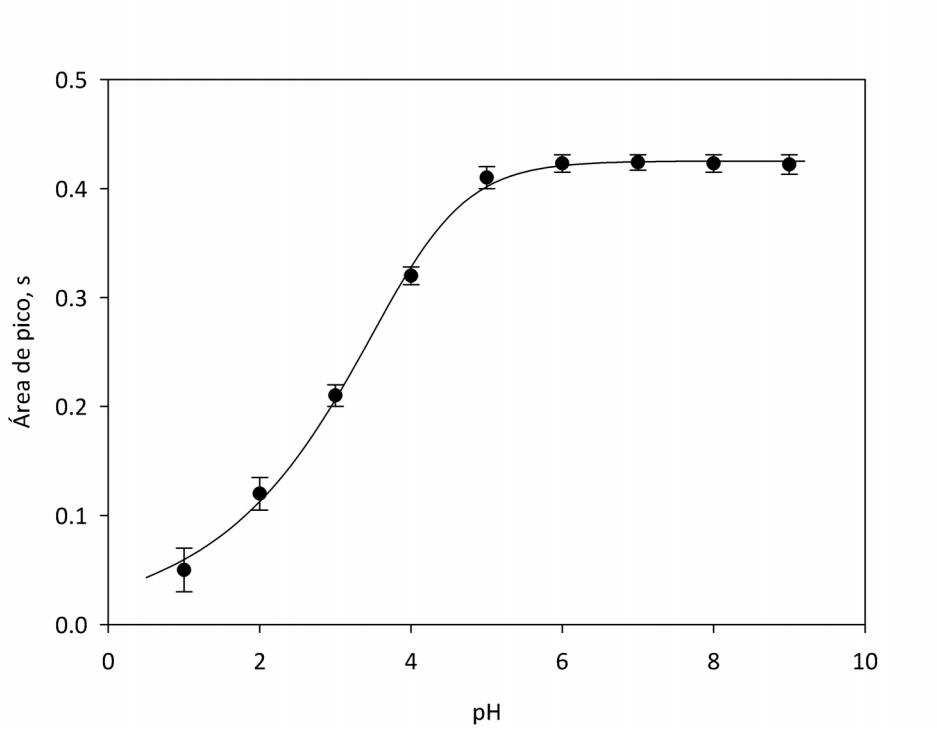


Figura 1.13: Efecto del pH del medio durante el tratamiento con permanganato potásico de una disolución contenido 0.1 µg L^{-1} de Cr(III). Tras 10 minutos de reacción la disolución se sometió al tratamiento recomendado.

TBP o extraídos como clorocomplejos que provoquen una interferencia espectral. En este sentido se encontró que Ba(II), Mn(II), Co(II), Cu(II), Cd(II), Ni(II) y Pb(II) se toleran hasta un nivel de 1 g L^{-1}, nivel máximo ensayado. As(III), As(V), Fe(III) y Se(IV) hasta 0.2 g L^{-1} y Sb(III) hasta 10 mg L^{-1}.

Estos datos muestran que la metodología propuesta resulta adecuada para la determinación de cromo en aguas naturales [48] donde los niveles de estos elementos son usualmente inferiores a los que hemos encontrado como interferentes.

1.3.8 OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE CALENTAMIENTO ELECTROTÉRMICO

El TBP se ha mostrado como un disolvente que no provoca problemas en la determinación de cromo pues ni genera elevadas señales de absorción de fondo ni afecta a la sensibilidad del analito. Únicamente es preciso tener en cuenta que su punto de ebullición es elevado y en consecuencia, es preciso incluir una etapa adecuada para conseguir su evaporación.

Trabajando con el empleo de plataforma de L'Vov, máxima potencia durante la rampa de la etapa de atomización y flujo de gas inerte nulo en esta etapa, se han obtenido los resultados que se muestran en la Figura 1.14. Como puede apreciarse el cromo extraído en TBP resulta estable hasta 1400 °C durante la etapa de calcinación y requiere el empleo de una temperatura de 2200 °C para conseguir una buena atomización. La Tabla 1.2 muestra los valores óptimos seleccionados. Obsérvese la inclusión de dos etapas de secado. Una a 120 °C para secar los restos de agua que pudieran existir tras la extracción y otra a 300 °C para evaporar el disolvente. Se incluye también una etapa de limpieza a 2600 °C con el fin de dejar el atomizador preparado para la siguiente determinación.

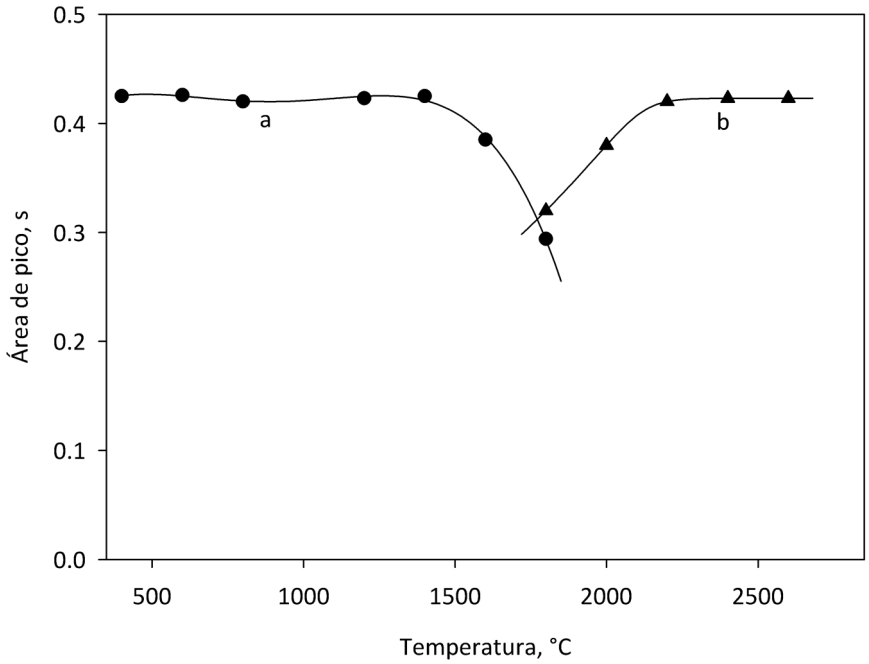


Figura 1.14: Efecto de las temperaturas de calcinación (curva a) y atomización (curva b) en la señal debida a 0.1 µg L^{-1} de Cr(VI) sometido al procedimiento recomendado.

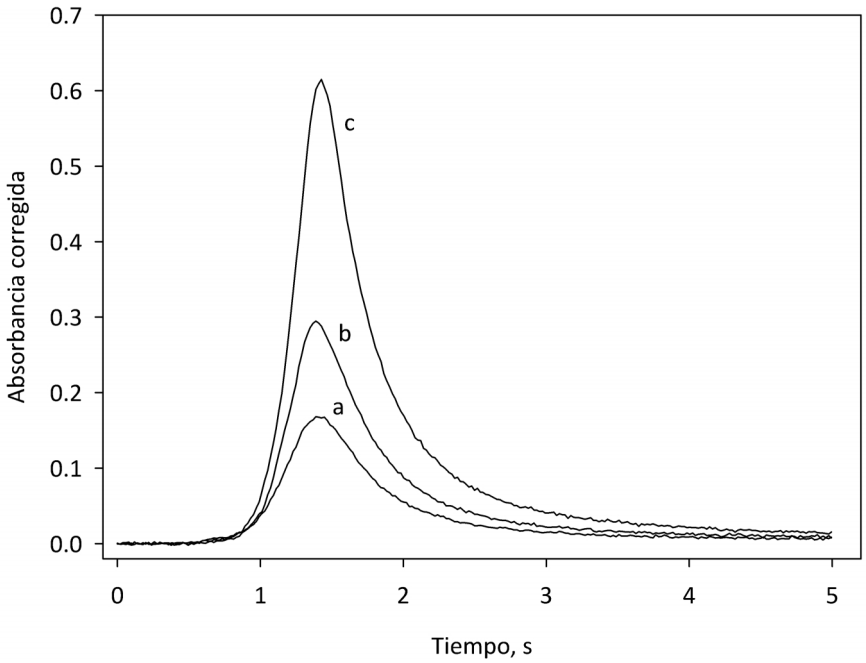


Figura 1.15: Señales obtenidas para Cr(VI) en TBP a partir de disoluciones acuosas conteniendo 0.03, 0.075 y 0.15 µg L^{-1} de Cr(VI) (curvas a, b y c, respectivamente).

Trabajando en estas condiciones se obtiene una señal bien definida, sin problemas de absorción de fondo, que se resuelve en menos de 5 minutos como se puede apreciar en la Figura 1.15. La masa característica obtenida fue 8 pg tanto para Cr(VI) en disolución acuosa como extraído en TBP.

El empleo de un modificador químico fue considerado, estudiandose el efecto de los que se han recomendado para cromo (fosfato amónico [73] o nitrato de magnesio [74]). Ninguno de los dos consiguió mejorar la señal y por tanto se concluye que no resulta preciso el empleo de modificador químico.

1.3.9 CALIBRACIÓN

Trabajando en las condiciones recomendadas en la parte experimental para 10 mL de fase acuosa y con la adición de 80 µL de TBP se observó un comportamiento lineal entre la concentración de cromo en fase acuosa y la señal en área de pico medida por el detector en el intervalo de concentraciones de 0.005 a 0.2 µg L^{-1} . El límite de detección se ha calculado como la concentración de cromo que conduce a una señal equivalente a tres veces el error estándar de la estimación de la regresión ($s_{y/x}$). Teniendo en cuenta que la pendiente de calibración resultó ser 4.285 s μg^{-1} L y $s_{y/x}$ presentó el valor de 0.003 s, el LOD que se obtiene es de 2 ng L^{-1}.

El factor de enriquecimiento se ha calculado a partir del cociente entre la pendiente de calibrado obtenida por el proceso de extracción y la que resulta de la determinación directa en fase acuosa de cromo (0.018 s μg^{-1} L) resultando ser de aproximadamente 240. Este valor resulta superior a la mayoría de los que aparecen recogidos en la bibliografía reciente para procesos de preconcentración de cromo por microextracción como podemos apreciar en la Tabla 1.3.

La precisión del método se ha estudiado tanto en repetitividad como reproducibilidad para la determinación de Cr(VI) y Cr(III). La repetitividad se estimó a partir de 10 experiencias consecutivas y se encontraron valores de desviación estándar relativa del 7.2 y 8.1 % para Cr(VI) y Cr(III), respectivamente. La reproducibilidad se midió a lo largo

de cinco días obteniéndose valores de desviación estándar relativa del 10,5 y 11,1 %, respectivamente. Trabajando con 5 mL de fase acuosa el factor de preconcentración disminuye hasta aproximadamente 120 y los valores de repetitividad (5.2 y 6.1 % para Cr(III) y Cr(VI), respectivamente) y reproducibilidad (8,3 y 8.6 para Cr(III) y Cr(VI), respectivamente) mejoran ligeramente.

Con el fin de evaluar la validez del procedimiento propuesto en cuanto a la selectividad de la determinación de Cr(VI) en presencia de Cr(III) y viceversa se realizaron determinaciones a distinta relación de estas dos especies y los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 1.4. Como puede apreciarse, los resultados de recuperación obtenidos para cada una de las formas de cromo se encuentran próximos al 100 % en ambos casos.

1.3.10 DETERMINACIÓN DE CROMO EN MUESTRAS DE AGUA Y JUGUETES

El procedimiento propuesto se ha aplicado a distintos tipos de agua sobre las que se realizaron estudios de recuperación para conocer la existencia o no de efecto matriz. La Tabla 1.5 muestra los resultados obtenidos. Como puede apreciarse el contenido de cromo total se encuentra en todos los casos por debajo de 0.2 µg L^{-1}, lo que no supone riesgo alguno para la salud y demuestra la validez del procedimiento propuesto para la determinación de muy bajas concentraciones de cromo incluso con especiación ya que los porcentajes de recuperación encontrados en todas las muestras se encuentran en el intervalo de 99.1 ± 2.6 %.

Por otro lado el empleo de los óxidos de cromo en la fabricación de pinturas y el posterior uso de éstas en la decoración de juguetes infantiles puede ser un factor de riesgo para la salud de los niños que juegan ellos. Además de los residuos que pueden quedar

Tabla 1.3. Comparación del procedimiento propuesto con otros publicados basados en técnicas de microextracción

Especies	Agente quela-tante	Técnica sep/preconc.	Fase aceptora	Técnica detección	Intervalo line-al, µg L^{-1}	EF	LOD, µg L^{-1}	Ref.
Cr(VI)	APDC	SDME+SIA[a]	tolueno	ETAAS	0.5-6	20	0.02	48
Cr(III)	no	CME[b]	ZrP	ETAAS	0.042-100	10	0.042	75
Cr(III), Cr(VI)	APDC	CPE[c]	Aliquat 336 + Triton X-114	ICP-MS	0.1-10, 0.3-5	10	0.01, 0.025	42
Cr(III), Cr(VI)	APDC	DLLME	Cl_4C	FAAS	0.3-20	270	0.08	76
Cr(VI)	APDC	USA-DLLME[d]	[Hmin][PF_6]	ETAAS	0.5-8	300	0.07	22
Cr(III)	no	SPME	SWCNTs[e]	FAAS	500-10000	30	4.08	77
Cr(VI)	Na-DDTC	DLLME	Cl_4C	ICP-OES	1-750	8	0.27	78
Cr(III)	PADAP[f]	SFO-DLLME[g]	1-undecanol	ETAAS	0.2-1.3[h]	800	0.2[h]	79
Cr(III), Cr(VI)	no	SFO-DLLME	TTA[i]	ETAAS	0.03-0.13	327	0.1	80
Cr(VI)	APDC	DLLME	Cl_4C	LA-ICP-MS[j]	0-250	154	0.1	81
Cr(III), Cr(VI)	APDC	DLLME	[C_8MIm] [NTf_2]	ETAAS	0.01-0.5	300	0.006	Este tra-bajo

[a] Single Drop Microextraction and Sequential Injection Analysis; [b] Capillary Micro-extraction with ZrP coated capillary; [c] cloud point extraction; [d] ultra-sonic probe-assisted dispersive liquid-liquid microextraction; [e] single-wallet carbon nanotubes; [f] 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diethyl amino) phenol; [g] solidification of floating organic drop dispersive liquid-liquid microextraction; [h] ng L^{-1}; [i] 1-undecanol containing 2-thenoyltrifluoroacetone; [j] Dried-Droplet Laser Ablation ICP-MS

Tabla 1.4: Selectividad del método para la determinación de las especies de Cr(VI) y Cr(III)

	Cr(VI), µg L^{-1}			Cr(III), µg L^{-1}		
Relación Cr(VI)/Cr(III)	Añadido	Encontrado	Recuperación, %	Añadido	Encontrado	Recuperación, %
0.1	0.01	0.011 ± 0.002	110	0.1	0.098 ± 0.003	98
1	0.1	0.101 ± 0.006	101	0.1	0.106 ± 0.005	106
10	0.1	0.095 ± 0.005	95	0.01	0.009 ± 0.002	99

Tabla 1.5: Concentraciones de Cr(VI) y Cr(III) encontradas en distintas muestras de agua

	Cr(VI)[a], µg L^{-1}			Cr(III)[a], µg L^{-1}		
Muestra	Añadido	Encontrado	Rec., %	Añadido	Encontrado	Rec., %
Agua de grifo	0	0.098 ± 0.007	-	0	<LOD	-
	0.1	0.202 ± 0.008	104	0.1	0.098 ± 0.008	98
	0.2	0.297 ± 0.009	99.5	0.2	0.201 ± 0.008	100.5
Agua mineral sin gas 1	0	0.022 ± 0.006	-	0	0.014 ± 0.008	-
	0.1	0.120 ± 0.008	98	0.1	0.112 ± 0.008	98
	0.2	0.220 ± 0.010	99	0.2	0.215 ± 0.008	100.5
Agua mineral sin gas 2	0	0.025 ± 0.007	-	0	<LOD	-
	0.1	0.123 ± 0.008	98	0.1	0.099 ± 0.008	99
	0.2	0.226 ± 0.009	100.5	0.2	0.201 ± 0.008	100.5
Agua de grifo con sistema de ósmosis inversa	0	0.032 ± 0.008	-	0	<LOD	-
	0.1	0.135 ± 0.009	103	0.1	0.101 ± 0.008	101
	0.2	0.230 ± 0.010	95	0.2	0.198 ± 0.008	99
Agua mineral con gas 1	0	0.026 ± 0.008	-	0	0.012 ± 0.008	-
	0.1	0.123 ± 0.006	97	0.1	0.113 ± 0.008	101
	0.2	0.224 ± 0.009	99	0.2	0.209 ± 0.008	98.5
Agua mineral con gas 2	0	0.008 ± 0.009	-	0	<LOD	-
	0.1	0.100 ± 0.008	92	0.1	0.102 ± 0.008	102
	0.2	0.205 ± 0.011	98.5	0.2	0.197 ± 0.008	98.5
Agua de mar 1	0	0.033 ± 0.007	-	0	0.029 ± 0.008	-
	0.1	0.135 ± 0.008	102	0.1	0.128 ± 0.008	99
	0.2	0.238 ± 0.010	102.5	0.2	0.230 ± 0.008	100.5
Agua de mar 2	0	0.038 ± 0.006	-	0	0.059 ± 0.008	-
	0.1	0.135 ± 0.009	97	0.1	0.158 ± 0.008	99
	0.2	0.236 ± 0.010	99	0.2	0.260 ± 0.008	100.5
Agua de mar 3	0	0.141 ± 0.010	-	0	0.043 ± 0.008	-
	0.1	0.240 ± 0.008	99	0.1	0.145 ± 0.008	102
	0.2	0.345 ± 0.011	102	0.2	0.242 ± 0.008	99.5

[a] valor medio ± desviación estándar de tres determinaciones

en los dedos y las manos tenemos que contemplar la posibilidad de que el cromo entre al organismo por la boca consecuencia de la tendencia de los niños a chupar los juguetes. Por este motivo, hemos seleccionado una serie de juguetes que hemos sometido al tratamiento establecido en la norma europea EN 71 [82], revisada recientemente [83], y que simula la lixiviación de analitos en un medio ligeramente ácido a la temperatura habitual del cuerpo humano. La Tabla 1.6 muestra los niveles máximos de migración de cromo tolerados por esta norma según el tipo de juguete. La Figura 1.1 muestra el tipo de juguete analizado en este trabajo. Los contenidos de cromo (III) y (VI), encontrados



Figura 1.16: Juguetes a los que se les ha determinado la migración de Cr(III) y Cr(VI) por aplicación del procedimiento propuesto

por aplicación del procedimiento propuesto tal y como se detalla en la Parte Experimental, que pasan a la disolución ácida aparecen en la Tabla 1.6. Como puede apreciarse los niveles encontrados en todas las muestras son inferiores a 20 ng/g, lo que no supone un riesgo para la salud, excepto en aquellos que están decorados con pinturas de color amarillo que son las que conducen a los contenidos en cromo (principalmente Cr(III)) más elevados.

Tabla 1.6. Cromo lixiviado de las muestra de juguetes

	Contenido encontrado[a], ng g^{-1}	
Muestra	Cr(III)	Cr(VI)
Gato rosa	4.9 ± 0.5	2.9± 0.5
Conjunto cocina azul	1.9 ± 0.5	2.1 ± 0.5
Conjunto cocina amarillo	42.5 ± 0.5	2.9 ± 0.5
Conjunto cocina rosa	4.8± 0.5	2.3 ± 0.5
Conjunto cocina violeta	2.6 ± 0.5	2.8 ± 0.5
Conjunto cocina marron	3.7± 0.5	1.9 ± 0.5
Conjunto cocina verde	7.5 ± 0.5	2.8 ± 0.5
Pelota azul	3.3± 0.5	2.1 ± 0.5
Pelota amarilla	22.1 ± 0.5	3.5 ± 0.5
Pelota rosa	2.6 ± 0.5	2.2 ± 0.5

[a] valor medio desviación estándar de tres determinaciones

1.4. CONCLUSIÓN

Se ha desarrollado una variante simplificada de DLLME basada en la extracción del analito por formación de un compuesto estable con la fase extractante y posterior dispersión con el empleo de ultrasonidos. La fase extractante, TBP, se muestra muy selectiva para la determinación de Cr(VI), especie de gran interés por sus importantes efectos nocivos para la salud. La determinación de cromo total (Cr(VI)+Cr(III)) resulta posible previa oxidación de Cr(III). La selectividad aumenta aún más mediante el empleo de Espectrometría de absorción atómica con calentamiento Electrotérmico como técnica de determinación. Por otra parte el procedimiento no precisa del empleo de agente dispersante químico ni disolvente orgánico por lo que se aproxima al concepto de Química Verde. Además se propone un tratamiento para la recuperación de la fase extractante no utilizada en la determinación. El método propuesto es simple, rápido y seguro y se ha aplicado a la determinación de cromo en muestras de agua y lixiviados obtenidos de juguetes.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

1 A. N. Anthemidis y M. Miró, Recent developments in flow injection/sequential injection liquid-liquid extraction for atomic spectrometric determination of metals and metalloids, Appl. Spectrosc. Rev., 44 (2009) 140-167.

2 F. Pena-Pereira, I. Lavilla y C. Bendicho, Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review, Spectrochim. Acta Part B, 64 (2009) 1-15.

3 M. Miró, J. M. Estela y V. Cerdá, Recent advances in on-line solvent extraction exploiting flow injection/sequential injection analysis, Curr. Anal. Chem., 1 (2005) 329-343.

4 A. N. Anthemidis y I. S. I. Adam, Development of on-line single-drop micro-extraction sequential injection system for electrothermal atomic absorption spectrometric determination of trace metals, Anal. Chim. Acta, 632 (2009) 216-220.

5 L. Xu, C. Basheer y H. K. Lee, Developments in single-drop microextraction, J. Chromatogr. A, 1152 (2007) 184-192.

6 S. Pedersen-Bjergaard y K. E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, Anal. Chem., 71 (1999) 2650-2656.

7 M. A. Jeannot y F. F. Cantwell, Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle, Anal. Chem., 69 (1997) 235-239.

8 E. K. Paleologos, D. L. Giokas y M. I. Karayannis, Micelle-mediated separation and cloud-point extraction, Trends Anal. Chem., 24 (2005) 426-436.

9 C. E. Matckovic y G. D. Christian, Solvent-extraction of metal-chelates into water-immiscible acetone, Anal. Chem. 46 (1974) 102-106.

10 S. Igarashi y T. Yotsuyanagi, Homogeneous liquid-liquid-extraction by pH dependent phase-separation with a fluorocarbon ionic surfactant and its application to the preconcentration of porphyrin compounds, Mikrochim. Acta, 106 (1992) 37-44.

11 M. R. Jamali, Y. Assadi y F. Shemirani, Homogeneous liquid-liquid extraction and determination of cobalt, copper and nickel in water samples by flame atomic absorption Spectrometry, Sep. Sci. Technol., 42 (2007) 3503-3515.

12 H. Ebrahimzadeh, Y. Yamini, F. Kamarei y S. Shariati, Homogeneous liquid-liquid extraction of trace amounts of mononitrotoluenes from waste water samples, Anal. Chim. Acta, 594 (2007) 93-100.

13 M. I. Leong y S. D. Huang, Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection, J. Chromatogr. A, 1211 (2008) 8-12.

14 H. Xu, Z. Ding, L. Lv, D. Song y Y.-Q. Feng, A novel dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples, Anal. Chim. Acta, 636 (2009) 28-33.

15 M. Cruz-Vera, Encyclopedia of Analytical Chemistry, Dispersive Liquid–Liquid Microextraction, John Wiley & Sons, 2010.

16 W. C. Tsai y S. D. Huang, Dispersive liquid-liquid microextraction with little solvent consumption combined with gas chromatography-mass spectrometry for the pretreatment of organochlorine pesticides in aqueous samples, J. Chromatogr., A, 1216 (2009) 5171-5175.

17 S. Xie, B. Xiang, M. Zhang y H. Deng, Determination of medroxyprogesterone in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction with low solvent consumption, Microchim. Acta, 168 (2010) 253-258.

18 P. Hashemi, S. Beyranvand, R. S. Mansur y A. R. Ghiasvand, Development of a simple device for dispersive liquid-liquid microextraction with lighter than water organic solvents: Isolation and enrichment of glycyrrhizic acid from licorice, Anal. Chim. Acta, 655 (2009) 60-65.

19 M. A. Farajzadeh, S. E. Seyedi, M. S. Shalamzari y M. Bamorowat, Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than water, J. Sep. Sci., 32 (2009) 3191-3200.

20 M. A. Farajzadeh, D. Djozan y R. F. Bakhtiyari, Use of a capillary tube for collecting an extraction solvent lighter than water after dispersive liquid-liquid microextraction and its ap-

plication in the determination of parabens in different samples by gas chromatography-Flame ionization detection, Talanta, 81 (2010) 1360-1367.

21 K. J. Huang, C. Y. Wei, W. L. Liu, W. Z. Xie, J. F. Zhang y W. Wang, Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for sensitive determination of biogenic amines in rice wine samples, J. Chromatogr., A, 1216 (2009) 6636-6641.

22 H. Chen, P. Du, J. Chen, S. Hu, S. Li y H. Liu, Separation and preconcentration system based on ultrasonic probe-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for determination trace amount of chromium(VI) by electrothermal atomic absorption spectrometry, Talanta, 81 (2010) 176-179.

23 Q. Wu, Q. Chang, C. Wu, H. Rao, X. Zeng, C. Wang y Z. Wang, Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction for the determination of carbamate pesticides in water samples by high performance liquid chromatography, J. Chromatogr., A, 1217 (2010) 1773-1778.

24 M. I. Leong y S. D. Huang, Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron-capture or mass spectrometry detection, J. Chromatogr., A, 1211 (2008) 8-12.

25 Y. Yamini, M. Rezaee, A. Khanchi, M. Faraji y A. Saleh, Dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating organic drop followed by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry as a fast technique for the simultaneous determination of heavy metals, J. Chromatogr., A, 1217 (2010) 2358-2364.

26 M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas y M. Valcárcel, One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction, J. Chromatogr., A, 1216 (2009) 6459-6465.

27 A. N. Anthemidis y K. I. G. Ioannou, On-line sequential injection dispersive liquid-liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples, Talanta, 79 (2009) 86-91.

28 H. Chen, R. Chen y S. Li, Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples, J. Chromatogr., A, 1217 (2010) 1244-1248.

29 L. Kocúrová, I. S. Balogh, L. Nagy, F. Billes, A. Simon y V. Andruch, Application of a bisindocarbocyanine reagent for dispersive liquid-liquid microextraction of silver with subsequent spectrophotometric determination, Microchem. J., 99 (2011) 514-522.

30 L. Rusnáková, V. Andruch, I. S. Balogh y J. Škrlíková, A dispersive liquid-liquid microextraction procedure for determination of boron in water after ultrasound-assisted conversion to tetrafluoroborate, Talanta, 85 (2011) 541-545.

31 X. Liao, B. Liang, Z. Li y Y. Li, A simple, rapid and sensitive ultraviolet-visible spectrophotometric technique for the determination of ultra-trace copper based on injection-ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction, Analyst, 21 (2011) 4580-4586.

32 X. Liao, B. Liang, Z. Li y Y. Li, Ion pair-based dispersive liquid-liquid microextraction for gold determination at ppb level in solid samples after ultrasound-assisted extraction and in waters by electrothermal-atomic absorption spectrometry, Talanta, 84 (2011) 109-115.

33 W. X. Wang, T. J. Yang, Z. G. Li, T. T. Jong y M. R. Lee, A novel method of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of trace organoarsenic compounds in edible oil, Anal. Chim. Acta, 690 (2011) 221-227.

34 V. P. Jofré, M. V. Assof, M. L. Fanzone, H. C. Goicoechea, L. D. Martínez y M. F. Silva, Optimization of ultrasound assisted-emulsification-dispersive liquid-liquid microextraction by experimental design methodologies for the determination of sulfur compounds in wines by gas chromatography-mass spectrometry, Anal. Chim. Acta, 683 (2010) 126-135.

35 E. Molaakbari, A. Mostafavi y D. Afzali, Ionic liquid ultrasound assisted dispersive liquid-liquid microextraction method for preconcentration of trace amounts of rhodium prior to flame atomic absorption spectrometry determination, J. Hazard. Mat., 185 (2011) 647-652.

36 S. Li, S. Cai, W. Hu, H. Chen y H. Liu, Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for a sensitive determination of cadmium in water samples, Spectrochim. Acta B, 64 (2009) 666-671.

37 F. Priego-Capote y M. D. Luque de Castro, Speciation of chromium by in-capillary derivatization and electrophoretically mediated microanalysis, J. Chromatogr. A, 1113 (2006) 244-250.

38 R. A. Gil, S. Cerutti, J. A. Gásquez, R. A. Olsina y L. D. Martinez, Preconcentration and speciation of chromium in drinking water samples by coupling of on-line sorption on activated carbon to ETAAS determination, Talanta, 68 (2006) 1065-1170.

39 A. Kot y J. Namiesnèik, The role of speciation in analytical chemistry, Trend Anal. Chem. 19 (2000) 69-79.

40 J. Kotas y Z. Stasicka, Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation, Environ. Pollut, 107 (2000) 263-283.

41 H. G. Seiler, H. Sigel (Eds.), Handbook on Toxicity of Inorganic Compounds, Marcel Dekker, New York, 1988.

42 N. N. Meeravali y S. J. Jiang, A novel cloud point extraction approach using cationic surfactant for the separation and pre-concentration of chromium species in natural water prior to ICP-DRC-MS determination, Talanta, 80 (2009) 173-178.

43 S. Cathum, C. E. Brown y W. Wong, Determination of Cr^{3+}, CrO_4^{2-}, and $Cr_2O_7^{2-}$ in environmental matrixes by high-performance liquid chromatography with diode-array detection (HPLC–DAD), Anal. Bioanal. Chem., 373 (2002) 103-110.

44 E. Castillo, M. Granados y J. L. Cortina, Liquid-supported membranes in chromium(VI) optical sensing: transport modelling, Anal. Chim. Acta, 464 (2002) 197-208.

45 N. Unceta, F. Séby, J. Malherbe y O. F. X. Donard, Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review, Anal. Bioanal. Chem. 397 (2010) 1097-1111.

46 M. J. Marqués, A. Salvador, A. Morales-Rubio y M. de la Guardia, Chromium speciation in liquid matrices: a survey of the literature, Fresenius J. Anal. Chem. 367 (2000) 601-613.

47 L. Hou y H. K. Lee, Dynamic Three-Phase Microextraction as a Sample Preparation Technique Prior to Capillary Electrophoresis, Anal. Chem., 75 (2003) 2784-2789.

48 F. Pena-Pereira, I. Lavilla y C. Bendicho, Immersed single-drop microextraction interfaced with sequential injection analysis for determination of Cr(VI) in natural waters by electrothermal-atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta B, 63 (2008) 498-503.

49 M. Ghambarian, Y. Yamini, A. Esrafili, N. Yazdanfar y M. Moradi, A new concept of hollow fiber liquid–liquid–liquid microextraction compatible with gas chromatography based on two immiscible organic solvents, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 5652-5658.

50 F. Pena-Pereira, I. Lavilla y C. Bendicho, Liquid-phase microextraction approaches with atomic detection: A critical review, Anal. Chim. Acta, 669 (2010) 1-16.

51 D. Dadfarnia y A. M. H. Shabani, Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals: A review, Anal. Chim. Acta, 658 (2010) 107-109.

52 F. Pena-Pereira, I. Lavilla y C. Bendicho, Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry, TrAc-Trend. Anal. Chem., 29 (2010) 617-628.

53 C. Nerín, J. Salafranca, M. Aznar y R. Batlle, Critical review on recent developments in solventles techniques for extraction of analytes, Anal. Bioanal. Chem., 393 (2009) 809-833.

54 C. Bosch-Ojeda y F. Sánchez-Rojas, Separation and Preconcentration by dispersive liquid-liquid microextraction procedure: A review, Chromatographia, 69 (2009) 1149-1159.

55 M. Rezaee, Y. Yamini y M. Faraji, Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 2342–2357.

56 Q. Zhou, H. Bai, G. Xie y J. Xiao, Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase micro-extraction, J. Chromatogr. A, 1188 (2008) 148-153.

57 Y.C. Fan, M.L. Chen, C. Shen-Tu y Y. Zhu, A Ionic Liquid for Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Phenols, J. Anal. Chem., 64 (2009) 1017–1022.

58 Y. Liu, E. Zhao, W. Zhu, H. Gao y Z. Zhou, Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction in water samples, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 885-891.

59 W. Zhang, J. Liu, Z. Reu, C. Du y J. Ma, Solvent extraction of Chromium (VI) with Tri-n-butyl phosphate from aqueous acidic solutions, J. Chem. Eng. Data, 52 (2007) 2220-2223.

60 P. Venkateswaran y K. Palanivelu, Studies on recovery of hexavalent chromium from plating wastewater by supported liquid membrane using tri-n-butyl phosphate as carrier, Hydrometallurgy, 78 (2005) 107-115.

61 A. Ouejhani, M. Dachraoui, G. Lalleve y J.F. Fauvarque, Hexavalent chromium recovery by liquid-liquid extraction with tributylphosphate from acidic chloride media, Anal. Sci. 19 (2003) 1499-1504.

62 R. K. Tandon, P. T. Crisp, J. Ellis y R. S. Baker, Effect of pH on chromium(VI) species in solution, Talanta, 31 (1984) 227-228

63 M. Sperling, S.K. Xu y B. Welz, Determination of chromium(III) and chromium(VI) in water using flow-injection on-line preconcentration with selective adsorption on activated alumina and flame atomic-absorption spectrometric detection, Anal. Chem. 64 (1992) 3101-3108.

64 J. C. Bailar, H. J. Emelélus y S. R. Nyholm, "Comprehensive Inorganic Chemistry", 1973, Pergamon Press, Oxford, 693.

65 F. A. Cotton y G. Wilkinson, "Advanced Inorganic Chemistry", 4th ed., 1980, John Wiley and Sons, New York, 733.

66 H. M. Santos, C. Lodeiro y J. L. Capelo-Martínez en "Ultrasound in Chemistry. Analytical Applications", J.L. Capelo-Martínez Ed., Wiley-VCH, 2009, cap. 1

67 F. Priego Capote y M.D. Luque de Castro, Analytical aplications of ultrasound, 2006, Elsevier

68 K. S. Suslick, R. R. Cline, y D. A. Hammerton, The sonochemical hot-spot, J. Am. Chem. Soc., 108 (1986) 5641-5642.

69 M. R. Baloga y J. E. Earley, Kinetics of oxidation of Cr(III) to Cr(VI) by hydrogen peroxide, J. Am. Chem. Soc., 83 (1961) 4906-4909

70 M. Sperling, X. Yin y B. Welz, Differential determination of chromium (VI) and total chromium in natural waters using flow injection on-line separation and preconcentration electrothermal atomic absorption spectrometry, Analyst, 117 (1992) 629-635.

71 J. L. Manzoori y F. Shemirani, Determination of chromium (VI) and total chromium by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after preconcentration using solvent extraction and back-extraction, J. Am. Chem. Soc., 10 (1995) 881-883

72 C. M. Wai, L. M. Tsay y J. C. You, A two-step extraction method for differentiating chromium species in water, Mikrochim. Acta II (1987) 73-78

73 M. L. Kaiser, S. R. Koirtyohann, E. J. Hinderberger y H.E. Taylor, Reduction of matrix interferences in furnace atomic absorption with the L'vov Platform, Spectrochim. Acta B, 36 (1981) 773-783.

74 W. Salvin, G. R. Carnrick y D. C. Manning, Magnesium-nitrate as a matrix modifier in the stabilized temperature platform furnace, Anal. Chem., 54 (1982) 621-624.

75 X. Bai, Z. Fan, Determination of chromium (III) in natural water samples utilizing capillary micro-extraction on nanometre zirconium phosphate coating coupled to electrothermal atomic absorbance spectrometry, J. Environ. Monit., 11 (2009) 326–329

76 P. Hemmatkhah, A. Bidari, S. Jafarvand, M.R.M. Hosseini y Y. Assadi, Speciation of chromium in water samples using dispersive liquid–liquid microextraction and flame atomic absorption spectrometry, Microchim. Acta 166 (2009) 69–75

77 M. Soylak y Y.E. Unsal, Chromium and iron determinations in food and herbal plant samples by atomic absorption spectrometry after solid phase extraction on single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) disk, Food and Chemical Toxicology 48 (2010) 1511–1515.

78 H. Sereshti, V.Khojeh y S. Samadi, Optimization of dispersive liquid–liquid microextraction coupled with inductively coupled plasma-optical emission spectrometry with the aid of experimental design for simultaneous determination of heavy metals in natural waters, Talanta 83 (2011) 885–890.

79 M. Mirzaei, M. Behzadi, N.M. Abadi y A. Beizaei, Simultaneous separation/preconcentration of ultra trace heavy metals in industrial wastewaters by dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop prior to determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry, Journal of Hazardous Materials 186 (2011) 1739–1743.

80 M.R. Moghadam, S. Dadfarnia y A.M.H. Shabani, Speciation and determination of ultra trace amounts of chromium by solidified floating organic drop microextraction (SFODME) and graphite furnace atomic absorption spectrometry, Journal of Hazardous Materials 186 (2011) 169–174

81 I. Razmisleviciene, A. Padarauskas, B. Pranaityte y E. Naujalis, Determination of Cr(VI) by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Dried-Droplet Laser Ablation ICP-MS, Current Analytical Chemistry, 6 (2010) 310-315.

82 EN 71 Part 3: Dec. 1994 2 rev. (Migration of certain elements), European Standard on Safety of Toys.

83 Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council of 18 june 2009 on the safety of toys, http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:C:2011:307:0003:0004:EN:PDF (consultado 20 de marzo de 2012).

Capítulo II

Procedimiento semicuantitativo (screening) no cromatográfico de especiación de arsénico en alimentos infantiles comerciales con base de pescado utilizando ETAAS e introducción directa de la muestra suspendida

CONTENIDO

1.1. INTRODUCCIÓN 89

2.2 PARTE EXPERIMENTAL 96

2.2.1. Instrumentación 96

2.2.2. HG-AFS 97

2.2.3. Otra instrumentación 98

2.2.4. Reactivos 99

2.2.5. Recubrimiento del tubo pirolítico 100

2.2.6. Muestras y material de referencia 100

2.2.7. Procedimiento para determinación de arsénico total mediante HG-AFS 101

2.2.8. Procedimiento propuesto 101

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 102

2.3.1 Efecto del medio de suspensión 105

2.3.2. Efecto del modificador químico 108

2.3.2.1. Níquel y Cerio 108

2.3.2.2. Recubrimiento del atomizador 118

2.3.2.3. Elementos del grupo del platino 122

2.3.3 Influencia de la matriz de alimentos en suspensión 126

2.3.4 Capacidad para la especiación 128

2.3.5 Calibración y validación 130

2.4. CONCLUSIÓN 131

2.5. BIBLIOGRAFÍA 133

1.1. INTRODUCCIÓN

El arsénico es un elemento ubicuo que aparece en el medio ambiente tanto a partir de fuentes naturales como debido a la actividad volcánica y el lixiviado de minerales [1] como desde fuentes antropogénicas (fundición de minerales, combustión de carbón, empleo de pesticidas y promotores del crecimiento, etc) [2,3]. Debido a los procesos metabólicos naturales que ocurren en la biosfera, el arsénico aparece en distintas formas inorgánicas y orgánicas. Hasta la fecha se han identificado más de 25 formas químicas en el medio ambiente [4]. La Figura 2.1 muestra las formas químicas de algunas de las especies identificadas. En agua de mar y sedimentos marinos las concentraciones de arsénico total se encuentran [5] en el intervalo 1-2 µg L^{-1} y 3-15 µg g^{-1}, respectivamente. Los organismos marinos son capaces de bioacumular arsénico [6] hasta concentraciones de 1-100 µg g^{-1}. La especie predominante en peces, moluscos y crustáceos es la arsenobetaína (AB) que supone, habitualmente, el 80 % del arsénico total [7,8], mientras que en algas las especies predominantes son los arsenoazúcares [9].

De acuerdo con el camino metabólico propuesto para seres humanos [10,11], la metilación de arsénico supone una reducción de As(V) a As(III) seguida de una adición oxidativa de un grupo metilo al arsénico según el esquema que aparece en la Figura 2.2. Se cree que, en el ser humano, la glutationa actúa como agente reductor y S-adenosilmetiona (SAM) como agente dador [12,13]. La presencia de concentraciones de los metabolitos ácido monometilarsónico (MA) y ácido dimetilarsínico (DMA) en orina humana constituye una evidencia de este camino metabólico [14,15]. Se admite que la metilación de las formas inorgánicas de arsénico es un proceso de destoxificación ya que, en general, al aumentar el carácter orgánico de las formas de arsénico disminuye la toxicidad como podemos comprobar en la Tabla 2.1. Como puede apreciarse, MA y DMA muestran una toxicidad intermedia, mientras que las especies trimetiladas como TMAO, AC y AB se consideran no tóxicas.

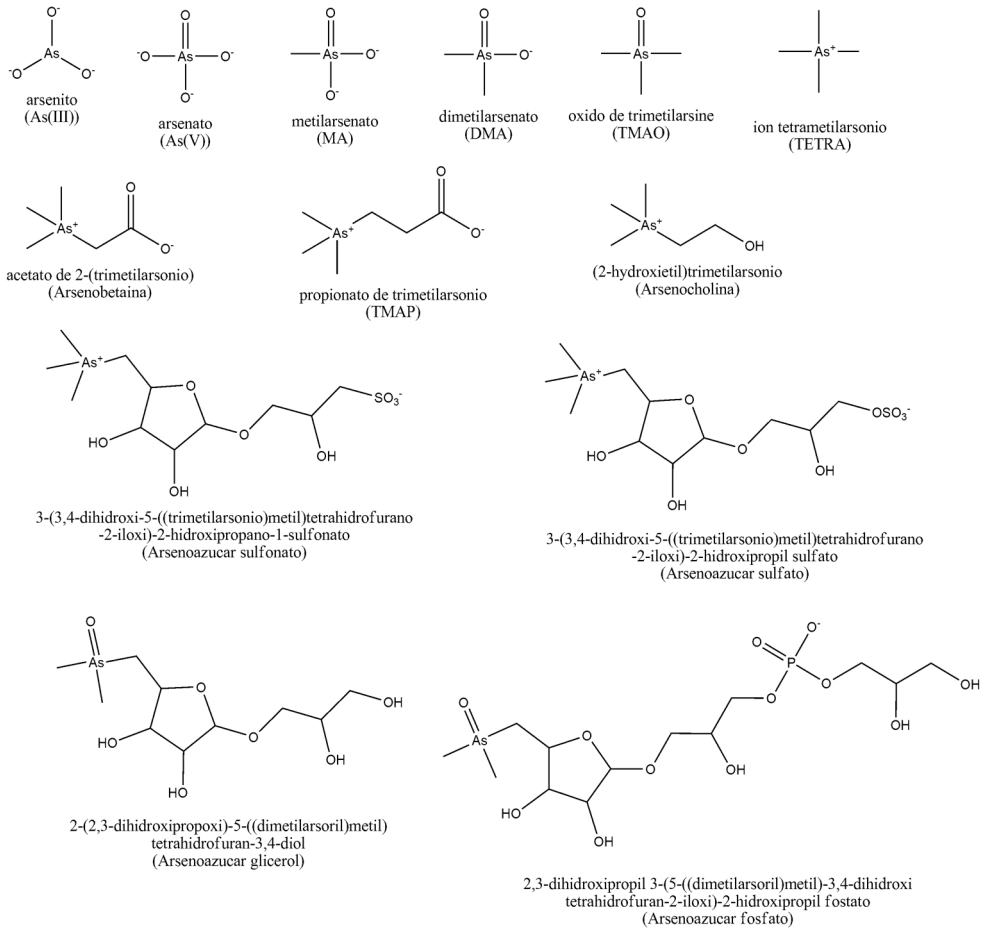


Figura 2.1: Formas comunes de arsénico encontradas en organismos marinos y tejidos de plantas.

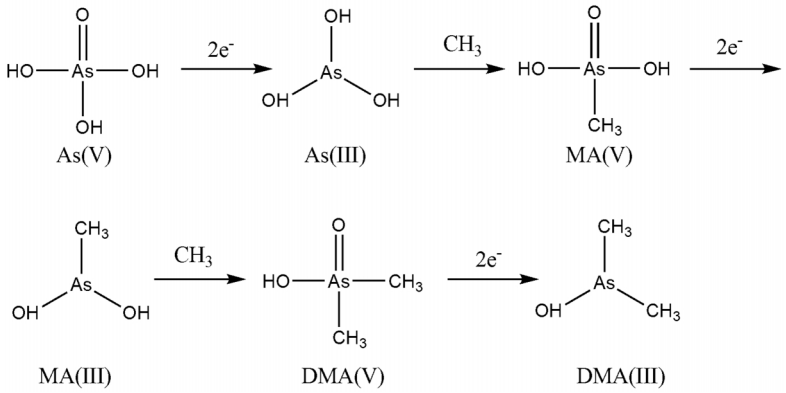


Figura 2.2: Posible camino metabólico del arsénico inorgánico en el cuerpo humano

Tabla 2.1. LD50 (μg g^{-1}) para algunas formas de arsénico en ratones

Compuestos de arsénico	LD_{50}
Arsenito (As(III))	15-42
Arsenato (As(V))	20-800
Metilarsenato (MA)	700-1800
Dimetilarsenato (DMA)	1200-2600
Óxido de trimetilarsina (TMAO)	10600
Ion tetrametilarsonio (TETRA)	890
Arsenocolina (AS)	6500
Arsenobetaína (AB)	>10000

En el ser humano se considera que una dosis oral de arsénico inorgánico diaria segura es de 0.3 μg kg^{-1} sin que se produzcan efectos adversos para la salud. Esta dosis se ha calculado suponiendo una ingesta de 2 μg de As al día como consecuencia de los alimentos y el consumo de 4.5 L de agua al día [16]. La mayor ingesta de arsénico en el ser humano a través de la dieta proviene del consumo de productos marinos, principalmente pescado, lo que supone el 90% del arsénico total consumido. Sin embargo, menos del 3 % de este arsénico está presente en forma inorgánica (arsenito o arsenato) [17].

Estos datos ilustran claramente sobre la necesidad de emplear métodos analíticos que sean capaces de diferenciar entre las distintas especies de arsénico, lo que denominamos especiación [18]. En 2003 la Unión Europea estableció [19] que el máximo contenido total en arsénico total tanto en productos alimenticios derivados del pescado como de animales de pelo es de 6 μg g^{-1}. La directiva reconoce la diferente toxicidad de las formas de arsénico y hace un llamamiento al desarrollo de métodos analíticos que puedan distinguir entre arsénico inorgánico y arsénico orgánico ya que puede, en muchas ocasiones, superarse esos niveles para el total del elemento y, sin embargo, encontrarnos mayoritariamente con formas químicas de arsénico no tóxicas [20].

Los estudios de especiación de arsénico comienzan con un paso crucial, el proceso de extracción [21]. En efecto, habitualmente la muestra no puede introducirse en la instrumentación de forma directa, es necesario aislar las distintas formas de arsénico de la mayor parte de la matriz evitando la interconversión de especies y procurando una extracción cuantitativa [22]. El procedimiento de extracción depende mucho del tipo de muestra y la mayoría se han desarrollado sobre matrices de productos marinos [23,24]

ya que es donde los contenidos en arsénico alcanzan los mayores valores. No obstante, se encuentran en la bibliografía procedimientos de extracción para vegetales [25], arroz[26-28], zanahorias[29,30], carne de pollo[31,32], algas [33], bebidas [34] y alimentos infantiles [35,36]. En la mayoría de los procedimientos propuestos se emplean procesos de extracción suave mediante digestión enzimática [37-39], extracción con microondas [40], extracción con líquido presurizado [41], empleo de ultrasonidos [42,43], extracción acelerada con disolventes [44], extracción a temperatura elevada con ácido trifluoroacético [45] y extracción con agua mediante agitación mecánica [46]. Después del tratamiento de la muestra, que en muchos de los casos comentados anteriormente supone el empleo de varias horas de tratamiento, la especiación de arsénico exige habitualmente el empleo de varias pasos adicionales como puede ser la derivatización [47], separación y detección [48].

En los últimos años las técnicas instrumentales aplicadas a la especiación de arsénico ha sido ampliamente revisadas [49-55]. La principal dificultad reside en la separación de las distintas especies de arsénico en un solo proceso cromatográfico. Frecuentemente se requiere más de una técnica cromatográfica para separar la especies catiónicas, aniónicas y neutras de arsénico presentes en la muestra antes de la detección. Es por ello que se han propuesto en muchos casos el empleo de varias columnas cromatográficas con fases estacionarias diferentes [56,57]. Mientras que esta opción ofrece un elevado nivel de separación, el equipamiento necesario y la complejidad del mismo lo hace poco práctico para muestras que han de caracterizarse de forma rápida, por lo que generalmente se prefiere el empleo de una sola columna cromatográfica [58]. En este caso se suelen emplear gradientes de fase móvil que tienen a su vez como inconveniente el tiempo extra que se consume en el reequilibrado de la columna entre determinaciones. Además de la cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), que se presenta como la opción más utilizada [52], también se han desarrollado procedimientos basados en el empleo de cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) [59], cromatografía de iones (IC) [60], electroforesis capilar (CE) [61], etc.

Tras la separación cromatográfica es precisa la detección en línea de las especies eluyentes. La técnica más utilizada [62] es el plasma de acoplamiento inducido (ICP) con

detección basada en espectrometría de masas (MS). Aunque suficientemente sensible, esta técnica basa su capacidad de identificación en la coincidencia en los tiempos de retención de estándares y analitos, lo que supone un serio problema en algunas formas de arsénico de las que no se dispone de estándares y es preciso sintetizarlas en el laboratorio [63]. El empleo de Electrospray acoplado a la Espectrometría de Masas (ES-MS) es una técnica de detección que aporta tanto información molecular como estructural permitiendo la identificación tanto de compuestos conocidos como desconocidos y ha sido aplicada con éxito a la determinación de arsenoazúcares en tejidos de animales marinos [64]. Con esta técnica se presenta un inconveniente en la detección de especies minoritarias de arsénico en presencia de grandes cantidades de arsenobetaína. Para corregir este problema se suele acoplar ES-MS con Espectrometría de movilidad de iones a longitud de onda asimétrica de campo alto (FAIMS) [65].

Alternativamente se ha utilizado la capacidad del arsénico para formar hidruros volátiles acoplando un sistema de generación de estos hidruros a la salida del cromatógrafo líquido lo que posibilita la detección de las distintas formas químicas de arsénico con la suficiente sensibilidad utilizando otros detectores distintos al ICP-MS [66,67], como pueden ser Fluorescencia Atómica [68,69] o la Espectrometría de Absorción Atómica [70-73], principalmente. La detección presenta distinta sensibilidad dependiendo de la forma química de arsénico, ya que no todas evolucionan a AsH_3. Cuando el rendimiento de algunas formas es muy bajo resulta necesario acoplar procesos de reducción y/o oxidación en línea enérgicos [74]. Precisamente, la distinta respuesta de las formas de arsénico al proceso de reducción en la generación de hidruros es la base del desarrollo de métodos no cromatográficos para la especiación de arsénico [75]. Un cuidadoso control de las condiciones experimentales, pretratamiento de la muestra en o fuera de línea y procesos de inyección en flujo o en baño, junto con distintas técnicas de atrapamiento del hidruro permiten la separación sin necesidad del proceso cromatográfico. Buena muestra de esto son los procedimientos propuestos recientemente para la especiación de arsénico en pescado [23], cereales [26], leche [76] y vegetales [25].

En ocasiones, no resulta necesario un estudio exhaustivo de las concentraciones de las distintas formas de arsénico, sino que bastaría con conocer el contenido total de ar-

sénico y su división en dos grandes grupos dependiendo de su toxicidad. En el primer grupo se incluyen las formas más tóxicas (As(III), As(V) y MA), mientras que en el segundo se incluyen las menos tóxicas (DMA, AB y AC). Esta situación es particularmente importante en los análisis de rutina de alimentos con base de pescado fabricados por la industria alimentaria. En esta situación es preciso disponer de un procedimiento que permita, con la sensibilidad adecuada, distinguir si la presencia de arsénico en el producto final es del tipo tóxico o no, aportando información útil de tipo cuantitativo o semicuantitativo. Un procedimiento de este tipo sería ideal si se pudiera realizar de forma rápida, con bajo costo, evitando los tediosos procesos de preparación de las muestras que anteriormente se han comentado, y con la suficiente sensibilidad como para satisfacer los requisitos de la legislación vigente. En este sentido se han publicado dos procedimientos de examen (*screening*) de formas de arsénico basados uno en el empleo de Cromatografía de Capa Fina con detección mediante Espectrometría de Masa con Célula de Reacción Dinámica en Plasma de Acoplamiento Inducido y Ablación por Láser (LA-ICP-DRC-MS) [77] y otro basado en la Voltametría aplicada a micropartículas inmovilizadas en pasta de carbono [78]. Ambos procedimientos requieren un tratamiento previo de la muestra y una instrumentación que se aleja de la definición previa de un procedimiento de *screening* ideal.

En este trabajo hemos desarrollado un procedimiento para el *screening* rápido de las formas de arsénico basándonos en el comportamiento diferencial de estas formas frente a distintos modificadores químicos cuando se emplea la Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (ETAAS). Esta técnica ya se ha aplicado a la cuantificación de As(III) y As total en distintos tipos de aguas [79-81] y sedimentos marinos [82] utilizando para ello procesos de inmovilización en nanopartículas de dioxido de titanio [79], coprecipitación [80], emulsión de membranas líquidas [81] y extracción en disolventes orgánicos de quelatos [82]. En otros casos se ha conseguido distinguir entre As total, As (III) y la suma de As(III)+As(V)+MA+DMA utilizando conjuntamente ETAAS y Generación de Hidruros [83].

El análisis de muestras biológicas por ETAAS se realiza habitualmente mediante la disolución ácida de la muestra con nítrico y peróxido de hidrógeno, ya que, en estas con-

diciones, la señal de absorción de fondo es mínima [84]. Para evitar la contaminación y aumentar la frecuencia de análisis se suele recomendar la mineralización en recipientes cerrados mediante calentamiento controlado en microondas [85]. Alternativamente se han utilizado otras sustancias para la mineralización como ácido etileno diaminotetra-acético (EDTA) [86]. Mejores resultados se obtienen con el empleo de hidróxido de tetrametil amonio (TMAH) en medio fuertemente alcalino. A este reactivo se le conoce como el "solubilizador de tejidos" y se ha empleado en multitud de matrices biológicas tales como tejidos y órganos de animales de origen marino [87-89] y terrestre [90-94], incluyendo pelo [95,96], suero sanguíneo [97] y espermatozoides humanos [98], material vegetal como plantas [99], arroz [100], cigarrillos [101] y madera [102] además de productos manufacturados como leche en polvo [103], aceite de girasol [104] y éster de celulosa [105] utilizando ETAAS como técnica de detección. Su empleo en ICP-OES e ICP-MS también está muy extendido [92] aunque aquí se pueden presentar problemas derivados de la formación de residuos en la nebulización, lo que obliga al empleo de sistemas distintos al neumático [106].

La solubilización con este reactivo presenta importantes ventajas ya que la mineralización parcial o completa se consigue con el empleo de temperaturas bajas, lo que evita la volatilización del analito.Al mismo tiempo, para conseguir estos fines solamente resulta necesario una pequeña concentración del mismo, lo que unido a su pureza, garantiza la obtención de blancos con baja señal. Aunque la mineralización sea incompleta, si se combina con una fuerte sonicación se puede conseguir una eficaz extracción del analito a la fase acuosa consiguiendo resultados seguros [89,107]. Otras propiedades interesantes son su utilización para eliminar o disminuir el residuo carbonáceo que queda en el atomizador debido a la introducción de muestras con elevado contenido de materia orgánica [97] y, puesto que la mineralización es suave, su adecuación para el estudio de especiación [108].

En muchos casos la mineralización incompleta de la muestra con TMAH conduce a la formación de suspensiones estables [107] que pueden manipularse como si de disoluciones acuosas se tratara, siendo muy adecuadas para su empleo en ETAAS ya que esta técnica no requiere que las muestras estén completamente disueltas [90].

En este trabajo se presenta un procedimiento especialmente adaptado para el *screening* de arsénico en alimentos infantiles de pescado manufacturados mediante un tratamiento muy elemental y sencillo de la muestra y la detección de arsénico con ETAAS y distintos modificadores químicos. Se trata de un procedimiento rápido y semi-cuantitativo que aporta información sobre el contenido en formas tóxicas y no tóxicas de arsénico en el producto alimenticio.

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1. INSTRUMENTACIÓN

Se ha utilizado un espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer Modelo 800 equipado con corrector de fondo de deuterio y corrección Zeeman (véase Figura 1.7), un atomizador de horno de grafito THGA y un automuestreador AS-800 (Perkin-Elmer, Shelton, USA). Las plataformas de grafito pirolítico se obtuvieron del mismo fabricante (referencia B050-4033). Como gas inerte se ha empleado argón, con una velocidad de flujo de 250 mL min^{-1} en todas las etapas, excepto en la de atomización en la que el flujo se detuvo. Se ha utilizado una lámpara de descarga sin electrodos de arsénico (Perkin-Elmer) operando a 300 mA. Los parámetros instrumentales seleccionados se muestran en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Parámetros instrumentales y programa de calentamiento.

Parámetro	*Valor*
Corriente de la lámpara, mA	300
Longitud de onda, nm	193.7
Rendija, nm	0.5
Tipo de atomizador	Plataforma
Volumen de muestra inyectada, µL	20
Modificador químico[a]	0.3 µg Ce(IV); 5 µg Zr; 30 µg Pd
Gráfica de calibrado, µg L^{-1}	50-250
Concentración de la suspensión, % m/v	10 (1 g en 10 ml)
Medio de suspensión	TMAH 0.01 M
Límite de detección en muestras, ng/g	30 (AB), 80 (DMA), 100 (As(III)+As(V)+MA)
RSD, %	< 3.5

[a] véase el texto para detalles sobre el modificador a utilizar

Programa de horno

Etapa	Temperatura, ºC	Rampa, °C/s	Mantenido, s
1: Secado	110	10	30
2: Secado	130	5	30
3: Calcinación	800[a]	10	20
4: Atomización[b,c]	2400	0	5
5: Limpieza[d]	2600	0	3

[a] Para la determinación de DMA se utilizan 600 °C
[b] El flujo de argón interno se paró
[c] Etapa de lectura
[d] Se suprimió esta etapa en la determinación de DMA con tubo recubierto

2.2.2. HG-AFS

La técnica HG-AFS se llevó a cabo utilizando un sistema de flujo continuo PSA MilleniumExcalibur (PS Analytical, Orping, UK). Las medidas se realizaron utilizando una lámpara de cátodo hueco de descarga reforzada para arsénico (Photron PTY. LTD., Australia) en la línea 197.3 nm, con una corriente primaria de 27.5 mA y una corriente de refuerzo de 34.9 mA. La Figura 2.3 muestra el equipo utilizado. Las condiciones para HG-AFS fueron: velocidades de flujo de reactivos a 9.0 mL min^{-1} para el reactivo reductor conteniendo ácido clorhídrico 3.5 M, disolución de ioduro potásico al 1% (m/v) y ácido ascórbico al 0.2% (m/v) y 4.5 mL min^{-1} para la disolución al 0.6% (m/v) de borohidruro sódico estabilizada con hidróxido sódico 75 mM. A través del separador gas-líquido en forma de U se pasó gas argón, y los hidruros volátiles producidos fueron empujados por el flujo de

argón (330 mL min^{-1}), pasando a través de una membrana higroscópica PermaPure (Farmingdale, NJ, USA) y siendo finalmente atomizados usando una llama de difusión de hidrógeno. Las válvulas y piezas en T se obtuvieron de Omnifit (Cambridge, UK).

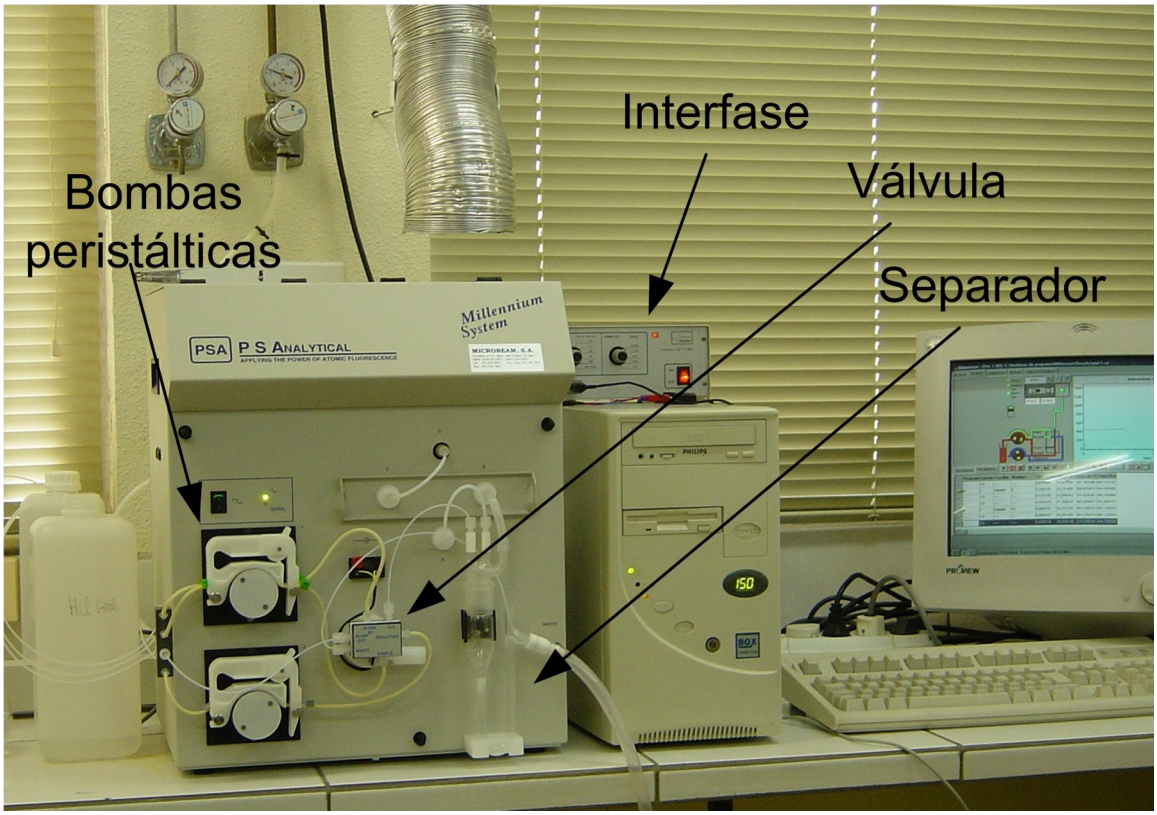


Figura 2.3: Equipo utilizado para las medidas de arsénico por fluorescencia atómica.

2.2.3 OTRA INSTRUMENTACIÓN

Para los trabajos con ultrasonidos se utilizó una sonda de 200 W de potencia Dr. Heilscher (Germany) modelo UP200H equipada con vástagos de 5 y 10 mm de titanio (Figura 2.4). El calentamiento de las muestras se realizó en un horno microondas doméstico de 850 W de potencia. La mineralización de las muestras con fines de comparación se llevó a cabo utilizando vasos de Teflon cerrados en un horno de microondas MLS-1200 MEGA (Milestone) y un rotor MDR-1000/6 (Radiometer).





Figura 2.4: Horno microondas y sonda de ultrasonidos utilizadas.

2.2.4. REACTIVOS

Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada (18 MΩ cm) purificada con un sistema Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA). Todo el material de vidrio se lavó con disolución al 10% v/v de ácido nítrico y se aclaró con agua desionizada antes de su uso. Las disoluciones estándar de 1000 µg mL^{-1} se prepararon disolviendo los estándares de As(III), $NaAsO_2$, y As(V), Na_2HAsO_4, (Fluka, Buchs, Switzerland) en agua y se almacenaron en botellas de PTFE a 4°C. Las disoluciones estándar de 1000 µg mL^{-1} en arsénico de ácido cacodílico [$(CH_3)_2As(O)OH$, DMA, Sigma, St. Louis, MO, USA] y metilarsinato sódico [$CH_3AsO(ONa)_2 \cdot 6H_2O$, MA, Carlo Erba, Milan, Italia] se prepararon en agua y se mantuvieron a 4 °C en botellas de PTFE. Las disoluciones de trabajo, más diluidas, se prepararon diariamente. La disolución estándar de arsenobetaína se obtuvo a partir del material de referencia BCR CRM 626 suministrado por el Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) con un contenido certificado de arsenobetaína de 1031 ± 6 µg g^{-1} (433 ± 3 µg g^{-1} de arsénico). Como modificadores químicos se utilizó nitrato de paladio, nitrato de cerio (IV) y amonio, nitrato de níquel, oxicloruro de zirconio, wolframato sódico, molibdato amónico, y rodio y platino. Todos ellos fueron Fluka. Como

agente solubilizante y disgregante se empleó hidróxido de tetrametil amonio (TMAH) 1 mol L^{-1} de Riedel-deHaën (Alemania). La disolución al 0.6% (m/v) de borohidruro sódico se preparó diariamente disolviendo el producto (Aldrich) en disolución de hidróxido sódico 0.075 mol L^{-1}. La disolución reductora se preparó disolviendo ioduro potásico (Fluka) al 1% (m/v) y ácido ascórbico (Fluka) al 0.2% (m/v) en disolución 3.5 mol L^{-1} de ácido clorhídrico (Fluka). Los hidruros volátiles formados fueron conducidos con argón hasta la llama del espectrómetro de fluorescencia atómica. Air Liquide (Madrid, España) suministró todos los gases empleados.

2.2.5. RECUBRIMIENTO DEL TUBO PIROLÍTICO

Para la determinación de DMA se propone el recubrimiento del tubo pirolítico con zirconio. Para ello se introduce el tubo, conteniendo la plataforma, en una disolución de $ZrOCl_2$ de 1 g L^{-1} en Zr y se deja estar a presión atmosférica durante toda la noche (aproximadamente 12 h). Con posterioridad el tubo se seca a 120 °C durante 30 minutos. Finalmente el tubo se somete tres veces al tratamiento térmico recomendado para la determinación de As antes de empezar a utilizarlo con ese fin con el objeto de preacondicionarlo (programa de calentamiento que aparece en la Tabla 2.2).

2.2.6. MUESTRAS Y MATERIAL DE REFERENCIA

Todas las muestras de alimentos infantiles se obtuvieron de la empresa Hero España, S.A. Se analizaron un total de siete muestras de alimento infantil con base de pescado donde habitualmente la guarnición es de verduras y patatas, aunque también se ha estudiado uno con bechamel y otro con arroz. El método se validó utilizando los materiales de referencia certificados, NIST-SRM 1568a (harina de arroz) y 1566a (tejido de ostra) del NationalxInstitute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA y DORM-2 (tejido muscular de pescado) y DOLT-2 (tejido muscular e hígado de pescado) del NationalxResearch Council of Canada. Estos materiales solamente están certificados para el

contenido total de arsénico, aunque se han hecho numerosos estudios que confirman los contenidos de las diferentes especies de arsénico.

2.2.7. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL MEDIANTE HG-AFS

Se pesa una fracción de la muestra de alimento infantil (1 g) en un crisol de porcelana y se añaden 2.5 mL de una suspensión conteniendo 20% de $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ y 2% de MgO, y seguidamente 5 mL de ácido nítrico al 50% (v/v). La digestión se realiza en una placa eléctrica a baja temperatura, para evitar salpicaduras, hasta sequedad. Después de este tratamiento, las muestras se calcinan en un horno de mufla aplicando una subida gradual de la temperatura desde 25 hasta 450 °C, temperatura que fue mantenida durante 12 horas. Las cenizas blancas obtenidas tras este tratamiento, fueron humedecidas con 1 mL de agua y disueltas mediante la adición de 9 mL de ácido clorhídrico al 10% (v/v). Se analizaron alícuotas de esta disolución mediante HG-AFS.

2.2.8. PROCEDIMIENTO PROPUESTO

Las suspensiones de alimentos infantiles comerciales se preparan pesando 1 g de material al que se añaden 10 ml de una disolución de TMAH 0.01 mol L^{-1}. La suspensión se calienta a 80 °C durante 10 minutos y se sonica durante 15 minutos. Alícuotas de 20 µl se introducen en el atomizador utilizando distintos modificadores químicos.

Para la determinación del contenido total en arsénico se utiliza como modificador químico una disolución de nitrato de paladio de 1500 µg mL^{-1} de la que se inyectan 20 µL.

Para la determinación de arsénico inorgánico (As(III)+As(V)+MA) se emplea una disolución de nitrato de cerio (IV) y amonio 10^{-4} mol L^{-1} de la que se inyectan 20 µL.

Para la determinación de DMA se utilizará un atomizador recubierto de Zr al tiempo que se emplea como modificador una disolución de nitrato de zirconio de 250 µg mL^{-1} de la que se inyectan 20 µL.

El programa de calentamiento aplicado aparece en la Tabla 2.2. La cuantificación se realiza en todos los casos mediante el método de adiciones estándar a las muestras con concentraciones de analito entre 50 y 250 µg L^{-1}.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contrariamente a lo que podría pensarse en un principio, a pesar de los procesos de calentamiento a los que se le somete durante el programa de horno en ETAAS, la atomización de arsénico depende de la forma química en la que se encuentra. En un artículo reciente [109] se discute sobre la atomización de arsénico y se proponen las siguientes reacciones como las más probables en esta etapa:

$$As_xO_y(s) + yC(s) \xrightarrow{K_1} xAs(s) + yCO(g) \qquad \{1\}$$

$$\frac{x}{2}As_2(g) \underset{}{\overset{K_2}{\rightleftarrows}} xAs(g) \qquad \{2\}$$

y en presencia de otro elemento (por ejemplo un modificador químico):

$$AsX_m(s,l) \rightarrow AsX_m(g) \rightarrow As(g) + mX(g)$$

donde m, x, e y son coeficientes estequiométricos. A partir de las constantes de los equilibrios $\{1\}$ y $\{2\}$, de los valores de absorbancia obtenidos para la señal de atomización en el máximo y a otros tiempos y la ecuación de Van'tHoff, los autores encuentran que la constante del equilibrio de atomización (K) de un elemento sigue la siguiente relación:

$$\log K = \left(-\frac{\Delta H^0}{2.303R} \right) \cdot \frac{1}{T} + C'$$

donde ΔH^0 es la entalpía estándar de la transición de fase, R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta y C' una constante de integración. La representación grá-

fica de $\log K$ frente a $\frac{1}{T}$ conduce a una línea recta de pendiente $-\frac{\Delta H^0}{2.303R}$, de donde se puede calcular la entalpía del proceso de atomización. El valor de K se obtiene a partir de:

$$K = \frac{A_t}{A_{\max} - A_t}$$

siendo $A_{\max}$ y A_t las señales de absorbancia medidas en el máximo y en otro tiempo t, respectivamente.

Utilizando este fundamento teórico se han desarrollado medidas experimentales que han permitido calcular los cambios de entalpía en la atomización de arsénico (III) y arsénico en arsenobetaína, resultando ser de 384.1 ± 2.5 kJ mol^{-1} y 362.5 ± 1.6 kJ mol^{-1}, respectivamente. La comparación de estos resultados con los valores conocidos previamente para algunas energías de enlace de arsénico (Tabla 2.3) muestra claramente que en el caso de As(III) la atomización se realiza a partir de enlaces As-As, mientras que en el caso de la arsenobetaína (AB) la atomización supone la ruptura de enlaces As-C.

Tabla 2.3. Energías de enlace y resultados experimentales

Enlace	*Energía, kJmol^{-1}*
As-As	382 ± 10.5
As-O	481 ± 18
As-C	367.0
As-Pd	112.1
Experimental As(III)	384.1 ± 2.5
Experimental AB	362.5 ± 1.6

Esta menor entalpía supone que la atomización ha de ser más favorable para el arsénico en arsenobetaína.Esto coincide con la observación experimental de que, en presencia de un cantidad baja de modificador (500 ng de Pd + 50 ng de $Mg(NO_3)_2$), la pendiente de la recta de calibrado para As en AB es 1.3 veces mayor que para As(III). No se han encontrado diferencias experimentales en la sensibilidad de As(III) y As(V). La mayor sensibilidad de las formas orgánicas de arsénico se atribuye a la formación de enlaces As-C. Esta afirmación puede resultar curiosa cuando la atomización se realiza en presen-

cia de carbono pirolítico tanto para As(III) como para AB. Parece ser que el grafito de la superficie del horno no es una fuente de carbono adecuada para la formación de enlaces As-C durante la etapa de pirólisis. Esto es consecuencia, probablemente, de que los enlaces sp^2 C-C de la superficie del horno son demasiado fuertes para reaccionar con el As y formar los enlaces As-C durante el proceso de pirólisis. El hecho de que la señal para As(III) aumente en presencia de materia orgánica como metanol o ácido acético, junto con las conclusiones obtenidas previamente sobre la formación de carbono activo en ETAAS debido a la pirólisis de ácido ascórbico [110,111], nos llevan a pensar que el carbono que coexiste con As en AB evoluciona hasta carbono activo durante la etapa de pirólisis enlazándose al As.

Algo similar se ha observado en la determinación de arsénico inorgánico y arsénico en arsenobetaina por ICP-AES e ICP-MS. En ambos casos se ha informado de un incremento en la sensibilidad para arsénico en AB del 15 % respecto de As inorgánico por introducción directa de disoluciones. El motivo no se conoce pero desaparece tras la mineralización de la disolución de AB [112].

Sin embargo, estas conclusiones no son definitivas ya que pueden cambiar dependiendo del modificador químico y el medio en el que se encuentran las formas de arsénico. Así, se ha encontrado diferencias de sensibilidad entre formas de arsénico con el empleo de W o Pd [113], la mezcla W+Pd+ácido cítrico [114], Ce(IV) [115] y Pd [116]. En un estudio comparativo [117] empleando tubos pirolíticos sin modificador, con modificadores de cloruro de paladio o nitrato de paladio y recubiertos de wolframio se observó que la sensibilidad de As(III) y As(V) era similar en cualesquiera condiciones. MA y DMA tuvieron un comportamiento similar en cuanto a masa característica y máxima temperatura de pirólisis con todos los modificadores excepto con tubos recubiertos de wolframio y principalmente con cloruro de paladio. Donde se observaron importantes diferencias fue en el comportamiento de arsenobetaína (AB) y arsenocolina (AC) que mostraron una gran volatilidad en tubos recubiertos de wolframio, pirolíticos y con el empleo de cloruro de paladio. En estas circunstancias la máxima temperatura de pirólisis disminuye hasta 200 °C, lo que da una idea de la volatilidad de estas formas orgánicas de arsénico. Cuando se emplea paladio en forma de nitrato se consigue un efecto nivelante en el

comportamiento y la masa característica para As(III), As(VI), MA, DMA y AB es similar, siendo menor para AC. La diferencia de comportamiento entre $PbCl_2$ y $Pd(NO_3)_2$ se debe a la presencia de cloruro y esta circunstancia hay que tenerla en cuenta ya que las muestras pueden incluir concentraciones importantes de cloruro o aparecer como consecuencia del proceso de mineralización, si existiera.

2.3.1 EFECTO DEL MEDIO DE SUSPENSIÓN

Uno de los objetivos de nuestra investigación es la introducción de la muestra en el atomizador de forma directa o con la mínima manipulación. Las muestras a considerar son alimentos preparados con pescado que se comercializan en envases individuales para consumo de niños pequeños. Debido a la presencia del pescado, los contenidos de arsénico total de estas muestras suelen llamar la atención por lo elevados que resultan. Los estudios de especiación realizados hasta la fecha siempre sugieren que la presencia de arsénico es mayoritariamente en la forma de arsenobetaína, con una presencia mínima o indetectable de As(III), MA y DMA.

La textura de estos alimentos es del tipo papilla sin trozos sólidos apreciables. La experiencia previa [118,119] en la determinación de arsénico total y especiación en estos alimentos indica un contenido promedio, dependiendo del tipo de pescado, de 2 $\mu g\ g^{-1}$ de alimento tal y como se comercializa. Por tanto la preparación de suspensiones al 10 % de estas muestras conducirá a concentraciones de arsénico perfectamente detectables por ETAAS.

Como medio de suspensión se ensayó en primer lugar el constituido por una disolución de ácido nítrico a distintas concentraciones siempre inferiores al 3 % v/v en presencia de H_2O_2, que favorece la combustión de la materia orgánica durante la etapa de pirólisis [120], a distintas concentraciones en el intervalo del 20 a 80 % v/v a partir del H_2O_2 comercial (30 % v/v). Se prepararon las suspensiones en presencia y ausencia de Tritón X-100 al 0.5 % y se ensayó el empleo de calentamiento moderado (70 °C durante 10 mi-

nutos) y la aplicación de energía ultrasónica durante 15 minutos para mejorar la suspensión.

Ni en las mejores condiciones experimentales encontradas para estas cinco variables fue posible obtener una suspensión homogénea y estable que permitiese el empleo del automuestreador en el detector. Además, la presencia de residuo carbonáceo en el automuestreador resultó visible después de una pocas inyecciones (aproximadamente 10) aunque no resultó necesaria su eliminación hasta pasadas 25 inyecciones de suspensión al 10 % m/v.

Alternativamente se ensayaron otros procedimientos [121] como:

a) preparación de la suspensión en una mezcla metanol y agua con sonicación de larga duración (2.5 horas),
b) tratamiento enzimático con α-amilasa durante 12 horas y posterior sonicación durante 1.5 h y
c) tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) durante 6 h a 100 °C.

Ninguno de estos procedimientos condujo a una suspensión con una estabilidad adecuada para su empleo en el automuestreador, todos condujeron a problemas de generación de carbón durante la pirólisis y resultaron extraordinariamente lentos para un procedimiento de rutina.

Los mejores resultados se obtuvieron con el empleo de TMAH como agente solubilizante en medio alcalino [122]. Se ensayaron concentraciones 2.5 10^{-3} a 5 10^{-2} mol L^{-1} en TMAH que se obtuvieron a partir de distintos volúmenes de una disolución comercial de TMAH 1 mol L^{-1}. La suspensión resultó estable y con características adecuadas para el empleo del automuestreador de ETAAS a partir de una concentración final 5 10^{-3} mol L^{-1} procediendo de la siguiente forma. Se pesa 1 g de muestra en un tubo de polietileno con tapón roscado y se añaden 10mL de disolución de TMAH 5 10^{-2} M. La muestra se calienta a 80 °C durante 10 minutos. A continuación se sonica durante 15 minutos. Cuando se empleó este procedimiento a distintos tipos de muestras elaboradas con diferentes pescados y otros componentes (patatas, verduras, arroz, etc.) encontramos que resulta más adecuado recomendar una concentración final de TMAH 0.01 mol L^{-1}. Concentraciones

de TMH tan altas como 0.05 mol L^{-1} no resultan aconsejables debido al efecto perjudicial sobre el material pirolítico del atomizador, que será comentado más adelante.

La suspensión formada tiene unas características físicas de viscosidad y densidad similares a las disoluciones acuosas y su aspecto se puede apreciar en la Figura 2.5 que corresponde a una suspensión al 10 % m/v en TMH 0.01 mol L^{-1} de un preparado alimenticio de platija.

Hay que tener la precaución de evitar el contacto de las suspensiones alcalinas de TMAH con medios ácidos como pueden ser los modificadores o el líquido de lavado del muestreador, ya que se puede producir la precipitación de las proteínas o el mismo modificador, provocando problemas de obstrucción. Por tanto se recomienda evitar la acidificación del líquido de lavado del automuestreador.

A pesar de lo afirmado por otros autores, la presencia de TMAH no disminuye la señal de As(III) en el atomizador, sino más bien al contrario, la aumenta como podemos apreciar en la Figura 2.6. Este efecto resulta muy claro con el empleo de Ni como modificador químico, tal y como será discutido más adelante.

Sin embargo, la presencia de una matriz orgánica, similar a la que acompaña a los alimentos infantiles preparados de pescado, provoca un descenso enorme de sensibilidad. Este comportamiento no es común para todas las formas de arsénico y además cambia con el modificador utilizado, como veremos a continuación.

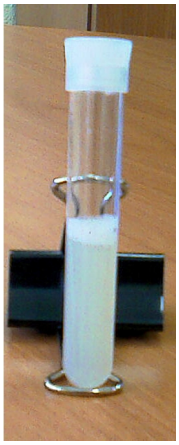


Figura 2.5: Aspecto de las suspensiones de alimentos infantiles

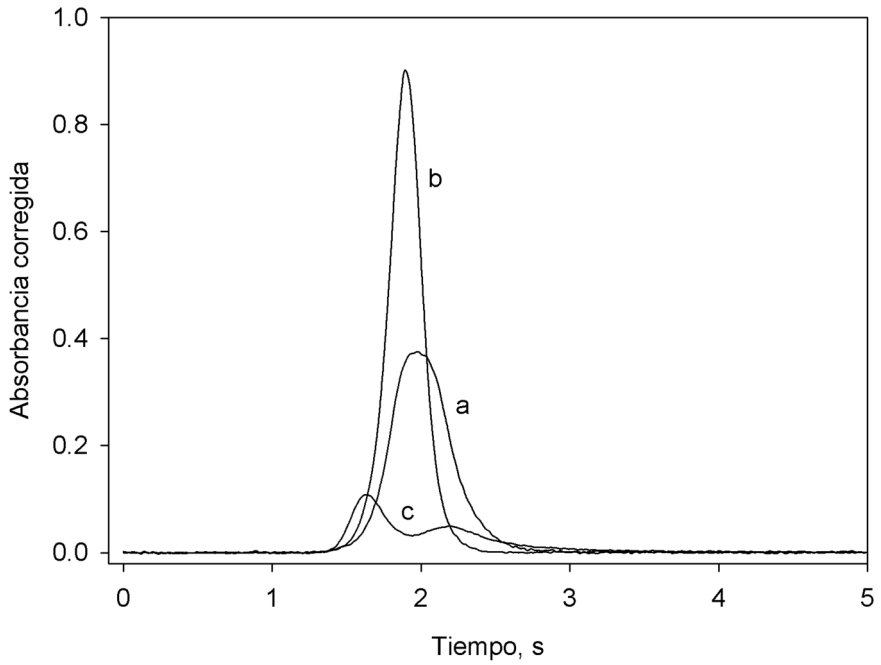


Figura 2.6: Señales obtenidas para 3 ng de As(III) en ácido nítrico al 0.1 % v/v (perfil a), TMAH 0.01 mol L^{-1} (perfil b) y suspensión de alimento de verduras y patata al 10 % m/v en TMAH 0.01 mol L^{-1} (perfil c). En todos los casos el modificador fue nitrato de níquel, 0.4 µg.

2.3.2. EFECTO DEL MODIFICADOR QUÍMICO

2.3.2.1. NÍQUEL Y CERIO

Como acabamos de comentar, la presencia de TMAH y la matriz que acompaña al pescado en los alimentos infantiles preparados afecta mucho a la eficiencia de atomización de As(III). Este efecto no es el mismo para todas las formas de arsénico. Como puede apreciarse en la Figura 2.7, en presencia de Ni como modificador y para la misma cantidad de arsénico que las experiencias de la Figura 2.6, pero en la forma de arsenobetaína, la presencia de TMAH 0.01 mol L^{-1} (curva b) se traduce en un descenso de la señal de aproximadamente el 20 %, mientras que para una suspensión al 10 % m/v de un alimento infantil a base de verduras y patata en TMAH 0.01 la señal se extinguió (curva c) hasta un valor que no se diferencia del ensayo en blanco.

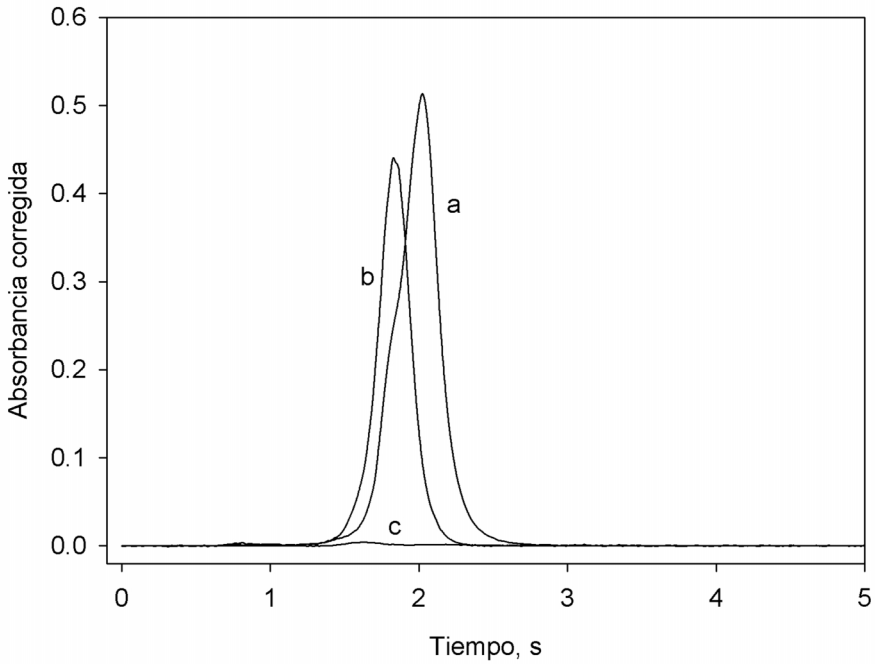


Figura 2.7: Señales obtenidas para 3 ng de As(III) como arsenobetaína en ácido nítrico al 0.1 % v/v (perfil a), TMAH 0.01 mol L^{-1} (perfil b) y suspensión de alimento de verduras y patata al 10 % m/v en TMAH 0.01 mol L^{-1} (perfil c). En todos los casos el modificador fue nitrato de níquel, 0.4 µg.

De acuerdo con estos resultados, la presencia de arsénico como arsenobetaína en un alimento infantil no sería detectada utilizando níquel como modificador al nivel de 0.4 µg.

El estudio del efecto de la temperatura de calcinación sobre las formas de arsénico: As(III), As(V), MA, DMA y AB aparece en la Figura 2.8. En todos los casos el contenido en arsénico inyectado fue de 4 ng añadidos a una suspensión de alimento infantil de verdura con patatas exento de pescado al 10 % m/v en TMAH 0.01 mol L^{-1}. El comportamiento para As(III) y As(V) en presencia de 0.4 µg de Ni como modificador fue idéntico, la señal disminuyó aproximadamente hasta el 50 % al llegar a 500 °C como temperatura de calcinación y se mantuvo constante hasta 1100 °C, donde empezó a descender (curva a). La señal para arsénico como MA mostró un descenso paulatino al aumentar la temperatura de calcinación de forma que a 800 °C disminuyó hasta el 10 % de la señal a 300 °C (curva b). Cuando el arsénico se encuentra en forma de DMA la señal disminuye rápidamente con la temperatura de manera que no se distingue del ensayo en blanco a temperaturas de 600 °C o superiores (curva c). En el caso de que el arsénico se añade en forma de arsenobetaína la señal decae rápidamente por encima de 400 °C y no se diferencia del

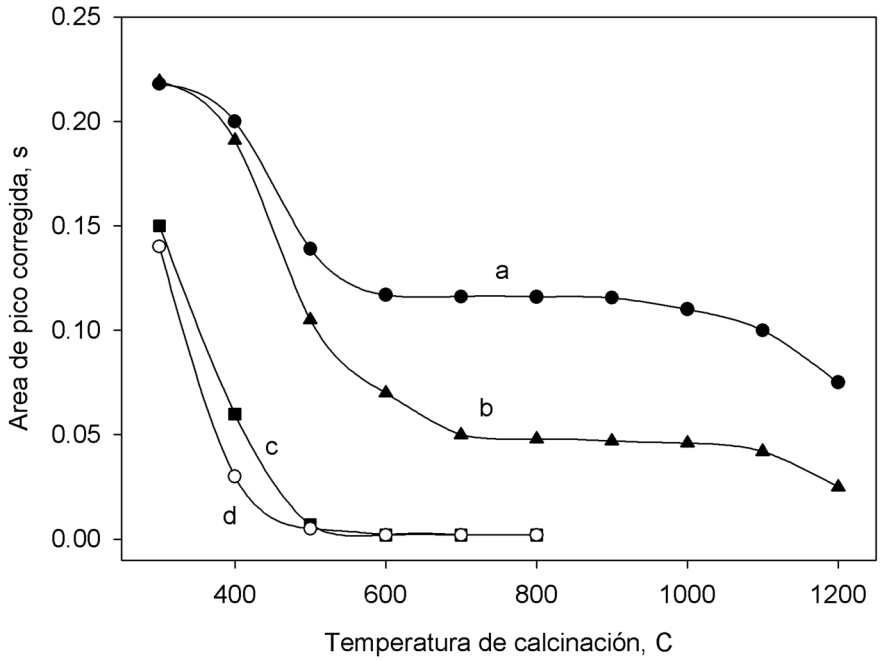


Figura 2.8: Efecto de la temperatura de calcinación en la señal obtenida para 4 ng de As(III) como As(III) (curva a), MA (curva b), DMA (curva c) y AB (curva d) en suspensión de alimento de verduras y patata al 10 % m/v en TMAH 0.01 M. En todos los casos el modificador fue nitrato de níquel, 0.4 µg.

ensayo en blanco (0.002 ± 0.001 unidades de area) a partir de 500 °C (curva d). Queda claro que, al aumentar el grado de metilación del arsénico, en presencia de Ni como modificador, la volatilidad de las formas aumenta mucho.

La estabilidad de AB mejora con el incremento de la cantidad de modificador químico introducido en el atomizador. La Figura 2.9 muestra como la señal debida a 3 ng de arsénico como AB (curva a) comienza a apreciarse para una cantidad de Ni de 6 µg y alcanza valores mensurables para 20 µg de Ni. En este mismo intervalo de concentraciones de modificador la señal para As(III) se mantiene constante (curva b). Es evidente que un aumento en la concentración de Ni permite aumentar la estabilidad de arsenobetaína que, a su vez depende de la concentración de TMAH en el medio de suspensión.

En efecto, como puede apreciarse en la Figura 2.10 un aumento de la concentración de TMAH disminuye la estabilidad de AB. Para estudiar la influencia de la concentración de TMAH en la señal de AB se realizaron experimentos a un nivel muy alto de Ni, 20 µg. Como puede apreciarse, a este nivel de modificador, la señal es constante hasta 800 °C en un medio TMAH 0.01 M. Cuando la concentración de TMAH aumenta hasta 0.03 mol

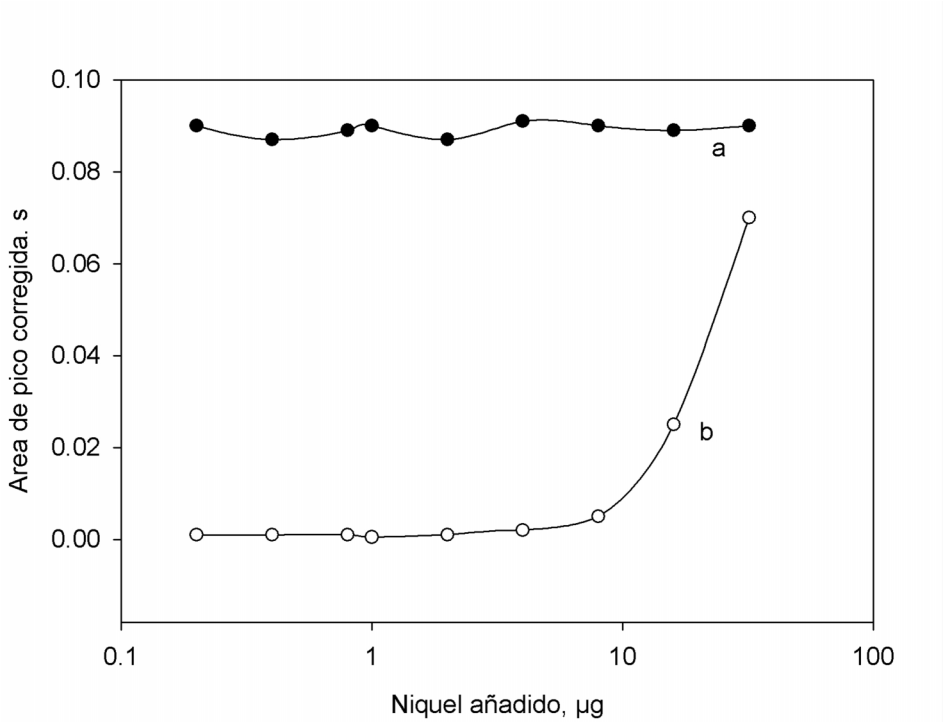


Figura 2.9: Efecto de la cantidad de níquel utilizada como modificador en la determinación de 3 ng de As(III) como As(III) (curva a) y AB (curva b) en suspensión de alimento de verduras y patata al 10 % m/v en TMAH 0.01 M.

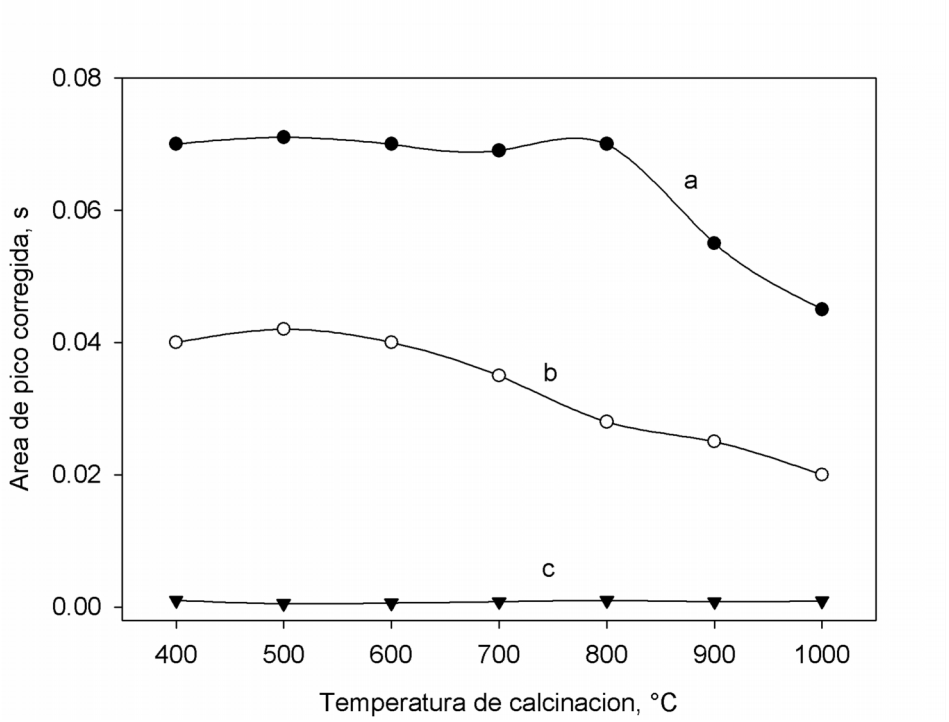


Figura 2.10: Efecto de la temperatura de calcinación en la señal obtenida para 3 ng de As(III) como AB a concentraciones de TMAH 0.01, 0.03 y 0.05 mol L^{-1} (curvas a-c, respectivamente). En todos los casos el modificador fue nitrato de níquel, 20 µg

L^{-1} la señal debida a AB comienza a descender a partir de 500 °C. Finalmente, en un medio 0.05 mol L^{-1} en TMAH la señal de AB no se aprecia ni a temperaturas de calcinación

de 400 °C.

Como se ha comentado anteriormente, la presencia de la matriz de la muestra provoca un importante descenso de la sensibilidad en todas las formas y especialmente en arsenobetaína. La Figura 2.11 muestra como desciende la señal obtenida para la inyección de 3 ng de arsénico en las formas químicas As(III), As(V), MA, DMA y AB. Nótese como al aumentar la concentración de matriz, en este caso se ensayó con un alimento infantil preparado a base de verduras y patatas, la señal cae rápidamente para todas las formas químicas.

Así pues, para una concentración de suspensión del 10 % en alimento infantil y utilizando 4 µg de Ni como modificador en un medio de suspensión de TMAH 0.01 mol L^{-1} se consiguen unos valores de sensibilidad como los que se observan en la Tabla 2.4. La sensibilidad para As(III) es similar a la de As(V) y tres veces superior a la de MA. La sensibilidad para DMA y AB es tan baja que ni siquiera concentraciones de AB en la muestra original de 1 µg g^{-1} serían detectables en muestras suspendidas al 10 % m/v.

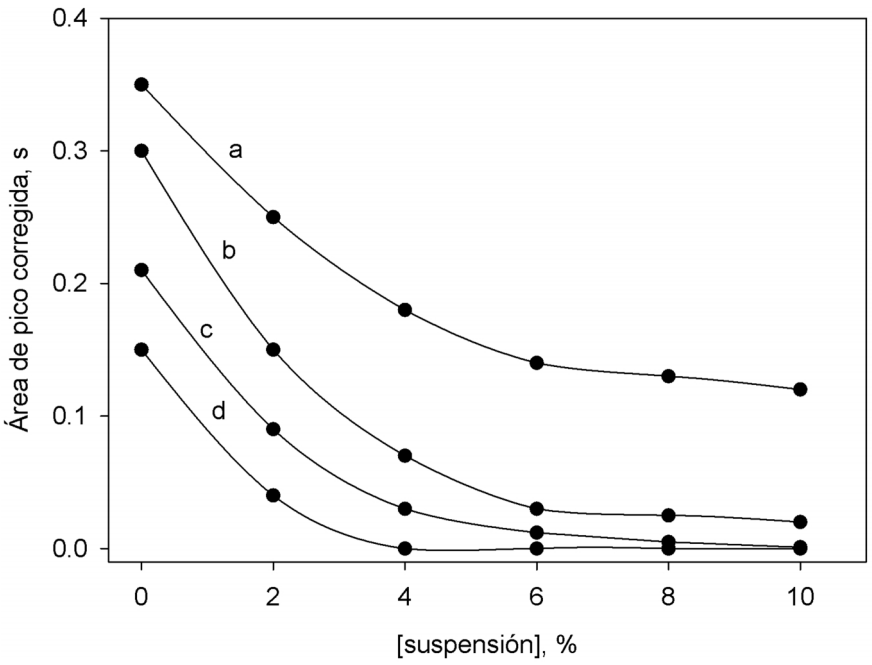


Figura 2.11: Efecto de la concentración de la suspensión de alimento infantil en la determinación de 3 ng de arsénico en las formas químicas: As(III), MA, DMA y AB (curvas a-d, respectivamente). En todos los casos el modificador fue nitrato de níquel, 4 µg. La sensibilidad para As(V) fue similar a As(III).

Tabla 2.4: Sensibilidades obtenidas para las distintas formas químicas de arsénico estudiadas en suspensiones al 10 % m/v de alimento y utilizando 4 µg de Ni como modificador químico.

Forma química	*Sensibilidad, s ng^{-1}*
As (III)	0.030
As(V)	0.029
MA	0.005
DMA	0.00025
AB	<0.0001

Aun siendo adecuadas las condiciones experimentales para distinguir As(III) de AB la sensibilidad obtenida para As(III) resulta escasa para su determinación si estuviera presente en la muestra en concentraciones bajas. Es por ello que el estudio se amplió hacia el empleo de otros modificadores que pudieran conducir a una mayor sensibilidad para As(III) y As(V) sin que aumentara significativamente la sensibilidad para AB.

En este sentido se encontró que el nitrato de cerio (IV), que ya ha sido propuesto como modificador químico en la determinación de As [109], muestra una mayor capacidad estabilizante para las formas de arsénico As(III), As(V), MA y DMA sin aumentar apreciablemente la sensibilidad para AB. La Figura 2.12 muestra las señales obtenidas

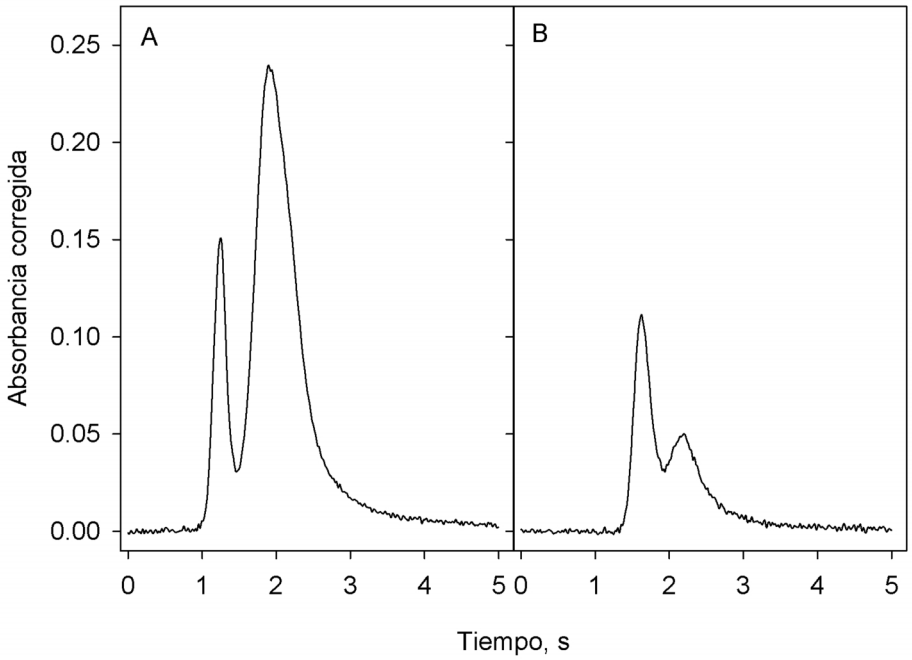


Figura 2.12: Efecto del modificador químico en la determinación de 3 ng de As(III) presente en suspensión de alimento infantil al 10 % m/v. La figura A corresponde al empleo de 4 µg de níquel y la Figura B al empleo de 0.3 µg de cerio

para 3 ng de As(III) utilizando 4 µg de níquel (perfil a) y 0.3 µg de cerio (perfil b) como modificadores.

Se ha estudiado el efecto que la cantidad de Ce(IV) utilizada como modificador tiene en la señal de las distintas formas de arsénico cuando éstas se encuentran presentes en una de suspensión de alimento infantil de verduras con patatas preparado al 10 % m/v en TMAH 0.01 M. La Figura 2.13 muestra como aumenta la sensibilidad de la detección de arsénico con el incremento en la cantidad de modificador introducido al atomizador.

Se ha escogido la cantidad de 0.3 µg de Ce(IV) que se añaden desde el automuestreador como 20 µl de disolución 10^{-4} mol L^{-1} de nitrato de cerio (IV) y amonio.

El desdoblamiento de la señal que se aprecia en la Figura 2.12 al emplear cerio (IV) como modificador no es debido únicamente a éste, sino a su combinación con la matriz que contiene al arsénico. Como podemos apreciar en la Figura 2.14, la señal para 4 ng de arsénico en medio TMAH 0.01 mol L^{-1} no muestra un desdoblamiento claro del pico aunque si es evidente la presencia de señales combinadas. Es en presencia de la matriz de alimento infantil cuando este desdoblamiento resulta claramente apreciable (perfil b).

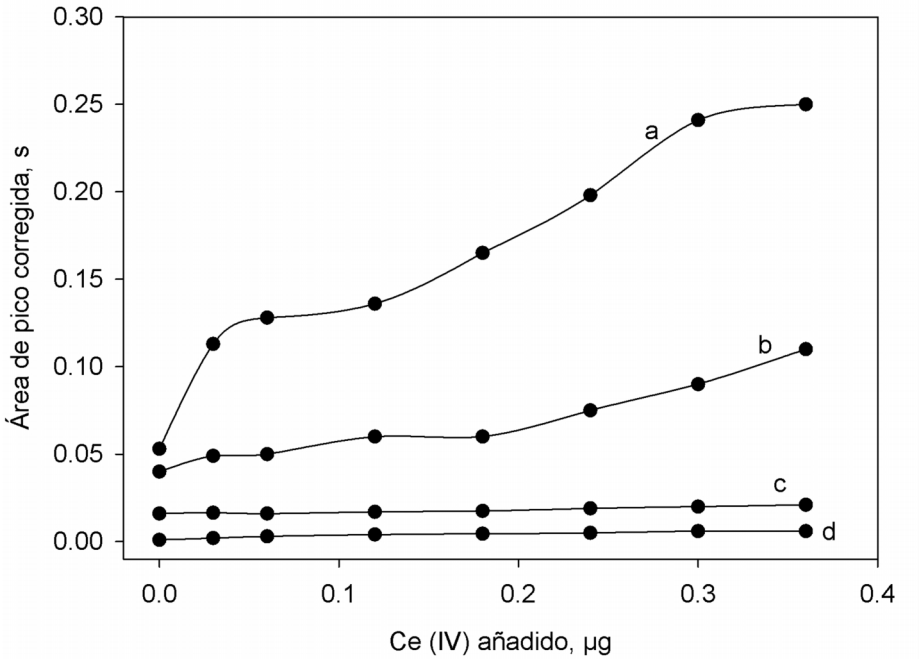


Figura 2.13: Efecto de la cantidad de cerio añadido como modificador químico en la determinación de 4 ng de arsénico presente en suspensión de alimento infantil al 10 % m/v bajo las formas As(III), MA, DMA y AB, curvas a-d, respectivamente.

Además del desdoblamiento de la señal se produce, como en el caso del empleo de níquel como modificador de matriz, un descenso en el área de pico como se puede apreciar en la Figura 2.15. Este descenso, que es muy acusado a concentraciones bajas de matriz, deja de producirse a partir del 5 % de suspensión de alimento infantil.

Este comportamiento de la matriz de alimento infantil se produce tanto para As(III) como para las demás formas de arsénico estudiadas: As(V), MA, DMA y AB.

El comportamiento de las formas de arsénico con la temperatura de calcinación empleando Ce(IV) como modificador es diferente al que se aprecia cuando se emplea Ni(II). En efecto, con este último y como podemos apreciar en la Figura 2.8 la señal decae rápidamente para todas las formas de arsénico por encima de 300 °C. Sin embargo, con el empleo de Ce(IV) la señal resultó baja incluso a esa temperatura y se mantuvo prácticamente constante hasta después de 1200 °C, indicando una buena estabilización del analito aunque con eficacia diferente dependiendo de la forma química. Nótese que incluso existen diferencias en estabilidad para las formas inorgánicas de arsénico (III) y (V), lo que no ocurría con níquel. La Figura 2.16 muestra los valores de área de pico corregida obtenidos para las distintas formas de arsénico estudiadas utilizando 0.3 µg de cerio como modificador. Puesto que no existen problemas con la absorción de fondo por encima de 700 °C, es decir el corrector basado en el efecto Zeeman puede compensar perfectamente la absorción de fondo, se ha seleccionado como temperatura de calcinación óptima en el caso del empleo de cerio como modificador la de 800 °C.

A la vista de los anteriores resultados podemos concluir que la determinación de As(III), As(V) y MA, en este tipo de matrices, resulta mucho más sensible con el empleo de Ce(IV) como modificador. La Tabla 2.5 muestra los valores de sensibilidad obtenidos para las distintas formas de arsénico estudiadas. Estos valores de sensibilidad corresponden a la pendiente de adiciones estándar de las distintas formas de arsénico realizada a una muestra de alimento infantil preparada al 10 % m/v.

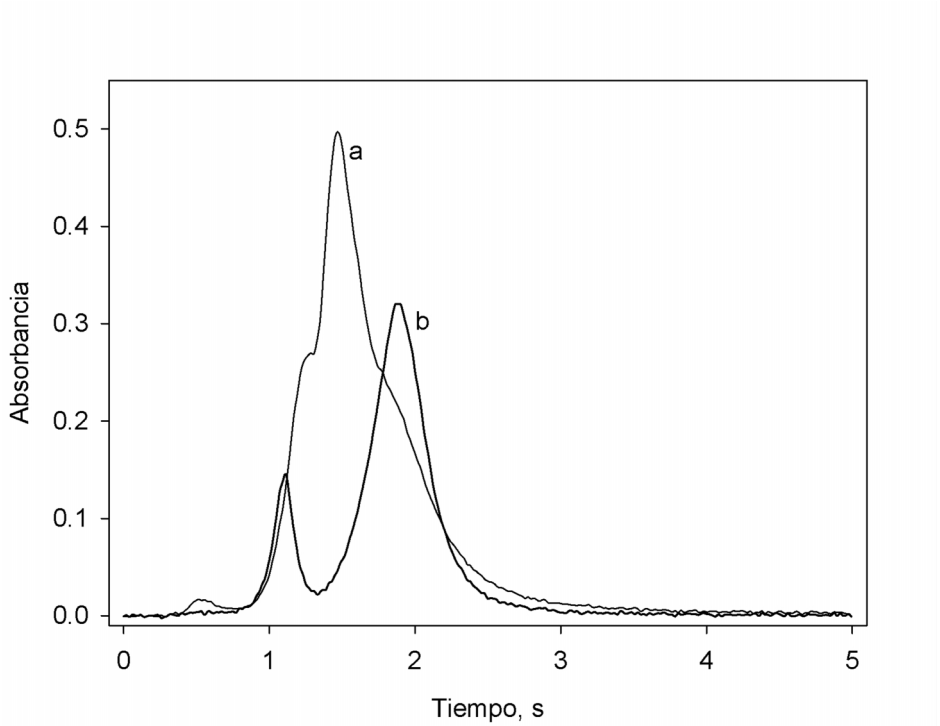


Figura 2.14: Efecto de la presencia de la matriz de alimento infantil en la señal obtenida para 4 ng de As (III) utilizando 0.3 µg de cerio como modificador. El perfil a corresponde a la señal para As(III) en medio TMAH 0.01 mol L^{-1} y el perfil b es una experiencia similar en presencia además del 10 % de suspensión de alimento infantil.

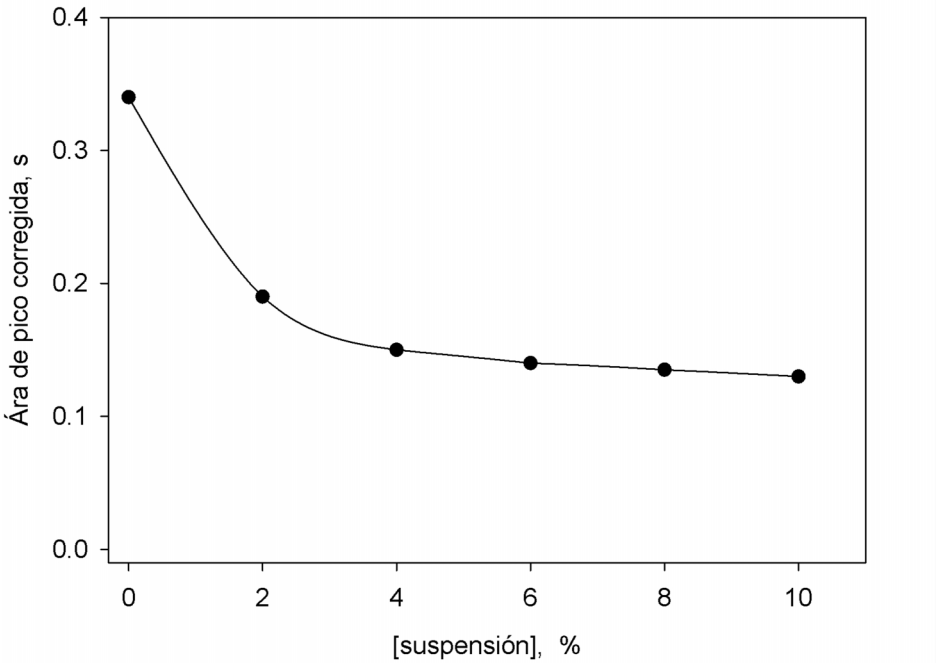


Figura 2.15: Efecto de la presencia de la matriz de alimento infantil en la señal obtenida para 4 ng de As (III) utilizando 0.3 µg de cerio como modificador.

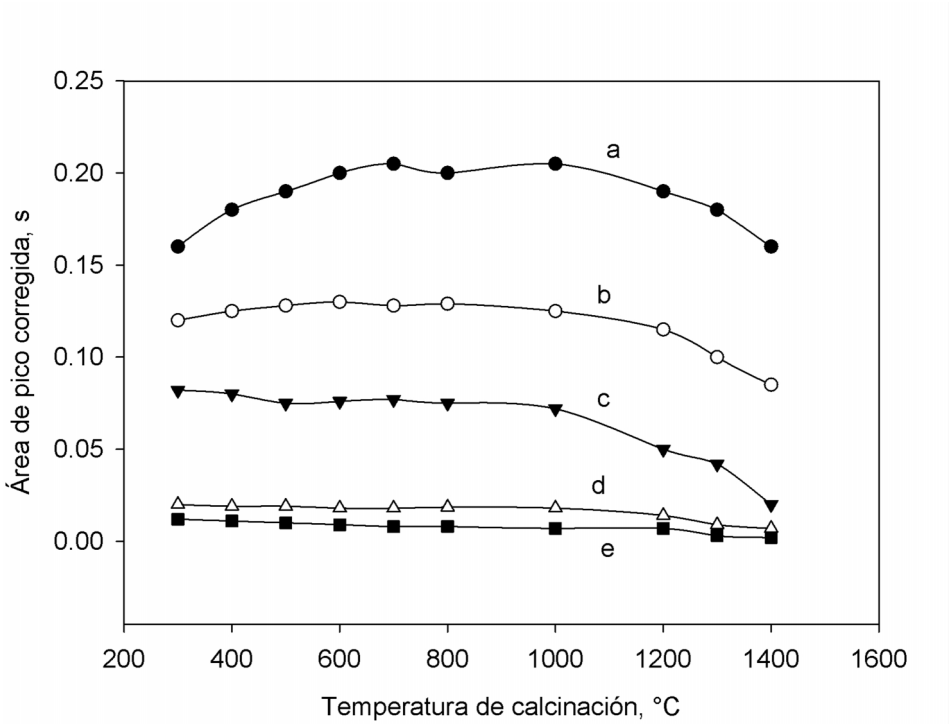


Figura 2.16: Efecto de temperatura de calcinación en la señal obtenida para las formas químicas de arsénico: As(III), As(V), MA, DMA y AB (curvas a-e, respectivamente) presentes todas como 4 ng de As. En todos los casos la determinaciones se realizaron en presencia de una matriz de alimento infantil preparada al 10 % m/v en TMAH 0.01 M.

Tabla 2.5: Sensibilidades obtenidas para las distintas formas químicas de arsénico estudiadas en suspensiones al 10 % m/v de alimento y utilizando 0.3 µg de Ce(IV) como modificador químico.

Forma química	*Sensibilidad, s ng^{-1}*
As (III)	0.052
As(V)	0.030
MA	0.021
DMA	0.0025
AB	<0.001

Con estos valores de sensibilidad, muestras conteniendo 0.1 µg g^{-1} de arsénico como As(III) conducirían, preparadas las suspensiones al 10 %, a señales en área de pico corregida próximas a 0.01 s, lo que supone una excelente sensibilidad. Al mismo tiempo, muestras de alimentos infantiles de pescado, que contienen o pueden contener menos

de 280 ng g^{-1} de arsenobetaína expresada como As(III) no serían apreciables en estas condiciones experimentales.

2.3.2.2. RECUBRIMIENTO DEL ATOMIZADOR

Se ha estudiado el efecto que molibdeno, wolframio y zirconio tiene en la estabilización de las distintas formas de arsénico consideradas en este trabajo. A tal efecto se ha realizado el recubrimiento del atomizador mediante la previa introducción en el mismo de una disolución concentrada (1000 µg mL^{-1}) de molibdeno (molibdato amónico), wolframio (wolframato sódico) y zirconio (cloruro de zirconio). El programa de calentamiento utilizado en el proceso de recubrimiento y atomización de muestras es muy similar al que aparece en la Tabla 2.2. Únicamente se ha suprimido la etapa de limpieza para evitar la volatilización del elemento recubierto. Para conseguir este recubrimiento se inyectan 20 µL de la disolución concentrada del elemento a la que se aplica el programa de calentamiento de la Tabla 2.2 sin la etapa 5. A continuación se inyectan las muestras (20 µL) junto al modificador químico (el mismo elemento utilizado para el recubrimiento) a la concentración seleccionada. La inyección previa del modificador a gran concentración permite depositar en la superficie del atomizador una capa de carburo del elemento que actúa como agente estabilizante de las distintas formas de arsénico. Alternativamente puede utilizarse un procedimiento de recubrimiento basado en la inmersión durante 12 horas del atomizador en una disolución concentrada del modificador y tras su secado y acondicionamiento térmico se encuentra en condiciones para su empleo como tubo recubierto. De esta forma se consiguen recubrimientos más eficaces, pero en estos estudios preliminares sobre el comportamiento de algunas especies recubiertas es más práctico utilizar el procedimiento de adición previa del modificador antes de cada inyección de la muestra. En estas condiciones el recubrimiento es menos eficaz pero no resulta permanente.

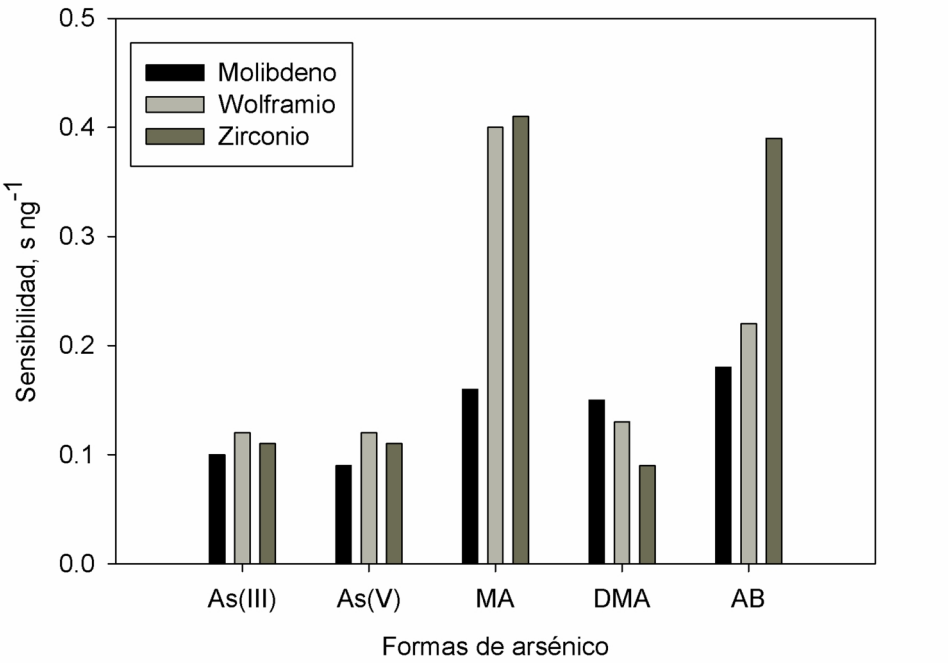


Figura 2.17: Efecto del tipo de modificador químico utilizado con la técnica de recubrimiento sobre la sensibilidad de las distintas formas de arsénico estudiadas en un medio TMAH 0.01 mol L^{-1}.

El comportamiento de las distintas formas de arsénico para estos tres modificadores condujo a unos valores de sensibilidad que aparecen recogidos en la Figura 2.17. Estos valores corresponden a la señal obtenida en área de pico corregida para la introducción en el atomizador de 1 ng de arsénico (20 µL de disolución de As(III), As(V), MA, DMA y AB en concentraciones equivalentes a 50 µgL^{-1} de arsénico). Todas estas disoluciones se prepararon en un medio TMAH 0.01 mol L^{-1} ya que el comportamiento en estas condiciones es diferente al que se apreció en medio ácido. Nótese como la sensibilidad para las formas inorgánicas resultó similar y baja, encontrándose los mejores valores de sensibilidad para la determinación de MA y AB con el empleo de wolframio y para AB con el empleo de zirconio.

Sin embargo, estos valores de sensibilidad cambian sustancialmente cuando se encuentra presente la matriz del alimento infantil suspendida al 10 % m/v en el medio TMAH 0.01 mol L^{-1}. La Figura 2.18 muestra los valores de sensibilidad para las distintas formas de arsénico en estas condiciones experimentales.

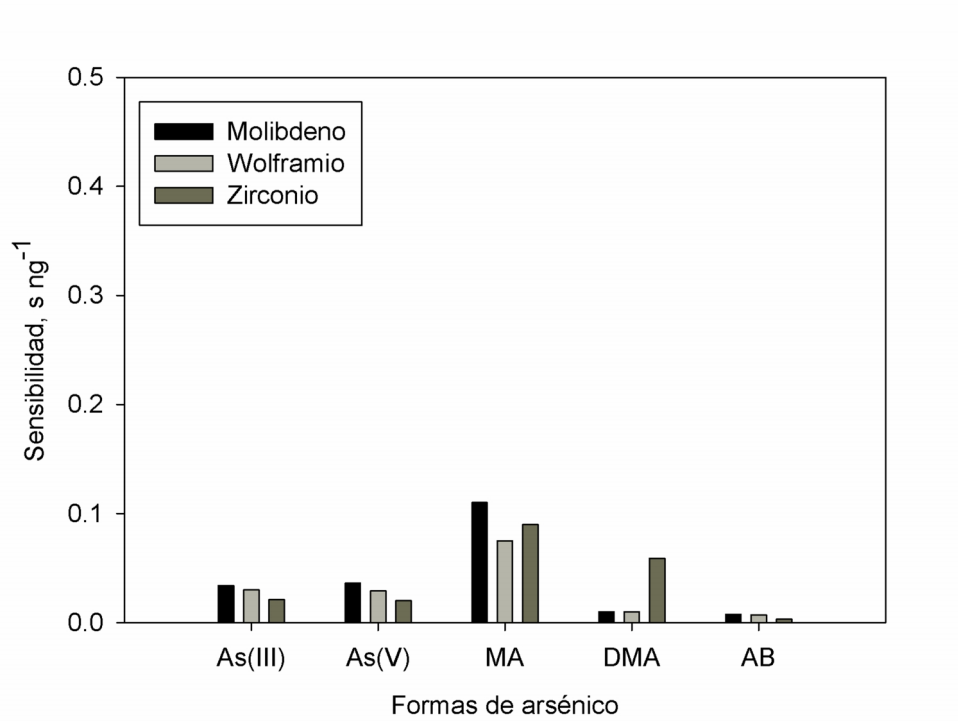


Figura 2.18: Efecto del tipo de modificador químico utilizado con la técnica de recubrimiento sobre la sensibilidad de las distintas formas de arsénico estudiadas en un medio TMAH 0.01 mol L^{-1} conteniendo suspensión de alimento infantil de verduras con patatas al 10 % m/v.

Intencionadamente se ha mantenido la misma escala en el eje de ordenadas. De esta forma queda bien patente el descenso importante en la sensibilidad que se produce debido a la presencia de la matriz orgánica. Algo similar a lo que ocurre con el empleo de níquel y cerio como modificadores.

Resulta llamativo que la mejor sensibilidad en estas condiciones se consigue para MA. Todos los intentos realizados para conseguir la mejor sensibilidad para MA reduciendo al mínimo la de arsénico inorgánico (As(III)+As(V)) resultaron infructuosos y por tanto no podemos proponer un procedimiento que permita que, en el caso de detectar señal para una muestra con cerio (IV) como modificador, lo que ocurre en caso de la presencia de As(III), As(V) y MA, podamos distinguir si se trata de MA o quizás de las formas inorgánicas. Únicamente podemos utilizar este comportamiento con fines cualitativos. En efecto, puesto que la sensibilidad para As(III) y MA con Ce(IV) es aproximadamente el doble y la quinta parte que con molibdeno, la inyección de una muestra que conduce a una señal mayor con el empleo de cerio que con el empleo de molibdeno, evidencia obligatoriamente la ausencia de MA o bien una relación [As(III)]/[MA] muy

alta. La presencia de importantes cantidades de MA o una baja relación [As(III)]/[MA] conducirá a una señal con molibdeno superior a la señal con cerio.

Una situación mucho más interesante se presenta debido al comportamiento de DMA con zirconio como modificador permanente. En efecto, cuando la señal obtenida para una muestra con el empleo de cerio como modificador es nula, eso indica la ausencia de cantidades apreciables de As(III), As(V) y MA. Sin embargo, es posible la presencia de DMA y/ AB, que con este modificador no se detectan. En estos casos el empleo de zirconio como modificador puede resultar adecuado para distinguir entre DMA y AB.

Se realizó por tanto un estudio de la concentración óptima de modificador, tipo de procedimiento para el recubrimiento y estabilidad de las formas con la temperatura de atomización con el fin de sensibilizar al máximo la señal para DMA reduciendo, al mismo tiempo, la sensibilidad para AB.

En este sentido se encontró que el recubrimiento del tubo pirolítico por inmersión, como se indica en la parte experimental, en una disolución de cloruro de zirconio, al tiempo que se emplea como modificador una disolución del mismo de 250 µg ml^{-1} conduce a unos valores de sensibilidad de 0.1 s ng^{-1} para DMA, mientras que para AB apenas se alcanza el valor de 0.001 s ng^{-1}, es decir, resulta 100 veces más sensible para DMA que para AB.

No se observaron diferencias significativas en el estudio de la temperatura de calcinación cuando el analito se encuentra en un medio TMAH 0.01 mol L^{-1} tal y como se aprecia en la Figura 2.19. Sin embargo, en presencia de una suspensión al 10 % de alimento infantil de verdura con patatas preparada en medio TMAH 0.01 mol L^{-1}, las señales comienzan a descender a partir de 800 °C lentamente. Por tanto se ha seleccionado como valor más adecuado la calcinación a 600 °C ya que de esta forma la absorción de fondo es perfectamente corregible por el detector. Para que la sensibilidad sea máxima resulta conveniente evitar la etapa de limpieza a 2600 °C que puede sustituirse por otra a 2400 °C (la misma temperatura que la etapa de atomización) con flujo de gas interno para arrastrar restos de material volatilizado.

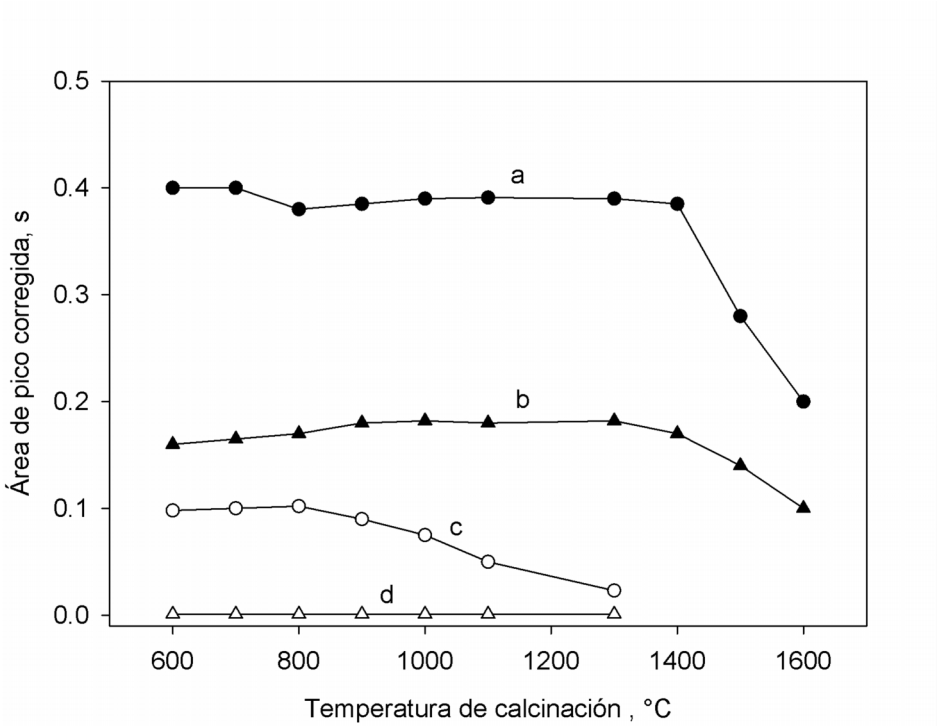


Figura 2.19: Efecto de la temperatura de calcinación en la señal obtenida para DMA (curvas b y c) y AB (curvas a y d) en medio TMAH 0.01 mol L^{-1} (curvas a y b) y en una suspensión al 10 % m/v en TMAH 0,01 mol L^{-1} (curvas c y d) utilizando zirconio como modificador de matriz.

2.3.2.3. ELEMENTOS DEL GRUPO DEL PLATINO

Se ha estudiado el efecto que algunos metales del grupo del platino, en concreto rodio, platino y paladio, tienen en la señal de las distintas formas de arsénico en medio TMAH 0.01 mol L^{-1} y en presencia o ausencia de la matriz de alimento infantil suspendida a distintas concentraciones. Los resultados obtenidos difieren del comportamiento comentado hasta ahora para níquel, cerio y los metales que forman carburos estables. En efecto, con el empleo de los metales de grupo del platino se consigue en primer lugar un importante aumento de la sensibilidad de la determinación que no está tan influenciada por la presencia de la matriz de las muestras, sobre todo cuando la concentración del modificador es suficientemente alta. No se ha considerado el empleo de iridio ya que en el medio alcalino originado por el uso de TMAH la sensibilidad para AB es muy diferente a la de las otras formas tal y como ya ha sido observado [83].

La Figura 2.20 muestra la estabilidad con la temperatura de calcinación de las distintas formas de arsénico estudiadas en presencia de paladio añadido en la cantidad de 4 µg desde el muestreador. Como puede apreciarse, la mejor sensibilidad se obtuvo para arsenobetaína seguida de MA y finalmente DMA y As(III) o As(V). La estabilidad de las formas permite el empleo de temperaturas de calcinación elevadas, lo que nos hace recomendar como temperatura de atomización la de 800 °C. La presencia del 10 % m/v de suspensión de alimentos infantiles conduce a un descenso importante de la sensibilidad y de la estabilidad. En estas condiciones se producen pérdidas de analito a partir de 1000 °C (para todas las formas), lo que no supone un inconveniente para seguir proponiendo como valor adecuado para la temperatura de calcinación el de 800 °C. El estudio de la temperatura de calcinación permitió observar señales máximas y constantes a partir de 2300 °C, por lo que se ha seleccionado este valor como más adecuado para todas las formas.

Cuando la cantidad de modificador es baja (< 1 µg), la señal obtenida para las formas de arsénico está muy afectada por la concentración de la suspensión de alimento infantil, pero cuando la cantidad de modificador aumenta, el descenso de la sensibilidad ob-

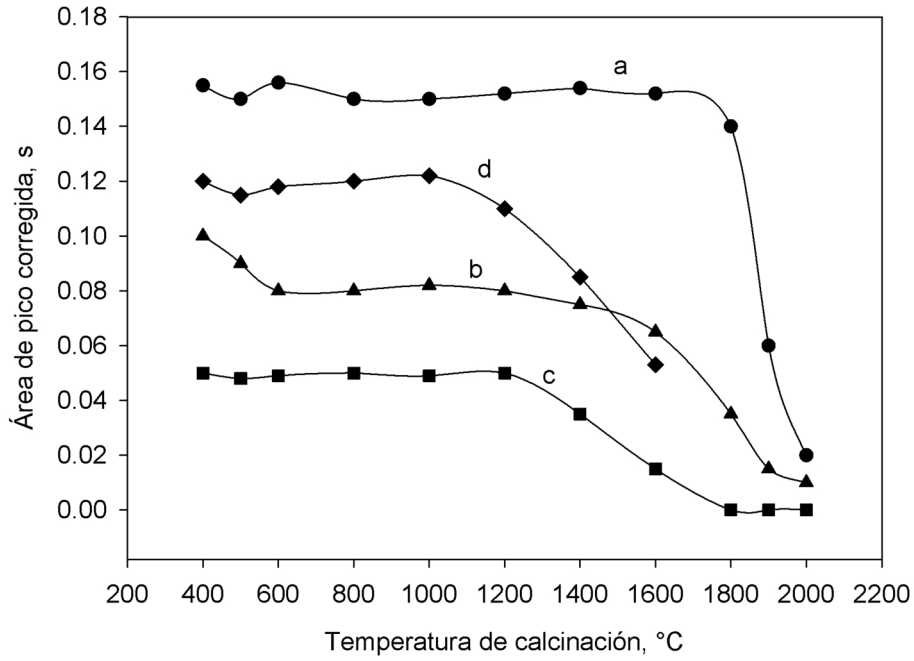


Figura 2.20: Efecto de la temperatura de calcinación en la señal obtenida para AB, MA, DMA y As(III) (curvas a-d, respectivamente). La curva de calcinación para As(V) es similar a la obtenida para As(III). En todos los casos el medio fue TMAH 0.01 mol L^{-1}.

servado es muy pequeño como se muestra, a modo de ejemplo, en la Figura 2.21 para la determinación de arsenobetaína. Así pues, para conseguir que paladio actúe como un eficaz modificador químico en la determinación de las diferentes muestras de arsénico a partir de suspensiones de alimentos infantiles conduciendo a sensibilidades muy similares para todas las muestras es preciso su empleo en gran cantidad. La Figura 2.22 muestra el efecto de la cantidad de paladio introducida en el atomizador en el caso de la determinación de las distintas formas químicas de arsénico estudiadas en presencia de la matriz de alimento infantil suspendida en TMAH.

Este comportamiento es similar para rodio, platino y paladio. Sin embargo, el empleo de paladio tiene una ventaja fundamental sobre los otros dos elementos ya que en su presencia la sensibilidad obtenida para las distintas formas de arsénico es similar. La Figura 2.23 muestra las sensibilidades, expresadas como la señal en área de pico corregida obtenidas para 1 ng de arsénico introducido en el atomizador bajo las distintas formas químicas estudiadas. Esta circunstancia, que ya ha sido observada por otros autores empleando programas de calentamiento convencionales [116] , tanto a partir de medios ácidos [117] como básicos (TMAH) [83] , actuando solo o en combinación con magnesio [122], permite la calibración para arsénico total utilizando un estándar de As(III).

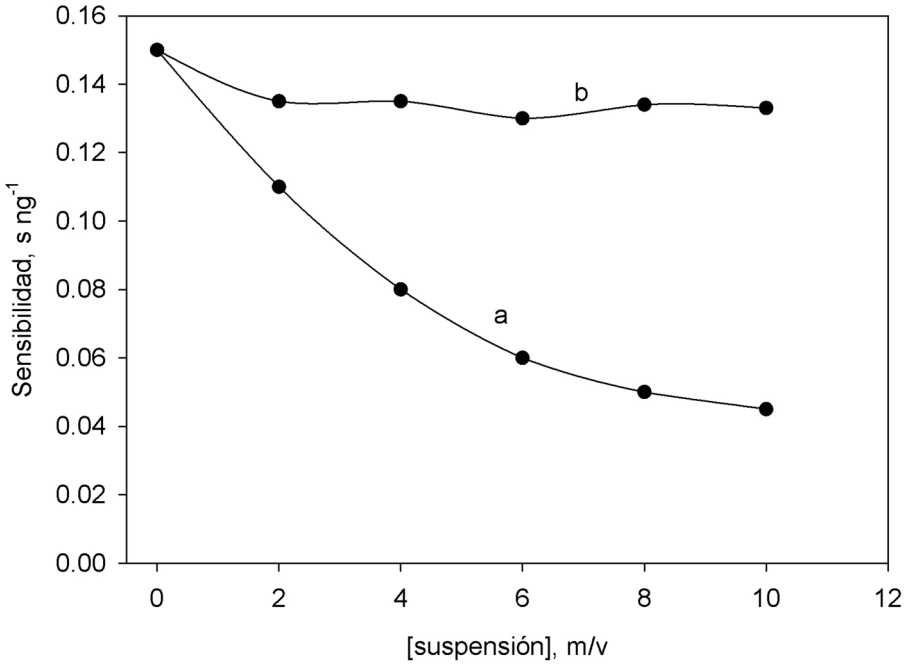


Figura 2.21: Efecto de la concentración de la suspensión de un alimento infantil de verdura con patatas en la señal obtenida para 1 ng de AB en presencia de 4 y 30 µg de Pd(II) como modificador.

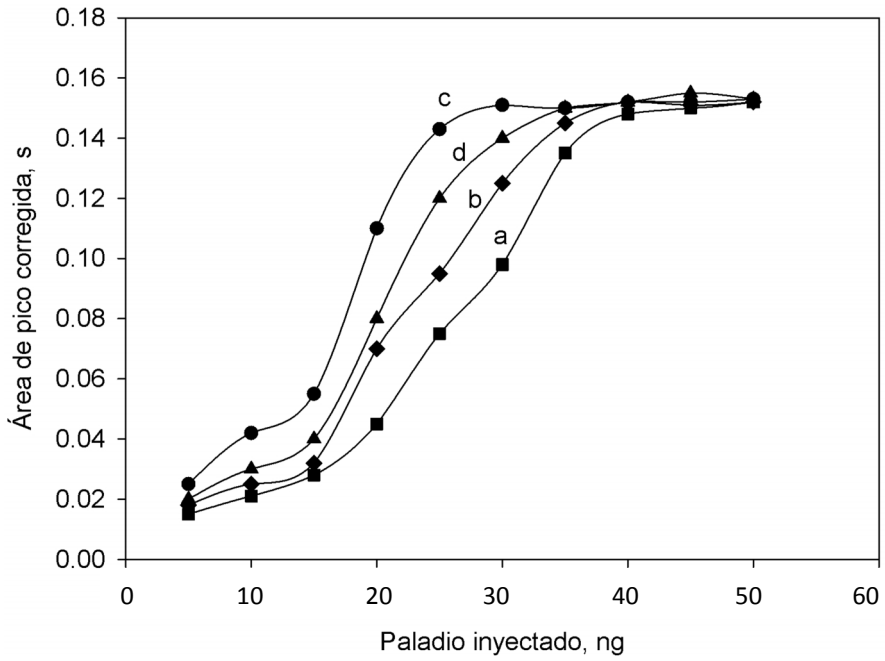


Figura 2.22: Efecto de la cantidad de paladio introducido en el atomizador en la señal que se obtiene para las distintas formas de arsénico cuando se encuentran presentes en una suspensión de alimento infantil de patatas y verduras al 10 % m/v en TMAH 0.01 mol L^{-1}. Las curvas a-d corresponden a las formas As(III), MA, DMA y AB, respectivamente. La respuesta para As(V) fue similar a la observada para As(III).

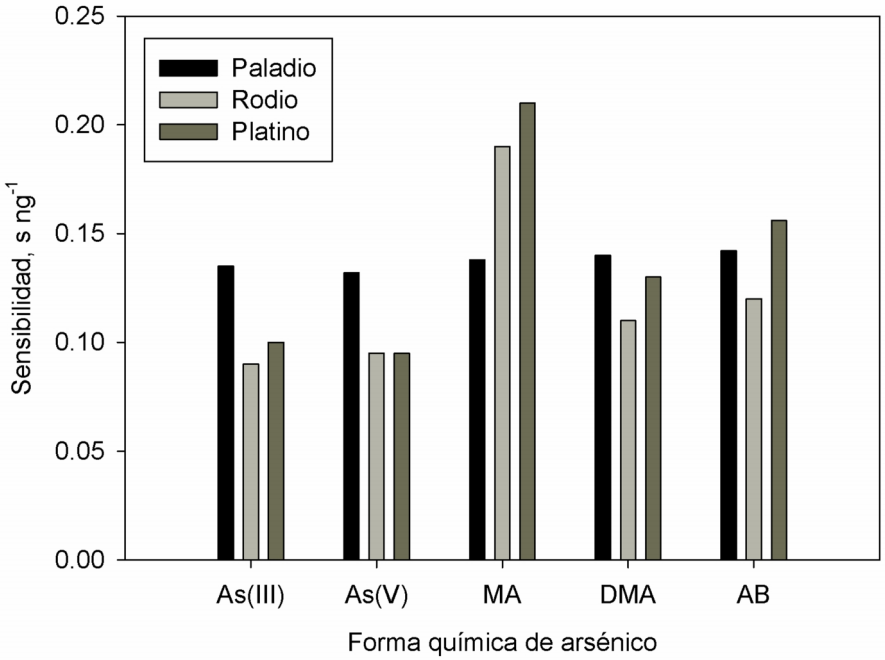


Figura 2.23: Sensibilidades obtenidas para las distintas formas químicas de arsénico estudiadas con el empleo de distintos elementos del grupo del platino actuando como modificadores químicos. En todos los casos el analito se encuentra en presencia de una suspensión de un alimento infantil de verdura con patatas preparada al 10 % m/v en TMAH 0.01 mol L^{-1} y la cantidad de modificador añadida fue de 40 µg.

2.3.3 INFLUENCIA DE LA MATRIZ DE ALIMENTOS EN SUSPENSIÓN

A lo largo de la discusión sobre el efecto de los diferentes modificadores químicos ha quedado puesto de manifiesto que en presencia de suspensiones en TMAH de los alimentos infantiles aparece un fuerte efecto matriz. Este efecto obliga a cuantificar empleando el procedimiento de adiciones estándar aun cuando la calibración se realice con ayuda de un alimento infantil de patatas y verduras, por ejemplo, con un contenido en las distintas formas de arsénico que quede por debajo del límite de detección y al que se le adicionan distintas concentraciones de analito estándar preparado también en TMAH. La Tabla 2.6 muestra las pendientes de adiciones estándar encontradas para cuatro tipos distintos de alimentos infantiles estudiados junto que la que resulta del empleo de una suspensión de alimento infantil de patatas con verdura. En todos los casos las suspensiones se prepararon en TMAH 0.01 mol L^{-1} al 10% m/v siguiendo el procedimiento recomendado en la parte experimental.

Tabla 2.6: Pendientes de las gráficas de adiciones estándar a suspensiones de alimentos infantiles preparados al 10 % m/v en TMAH 0.01 mol L^{-1}.

	Pendiente ± desv. estándar[a], $s.ng^{-1}$		
Muestra	AB[b]	DMA[c]	As(III)[d]
Patatas y verduras	0.152 ± 0.005	0.059 ± 0.004	0.052 ± 0.005
Platija con patatas y verduras	0.157 ± 0.005	0.051 ± 0.002	0.071 ± 0.003
Salmón con patatas y verduras	0.142 ± 0.003	0.062 ± 0.006	0.042 ± 0.004
Merluza con patatas y verduras	0.169 ± 0.005	0.053 ± 0.003	0.059 ± 0.006
Lubina con patatas y verduras	0.165 ± 0.005	0.075 ± 0.003	0.065 ± 0.005

[a] Resultado de 4 adiciones de analito

[b, c, d] Pd, Zr y Ce como modificadores químicos, respectivamente

Las diferencias entre las pendientes resultan significativas al 95 % de nivel de confianza por lo que se propone el empleo del procedimiento de adiciones estándar. Todos los intentos realizados para fabricar un medio sintético que pudiera utilizarse para la calibración directa resultaron infructuosos. En efecto, mientras que el empleo de un medio compuesto por fructosa al 7 % en TMAH 0.01 mol L^{-1} resulta adecuado para calibrar utilizando níquel como modificador químico, no es así para el resto de los modificadores. De hecho esta elevada concentración de fructosa provoca un descenso en la sensibilidad muy acusado cuando se trata del empleo de cerio como modificador y no resulta adecuada para el empleo de paladio.

La introducción en el atomizador de 20 µL de una suspensión de estas muestras preparada al 10 % m/v supone la entrada en el atomizador de 2 mg de muestra lo que, aceptando un contenido promedio del 50 % en agua, equivale a la introducción de 1 mg de materia orgánica en su mayoría. Esta circunstancia debería conducir a la rápida formación de residuo carbonáceo tras muy pocas determinaciones. Sin embargo la presencia de TMAH evita que esto ocurra. En efecto, en presencia de TMAH 0.01 mol L^{-1} es posible realizar al menos 100 inyecciones de muestras suspendidas al 10 % sin que se aprecien residuos carbonáceos en la superficie del atomizador.

Los cambios que se observaron en la sensibilidad del detector a las distintas formas de arsénico con el uso continuado del atomizador son consecuencia del desgaste producido en la superficie del recubrimiento pirolítico más que de la aparición de residuo. En efecto, el empleo de TMAH 0.01 mol L^{-1} permite realizar 150 inyecciones de muestra suspendida sin que aparezcan deteriores visibles en ninguna zona del atomizador trans-

versal. Este deterioro es mucho más acentuado cuando se emplea TMAH 0.05 mol L^{-1}. En este caso tras 20 inyecciones se observa un franco desmoronamiento de la estructura de grafito en el orificio de entrada y las zonas frías del atomizador que evoluciona hacia un aumento de la fragilidad del mismo. Es por ello que no se recomienda el empleo de TMAH a concentraciones superiores a 0.01 mol L^{-1}.

La Figura 2.24 muestra la evolución de la sensibilidad obtenida para las señales de AB, DMA y As(III) medidas con paladio, zirconio y cerio, respectivamente, como modificadores cuando se realizan inyecciones continuadas de suspensión de alimento infantil de verdura con patatas preparada al 10 % m/v en TMAH 0.01 mol L^{-1}.

2.3.4 CAPACIDAD PARA LA ESPECIACIÓN

El comportamiento diferencial de las formas químicas de arsénico estudiadas frente a los distintos modificadores químicos nos lleva a proponer un esquema de especiación semicuantitativa que permite diferenciar entre su nivel de metilación.

De lo expuesto en el estudio de los modificadores se desprende que resulta posible detectar la presencia de arsénico inorgánico (As(III) + As(V)) en una muestra de alimento infantil conteniendo importantes cantidades de AB y/o DMA. El esquema que se propone resulta especialmente adecuado para alimentos con base de pescado, donde las especies mayoritarias son AB y DMA. En estas muestras la presencia de arsénico inorgánico sería considerada como una seria contaminación.

Por tanto, preparada la suspensión de la muestra en las condiciones recomendadas se inyectan 20 µL de la misma en el atomizador utilizando cerio como modificador según se indica en la Parte Experimental. Si se obtiene señal en el atomizador esto supone la presencia de arsénico inorgánico o MA. Lo más probable, a no ser que exista una contaminación indeseada, es que la señal de arsénico no se detecte. En este caso ello supone la posible presencia de DMA y/o AB. Utilizando ahora Zr como modificador de matriz podemos detectar DMA en presencia de AB. Finalmente utilizando paladio como modifi-

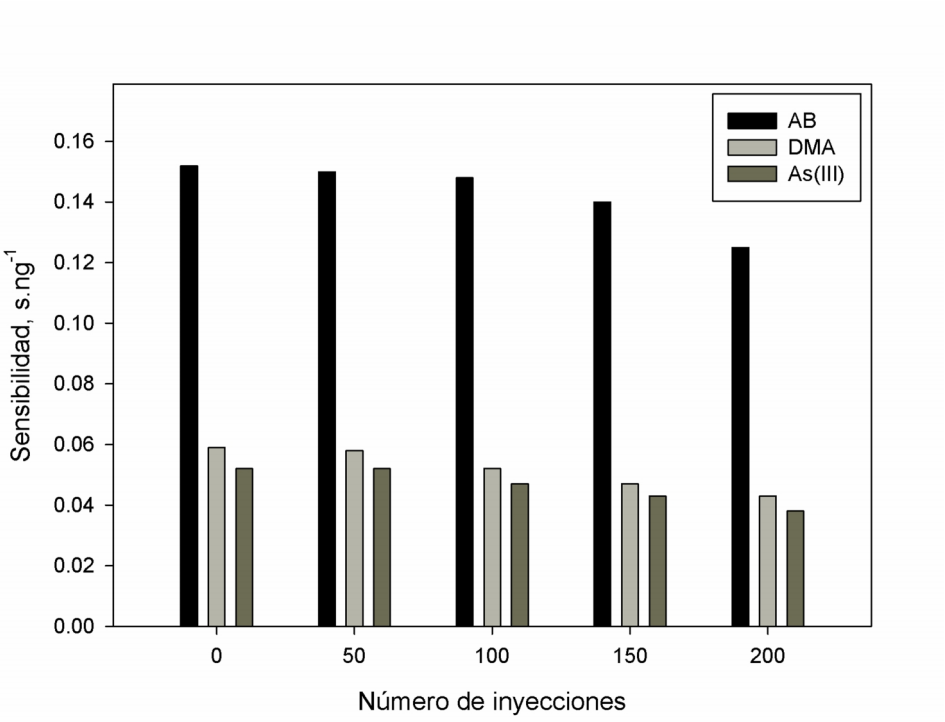


Figura 2.24: Sensibilidades obtenidas para AB, DMA y As(III) con el número de inyecciones. Cada forma química se medió con el modificador adecuado. Se utilizó como matriz una suspensión de verduras y patatas al 10 % m/v en TMAH 0.01 mol L^{-1}.

cador podemos conseguir una estimación del contenido total de arsénico, que por diferencia nos conducirá al contenido en AB.

En la Tabla 2.7 se muestran los resultados obtenidos trabajando con concentraciones de AB, DMA y As(III) en distintas proporciones añadidos a suspensiones de alimento infantil preparadas al 10 % m/v en TMAH 0.01 M. La máxima relación entre formas químicas estudiadas ha sido 40. Entre paréntesis aparecen los valores encontrados para la concentración de cada una de las formas químicas. Nótese que la detección de DMA solamente es posible en ausencia de As(III).

Tabla 2.7. Determinación de As(III), DMA y AB en disoluciones modelo

	Concentración, µg de $As.l^{-1}$			
Suspensión modelo	As(III)	DMA	AB	Total
1	100(103)	-	100(99)	200(202)
2	25(23)	-	275(279)	300(302)
3	-	100(92)	100(98)	200(190)
4	-	50(55)	250(257)	300(312)
5	200(195)	-	50(47)	250(242)

2.3.5 CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN

Como ya hemos comentado, el procedimiento propuesto permite la cuantificación del contenido total de arsénico mediante el empleo de paladio como modificador. El contenido de arsénico inorgánico (suma de As(III), As(V) y MA) se puede conocer con el empleo de cerio (IV) como modificador. Por diferencia podemos conocer la suma DMA+AB. En el caso de que no se encuentren presentes en la muestra formas de arsénico inorgánico y/o MA es posible cuantificar el contenido en DMA utilizando zirconio como modificador.

En todos los casos, como ya hemos indicado es preciso cuantificar mediante el procedimiento de adiciones estándar. Los valores de límite de detección encontrados para AB, DMA y arsénico inorgánico se han calculado en base a la concentración de As(III) que conduce a una señal igual a tres veces el error estándar de la estimación de la recta de regresión realizada para las adiciones estándar. La Tabla 2.8 muestra estos valores junto con los de desviación estándar relativa para determinaciones de analito en el intervalo de 50 a 250 µg L^{-1}. Si las suspensiones de las muestras de alimentos se preparan al 10 % m/v y se inyectan 20 µL de suspensión, los límites de detección para el contenido en la muestra aparecen también reflejados en esta tabla.

Tabla 2.8. Límites de detección y valores de desviación estándar relativa obtenidos por aplicación del procedimiento propuesto.

Analito	LOD, µg de AsL^{-1}	LOD, ng de Asg^{-1}	RSD, %
AB	3	30	2.7
DMA	8	80	3.5
As(III)+As(V)+MA	10	100	3.8

Para la validación del procedimiento propuesto se han comparado los contenidos en arsénico total encontrados por el procedimiento recomendado con los que resultan del empleo de un procedimiento de mineralización previa y determinación de arsénico total con Espectroscopia de Fluorescencia Atómica. Para ello se han utilizado distintas muestras de las que se comercializan como alimentos infantiles, dedicando especial atención

a muestras con base de pescado. El estudio de especiación semicuantitativo se ha completado con la determinación de las diferentes formas químicas de arsénico en materiales de referencia. Se han analizados los materiales DORM-2 (tejido muscular de pescado), DOLT-2 (tejido muscular e hígado de pescado), 1566a (tejido de ostra) y 1568a (harina de arroz). Aunque estos materiales de referencia contienen certificado solamente el arsénico total, los contenidos de las distintas formas químicas, han sido estudiados por numerosos autores y se recogen también en la Tabla 2.9 con fines comparativos.

Como puede observarse de los resultados presentados en la Tabla 2.9 la concordancia entre los resultados es muy buena. La aplicación de las pruebas estadísticas de Wilcoxon y Friedman reveló la no existencia de diferencias significativas al 95 % de nivel de confianza entre los resultados encontrados por el procedimiento propuesto y los recogidos en la bibliografía.

En el caso de los materiales de referencia con contenidos en el orden de µg $.g^{-1}$ no fue necesario preparar las suspensiones al 10 % m/v. En estos casos las suspensiones se prepararon de la misma forma pero más diluidas (0.3-2 %, según contenidos).

2.4. CONCLUSIÓN

Se ha desarrollado un medio de suspensión que permite la introducción directa de alimentos infantiles comerciales en el atomizador electrotérmico, lo que supone un importante ahorro en tiempo y reactivos, haciendo al procedimiento especialmente adecuado para el empleo en laboratorios de control rutinario que no disponen de técnicas analíticas mucho más sofisticadas y de alto precio. El estudio de la distinta capacidad de estabilización de las formas químicas de arsénico (As(III), As(V), MA, DMA y AB) por parte de diferentes modificadores químicos ha permitido desarrollar un protocolo que posibilita la realización rápida de un procedimiento de especiación semicuantitativo "*screening*". Con este procedimiento resulta muy rápido y sencillo cuantificar, además del contenido total de arsénico, la cantidad de arsénico inorgánico (expresado como As(III)+As(V)+MA) y la suma AB+DMA. En ausencia de arsénico inorgánico es posible dis-

tinguir entre DMA y AB. El procedimiento se ha aplicado con éxito a la determinación de arsénico total, AB, DMA y arsénico inorgánico en alimentos infantiles comerciales con base de pescado y se ha validado con el empleo de materiales de referencia conteniendo, mayoritariamente AB y DMA.

Tabla 2.9. Resultados obtenidos en la determinación de distintas formas químicas de arsénico en muestras y materiales de referencia.

	Contenido expresado como ng de As por gramo[a]					
		Procedimiento propuesto				
Muestra	Valor de Referencia[b]	As total	AB	DMA	As(III)+ As(V)+MA	
Alimentos infantiles						
Salmón con verduras	190 ± 10	197 ± 12	172 ± 10	30 ± 12	<LOD	
Platija con verduras	220 ± 15	210 ± 14	183 ± 14	25 ± 11	<LOD	
Merluza con verduras	105 ± 8	108 ± 10	97 ± 11	10 ± 8	<LOD	
Dorada con verduras	233 ± 12	239 ± 11	239 ± 11	<LOD	<LOD	
Lubina con verduras	280 ± 14	275 ± 15	275 ± 15	<LOD	<LOD	
Lenguado con bechamel	175 ± 7	168 ± 11	135 ± 10	32 ± 12	<LOD	
Pescadilla con arroz	210 ± 10	214 ± 12	174 ± 11	45 ± 12	<LOD	
Materiales de referencia						Ref.
DORM-2	18.0[c] ± 1.1	17.2 ± 0.7 17.5 ± 1.4 17.8 ± 0.5 17.3 ± 0.9 17.6 ± 0.5	16.2 ± 0.7 16.4 ± 1.1 16.7 15.5 ± 0.2 16.3 ± 0.7	0.28 ± 0.01 0.25 ± 0.02 0.61 ± 0.04 - 0.56 ± 0.2	<0.03 0.36 ± 0.09 0.45 ± 0.01 - -	123 124 23 31 Este trabajo
DOLT-2	16.6[c] ± 1.1	9.1 ± 0.6 16.2 ± 0.5	6.1 ± 0.3 15.1 ± 0.4	1.2 ± 0.2 1.1 ± 0.1	0.047 ± 0.002 -	125 Este trabajo
1566a	14.0[c] ± 1.2	13.7 ± 0.5 13.5 ± 0.5	11.9 ± 0.4 13.3 ± 0.4	0.6 ± 0.1 0.8 ± 0.1	- -	126 Este trabajo
1568a	290 ± 30	274 ± 12	-	174 ± 12	92 ± 12	121
		267 ± 3	-	155 ± 2	69 ± 1	26
		260 ± 6	-	148 ± 7	101 ± 7	37
		272 ± 9	-	158 ± 10	99 ± 9	Este trabajo

[a]valor medio ± desviación estándar de tres determinaciones

[b]valor encontrado por el procedimiento de referencia (AFS) o certificado

[c]contenido expresado en $\mu g.g^{-1}$

2.5. BIBLIOGRAFÍA

1. P. Smedley y D. Kinniburgh, *A review or the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters*, Appl. Geochem, 17 (2002) 517-568.
2. W. Cullen y K. Reimer, *Arsenic speciation in the environment*, Chem. Rev., 89 (1989) 713-764.
3. S. Pergantis, W. Cullen, D. Chow y G. Eigendor, *Liquid chromatography and mass spectrometry for the speciation of arsenic animal feed additives*, J. Chromatogr. A, 764 (1997) 211-222.
4. K. A. Francesconi y D. Kuehnelt, *Arsenic Compounds in the Environment. In: Environmental Chemistry of Arsenic* (W. T. FrankenbergerJr, ed.) Marcel Dekker Inc., (2002) New York, USA, 51-94.
5. P. Fodor, *Arsenic Speciation in the Environment*. In: *Trace Element Speciation for Environment, Food and Health* (L. Ebdony cols. ed.) (2001)Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry, 196-210.
6. J. S. Edmonds y K. A. Francesconi, *Organoarsenic compounds in the marine environment.* In: *Organometallic Compounds in the Environment* (P.J. Craig, ed.) John Wiley and Sons Ltd, (2003) Chichester, UK, 195-222.
7. K. Ackley, C. Bhyn, K. Sutton y J. Caruso, *Speciation of arsenic in fish tissue using microwave-assisted extraction followed by HPLC-ICP-M,* J. Anal. Atom. Spectrom., 14 (1999) 845-850.
8. W. Maher, W.Goessler, J. Kirby y G. Raber, *Arsenic concentrations and speciation in the tissues and blood of sea mullet (Mugilcephalus) from Lake Macquarie NSW, Australia*. Mar. Chem., 68 (1999) 169-182.
9. S. McSheehy, P. Pohl, D. Velez y J. Szpunar, *Multidimensional liquid chromatography with parallel ICP MS and electrospray MS/MS detection as a tool for the characterization of arsenic species in algae*, Anal. Bioanal. Chem., 372 (2002) 457-466.
10. W. Cullen, B. McBride y J. Reglinski, *The reduction of trimethylarsine oxide to trimethysine by thiols: a mechanistic model for the biological reduction of arsenicals*, Inorg. Biochem., 21 (1984) 45-60.
11. M. F. Hughes, B. D. Beck, Y. Chen, A. S. Lewis y D. J. Thomas, *Arsenic Exposure and Toxicology: A Historical Perspective*, Toxicol. Sci., 123 (2011) 305-332.
12. R. Zakharyan, Y. Wu, G.Bogdan y H. Aposhian, *Enzymatic methylation of arsenic compounds - assay, partial-purification, and properties of arsenitemethyltransferase and monomethylarsonic acid methyltransferase of rabbit liver*, Chem. Res. Toxicol., 8 (1995) 1029-1038.
13. K. Suzuki, T. Tomita, Y.Ogra y M. Ohmichi, *Glutathione-conjugated arsenics in the potential hepato-enteric circulation in rats*, Chem. Res. Toxicol., 14 (2001) 1604-1611.
14. C. Le, W. Cullen y K. Reimer, *Human urinary arsenic excretion after one-time ingestion of seaweed, crab, and shrimp*, Clin. Chem., 40 (1994) 617-624.

15. M. Vahter, *Environmental and occupational exposure to inorganic arsenic*, ActaPharmacol. Toxicol., 59 (1986) 31-34.

16. U.S, EPA, 1993. *Arsenic, Inorganic* (CA8RN 7440-38·2) Integrated Risk Information System. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. http://www.epa.gov/iris/subst/0278.htm (consultado 20 de marzo de 2012).

17. G. Ysart, P. Miller, M. Croasdale, H. Crews, P. Robb, M. Baxter, C. De L' Argy y N. Harrison, *1997 UK Total Diet Study - dietary exposures to aluminium, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, tin and zinc*, Food Add. Contam., 17 (2000) 775-786.

18. D. M. Templeton, E. Ariese, R. Cornelis, L. G. Danielsson, H. Muntau, H. P. Van Leeuwen y R. Lobinski, *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation or elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Reconmmendations 2000)*, Pure Appl. Chem., 72, 1453-1470.

19. EU Directive,Commission Directive 2003/100/EC of 31 October 2003 amending Annex I of Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed. L285/233-L285/237. EU-Commission, Brussels (2003) Belgium.

20. J. Sloth, K. Julshamn y A. Lundebye, *Total arsenic and inorganic arsenic content in Norwegian fish feed products*, Aquacult. Nutr., 11 (2005) 61-66.

21. L. Benramdane, F. Bressolle, y J. Vallon, *Arsenic speciation in humans and food products: a review*, J. Chromatogr. Sci., 37(9) (1999) 330-344.

22. J. H. Huang, P. Fecher, G. Ilgen, K. N. Hu y J. Yang, *Speciation of arsenite and arsenate in rice grain - Verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey*, Food Chem., 130 (2012) 453-459.

23. P. Cava-Montesinos, K. Nilles, M. Cervera y M. De la Guardia, *Non-chromatographic speciation of toxic arsenic in fish*, Talanta, 66 (2005) 895-901.

24. U. Kohlrneyer, E.Jantzen, J.Kuballa y S. Jakubik, *Benefits of high resolution IC-ICP-MS for the routine analysis of inorganic and organicarsenic species in food products of marine and terrestrial origin*, Anal. Bioanal. Chem., 377 (2003) 6-13.

25. M. Matos-Reyes, M. Cervera, R. Campos y M. De la Guardia, *Non-chromatographic speciation of toxic arsenic in vegetables by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry after ultrasound-assisted extraction*, Talanta, 75 (2008) 811-816.

26. M. Matos, M. Cervera, R. Campos y M. De la Guardia, *Determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid in cereals by hydride generation atomic fluorescence spectrometry*, Spectrochim. Acta Part B, 62 (2007) 1078-1082.

27. I. Pizarro, M. Gómez, M. Palacios y C. Cámara, *Evaluation of stability of arsenic species in rice*, Anal. Bioanal. Chem., 376 (2003) 102-109.

28. M. D'Amato, F. Aureli, S. Ciardullo, A. Raggi y F. Cubadda, *Arsenic speciation in wheat and wheat products using ultrasound- and microwave-assisted extraction and anion ex-*

change chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, J. Anal. Atom. Spectrom., 26(2011) 207-213.

29. S. Yathavakilla, M. Fricke, P. Creed, D.Heitkemper, N.Shockey, C. Schwegel, J. Caruso y J. Creed, *Arsenic Speciation and Identification of Monomethylarsonous Acid and Monomethylthioarsonic Acid in a Complex Matrix*, Anal. Chem., 80 (2008) 775-782.

30. P. Vela, D. Heitkemper y K. Stewart, *Arsenic extraction and speciation in carrots using accelerated solvent extraction, liquid chromatography and plasma mass spectrometry*, Analyst, 126 (2001) 1011-1017.

31. D. Sánchez-Rodas, J. Gómez-Ariza y V. Oliveira, *Development of a rapid extraction procedure for speciation of arsenic in chicken meat*, Anal. Bioanal. Chem., 385 (2006) 1172-1177.

32. A. Polatajko y J. Szpunar, *Speciation of arsenic in chicken meat by anion-exchange liquid chromatography with inductively coupled plasma-mass spectrometry,* Journal of AOAC International (2004), 87(1), 233-237.

33. V. Nischwitz y S. Pergantis, *Improved Arsenic Speciation Analysis for Extracts of Commercially Available Edible Marine Algae Using HPLC-ES-MS/MS*, J. Agr. Food Chem., 54 (2006) 6507-6519.

34. N. Coelho, L. Coelho, E. de Lima, A. Pastor M. De la Guardia, *Determination of arsenic compounds in beverages by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*, Talanta, 66 (2005) 818-822.

35. P. Vela y D. Heitkemper, *Total arsenic determination and speciation in infant food products by ion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry*, J. AOAC Int., 87 (2004) 244-252.

36. K. Ljung , B. Palm, M. Grandér y M. Vahter, *High concentrations of essential and toxic elements in infant formula and infant foods – A matter of concern*, Food Chem., 127 (2011) 943-951.

37. A. Ackerman, P. Creed, A. Parks, M. Fricke, C. Schwegel, J. Creed, D. Heitkemper y N. Vela, *Comparison of a chemical and enzymatic extraction of arsenic from rice and an assessment of the arsenic absorption from contaminated water by cooked rice*, Environ. Sci. Technol., 39 (2005) 5241-5246.

38. M. Pardo, P. Viñas, A. Fisher y S. Hill, *Comparison of enzymatic extraction procedures for use with directly coupled high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of arsenic in baby foods*, Anal. Chim. Acta, 441 (2001) 29-36.

39. J. Caruso, D.Heitkemper y C. B'Hymer, *An evaluation of extraction for arsenic species from Freeze-dried apple samples*, Analyst, 126 (2001) 136-140.

40. V. Dufailly, L. Noeel, J. Fremy, D.Beauchemin y T. Guerin, *Optimization by experimental design of an IEC/ICP-MS speciation method for arsenic in seafood following microwave assisted extraction*, J. Anal. Atom. Spectrom., 22 (2007) 1168-1173.

41. J. Moreda-Piñeiro, E. Alonso-Rodríguez, A. Moreda-Piñeiro, C. Moscoso-Pérez, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez y P. Bermejo-Barrera, *Simultaneous pressurized enzymatic hydrolysis extraction and clean-up for arsenic speciation in seafood samples before high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry determination*, Anal. Chim. Acta, 679 (2010) 63-73.

42. A. Polatakjo y J. Szpunar, *Speciation of arsenic in chicken meat by anion-exchange liquid chromatography with inductively coupled plasma-mass spectrometry*, J. AOAC Inter., 87 (2004) 233-237.

43. E. Sanz, R. Muñoz y C. Cámara, *A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe*, Anal. Chim. Acta, 535 (2005) 227-235.

44. N. Vela, D. Heitkemper y K. Stewart, *Arsenic extraction and speciation in carrots using accelerated solvent extraction, liquid chromatography and plasma mass spectrometry*, Analyst, 126 (2001) 1011-1017.

45. N. Vela y D. Heitkemper, *Total arsenic determination and speciation in infant food products by ion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry*, J. AOAC Inter., 87 (2004) 244-252.

46. S. Londesborough, J.Mattusch y R. Wennrich, *Separation of organic and inorganic arsenic species by HPLC-ICP-MS*, Fresen. J. Anal. Chemi., 363 (1999) 577-581.

47. J. Gomez-Ariza, E. Morales, I. Giraldez, D. Sanchez-Rodas y A. Velasco, *Sample treatment in chromatography-based speciation of organometallic pollutants*, J. Chromatogr. A, 938 (2001) 211-224.

48. C. Barra, R.Santelli, J.Abräo y M. De la Guardia, *Arsenic speciation - A review*, Química Nova, 23 (2000) 58-70.

49. T. Nakazato, *Analytical methods for speciation of organic arsenicals*, Biomedical Research on Trace Elements, 18 (2007) 63-72.

50. D. J. Butcher, *Environmental applications of arsenic speciation using atomic spectrometry detection*, Appl. Spectrosc. Rev., 42 (2007) 1-22.

51. M. Leermakers, W.Baeyens, M. De Gieter, B.Smedts, C.Meert, H. De Bisschop, R.Morabito y P. Quevauviller, *Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation*, TrAC-Trend. Anal. Chem., 25 (2006) 1-10.

52. A. Imrany J. Chakresh, *Advances in arsenic speciation techniques*, International J. Environ. Anal. Chem., 84 (2004) 947-964.

53. C. B'Hymer y J. Caruso, *Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 1045 (2004) 1-13.

54. K. Francesconi y D. Kuehnelt, *Determination of arsenic species: A critical review of methods and applications, 2000-2003*, Analyst, 129(5) (2004) 373-395.

55. E. Terlecka, *Arsenic speciation analysis in water samples: a review of the hyphenated techniques*, Environ. Monit. Assess., 107 (2005) 259-284.

56. J. Montes-Bayon, K. De Nicola y J. Caruso, *Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 1000 (2003) 457-476.

57. S. McSheehy, J. Szpunar, R. Lobinski, V. Haldys, J. Tortajada y J. Edmonds, *Characterization of arsenic species in kidney of the clam Tridacnaderasa by multidimensional liquid chromatography-ICPMS and electrospray time-of-flight tandem mass spectrometry*, Anal. Chem., 74 (2002) 2370-2378.

58. R. Paproski y X. Lea, *Boric acid-assisted anion-exchange chromatography for separating arsenic species*, Anal. Chim. Acta, 526 (2004) 69-76.

59. J. Bayona, *Supercritical fluid extraction in speciation studies*, TrAC-Trend. Anal. Chem., 19 (2000) 107-112.

60. P. Pawel y B. Prusisz, *Ion-exchange column chromatography-an attempt to speciate arsenic*, TrAC-Trend. Anal. Chem., 23 (2004) 63-69.

61. I. Ali y H. Aboul-Enein, *Speciation of metal ions by capillary electrophoresis*, Crit. Rev. Anal. Chem., 32 (2002) 337-350.

62. S. McSheehy, J. Szpunar, R. Morabito y P. Quevauviller, *The speciation of arsenic in biological tissues and the certification of reference materials for quality control*, TrAC-Trend. Anal. Chem., 22 (2003) 191-209.

63. R. Xie, W. Johnson, S. Spayde, G. Hall y B. Buckley, *Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 578 (2006) 186-194.

64. S. McSheehy y Z. Mester, *The speciation of natural tissues electrospray-mass spectrometry II: Bioinduced ligands and environmental contaminants*, TrAC-Trend. Anal. Chem., 22 (2003) 210.

65. S. McSheehy y Z. Mester, *Arsenic speciation in marine certified reference materials. Part 1: Identification of water-soluble arsenic species using multidimensional liquid chromatography combined with inductively coupled plasma, electrospray and electrospray high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry with mass spectrometric detection*, J. Anal. Atom. Spectrom., 19 (2004) 373-380.

66. E. Schmeisser, W. Goessler, N. Kienzl y K. Francesconi, *Volatile Analytes Formed from Arsenosugars: Determination by HPLC-HG-ICPMS and Implications for Arsenic Speciation Analyses*, Anal. Chem., 76 (2004) 418-423.

67. J. Gomez-Ariza, D. Sanchez-Rodas, I. Giraldez y E. Morales, *Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS*, Analyst, 125 (2000) 401-407.

68. M. Mato, J. Otero, J. Moreda, E. Alonso, P. López, S. Muniategui y D. Prada, *Arsenic extraction in marine biological materials using pressurized liquid extraction*, Talanta, 71 (2007) 515-520.

69. C. G. Yuan, G. B. Jiang y B. He, *Evaluation of the extraction methods for arsenic speciation in rice straw, Oryzasativa L., and analysis by HPLC-HG-AFS*, J. Anal. Atom. Spectrom., 20 (2005) 103-110.

70. H. B. Han, Y. B. Liu, S. F. Mou y Z. M. Ni, *Speciation of Arsenic by Ion Chromatography and Off-line Hydride Generation Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 8 (1993) 1085-1090.

71. A. Lindberg, W.Goessler, M. Grander, B. Nermell y M. Vahter, *Evaluation of the three most commonly used analytical methods for determination of inorganic arsenic and its metabolites in urine*, Toxicol. Lett., 168 (2007) 310-318.

72. R. Sur y L. Dunemann, *Method for the determination of five toxicologically relevant arsenic species in human urine by liquid chromatography-hydride generation atomic absorption spectrometry*, Journal of Chromatography B 807 (2004) 169-176.

73. Z. Zhu, S. Zhang, Y. Lv y X. Zhang, *Atomization of hydride with a low-temperature, atmospheric pressure dielectric barrier discharge and its application to arsenic speciation with atomic absorption spectrometry*, Anal. Chem., 78 (2006) 865-872.

74. P. Viñas, I. López-García, B. Merino, N. Campillo, M. Hernandez-Córdoba, *Speciation of arsenic in baby foods and the raw fish ingredients using liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry*, Chromatographia, 57 (9/10) (2003) 611-616.

75. A. Kumar y P. Riyazuddin, *Non-chromatographic hydride generation atomic spectrometric techniques for the speciation analysis of arsenic, antimony, selenium, and tellurium in water samples-a review*, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 87 (2007) 469-500.

76. P. Cava, A. De la Guardia, C. Teutsch, M.Cervera y M. De la Guardia, *Non-chromatographic speciation analysis of arsenic and antimony in milk hydride generation atomic fluorescence spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 493 (2003) 195-203.

77. M. Resano, E. García, V. Mihucz, A. Móricz, G. Záray y F. Vanhaecke, *Rapid screening method for arsenic speciation by combining thin layer chromatography and laser ablation-inductively coupled plasma-dynamic reaction cell-mass spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 22 (2007) 1158-1162.

78. G. Cepriá, N. Alexa, E. Cordos y J. Castillo, *Electrochemical screening procedure for arsenic contaminated soils*, Talanta, 66 (2005) 875–881.

79. L. Pei y L. Rui, *Speciation analysis of inorganic arsenic in water samples by immobilized nanometer titanium dioxide separation and graphite furnace atomic absorption spectrometric determination*, Anal. Chim. Acta, 602 (2007) 32-36.

80. R. Murata, T. Shimizu, y N. Uehara, *Speciation of arsenic(III) and arsenic(V) in natural water by graphite furnace AAS after coprecipitation with a copper-pyrrolidinedithiocarbamate complex*, Bunseki Kagaku, 54 (9) (2005) 831-836.

81. L. Q. Li, Y. H. Zhang, W. E. Gan y Y. D. Li, *Emulsion liquid membrane separation of As(III) and As(V) with subsequent determination by electrothermal AAS*, Atom. Spectrosc., 22(2) (2001) 290-294.

82. P. Bermejo, M.Barciela, M.Ferron y A. Bermejo, *Speciation of arsenic by the determination of total arsenic and arsenic(III) in marine sediment samples by Electrothermal atomic absorption spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 10 (1995) 247-52.

83. I. Serafimovski, I. Karadjova, T. Stafilov y D. Tsalev, *Determination of total arsenic and toxicologically relevant arsenic species in fish by using electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry*, Microchem. J., 83 (2006) 55-60.

84. I. H. Matusiewicz, *'Wet digestion methods', in: Sample preparation for trace element analysis*, Z. Mester y R.E. Sturgeon (ed), Elsevier Science, (2003) Amsterdam, capítulo 6.

85. S. Wu, X. Feng y A. Wittmeier, *Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled plasma mass spectrometry*, J . Anal. Atom. Spectrom., 12 (1997) 797-806.

86. J. Nóbrega, Y. Gélinas, A. Krushevska y R. Barnes, *Determination of elements in biological and botanical materials by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry after extraction with a tertiary amine reagent*, J. Anal. Atom. Spectrom., 12 (1997) 1239-1242.

87. I. Karadjova, P. Petrov, I. Serafimovski, T. Stafilov y D. Tsalev, *Arsenic in marine tissues - The challenging problems to electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta, 62 B (2007) 258-268.

88. I. Karadjova, T. Stafilov y D. Tsalev, *Determination of total arsenic and toxicologically relevant arsenic species in fish by using electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry*, Microchem. J., 83(2) (2006) 55-60.

89. R. Silva, R. Santelli, S. Willie, R. Sturgeon y S. Sella, *Alkaline solubilization of biological materials for trace element analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry*, Analyst, 124 (1999) 1843-1846.

90. E. Muñoz, J. Morote, R. Romero, I. López-García y M. Hernández-Córdoba, *Determination of zinc in tissues of normal and dystrophic mice using electrothermal atomic absorption spectrometry and slurry sampling*, Anal. Biochem., 348 (2006) 64-68.

91. J. Borba da Silva, D. Borges, M. Silva da Veiga, A.Curtius y B. Welz, *Determination of cadmium in biological samples solubilized with tetramethylammonium hydroxide by Electrothermal atomic absorption spectrometry, using ruthenium as permanent modifier*, Talanta, 60 (2003) 977-982.

92. Y. Tian, M. L. Chen, X. W. Chen, J. H. Wang, Y. Hirano, H. Sakamoto y T. Shirasaki, *Arsenic preconcentration via solid phase extraction and speciation by HPLC-gradient hydride generation atomic absorption spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 26 (2011) 133-140.

93. Y. Tan, J.S. Blais y W. D. Marshall, *Slurry preparation by high-pressure homogenization for the determination of heavy metals in zoological and botanical certified reference materials and animal feeds by electrothermal atomic absorption spectrometry*, Analyst, 121 (1996) 1419-1424.

94. Y. Tan, W. Marshall y J. Blais, *Slurry preparation by high-pressure homogenization for cadmium, copper and lead determination in cervine liver and kidney by electrothermal atomic absorption spectrometry*, Analyst, 121 (1996) 483-488.

95. A. Ribeiro, A. Curtius y D. Pozebon, *Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide*, Microchem. J., 64 (2000) 105-110.

96. D. Tsalev, E. Tserovski, A. Raitcheva, R. Georgieva y Z. Zaprianov, *Analytical scheme for the direct graphite-atomizer/flame atomic absorption spectrometric determination of fifteen trace elements in toenails for biological monitoring*, Spectrosc. Lett., 26 (1993) 331-346.

97. A. Almeida y J. Lima, *Elimination of the carbon build-up effect in the ETAAS analysis of low diluted serum samples using an in situ wet digestion with tetramethylammonium hydroxide. Application to aluminum determination*, J. Anal. Atom. Spectrom., 15 (2000) 1019-1024.

98. U. Suistoma, M. Saaranen y T. Vanha-Perttula, *Determination of selenium in human spermatozoa and prostasomes using base digestion and electrothermal atomic absorption spectrophotometry*, Clin. Chim. Acta, 168 (1987) 323-8.

99. I. Karadjova y M. Karadjov, *ETAAS determination of Cd and Pb in plants*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 360 (1998) 246-251.

100. M. Silva, M. Vale, I. Damin, B. Welz, M. Mandaji y J. Fett, *Method development for the determination of iron in milligram amounts of rice plants (Oryzasativa L.) from cultivation experiments using graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Anal. Bioanal. Chem., 377 (2003) 165-172.

101. Z. Xiashi, H. Bin y J. Zucheng, *Cloud point extraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of chromium species and their distribution in cigarette and cigarette ash*, Int. J. Environ. Anal. Chem., 84 (2004) 927-934.

102. S. Ehsan y W. Marshall, *High-pressure homogenization prior to slurry introduction electrothermal atomic absorption spectrometry for metal determinations in wood pulps*, J. Anal. Atom. Spectrom., 16 (2001) 1180-1184.

103. P. Martins, D. Pozebon, V. Dressler y G. Kemieciki, *Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation*, Anal. Chim. Acta, 470 (2002) 195-204.

104. I. Karadjova y T. Venelinov, *Determination of arsenic and mercury in sunflower oil by electrothermal atomic absorption*, Food Addit. Contam., 19 (2002) 948-953.

105. N. Hata, H. Yamada, I. Kasahara y S. Taguchi, *Membrane solubilization with tetramethylammonium, hydróxide for the preconcentration and electrothermal atomic absorption spectrometric determination of trace amounts of arsenic in water*, Analyst, 124 (1999) 23-26.

106. H. Matusiewicz y B. Golik, *Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilisation*, Microchem. J., 76 (2004) 23-29.

107. D. Pozebon, D. Valderi y C. Adilson, *Determination of trace elements in biological materials by ETV-ICP-MS after dissolution or slurry formation with tetramethylammonium hydroxide*, J. Anal. Atom. Spectrom., 13 (1998) 1101-1105.

108. W. Scott, G. Conrad y S. Ralph, *Determination of Inorganic and Total Mercury in Biological Tissues by Electrothermal Vaporization Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Analyst, 122 (1997) 751 – 754.

109. N. Tomohiro, K. Takayoshi, N. Izumi y C. Koichi, *Effect of the Chemical Species of Arsenic on Sensitivity in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, Anal. Sci., 24 (2008) 355-360.

110. S. Imai, Y. Ito, M. Tani, A. Yonetani, Y. Nishiyama y Y. Hayashi, *Desorption Mechanism of Arsenic from Non-Pyrolytic Graphite, Pyrolytic Graphite and Pyrolyzed Ascorbic Acid in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*, Anal. Sci., 16 (2000)1189-1194.

111. T. Itoh, H. Shimomura, Y. Nishiyama y S. Imai, *Atomization Mechanism of Silver Deposited on Pyrolyzed Ascorbic Acid in Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, Bunseki Kagaku, 5 (2005) 621-626.

112. T. Narukawa, T. Kuroiwa, T. Yarita y K. Chiba, *Analytical sensitivity of arsenobetaine on atomic spectrometric analysis and the purity of synthetic arsenobetaine*, Appl. Organometal. Chem., 20 (2006) 565-572.

113. V. Krivan y S. Arpadjan, *Radiotracer study of the behavior of arsenic in the graphite-furnace*, Fresen. J. Anal. Chem., 335 (1993) 743-747.

114. E. Russeva, I. Havezov y A. Detcheva, *Arsenic speciation in waste-waters by extraction chromatography followed by atomic-absorption spectrometry*, Fresen. J. Anal. Chem., 347 (1993) 320-323.

115. D. Tsalev, P. Mandjukov y J. Stratis, *Electrothermal atomisation atomic absorption spectrometric determination of inorganic and methylated arsenic after pre-concentration by hydride generation and trapping the hydrides in a cerium(iv)-iodide absorbing solution*, J. Anal. Atom. Spectrom., 2 (1987) 135-141.

116. E. H. Larsen, *Electrothermal atomic absorption spectrometry of inorganic and organic arsenic species using conventional and fast furnace programmes*, J. Anal. Atom. Spectrom., 6 (1991) 375-377.

117. V. Slaveykova, F. Rastegar y M. Jeroy, *Behaviour of Various Arsenic Species in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 11 (1996) 997-1002.

118. P. Viñas, I. López-García, B. Merino, N. Campillo y M. Hernández-Córdoba, *Stability of arsenobetaine levels in manufactured baby foods*, J. Food Protec., 66 (2003) 2321-2324.

119. N. Campillo, R. Peñalver, P. Viñas, I. López-García y M. Hernández-Córdoba, *Speciation of arsenic using capillary gas chromatography with atomic emission detection,* Talanta, 77 (2008) 793-799.

120. I. López-García, P. Viñas, R. Romero y M. Hernández-Córdoba, *Fast determination of phosphorus in honey, milk and infant formulas by electrothermal atomic absorption*

spectrometry using a slurry sampling procedure, Spectrochim. Acta Part B, 62 (2007) 48–55.

121. D. Heitkemper, N. Vela, K. Stewart y C. Westphal, *Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 16 (2001) 299-306.

122. M. Giacomelli, M. Lima, V. Stuppa, R.M. de Carvalho Jr., J.B.B. da Silva y P. Bermejo, *Determination of As, Cd, Pb and Se in DORM-l dogfish muscle reference material using alkaline solubilization and Electrothermal atomic absorption spectrometry with Ir + Rh as permanent modifiers or Pd + Mg in solution*, Spectrochim. Acta Part B, 57 (2002) 2151-2157.

123. W. Goessler, D. Kuehnelt, C. Schlagenhaufen, Z. Slejkivec y K. J. Irgolic, *Arsenobetaine and other arsenic compounds in the National Research Council of Canada Certified Reference Materials DORM 1 and DORM 2*, J. Anal. Atom. Spectrom. 13 (1998) 183-187.

124. S. Karthikeyan, S. Hirata y C.S.P. Iyer, *Determination of arsenic species by microwave-assisted ex-traction followed by ion-pair chromatography-ICPMS: analysis of reference materials and fish tissues*, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 84 (2004) 573-582.

125. R. Wahlen, S. McSheehy, C. Scriver y Z. Mester, *Arsenic speciation in marine certified reference materials. Part 2. The quantification of water soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom. 19 (2004) 876-882.

126. M. Vilanó y R. Rubio, *Determination of arsenic species in oyster tissue by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-atomic fluorescence detection*, Appl. Organometal. Chem., 15 (2001) 658-666.

Capítulo III

Determinación del arsénico soluble en disolución acuosa de muestras de aceite comestible mediante DLLME y determinación por ETAAS.

CONTENIDO

3.1. INTRODUCCIÓN 147

3.2. PARTE EXPERIMENTAL 165

3.2.1. Instrumentación 165

3.2.2. HG-AFS 165

3.2.3 Otra instrumentación 166

3.2.4. Reactivos 167

3.2.5. Muestras y material de referencia 168

3.2.6. Digestión de las muestras de aceite en microondas 170

3.2.7. Arsénico total mediante HG-AFS 170

3.2.8. Arsénico total mediante ETAAS 171

3.2.9. Procedimiento propuesto por DLLME asistida con Ultrasonidos 172

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 173

3.3.1. Selección del medio extractante 173

3.3.2. Selección del dispersante 175

3.3.3. Efecto de los ultrasonidos y la temperatura 177

3.3.4. Optimización del programa de calentamiento 178

3.3.5. Calibración 182

3.3.6. Capacidad de extracción del procedimiento propuesto 184

3.3.7. Determinación de arsénico en muestras de aceite 185

3.3.8. Naturaleza de la especies extraidas por el procedimiento propuesto 188

3.3.9. Naturaleza del arsénico presente en las muestras estudiadas 192

3.3.9.1. Optimización del procedimiento de separación 193

3.3.9.2. Determinación de arsénico en las fracciones obtenidas 196

3.4. CONCLUSIÓN 198

3.5. BIBLIOGRAFÍA 199

3.1. INTRODUCCIÓN

Aunque se ha sugerido que el arsénico podría ser un elemento esencial para la vida [1] y se sabe que algunos microorganismos lo usan para generar energía [2], no hay datos concluyentes sobre su esencialidad para los sistemas biológicos [3].

El arsénico ha sido uno de los elementos tristemente más mencionados durante la edad media e incluso moderna [4], aunque fuera conocido antes por chinos, romanos, griegos y todavía antes, por los babilonios. Así en la biblioteca de ladrillos cuneiformes del palacio de Asurbanipal en Nínive (668 a.C.), se describe prácticamente el sulfuro de arsénico. Los griegos usaron el actual óxido de arsénico (III) como depilatorio, y no podemos olvidar que 4000 años antes de la era cristiana el arsénico intervenía en la elaboración de los primeros bronces. Sin embargo, el empleo de este elemento se difunde en las civilizaciones primitivas a través de compuestos o sustancias que lo contenían y que por su color (amarillo o dorado) y aspecto (polvillo), eran candidatos a favorecer la conversión de los metales en oro, y por lo tanto, entrará de lleno dentro del campo de la alquimia, como medio para la elaboración de la píldora de la inmortalidad, la conclusión de la Gran Obra o la búsqueda de la piedra filosofal para transmutar los elementos de partida en oro. Las tres sustancias claves a efectos de transmutación fueron: una resina de madera, conocida como SANDARACA (de color rojo brillante), el REJALGAR (con el significado persa y después árabe de "polvo de caverna", S_2As_2), y el OROPIMENTE (AURIPIGMENTUM, de los latinos, cuyo nombre ya indica su uso, S_3As_2).Todas ellas se pueden reducir a polvos de color amarillo o rojizo; ésa fue la clave, pues eran capaces de ejercer un efecto de colorante. Precisamente, Plinio explica como “hacer oro”, con oropimente, método empleado incluso por algún emperador romano para satisfacer sus necesidades económicas.

La alquimia china, en textos que datan del 122 a.C., nos presenta al oro en el centro de la Tierra, en relaciones místicas con el CHU (rejalgar), el "mercurio amarillo" y la vida futura. Estas sustancias eran las fuentes amarillas necesarias para obtener, a través del oro, la píldora de la inmortalidad. Dioscórides, médico griego del siglo I d. C. es el primero en rebautizar a la sandaraca oriental, como ARSENIKÓS, refiriéndose a lo que más tarde sería el arsénico rojo. Zósimo el Panapolitano (IV d. C.) recopiló en su libro Ymout

todos los conocimientos químicos de épocas anteriores tomados en la biblioteca de Alejandría. En él menciona al elemento como SEGUNDO MERCURIO, indicando su preparación a partir del sulfuro, el conocido oropimente. También obtiene la plata a partir de cobre por adición del SEGUNDO MERCURIO. Demócrito el Mistagogo, en sus múltiples recetas para hacer oro, sitúa en el mismo nivel a la SANDARACA, el ARSENICUM y el KINNABARI, como polvos necesarios para obtener el oro, a partir de otros metales. Olimpiodoro, intitulado "Filósofo de Alejandría", embajador del imperio romano frente a Atila, describe el ARSÉNICO BLANCO, y lo emplea para combatir plagas de ratones. Mucho más tarde, en 1733, Brandt lo identificaría como una especie de cal de arsénico. Sin embargo, suele atribuirse la primera obtención de arsénico puro a Alberto Magno, a mediados del siglo XII, tratando oropimente con jabón.

En la filosofía de la alquimia, el arsénico representaba también el principio de lo masculino. Ahora bien, la masculinidad del arsénico era singular, pues se combinaba con el azufre, un elemento que se había considerado como masculino, formando el oropimente y el rejalgar. Esta unión, motivó un cambio filosófico en el comportamiento del azufre, que griegos y árabes habían considerado masculino. No es de extrañar por lo tanto que según determinadas teorías su nombre actual derive del griego ARSENIKÓS (αρσενιχός), que a su vez lo podría hacer de la voz ARSEN y ARREN (αρρην), con el significado del principio viril en contraposición con lo femenino. A su vez ARSEN y ARREN, lo hacen del avéstico ARESAN y del indoiranio ARASAN, término referido al macho como opuesto a la hembra, pero no al macho reproductor VARESAN, del cual en último término derivaría el verraco castellano y el concepto de varón, tal como el nombre de Arsenio. Así tenemos al indoeuropeo como punto de partida remoto del ARSÉNICO español.

Sin embargo, en los libros de la alquimia hebrea, aparece el arsénico como ZARNÏKH, término que se repite en la mayoría de los textos, con la modificación ZIRNIKH, (manuscrito de Manchester) que los lingüistas hacen derivar de la voz persa ZARNIK (casi dorado), que tendría que referirse a sus minerales, siendo el equivalente del oropimente o sulfuro de arsénico. En chino, el arsénico es SHEN y como se puede observar, es un nombre fonético formado por la segunda sílaba de ARSEN, por eso en sus ideogramas se

representa con el símbolo de piedra, reservado paradójicamente a los no metales, y el fonético que representa el sonido SHEN.

En el mundo árabe, la idea sobre el arsénico cambia, y por lo tanto sus nominaciones. Rhases, el alquimista árabe del siglo IX, en la primera clasificación sistemática de las sustancias químicas conocidas, lo cataloga como piedra. Avicena, un siglo más tarde, lo cataloga perfectamente. Evidentemente no es cierto que fuera Alberto Magno su descubridor, como aparece en algunos textos, aunque describa su obtención a partir del oropimente y jabón; posiblemente se hubiera documentado en los escritos árabes.

Arnaldo de Vilanova, a últimos del siglo XIII, lo considera entre otras sustancias, como “alma de los metales”, dentro de la filosofía alquímica. A mediados del siglo XV, Basilio Valentino en sus escritos llama al arsénico "humo de fragua". Este nombre parece indicar la producción de sus derivados volátiles (óxidos) en la metalurgia de las piritas, reforzando la consideración de Arnaldo de Vilanova. Poco después, Paracelso introduce un derivado arsenical, el “arsenicum fixum” como purgante, remedio que se generalizó bastante dada la repercusión que tuvieron todos sus escritos en la posteridad. A principios de 1600, surge un clásico de la alquimia, Eireneo Filaleteo, que publicará una serie de textos en lenguaje hermético, que incluso llegarán a ser empleados por Newton. En su trabajo sobre:"Experiences sur la pénetration du Mercure des Sages" expone que para la preparación del mercurio de los sabios por sublimación (lo que en lenguaje hermético se conocía como “águila”), era condición fundamental el arsénico. El “arsénico sublimado”, era un arsénico pulverizado que se empleó a partir de la edad media como veneno.

Pese a su uso como medicamento en el desarrollo de la iatroquímica, el arsénico fue cronológicamente el tercer elemento químico empleado como veneno desde el punto de vista histórico, después del mercurio y del plomo. No es de extrañar que fuera el ingrediente fundamental del famoso veneno "Cantarella" de los Borgias, llamado así por los gritos, lamentos y convulsiones que en su fase final emitían los envenenados. El arsénico sublimado, fue la sustancia recomendada por Carlos el Malo, rey de Navarra a su menestral Woudretón, para que en 1384, asesinara a Carlos VI rey de Francia y a otros nobles de la corte. Tanto se popularizó que, entre 1600 y 1700, el 80% de los envene-

namientos en Francia lo fueron por arsénico o sus combinaciones químicas. Así fue llamado "polvos de sucesión" por ser empleado fundamentalmente en estos menesteres. Se habló del asesinato con arsénico de Enriqueta de Inglaterra y del duque de Saboya. El análisis por activación neutrónica de cabellos de Napoleón cuando muere en Santa Elena, reveló una concentración de arsénico muy superior a la normal. Durante la Edad Media, las propiedades tóxicas del arsénico fueron muy utilizadas y el arsénico blanco (trióxido de arsénico) fue el veneno de elección, por su alta toxicidad. Durante la Primera Guerra Mundial, se desarrollaron y utilizaron como armas químicas los gases arsenicales, entre ellos el gas Lewisita (clorovinil-dicloroarsina), que es un potente agente vesicante, irritante local y tóxico sistémico.

El arsénico no siempre produjo males como hemos dicho. Hipócrates (V a.C.) recomendaba un tratamiento a base de sulfuro de arsénico para curar las úlceras y los chinos tenía un elixir denominado "LOS TRES AMARILLOS" que consistía en oropimente, rejalgar y oro para el tratamiento de diversas enfermedades. La disolución Fowler a base de anhídrido arsenioso se empleó con diversos nombres durante diecinueve siglos para combatir la epilepsia, el asma y determinados eczemas. En pequeñas dosis favorece y estimula la retención del Fe^{2+} en el grupo hemo y por lo tanto la formación de glóbulos rojos, y desde 1909 se emplearon sus derivados en combatir la sífilis: nace el medicamento Salvarsán (el arsénico que "salva"). Algunos compuestos de arsénico inorgánico se han utilizado para el tratamiento de enfermedades cutáneas crónicas, anemia, leucemia y enfermedades pulmonares. Su uso medicinal está actualmente limitado a casos avanzados de la enfermedad del sueño y como componente de drogas antiparasitarias de uso tópico [5].

El arsénico es un veneno porque actúa en el organismo de la misma forma que lo hace el plomo y el mercurio, esto es, uniéndose a los grupos tiol -SH de las proteínas, deformando su estructura y alterando en muchos casos las membranas celulares hasta modificar su permeabilidad. A consecuencia de ello se produce una fuerte variación de las concentraciones iónicas de sodio y potasio, alterando el estímulo nervioso. Por eso algunos síntomas de su intoxicación son muy parecidos a los de ciertas enfermedades que desacoplan las concentraciones iónicas. Otras veces se asemejan a los estados ca-

renciales de vitamina B1 (tiamina). Esto es debido a que también interfiere en el metabolismo de la glucosa, en el paso clave: la formación de acetil coenzima A. El arsénico(III) se une al ácido lipoico que contiene un ciclo pentagonal de carbonos con dos azufres, transformándolo en un ciclo hexagonal, puenteando los dos azufres y bloqueando de esta forma, la acción de los grupos tiol -SH que deberían formarse en dicho ácido, a través de su acción junto con acetil coenzima A. No termina aquí la acción del arsénico ya que al ser de la misma familia que el fósforo, es capaz de suplantarlo en los fosfatos, como As (V), formando enlaces As-O, menos energéticos, inhibiendo los enzimas oxidativos y desacoplando la síntesis del ATP, base energética de la actividad humana [1].

Como antídoto se han empleado históricamente la leche fresca y el zumo de limón porque tanto el ácido láctico como el cítrico pueden complejar y aislar al arsénico formando un quelato, aunque con más dificultades que con metales como el plomo y el mercurio.

El As se encuentra como materia de desecho o "ganga" en muchos minerales; también puede ser liberado al ambiente por la actividad volcánica [6], la erosión de depósitos minerales y por diversas actividades humanas [7]. Méjico es uno de los principales productores en el mundo, con cerca del 20 % de la producción mundial. Además de su presencia natural en pequeñas cantidades en prácticamente todos los ecosistemas, las principales actividades humanas que liberan este elemento al ambiente son el uso de combustibles fósiles en plantas termoeléctricas, los procesos de fundición y refinado de metales no ferrosos (Pb, Zn y Cu), el uso para la protección de maderas, en especial el método conocido como cobre-cromo-arsénico, la fabricación de semiconductores a base de arseniuro de galio e indio para la industria electrónica y el almacenamiento inadecuado de desechos industriales que contienen As.

Las concentraciones de As en el aire en sitios alejados de actividades antropogénicas son de 1 a 3 ng m^{-3} mientras que, en áreas industriales emisoras de As, los niveles de este elemento pueden ser de 100 hasta 300 ng m^{-3} . Las concentraciones de As en el agua son usualmente menores a 10 µg L^{-1} [8] mientras que, en sitios cercanos a minas o contaminados con minerales arsenicales, fluctúan entre 200 y 1 000 µg L^{-1} [9]. Las con-

centraciones en el suelo varian de 1 a 40 mg kg^{-1} y, en áreas agricolas, pueden ser aún más altas por la presencia de residuos de plaguicidas arsenicales.

El principal aporte de As a la dieta son los alimentos de origen marino [10], pues los crustáceos y peces marinos comestibles tienen las concentraciones más altas (0.1 a 90 µg g^{-1}) [11]. Sin embargo, el As presente en este tipo de alimentos es arsénico orgánico, que es considerado como menos tóxico. La ingestión a través del agua de bebida (principalmente arsénico inorgánico) es una fuente de exposición muy importante para algunas poblaciones, por lo que puede ser un problema grave de salud pública. Este problema ha sido descrito en Taiwan, Chile, Argentina, México e India; en todas las regiones calificadas como afectadas por la presencia de As en el agua de bebida se rebasa varias veces el límite máximo permisible (50 µg As L^{-1}) en agua potable [12]. La entrada del elemento al organismo a través del aire y suelo es mucho menor, pero puede ser importante en poblaciones vecinas a fuentes de emisión.

Como ya comentamos en el capítulo 2, el arsénico está presente en varias formas químicas y su toxicidad depende de las mismas. Por tanto su ecotoxicidad depende de la distribución de estas formas químicas. En los últimos años se ha abierto un nuevo campo, la metalómica, que dirige su atención hacia la identificación de metalomas (metaloproteínas, metaloenzimas y otras biomoléculas conteniendo metales) y la elucidación de sus funciones en los sistemas biológicos [13]. Dentro de este campo, la investigación sobre arsénico también resulta de interés [14]. La combinación de Cromatografía de líquidos de alta resolución con Plasma de acoplamiento inducido y Espectrometría de masas (HPLC-ICP-MS) es la técnica más empleada para la especiación de arsénico. Con ella se pueden conseguir límites de detección de 0.5 ng L^{-1} [15].

El agua de mar es considerada como el punto de partida del ciclo de este elemento en el ecosistema marino. Aquí la mayor parte del arsénico existe en forma inorgánico, como pentavalente formando $HAsO_4^-$[16]. Además de esta forma también se ha detectado la presencia de DMA y MA [17] y en mucha menor extensión DMA(III) y MA(III) [18], lo que se puede explicar en base a dos procesos redox diferentes [19] que pueden apreciarse en la Figura 3.1. Estos compuestos son transformados por las algas marinas principalmente en arsenoazúcares que luego son metabolizados por los animales mari-

nos más bajos de la cadena trófica hasta arsenobetaína (AB) identificada por primera vez en *Panuliruscygnus* (langosta australiana) [20].

Como puede apreciarse en la Figura 3.2 [21] la forma de arsénico más abundante en los animales marinos es la arsenobetaína, pero esto no es algo general. En efecto, el tambor australiano (Kyphosussydneyanus) [22], un pez teleósteo que digiere las micro-algas de su dieta por fermentación y el dugón (Dugongdugon), un sirenio de los océanos Índico y Pacífico, que se alimenta de algas marinas [23], se alejan de esta tendencia. Parece que la abundancia de arsénico en forma de arsenobetaína depende de su habitat alimenticio y su posición en la cadena trófica [24].

La ruta para la formación de AB no está bien asentada y se han propuesto hasta cuatro caminos que aparecen recogidos en la Figura 3.3. En los tres primeros se parte de arsenoazúcar [25], aunque esta circunstancia no es imperativa ya que se puede sintetizar a partir de DMA(III) por reacción con glioxilato o piruvato [26].

Puesto que AB es la especie de arsénico predominante en la mayoría de los animales marinos, la degradación de AB en arsénico inorgánico después de su liberación al medioambiente tras la muerte de los animales es esencial para completar el ciclo del elemento en el ecosistema marino. Hay dos posibles caminos para la degradación de AB que se muestran en la Figura 3.4 y donde la AB evoluciona bien a TMAO, bien a DMA, pero en cualquier caso, el proceso va seguido de una degradación hasta DMA(V) y finalmente As(V). Esta degradación es realizada por bacterias ubicuas en el ambiente marino [27].

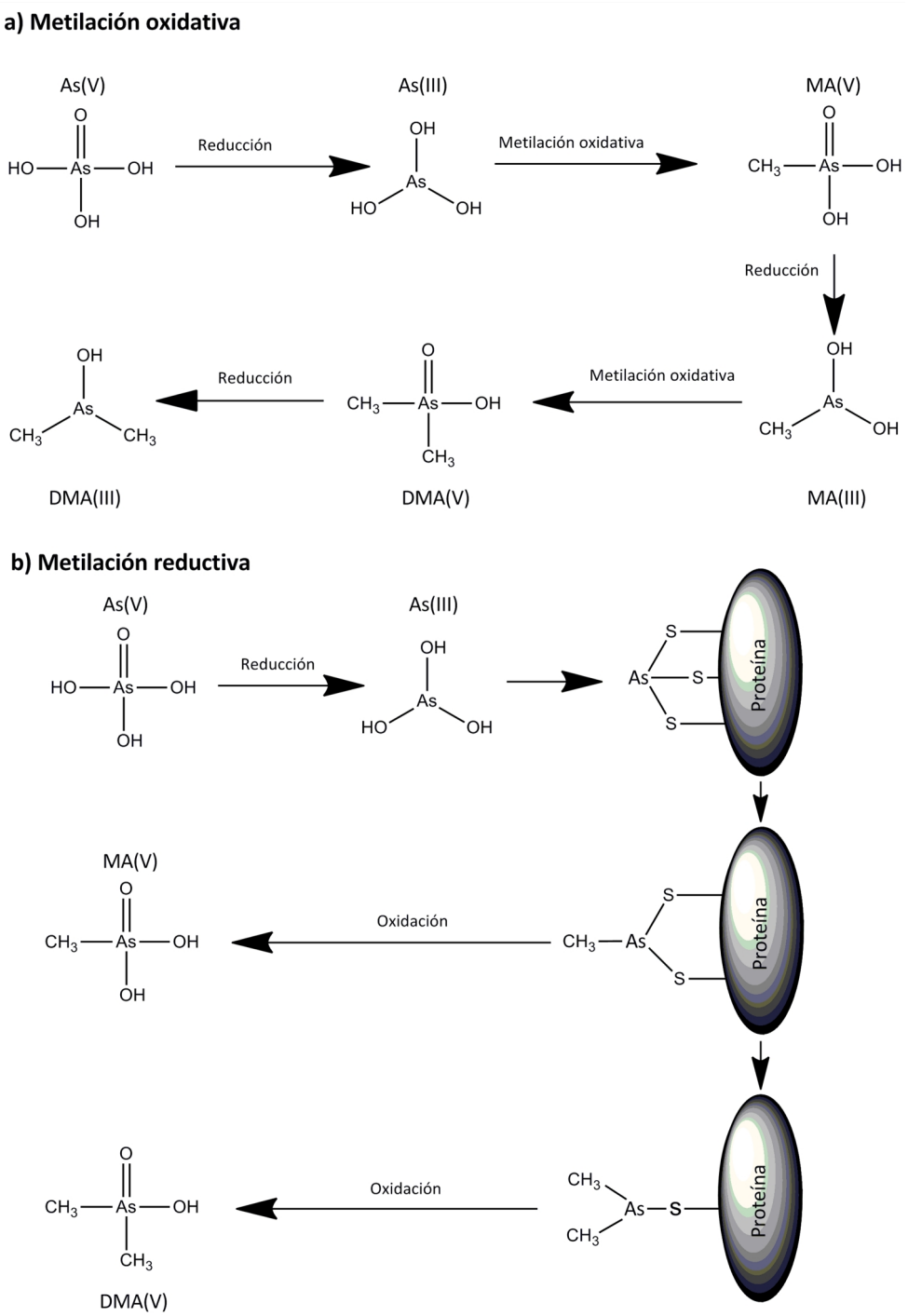


Figura 3.1: Hipótesis sobre las reacciones de arsénico (V) en agua de mar

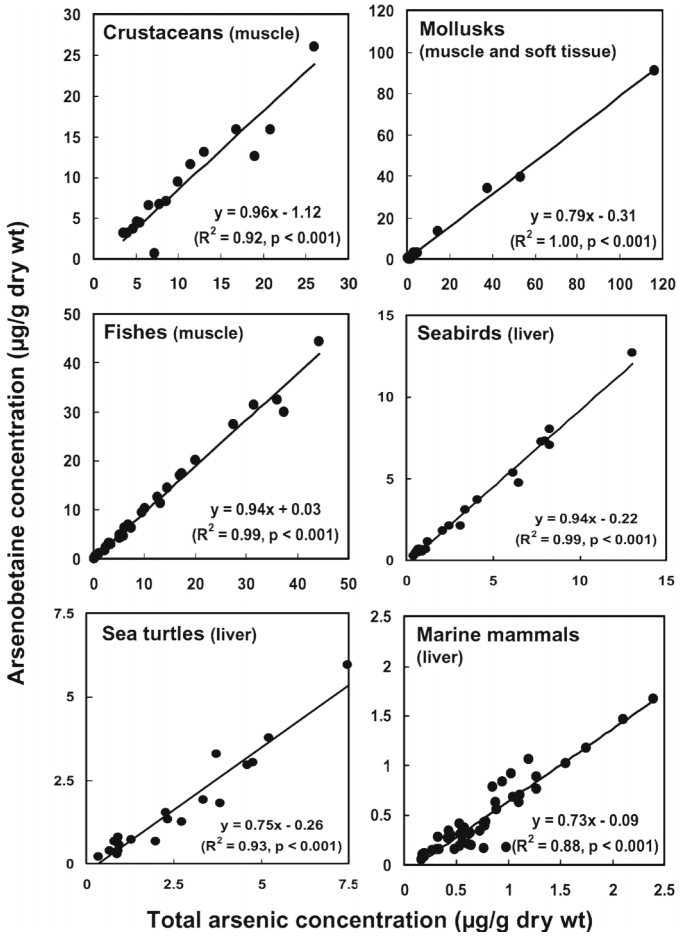


Figura 3.2: Relación entre arsénico total y arsenobetaína encontrada en algunas especies de animales marinos. Tomada de [21].

El aceite de pescado es altamente recomendado como suplemento nutricional debido a su elevado porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados. En este sentido, los ácidos eicosapentanoico (EPA) y el docosahexanoico (DHA), ambos ácidos grasos omega-3, son de los más importantes debido a su efecto positivo en la salud humana especialmente en el sistema cardiovascular. Estos dos ácidos se pueden encontrar hasta en el 20 % en el aceite de pescado [28]. Pero por otro lado el aceite de pescado contiene importantes cantidades de arsénico, de ahí el interés de conocer las especies de arsénico presentes en este tipo de muestras.

Existen notables discrepancias en la bibliografía sobre el contenido del elemento en los aceites con origen en animales marinos. Así, se ha señalado que el contenido total de arsénico encontrado en aceite de pescado está en el intervalo de <0.1 a 5 μg g^{-1} y únicamente el 1 % del total es soluble en mezclas agua:metanol [29]. En otros estudios, si bien el contenido incrementa hasta el intervalo de 4.3 a 10.5 μg g^{-1}, la fracción soluble en agua es similar aunque puede aumentar hasta el 20% con procesos de hidrólisis. En aceite de hígado de bacalao aproximadamente el 20% del total del contenido en el elemento se encuentra en forma de arsénico unido a ácidos grasos [30] y el restante está unido a lípidos no polares. En otro estudio con aceite de capelín (Mallotusvillosus) el 70% del arsénico estaba unido a lípidos apolares, mientras que el unido a ácidos grasos resultó casi nulo [31]. Esta circunstancia se atribuye al hecho de que el aceite de capelín se preparó a partir del pescado entero.

En otro estudio realizado con atún [32] se concluyó que el arsénico total (5.9 μg de As g^{-1}) se encuentra como compuestos arsenicales solubles en agua y grasas. Los solubles en agua están muy bien caracterizados y constituidos mayoritariamente por arsenobetaína (aprox. 95 %), mientras que los solubles en grasas (arsenolípidos) permanecen desconocidos. En este estudio, aproximadamente la mitad del arsénico total se enccontró en forma soluble en agua, donde la especie predominante es arsenobetaina (aprox. 95 %) con trazas de DMA. En otros casos, como en el estudio de grasa de foca anillada, el constituyente mayoritario de formas de arsénico solubles en agua fue DMA [33], mientras que el soluble en grasa evolucionaba a DMA con hidrólisis alcalina o enzimática con fosfolipasa D [34].

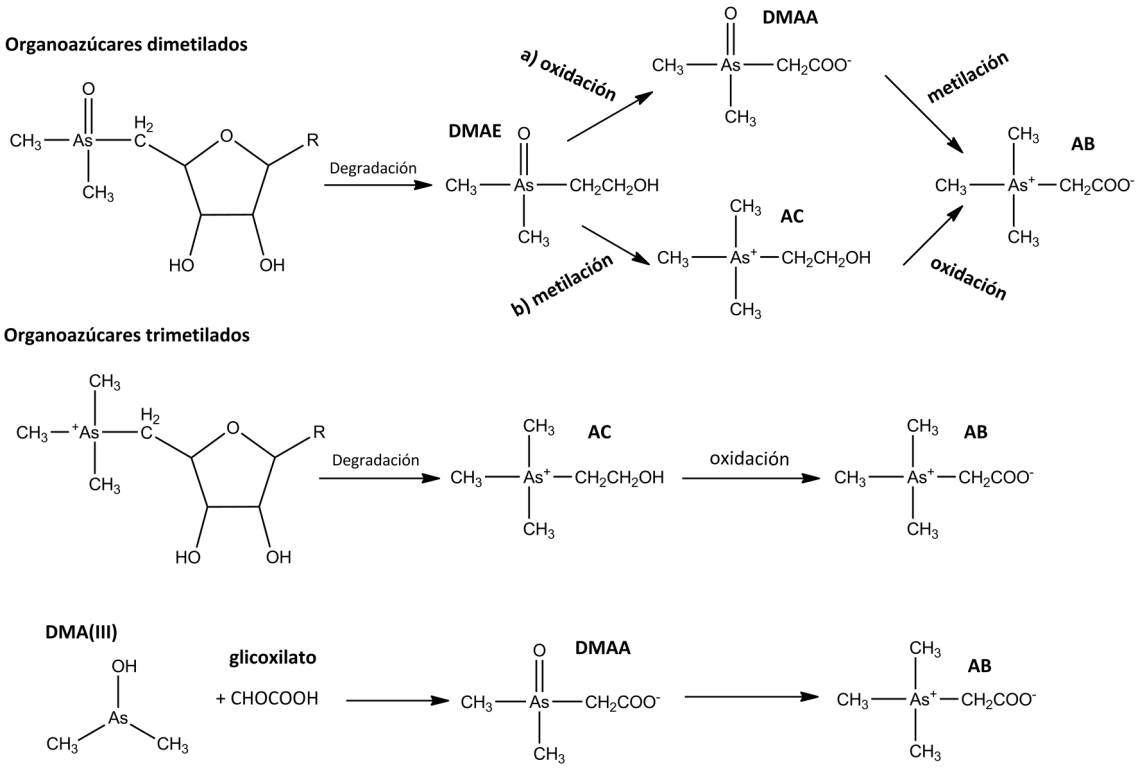


Figura 3.3: Rutas posibles para la formación de AB en los organismos vivos marinos.

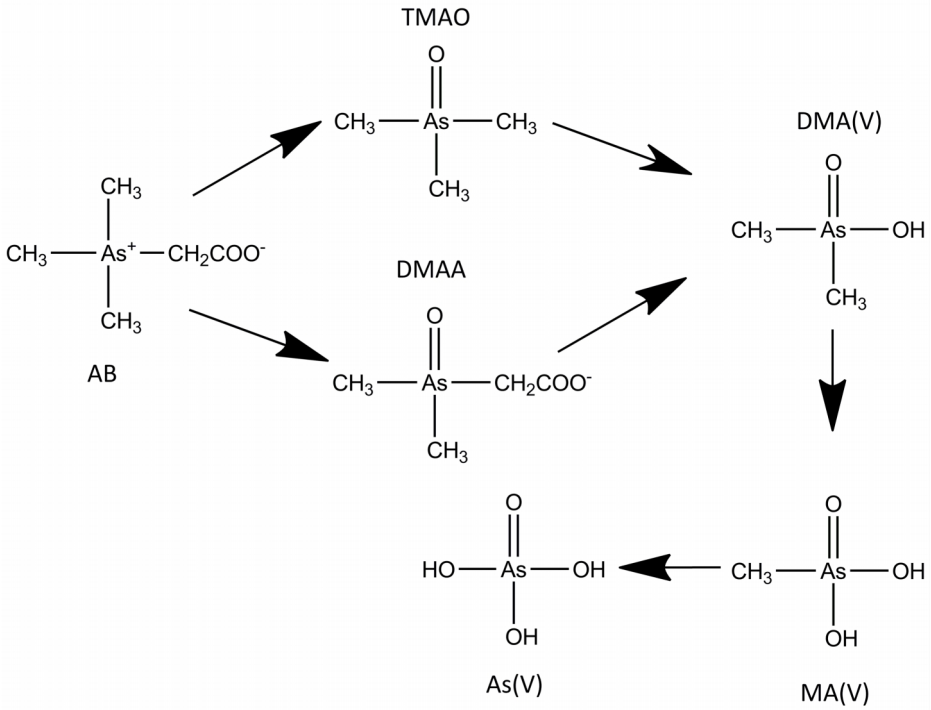


Figura 3.4: Hipótesis de degradación microbiana de AB en agua de mar.

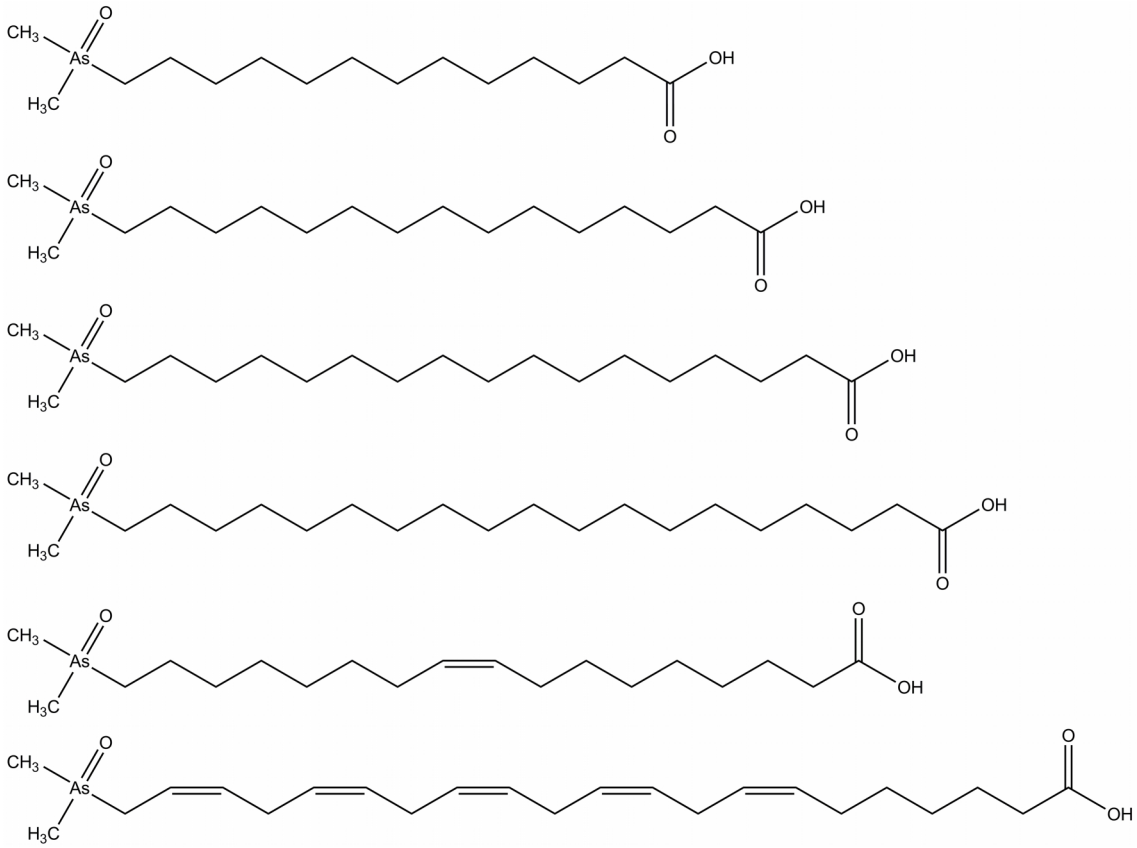


Figura 3.5: Arsenolípidos conteniendo ácidos grasos de cadena larga identificados en aceite de hígado de bacalao. Tomado de [30].

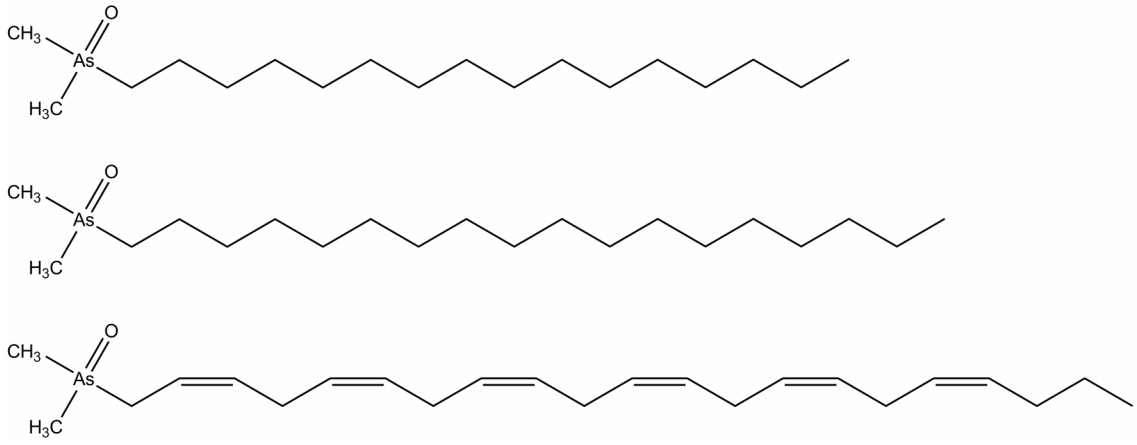


Figura 3.6: Arsenolípidos conteniendo hidrocarburos identificados en aceite de capelín. Tomado de [31].

De los arsenocompuestos solubles en grasas se han detectado solamente algunos arsenolípidos que suponen el 40 % del total soluble en grasas. El resto forma parte de arsenolípidos menos polares de estructura todavía desconocida. La Figura 3.5 muestra algunas estructuras que ya han sido identificadas de arsenolípidos constituidos por dimetilarsenoil y distintos ácidos grasos [30]. Estas formas se encontraron en aceite de hígado de bacalao y constituyen aproximadamente el 20 % de todo el arsénico soluble en grasas. El 80 % restante se encuentra unido a lípidos no polares. La Figura 3.6 muestra estructuras similares identificadas donde el grupo arsenoil se encuentra unido a hidrocarburos [31,35,36]. En estudios similares realizados con aceite de hígado de capelín más del 70 % del total de arsénico (12 μg g^{-1}) corresponde a As en lípidos no polares.

Del arsénico soluble en grasas se han separado los lípidos polares de los apolares. El contenido del elemento en lípidos apolares supuso el 50 % del total soluble en grasas aunque el contenido de lípidos de esta fracción fue del 95%. El 5 % restante constituía la fracción polar que contuvo el 50 % del arsénico restante. Mientras que la arsenobetaína no se metaboliza y se excreta por la orina, los arsenolípidos son metabolizados por el cuerpo humano hasta DMA, lo que supone un peligro potencial que requiere mucha más atención [37].

Si bien algunos aceites de pescado, como ya hemos comentado, presentan contenidos elevados en arsénico total, esta situación no puede generalizarse para todos los tipos de aceite. La Tabla 3.1 muestra los contenidos en aceites comestibles [38]. Nótese como lo habitual en cualquier aceite que no sea de pescado es un contenido inferior a 0.01 μg g^{-1}. Además estos aceites en ningún caso son un componente importante en el aporte de este elemento al organismo. En efecto, como se puede apreciar en la Tabla 3.2, que recoge la ingesta diaria de arsénico en una dieta promedio en Reino Unido, el aporte proveniente del aceite es muy bajo. Resulta mucho más importante el que se deriva de la ingesta de pescado que supone el 93 % o la suma de pan y cereales que alcanza el 3 % de un total de 65 μg dia^{-1} de arsénico ingerido [38]. En otros países como España la ingesta de pescado supone el 98 % de 255 μg dia^{-1}, mientras que en Japón al aporte de arsénico debido al pescado (50 %) hay que sumar el que se obtiene del arroz (17 %) y los vegetales y algas (28 %) para una ingesta diaria de 110 μg dia^{-1}. En los tres

casos el aporte de arsénico debido a la ingesta de aceites y grasas resultó ser insignificante (<0.01 %).

El comité de expertos de aditivos alimenticios de la FAO/WHO [39] ha establecido una ingesta máxima tolerable de arsénico inorgánico de 15 µg por kg de peso corporal a la semana, mientras que para arsénico orgánico eleva este límite hasta 350 µg. Una norma australiana de alimentos establece el contenido máximo total de arsénico en cereales en 1 µg g^{-1}, el inorgánico en pescado y crustáceos en 2 µg g^{-1} y para moluscos y algas en 1 µg g^{-1} [40], aunque estos valores estan en continua revisión. El estándar Codex establece el contenido máximo de arsénico en grasas comestibles y aceites en 0.1 µg g^{-1}.

La necesidad de conocer con precisión la naturaleza del arsénico presente en los alimentos ha movido a muchos autores a desarrollar procedimientos que permiten su especiación en las distintas formas. Estos procedimientos generalmente involucran el empleo de técnicas sofisticadas y costosas como ICP-MS acoplada a HPLC [50] que no se encuentran al alcance de muchos laboratorios. Cuando se trata de evaluar la viabilidad de un producto como alimento saludable el problema desde el punto de vista que nos ocupa puede reducirse simplemente a conocer el contenido total de arsénico y además su contenido en forma inorgánica u orgánica para poder tomar una decisión sobre su salubridad.

Tabla 3.1: Niveles de arsénico total encontrados en distintas muestras de aceite comestible

Tipo de aceite	Contenido, μg g^{-1}	País	Año	Técnica	Referencia
Girasol	0.0034–0.0075	Bulgaria	2000	ETAAS	[41]
Girasol	0.000745	España	2001	AAS	[42]
Oliva	0.00223				
Cacahuete	0.006-0.027	Taiwán	2000	AFS	[43]
Sésamo	0.006-0.011				
Oliva	0.006-0.012				
Girasol	0.005-0.006				
Ensalada	0.006-0.012				
Semilla de té	0.006				
Mantequilla	0.009				
Manteca de cerdo	0.007				
Maíz	0.011				
Colza	0.013				
Vegetal	0.013				
Palma	0.025				
Semillas	0.169	Francia	2000	ICP-MS	[44]
Genérico	0.045				
Palma	<0.54	Malasia	2001	ICP	[45]
Soja	0.09	USA	1990		[46]
Hígado de bacalao	1.4–10				
Platija	6.1				
Arenque	3.1–20.2				
Caballa	8.2–15				
Eperlano	5.2–23.2				
Camarón	10.1				
Almeja	4.8				
Mejillón	18				
Vincapervinca	84				
Atún	0.557	Bélgica	1992	AAS	[47]
Arenque	1.742				
Caballa	1.036				
Girasol	<0.01–0.05	Osaka, Japón	1978-1980	AAS	[48]
Vegetal	<0.01				
Yema de huevo	<0.01				
Cártamo	0.25				
Cocina (procesado)	<0.01				
Genérico	0.003	Chile	2001	HG-AAS	[49]
Varios	<0.05-10.5	Varios	2004	HPLC-ICP-MS	[50]

Tabla 3.2: Arsénico total ingerido en una dieta convencional en Reino Unido [51]

Alimento	Ingesta diaria, g	[As], µg g^{-1}	Ingesta As diaria, µg	Porcentaje (%)
Pan	200.0	0.005	1	1.54
Cereales varios	142.9	0.007	1	1.54
Carne fresca	23.3	0.003	0.07	0.11
Despojos	1.0	0.004	0.004	0.01
Productos cárnicos	46.7	0.003	0.14	0.22
Ave de corral	20.0	0.004	0.08	0.12
Pescado	13.9	4.4	61	93.85
Aceites y grasas	26.7	0.003	0.08	0.12
Huevos	11.1	0.0009	0.01	0.02
Azúcares y conservantes	64.0	0.005	0.32	0.49
Vegetales verdes	30.0	0.003	0.09	0.14
Patatas	125.0	0.002	0.25	0.38
Otros vegetales	80.0	0.005	0.4	0.62
Vegetales envasados	37.5	0.0008	0.03	0.05
Fruta fresca	71.4	0.0014	0.1	0.15
Fruta no fresca	42.1	0.0019	0.08	0.12
Bebidas	1000.0	0.001	1	1.54
Leche	275.0	0.0004	0.11	0.17
Productos lácteos	60.0	0.002	0.12	0.18
Nueces	2.0	0.006	0.012	0.02
Total			65	100

La determinación del contenido total de arsénico en alimentos se realiza previa mineralización de la muestra con ácidos [52] y, en la mayoría de los casos con la ayuda de microondas [29,43,53,54]. Para la detección se emplean técnicas muy sensibles como HG-AAS [52], AFS [43] e ICP-MS [29,53,54]. Incluso con estas técnicas tan sensibles el límite de detección no resulta muy bajo debido a que el proceso de digestión obliga a diluir la muestra. En efecto nótese que la cantidad típica de muestra que se utiliza en el digestor es de 0.2 g y el digerido se lleva finalmente a un volumen entre 15 y 25 mL, lo que supone aproximadamente una dilución de 100 veces sobre el contenido original. En estas condiciones el límite de detección se encuentra entre 0.01 y 0.1 µg g^{-1}.Para conseguir mayor sensibilidad se puede recurrir al empleo de emulsiones de aceite, generación de vapor e ICP-MS [55], o introducción directa del aceite en el atomizador electrotérmico (ETAAS) bien disuelto en un disolvente miscible [56], bien emulsionado en hidróxido de tetrametil amonio [41].

La técnica ETAAS presenta interesantes ventajas ya que permite la introducción directa de la muestra en el atomizador sin digestión, el empleo de pequeñas cantidades de

muestra, alta sensibilidad, mínima manipulación y gran rapidez. Como ya hemos visto en el capítulo 1, cuando se combina con procesos de preconcentración la sensibilidad aumenta mucho y se hace similar al empleo de ICP-MS.

Por tanto el desarrollo de un proceso de extracción en disolución acuosa cuantitativo resultará interesante no solo para el cálculo del contenido total sino también en estudios de especiación. Los disolventes más comúnmente utilizados para extraer las especies de arsénico son agua, metanol y mezclas de agua:metanol a distintas concentraciones [57,58]. En el caso de plantas vegetales se ha utilizado ácido fosfórico, ácido trifluoroacético [59,60] e hidróxido sódico [61]. El empleo de ultrasonidos como alternativa a la agitación manual y el calentamiento con microondas provoca un aumento de la eficiencia de extracción [59]. Este efecto también se observa cuando la fase extractante es muy rica en metanol [62,63]. La extracción de arsénico de aceite de girasol con mezclas HCl/H_2O_2, HCl/EDTA y NH_3/EDTA a distintas temperaturas condujo a extracciones cuantitativas de As(III) y As(V) y muy elevadas de MA y DMA [41].En un estudio sobre la estabilidad de distintas formas de arsénico se comprobó que DMA, TMAO y TETRA son estables hasta 200 °C, MA se empieza a degradar a As(V) a partir de 140 °C, AB resultó estable hasta 100 °C y AC se degrada a temperatura más baja hasta TMAO y TETRA.

En un estudio sobre la extracción de arsénico en especies marinas y tejido animal se encontró que con el empleo de un medio ácido (2 % de HNO_3) secuencial con una mezcla etanol agua [64] y calentamiento en microondas a 90 °C se consigue un porcentaje elevado de extracción. Si el proceso se realiza extrayendo primero en metanol:agua y después en el medio ácido se preservan las formas químicas. Parece claro que el empleo de un medio ácido en caliente provoca la hidrólisis de diferentes formas de arsénico que evolucionan hasta DMA [29].

En un estudio más reciente [65] se propone la extracción en medio HNO_3 al 0.3 % con metanol al 80 % calentando a 80 °C en microondas. De esta forma se han conseguido extracciones superiores al 92 % en aceites comestibles y la especiación de As(III), As(V), MA, DMA, AB y AC con IC-ICP-MS. Recuperaciones del 90% para MA, DMA y ácido 3-nitro-4-hidroxifenil arsénico (Roxarsona) en aceites comestibles se obtuvieron median-

te DLLME con una mezcla de hexano y reguladora de pH=7 y la participación de la energía ultrasónica [66].

En esta Memoria hemos considerado utilizar la metodología DLLME en combinación con ETAAS para la determinación y especiación no cromatográfica de arsénico en aceites comestibles. En este caso se trata de dispersar una fase acuosa dentro de otra orgánica con una relación de fases máxima. Para conseguir buenos resultados, es decir, un tamaño de gota dispersa mínimo, hemos recurrido al empleo de tanto un agente químico dispersante como de uno físico, la energía ultrasónica.

La necesidad de aplicar un procedimiento de preconcentración es clara si tenemos en cuenta que ninguna de las muestras de aceite comercial, de distinta naturaleza, adquirido en los comercios locales, condujo a una señal significativa[1] por ETAAS de forma directa previa preparación de disoluciones al 30 % de los mismos en hexano.

[1] Se entiende como señal significativa la debida a una concentración de arsénico total en la muestra de aceite superior al límite de detección de este procedimiento (0.03 ng g^{-1}).

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. INSTRUMENTACIÓN

Se ha utilizado un espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer Modelo 800 equipado con corrector de fondo de deuterio y corrección Zeeman (Figura 1.7), un atomizador de horno de grafito THGA y un automuestreador AS-800 (Perkin-Elmer, Shelton, USA). Los tubos equipados con plataforma de L'Vov fueron de grafito pirolítico y se obtuvieron del mismo fabricante (referencia B050-4033). Como gas inerte se ha empleado argón, con una velocidad de flujo de 250 mL min^{-1} en todas las etapas, excepto en la de atomización en que el flujo se detuvo. Se ha utilizado una lámpara de descarga sin electrodos de arsénico (Perkin-Elmer) operando a 300 mA. Los parámetros instrumentales seleccionados se muestran en la Tabla 3.3.

3.2.2. HG-AFS

La técnica HG-AFS se llevó a cabo utilizando un sistema de flujo continuo PSA MilleniumExcalibur (PS Analytical, Orping, UK). Las medidas se realizaron utilizando una lámpara de cátodo hueco de descarga reforzada para arsénico (Photron PTY. LTD., Australia) en la línea 197.3 nm, con una corriente primaria de 27.5 mA y una corriente de refuerzo de 34.9 mA. La Figura 2.3 muestra el equipo utilizado. Las condiciones para HG-AFS fueron: velocidades de flujo de reactivos a 9.0 mL min^{-1} para el reactivo reductor conteniendo ácido clorhídrico 3.5 M, disolución de ioduro potásico al 1% (m/v) y ácido ascórbico al 0.2% (m/v) y 4.5 mL min^{-1} para la disolución al 0.6% (m/v) de borohidruro sódico estabilizada con hidróxido sódico 0.075 M. A través del separador gas-líquido en forma de U se pasó gas argón y los hidruros volátiles producidos fueron empujados por el flujo de argón (330 mL min^{-1}), pasaron a través de una membrana higroscópica PermaPure (Farmingdale, NJ, USA) y fueron atomizados usando una llama de difusión de hidrógeno. Las válvulas y piezas en T se obtuvieron de Omnifit (Cambridge, UK).

Tabla 3.3. Parámetros instrumentales y programa de calentamiento.

Parámetro	*Valor*
Corriente de la lámpara, mA	300
Longitud de onda, nm	193.7
Rendija, nm	0.7
Tipo de atomizador	Plataforma
Volumen de muestra inyectada, µL	30
Modificador químico[a]	0.3 µg Ce(IV); 20 µg Pd
Gráfica de calibrado, µg L^{-1}	2-100
Líquido extractante, µL	300 (76 % isopropanol + 0.7 % HNO_3)
Cantidad de muestra, g	10
Límite de detección en muestras, ng g^{-1}	0.03 ng g^{-1}
RSD, %	<4.6

[a] véase el texto para detalles sobre el modificador a utilizar

Programa de horno

Etapa	Temperatura, °C	Rampa, °C/s	Mantenido, s
1: Secado	90	1	20
2: Secado	130	1	30
3: Calcinación	400	10	30
4: Calcinación	800	5	30
4: Atomización[a,b]	2300	0	4
5: Limpieza	2600	0	3

[a] El flujo de argón interno se paró; [b] Etapa de lectura

Secuencia

Paso	Acción
1	Inyectar el modificador y ejecutar las etapas 1 a 2 del programa de calentamiento
2	Inyectar la muestra o estandar y ejecutar el programa completo de calentamiento

3.2.3 OTRA INSTRUMENTACIÓN

Para los trabajos con ultrasonidos se utilizó un baño de ultrasonidos ATU mod. ATM 40-0.7LC (Valencia, España) de 50 W a 40 kHz. La centrifugación de las dispersiones se realizó en la centrífuga Unicen 21 (Madrid, España) con rotor y adaptador para tubos falcon de 15 mL hasta 4000 rpm.La mineralización de las muestras con fines de comparación se llevó a cabo utilizando un rotor 8SXF100 equipado con 8 vasos de teflón cerrados, con camisa cerámica, resistentes hasta 310 °C y 140 bar y control simultáneo de presión y temperatura, en un horno microondas Aston-Paar modelo Multiwave 3000 (Figura 3.7). Rotavapor Büchi R-210 (Flawil, Suiza).

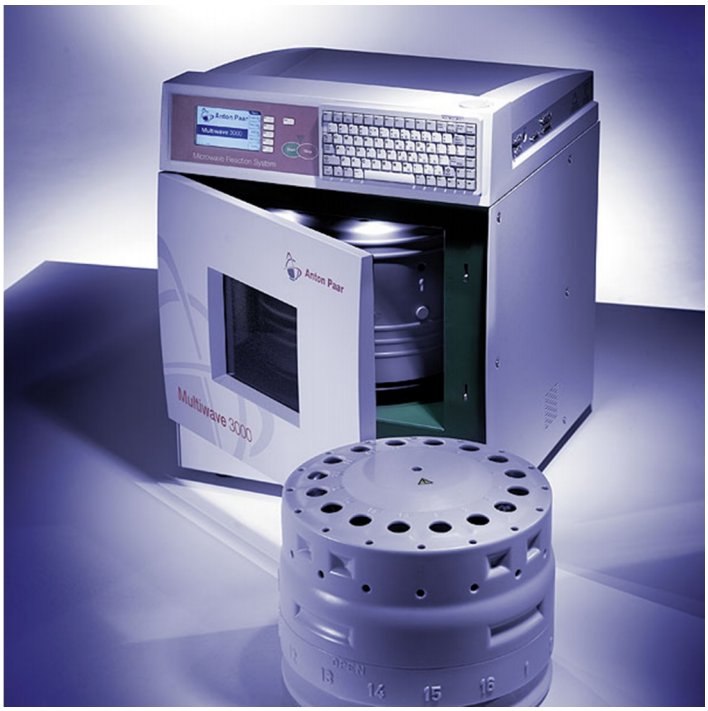




Figura 3.7: Horno microondas y rotor utilizados.

3.2.4. REACTIVOS

Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada (18 MΩ cm) purificada con un sistema Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA). Todo el material de vidrio se lavó con disolución al 10% v/v de ácido nítrico y se aclaró con agua desionizada antes de su uso. Las disoluciones estándar de 1000 µg mL^{-1} se prepararon disolviendo los estándares de As(III), $NaAsO_2$, y As(V), Na_2HAsO_4, (Fluka, Buchs, Switzerland) en agua y se almacenaron en botellas de PTFE a 4°C. Las disoluciones estándar de 1000 µg mL^{-1} en arsénico de ácido cacodílico [$(CH_3)_2As(O)OH$, DMA, Sigma, St. Louis, MO, USA] y metilarsinato sódico [$CH_3AsO(ONa)_2 \cdot 6H_2O$, MA, Carlo Erba, Milan, Italia] se prepararon en agua y se mantuvieron a 4 °C en botellas de PTFE. Las disoluciones de trabajo, más diluidas, se prepararon diariamente. La disolución estándar de arsenobetaína se obtuvo a partir del material de referencia BCR CRM 626 suministrado por el Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) con un contenido certificado de arsenobetaína de 1031 ± 6 µg.g^{-1} (433 ± 3 µg.g^{-1} de arsénico). Como modificadores químicos se utilizó nitrato de paladio y nitrato de cerio (IV) ambos de Fluka. La disolución al 0.7% (m/v) de borohidru-

ro sódico se preparó diariamente disolviendo el producto (Aldrich) en disolución de hidróxido sódico 75 mM. La disolución reductora se preparó disolviendo ioduro potásico (Fluka) al 1% (m/v) y ácido ascórbico (Fluka) al 0.2% (m/v) en disolución 3.5 mol L^{-1} de ácido clorhídrico (Fluka). Los hidruros volátiles formados fueron conducidos con argón hasta la llama del espectrómetro de fluorescencia atómica. Air Liquide (Madrid, España) suministró todos los gases empleados.

En la determinación directa de arsénico total en las muestras más concentradas en arsénico mediante dilución de las muestras con hexano se utilizó el método de adiciones estándar. En este caso se empleó como modificador bis(benzonitrilo) dicloro paladio (II) (0.3604 g) que se disolvió en 5 mL de acetona y se llevó a 10 mL con isopropanol para disponer de una concentración de Pd(II) de 1000 µg mL^{-1}. Los estándares de arsénico se prepararon a partir del estándar acuoso de 1 g L^{-1} por dilución en isopropanol. La cuantificación se realizó por el procedimiento de adiciones estándar.

3.2.5. MUESTRAS Y MATERIAL DE REFERENCIA

Se han utilizado muestras de aceite comestible, complementos nutricionales en perlas, aceites comercializados por fabricantes de productos de laboratorio y aceites de conservas de pescado.

Los aceites comestibles se adquirieron en supermercados locales y corresponden, según su etiqueta, a aceites de: oliva, oliva virgen extra, girasol, maíz, soja, semillas, aguacate, nuez, macadamia y orujo de oliva.

Los aceites de laboratorio fueron todos de la marca SIGMA y correspondieron a aceite de lacha tirana (*brevoortia tyrannus o* menhaden), de hígado de pez *gadus morrhua*, de sésamo (*sesamum indicum*), de cacahuete y maíz. Sus referencias comerciales son F8020, 74380, 85067, P2144 y C8267, respectivamente.

Los complementos nutricionales se adquirieron en supermercados y parafarmacias locales y se correspondieron con aceites de: onagra, germen de trigo, pescado (dos fabricantes distintos), salmón e hígado de bacalao (dos fabricantes distintos).

Las conservas de pescado (caballa, sardina y atún) en aceite vegetal y de oliva se compraron en supermercados locales. Se utilizó el aceite sobrenadante en la conserva.

El método se validó utilizando los materiales de referencia certificados, NIST-SRM 1568a (harina de arroz) y 1566a (tejido de ostra) del National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA y DORM-2 (tejido muscular de pescado) y DOLT-2 (tejido muscular e hígado de pescado) del National Research Council of Canada. Estos materiales solamente están certificados para el contenido total de arsénico, aunque se han hecho numerosos estudios que confirman los contenidos de las diferentes especies de arsénico.



Figura 3.8: Algunas de las muestras analizadas

3.2.6. DIGESTIÓN DE LAS MUESTRAS DE ACEITE EN MICROONDAS

Para determinar el contenido total en arsénico en las muestras de aceite se procedió a la mineralización de las muestras empleando un digestor de microondas. Para ello en cada vaso del digestor se colocan 0.25 g de aceite, 5 mL de HNO_3, 3 mL de H_2O_2 y 1 mL de HCl. Los vasos se dispusieron en un rotor de alta presión y se sometieron al programa de calentamiento que aparece en la Tabla 3.4. Las muestras digeridas se llevaron con HCl 3.5 mol L^{-1} a 25 mL. Estas disoluciones se sometieron al procedimiento de determinación de arsénico por formación de arsina que se detalla seguidamente.

Tabla 3.4: Programa de calentamiento en el microondas para la digestión de las muestras de aceite

Etapa	Potencia, W	Tiempo de rampa, min	Tiempo de mantenido, min	Ventilación
1	600	5	2	1
2	900	5	2	1
3	1400	15	20	1
4	0	0	15	3

Limitaciones: P_{max}=55 bar; T_{max}=160 °C; $(\Delta P/\Delta t)_{max}$=0.3 bar s^{-1}.

3.2.7. ARSÉNICO TOTAL MEDIANTE HG-AFS

A 10 mL de la disolución resultante del proceso de digestión se añaden 1 mL de disolución reductora conteniendo ioduro potásico al 50 % (m/v) y ácido ascórbico al 10 % (m/v). Se deja reposar durante 30 min para permitir la completa reducción a As(III). El contenido total en arsénico se determina por HG-AFS utilizando las condiciones experimentales que aparecen en la Tabla 3.5. La recta de calibrado resultó lineal entre 0.1 y 2 µg L^{-1} de arsénico. Teniendo en cuenta la cantidad de muestra tomada y los efectos de dilución del procedimiento, el límite de detección (criterio de tres veces la desviación estándar del ensayo en blanco) resultó ser de 3 ng g^{-1} de arsénico total en la muestra original.

Tabla 3.5: Condiciones experimentales propuestas para la determinación de arsénico por HG-AFS	
Parámetro	Valor
Longitud de onda, nm	197.3
Corriente primaria, mA	27.5
Corriente de refuerzo, mA	35
Tiempo de retraso, s	10
Tiempo de análisis, s	30
Tiempo de memoria, s	30
[HCl], mol L^{-1}	3.5
[$NaBH_4$], % (m/v)	0.7
Caudal de argón, mL min^{-1}	330
Caudal de aire, mL min^{-1}	2.5
Caudal de portador, mL min^{-1}	9
Caudal de $NaBH_4$, mL min^{-1}	4.5

3.2.8. ARSÉNICO TOTAL MEDIANTE ETAAS

Alternativamente al empleo de HG-AFS y con un LOD ligeramente más alto se ha empleado ETAAS para determinar el contenido total de arsénico en las muestras de aceite. Se ha utilizado un procedimiento propuesto previamente [56] que se basa en la disolución de 3 g de aceite en hexano llevando a un volumen final de 10 mL. La cuantificación se realizó por adiciones estándar de arsénico a esta disolución. Para ello se preparó, a partir del estandar de DMA de 1000 mg L^{-1} en agua, una disolución de 1000 µg L^{-1} del estándar de DMA en isopropanol. Disoluciones en isopropanol obtenidas a partir de ésta se utilizaron para las adiciones estándar. Como modificador se utilizó una disolución de nitrato de paladio (II) de 2000 µg mL^{-1} en paladio. El programa de calentamiento propuesto para la determinación directa de arsénico aparece en la Tabla 3.6. El resto de las condiciones experimentales es similar al que aparece en la Tabla 3.3. En todos los casos se inyectaron 30 µL de muestra y 10 µL de modificador. Se realizaron adiciones estándar de 10, 20 y 40 µg L^{-1}. El límite de detección calculado en base a tres veces la desviación estándar del ensayo en blanco resultó ser de 10 ng g^{-1}.

Tabla 3.6: Programa propuesto para la introducción directa de las muestras de aceite disueltas en hexano en el atomizador de ETAAS			
Etapa	Temperatura, °C	Rampa, °C/s	Mantenido, s
1: Secado	80	10	20
2: Secado	130	10	20
3: Calcinación	500	50	30
4: Calcinación	800	10	30
5: Atomización[a,b]	2300	0	4
6: Limpieza	2600	0	3
[a] El flujo de argón interno se paró; [b] Etapa de lectura			

3.2.9. PROCEDIMIENTO PROPUESTO POR DLLME ASISTIDA CON ULTRASONIDOS

Se colocan 10 g de aceite en un tubo de centrífuga de fondo cónico y se precalienta a 80 °C. A continuación se añaden 300 µL de una disolución que contiene 78 % en isopropanol y 0.7 % de HNO_3 concentrado. La dispersión es completa tras una breve agitación manual. Se introduce en el baño de ultrasonidos a 80 °C durante 3 minutos. La dispersión se centrifuga a 4000 rpm durante 15 min. La fase acuosa separada queda en el fondo del tubo. De esta disolución se toman 30 µL que se llevan al atomizador aplicando el programa de calentamiento que aparece en la Tabla 3.3.

La calibración se realizó a partir de muestras de aceite con contenido por debajo del LOD que se adulteraron con cantidades conocidas de disolución estándar de DMA en isopropanol. La recta de calibrado resultó lineal entre 0.1 y 1.5 µg L^{-1} de arsénico en el aceite.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se comentan los distintos parámetros que afectan a la extracción de las formas de arsénico desde los aceites comerciales a una fase acuosa mediante el empleo de la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva con ayuda de ultrasonidos. Con el fin de conseguir la máxima eficiencia en la extracción se estudia el efecto de la naturaleza y volumen del dispersante, volumen y composición del extractante, tiempo de aplicación de ultrasonidos, efecto de la temperatura, etc. a la par que se optimizan las condiciones experimentales para conseguir la máxima sensibilidad con ETAAS. Finalmente, se propone un procedimiento sencillo, de "*screening*", para distinguir entre el arsénico "tóxico" (As(III), As(V), MA y DMA) y el arsénico "no tóxico" (arsenobetaína y otros compuestos organoarsenicales más complejos) extraídos del aceite.

3.3.1. SELECCIÓN DEL MEDIO EXTRACTANTE

Para optimizar la composición del extractante se preparó un aceite mezcla de aceite de hígado de pez *gadus morrhua* y aceite de sésamo en la proporción 1:9 con el fin de utilizar una muestra genérica que combinara los componentes de los aceites de procedencia animal y vegetal. Nótese que en los aceites de procedencia animal (principalmente pescado) el contenido mayoritario será arsenobetaína y arsenolípidos, como ya hemos comentado. Del mismo modo, en el caso de aceites vegetales la especie mayoritaria de arsénico es DMA.

En principio se consideraron tres medios acuosos de distinto pH. En este sentido se estudió la señal de arsénico total extraído en las fases acuosas de disoluciones con pH ajustado a 6 con reguladora acetato-acético, disoluciones ácidas de distinta concentración de ácido nítrico y disoluciones alcalinas con distintas concentraciones de TMAH. Los mejores resultados (señal más alta) se obtuvieron trabajando con disoluciones acuosas en medio ácido. La Figura 3.9 muestra la evolución de la señal medida para arsénico en el extracto acuoso con la concentración de ácido nítrico en fase acuosa. Las condiciones experimentales corresponden a las que se detallan en el procedimiento recomendado.

Como puede verse a partir del 2% v/v de HNO_3 en la fase acuosa se consigue una extracción máxima y constante. Se ha tomado como valor óptimo el 3 % en HNO_3 ya que concentraciones superiores deterioran prematuramente el recubrimiento pirolítico del atomizador de grafito.

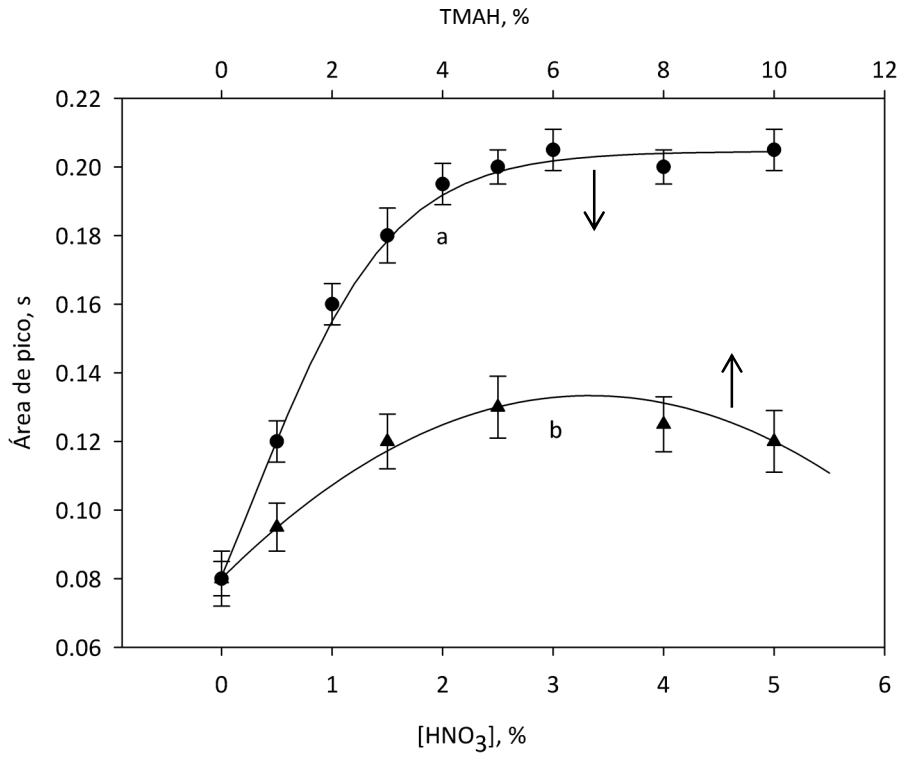


Figura 3.9: Efecto de la concentración de ácido nítrico (curva a) e hidróxido de tetrametil amonio (curva b) en la señal de arsénico obtenida en la inyección de 30 µL de extracto acuoso obtenido para 10 mL de un aceite mixto (véase el texto para detalles) en el atomizador utilizando las condiciones recomendadas en la Parte Experimental.

Para comprobar este comportamiento se adulteró un aceite vegetal (maíz) de contenido total muy bajo (< LOD) con cantidades conocidas de As(III), As(V), MA, DMA y AB. Para ello se añadieron microvolúmenes de disoluciones estándar de estos analitos preparadas en isopropanol a partir de las correspondientes disoluciones estándar preparadas en agua. Utilizando un medio al 3 % v/v en ácido nítrico se consiguieron porcentajes de extracción a la fase acuosa del 93, 95, 97, 96 y 98 % para As(III), As(V), MA, DMA y AB, respectivamente. El porcentaje de extracción se calculó a partir de la señal para arsénico

medida en el aceite antes y después de la extracción aplicando el procedimiento propuesto en 3.2.9.

El volumen de la fase aceptora (disolución acuosa) juega un importante papel ya que el factor de preconcentración depende, entre otros efectos, de la relación de fase dadora (aceite) a fase aceptora. Obviamente, la señal medida disminuye a medida que aumenta el volumen de fase acuosa ya que se pierde efecto de preconcentración. Sin embargo, la recuperación de la fase acuosa cuando su volumen inicial es menor de 50 µL supone una gran dificultad. Por tanto se propone el empleo de 70 µL de fase acuosa, lo que permite además la cuantificación por duplicado ya que el volumen de inyección es de 30 µL.

3.3.2. SELECCIÓN DEL DISPERSANTE

Como se comentó en el capítulo 1 la microextracción dispersiva líquido-líquido utiliza un agente miscible en ambas fases para provocar la rápida dispersión del disolvente orgánico inmiscible con el agua en las disoluciones acuosas. De esta forma se generan gotas de muy pequeño tamaño y la transferencia de fases es muy rápida, prácticamente instantánea. Cuando se intenta aplicar esta metodología a la dispersión de una fase acuosa en un gran volumen de disolvente orgánico, y en especial en un aceite, aparecen nuevos problemas. En efecto, la elevada viscosidad del aceite impide la rápida formación de la dispersión y ha de recurrirse a la agitación mecánica o, como veremos más adelante, el empleo de ultrasonidos. Además el empleo de disolventes orgánicos polares favorece la extracción de compuestos organoarsenicales polares.

En nuestro caso hemos estudiado la eficacia como dispersante y solubilizante de acetonitrilo, acetona, metanol, etanol e isopropanol. Para ello se prepararon mezclas de 300 µL de disolución acuosa de HNO_3 al 3 % v/v con distintos volúmenes de dispersante. De la mezcla resultante se añadieron distintos volúmenes a 10 mL del aceite mixto comentado antes de forma que el volumen de fase acuosa se mantuvo constante. La Figura 3.10 muestra los resultados obtenidos para la determinación de arsénico en el extracto acuoso con distintas cantidades de dispersante. Aquí solamente se han representado

los resultados obtenidos para isopropanol, etanol y metanol (curvas a-c, respectivamente) pues son los que condujeron a las mayores señales de arsénico en el extracto acuoso sin comprometer la separación de fases. Para volúmenes de dispersante en la mezcla con la fase acuosa mayores de 1500 µL la dispersión formada (emulsión), no puede separase por centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos, por lo que no se han considerado. Como puede apreciarse los mejores resultados se obtienen para el 78% de isopropanol en la mezcla extractante (300 µL de HNO_3 al 3% +1000 µL de isopropanol). La adición de 300 µL de esta mezcla al aceite mixto condujo, tras centrifugar la dispersión, a un volumen de fase acuosa aproximado de 67 µL, lo que permitió la inyección por duplicado de dos alícuotas de 30 µL de extracto acuoso en el atomizador.

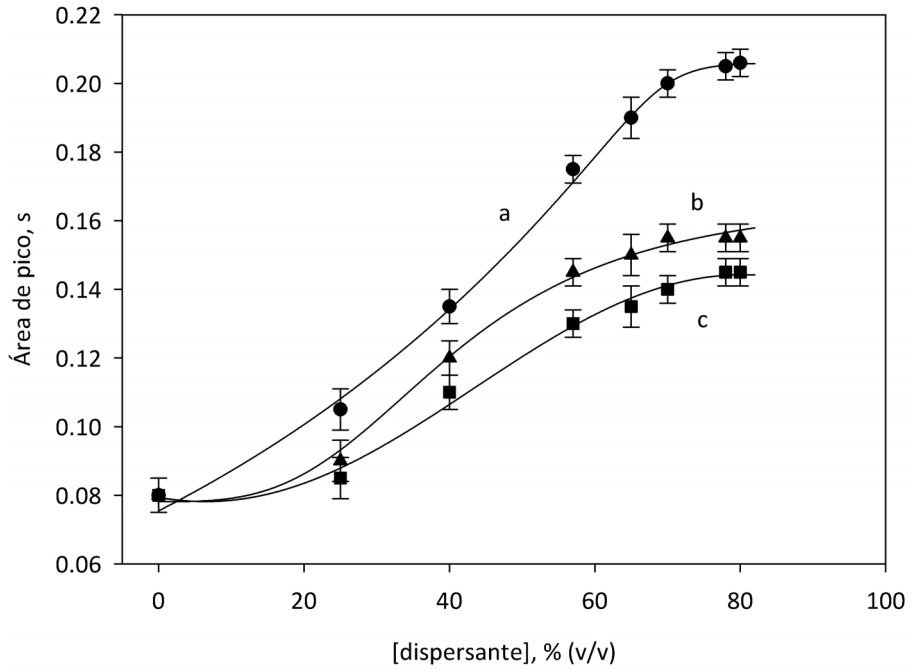


Figura 3.10: Efecto de la concentración de dispersante en la señal de arsénico en el extracto acuoso. En todos los casos se añadieron 300 µL de dispersante con fase acuosa a 10 mL de aceite mixto. La gráfica muestra los resultados obtenidos al variar el contenido en isopropanol, etanol y metanol (curvas a-c, respectivamente) utilizando las condiciones recomendadas en la Parte Experimental.

3.3.3. EFECTO DE LOS ULTRASONIDOS Y LA TEMPERATURA

La emulsificación asistida por ultrasonidos se aplicó por primera vez en 1927 [67]. El mecanismo de actuación más ampliamente aceptado atribuye su efecto al proceso de cavitación. En efecto, las ondas sónicas provocan la formación de burbujas de aire llenas de vapor de agua que al implosionar provocan importantes alteraciones en el líquido que las rodea generando corrientes de fluido a alta velocidad que colisionan con las gotículas de fase dispersa provocando su ruptura en otras más pequeñas [68].

Esta implosión, consecuencia de la cavitación, produce una compresión adiabática rápida de los gases y vapores dentro de las burbujas de las cavidades generadas por los ultrasonidos al propagarse por el disolvente apareciendo elevadas presiones y temperaturas muy localizadas. El incremento de la temperatura favorece la solubilidad de los analitos en el medio extractante facilitando la transferencia entre fases. Por otro lado el incremento de la presión provoca la penetración del extractante en la matriz de la muestra acelerando la transferencia de analitos en la interfase [69]. Aplicando esta metodología se puede conseguir la extracción tanto de compuesto polares como apolares desde su matriz [70] acortando muy notablemente el tiempo de extracción.

En este estudio se compararon en primer lugar los resultados que se obtienen cuando se emplea energía ultrasónica bien sea con sonda o con baño. Las experiencias con sonda de ultrasonidos se realizaron con el equipo que se detalla en el capítulo 2, utilizando una sonda de titanio de 7 mm de diámetro, un ciclo de irradiación de 0.5 s s^{-1} y una amplitud de salida del 20 % de la potencia aplicada (200 W). Como equipo de baño se utilizó el que se detalla en la Parte experimental, que posee una potencia de 50 W a 40 kHz concentrada en un calderín de 0.7 L. No se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos dispositivos. Esta circunstancia y el hecho de que el control de la temperatura sea mucho más cómodo con el empleo del baño nos lleva a proponer este último dispositivo como más adecuado en este caso.

Las primeras experiencias realizadas sobre aceite mixto utilizando la mezcla dispersante:extractante ya comentada mostraron un importante aumento de la señal de arsénico en el extracto acuoso al aumentar el tiempo de exposición a los ultrasonidos entre

1 y 15 minutos. En un intento de acortar este tiempo se estudió el efecto conjunto de la temperatura. La Figura 3.11 muestra los resultados obtenidos a distintos tiempos de aplicación de ultrasonidos al variar la temperatura del baño de ultrasonidos desde 25 hasta 80 °C. Nótese como la señal de arsénico se hace máxima y constante tanto más rápidamente cuanto mayor es la temperatura de trabajo. No se consideraron temperaturas superiores para evitar la desnaturalización de las formas de arsénico. Se propone el empleo de 80 °C como temperatura del proceso de extracción. Para ello se recomienda precalentar la muestra de aceite a esta temperatura y añadir la mezcla dispersante:extractante, sometiendo la dispersión a 3 min de ultrasonidos. Acabado este tiempo la dispersión se separa fácilmente por centrifugación a 4000 rpm (2100 g) durante 15 minutos.

3.3.4. OPTIMIZACIÓN DEL PROGRAMA DE CALENTAMIENTO

Se han optimizado los programas de calentamiento tanto para los extractos acuosos

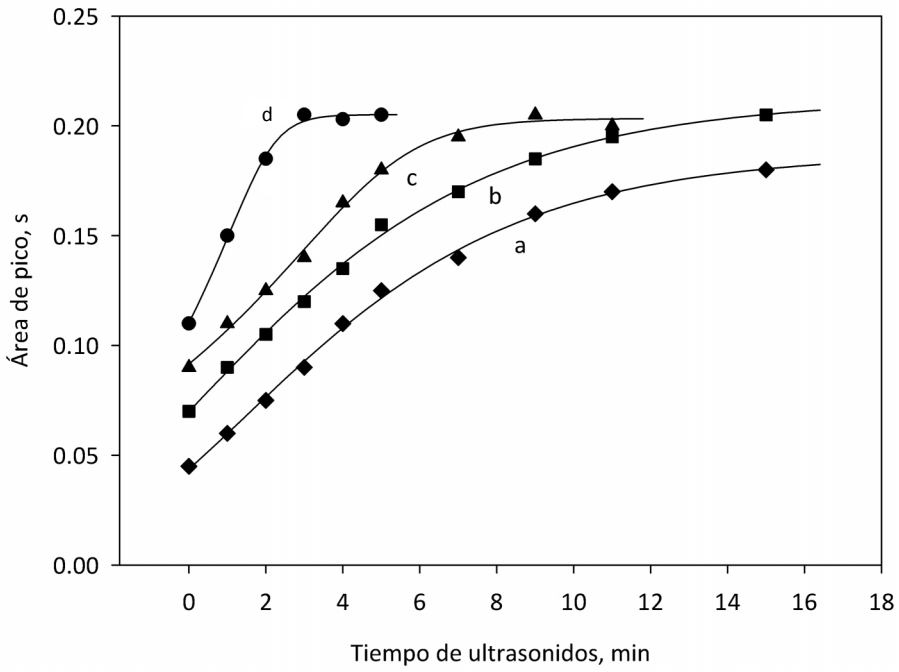


Figura 3.11: Efecto del tiempo de aplicación de ultrasonidos a 25, 40, 60 y 80 °C (curvas a-d, respectivamente) en la señal de arsénico en el extracto acuoso. En todos los casos se añadieron 300 µL de dispersante con fase acuosa a 10 mL de aceite mixto. El resto de las condiciones experimentales como se detalla en la Parte Experimental.

resultantes del proceso DLLME como para la introducción directa de las muestras de aceite diluidas en hexano en el atomizador. Respecto del primer caso, como ya hemos comentado en el capítulo 2 de esta Memoria, el uso de Pd(II) como modificador químico estabiliza eficazmente al arsénico permitiendo el empleo de temperaturas de calcinación elevadas. Además, en medio ácido la sensibilidad de la determinación es independiente de la forma química de arsénico (As(III), As(V), MA, DMA o AB). La Figura 3.12 muestra los resultados obtenidos al estudiar el efecto de las temperaturas de calcinación y atomización de arsénico proveniente de extractos acuosos de aceite mixto en las condiciones detalladas en la Parte experimental. Nótese como la señal es constante hasta 800 °C y la señal de atomización es máxima a 2300 °C. En estas condiciones la señal está bien definida con un perfil alto que permite la determinación de arsénico con buena sensibilidad (Figura 3.13). La optimización de las temperaturas de secado y rampas de calentamiento nos permite proponer el programa que aparece en la Tabla 3.3. El proceso de secado en dos etapas se realiza con el fin de evaporar la fracción de isopropanol solubilizada en la fase acuosa. El calcinado en dos etapas se realiza con el fin de evaporar restos de aceite que ocasionalmente pudieran arrastrarse con la fase acuosa.

La inyección del extracto acuoso en el atomizador (30 µL) no es posible realizarla de forma simultánea con el modificador químico (20 µL) ya que juntos superan la capacidad de la plataforma de L'Vov. Por ello es preciso realizar la inyección por separado mediante el secado previo de la primera. En este sentido se comprobó que la inyección previa del modificador resulta menos eficaz. En efecto, cuando se inyecta previamente el modificador químico y se seca para, a continuación inyectar la muestra, la señal del analito decae aproximadamente el 12 %. Es por esto que en el programa de la Tabla 3.3 se recomienda la introducción de la muestra, ejecutar las etapas 1 y 2 para secarla y seguidamente inyectar el modificador.

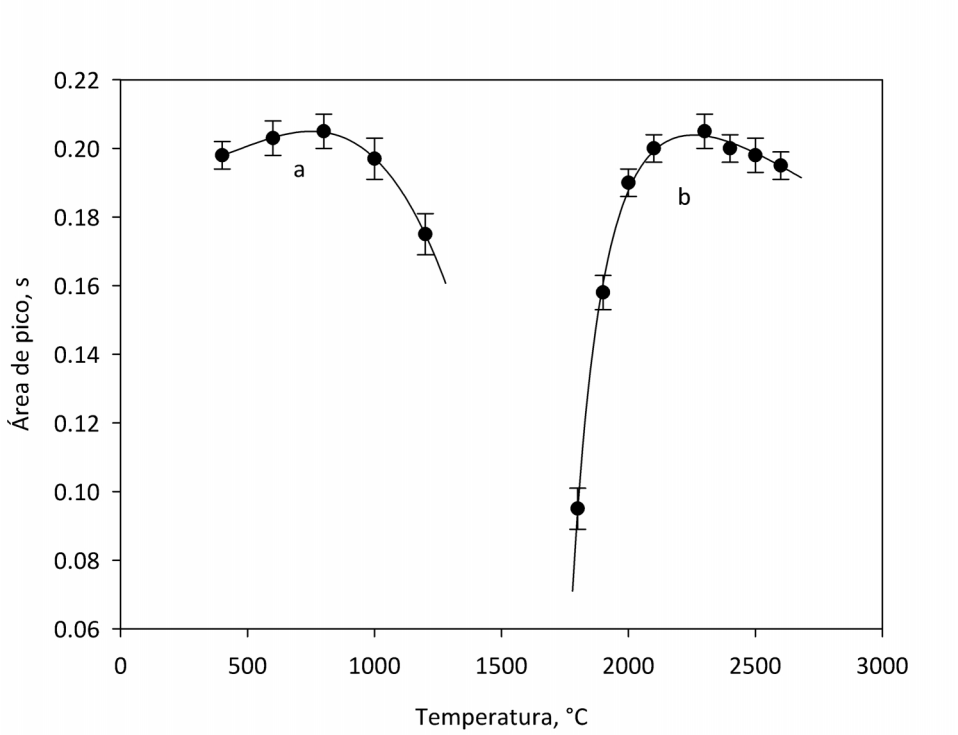


Figura 3.12: Efecto de las temperaturas de calcinación (curvas a) y atomización (curva b) en la señal de arsénico en el extracto acuoso. En todos los casos se añadieron 300 µL de dispersante con fase acuosa a 10 mL de aceite mixto. El resto de las condiciones experimentales como se detalla en la Parte Experimental.

El contenido total de arsénico en algunas muestras de aceite se pudo cuantificar de forma directa como se detalla en 3.2.8 previa dilución de la muestra en hexano. Para ello es preciso que la muestra contenga al menos 20 ng g^{-1} de arsénico total. En este caso, el programa de calentamiento ha de estar adaptado al tipo de muestra que se introduce en el atomizador. La Tabla 3.6 muestra los valores recomendados para el programa de calentamiento. Se recomienda el empleo de una etapa de secado doble con una primera parte donde se calienta a 80 °C para conseguir la evaporación del hexano (punto de ebullición: 69 °C) y continua con una etapa de secado a 130 °C con rampa lenta para evaporar el isopropanol de las adiciones estándar y del modificador químico. La etapa de calcinación previa a 500 °C con una rampa muy lenta se ha insertado para conseguir la vaporización del aceite sin que se produzca chisporroteo. La calcinación de la muestra se produce a 800 °C atomizando a 2300 °C. En estas condiciones la absorción de fondo es baja y no supone ningún problema para la cuantificación.

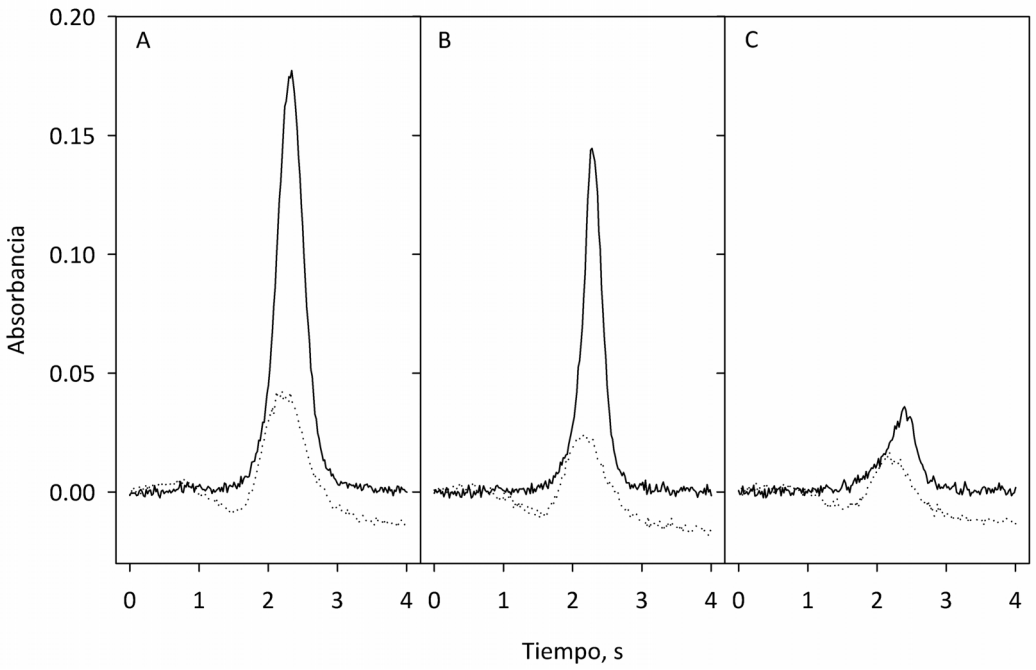


Figura 3.13: Señales obtenidas en la inyección de 30 µL de extracto acuoso resultante de la microextracción de aceite mixto, aceite de hígado de bacalao en píldoras dietéticas y aceite de semillas (A-C, respectivamente). La línea continua corresponde a la señal atómica y la discontinua a la absorción de fondo. Las condiciones experimentales se detallan en la Parte Experimental.

En este caso la inyección conjunta de muestra y modificador de nitrato de paladio acuoso no resulta posible ya que son inmiscibles. Por tanto se consideraron dos procedimientos para la introducción de la muestra. Por una parte se evaluó la posibilidad de introducir primero el modificador acuoso, secar con aplicación de las etapas 1 y 2 y finalmente introducir la muestra aplicando el programa de calentamiento completo. Alternativamente, se puede utilizar un compuesto orgánico de paladio como modificador (diclorobis(benzonitrilo) de paladio (II)) tal y como ya ha sido propuesto [56]. En este caso, al ser soluble la disolución en el aceite, se pueden inyectar de forma conjunta sin separación por etapas de secado. La Figura 3.14 muestra la no existencia de diferencias significativas en las pendientes de calibrado obtenidas por cada procedimiento (curvas a y b), por lo que optamos por el empleo del modificador químico de paladio orgánico ya que así se reduce el tiempo del programa de calentamiento. En este caso también es posible realizar la inyección de 30 µL de muestra con tan solo 10 µL de paladio orgánico, ya que como hemos comprobado los resultados son adecuados. La Figura 3.14 muestra

también la gráfica de calibrado que se obtiene para el estándar de arsénico en medio acuoso. Como puede verse la sensibilidad del detector es mayor en estas condiciones que en presencia de la matriz orgánica del aceite, lo que no permite la calibración frente a patrones acuosos. Este importante efecto matriz obliga a cuantificar por adiciones estándar.

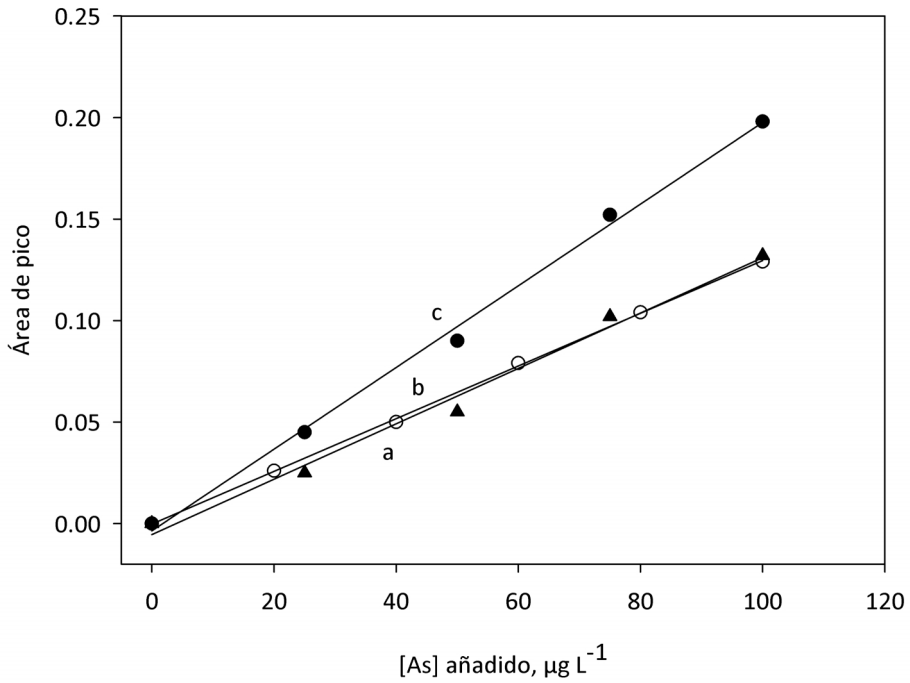


Figura 3.14: Gráficas de calibrado obtenidas de la adición de arsénico como DMA a un aceite (20 µL) con contenido total por debajo del LOD utilizando distintos modificadores. Las curvas a y c corresponden al empleo de nitrato de paladio acuoso. La curva b corresponde al empleo de un compuesto orgánico de paladio. La curva c se ha realizado sobre disoluciones acuosas (20 µL).

3.3.5. CALIBRACIÓN

En el caso de la determinación del contenido de arsénico en los extractos obtenidos en el proceso de microextracción, la calibración se realiza utilizando como estándares disoluciones en isopropanol de DMA de distinta concentración, que preparadas como se detalla en la Parte Experimental, se añaden en forma de microvolúmenes a un aceite

con contenido inferior al LOD del procedimiento. La gráfica de calibrado realizada en estas condiciones resultó lineal entre 0.1 y 1.5 µg L^{-1} de arsénico. La ecuación de regresión de este comportamiento lineal resultó ser: área de pico = 0.005 + 0.332·$[As]_{aceite}$ s^{-1} μg^{-1} L. El límite de detección calculado como la concentración de arsénico equivalente a tres veces la desviación estándar del ensayo en blanco resulto ser 0.05 ng g^{-1} de arsénico en el aceite. La desviación estándar relativa de las medidas de arsénico tras aplicar el procedimiento propuesto a los niveles de 0.3, 0.5 y 1.0 µg L^{-1} resultaron ser 4.8, 3.9 y 3.2 %, respectivamente.

En el siguiente apartado se presentan los resultados obtenidos en el cálculo del porcentaje de extracción de las formas químicas estudiadas. Como se comenta la extracción de todas ellas es cuantitativa. Además, como se demostró en el capítulo 2, en presencia de paladio la señal en el atomizador es independiente de la forma química de arsénico. Por tanto el cálculo del factor de preconcentración puede hacerse a partir del cociente entre la pendiente de calibración del procedimiento propuesto con DLLME (0.332 ± 0.003 s^{-1} μg^{-1} L) y la pendiente de la recta de calibrado en medio acuoso al 3 % en HNO_3 (0.00320 ± 0.00005 s^{-1} μg^{-1} L). El resultado obtenido para este cociente fue de 103 ± 4. Como consecuencia de este buen factor de preconcentración, el límite de detección para el procedimiento propuesto resulta más bajo que otros basados en el empleo de ICP-MS que lo sitúan en 7 [53] o 0.5 [50] ng g^{-1}.

Nótese que este factor de preconcentración resulta menor que el valor teórico. En efecto teniendo en cuenta el procedimiento propuesto, el volumen de agua añadido es de 69 µL, por tanto este es el volumen máximo que se debería recoger tras el proceso DLLME. Sin embargo, el volumen que se obtiene es mayor consecuencia de la parcial solubilización del isopropanol en la fase acuosa. Experimentalmente se recogen aproximadamente 76 µL tras la centrifugación, aunque el volumen debe ser mayor ya que la fase orgánica no queda transparente.

3.3.6. CAPACIDAD DE EXTRACCIÓN DEL PROCEDIMIENTO PROPUESTO

Se ha evaluado la eficiencia de extracción de las formas de arsénico As(III), As(VI), MA, DMA y AB en muestras de aceite comestible. Como se verá más adelante el contenido en arsénico total de las muestras medidas es, en general muy bajo. Por tanto se ha aplicado el procedimiento propuesto a las muestras de aceite adulteradas con distintas cantidades de arsénico en sus distintas formas. La Tabla 3.7 muestra los resultados obtenidos para distintas muestras.

Tabla 3.7: Recuperación de formas de arsénico en muestras de aceite comestible utilizando el procedimiento de preconcentración propuesto

	Recuperación[a] de 0.5 µg L^{-1} de arsénico añadido como				
Muestra de aceite	*As(III)*	*As(V)*	*MA*	*DMA*	*AB*
Oliva[b]	94± 3	100 ± 3	98 ± 3	102 ± 2	105 ± 3
Oliva virgen extra[b]	99 ± 4	101 ± 2	97 ± 3	93 ± 5	103 ± 4
Girasol[b]	99 ± 3	95 ± 3	101 ± 2	92 ± 4	99 ± 3
Maíz[b]	93 ± 5	97 ± 5	100 ± 3	100 ± 3	102 ± 2
Soja[b]	94 ± 4	98 ± 5	106 ± 4	102 ± 2	102 ± 3
Semillas[b]	103 ± 3	99 ± 3	100 ± 3	98 ± 5	97 ± 4
Aguacate[b]	95 ± 4	95 ± 2	101 ± 2	99 ± 3	94 ± 3
Nuez[b]	105 ± 4	99 ± 3	98 ± 5	98 ± 2	95 ± 4
Macadamia[b]	91 ± 3	100 ± 4	100 ± 3	98 ± 3	105 ± 3
Orujo de oliva[b]	104 ± 3	97 ± 4	95 ± 4	102 ± 5	100 ± 2
Pescado[c]	97 ± 4	99 ± 3	103 ± 3	102 ± 3	104 ± 3
Sésamo[c]	98 ± 3	99 ± 2	100 ± 4	105 ± 2	101 ± 3
Cacahuete[c]	100 ± 5	98 ± 4	103 ± 3	101 ± 3	93 ± 2
Maíz[c]	98 ± 4	98 ± 4	104 ± 2	101 ± 3	103 ± 3
Onagra[d]	102 ± 3	95 ± 3	98 ± 5	98 ± 4	99 ± 3
Germen de trigo[d]	99 ± 4	101 ± 4	97 ± 3	98 ± 5	99 ± 3
Pescado-a[d]	104 ± 3	100 ± 3	93 ± 4	102 ± 3	101 ± 4
Pescado-b[d]	98 ± 5	97 ± 2	96 ± 3	101 ± 2	94 ± 3
Salmón[d]	99 ± 4	97 ± 5	99 ± 2	98 ± 3	95 ± 2
Hígado de bacalao[d]	98 ± 3	98 ± 3	95 ± 3	97 ± 5	103 ± 3

[a] valor medio ± desviación estándar (n=3); [b] aceite comestible comercial; [c] producto de laboratorio (Sigma o Fluka); [d] complemento nutricional comercializado en forma de perlas

Estos valores de recuperación se han calculado comparando la señal neta obtenida para cada muestra antes y después de la adición con la que resulta de añadir esta misma cantidad de arsénico a un aceite de avena de aplicación cosmética exento de arsénico. Nótese como la presencia de las distintas matrices no afecta a la completa extracción de estas "especies solubles en agua" de arsénico ya que el valor medio de estas recuperaciones estuvo en el 99 ± 3 %.

Algunas muestras analizadas tienen contenidos más altos en arsénico, lo que permite la determinación sin realizar adiciones. Se trata de muestras de aceite de pescado de Sigma (aceite de hígado de bacalao) y de los aceites de oliva y/o girasol sobrenadantes de las conservas en lata de atún, sardina, caballa y anchoa. En estos casos la señal que se obtiene en el extracto acuoso al aplicar el procedimiento propuesto es muy elevada y se han de realizar diluciones entre 1:10 y 1:100 para conseguir una señal dentro del intervalo lineal. Para estas muestras se ha realizado una segunda extracción al aceite restante de la primera. Para ello el aceite se pasa a través de un filtro de membrana hidrofílica de 0.45 µm (de fluoruro de polivinilideno, PVDF, con prefiltro de fibra de vidrio) que permite su clarificación retirándole la fase acuosa emulsionada que no se ha separado por centrifugación. El aceite clarificado resultante se vuelve a someter al tratamiento propuesto. Los contenidos en arsénico de los extractos acuosos resultantes de la primera y segunda extracción se miden por ETAAS. Los valores de señal obtenidos para la segunda extracción son próximos al ensayo en blanco, lo que indica que las especies de arsénico "extraíbles" lo hicieron en su totalidad durante la primera extracción. Estas experiencias también se repitieron para aquellos otros aceites de bajo contenido en arsénico y que habían sido adulterados con las formas químicas de arsénico estudiadas en esta Memoria. De nuevo, las señales de arsénico obtenidas en la segunda extracción son próximas al ensayo en blanco. Esto corrobora la afirmación anterior, es decir, estas especies solubles se extraen totalmente con el procedimiento recomendado.

3.3.7. DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN MUESTRAS DE ACEITE

Como ya se ha comentado antes, únicamente las muestras de aceite sobrenadante en el interior de latas de conserva de pescado (atún, sardina, caballa y anchoa) y una muestra de aceite de hígado de pescado (Sigma) contienen niveles adecuados para ser medidos directamente por ETAAS. Se estudiaron conservas de pescado en aceite de oliva y de girasol. El contenido total de arsénico se ha medido aplicando el procedimiento ETAAS directo propuesto en 3.2.8. Estos valores se han comprobado con los que se obtiene tras la mineralización de la muestra y la determinación del contenido total de arsénico como As(III) con HG-AFS (apartado 3.2.7). Adicionalmente se ha aplicado el pro-

cedimiento propuesto (apartado 3.2.9) con preconcentración mediante DLLME de las muestras sin pretratamiento. Resultó preciso diluir el extracto acuoso entre 10 y 100 veces, según la muestra, con el fin de que la señal quedara dentro de la zona lineal. La Tabla 3.8 muestra los resultados obtenidos. Nótese la excelente concordancia que se aprecia entre los dos primeros procedimientos que miden el contenido total de arsénico en las muestras. Además, como puede apreciarse no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos para los aceites de conserva de pescado de oliva o de girasol. Esto parece indicar que el arsénico que contienen estos aceites es debido fundamentalmente a la migración de compuestos arsenicales desde el pescado ya que, como veremos después los contenidos en aceites vegetales nunca son tan elevados.

Al comparar los resultados de los dos procedimientos que miden arsénico total con los obtenidos por el procedimiento de extracción propuesto se observa que en este último caso se obtienen valores francamente menores. Esto es consecuencia de que con la aplicación del procedimiento DLLME propuesto únicamente pasan a la fase acuosa las especies solubles de arsénico y aquellos arsenolípidos que pudieran haberse fraccionado durante el tratamiento térmico con ultrasonidos generando formas solubles de arsénico.

Para corroborar esta circunstancia se midió el contenido total de arsénico en el volumen de aceite después del proceso de microextracción por aplicación del procedimiento detallado en el apartado 3.2.8. Para llevar a cabo esta determinación es preciso retirar fase acuosa emulsionada que no se ha podido separar por centrifugación. Esto puede conseguirse con el empleo de los filtros de membrana comentados en 3.3.6. La Tabla 3.8 muestra los contenidos en arsénico total de estas muestras antes y después del proceso de microextracción. Los resultados obtenidos revelan que aproximadamente entre el 30 y 40 % del total de arsénico en las muestras pasa a la fase acuosa como consecuencia de la aplicación del procedimiento propuesto. A este arsénico lo podemos llamar “soluble” y cómo podemos ver en la Tabla 3.8, donde se ha calculado por diferencia entre los resultados antes y después de la extracción, coincide significativamente con el encontrado en el proceso de microextracción propuesto.

El resto de las muestras estudiadas presentaron contenidos que no pudieron determinarse de forma directa ni mediante HG-AFS. La Tabla 3.9 muestra los resultados

obtenidos aplicando el procedimiento de microextracción propuesto. La validez de estos resultados queda garantizada tanto por el estudio de recuperación realizado y cuyos resultados aparecen en la Tabla 3.7 como por los resultados mostrados en la Tabla 3.8. Como puede apreciarse los contenidos son muy bajos en todos los casos excepto en el aceite de pescado de laboratorio y los complementos nutricionales de aceite de pescado en forma de perlas. En estas muestras el contenido es menor del que sería de esperar teniendo en cuenta que habitualmente proceden de pescado. Esto debe ser consecuencia, probablemente, de los procesos de enriquecimiento en omega-3 a los que son sometidos estos complementos nutricionales [50].

Tabla 3.8: Resultados obtenidos en la determinación de arsénico en muestras de aceite pescado y de conservas de pescado.

	Contenido en arsénico total por distintos procedimientos, ng g^{-1}					
Aceite de	ETAAS	HG-AFS	ETAAS[a]	As extraído[b], %	DLLME[c]	As equiv.[d], %
Hígado de pescado	69.3 ± 0.1	66.9 ± 0.1	47.8 ± 0.1	31.0 ± 0.3	21.2 ± 0.1	30.6 ± 0.2
Oliva + atún	50.4 ± 0.1	51.2 ± 0.1	31.4 ± 0.1	37.7 ± 0.2	15.7 ± 0.1	31.2 ± 0.4
Girasol + atún	48.3 ± 0.1	49.1 ± 0.1	30.6 ± 0.1	36.6 ± 0.4	17.2 ± 0.1	35.6 ± 0.3
Oliva + sardina	481.2 ± 0.3	475.3 ± 0.3	317.4 ± 0.3	34.1 ± 0.3	174.1 ± 0.3	36.2 ± 0.3
Girasol + sardina	492.5 ± 0.3	498.2 ± 0.3	320.2 ± 0.3	35.0 ± 0.2	163.0 ± 0.3	33.1 ± 0.2
Oliva + caballa	303.9 ± 0.2	308.1 ± 0.2	205.1 ± 0.2	32.3 ± 0.3	105.7 ± 0.2	34.8 ± 0.4
Girasol + caballa	320.3 ± 0.2	316.2 ± 0.2	212.6 ± 0.2	33.6 ± 0.3	120.1 ± 0.2	37.5 ± 0.3
Oliva + anchoa	229.2 ± 0.2	225.6 ± 0.2	147.3 ± 0.2	35.5 ± 0.4	77.7 ± 0.2	33.9 ± 0.2

[a] Contenido en el aceite después de la microextracción DLLME
[b] Arsénico extraído durante el proceso DLLME determinado de forma directa en el aceite después del proceso DLLME.
[c] Contenido de arsénico en el aceite calculado a partir del arsénico en el extracto acuoso
[d] Porcentaje de arsénico extraído por el proceso DLLME respecto del total.

Tabla 3.9: Contenidos de arsénico "soluble" encontrados en muestras de aceite comestible y complementos nutricionales utilizando el procedimiento de preconcentración propuesto

Muestra de aceite	*[As][a], ng g^{-1}*	*Muestra de aceite*	*[As][a], ng g^{-1}*	*Muestra de aceite*	*[As][a], ng g^{-1}*
Oliva[b]	0.22 ± 0.03	Pescado[c]	1.86 ± 0.06	Híg. de bacalao-a[d]	3.02 ± 0.05
Oliva virgen extra[b]	<0.05	Sésamo[c]	0.45 ± 0.05	Híg. de bacalao-b[d]	1.95 ± 0.05
Girasol[b]	0.36 ± 0.04	Cacahuete[c]	0.20 ± 0.03	Oliva + atún[e]	15.7 ± 0.1
Maíz[b]	0.41 ± 0.04	Maíz[c]	0.49 ± 0.03	Girasol + atún[e]	17.2 ± 0.1
Soja[b]	0.12 ± 0.02	Hig. Pesc.[c]	21.2 ± 0.2	Oliva + sardina[e]	174.1 ± 0.3
Semillas[b]	0.24 ± 0.03	Onagra[d]	0.12 ± 0.02	Girasol + sardina[e]	163.0 ± 0.3
Aguacate[b]	0.12 ± 0.02	Germen de trigo[d]	0.18 ± 0.02	Oliva + caballa[e]	105.7 ± 0.2
Nuez[b]	0.17 ± 0.02	Pescado-a[d]	1.15 ± 0.04	Girasol + caballa[e]	120.1 ± 0.2
Macadamia[b]	0.11 ± 0.02	Pescado-b[d]	0.31 ± 0.03	Oliva + anchoa[e]	77.7 ± 0.2
Orujo de oliva[b]	0.20 ± 0.03	Salmón[d]	2.81 ± 0.06		

[a] valor medio ± desviación estándar (n=3); [b] aceite comestible comercial; [c] producto de laboratorio (Sigma o Fluka); [d] complemento nutricional comercializado en forma de perlas; [e] aceite sobrenadante en conservas de pescado enlatadas.

3.3.8. NATURALEZA DE LA ESPECIES EXTRAIDAS POR EL PROCEDIMIENTO PROPUESTO

En este punto pensamos que sería interesante disponer de un procedimiento sencillo, no cromatográfico, que nos permitiera distinguir rápidamente entre las posibles formas de arsénico extraídas. En el capítulo 2 vimos que era posible llevar a cabo un "*screening*" de la muestra con una adecuada selección de modificadores químicos. En este capítulo hemos abordado la adaptación de esa idea al microvolumen de fase acuosa generado durante el proceso de microextracción comentado anteriormente. Se trata de determinar si el arsénico extraído en el proceso DLLME es de naturaleza orgánica (arsenobetaína, arsenocolina y otros arsenoazúcares) o inorgánica (DMA,MA, As(V) y As(III)).

Como vimos en el capítulo 2, el comportamiento de las formas químicas de arsénico cambia con el modificador. En efecto, en presencia de una matriz de suspensión de potito de verdura al 10% en medio TMAH 0.01 mol L^{-1}, las formas químicas (As(III), As(VI), MA, DMA y AB tienen idéntica sensibilidad en el atomizador utilizando paladio (II) como modificador (30 µg inyectados). En estas condiciones la sensibilidad es 0.135 s ng^{-1}, es decir, la inyección en el atomizador de 20 µL de disolución de arsénico de 50 µg L^{-1} conduce a una señal de 0.135 unidades de área.

Cuando se utiliza cerio (IV) la sensibilidad desciende para todas las formas (véase Tabla 2.5) pero fundamentalmente para AB. En estas condiciones AB, DMA y MA reducen su sensibilidad hasta <0.5, 2 y 15 %, respectivamente (0.3 µg de cerio inyectados), de la que presentan todas las formas con paladio (II). Del mismo modo, la sensibilidad para As(III) y As(V) se reduce hasta el 40 y 22 % de la que presentan las formas de arsénico con paladio (II). Queda claro por tanto que la presencia o no de arsenobetaína, y aún más si esta especie es mayoritaria, puede concluirse con la inyección de la muestra en presencia de estos modificadores químicos.

Si regresamos ahora a considerar los extractos acuosos de las muestras de aceite la situación de partida es diferente. En efecto, ahora las especies de arsénico se encuentran en un medio al 3 % de HNO_3 y en estas condiciones el comportamiento diferencial del cerio no se aprecia en la extensión comentada. La Figura 3.15 muestra la evolución

de la señal para las distintas formas químicas de arsénico en un medio al 3 % de HNO_3 al que se van añadiendo cantidades crecientes de TMAH. Nótese como todas las señales decrecen al aumentar la concentración de TMAH pero no tanto como para hacerse tan pequeñas como las que se mostraron en el capítulo 2. En efecto, en un medio al 20 % en TMAH (0.2 mol L^{-1}) la señal para 50 µg L^{-1} de AB es mínima pero mensurable.

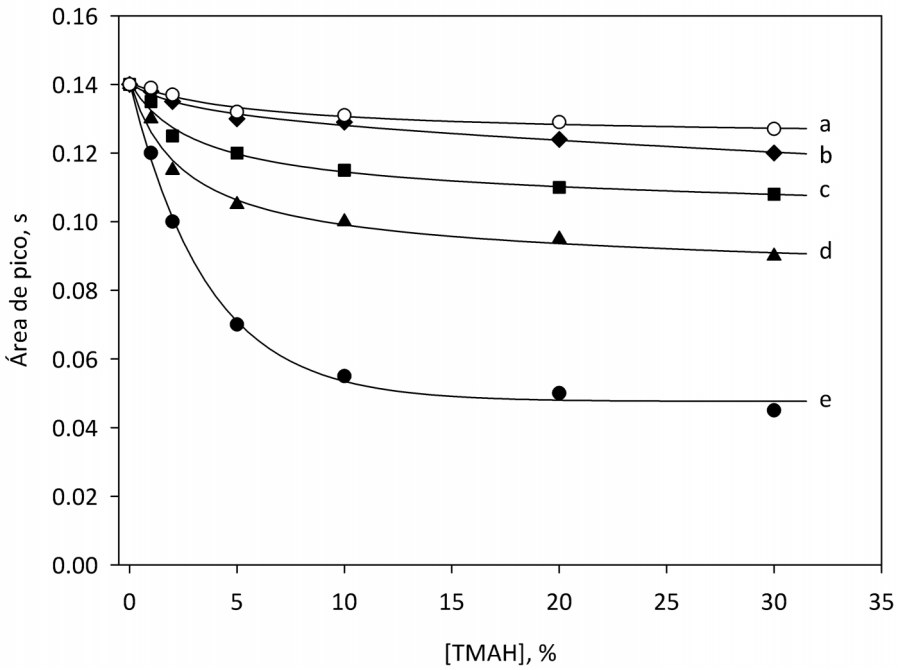


Figura 3.15: Efecto de la concentración de TMAH en disoluciones de AB, DMA, MA, As(V) y As(III) (curvas e-a, respectivamente) conteniendo 150 µg L^{-1} de arsénico y utilizando 0.3 µg de cerio (IV).

El motivo de esta discrepancia se encuentra en que en aquella situación las determinaciones se realizaban en presencia de una importante cantidad de materia orgánica aportada por la matriz de la muestra (suspensión al 10% m/v). Para simular aquellas condiciones estudiamos el efecto que la adición de materia orgánica tiene en las señales de la Figura 3.15. Los resultados aparecen en la Figura 3.16. Nótese como la presencia de pequeñas cantidades de almidón provocan efectos significativos y dispares en las formas de arsénico estudiadas. Mientras que la señal para AB decae rápidamente a partir de tan sólo el 0.2 % de almidón, DMA requiere al menos el 0.6 % de almidón para

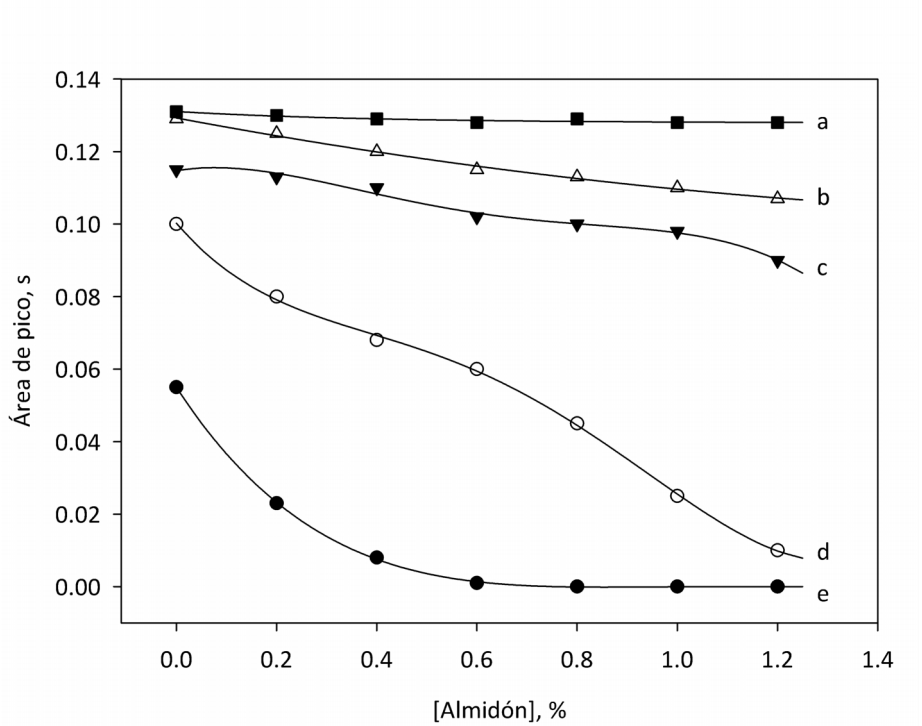


Figura 3.16: Efecto de la concentración de almidón en disoluciones de AB, DMA, MA, As(V) y As(III) (curvas e-a, respectivamente) conteniendo 150 µg L^{-1} de arsénico, 10 % de TMAH y utilizando 0.3 µg de cerio (IV).

reducir muy significativamente su señal. No ha sido posible reducir más la señal para MA ya que concentraciones más elevadas de almidón provocan la formación de abundante residuo carbonáceo en el atomizador tras algunas inyecciones.

La presencia de TMAH 0.2 mol L^{-1} provoca un rápido deterioro del recubrimiento de grafito pirolítico del atomizador. Para evitar el empleo de esta elevada concentración, la neutralización del extracto ácido se puede realizar con el empleo de hidróxido amónico y en estas condiciones se han obtenido excelentes resultados usando TMAH al 10 % v/v (0.1 mol L^{-1}).

Así pues el procedimiento que se propone consiste en añadir a 50 µL del extracto 20 µL de una disolución compuesta por el 35 % v/v de TMAH, 3.5 % m/v de almidón y 20 % v/v de hidróxido amónico.

Cuando distintas concentraciones de las formas químicas de arsénico estudiadas, preparadas en este medio, se llevan al atomizador utilizando cerio como modificador se obtienen los resultados que aparecen en la Tabla 3.10. Como puede apreciarse, con el

empleo de cerio como modificador químico la señal de arsenobetaína desciende hasta un valor en sensibilidad que apenas supone el 1 % de la que muestra esta especie con Pd como modificador en las mismas condiciones experimentales. La sensibilidad para DMA también desciende mucho. Por tanto podemos concluir que si el extracto acuoso de una muestra de aceite, tratado en la forma comentada, presenta una señal mensurable con paladio como modificador químico y ésta desaparece utilizando cerio, entonces el extracto está formado principalmente por AB y DMA. Por el contrario, si la señal no desciende significativamente al emplear cerio podemos concluir la presencia de importantes cantidades de As(III), As(V) y/o MA.

Tabla 3.10: Sensibilidades obtenidas para las distintas formas químicas de arsénico estudiadas al 10 % v/v de TMAH y 1 % m/v de almidón con 0.3 µg de Ce(IV) como modificador químico.

Forma química	*Sensibilidad, s ng^{-1}*
As (III)	0.043
As(V)	0.034
MA	0.030
DMA	0.007
AB	<0.001

En el capítulo 2 presentamos la posibilidad de distinguir entre DMA y AB en base al empleo de un tercer modificador, circonio en forma de recubrimiento permanente. Ahora, y en un intento de simplificar las experiencias, proponemos una alternativa a este procedimiento. Como hemos visto anteriormente, la señal de las formas metiladas de arsénico disminuye con el grado de metilación y el contenido en almidón. Por tanto, y como podemos apreciar en la Figura 3.16, si la concentración de almidón se reduce a apenas el 0.4 % m/v, la señal de DMA todavía se mantiene en un nivel alto mientras que la de AB disminuye hasta valores próximos al ensayo en blanco. En efecto, la mera dilución 1:1 del extracto (tratado como se ha indicado antes) con TMAH al 10 % v/v conducirá a una señal próxima al ensayo en blanco para el caso de presencia mayoritaria de AB y, en el caso de su ausencia, la obtención de señal indicaría la presencia de arsénico como DMA.

La Tabla 3.11 muestra los resultados obtenidos para algunas de las muestras utilizadas en este estudio. La columna que presenta el contenido cuando se utiliza paladio

hemos de interpretarla como la suma de todas las formas solubles de arsénico, mientras que la que corresponde al empleo de cerio se refiere a la suma de As(III), As(V) y MA. Se han medido únicamente aquellas que contenían cantidades de arsénico superiores a 0.4 ng g^{-1} con el fin de disponer de una señal adecuada para el estudio. Como puede apreciarse, en la mayoría de los casos la señal quedó por debajo del límite de detección cuando se empleó cerio como modificador químico, lo que indica que las especies mayoritarias en estos extractos son AB y DMA. Únicamente una muestra condujo a valores elevados con el empleo de cerio, lo que indica una composición mayoritaria de arsénico inorgánico y MA. En este caso el valor presentado se ha estimado como As(III).

Tabla 3.11: Comparación entre el contenido de arsénico "soluble" encontrado en muestras de aceite comestible y complementos nutricionales utilizando el procedimiento de preconcentración propuesto y empleando paladio (II) o cerio (IV) como modificadores químicos

	[As][a]*, ng g^{-1}*			*[As]*[a]*, ng g^{-1}*	
Muestra de aceite	*Con Pd(II)*	*Con Ce(IV)*	*Muestra de aceite*	*Con Pd(II)*	*Con Ce(IV)*
Pescado[b]	1.86 ± 0.06	0.09 ± 0.03	Oliva + atún[d]	15.7 ± 0.1	<0.05
Sésamo[b]	0.45 ± 0.05	0.08 ± 0.03	Girasol + atún[d]	17.2 ± 0.1	<0.05
Maíz[b]	0.49 ± 0.03	0.12 ± 0.03	Oliva + sardina[d]	174.1 ± 0.3	<0.05
Hig. Pesc.[b]	21.20 ± 0.21	10.2 ± 0.06	Girasol + sardina[d]	163.0 ± 0.3	<0.05
Pescado-a[c]	1.15 ± 0.04	<0.05	Oliva + caballa[d]	105.7 ± 0.2	<0.05
Salmón[c]	2.81 ± 0.06	<0.05	Girasol + caballa[d]	120.1 ± 0.2	<0.05
Híg. de bacalao-a[c]	3.02 ± 0.05	<0.05	Oliva + anchoas[d]	77.7 ± 0.2	<0.05
Híg. de bacalao-b[c]	1.95 ± 0.05	<0.05			

[a] valor medio ± desviación estándar (n=3); [b] producto de laboratorio (Sigma o Fluka); [c] complemento nutricional comercializado en forma de perlas; [d] aceite sobrenadante en conservas de pescado enlatadas.

3.3.9. NATURALEZA DEL ARSÉNICO PRESENTE EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS

De lo expuesto se deduce que apenas el 30 % del contenido total de arsénico de las muestras de aceite se extrae en la fracción acuosa. El resto del arsénico, como se ha comentado en la Introducción de este capítulo (páginas 156 y siguientes) se encuentra constituyendo arsenolípidos u otras sustancias no solubles en fase acuosa.

La separación de lípidos polares, mono di y tri acilgliceroles y ácidos grasos con cartuchos de fase sólida (SPE) como una etapa previa a la determinación por cromatografía de gases [71,72] está claramente asentada en la bibliografía [73]. Se han propuesto multitud de soportes sólidos como los que utilizan sílice (-Si), sílice hidratada (-Si-OH), sílice con aminopropil enlazado (-Si-$(CH_2)_3$-NH_2), intercambiadores iónicos en forma de amina

cuaternario o sulfonatos. Nosotros hemos evaluado la capacidad de retención de arsénico de estos soportes además de los basados en C18, Si + Mg, grafito (ENVI) y los basados en un polímero de estireno modificado hidrofílicamente (HLB).

La retención de arsénico en los distintos tipos de cartucho se realizó haciendo pasar una mezcla de aceite y hexano 3:4 v:v por la fase sólida y midiendo el contenido total de arsénico por ETAAS antes y después de pasar. Únicamente con el empleo de cartuchos HLB se consiguió una retención total, por lo que se seleccionó este soporte como más adecuado.

El siguiente paso fue la elución selectiva de los compuestos de arsénico retenidos en el soporte cromatográfico. Para ello se ha seguido en parte el esquema propuesto previamente [71] en donde los lípidos apolares se eluyen con hexano, mientras que los compuestos de polaridad polaridad creciente se eluyen con mezcla hexano:etanol.

En nuestro caso, una vez retenidos todos los compuestos de arsénico se añade eluye con más hexano y se consigue separar la fracción apolar. Seguidamente se eluye la fracción polar con el empleo de etanol como eluyente. Finalmente queda una fracción retenida por intercambio iónico formada por las especies inorgánicas, MA y DMA que se pueden eluir con ácido nítrico al 3 %. La Figura 3.17 muestra un esquema del proceso de separación propuesto.

3.3.9.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE SEPARACIÓN

El cartucho HLB se preacondiciona pasando 3 mL de hexano. Si se ha utilizado previamente con fase acuosa es preciso desplazar el agua con 3 mL de etanol y a continuación 3 mL de hexano.

Para conseguir que el aceite pase por el cartucho simplemente por gravedad se propone diluirlo con hexano, de esta forma disminuye su viscosidad. Se encontró que la dilución 3:4 (3 mL de aceite + 4 de hexano) permite que el fluido atraviese el cartucho en apenas 10 minutos a temperatura ambiente. En primer lugar se estudió la cantidad

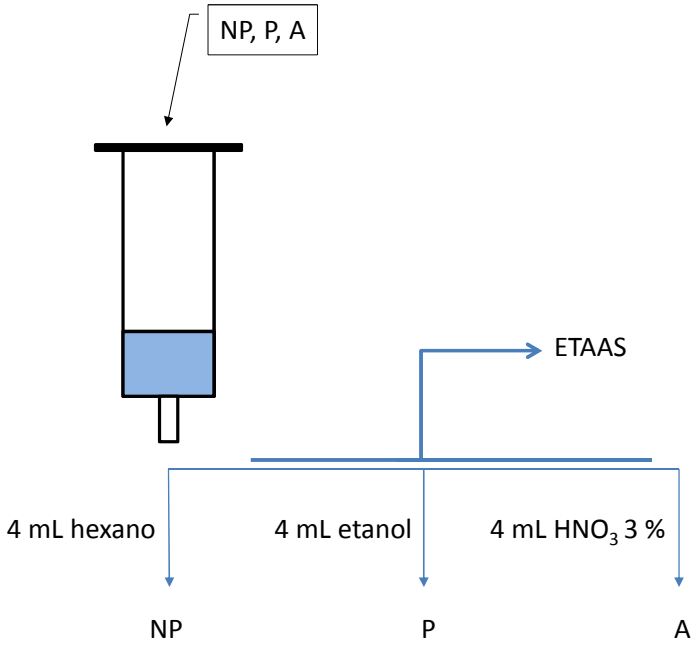


Figura 3.16: Esquema de separación de las fracciones de arsénico en aceite propuesto.

máxima de aceite que se puede pasar por el cartucho HLB antes de que empiece a eluir alguna forma de arsénico, bien sea no polar (porque se desplaza con el disolvente) bien sea por saturación del material de relleno activo.

Para este estudio se utilizó aceite de oliva sobrenadante de las conservas de caballa que era el de mayor contenido en arsénico total. Se preparó una mezcla de aceite con hexano 3:4 de la que se pasaron volúmenes crecientes en intervalos de 1 mL por el cartucho, determinando el contenido en arsénico total de cada mL que sale del cartucho HLB. La señal atómica medida para arsénico empezó a separarse de la señal para el ensayo en blanco tras el paso de 10 mL de la mezcla. Por tanto se propone el empleo de una mezcla de 3 mL de aceite y 4 mL de hexano, lo que supone el paso de 7 mL de disolución por el cartucho HLB, de esta forma garantizamos la total retención de las especies de interés en el cartucho.

La elución de los compuestos apolares de arsénico se consigue en un disolvente polar como el hexano. En efecto, hemos comprobado que la adición de hexano al material retenido en el soporte permite la elución de una parte del arsénico total. La gráfica 3.18 muestra la evolución del contenido de arsénito total eluido en función del volumen de

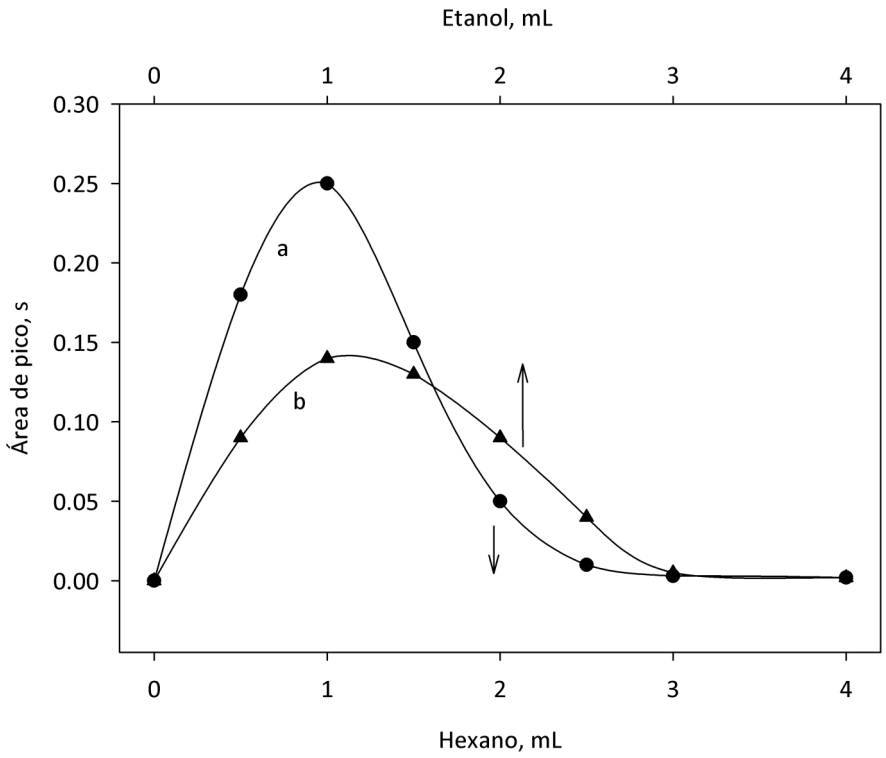


Figura 3.18: Perfiles de elución de las fracciones no polares (curva a) y polares (curva b) de las distintas formas químicas que contienen arsénico en el aceite.

elución. Nótese que con el empleo de 3 mL de hexano es suficiente para conseguir la completa elución de la fracción no polar (NP) de los compuestos de arsénico.

La elución de los compuestos polares de arsénico se consigue con el empleo de un disolvente polar. En nuestro caso hemos utilizado etanol. La Figura 3.18 (curva b) muestra el perfil de elución de las formas polares con el volumen de etanol utilizado en la elución. Obsérvese como el empleo de 3 mL es suficiente para conseguir la elución completa de estas formas. La adulteración del aceite con arsenobetaína permitió comprobar que esta especie se retiene en el soporte y eluye con la fracción de etanol. Estudios similares con DMA, MA, arsenito y arsenato concluyen que estas formas quedan retenidas en el soporte probablemente por intercambio iónico y se pueden eluir en medio ácido nítrico al 3 % v/v. Esto únicamente se ha comprobado con adulteraciones del aceite con estándares ya que no disponemos de muestras con contenidos en estas formas suficientes para su determinación. Estudios propios no publicados todavía realizados con selenito y seleniato conducen a las mismas conclusiones. Las formas iónicas de selenio se retienen en el soporte y solamente eluyen con un medio ácido, mientras que selenocisteína y selenometionina eluyen en etanol.

3.3.9.2. DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN LAS FRACCIONES OBTENIDAS

Para determinar con mayor sensibilidad el arsénico eluido en cada una de las fracciones se ha recurrido a la evaporación del disolvente en un rotavapor. Este proceso reduce los 3 mL de hexano de la fracción no polar a un residuo de aproximadamente 300 ± 5 µL con una viscosidad próxima a la del agua y que por tanto puede manipularse con micropipeta para introducirlo en el atomizador de ETAAS. De esta forma, teniendo en cuenta que el eluido corresponde al contenido de 3 mL de aceite se consigue un factor de preconcentración de 10 veces.

Al reducir volumen en el rotavapor de la fracción de formas polares eluidas en etanol se consigue un residuo muy viscoso de unos pocos microlitros (< 10 µL) que se diluye con 300 µL de hexano para conseguir una disolución 10 veces más concentrada en arsénico que el aceite de partida.

Ambas fracciones pueden llevarse al detector aplicando el programa de calentamiento que aparece en la Tabla 3.6. En este caso recomendamos el empleo de nitrato de paladio como modificador químico, ya que conduce a una mejor sensibilidad que con el empleo de dicloro bis(benzonitrilo) de paladio (II). En efecto, el empleo de una disolución de Pd(II) de 2000 µg mL^{-1} (20 µL) conduce a un incremento del 25 % de la pendiente de la recta de calibrado. En este caso los mejores resultados se obtienen inyectando previamente el modificador y deteniendo el programa tras ejectuar la segunda etapa. De esta forma el modificador queda en estado sólido sobre la plataforma del atomizador. A continuación se inyectan 30 µL de las fracciones y se ejecuta el programa de calentamiento completo. La calibración se ha realizado con arsenobetaína disuelta en hexano.

La Tabla 3.12 muestra el contenido de arsénico encontrado en cada una de las fracciones de distintas muestras de aceite expresado como porcentaje respecto del total. Como puede comprobarse la fracción apolar es más importante que la polar. Al mismo tiempo, si se comparan los resultados obtenidos para la fracción polar con los que se obtienen para esas mismas muestras por el procedimiento DLLME propuesto (fracción soluble en agua) podemos ver que los contenidos son superiores en aquel caso. Es decir,

durante el proceso de extracción en fase acuosa no se consigue extraer toda la fracción polar de arsénico contenida en los aceites.

Tabla 3.12: Composición porcentual de las fracciones polar y no polar de las distintas formas de arsénico en los aceites analizados

	Fracción, % As respecto del total[a]	
Aceite de	No polar	Polar
Hígado de pescado[b]	4.5 ± 0.2	95.5 ± 0.5
Oliva + atún[c]	42.2 ± 0.4	57.8 ± 0.4
Girasol + atún[c]	42.2 ± 0.4	57.8 ± 0.4
Oliva + sardina[c]	3.8 ± 0.2	96.2 ± 0.5
Girasol + sardina[c]	4.1 ± 0.2	95.9 ± 0.5
Oliva + caballa[c]	38.3 ± 0.3	61.7 ± 0.4
Girasol + caballa[c]	38.3 ± 0.3	61.7 ± 0.4
Oliva + anchoa[c]	22.5 ± 0.2	77.5 ± 0.5
Oliva[d]	25.1 ± 0.2	74.9 ± 0.5
Girasol[d]	48.6 ± 0.4	51.4 ± 0.4
Macadamia[d]	62.6 ± 0.5	37.4 ± 0.3
Aguacate[d]	13.7 ± 0.2	86.3 ± 0.4
Soja[d]	43.8 ± 0.3	56.3 ± 0.4

[a] valor medio ± desviación estándar (n=3); [b] producto de laboratorio (Sigma o Fluka); [c] aceite sobrenadante en conservas de pescado enlatadas; [d] aceite comestible comercial

Estos resultados coinciden con los publicados previamente sobre aceite de hígado de bacalao [30] y músculo de atún [32], aunque estos porcentajes cambian según la especie, así por ejemplo en aceite de capelín (*mallotus villosus*) el 70% del arsénico total está en la fracción apolar [31] mientras que en otros apenas alcanza el 20 % [29]. Estos resultados abren un nuevo campo de investigación ya que hasta ahora únicamente se consideraba que el arsénico estaba en la fracción soluble. La presencia de estos arsenolípidos en el cuerpo humano puede evolucionar hacia la formación de DMA aunque esto realmente se desconoce. Quizás sean especies tan inertes como la arsenobetaína que no se metaboliza en el organismo. Realmente se sabe muy poco sobre la toxicidad de estos compuestos para el ser humano aunque el tema resulta de gran interés habida cuenta de la recomendación de la ingesta de aceite de pescado por su elevado contenido en omega-3.

3.4. CONCLUSIÓN

Se propone un procedimiento que permite la determinación de la fracción soluble de arsénico en muestras de aceite sin la mineralización previa de la muestra. El procedimiento propuesto está basado en la microextracción de las especies solubles de arsénico de muestras de aceite comestible y complementos nutricionales de perlas de pescado en un pequeño volumen de fase acuosa con un elevado factor de preconcentración. La determinación se realiza por ETAAS y presenta una elevada sensibilidad y sencillez de aplicación. El procedimiento puede llevarse a cabo fácilmente con la instrumentación habitual en los laboratorios de análisis de rutina. La sensibilidad es superior a la que se consigue con el empleo de una instrumentación mucho más sofisticada como es el ICP-MS. Se presenta también un sencillo procedimiento para distinguir la naturaleza tóxica o no tóxica del arsénico extraído. Al mismo tiempo se caracterizan las fracciones polares y no polares de las formas de arsénico contenidas en los aceites.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

1 P. A. Cox, "*The Elements on Earth: Inorganic Chemistry in the Environment*", (1995), Oxford University Press, Oxford, 287.

2 R. S. Oremland y J. F. Stolz, *The ecology of arsenic*, Science, 300 (2003) 939–944.

3 K. A. Francesconi, *Current perspectives in arsenic environmental and biological research*, Environ. Chem., 2 (2005) 141–145.

4 J. O. Nriagu, *"Arsenic poisoning through the ages"*, In: Environmental Chemistry of Arsenic, W. T. Frankenberger Jr (ed), (2002) Dekker, New York, 1–26.

5 J. Zhu, Z. Chen, V. Lallemand-Breitenbach y H. de The, *How acute promyelocyticleukaemia revived arsenic*, Nat. Rev. Cancer, 2 (2002) 705–713.

6 J. O. Nriagu, *A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals*, Nature, 338 (1989) 47–49.

7 J. M. Azcue y J.O. Nriagu, *Arsenic: historical perspectives*. In: Arsenic in the Environment, Part I: Cycling and Characterization. J. O. Nriagu (ed), (1994) Wiley, New York, 1–15.

8 J. A. Plant, D. G. Kinniburgh, P. L. Smedley, F. M Fordyce y B. A. Klinck , "*Arsenic and selenium*", In: Environmental Geochemistry, B. S. Lollar (ed), (2005) Elsevier, Amsterdam, 17–66.

9 D. K. Nordstrom, *Worldwide occurrences of arsenic in groundwater*, Science, 296 (2002) 2143–2145.

10 G. Lunde, *Occurrence and transformation of arsenic in the marine environment*, Environ Health Perspect, 19 (1977) 47–52.

11 P. E. Gibbs, W. J. Langston, G. R. Burt y P. L. Pascoe, *Tharyx marioni (Polychaeta): a remarkable accumulator of arsenic*, J. Mar. Biol. Assoc., 63 (1983) 313–325.

12 B. K. Mandal y K. T. Suzuki, *Arsenic round the world: a review*, Talanta, 58 (2002) 201–235.

13 H. Haraguchi, *Metallomics as integrated biometal science*, J. Anal. At. Spectrom., 19 (2004) 4–15.

14 K. T. Suzuki, *Metabolomics of arsenic based on speciation studies*, Anal. Chim. Acta, 540 (2005) 71–76.

15 S. Hirata, H. Toshimitsu y M. Aihara, *Determination of arsenic species in marine samples by HPLC-ICP-MS*, Anal. Sci., 22 (2006) 39–43.

16 W. R. Cullen y K. J. Reimer, *Arsenic speciation in the environment*, Chem. Rev., 89 (1989) 713–764.

17 S. J. Santosa, H. Mokudai y M. Takahashi y S. Tanaka, *The distribution of arsenic compounds in the ocean: biological activity in the surface zone and removal processes in the deep zone*, Appl. Organomet. Chem., 10 (1996) 697–705.

18 H. Hasegawa, *Seasonal changes in methyl arsenic distribution in Tosa Bay and Uranouchi-Inlet*, Appl. Organomet. Chem., 10 (1996) 733–740.

19 H. Naranmandura, N. Suzuki y K. T. Suzuki, *Trivalent arsenicals are bound to proteins during reductive methylation*, Chem. Res. Toxicol., 19 (2006) 1010–1018.

20 J. S. Edmonds, K. A. Francesconi, J. R. Cannon, C.L. Raston, B. W. Skelton y A. H. White, *Isolation, crystal structure and synthesis of arsenobetaine, the arsenical constituent of the western lock lobster Panulirus longipescygnus George*, Tetrahedron Lett., 18 (1977) 1543–1546.

21 T. Kunito, R. Kubota, J. Fujihara, T. Agusa y S. Tanabe, *Arsenic in Marine Mammals, Sea-birds and Sea Turtles*, Rev. Environ. Contam. Toxicol., 195 (2008) 31-69.

22 J. S. Edmonds, Y. Shibata, K. A. Francesconi, R. J. Rippingale y M. Morita, *Arsenic transformations in short marine food chains studied by HPLC-ICP-MS*, Appl. Organomet. Chem., 11 (1997) 281–287.

23 R. Kubota, T. Kunito y S. Tanabe, *Chemical speciation of arsenic in the livers of higher trophic marine animals*, Mar. Pollut. Bull., 45 (2002) 218–223.

24 K. A. Francesconi y D. Kuehnelt, *Arsenic compounds in the environment*, In: Frankenberger WT Jr (ed) Environmental Chemistry of Arsenic, (2002) Dekker, New York, 51–94.

25 J. Kirby, W. Maher y D. Spooner, *Arsenic occurrence and species in near-shore macroalgae-feeding marine animals*, Environ. Sci. Technol., 39 (2005) 5999–6005.

26 J. S. Edmonds y K. A. Francesconi, *Organoarsenic compounds in the marine environment. In: Organometallic Compounds in the Environment*, P. J. Craig (ed), (2003), Wiley, New York, 195–222.

27 S. Khokiattiwong, W. Goessler, S. N. Pedersen, R. Cox y K. A. Francesconi, *Dimethyl arsinoylacetate from microbial demethylation of arsenobetaine in seawater*, Appl. Organomet. Chem., 15 (2001) 481–489.

28 RöomppLexikonChemie – Version 2.0 (CD-ROM). Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, 1999.

29 U. Kohlmeyer, S. Jakubik, J. Kuballa y E. Jantzen, *Determination of arsenic species in fish oil after acid digestion*, Microchim. Acta, 151 (2005) 249–255.

30 A. Rumpler, J. S. Edmonds, M. Katsu, K. B. Jensen, W. Goessler, W, G. Raber, H. Gunnlaugsdottir y K. A. Francesconi, *Arsenic content in long-chain fatty acids in cod-liver oil: A result of biosynthetic infidelity?*, Angew. Chem., 47 (2008) 2665–2667.

31 M. S. Taleshi, K. B. Jensen, G. Raber, J. S. Edmonds, H. Gunnlaugsdottir y K. A. Francesconi, *Arsenic-containing hydrocarbons: natural compounds in oil from the fish capelin, Mallotus villosus*, Chem. Commun., 39 (2008) 4706–4707.

32 M. S. Taleshi, J. S. Edmonds, W. Goessler, M.J. Ruiz-Chancho, G. Raber, K. B. Jensen y K.A. Francesconi, *Arsenic-Containing lipids are natural constituents of sashimi tuna*, Environ. Sci. Technol., 44 (2010) 1478–1483.

33 K. Ebisuda, T. Kunito, J. Fujihara, R. Kubota, Y. Shibata y S. Tanabe, *Lipid-soluble and water-soluble arsenic compounds in blubber of ringed seal (Pusahispida)*, Talanta, 61 (2003) 779-787.

34 S. Devallay y J. Feldmann, *Determination of lipid-soluble arsenic species in seaweed-eating sheep from Orkney*, Appl. Organometal. Chem., 17 (2003) 906–912.

35 U. Arroyo-Abad, J. Mattusch, S. Mothes, M. Möder, R. Wennrich, M. P. Elizalde-González y F. M. Matysik, *Detection of arsenic-containing hydrocarbons in canned cod liver tissue*, Talanta, 82 (2010) 38–43.

36 G. Raber, S. Khoomrung, M. S. Taleshi, J. S. Edmonds y K. A. Francesconi, *Identification of arsenolipids with GC/MS, Talanta*, 78 (2009) 1215–1218.

37 E. Schmeisser, A. Rumpler, M. Kollroser, G. Rechberger, W. Goessler y K. A. Francesconi, *Arsenic fatty acids are human urinary metabolites of arsenolipids present in cod liver*, Angew. Chem., 45 (2006) 150–154.

38 C. Uneyama, M. Toda, M. Yamamoto y K. Morikawa, *Arsenic in various foods: Cumulative data*, Food Addit. Contam., 24 (2007) 447–534

39 JECFA. 2006. Arsenic. Available: http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v024je08.htm. Acceso 2012.

40 FSANZ. 2006. Standard 1.4.1. Contaminants and naturaltoxicants. Available: http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/FSANZ%2023rd%20ATDS_v5.pdf. Acceso 2012.

41 I. Karadjova y T. Venelinov, *Determination of arsenic and mercury in sunflower oil by electrothermal atomic absorption*, Food Addit. Contam., 19 (2002) 948–953.

42 L. R. Bordajandi, G. Gómez, E. Abad, J. Rivera, M. del Mar Fernandez-Baston, J. Blasco y M. J. Gonzalez, *Survey of persistent organochlorine contaminants (PCBs, PCDD/Fs, and PAHs), heavy metals (Cu, Cd, Zn, Pb, and Hg), and arsenic in food samples from Huelva (Spain): Levels and health implications*, J. Agr. Food. Chem., 52 (2004) 992–1001.

43 S. S. Chen, B. Y. Lee, C. C. Cheng y S. S. Chou, *Determination of arsenic in edible fats and oils by focused microwave digestion and atomic fluorescence spectrometer*, J. Food Drug Anal., 9 (2001) 121–125.

44 J. C. Leblanc, T. Guerin, L. Noel, G. Calamassi-Tran, J. L. Volatier y P. Verger, *Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French Total Diet Study*, Food Addit. Contam., 22 (2005) 624–641.

45 B. A. Zarcinas, C. F. Ishak, M. J. *McLaughlin y G. Cozens, Heavy metals in soils and crops in Southeast Asia. 1. Peninsular Malaysia*, Environ. Geochem. Hlth., 26 (2004) 343–357.

46 K. Nishizawa, [*Título en japonés*], Syokuhin to kaihatsu 26 (1991) 50–55

47 H. Robberecht, R. V. Cauwenbergh, D. Bosscher, R. Cornelis y H. Deelstra, *Daily dietary total arsenic intake in Belgium using duplicate portion sampling and elementalcontent of various foodstuffs*, Eur. Food Res. Technol., 214 (2002) 27–32.

48 Ikebe K, Tanaka Y, Tanaka R. [*Título en japonés*], Osakahuritsu kosyueisei kenkyusyo nenpou syokuhineiseihen, 14 (1983) 83–86.

49 O. Muñoz, D. Velez y R. Montoro, *Optimization of the solubilization, extraction and determination of inorganic arsenic [As (III) + (As(V)] in seafood products by acid digestion, solvent extraction and hydride generation atomic absorption spectrometry*, Analyst, 124 (1999) 601–607.

50 E. Schmeisser, W. Goessler, N. Kienzl y K. A. Francesconi, *Direct measurement of lipid-soluble arsenic species in biological samples with HPLC-ICP-MS*, Analyst, 130 (2005) 948–955.

51 G. Ysart, P. Miller, M. Croasdale , H. Crews, P. Robb, M. Baxter, C. de L'Argy y N. Harrison, *1997 UK Total Diet Study —dietary exposures to aluminium, arsenic, cadmium, chromium, copper, lead, mercury, nickel, selenium, tin and zinc*, Food Addit. Contam., 17 (2000) 775–786.

52 C. Delgado-Andrade, M. Navarro, H. López y M. C. López, *Determination of total arsenic levels by hydride generation atomic absorption spectrometry in foods from south-east Spain: estimation of daily dietary intake*, Food Addit. Contam., 20 (2003) 923-932.

53 J. J. Sloth, K. Julshamn y A. K. Lundebye, *Total arsenic and inorganic arsenic content in Norwegian fish*, Aquacult. Nutr., 11 (2005) 61–66.

54 H. Agah, M. Leermakers, M. Elskens, S. M. R. Fatemi y W. Baeyens, *Accumulation of trace metals in the muscle and liver tissues of five fish species from the Persian Gulf*, Environ. Monit. Assess., 157 (2009) 499–514.

55 Y. T. Chang y S. J. Jiang, *Determination of As, Cd and Hg in emulsified vegetable oil by flow injection chemical vapour generation inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. At. Spectrom., 23 (2008) 140–144.

56 S. S. Chen, C. C. Cheng y S. S. Chou, *Determination of arsenic in edible oils by direct graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Journal of food and drug analysis, 11 (2003) 214-219.

57 D. Kuehnelt, K. J. Irgolic y W. Goessler, *Comparison of three methods for the extraction of arsenic compounds from the NRCC standard reference material DORM-2 and the brown alga Hijiki fuziforme*, Appl. Organometall. Chem. 15 (2001) 445–456.

58 J. Kirby y W. Maher, *Measurement of water-soluble arsenic species in freeze-dried marine animal tissues by microware-assisted and HPLC-ICO-MS*, J. Anal. Atom. Spectrom. 17 (2002) 838–843.

59 Y. Bohari, G. Lobos, H. Pinochet, F. Pannier, A. Astruc y M. Potin-Gautier, *Speciation of arsenic in plants by HPLC-HG-AFS: extraction optimisation on CRM materials and application to cultivated samples*, J. Environ. Monit. 4 (2002) 596–602.

60 M. N. Matos Reyes, M. L. Cervera, R.C. Campos y M. de la Guardia, *Non-chromatographic speciation of toxic arsenic in vegetables by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry after ultrasound-assisted extraction*, Talanta, 75 (2008) 811-816.

61 M. Krachler y H. Emons, *Extraction of antimony and Arsenic from fresh and freeze-dried plant samples as determined by HG-AAS*, Fresenius J. Anal. Chem. 368 (2000) 702–707.

62 W. Goessler, A. Rudorfer, E. A. Mackey, P. R. Becker y K. Irgolic, *Determination of Arsenic Compounds in Marine Mammals with High Performance Liquid Chromatography and an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer as Element Specific Detector*, J. Appl. Organometall. Chem., 12 (1998) 491–501.

63 W. Maher, W. Goessler, J. Kirby y G. Raber, *Arsenic concentrations and spaciation in the tissues and blood of sea mullet (Mugil cephalus) from Lake Macquarie NSW*, Mar. Chem., 68 (1999) 169–182.

64 S. Foster, W. Maher, F. Krikowa y S. Apte, *A microwave-asisted sequential extraction of water and diluted acid soluble species from marine plant and animal tissues*, Talanta, 71 (2007) 537-549.

65 Y. L. Chu y S. J. Juang, *Speciation analysis of arsenic compounds in edible oil by ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 5175-5179.

66 W. X. Wang, T. J. Yang, Z. G. Li, T. T. Jong y M. R. Lee, *A novel method of ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of trace organoarsenic compounds in edible oil*, Anal. Chim. Acta, 690 (2011) 221-227.

67 R. W. Wood y A. L. Loomis, *The Physical and Biological Effects of High Frequency Sound Waves of Great Intensity*, Phil. Mag., 4 (1927) 417-436.

68 W. Lauterborn y C. D. Ohl, *Cavitation bubble dynamics*, Ultrason. Sonochem., 4 (1997) 65-75.

69 T. Wang, W. Jia y J. Wu, *Direct determination of metals in organics by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry in aqueous matrices*, Pharm. Biomed. Anal., 33 (2003) 639-646.

70 J. A. Pérez-Serradilla, F. Priego-Capote y M. D. Luque de Castro, *Simultaneous Ultrasound-Assisted Emulsification-Extraction of Polar and Non polar Compounds from Solid Plant Samples*, Anal. Chem., 79 (2007) 6767-6774.

71 J. Giacometti, A. Milosevic y C. Milin, *Gas chromatographic determination of fatty acids contained in different lipid clases after their separation by solid-phase extraction*, J. Chromatogr. A, 976 (2002) 47-54

72 F. Pernet, C.J. Pelletier y J. Milley, *Comparison of three solid-phase extraction methods for fatty acid analysis of lipid fractions in tissues of marine bivalves*, J. Chromatogr. A, 1137 (2006) 127-137

73 V. Ruiz-Gutiérrez y M.C. Pérez-Camino, *Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds*, J. Chromatogr. A 885 (2000) 321-341

Capítulo IV

Especiación de arsénico en arroz mediante separación por intercambio iónico, preconcentración con DLLME y determinación por ETAAS.

CONTENIDO

4.1. INTRODUCCIÓN 209
4.2. PARTE EXPERIMENTAL 218
4.2.1. Instrumentación 218
4.2.2. Tratamiento de los tubos con volframio 220
4.2.3. Reactivos 220
4.2.4. Muestras y materiales de referencia 221
4.2.5. Digestión de las muestras en microondas 222
4.2.6. Arsénico total mediante HG-AFS 222
4.2.7. Arsénico total mediante ETAAS 223
4.2.8. Extracción de las formas de arsénico en medio alcalino 224
4.2.9. Extracción de las formas de arsénico en medio ácido 224
4.2.10. Separación de especies tras el tratamiento alcalino 224
4.2.11. Separación de especies tras el tratamiento ácido 225
4.2.12. Procedimiento DLLME para As(III) y As(V) 227
4.2.13. Procedimiento DLLME para MA y DMA 228
4.2.14. Procedimiento para la determinación de AB 228
4.2.14.1. A partir del sobrenadante de la suspensión alcalina 229
4.2.14.2. A partir del eluido del cartucho catiónico 229
4.3. Resultados y discusión 230
4.3.1. Selección del medio de extracción 231
4.3.1.1. Extracción en medio alcalino 232
4.3.1.2. Extracción en medio ácido 240
4.3.2. Separación de las especies de arsénico 243
4.3.2.1 Separación tras el tratamiento alcalino 250
4.3.2.2 Separación tras el tratamiento ácido 253
4.3.3. Preconcentración de las formas de arsénico 258
4.3.3.1. Preconcentración DLLME de As(III) y As(V) 261
4.3.3.1.1. Estudio de las condiciones de complejación y extracción 262
4.3.3.1.2. Curvas de calcinación y atomización 265
4.3.3.1.3. Determinación de As(V) 268
4.3.3.1.4. Efecto de los iones coexistentes 269
4.3.3.1.5. Calibración 270
4.3.3.2. Preconcentración por DLLME de MA y DMA 271
4.3.3.2.1 Estudio de las condiciones de reacción y extracción 274
4.3.3.2.2. Curvas de calcinación y atomización 279

4.3.3.2.3. Efecto de los iones coexistentes 281
4.3.3.2.4. Calibración 282
4.3.4. Aplicación de los procedimientos propuestos 282
4.4. Conclusión 288
4.5. BIBLIOGRAFÍA 289

4.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha discutido en el capítulo anterior, el arsénico es un elemento ampliamente distribuido en la corteza terrestre. Aunque frecuentemente se cita como metal, químicamente está clasificado como un metaloide, con propiedades tanto de metal como de elemento no-metálico. La mayoría de los compuestos inorgánicos y orgánicos de arsénico son polvos de color blanco no volátiles. No tienen olor y muchos tampoco tienen ningún sabor especial. Por esta razón, generalmente pasan desapercibidos cuando están presentes en los alimentos, el agua o el aire [1].

El arsénico inorgánico se encuentra de forma natural en el suelo y en muchos tipos de rocas, especialmente en minerales que contienen cobre o plomo. Cuando estos minerales se calientan en hornos, la mayor parte del arsénico se elimina a través de la chimenea en forma de un polvo fino que se incorpora a la atmósfera. Las fundiciones pueden recuperar este polvo y aislar el arsénico en forma de un compuesto llamado trióxido de arsénico (As_2O_3).

En la actualidad, aproximadamente 70 % del arsénico que se produce es para utilizarlo como conservante de la madera en forma de arsenato cromado de cobre (*CCA*) [2]. Desde 2003 se ha suprimido el uso del *CCA,* lógicamente sin efectos retroactivos, en estructuras en donde juegan niños, mesas para picnic, terrazas de madera, cercas y en estructuras similares. En general su empleo para esta finalidad está disminuyendo.

En el pasado, los compuestos inorgánicos de arsénico se usaron predominantemente como plaguicidas, con mucha frecuencia en la obtención de algodón y cultivo de frutales. Actualmente, los compuestos inorgánicos del elemento no se pueden usar en la agricultura. Sin embargo, los compuestos orgánicos de arsénico, específicamente el ácido cacodílico (DMA), el arsenato de metilo bisódico (*DSMA*) y el arsenato de metilo monosódico (*MSMA*), aun se usan como plaguicidas, en especial en el cultivo de algodón [3]. Algunos compuestos orgánicos de arsénico se usan como suplementos en alimentos para animales. Cantidades pequeñas del elemento metálico se agregan a otros metales para formar aleaciones con mejores características físicas como en baterías para auto-

móviles. Otro uso importante es en semiconductores y en diodos luminosos [4] (arseniuro de galio).

El arsénico puede pasar al aire y al agua desde el suelo debido al polvo que levanta el viento, el agua de escorrentía, el agua que se filtra a través del suelo, erupciones volcánicas, en las fundiciones para obtener cobre y plomo y en incineradores porque a menudo el carbón y los productos de desecho lo contienen.

Como es lógico, el elemento no se destruye en el medioambiente, sino que tan solo cambia de forma al reaccionar con oxígeno o con otras moléculas presentes en el aire, agua o suelo, o por la acción de bacterias que viven en el suelo o el sedimento. Muchos compuestos comunes de arsénico son solubles y así pueden pasar a lagos, ríos o al agua subterránea disolviéndose en el agua de lluvia o la nieve o en desagües industriales. Aunque algunos peces y mariscos incorporan arsénico que puede acumularse en los tejidos, la mayor parte de este arsénico se encuentra en una forma orgánica (arsenobetaína) que es mucho menos peligrosa, como hemos discutido extensamente en el Capítulo 3.

La concentración del elemento en el suelo varía entre 1 y 40 $\mu g\ g^{-1}$ [5]. Sin embargo, los suelos situados cerca de depósitos geológicos ricos en arsénico, cerca de algunas minas y/o fundiciones, o en áreas agrícolas donde se usaron plaguicidas con arsénico en el pasado, pueden tener niveles mucho más altos [6,7]. Por lo general, la concentración en agua de superficie o subterránea es aproximadamente 1 $\mu g\ L^{-1}$, pero puede exceder 1000 $\mu g\ L^{-1}$ en áreas de minería o donde los niveles de arsénico en el suelo son elevados [8] por razones naturales debido a la geología de los materiales primarios. Generalmente, el agua subterránea contiene niveles mayores que el agua de superficie. Estudios del agua potable en zonas no contaminadas indican un contenido medio de 2 $\mu g\ L^{-1}$. Los niveles en los alimentos varían entre 20 y 140 $ng\ g^{-1}$ [9]. Sin embargo, los niveles de arsénico inorgánico, la forma que genera mayor preocupación, son mucho más bajos. En el aire varían entre menos de 1 y 2000 $ng\ m^{-3}$, dependiendo de la localidad, las condiciones climáticas y el nivel de actividad industrial en el área. Por lo que a las áreas urbanas se refiere, los niveles se encuentran entre 20 y 30 $ng\ m^{-3}$.

En la mayoría de los casos el arsénico entra al organismo a través del aire, el agua y principalmente los alimentos [10]. La mayor fuente de ingesta del elemento a través de la dieta son los mariscos [11], seguidos por el arroz, hongos y aves de corral [12]. Aunque los mariscos contienen la cantidad de arsénico más alta, éste en peces y mariscos está principalmente en forma orgánica, mucho menos peligrosa. Algunas algas marinas pueden contener formas inorgánicas de arsénico que pueden ser más peligrosas [13].

Tanto la forma inorgánica como la orgánica de arsénico se excretan por la orina en unos días, pero una parte permanecerá en el cuerpo durante meses o más tiempo, sobre todo las formas inorgánicas [14]. Se sabe que contenidos de arsénico en agua de 60 µg L^{-1} pueden ser fatales. Tal vez el efecto más característico de la exposición oral prolongada a la forma inorgánica es un cuadro de alteraciones de la piel [15]. Este concluye con un oscurecimiento de la piel y la aparición de pequeños callos o verrugas en la palma de las manos, la planta de los pies y el torso, a menudo asociados con alteraciones en los vasos sanguíneos de la piel. También se puede desarrollar cáncer de piel, hígado, vejiga y pulmón.

La información acerca de los efectos de los compuestos orgánicos de arsénico en seres humanos es muy escasa. Los estudios en animales indican que la mayoría de los compuestos orgánicos simples (por ejemplo, los compuestos de metilo y dimetilo) son menos tóxicos que las formas inorgánicas [16]. En animales, la ingestión de las especies metiladas puede producir diarrea, y la exposición de por vida puede dañar los riñones.

Una importante fuente de exposición humana a arsénico en este mundo globalizado puede ser a través de la ingesta de verduras y otros alimentos cultivados en suelos contaminados o regados con agua de elevado contenido en el elemento. Un ejemplo claro de esto último lo tenemos en los cultivos de arroz, que si bien en algunos países no suponen inconveniente alguno, si lo representan en Bangladesh y otras zonas de Asia, donde el riego con aguas subterráneas contaminadas [17] supone que entre 35 y 77 millones de personas están constantemente expuestas a este peligro [18]. Se ha establecido [19] que aproximadamente el 43% de los más de 50000 pozos de agua analizados en 64 regiones de Bangladesh tienen concentraciones de arsénico por encima de 10 µg L^{-1} (nivel máximo recomendado por la Organización Mundial de la Salud, WHO) y el 28 %

presenta niveles superiores a 50 µg L^{-1}. Con estos datos se estima que entre 200000 y 270000 personas morirán de cáncer únicamente en este país por ese motivo.

La estimación de la cantidad de arsénico presente en vegetales y otras plantas utilizadas en el consumo humano ha despertado desde hace tiempo gran interés [20-24]. Se ha encontrado que el contenido en vegetales y otros cultivos incrementa según la secuencia: grano « hoja < tallo « raíz [21]. Las concentraciones más bajas en las partes aéreas de la planta son debidas a la incapacidad de la planta para trasladar el arsénico más allá de las raíces.

Un suelo de regadío típico en Bangladesh contiene entre 4 y 8 µg g^{-1} [25] del elemento, pero cuando está regado con aguas contaminadas el contenido aumenta hasta más de 80 µg g^{-1}. La combinación de suelos y aguas con elevado contenido en arsénico constituye un peligro no solo para la población autóctona, sino que, como parte de la producción se exporta al resto del mundo, aparece un problema global. La Tabla 4.1 muestra los contenidos totales de arsénico encontrados en muestras de arroz provenientes de algunas regiones de Asia. Estudios similares realizados sobre arroz cultivado en España indican un contenido total en arroz blanco y moreno de 220 ng g^{-1} [26]. Los estudios estadísticos han demostrado que el riesgo de padecer cáncer posiblemente atribuible a arsénico inorgánico varía mucho entre países, siendo estimado a través de la mediana como tan solo un 0.7 por 10000 en Italia mientras que para Bangladesh es de 22 [27].

Tabla 4.1: Contenidos de arsénico en muestras de arroz de distintas regiones de Asia*

Región	Número de muestras	[As], ng g^{-1} Media	Intervalo	Referencia
Bangladesh	214	143	2-557	[28]
Bangladesh	4	11.3	<5-20.2	[29]
Bangladesh (arroz boro)	78	183	108-331	[30]
Bangladesh (arroz aman)	72	117	72-170	[30]
Bangladesh	10	136	40-270	[31]
Bangladesh	15	130	30-300	[32]
Bangladesh	13	496	58-1835	[33]
Bangladesh (arroz boro)	133	-	40-910	[34]
Bangladesh (arroz aman)	189	-	<40-920	[34]
Jalangi, Bengala Occidental, India	11	232	408-605	[35]
Domkal, Bengala Occidental, India	23	233	78.8-546	[35]
Kolsur, Bengala Occidental, India	8	358	120-336	[36]
China	11	501	283-725	[37]
Taiwan (1993)	2	200	190-210	[38]
Taiwan (1995)	5	130	63-170	[38]
Vietnam	31	208	32-465	[39]

* Tomado de [28]

De lo expuesto hasta ahora pareciera inferirse que los contenidos más elevados de arsénico en el arroz se dan en los cultivos de Asia. Sin embargo esto no es cierto, al menos de forma general. En un extenso estudio sobre el contenido de arsénico en el arroz producido y consumido en varios países del mundo [40] se concluye que los mayores contenidos se encuentran, de forma sorprendente, en los producidos en EE.UU. La Figura 4.1 (adaptada de [40]) muestra los valores publicados. En este estudio, se concluye que los contenidos medios encontrados en producciones europeas y de EE.UU. (198 ng g^{-1}) son significativamente mayores que los encontrados en cultivos de Asia (70 ng g^{-1}). En un estudio posterior [41] de estos mismos autores se incide en el hecho de que en el grano de arroz no solamente están presente el arsénico como As(III) y As(V), sino también como MA y DMA, especies éstas últimas mucho menos tóxicas. Además, la abundancia de este arsénico metilado depende de la zona de procedencia [32]. Así se han presentados resultados que indican que el arroz de EE.UU. presenta un 42 % de arsénico inorgánico, mientras que el de Europa y Bangladesh alcanza el 60 y 80 %, respectivamente.

Todos los estudios sobre la ingesta de vegetales coinciden en que la especiación de arsénico es crítica para determinar su fitotoxicidad y fitodisponibilidad. Los resultados obtenidos en cultivos hidropónicos con arsénico orgánico e inorgánico indican una cinética de absorción bien diferenciada. A modo de ejemplo podemos decir que en *Spartina*

alterniflora y nabos la menor velocidad de absorción por parte de la planta corresponde a DMA y sigue en el orden: DMA < MA < As(V) < As(III) [42,43].

Los estudios realizados con vegetales y plantas indican que As(III) y As(V) son las únicas especies presentes en estos materiales [44]. Por lo general, la especie mayoritaria es As(III) (entre el 67 y 90 % del arsénico de la raíz) debido a la reducción de As(V), lo que disminuye su toxicidad dentro de la célula al no competir con fosfato en el ciclo del ATP [45]. En cultivos hidropónicos de lechuga, rábano, acelga y frijol se ha estudiado el contenido en arsénico en raíz, tallo y hoja [46]. El contenido en estas plantas sigue la secuencia: raíz >> tallo > hoja y se han podido determinar contenidos de hasta 278 µg g^{-1} de arsénico en el tejido de la raíz. Los estudios de especiación en estas muestras indican que solamente hay arsénico inorgánico y no se ha podido identificar ninguna forma or-

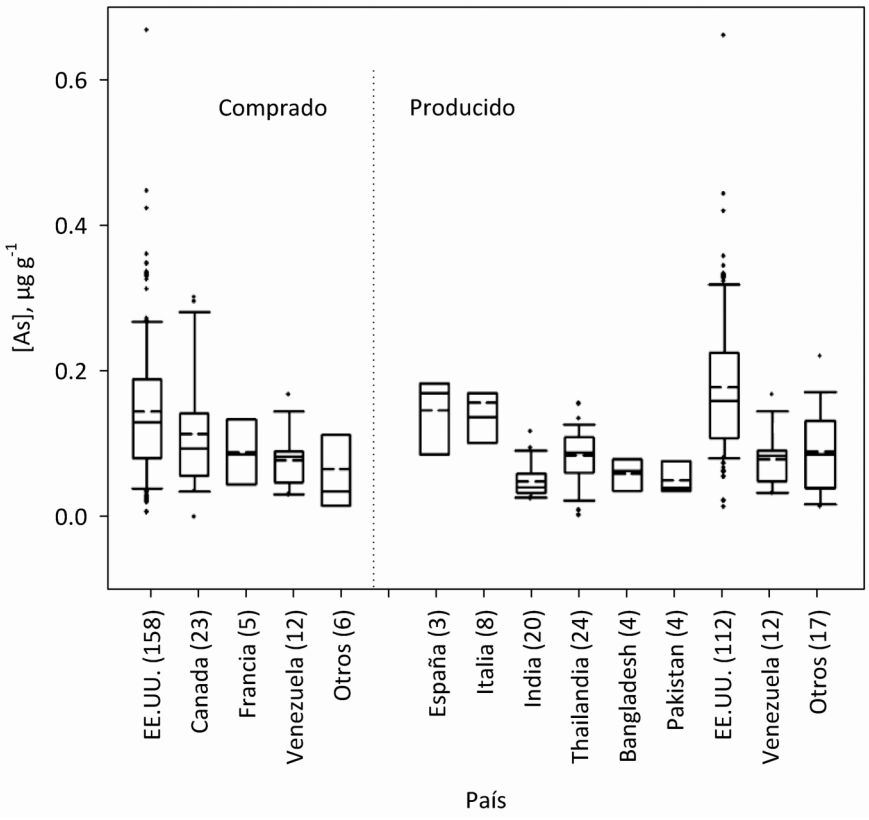


Figura 4.1: Concentración total de arsénico en grano de arroz según el país de compra y producción. Los números entre paréntesis corresponden al número de muestras. La caja representa el intervalo entre el percentil 25 y el 75. Los bigotes corresponden a los percentiles 5 y 95. Los puntos sueltos son valores que se salen de estos límites. La línea continua dentro de la caja es la mediana y la discontinua la media. Adaptada de [40].

gánica. A esta misma conclusión se ha llegado en la especiación de arsénico en acelgas y amaranto [47], concluyendo que en la parte comestible se encuentra especialmente As(III).

Mientras que el arsénico inorgánico es lo único que se ha detectado en vegetales y plantas cultivadas con aguas no problemáticas, el ácido dimetil arsínico (DMA) se ha encontrado en cultivos regados con aguas contaminadas. En tales casos, esta especie supone entre el 1 y 89 % del total del elemento y ello depende de la forma de cultivo, la localidad y condiciones de desarrollo [32,48].

En estudios realizados sobre granos de arroz de distintos países se concluye que existen cultivos en los que el nivel de As(III) se mantiene constante en las muestras y el arsénico total varía de forma lineal con la concentración de DMA. Sin embargo, en otros cultivos es el DMA la magnitud constante y el arsénico total quien varía de forma lineal con el arsénico inorgánico [41]. Estudios de especiación y localización realizados sobre granos de arroz blanco y moreno de distintas procedencias revelan que el arroz moreno presenta contenidos más elevados de la forma inorgánica. Además, el arsénico inorgánico se localiza principalmente en la capa externa del grano de arroz moreno, mientras que en el blanco se encuentra homogéneamente distribuido [49]. El motivo de este comportamiento aún no se conoce pero es evidente que supone un aspecto de interés por la repercusión que tiene en la salud humana. Para ello es preciso conseguir mayor información sobre la naturaleza de las especies de arsénico presentes en las muestras, la proporción de cada una de las especies respecto del total y el nivel de biodisponibilidad de estas formas [47,50].

La especiación de niveles traza de arsénico en muestras ambientales y biológicas requiere la separación efectiva de las distintas formas y una elevada sensibilidad en la detección. La forma más habitual, aunque no siempre [51-53], de separar las especies químicas en los extractos de las muestras es mediante el empleo de HPLC debido a su eficiencia, seguridad y rapidez [54-56]. Para conseguir una elevada sensibilidad en la detección, resulta frecuente la combinación de HPLC con ICP-MS [57] o generación de hidruros y fluorescencia atómica (HG-AFS) [58].

Mientras que agua, orina y suero pueden analizarse directamente, en el caso de suelo y tejidos animales y vegetales es preciso incluir una etapa de extracción [59,60]. No se dispone en la actualidad de un procedimiento de extracción definitivo que extraiga los analitos con elevada eficiencia manteniendo la integridad de su forma química. La mayor parte de las investigaciones se han realizado sobre organismos marinos extrayendo en disolventes orgánicos polares (metanol, agua:metanol, agua:metanol:cloroformo) con agitación [61], sonicación [62], calentamiento en microondas [63] o extracción acelerada con disolventes [62,64]. Sin embargo, en vegetales, donde la mayor parte del arsénico está como As(III) y se encuentra fuertemente enlazado al grupo –SH de las proteínas, la extracción con disolventes orgánicos [65,66] es incapaz de romper los enlaces de As(III) a la matriz. Mejores resultados se han obtenido con ácido trifluoroacético (TFA) [67], aunque el As(V) se puede reducir a la forma trivalente durante el proceso de extracción [68]. La digestión enzimática también permite obtener elevados porcentajes de extracción, pero se ha observado la oxidación de As(III) a As(V) [69]. Si bien la extracción acelerada con disolventes es adecuada para el arsénico orgánico, los resultados obtenidos para las formas inorgánicas suelen ser bajos [70]. Se han conseguido recuperaciones entre el 80 y 100 % en arroz con el empleo de proteasa XIV + α-amilasa y ultrasonidos [10]. Elevados valores de extracción se han obtenido también con el empleo de ultrasonidos en medio 1 mol L^{-1} de H_3PO_4 al 0.1 % m/v de Triton X-114 [71] y mediante extracción asistida por microondas con disolventes orgánicos [72,73].

La producción mundial de arroz está muy concentrada en Asia. Entre China, India, Indonesia y Bangladesh se produce el 70 % del arroz mundial [74]. España es el segundo país productor de arroz de Europa detrás de Italia [75]. Esta circunstancia, el elevado consumo de arroz en algunas regiones en todo el mundo, y la importante presencia de arsénico inorgánico en las muestras hace muy interesante el disponer de un procedimiento rápido que permita distinguir entre arsénico inorgánico (tóxico) y orgánico (menos tóxico, formado por MA y DMA).

La masa característica de arsénico en ETAAS con efecto Zeeman y atomización electrotérmica es de 40 pg. Esto supone que la inyección de 20 µL de una disolución de 2 µg L^{-1} en el atomizador conducirá, en las mejores condiciones, a una señal de 0.0044, pro-

bablemente muy próxima al LOD. En la introducción directa de muestra en el atomizador no es habitual la preparación de suspensiones de concentración superior al 10 % m/v, lo que supone que la muestra debe contener al menos 20 ng g^{-1}. Este valor podría permitir la determinación de arsénico total en arroz mediante la preparación de suspensiones, pero la sensibilidad es baja si se pretende hacer especiación.

En esta memoria hemos abordado este desafío pues entendemos que ETAAS puede ser una alternativa interesante a ICP-MS y AFS debido a su simplicidad, asequibilidad y robustez. Sin embargo presenta un inconveniente claro, no se le puede acoplar, al menos de forma sencilla, un sistema en flujo continuo como es HPLC para lograr la separación de las formas químicas. En esta Memoria se presenta un procedimiento que permite la separación cromatográfica, sin HPLC, de las formas químicas de arsénico en harina de arroz. Su combinación con técnicas de microextracción permite aumentar la sensibilidad de la técnica ETAAS hasta los niveles necesarios para poder cuantificar los contenidos con seguridad.

4.2. PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1. INSTRUMENTACIÓN

Se ha utilizado un espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer Modelo 800 equipado con corrector de fondo de deuterio y corrección Zeeman (Figura 1.7), un atomizador de horno de grafito THGA y un automuestreador AS-800 (Perkin-Elmer, Shelton, USA). Los tubos equipados con plataforma de L'Vov fueron de grafito pirolítico y se obtuvieron del mismo fabricante (referencia B050-4033). Como gas inerte se ha empleado argón, con una velocidad de flujo de 250 mL min^{-1} en todas las etapas, excepto en la de atomización en que el flujo se detuvo. Para la introducción directa de suspensiones se ha incluido una etapa de calcinación con aire a 150 mL min^{-1} y la máxima temperatura aplicable con seguridad, 500 °C. Se ha utilizado una lámpara de descarga sin electrodos de arsénico (Perkin-Elmer) operando a 380 mA. Los parámetros instrumentales seleccionados se muestran en la Tabla 4.2. En ella se detallan también los programas de calentamiento utilizados para la medida de arsénico total en los extractos de las suspensiones en TMAH y en los disolventes orgánicos resultantes de los procesos DLLME propuestos. La determinación de arsénico total por formación de hidruro (arsina) con la técnica HG-AFS se llevó a cabo utilizando un sistema de flujo continuo PSA Millenium Excalibur (PS Analytical, Orping, UK).

Para los trabajos con ultrasonidos se utilizó un baño de ultrasonidos ATU mod. ATM 40-0.7LC (Valencia, España) de 50 W a 40 kHz y una sonda de 200 W de potencia Dr. Heilscher (Germany) modelo UP200H equipada con vástagos de 5 y 10 mm de titanio. El calentamiento de la muestras se ha realizado en un horno microondas doméstico de 850 W de potencia. La centrifugación de las dispersiones se realizó en la centrífuga Unicen 21 (Madrid, España) con rotor y adaptador para tubos falcon de 15 mL hasta 4000 rpm. La mineralización de las muestras con fines de comparación se llevó a cabo utilizando un rotor 8SXF100 equipado con 8 vasos de teflón cerrados, con camisa cerámica, resistentes hasta 310 °C y 140 bar y control simultáneo de presión y temperatura, en un horno microondas Anton-Paar modelo Multiwave 3000 (Figura 3.7).

Tabla 4.2. Parámetros instrumentales y programa de calentamiento.

Parámetro	*Valor*
Corriente de la lámpara, mA	380
Longitud de onda, nm	193.7
Rendija, nm	0.7
Tipo de atomizador	Plataforma
Volumen de muestra inyectada, µL	20
Modificador químico	20 µg Pd
Gráfica de calibrado, µg L^{-1}	6-200 para suspensiones 0.06-2 para DLLME
Líquido extractante, µL	400 metanol al 12.5 % en Cl_4C
Cantidad de muestra, g	1 en 10 mL
Límite de detección en muestras, ng g^{-1}	30 ng g^{-1} para suspensiones 0.3 ng g^{-1} para DLLME
RSD, %	< 5

Programa de horno para arsénico en suspensiones de TMAH

Etapa	Temperatura, °C	Rampa, °C s^{-1}	Mantenido, s
1: Secado	110	10	30
2: Secado	130	5	30
3: Calcinación[a]	500	5	40
3: Calcinación	500	1	15
4: Calcinación	800	5	30
4: Atomización[b,c]	2400	0	5
5: Limpieza	2600	0	3

[a] Aire como gas alternativo a 150 mL min^{-1}; [b] El flujo de argón interno se detuvo; [c] Etapa de lectura

Programa de horno para arsénico por DLLME

Etapa	Temperatura, °C	Rampa, °C s^{-1}	Mantenido, s
1: Secado	90	5	30
2: Calcinación	400	15	20
3: Atomización[a,b]	1900	0	4
4: Limpieza	2600[c]	0	3

[a] El flujo de argón interno se detuvo; [b] Etapa de lectura; [c] utilizar 2400 °C si se emplea tubo recubierto de volframio

Tabla 4.3. Programa de calentamiento para acondicionar el atomizador después del tratamiento con volframato sódico

Etapa	Temperatura, °C	Rampa, °C s^{-1}	Mantenido, s
1	120	1	120
2	200	5	120
3	1200	5	30
4[a]	2400	1	6

[a] El flujo de argón interno se detuvo

4.2.2. TRATAMIENTO DE LOS TUBOS CON VOLFRAMIO

Se ha utilizado volframio como modificador permanente [76] en la determinación de arsénico extraído en tetracloruro de carbono. Para ello tanto el tubo como la plataforma de L'Vov se sumergen en 100 mL de una disolución que contiene 1 g L^{-1} de $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ y se dejó estar a presión atmosférica durante 12 h. A continuación se secó en horno a 120 °C durante 4 h y, finalmente, se aplicó el programa de calentamiento que aparece en la Tabla 4.3.

4.2.3. REACTIVOS

Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada (18 MΩ cm) purificada con un sistema Milli-Q academic system (Millipore, Bedford, MA, USA). Todo el material de vidrio se lavó con disolución al 10% v/v de ácido nítrico y se aclaró con agua desionizada antes de su uso. Las disoluciones estándar de 1000 µg mL^{-1} se prepararon disolviendo los estándares de As(III), $NaAsO_2$, y As(V), Na_2HAsO_4, (Fluka, Buchs, Switzerland) en agua y se almacenaron en botellas de PTFE a 4°C. Las disoluciones estándar de 1000 µg mL^{-1} en arsénico de ácido cacodílico [$(CH_3)_2As(O)OH$, DMA, Sigma, St. Louis, MO, USA] y metilarsinato sódico [$CH_3AsO(ONa)_2 \cdot 6H_2O$, MA, Carlo Erba, Milan, Italia] se prepararon en agua y se mantuvieron a 4 °C en botellas de PTFE. Las disoluciones de trabajo, más diluidas, se prepararon diariamente. La disolución estándar de arsenobetaína se obtuvo a partir del material de referencia BCR CRM 626 suministrado por el Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) con un contenido certificado de arsenobetaína de 1031 ± 6 µg g^{-1} (433 ± 3 µg g^{-1} de arsénico). Como modificadores químicos se utilizó nitrato de paladio, volframato sódico y bis(benzonitrilo) dicloro paladio [77], todos de Sigma-Aldrich. Este último modificador se prepara disolviendo 0.03 g del producto en 500 µL de acetona y llevando a 10 mL con etanol. La disolución de pirrolidínditiocarbamato amónico (APDC) 0.1 mg mL^{-1} se preparó disolviendo el compuesto (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) en metanol de alta pureza. La disolución de 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) se preparó al 10 % en metanol. La disolución al 0.7% m/v de borohidruro sódico se preparó diariamente disolviendo el producto (Aldrich) en diso-

lución de hidróxido sódico 0.075 mol L^{-1}. La disolución reductora se preparó disolviendo 2.5 g de ioduro potásico y 0.5 g de ácido ascórbico (Fluka) en 5 mL de agua. Los hidruros volátiles formados fueron conducidos con argón hasta la llama del espectrómetro de fluorescencia atómica. Air Liquide (Madrid, España) suministró todos los gases empleados.

Para los procesos de intercambio iónico han utilizado cartuchos SPE de intercambio aniónico DSC-SAX y catiónico DSC-SCX de Supelco (Sigma-Aldrich), ambos de 6 mL con 500 mg de relleno. Otros intercambiadores aniónicos (Dowex® 1X8, Amberlita IRA400, AG1-X8 e IRA 473) y catiónicos (Dowex® 50W X8 y Amberlita AG50W-X8) ensayados fueron de Sigma con los que se rellenaron minicolumnas de vidrio de Omnifit (Cambridge, Reino Unido) de 5 cm de longitud que albergan un volumen interno de 1.7 mL. Para los montajes de flujo se utilizó una bomba peristáltica Minipulse 4 de Gilson (Francia). Los tubos de PTFE y conexiones fueron también de Omnifit.

4.2.4. MUESTRAS Y MATERIALES DE REFERENCIA

Se han utilizado muestras de arroz suministradas por la empresa Hero España S.A. de procedencia desconocida por nosotros que etiquetamos como M1 a M6. No se hizo tratamiento adicional alguno a las muestras, que se analizaron tal y como se recibieron.

El método se validó utilizando los materiales de referencia certificados, NIST-SRM 1568a (harina de arroz), 1573 y 1573a (hojas de tomate), 1572 (hojas de cítricos) y 1566a (tejido de ostra) del National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA y DORM-2 (tejido muscular de pescado) y DOLT-2 (tejido muscular e hígado de pescado) del National Research Council of Canada. Estos materiales solamente están certificados para el contenido total de arsénico, aunque se han hecho numerosos estudios que proporcionan información sobre los contenidos de la mayoría de las diferentes especies de arsénico.

4.2.5. DIGESTIÓN DE LAS MUESTRAS EN MICROONDAS

Para determinar el contenido total en arsénico en las muestras de harina de arroz se procedió a su mineralización empleando un digestor de microondas y una variante del método U.S. EPA 3052 [78]. Para ello en cada vaso del digestor se colocan 0.5 g de harina de arroz, 7 mL de HNO_3 concentrado y 2 mL de H_2O_2 concentrado. Los vasos se dispusieron en un rotor de alta presión y se sometieron al programa de calentamiento que aparece en la Tabla 4.4. Las muestras digeridas se llevaron con HCl 3.5 mol L^{-1} a 25 mL. Estas disoluciones se sometieron al procedimiento de determinación de arsénico por formación de arsina que se detalla seguidamente.

Tabla 4.4: Programa de calentamiento en el microondas para la digestión de las muestras de arroz

Etapa	Potencia	Tiempo de rampa, min	Tiempo de mantenido, min	Ventilación
1	600	5	2	1
2	900	5	2	1
3	1400	15	20	1
4	0	0	15	3

Limitaciones: P_{max} = 55 bar; T_{max} = 180 °C; $(\Delta P/\Delta t)_{max}$ = 0.3 bar s^{-1}.

4.2.6. ARSÉNICO TOTAL MEDIANTE HG-AFS

A 10 mL de la disolución resultante del proceso de digestión se añaden 0.1 mL de disolución reductora conteniendo ioduro potásico al 50 % (m/v) y ácido ascórbico al 10 % (m/v). Se deja reposar durante 30 min para permitir la completa reducción a As(III). El contenido total en arsénico se determina por HG-AFS utilizando las condiciones experimentales que aparecen en la Tabla 4.5. La recta de calibrado resultó lineal entre 0.1 y 2 µg L^{-1} de arsénico. Teniendo en cuenta la cantidad de muestra tomada y los efectos de dilución del procedimiento, el límite de detección (criterio de tres veces la desviación estándar del ensayo en blanco) resultó ser de 3 ng g^{-1} de arsénico total en la muestra original.

Tabla 4.5: Condiciones experimentales propuestas para la determinación de arsénico por HG-AFS	
Parámetro	Valor
Longitud de onda, nm	197.3
Corriente primaria, mA	27.5
Corriente de refuerzo, mA	35
Tiempo de retraso, s	10
Tiempo de análisis, s	30
Tiempo de memoria, s	30
[HCl], mol L^{-1}	3.5
[$NaBH_4$], % (m/v)	0.7
Caudal de argón, mL min^{-1}	330
Caudal de aire, mL min^{-1}	2.5
Caudal de portador, mL min^{-1}	9
Caudal de $NaBH_4$, mL min^{-1}	4.5

4.2.7. ARSÉNICO TOTAL MEDIANTE ETAAS

Alternativamente al empleo de HG-AFS y con un LOD algo más alto se ha empleado ETAAS para determinar el contenido total de arsénico en las muestras de arroz. Se ha utilizado el procedimiento propuesto en 2.2.8 ligeramente modificado porque las muestras de harina de arroz contienen menos agua que los alimentos infantiles y por tanto el efecto matriz es más importante. En este caso 1 g de harina se suspende en 10 mL de TMAH al 10 % v/v calentando a 80 °C durante 10 min. A continuación se somete a ultrasonidos durante 15 min con la sonda de ultrasonidos equipada con el vástago de titanio de 5 mm de diámetro. La potencia se aplicó al 50 % en lapsos de 0.5 s. La determinación del contenido total de arsénico se realiza por aplicación del programa de calentamiento que aparece en la Tabla 4.2. La cuantificación se realizó por adiciones estándar de arsénico de 10, 20 y 40 µg L^{-1} a esta suspensión. Como modificador se utilizó nitrato de paladio de 2000 µg mL^{-1} del que se inyectaron 10 µL junto con la muestra en el atomizador. El límite de detección calculado en base a tres veces la desviación estándar del ensayo en blanco resultó ser de 30 ng g^{-1}.

Si este procedimiento se aplica al sobrenadante de la suspensión tratada con TMAH el contenido en arsénico total no presenta diferencias significativas con el encontrado al emplear la suspensión completa ya que la extracción es cuantitativa, y se tiene la ventaja añadida de que se genera menos residuo carbonáceo en el atomizador.

4.2.8. EXTRACCIÓN DE LAS FORMAS DE ARSÉNICO EN MEDIO ALCALINO

Tome hasta 1 g de muestra en un tubo de ensayo de vidrio y añada 5 mL de TMAH al 10 % v/v. Mezcle y caliente a 80 °C durante 10 min. Deje enfriar y añada 5 mL de metanol. Introduzca el vástago de titanio de 5 mm de diámetro de la sonda de ultrasonidos y aplique 15 min al 50 % de potencia a intervalos de 0.5 s. Centrifugue la suspensión resultante a 4000 rpm y separe el sobrenadante para el estudio de especiación.

4.2.9. EXTRACCIÓN DE LAS FORMAS DE ARSÉNICO EN MEDIO ÁCIDO

Tome hasta 1 g de muestra en un tubo de ensayo de vidrio y añada 5 mL de HCl 0.5 M conteniendo Triton X-100 al 0.1 % v/v. Mezcle y caliente a 80 °C durante 10 min. Deje enfriar y añada 5 mL de metanol. Introduzca el vástago de titanio de 5 mm de diámetro de la sonda de ultrasonidos y aplique 15 min al 50 % de potencia e intervalos de 0.5 s. Centrifugue la suspensión resultante a 4000 rpm y separe el sobrenadante para el estudio de especiación.

La Figura 4.2 muestra un esquema general del procedimiento de separación y determinación de As(III), As(V), MA, DMA y AB.

4.2.10. SEPARACIÓN DE ESPECIES TRAS EL TRATAMIENTO ALCALINO

Preacondicione un cartucho SPE de intercambio aniónico del tipo DSC-SAX (A) con 5 mL de TMAH al 1% v/v y un cartucho SPE de intercambio catiónico del tipo DSC-SCX (B) con HCl 0.5 M. Pase 5 mL del sobrenadante del proceso 4.2.8 por A y recoja lo que sale del cartucho en un tubo de ensayo. En A se retiene todo el arsénico inorgánico (iAs) y MA. Lave con 1 mL de TMAH al 1 % v/v y recoja este líquido en el mismo tubo. Acidule esta disolución con HCl 1 M hasta pH=1 y pásela por el cartucho B. En B se retienen DMA y AB. El eluido de la columna se desecha así como 1 mL de HCl 0.5 M que se utiliza para lavar.

Para eluir iAs y MA pase por el cartucho A 5 mL de HCl 0.5 M y recoja el eluido para aplicar los procedimientos de preconcentración DLLME recomendados para As(V) y MA. En este eluido todo el arsénico inorgánico se encuentra como As(V).

Para eluir DMA y AB pase por el cartucho B 5 mL de NH_4OH 0.5 M y recoja el eluido para aplicar el procedimiento de preconcentración DLLME recomendado para DMA.

En el sobrenadante tras la determinación de DMA se puede medir arsenobetaína directamente.

4.2.11. SEPARACIÓN DE ESPECIES TRAS EL TRATAMIENTO ÁCIDO

Este procedimiento se recomienda para la determinación de As(III) ya que el resto de los analitos se han determinado con el tratamiento alcalino. Preacondicione un cartucho SPE de intercambio aniónico del tipo DSC-SAX (C) con 5 mL de NH_4OH 0.01 mol L^{-1}. Tome 5 mL del sobrenadante del proceso de extracción detallado en 4.2.9 y añada 50 µL de ácido ascórbico al 1 % m/v. Ajuste el pH a 9 con $NaHCO_3$ 1 mol L^{-1}. Pase la disolución resultante por el cartucho SPE aniónico. En estas condiciones As(III), A(V) y MA se retienen en el cartucho. Deseche el eluido del cartucho C.

Para la determinación de As(III) eluya los analitos con 5 mL de HCl 0.5 M y aplique el procedimiento DLLME propuesto para As(III).

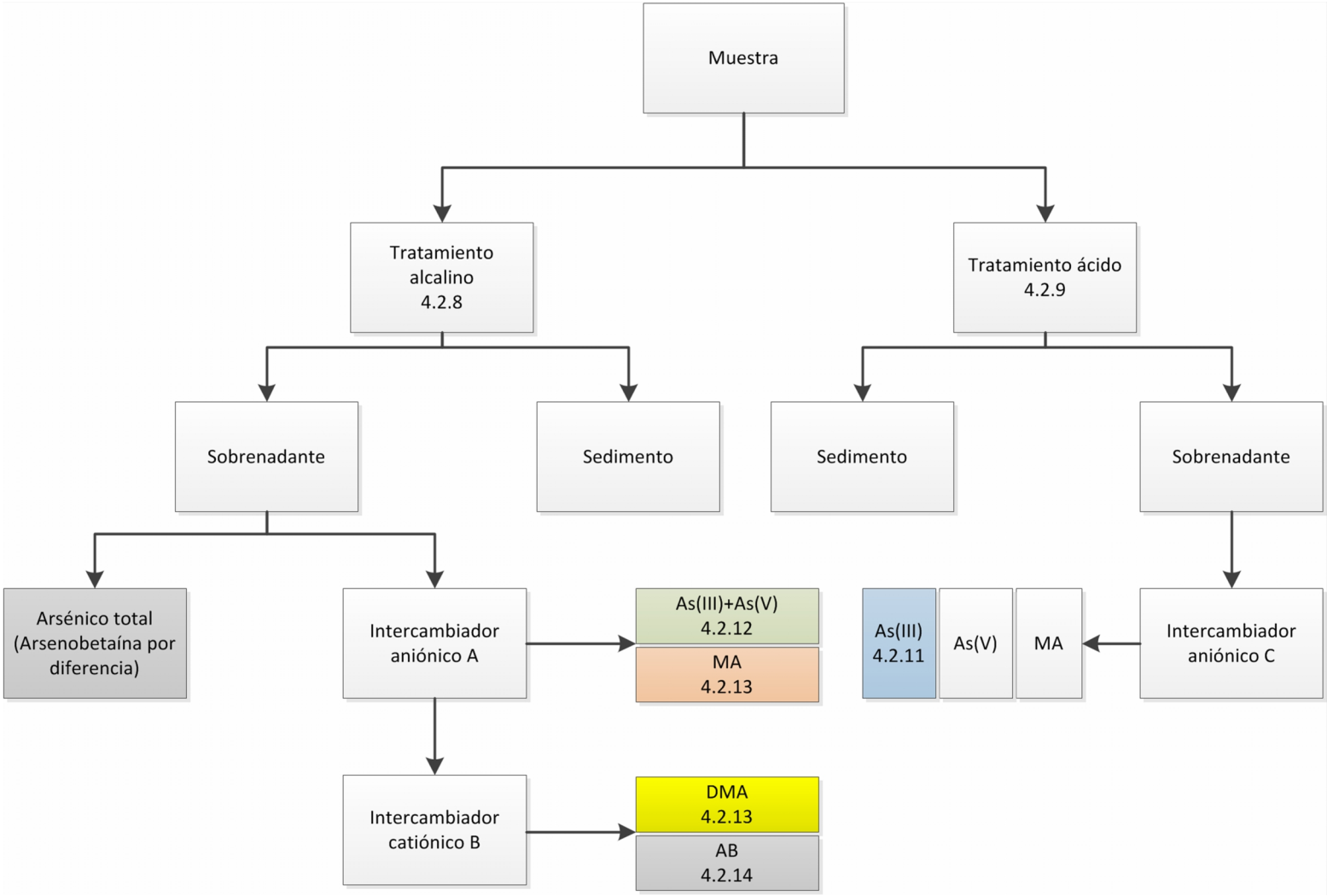


Figura 4.2: Esquema general de los procesos de separación y determinación propuestos

4.2.12. PROCEDIMIENTO DLLME PARA As(III) Y As(V)

El tratamiento alcalino y de separación con el empleo de cartuchos aniónico y catiónico detallado en 4.2.10 conduce a los eluidos de los cartuchos A y B. Uno contiene iAs+MA y el otro DMA + AB. La determinación de estos cuatro parámetros suele ser suficiente en la mayoría de las situaciones. No obstante, para aquellas otras en donde se desee conocer el contenido en As(III) se propone el tratamiento ácido y la separación detallada en 4.2.11.

Para la determinación de As(III) tras el tratamiento ácido y la separación por intercambio aniónico se propone el siguiente procedimiento de preconcentración por microextracción líquido-líquido dispersiva. Tome 5 mL de eluido en HCl 0.5 mol L^{-1} (apartado 4.2.11) del cartucho C y añada 400 µL de metanol conteniendo el 12.5 % de Cl_4C y 0.2 mg mL^{-1} de APDC. El complejo As(III)-APDC se forma y extrae en la fase dispersa originada. Centrifugue a 4000 rpm durante 5 min y tome el sedimento de Cl_4C del fondo del tubo aspirando 50 µL con una micropipeta y depositándolos en un tubo eppendorf de 500 µL situado dentro de un vial del automuestreador. De este volumen 35 µL aproximadamente corresponden a la fase orgánica, el resto es fase acuosa que tiene como misión impedir la rápida volatilización aquella. Aplique el programa de calentamiento que aparece en la Tabla 4.2 a 20 µL de fase orgánica utilizando paladio como modificador. La gráfica de calibrado es lineal entre 0.06 y 2 µg L^{-1} de arsénico en fase acuosa.

Para determinar el contenido en As(V) se ofrecen dos alternativas. Por una parte el eluido en HCl 0.5 mol L^{-1} del cartucho A contiene todo el arsénico inorgánico como As(V). Por otra parte, en el eluido del cartucho C, tras determinar el contenido en As(III) se puede utilizar para determinar el contenido en As(V). En ambos casos el proceso de determinación exige la previa reducción del As(V) a As(III). Desde el punto de vista práctico es más cómoda la primera opción. Para ello a 5 mL de eluido en HCl 0.5 mol L^{-1} (apartado 4.2.10) del cartucho aniónico A añada 100 µL de tiosulfato sódico 0.2 mol L^{-1}. Deje reposar durante 15 min y aplique el procedimiento anterior. De esta manera se calcula la concentración de As(III) + As(V). Por diferencia a la anterior se puede conocer la de As(V).

4.2.13. PROCEDIMIENTO DLLME PARA MA Y DMA

MA y DMA reaccionan con 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) formando compuestos neutros extraíbles en disolventes orgánicos. Por tanto, para poder determinarlos no pueden estar juntos. Además As(III) y As(V) reaccionan de la misma forma, por lo que tampoco deben estar presentes. En nuestro caso, el eluido en HCl del cartucho A después de determinar iAs resulta adecuado para la determinación de MA. Para la determinación de DMA recurriremos al eluido en NH_4OH del cartucho B, pues AB no reacciona con BAL. El proceso en ambos casos es el mismo.

Tome 5 mL del eluido del cartucho A después de determinar el iAs o 5 mL del eluido del cartucho B y añada 100 µL de BAL al 6 % v/v en metanol. Someta a ultrasonidos durante 15 min en caliente (40 °C). Después de enfriar a temperatura ambiente añada 400 µL de metanol conteniendo el 12.5 % de Cl_4C. Se forma la fase dispersa y se extrae el compuesto neutro resultante de la reacción de MA o DMA con BAL. Centrifugue a 4000 rpm durante 5 min y tome el sedimento de Cl_4C del fondo del tubo aspirando 50 µL con una micropipeta y depositándolos en un tubo eppendorf de 500 µL situado dentro de un vial del automuestreador. De este volumen, 35 µL corresponden a la fase orgánica, el resto es fase acuosa que tiene como misión impedir la rápida volatilización de aquella. Aplique el programa de calentamiento que aparece en la Tabla 4.2 a 20 µL de fase orgánica utilizando paladio como modificador. La gráfica de calibrado es lineal entre 0.06 y 2 µg L^{-1} de arsénico en fase acuosa.

4.2.14. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE AB

Se proponen dos procedimientos para determinar arsenobetaína sin preconcentración.

4.2.14.1. A PARTIR DEL SOBRENADANTE DE LA SUSPENSIÓN ALCALINA

La aplicación del procedimiento detallado en 4.2.7 permite conocer el contenido total de arsénico en la muestra de harina de arroz. Por diferencia entre este valor y la suma de los encontrados para iAs, MA y DMA calculamos el contenido en AB.

4.2.14.2. A PARTIR DEL ELUIDO DEL CARTUCHO CATIÓNICO

La fase acuosa que queda tras el proceso DLLME para DMA realizado al eluido del cartucho B contiene únicamente arsenobetaína. La medida del contenido en arsénico de esta disolución utilizando el programa de calentamiento propuesto en la Tabla 4.2 permite conocer la concentración de arsenobetaína comparando frente a estándares acuosos.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El arroz (*oryza sativa*) en grano o harina constituye un alimento básico en muchos países debido a su gran valor nutricional [79], por lo que resulta preciso disponer de procedimientos rápidos que permitan conocer el contenido de elementos traza y metales pesados, así como sus especies químicas.

El arroz, en comparación con otros cereales, es muy susceptible a acumular arsénico. Se han determinado contenidos totales de arsénico en arroz entre 10 y 2050 ng g^{-1} [40]. De este contenido, se estima que entre el 10 y 90% se encuentra presente como arsénico inorgánico (As(III)+As(VI)), mientras que el resto es DMA fundamentalmente [79]. La recomendación de la Organización de alimentos y agricultura (FAO) recomienda no superar la ingesta de 15 µg de As por kilo de peso corporal y semana [10].

Hay pocos trabajos que aborden la especiación química de arsénico en un alimento tan básico como el arroz [41,48,68,71 y 80] y casi todos ellos determinan el contenido de las especies de arsénico con el empleo de ICP-MS tras la separación cromatográfica con intercambio iónico (IC) o bien AFS [68].

A continuación se comentan los resultados obtenidos en la extracción de As(III), As(V), MA, DMA y AB en muestras de harina de arroz, la separación de los analitos utilizando resinas de intercambio iónico en columna y el desarrollo de procedimientos de preconcentración de estas especies mediante microextracción dispersiva al tiempo que se optimizan las condiciones experimentales para conseguir la máxima sensibilidad con ETAAS. Finalmente, se proponen procedimientos sencillos para distinguir entre As(III), As(V), MA y DMA, que son las formas más habituales de arsénico en arroz, aunque nosotros hemos incluido también AB ya que se ha detectado su presencia (minoritaria) en algunas muestras de arroz y harinas de arroz [66].

4.3.1. SELECCIÓN DEL MEDIO DE EXTRACCIÓN

Una de las principales dificultades de un procedimiento de especiación es el proceso de extracción de los analitos. Por una parte ha de ser lo suficientemente enérgico como para conseguir su transferencia a una fase compatible con el detector de forma cuantitativa. Sin embargo, no puede serlo tanto como para provocar la interconversión de formas, por ejemplo, por procesos redox.

La estabilidad de las formas de arsénico en disolución acuosa ha sido revisada [81] y se concluye que en medio ácido (pH < 2) y a temperaturas inferiores a 4 °C As(III), As(V), MA, DMA y AB son estables durante al menos un mes independientemente de que se conserven en plástico o vidrio. Sin embargo, cuando el pH o la temperatura aumentan las disoluciones se hacen inestables. La inestabilidad aumenta exponencialmente cuando los analitos se encuentran en matrices complejas [82]. Incluso sin extraer los analitos, es decir sobre el material almacenado durante cuatro meses, se han observado interconversiones de analitos [66]. En este estudio se observó que el contenido en As(V) o se mantiene constante o disminuye aumentando el de As(III). Los niveles de DMA se mantienen constantes, mientras que los de MA tienden a disminuir. Los niveles de AB o se mantienen constante o bajan. El comportamiento depende de la naturaleza de la muestra y el tratamiento a que ha sido sometida.

La Tabla 4.6 muestra algunos procedimientos de extracción propuestos para la determinación de formas químicas de arsénico en arroz [83]. La mayor parte de estos procedimientos son muy tediosos, no muy adecuados para un método de rutina.

Un problema adicional es la baja concentración de estos analitos. En efecto, a pesar de la buena sensibilidad de la técnica ETAAS, el bajo contenido de arsénico total en las muestras de arroz obliga a realizar tratamientos en donde la masa de muestra se encuentre al menos al 10 % m/v en el medio de extracción. Todos los procesos en medio acuoso o ácido no resultan adecuados en determinaciones directas de suspensiones con ETAAS debido a la enorme cantidad de materia orgánica que solubilizan, generando elevado valores de absorción de fondo en la medida y residuos abundantes de material carbonáceo en el atomizador.

Tabla 4.6. Procedimientos de extracción de especies de arsénico en arroz

Procedimiento	Extracción, %		Ref.
Agua, agua-metanol o HNO_3 0.02 mol L^{-1}, agitación manual	20-30	Extracción baja en muestras reales, buenos resultados en SRM de harina de arroz 1568a	[68]
Extracción acelerada con disolventes, temperatura ambiente, agua-metanol	24-36		[67]
Digestión con α-amilasa y extracción con agua-metanol	59		
Hidrólisis con ácido trifluoroacético	92	Reducción de As(V) a As(III)	[65]
Digestión con α-amilasa, 60 °C, 24 h	80-100	As(III), As(V) y DMA	
Extracción con agua-metanol, ultrasonidos, 10 h	97	As(III), As(V) y DMA	[84]
Digestión a temperatura ambiente con α-amilasa y proteasa + ultrasonidos	95	As(III), As(V), MA y DMA	[10]
Metanol (10 %)+ HNO_3 (2%) + ultrasonidos (2 min)	103.2	As(III), As(V), MA y DMA	[95]

4.3.1.1. EXTRACCIÓN EN MEDIO ALCALINO

De nuestra experiencia previa con suspensiones de alimentos infantiles (capítulo 2 de esta Memoria) se deduce que el empleo de TMAH permite la obtención de medios adecuados para el atomizador electrotérmico. Además, este reactivo se ha utilizado ampliamente como agente solubilizante en tratamientos de extracción de arsénico desde distintas matrices con resultados cuantitativos [64, 85-87] y para la liberación de las formas de arsénico retenidas en soportes cromatográficos [88-90].

De todos es sabido la distinta sensibilidad que tienen en ETAAS las formas químicas de arsénico dependiendo de su grado de metilación. Sin embargo, como ya hemos comentado, y ha sido corroborado por distintos autores [91, 92], en presencia de materia orgánica, el nitrato de paladio se muestra como un modificador químico eficaz y nivelador de la sensibilidad de las formas químicas de arsénico, especialmente en presencia de TMAH [52, 87, 93]. Las pruebas realizadas sobre harina de arroz tratada con TMAH, como se verá más adelante, condujeron a resultados similares a los ya publicados.

Por otra parte, el TMAH tiene un efecto disgregante y solubilizante que, al tiempo que permite la extracción de analitos, genera medios ligeramente digeridos que, al introducirse en el atomizador electrotérmico, conducen a señales con absorción de fondo menores que cuando el tratamiento se realiza en medio ácido o con mezclas de agua+metanol. En nuestro caso, y teniendo en cuenta los niveles de arsénico en las muestras de arroz, es preciso preparar suspensiones al 10 % m/v de harina de arroz en el medio extractante para conseguir una señal medible con seguridad. En estas condiciones, únicamente el empleo de TMAH conduce a señales atómicas con una absorción de fondo compensable por el corrector Zeeman. En el caso de extracciones en medio ácido y con mezclas agua+metanol, la señal de fondo fue demasiado alta para permitir el tratamiento de la señal corregida. La Figura 4.3 muestra las señales atómica corregida y de fondo de arsénico total medido en el sobrenadante de dos suspensiones al 10 % m/v preparadas de dos muestras de harina de arroz en TMAH al 10 % v/v.

A pesar de las buenas características espectrales de la señal medida, se presentaron otros problemas que dificultan la utilización exclusiva de extractos tan concentrados en TMAH. En efecto, la cantidad de materia orgánica es tan elevada que a pesar de utilizar aire como gas alternativo durante la etapa de pre-calcinación a la temperatura de 500 °C y las temperaturas de calcinación más elevadas admitidas por el modificador de nitrato de paladio, se genera abundante residuo carbonáceo en el atomizador tras aproximadamente 20 inyecciones. En estas condiciones es preciso realizar la limpieza manual del atomizador y así recuperar la sensibilidad del analito. La Figura 4.4 muestra una fotografía de la plataforma de L'Vov de un tubo de grafito pirolítico tras 15 inyecciones de una suspensión de harina de arroz preparada en las condiciones comentadas anteriormente. Ese residuo se puede limpiar fácilmente de forma manual, pero es evidente que supone un inconveniente a superar.

De lo expuesto se deduce claramente la necesidad de introducir una etapa de limpieza o aislamiento de los analitos del resto de la materia orgánica.

Además, la señal medida en área de pico de la muestra de harina de arroz que aparece en la Figura 4.3B es 0.043. Este valor corresponde al total de arsénico en la muestra. Es evidente que si se desea conocer los contenidos de las distintas formas químicas

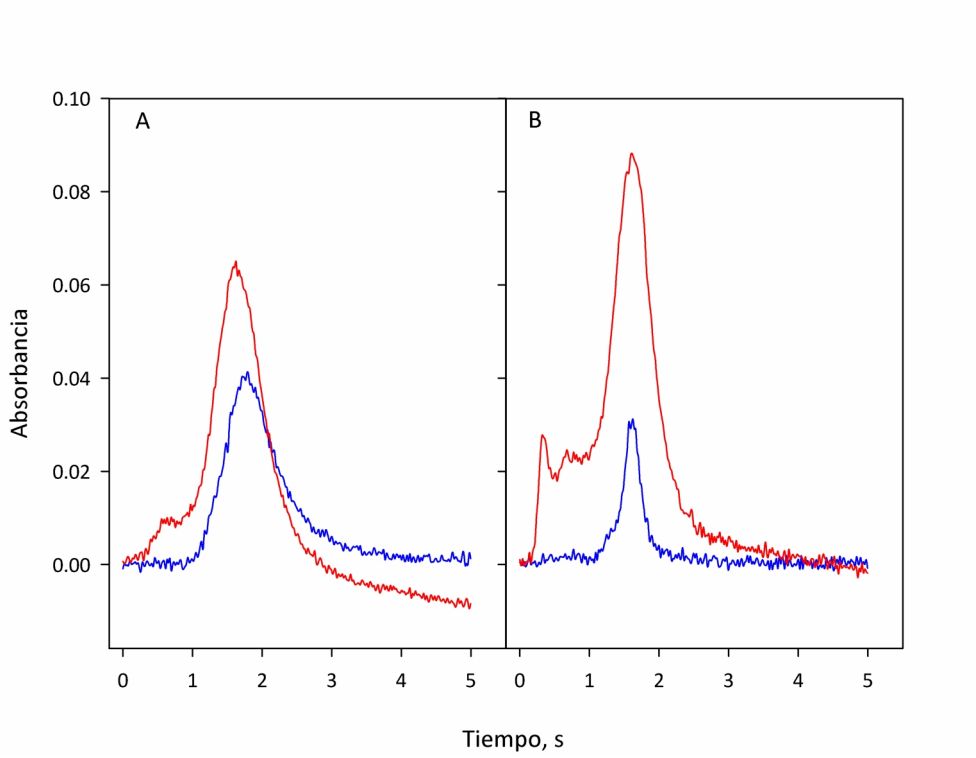


Figura 4.3: Señales atómica corregida (curva azul) y fondo (curva roja) obtenidas en la inyección de una suspensión al 10 % m/v de dos muestras de harina de arroz en TMAH al 10% (A y B).

de arsénico hemos de introducir un procedimiento de preconcentración para conseguir una señal más elevada y así poder discriminar con mayor seguridad entre las distintas formas.

Para alcanzar este fin se ha actuado en tres líneas de trabajo:

a) Por una parte se ha desarrollado un medio de extracción cuantitativo y respetuoso con las formas químicas de arsénico en arroz y harina de arroz.
b) Además se han puesto a punto procedimientos de "limpieza" de ese extracto con el fin de que sea adecuado para su medida directa en el atomizador electrotérmico y separación de los analitos

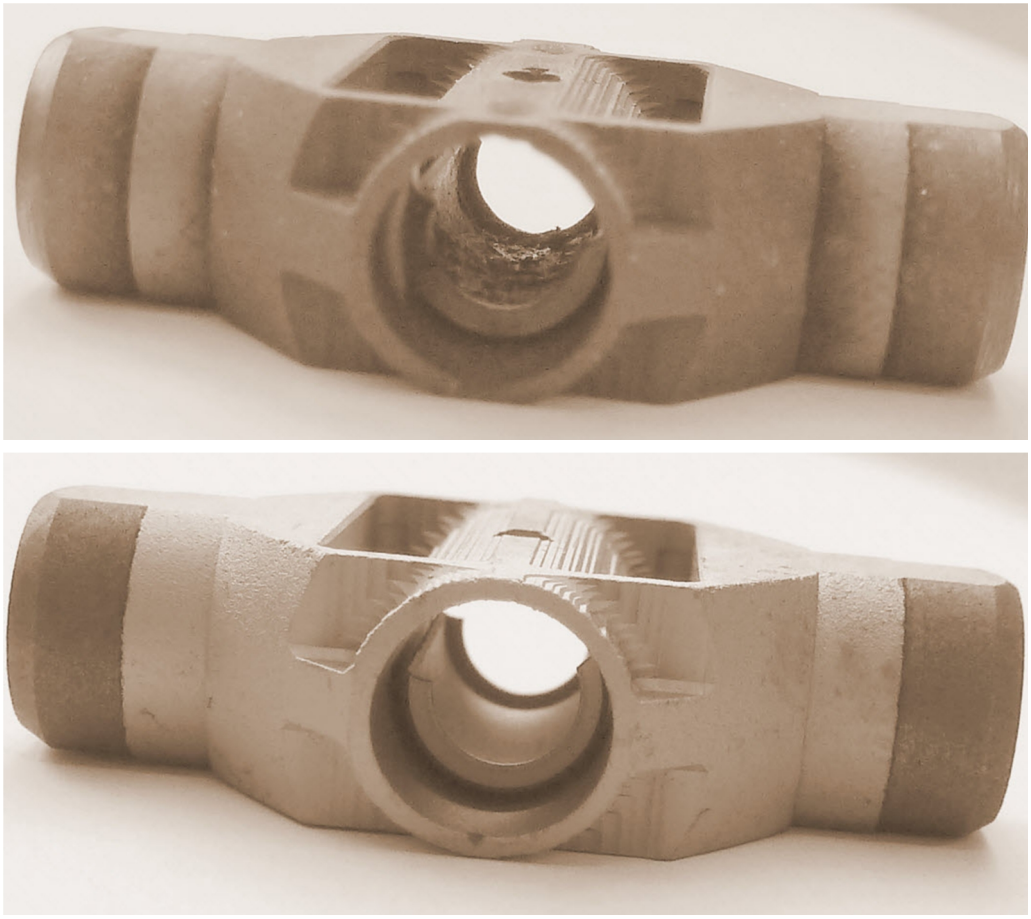


Figura 4.4: Fotografías de tubos de grafito pirolítico utilizados en la determinación de arsénico por introducción de las suspensiones en TMAH. En la fotografía superior se aprecia la formación de residuo carbonáceo tras unas pocas inyecciones. La fotografía inferior, presentada con fines comparativos, corresponde a un tubo sin usar.

c) Finalmente se han desarrollado procedimientos de preconcentración para las cinco analitos en estudio: As(III), As(V), MA, DMA y AB.

En los procedimientos de extracción de las formas químicas de arsénico se ha recurrido al empleo de ultrasonidos para acelerar el proceso y aumentar la capacidad de extracción [10]. Con estos fines se ha empleado una sonda de ultrasonidos que operó de forma pulsada como se indica en la Parte experimental.

La eficiencia de extracción se ha estudiado en 6 muestras de harina de arroz y los materiales de referencia certificados que se indican en la Parte Experimental. De las primeras experiencias con TMAH como agente solubilizante se observó que la eficacia del proceso depende de su concentración, temperatura de trabajo, intensidad de los

ultrasonidos y posible mezcla con disolventes orgánicos. No todas las muestras se comportaron de igual forma, siendo las muestras de harina de arroz las que presentaron una mayor dificultad para conseguir extracciones cuantitativas. El contenido total de arsénico en estas muestras se determinó por medida con AFS de las digestiones en medio ácido realizadas como en indica en la Parte experimental en horno microondas. El contenido total de arsénico en las muestras certificadas se tomó del valor indicado por el Organismo emisor del certificado.

La eficacia de la extracción se calculó por comparación de la señal obtenida para los extractos cuantificados por adiciones estándar frente a los contenidos totales.

La concentración de TMAH juega un papel importante. Se prepararon medios extractantes de distinta concentración a partir de TMAH concentrado que se comercializa a una concentración de 1 mol L^{-1}. La Figura 4.5 muestra el efecto de la [TMAH] en el porcentaje de arsénico total extraído desde el material de referencia 1572 (hojas de cítrico). Nótese como a partir del 10 % v/v de TMAH concentrado la extracción se hace máxima.

En la Figura 4.6 aparece la variación de la eficacia del proceso de extracción con el tiempo de agitación y la temperatura de trabajo. Como puede observarse, una temperatura elevada (aprox. 80 °C) resulta muy adecuada para reducir el tiempo de contacto a tan sólo 10 minutos. Temperaturas superiores no se consideraron adecuadas para evitar la posible interconversión de especies. Como puede apreciarse, el tratamiento con TMAH al 10 % v/v durante 10 minutos a 80 °C no consigue la completa extracción de los analitos en esta muestra. Resultados similares se obtuvieron en las demás muestras de arroz, mientras que para los materiales de referencia con base de pescado la extracción era total.

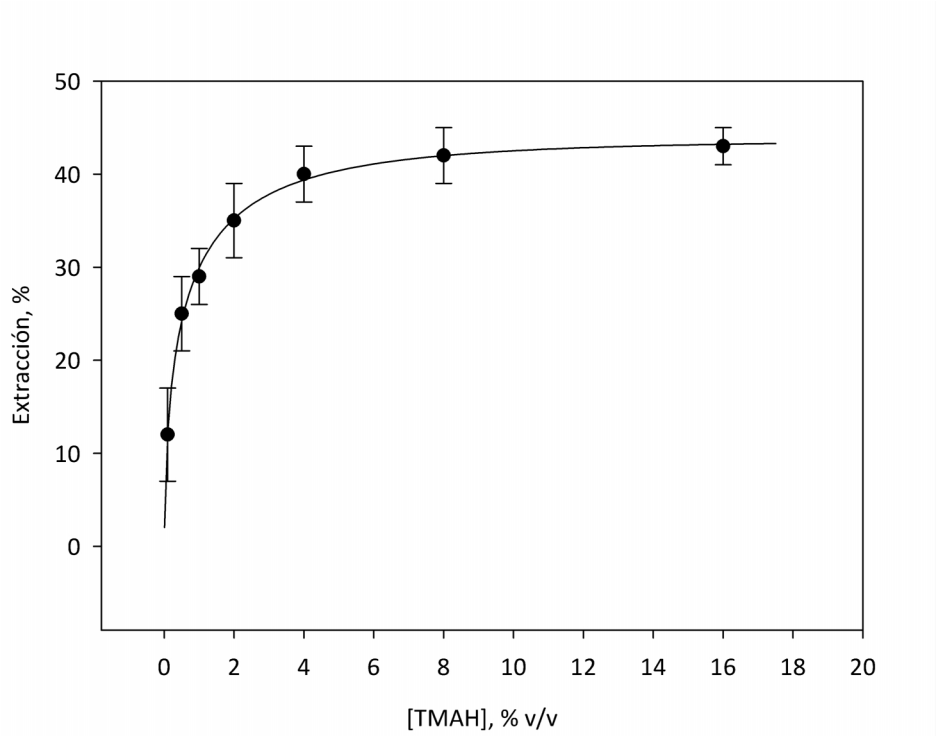


Figura 4.5: Efecto de la concentración de TMAH en la fase acuosa extractante sobre el porcentaje de extracción de arsénico total en suspensiones de hojas de cítrico (SRM 1572) preparada al 10 % m/v.

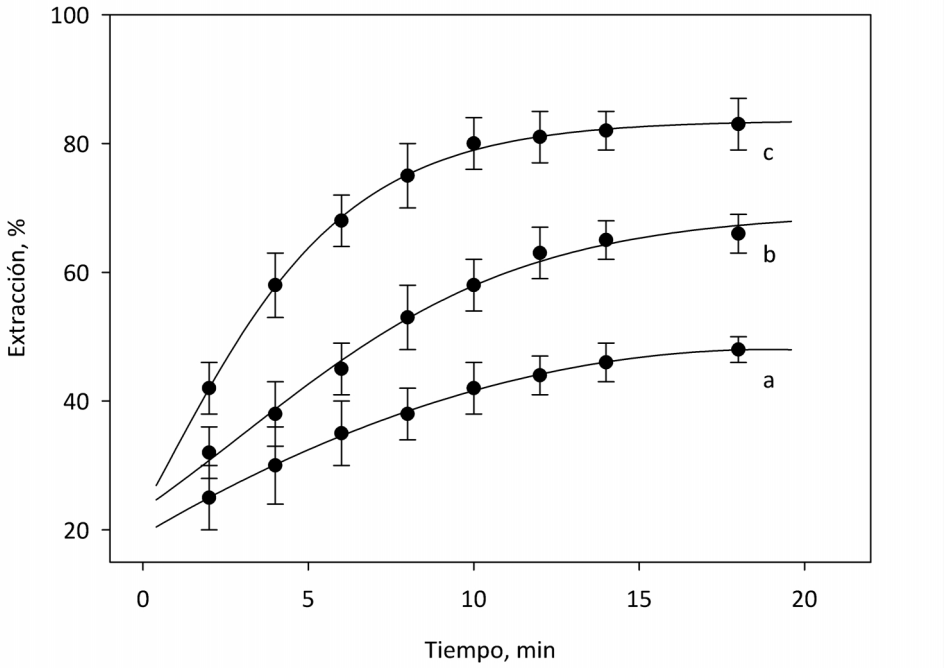


Figura 4.6: Efecto del tiempo de contacto a 25, 60 y 80 °C (curvas a-c, respectivamente) en la extracción de arsénico total a partir de suspensiones al 10 % m/v de SRM 1572 preparadas en TMAH al 5 % v/v.

El empleo de ultrasonidos mejoró los valores de extracción como puede verse en la Figura 4.7. Nótese que el empleo de 15 minutos de ultrasonidos pulsados a 0.5 s^{-1} es suficiente para conseguir extracciones máximas. No obstante, algunas muestras de arroz aún no conducían a resultados cuantitativos. Éstos se lograron cuando se añadió metanol o etanol a la disolución de TMAH tras el tratamiento térmico y una vez que se había enfriado la disolución. En presencia de este medio hidroalcoholico se aplicaron los ultrasonidos en la forma comentada anteriormente y los resultados fueron excelentes. Para evitar el calentamiento de la muestra durante el tratamiento con ultrasonidos, el tubo con la suspensión se sumerge en un vaso con agua a temperatura ambiente que permite amortiguar el cambio de temperatura. En consecuencia, tras 15 minutos de ultrasonidos se consiguen eficiencias de extracción totales en todas las muestras estudiadas como puede apreciarse en la Tabla 4.7.

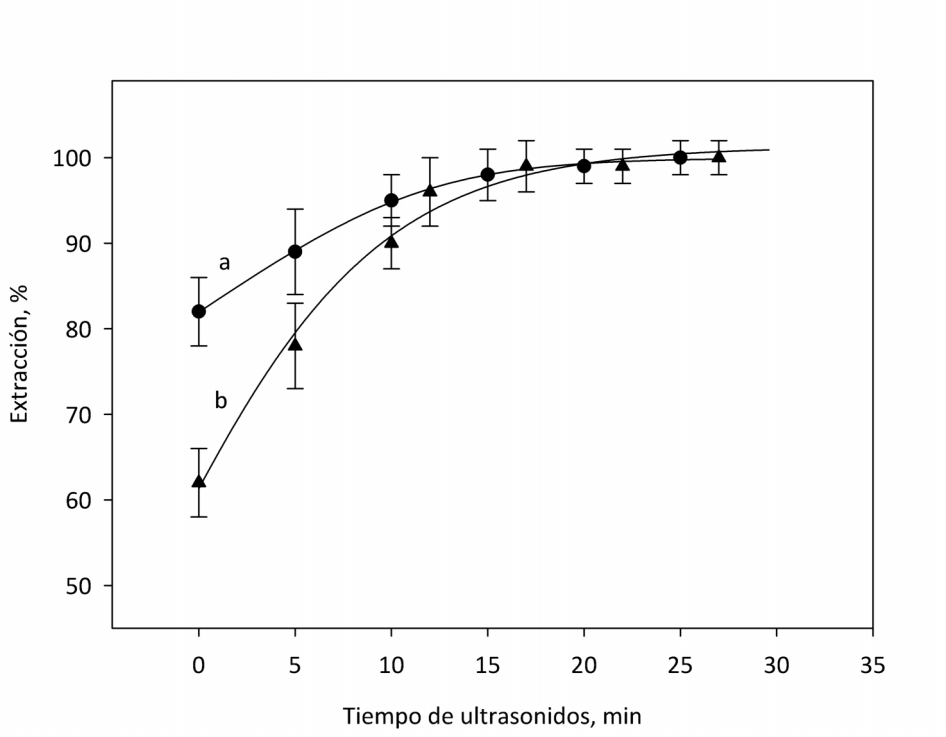


Figura 4.7: Efecto del tiempo de aplicación de los ultrasonidos en la extracción de arsénico total a partir de suspensiones al 10 % m/v de SRM 1572 (curva a) y SRM 1568a (curva b) preparadas en TMAH al 5 % v/v.

Tabla 4.7: Resultados obtenidos para arsénico total en las muestra estudiadas utilizando TMAH como extractante.

Material	$[As]_{total}$, µg g^{-1}	$[As]_{extraído}$, µg g^{-1}	Extracción, %
Harina de arroz (HA1)[a]	0.335 ± 0.052	0.330 ± 0.084	98 ± 3
Harina de arroz (HA2)[a]	0.256 ± 0.043	0.250 ± 0.073	97 ± 3
Harina de arroz (HA3)[a]	0.215 ± 0.053	0.220 ± 0.085	102 ± 4
Harina de arroz (HA4)[a]	0.284 ± 0.052	0.289 ± 0.092	102 ± 4
Harina de arroz (HA5)[a]	0.130 ± 0.036	0.135 ± 0.071	104 ± 6
Harina de arroz (HA6)[a]	0.112 ± 0.047	0.121 ± 0.062	108 ± 6
Harina de arroz (SRM 1568a)[b]	0.29 ± 0.03	0.283 ± 0.072	97 ± 3
Hojas de cítrico (SRM 1572)[b]	3.1 ± 0.3	3.12 ± 0.09	100 ± 5
Hojas de tomate (SRM 1573)[b]	0.270 ± 0.002	0.265 ± 0.005	98 ± 5
Hojas de tomate (SRM 1573a)[b]	0.112 ± 0.004	0.115 ± 0.05	103 ± 5
Tejido de ostra (1566a)[b]	14.0 ± 1.2	14.1 ± 0.3	101 ± 4
Músculo de pez (DORM-2)[b]	18.0 ± 1.1	18.2 ± 0.4	101 ± 3
Hígado de pez (DOLT-2)[b]	16.6 ± 1.1	16.5 ± 0.2	99 ± 4

[a] valor medio obtenido por AFS ± desviación estándar de tres medidas
[b] valor certificado ± desviación estándar

Como se puede apreciar los resultados indican una extracción cuantitativa de todas las formas químicas de arsénico a la disolución acuosa. Sin embargo, comprobamos que se produce una interconversión de especies. En efecto, en ese medio alcalino y aún más al realizarse la extracción en caliente, se produce la oxidación de As(III) a As(V) debido probablemente a la presencia del oxígeno disuelto en el agua. Los potenciales normales de las semireacciones son:

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O \qquad E^o = 1.23V$$
$$AsO_4^{3-} + 4H^+ + 2e^- \rightarrow AsO_2^- + 2H_2O \qquad E^o = 0.56V$$

Por tanto la reacción global presenta un potencial no muy acusado pero dependiente de la concentración de protones, de tal forma que en medio alcalino se encuentra muy favorecida:

$$O_2 + 2AsO_2^- + 2H_2O \rightarrow 2AsO_4^{3-} + 4H^+$$

Este proceso se ha comprobado a partir de estándares de As(III) sometidos a las condiciones de extracción y determinados posteriormente mediante los procedimientos que se detallan más adelante y que se basan en la microextracción selectiva de As(III) por formación de un complejo neutro con pirrolidín ditiocarbamato amónico (APDC).

Estudios similares se han realizado para las otras formas de arsénico: As(V), MA, DMA y AB. En ningún caso se observaron alteraciones.

Todos los intentos realizados para evitar la oxidación de As(III) resultaron ineficaces, por lo que concluimos que este procedimiento de extracción solamente resulta adecuado para la determinación de arsénico inorgánico (iAs). Por otra parte, como ya hemos comentado, estas formas se interconvierten en su estado natural con el tiempo, por lo que disponer de un contenido total de iAs puede resultar una información valiosa en muchos casos.

4.3.1.2. EXTRACCIÓN EN MEDIO ÁCIDO

No obstante, con el fin de disponer de un medio de extracción cuantitativo compatible con la especiación de As(III) y As(V) en este tipo de matrices se investigaron otras alternativas. Evidentemente para evitar la oxidación hay que recurrir al empleo de medios ácidos, pero no todos son adecuados, ya que como hemos comentado, el empleo de ácido trifluoroacético provoca la reducción de As(V) a As(III).

En este sentido encontramos que el empleo de HCl y Triton X-100 en caliente y con ayuda de ultrasonidos permite conseguir extracciones muy elevadas de las distintas formas químicas de arsénico. La extracción aumentaba cuando el tratamiento con ultrasonidos se realizaba en medios hidroalcohólicos.

Como ya hemos comentado antes, los sobrenadantes en medio ácido de suspensiones de arroz preparadas al 10 % m/v, y aún más la suspensión completa, presentan elevada absorción de fondo y grandes problemas de formación de residuo carbonáceo en el atomizador.

A este inconveniente hay que añadir el hecho de que en medio ácido la sensibilidad de todas las formas de arsénico en el atomizador no es la misma ni siquiera con el empleo de paladio.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la optimización de los parámetros que afectan a la eficiencia de extracción: tipo de ácido y su concentración, concentración de tensioactivo, temperatura de trabajo, tiempo de contacto con el ácido, concentración de metanol y tiempo de aplicación de ultrasonidos. El contenido en arsénico total de las muestras se ha tomado de los valores obtenidos previamente y que aparecen en la Tabla 4.7.

Como ya se ha demostrado en estudios previos sobre arroz, los mejores ácidos para realizar la extracción son HCl, HNO_3 y H_3PO_4 [71]. Elevadas concentraciones y ácidos oxidantes no resultan adecuados porque favorecen la oxidación de As(III) a As(V). Aunque el ácido H_3PO_4 ha sido seleccionado por varios autores [71, 94], tiene que utilizarse a concentraciones muy elevadas (1-1.5 mol L^{-1}) para que resulte efectivo, y esto supone un gran inconveniente para nuestro trabajo ya que el extracto obtenido ha de introducirse en columnas de intercambio iónico previa neutralización. El empleo de ácido nítrico resulta adecuado incluso al 2% [95] pero, como las suspensiones se tratan en caliente es posible la oxidación de As(III) y se ha desechado. Por tanto hemos seleccionado finalmente el empleo de HCl a concentraciones moderadas. La Figura 4.8 muestra los resultados obtenidos para el porcentaje de extracción empleando medios 0.001, 0.01 y 0.1 mol L^{-1} de HCl con el tiempo de contacto cuando la disolución se mantuvo a temperatura ambiente. Nótese que el empleo de HCl 0.1 mol L^{-1} resulta más adecuado ya que permite valores máximos en tan sólo 20 minutos de tratamiento.

En otra serie de experimentos se intentó ver si un aumento de la temperatura tiene efecto beneficioso sobre el porcentaje de extracción. El tiempo se comenzó a contar cuando la suspensión ya estaba a la temperatura deseada. La Figura 4.9 muestra el efecto de la temperatura con el tiempo de contacto en el porcentaje de extracción cuando se utiliza HCl 0.1 mol L^{-1} como extractante. Como se puede apreciar, cuando la temperatura de extracción es de 80 °C la señal se hace máxima en tan sólo 10 min.

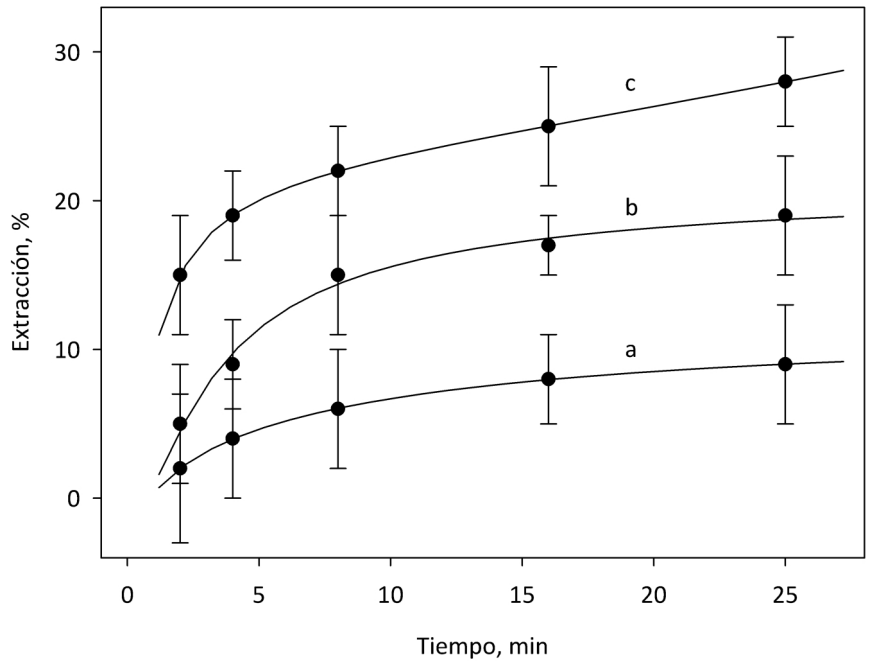


Figura 4.8: Efecto del tiempo de del tiempo de contacto en la extracción de arsénico total a partir de suspensiones al 10 % m/v de SRM 1572 (curva a) en medios con concentraciones de HCl 0.001, 0.01 y 0.1 mol L^{-1} (curvas a-c, respectivamente) a temperatura ambiente.

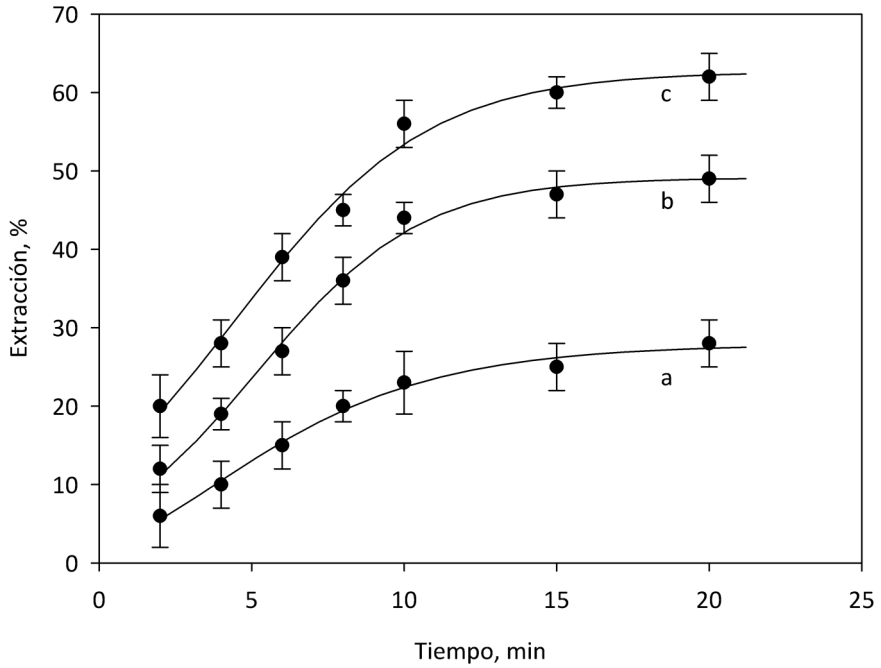


Figura 4.9: Efecto del tiempo de contacto en medio HCl 0.1 mol L^{-1} en la extracción de arsénico total a partir de suspensiones al 10 % m/v de SRM 1572 a temperaturas de 25, 60 y 80 °C (curvas a-c, respectivamente).

Se comprobó experimentalmente que la adición de un tensioactivo no iónico como Tritón X-100 tiene un efecto beneficioso en la eficacia del proceso de extracción aumentándola hasta aproximadamente un 15 % más. Ese incremento hemos de atribuirlo simplemente a su colaboración en la formación de una suspensión homogénea facilitándose de esta forma el efecto extractante del HCl. No descartamos la posibilidad de que se facilite de esta forma la ruptura de células vegetales. Concentraciones superiores al 0.1 % de Tritón X-100 no son aconsejables debido a que se forma una gran cantidad de espuma, especialmente durante el tratamiento con ultrasonidos.

Los porcentajes de extracción resultaron casi cuantitativos con el empleo combinado de un medio conteniendo metanol y el uso de ultrasonidos. Los resultados fueron mejores cuando los ultrasonidos se aplicaron en presencia de metanol. Por ello fue preciso enfriar la suspensión antes de añadirle el metanol y someterla al tratamiento con la sonda de ultrasonidos.

La Figura 4.10 muestra el efecto en el porcentaje de extracción con la concentración de metanol en el medio a tres tiempos de aplicación de los ultrasonidos. Como puede verse, la combinación de 15 minutos de ultrasonidos con metanol al 50 % condujo a resultados que podemos calificar como cuantitativos. El extracto, tratado de esta forma, se sometió a centrifugación a 4000 rpm durante 15 min antes de su empleo en los procesos de separación que se comentan seguidamente. La eficacia de la combinación medio ácido, metanol y ultrasonidos también ha sido comprobada por otros autores [95] en muestras de alimentos con resultados cuantitativos.

4.3.2. SEPARACIÓN DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO

Para hacer posible la preconcentración de las formas de arsénico es necesario tanto una etapa de limpieza en la que aislamos los analitos de interés del resto de los componentes de la matriz como separar los analitos entre sí con el fin de aumentar la selectividad del proceso de preconcentración. En esta Memoria hemos abordado este proceso mediante el empleo de intercambiadores iónicos.

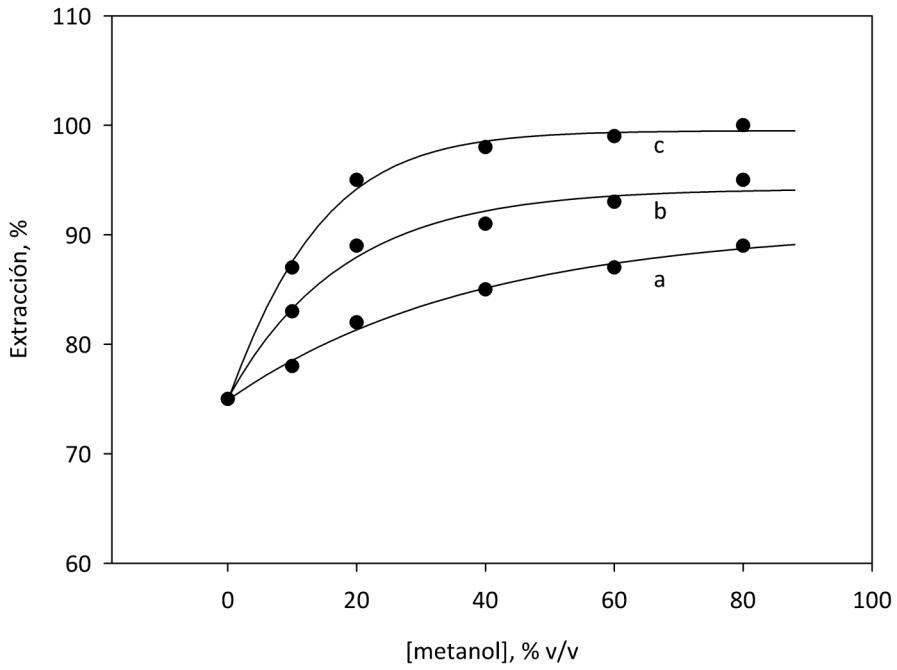


Figura 4.10: Efecto de la concentración de metanol en la fase extractante para tiempo de ultrasonidos de 5, 10 y 15 min (curvas a-c, respectivamente) en la extracción de arsénico total a partir de suspensiones al 10 % m/v de SRM 1572 preparadas en medio HCl 0.1 mol L^{-1} .

En efecto, las características ácido-base de las formas solubles de arsénico constituyen la base de su separación en la mayoría de las técnicas cromatográficas desarrolladas por diversos investigadores [96-98]. En nuestro caso pretendemos desarrollar procedimientos similares aplicados a moderados volúmenes de extracto con el fin de utilizar posteriormente procesos de preconcentración como alternativa a la separación por microextracción en fase sólida [99].

La Figura 4.11 muestra la abundancia de las especies de ácido arsénico (H_3AsO_4) en función del pH. La gráfica, obtenida a partir de los valores de pK_a (2.20, 6.97 y 11.53) permite comprobar que a pH > 4 predominan las formas cargadas negativamente.

En el caso del ácido arsenioso (H_3AsO_3), los valores de pK_a (9.22, 12,13 y 13,4) indican que la presencia de formas cargadas no será efectiva hasta valores de pH mayores del primer pK_a (Figura 4.12). En este caso su retención en un intercambiador aniónico solamente sería posible en medios alcalinos, mientras que en el caso de As(V) su retención es viable incluso a pH neutro.

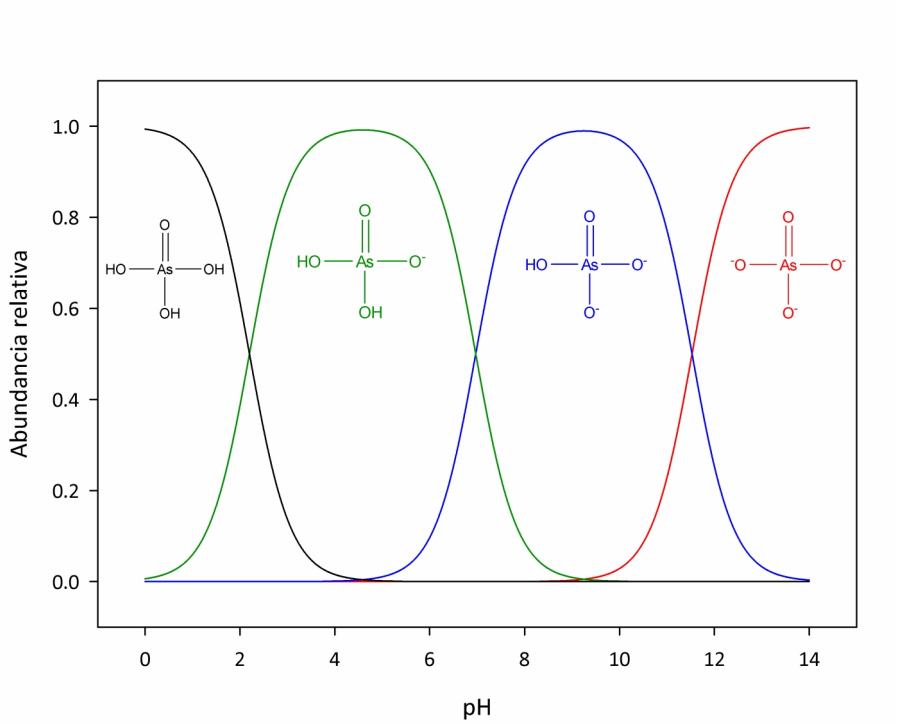


Figura 4.11: Distribución de las formas de As(V) en función del pH del medio.

En el caso del ácido monometil arsónico ($CH_3AsO(OH)_2$) los valores de pK_a (4.1 y 8.7) indican la presencia de especies negativas de MA incluso a pH neutro. La Figura 4.13 muestra la abundancia de las distintas formas de MA con el pH de la disolución.

El ácido dimetil arsónico (DMA, $(CH_3)_2AsO(OH)$, ácido cacodílico) presenta unos valores de pKa (1.6 y 6.3) que garantizan la formación de especies cargadas negativamente incluso a pH = 4. La Figura 4.14 muestra la distribución de sus formas con el pH.

En el caso de arsenobetaína ($(CH_3)_3As^+CH_2COOH$), con un solo valor de pK_a, la molécula está cargada positivamente a pH < pK_a y se presenta como un zwiterion a valores de pH superiores al pK_a (2.18). La Figura 4.15 muestra la predominancia de sus formas en función del pH del medio. Es evidente por tanto que este compuesto no es adecuado para procesos de intercambio iónico a pH neutro o alcalino.

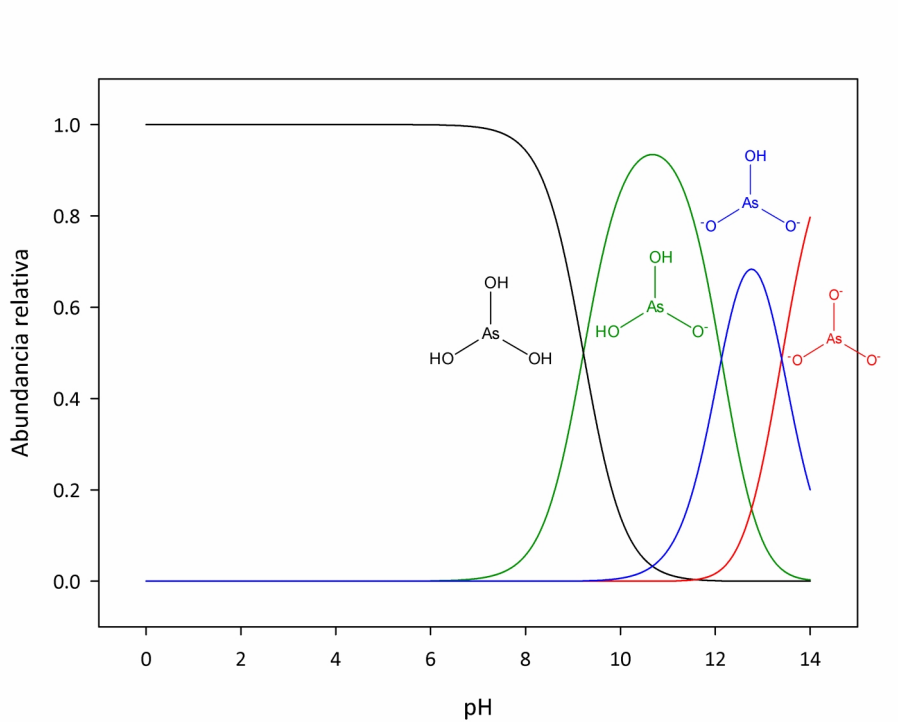


Figura 4.12: Distribución de las formas de As(III) en función del pH del medio.

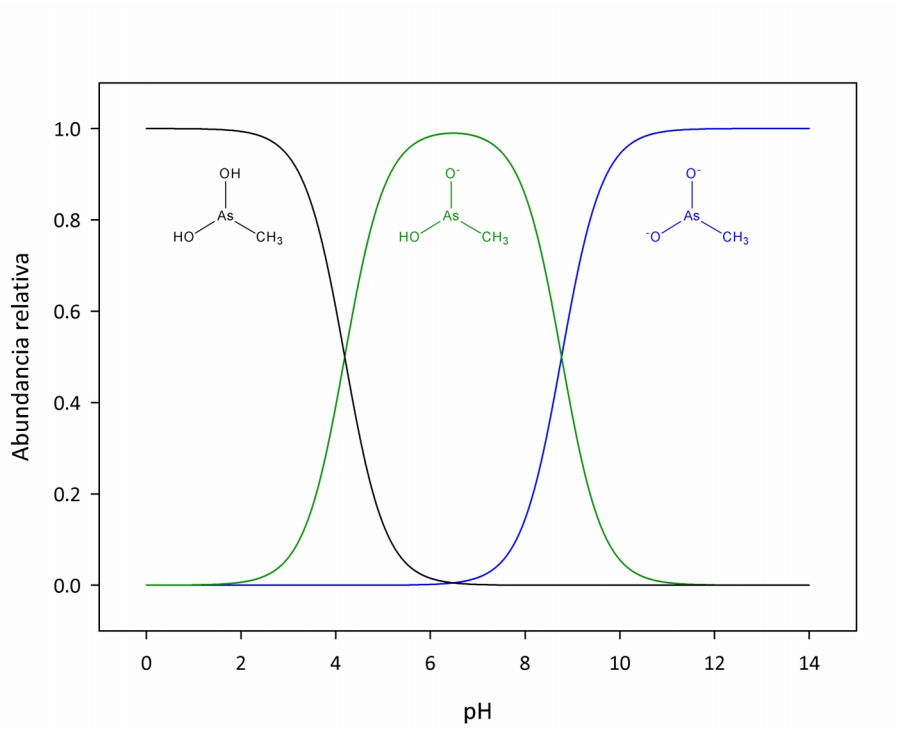


Figura 4.13: Distribución de las formas de MA en función del pH del medio

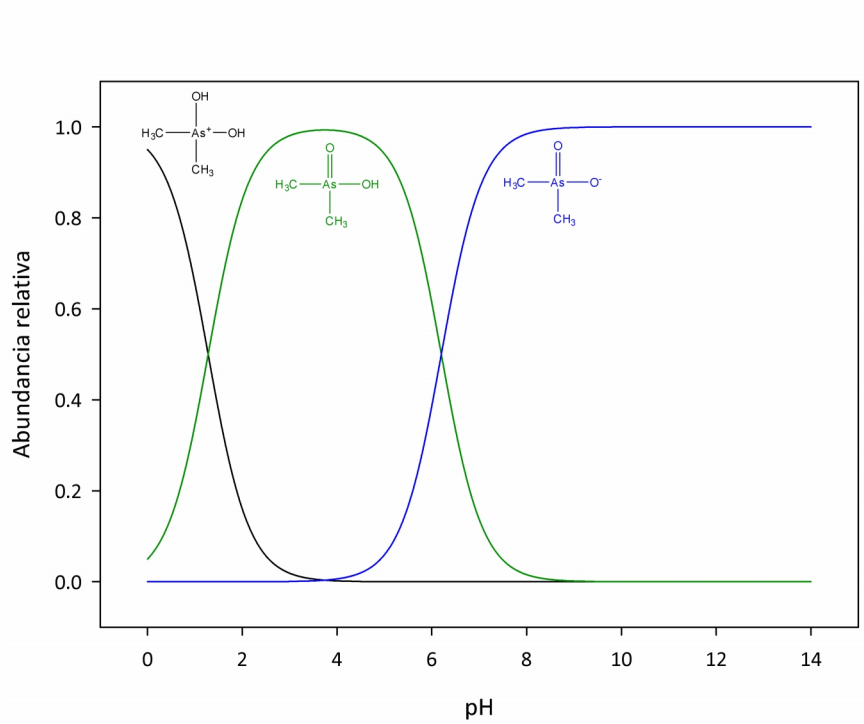


Figura 4.14: Distribución de las formas de DMA en función del pH del medio

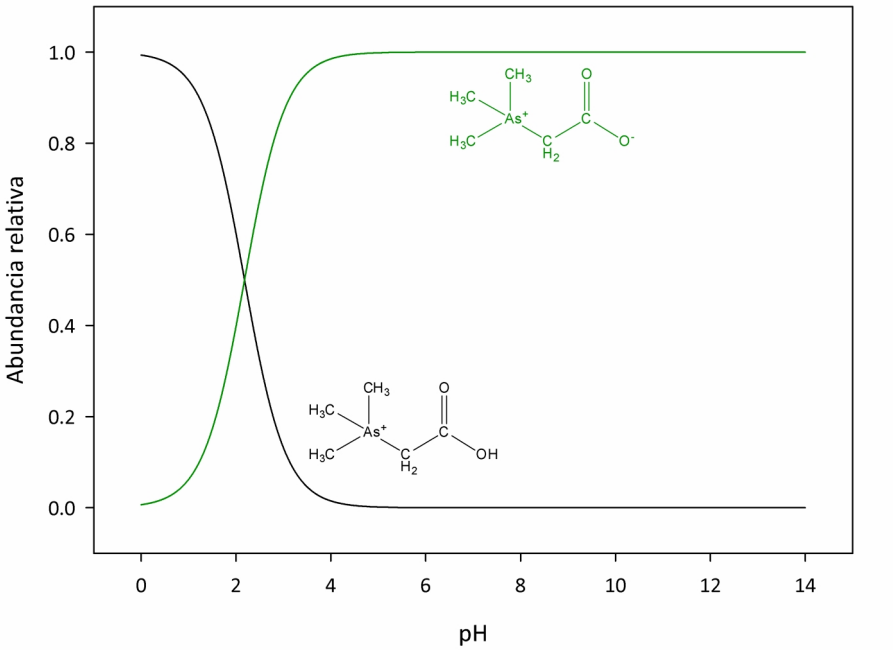


Figura 4.15: Distribución de las formas de AB en función del pH del medio

Para conseguir la separación de las distintas especies químicas de arsénico se han utilizado resinas de intercambio catiónico Dowex® 50W X8 en la forma H^+ y aniónico Dowex® 1X8 en la forma Cl^- ambas con tres tamaños, 50-100, 100-200 y 200-400 mesh. Las resinas Dowex están basadas en copolímeros microporosos de estireno y divinilbenceno muy resistentes a procesos de oxidación y reducción. En el caso de las aniónicas fuertes el grupo funcional intercambia cloruro por el anión de interés. En el caso de las catiónicas fuertes el grupo sulfónico intercambia protones por los cationes de la disolución. La Figura 4.16 muestra los grupos funcionales de ambas resinas.

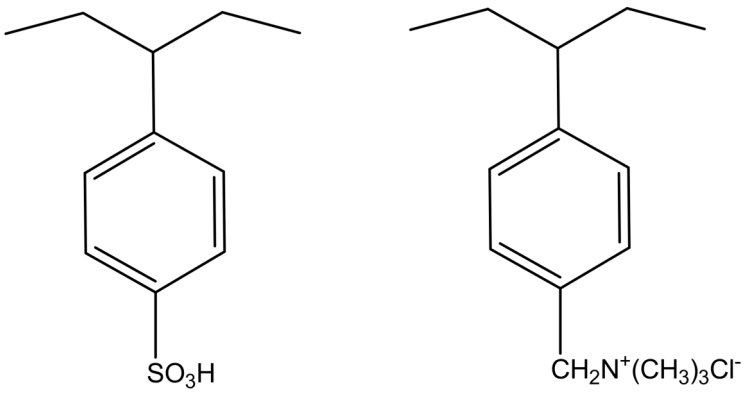


Figura 4.16: Grupos funcionales de las resinas de intercambio Dowex 1X8 y 50W X8

También se ensayaron otros resinas aniónicas fuertes como Amberlita IRA400 y AG1-X8 y débiles como Amberlita IRA 473 con propiedades quelatantes en forma cloruro. Dentro de las catiónicas también se ensayó el empleo de Amberlita AG50W-X8.

Estas resinas se empaquetaron en una minicolumna como la que se muestra en la Figura 4.17 que se inserta en el montaje de flujo que se detalla. La minicolumna se dispone en el lazo de la válvula de inyección de seis vías de forma que al cambiar de la posición de carga a inyección se consigue pasar el eluyente por la columna. Mientras que está en la posición de carga es la muestra la que pasa a través de la columna.

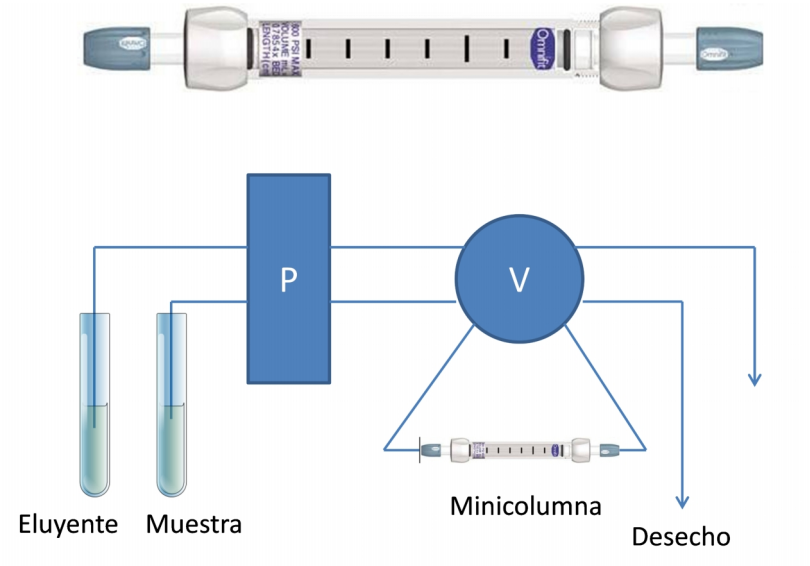


Figura 4.17: Esquema del montaje de flujo utilizado para la separación con las resinas. En la parte superior aparece un detalle de la minicolumna utilizada. P indica bomba peristáltica y V es una válvula de seis vías de las habituales en Análisis por Inyección en Flujo.

Además de estas resinas intercambiadoras con base de polímero se han ensayado otros intercambiadores que utilizan grupos funcionales adecuados enlazados a un soporte de sílice. En este sentido se han utilizado minicolumnas empaquetadas comercialmente de las habituales en separación en fase sólida como las que aparecen en la Figura 4.18.

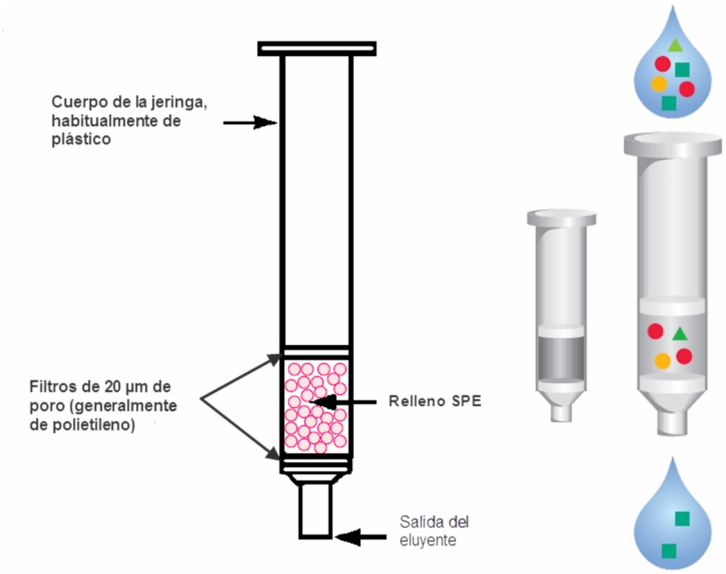


Figura 4.18: Esquema de los cartuchos SPE utilizados

Para la retención de especies aniónicas se ensayaron cartuchos DSC-SAX para aniones fuertes y DSC-NH2 para aniones débiles. En el caso de especies catiónicas se ensayaron cartuchos DSC-SCX y DSC-WCX para cationes fuertes y débiles, respectivamente. La Figura 4.19 muestra la estructura activa de estos soportes de extracción. Junto con los procesos de intercambio es posible la existencia de interacciones entre porciones no polares de los analitos y no polares de la sílice del soporte e interacciones hidrofílicas entre los grupos OH de los analitos y de la sílice.

4.3.2.1 SEPARACIÓN TRAS EL TRATAMIENTO ALCALINO

El tratamiento alcalino comentado en 4.3.1.1 para la extracción de las especies de arsénico conduce a la obtención de un sobrenadante al 5 % en TMAH v/v y al 50 % v/v en metanol. En estas condiciones el pH resulta muy alcalino, ligeramente superior a 11.3. Como ya hemos comentado todo el As(III) se ha oxidado a As(V) mientras que las demás formas se mantienen inalteradas.

Se evaluó la capacidad de retención de las resinas intercambiadoras de aniones con base de polímero para la retención de As(V), MA, DMA y AB a partir de disoluciones de los estándares de 50 µg L^{-1} . Los soportes se activaron pasando HCl 1 mol L^{-1} y lavando con agua hasta pH neutro. En el caso del empleo de la resina Dowex 1X8 (aniónica fuerte) la retención de As(V) y MA fue total, mientras que DMA y AB se retuvieron en menor

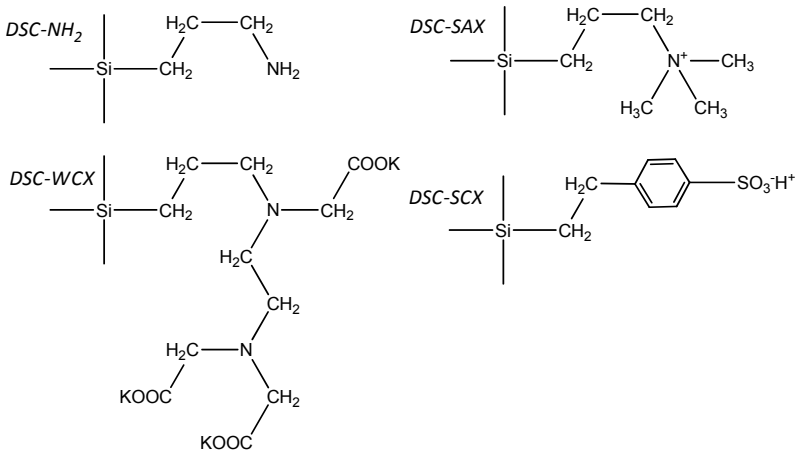


Figura 4.19: Grupos funcionales responsables de las interacciones iónicas.

extensión, 65 y 46 %, respectivamente. Todos eluyeron rápidamente con HCL 0.5 mol L^{-1}.

Resultados similares se obtuvieron cuando estos analitos en concentración de 50 µg L^{-1} se añadieron a una muestra de harina de arroz y tras homogeneizar y preparar la suspensión el sobrenadante se pasó por la columna de intercambio. Los resultados no mejoraron con el empleo de la resina intercambiadora débil Amberlita IRA 473 que presenta características quelatantes. También se observó la parcial retención de DMA con el empleo de Amberlita IRA400 y AG1-X8 (aniónicas fuertes). Estos resultados se reprodujeron para distintos tamaños de partícula del soporte y diferentes caudales de disolución. Antes de proceder a la elución se desplazó el disolvente que acompaña a la muestra dentro de la columna con el paso de aire. Los perfiles de elución encontrados para todos los analitos revelan la elución de la cantidad añadida antes de 4 mL.

La no retención de DMA a pesar de que el pH es favorable lo atribuimos a la posible formación de pares iónicos con TMAH que compiten con el proceso de intercambio. Otros autores han encontrado, si bien en otro tipo de soportes, una gran capacidad en el TMAH para provocar la elución del DMA retenido [88]. La separación de DMA por intercambio iónico está sujeta a cierta polémica ya que mientras que algunos autores [100] han separado DMA como especie aniónica a pH comprendido entre 6 y 8, otros [101] lo han separado en ese mismo intervalo de pH como si de una especie catiónica se tratara. En nuestro caso el pH resulta superior, así que la forma aniónica debe ser mayoritaria. Además, si tras pasar la muestra se lava la columna con TMAH al 5 % v/v se consigue la completa elución del DMA parcialmente retenido. Procediendo de esta forma AB tampoco se retiene. Ambos resultados avalan la hipótesis de la formación de pares iónicos.

Trabajando en estas condiciones únicamente podemos separar iAs (As(III)+As(V)) y MA de DMA y AB. La elución conjunta de As(V) y MA se consigue fácilmente en HCl 0.5 mol L^{-1}. De esta forma se dispone de una disolución “limpia” conteniendo estas especies de arsénico.

Cuando se ensayó el empleo de resinas de intercambio catiónico (Dowex 50W-X8) para sobrenadantes resultado del tratamiento alcalino con TMAH se encontró que As(V) y MA no se retienen en la columna, mientras que DMA y AB tienen un comportamiento

que depende de la matriz. En efecto, cuando se trabaja con estándares acuosos en TMAH al 5 % la retención de ambos analitos es parcial (72 y 49 %, respectivamente). Sin embargo, cuando se trabaja con muestras de harina de arroz adulteradas con cantidades conocidas de DMA y AB la retención en la columna fue total para los dos, aunque muy lábil, pues el simple lavado de la columna con más TMAH al 5 % v/v condujo a la elución completa de DMA y solamente parcial de AB. Estos resultados se repitieron usando Amberlita AG50W-X8, una resina intercambiadora catiónica fuerte. El cambio en el pH hacia valores superiores e inferiores no supuso variación en el comportamiento descrito.

Así pues, los resultados obtenidos con resinas intercambiadoras no nos permiten proponer un procedimiento que genere fracciones "limpias" conteniendo los analitos, ni siquiera combinando los procesos de intercambio. Es decir, el paso del sobrenadante del tratamiento de extracción por la columna aniónica y lavado con TMAH al 5 % v/v retiene As(V) y MA en la columna. El líquido resultante se pasa a continuación por la columna conteniendo la resina catiónica. En estas condiciones DMA y AB quedan retenidos parcialmente.

Mejores resultados se obtuvieron con el empleo de cartuchos de sílice funcionalizados, de los habituales en extracción en fase sólida. En efecto, si el sobrenadante del proceso de extracción alcalino se pasa a través de un intercambiador aniónico (DSC-SAX) se produce la retención completa de As(V) y MA, mientras que DMA y AB no se retienen. Este eluido ajustado a pH 1 con HCl se puede ahora pasar por un intercambiador catiónico (DSC-SCX), donde se retienen DMA y AB, ya que a ese pH se encuentran en forma catiónica. De este intercambiador sale la mayor parte de la matriz del sobrenadante de la muestra y los analitos quedan retenidos en los cartuchos.

Para el proceso de elución se encontró que As(V) y MA eluyen en apenas 3 mL de HCl 0.5 mol L^{-1} desde el cartucho aniónico, mientras que DMA y AB eluyen en NH_4OH 0.5 mol L^{-1} desde el cartucho catiónico. La Figura 4.20 muestra de forma esquemática el tratamiento alcalino propuesto que genera un sobrenadante adecuado para la determinación de arsénico inorgánico total, MA, DMA y AB.

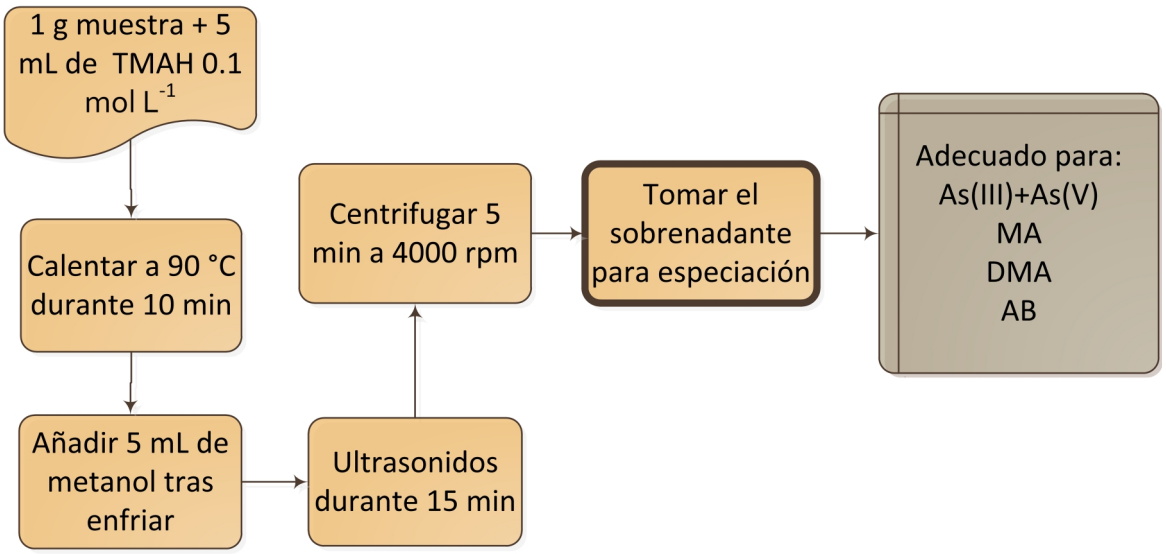


Figura 4.20: Esquema del tratamiento alcalino propuesto para la extracción de las formas de arsénico.

El sobrenadante generado en este tratamiento se puede tratar como se esquematiza en la Figura 4.21 con el fin de separar el arsénico inorgánico y MA en el cartucho de intercambio aniónico de DMA y AB en el catiónico.

4.3.2.2 SEPARACIÓN TRAS EL TRATAMIENTO ÁCIDO

El tratamiento alcalino con TMAH comentado en el apartado anterior conduce inevitablemente a la oxidación total de As(III) a As(V). Todos los intentos realizados para extraer los analitos a pH ligeramente más bajo (se probaron valores de pH de 7.5, 8.5 y 9.5) no resultaron adecuados ya que no se consigue la extracción completa de los analitos. Además el As(III) se oxidó incluso parcialmente a pH = 7.5 durante el tratamiento térmico y los ultrasonidos.

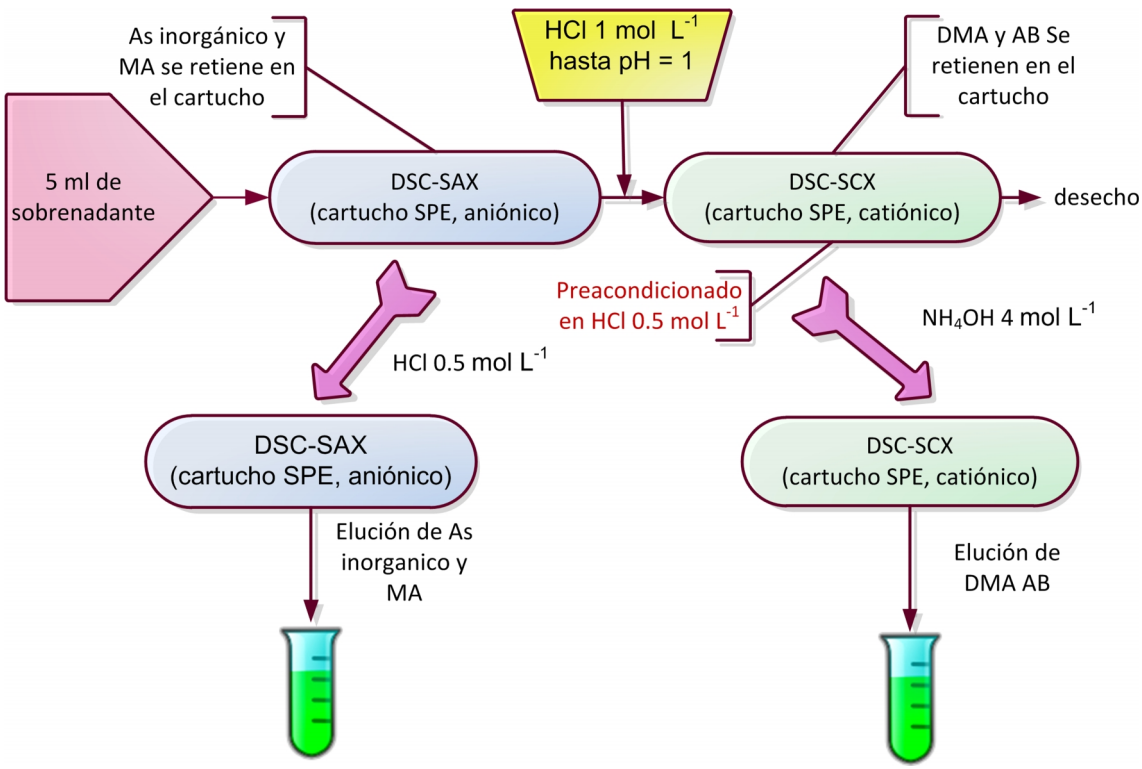


Figura 4.21: Esquema de la separación propuesta para las formas de arsénico con cartuchos SPE tras el tratamiento alcalino de extracción.

Como ya se comentó en 4.3.1.2, el tratamiento en medio ácido en las condiciones recomendadas también permite la extracción completa de los analitos. Sin embargo, para la retención de As(III) mediante un proceso de intercambio iónico, hemos de alcanzar un pH lo suficientemente alto como para que se encuentre en forma cargada.

Cuando el sobrenadante proveniente del proceso de extracción ácido adulterado con As(III) de 50 µg L^{-1} se ajusta a pH = 9 y se pasa por el cartucho DSC-SAX, se produce la retención completa del analito. El estudio del arsénico eluido en HCl 0.5 mol L^{-1} del cartucho indica la transformación completa de As(III) a As(V). La Figura 4.22 muestra los resultados encontrados en el estudio de especiación del arsénico eluido cuando el pH del sobrenadante de la extracción ácida se ajustó entre 7 y 10. A valores de pH inferiores no se consigue una buena retención de arsénico. Como puede observarse, a partir de pH = 7 se produce oxidación parcial del As(III).

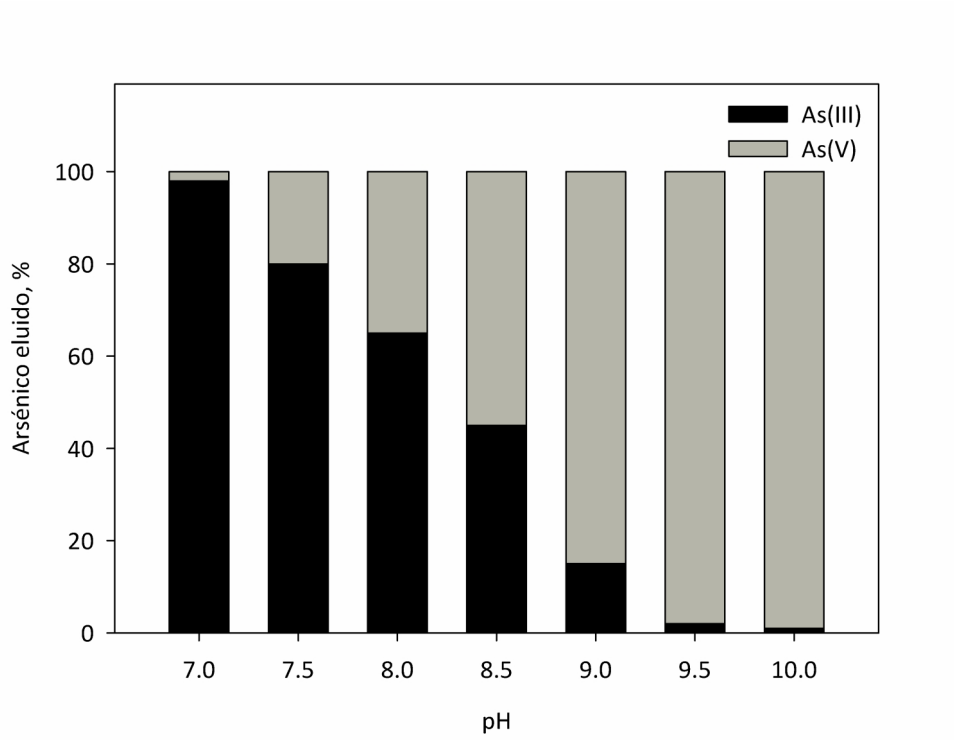


Figura 4.22: Efecto del pH en la conversión de As(III) a As(V). Las experiencias se realizaron con un estándar de 50 µg L^{-1} en medio ácido ajustando a distintos valores de pH con $NaHCO_3$ y Na_2CO_3. Tras la elución se determinó la concentración de las dos formas químicas con el procedimiento propuesto y que se detalla más adelante.

Cuando se realizaron experiencias similares a partir de sobrenadantes de suspensiones de harina de arroz adulteradas con As(III), la oxidación del arsénico trivalente se produjo a valores de pH superiores a 8.5. Es decir, la muestra preserva, en parte, la oxidación de As(III). Es por ello que se investigó la posibilidad de utilizar un reductor suave para evitar la oxidación de arsénico. En este sentido encontramos buenos resultados con el empleo de ácido ascórbico al 0.01 % m/v. La Figura 4.23 muestra los resultados obtenidos cuando el pH de la disolución ácida se ajustó a los distintos valores en presencia de ácido ascórbico 0.01 % m/v.

Nótese como es posible trabajar incluso a pH = 9 sin que se produzca la oxidación de As(III) a As(V). Concentraciones superiores de ácido ascórbico no permitieron superar este pH límite.

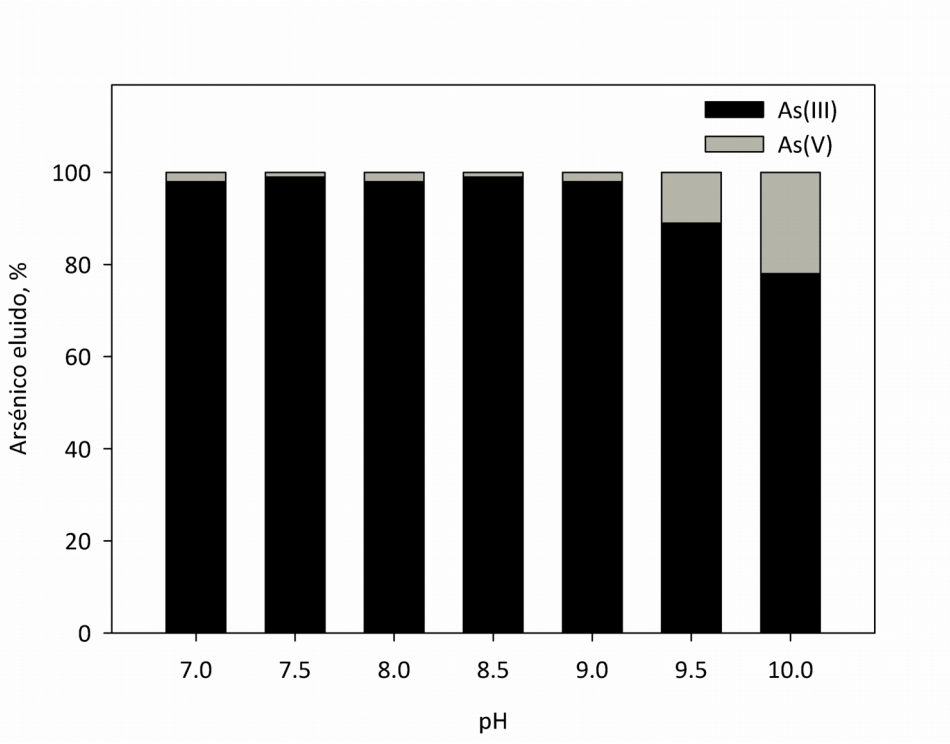


Figura 4.23: Efecto del pH en la conversión de As(III) a As(V). Las experiencias se realizaron con un estándar de 50 µg L^{-1} en medio ácido conteniendo 0.01 % m/v de ácido ascórbico y ajustando a distintos valores de pH con $NaHCO_3$ y Na_2CO_3. Tras la elución se determinó la concentración de las dos formas químicas con el procedimiento propuesto y que se detalla más adelante.

También se comprobó que el ácido ascórbico no provocaba alteraciones de las formas químicas de As(V) y MA. Para ello se realizaron experiencias a concentraciones de 50 µg L^{-1} de arsénico en estas formas a los diferentes valores de pH comentados. En todos los casos, antes de añadir el ácido ascórbico se ajustó el pH a 7 con $NaHCO_3$. Los resultados obtenidos indican que no se produce la reducción de estas formas. Por tanto el procedimiento que se propone para la separación de As(III), As(V) y MA queda esquematizado en las Figuras 4.24 y 4.25. Los analitos retenidos se eluyen en HCl 0.5 mol L^{-1} y se someten a los procesos de preconcentración detallados más adelante.

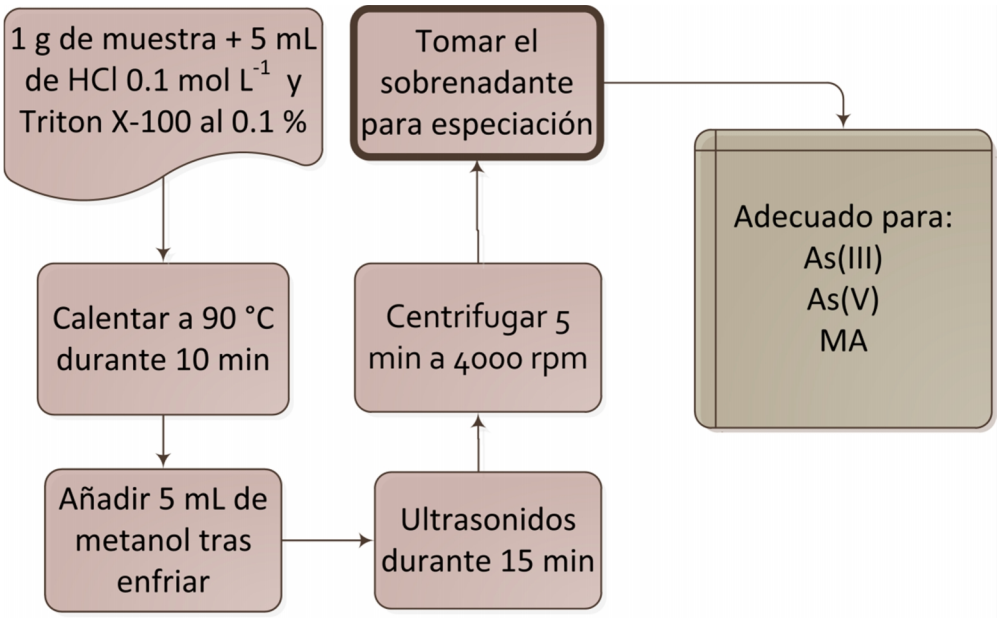


Figura 4.24: Esquema del tratamiento ácido propuesto para la extracción de las formas de arsénico con el fin de distinguir entre As(III) y As(V).

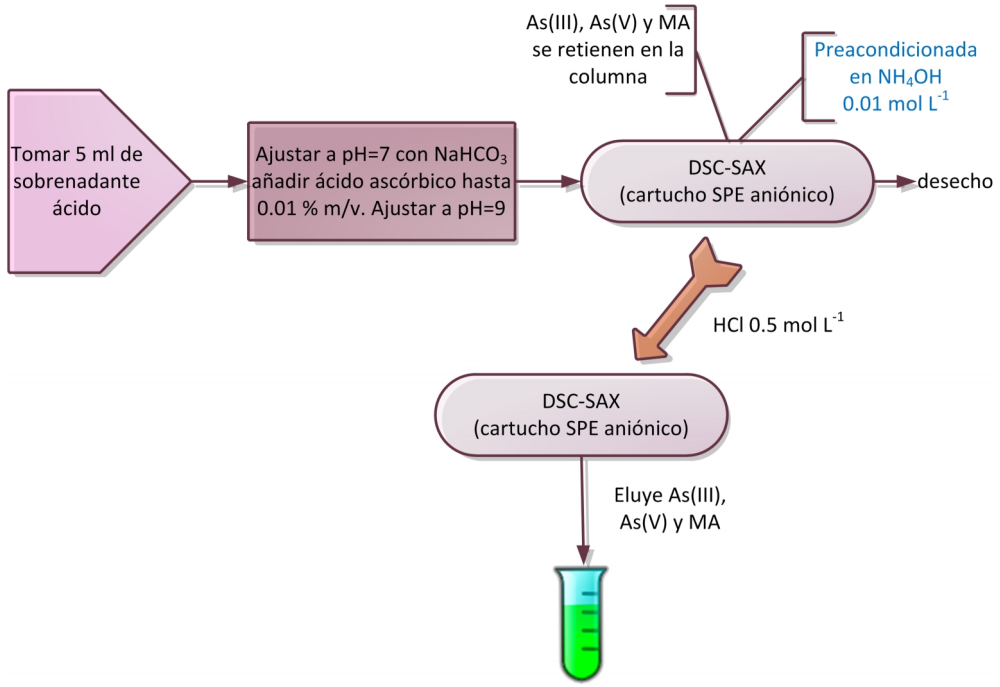


Figura 4.25: Esquema de la separación propuesta para las formas de arsénico con cartuchos SPE tras el tratamiento ácido de extracción.

Trabajando en las condiciones recomendadas se consigue la elución de estas formas químicas de arsénico en un medio "limpio" adecuado para aplicar los procedimientos de preconcentración que se detallan a continuación.

4.3.3. PRECONCENTRACIÓN DE LAS FORMAS DE ARSÉNICO

Los cartuchos SPE resultan adecuados para la retención del analito separándolo de la matriz compleja. Sin embargo, la elución no se consigue en un volumen pequeño de disolución, por lo que la preconcentración es baja, insuficiente para alcanzar la sensibilidad adecuada. En nuestro caso, nunca se consiguió la elución completa, en el mejor de los casos, con menos de 1 mL de eluyente. Desde el punto de vista práctico resulta mucho más adecuado acoplar procesos de microextracción al eluido que intentar eluir en volúmenes pequeños.

En este sentido hemos optamos por el empleo de la microextracción dispersiva líquido-líquido que, como ya hemos comentado en los capítulos 1 y 3, presenta unas excelentes características en cuanto a elevado factor de preconcentración y rapidez. A continuación se detallan los procedimientos DLLME desarrollados para la determinación de As(III), As(V), MA y DMA. El contenido AB se calcula por diferencia entre el contenido total de arsénico y la suma de estas especies. Conviene en primer lugar recordar las características esenciales de DLLME.

Assadi y cols. [102] implementaron esta nueva técnica de microextracción LLE en la que un pequeño volumen de disolvente orgánico inmiscible con el agua se agrega junto con otro inmiscible en ambos. El resultado final es la obtención de un medio disperso constituido por microgotas del disolvente inmiscible. Al ofrecer una extraordinaria superficie de contacto con la fase acuosa, la extracción se realiza rápidamente.

Seguidamente se realiza la separación de las fases mediante centrifugación. Las finas gotas de disolvente orgánico, enriquecidas con el analito, se colectan en el fondo del tubo cónico cuando aquel es más denso que la fase acuosa. La fase orgánica sedimenta-

da se separa con la ayuda de una microjeringa o micropipeta y se somete a la instrumentación analítica adecuada. Un esquema del procedimiento se observa en la Figura 1.1.

En comparación con otros métodos de extracción, en DLLME la superficie de contacto entre las finas y abundantes gotas de extractante y la muestra hace que se acorten los procesos de transferencia de masa de los analitos desde la fase acuosa a la fase orgánica, mejorando considerablemente la eficiencia de la extracción y en definitiva el tiempo de análisis. En la Figura 1.2 pueden observarse fotogramas del proceso de dispersión.

En esta modalidad de microextracción DLLME, la dispersión del disolvente orgánico sobre la muestra acuosa juega un papel clave en la eficiencia de la extracción, por lo que el volumen del agente dispersante ha de ser seleccionado adecuadamente. Debido a su bajo costo, acetona, metanol, etanol y acetonitrilo han sido por lo general utilizados habitualmente como disolventes dispersantes.

Las principales ventajas que presenta DLLME son la simplicidad de operación, la rapidez, el bajo costo, los elevados porcentajes de recuperación y factores de enriquecimiento y sobre todo, en comparación con otras metodologías de microextracción, tiempos de extracción muy cortos (segundos). Aunque el uso de esta metodología DLLME fue implementado por primera vez para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en muestras de agua mediante el uso de la cromatografía de gases con detección por ionización a la llama (GC-FID). Posteriormente, los mismos autores adaptaron su acoplamiento a la espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (ETAAS) para la determinación de cadmio en muestras de agua [103] y Shemirani y cols. [104] a la simultanea preconcentración y determinación de paladio y cobalto en el mismo tipo de muestras.

Subsecuentemente, Feng y colaboradores [105] introdujeron un nuevo método basado en la solidificación de la fase dispersa con su posterior flotación (DLLME-SFO) con la que consiguieron factores de enriquecimiento dos veces mejores que los encontrados con la tradicional LPME.

Por lo general, las metodologías de microextracción tienen como objetivo no solo separar y preconcentrar el analito en un medio aislable, sino también reducir o eliminar las interferencias originalmente presentes en las muestras con el propósito de facilitar la determinación de los analitos a bajas concentraciones. La principal desventaja de la DLLME es que su selectividad es muy baja y los interferentes pueden extraerse junto con el analito. Por esta razón esta metodología ha sido reservada para el análisis de muestras sencillas, como aguas. Sin embargo, si se acopla algún tratamiento adicional al procedimiento, previo a la microextracción, se puede mejorar la selectividad. Por ejemplo Assadi y colaboradores combinaron la SPE con DLLME para la determinación selectiva de clorofenoles en muestras de aguas con diferentes matrices [106].

Las Tablas 4.8 y 4.9 muestran las características de algunos de los procedimientos publicados con esta técnica. Como puede apreciarse ETAAS es la técnica de detección más utilizada porque trabaja perfectamente con el microvolumen de fase orgánica involucrado.

Tabla 4.8: Condiciones experimentales óptimas para la microextracción de compuestos metálicos por DLLME

Analito	Dispersante, mL	Extractante, µL	Agente quelatante	Volumen de fase acuosa, mL	Volumen de fase sedimentada analizada, µL	Referencia
Cd	0.5 mL metanol	34 µL CCl_4	0.0001 g de APDC	5 mL con 50 µL de HNO_3	20 µL	[103]
Cd	0.5 mL metanol	34 µL CCl_4	0.0001 g de N,N'-bis(salicilideno) etilenodiamina	5 mL	20 µL	[107]
Co	2.1 mL metanol	400 µL CH_3Cl	0.1 mL de PAN 10^{-3} M a pH 1 ajustado con HCl	50 mL con $NaNO_3$	100 µL+250 µL de acetona	[108]
Co, Pd	0.4 mL etanol	70 µL diclorobenceno	PAN 10^{-5} M a pH=4	10 mL	60 µL	[104]
Cu	1.5 mL metanol	250 µL CH_3Cl	1 mL reguladora acetato y 0.5 mL de 8-hidroxiquinoleína	5 mL	Se evapora y redisuelve en 0.5 mL de HNO_3	[109]
Au	1 mL acetona	40 µL clorobenceno	2 mL de HCl 2.5 M y 1 mL de Azul Victoria R 4.10^{-5} M	10 mL	10 µL	[110]
Lantánidos	8 mL metanol	600 µL CCl_4	0.8 mL PAN 1 mM	20 mL	Se evapora y redisuelve en 0.5 mL de HNO_3	[111]
Pd	0.5 mL etanol	40 µL CCl_4	0.1 $g.L^{-1}$ DDTC a pH=1	5 mL	--	[112]
Pb	2.5 mL metanol	52 µL CCl_4	50 µL DDTP	25 mL	--	[113]
Pb	0.5 mL acetona	35 µL CCl_4	5 µL DDTP	5 mL	20 µL	[114]
Pb	0.5 mL etanol	40 µL CCl_4	pH=4 y 1 $g.L^{-1}$ PMBP	5 mL	20 µL	[115]
Se	0.5 mL etanol	33 µL CCl_4	50 µL HCl, 0.0001 g APDC	5 mL	20 µL	[116]
Se	0.5 mL etanol	11 µL clorobenceno	0.00025 g 4-nitro-o-fenildiamina	5 nL	0.5 µL	[117]
Organoestaño	0.5 mL etanol	11.5 µL CCl_4	Tetraetilborato como agente derivatizante	5 mL	2 µl	[118]

Tabla 4.9: Características analíticas de algunos de los procedimientos propuestos para la determinación de metales por DLLME

Analito	Técnica	Intervalo lineal	Factor de enriquecimiento	Límite de detección	RSD (%)	Aplicaciones	Referencia
Cd	ETAAS	2–20 ng·L^{-1}	125	0.6 ng·L^{-1}	3.5 (n = 10; 20 ng·L^{-1})	Agua	[**¡Error! Marcador no definido.**]
Cd	ETAAS	2–21 ng·L^{-1}	122	0.5 ng·L^{-1}	2.9 (n = 10; 20 ng·L^{-1})	Agua	[107]
Co	UV/VIS a 577 nm	2–50 µg·L^{-1}	125	0.5 µg·L^{-1}	2.5 (n = 5; 30 µg·L^{-1})	Agua	[108]
Co,Pd	FO-LADS	1–70 µg·L^{-1} (Co) 2–100 µg·L^{-1} (Pd)	165 (Co) 162 (Pd)	0.2 µg·L^{-1} (Co) 0.25 µg·L^{-1} (Pd)	<4 (n = 5)	Agua y muestras sintéticas	[104]
Cu	FAAS	50–2000 µg·L^{-1}	42	3 µg·L^{-1}	5.1 (n = 6; 500 µg·L^{-1})	Aguas	[109]
Au	ETAAS	0.03–0.5 µg·L^{-1}	388	0.005 µg·L^{-1}	4.2 (n = 8; 0.2 µg·L^{-1})	Agua del grifo y materiales silicatados	[110]
Lantánidos	ICP-OES	–	80 (Sm). 100 (Eu). 103 (Gd). 78 (Dy)	–	–	–	[111]
Pd	ETAAS	0.1–5 µg·L^{-1}	156	2.4 ng·L -1	4.3 (n = 7; 10 µg·L^{-1})	Aguas	[112]
Pb	FAAS	1–70 µg·L^{-1}	450	0.5 µg·L^{-1}	3.8 (n = 7; 5 µg·L^{-1})	Aguas	[113]
Pb	ETAAS	0.05–1 µg·L^{-1}	150	0.02 µg·L^{-1}	2.5 (n = 7; 0.5 µg·L^{-1})	Aguas	[114]
Pb	ETAAS	0.1–20 µg·L^{-1}	78	39 ng·L -1	3.2 (n = 7; 10 µg·L^{-1})	Aguas y muestras biológicas	[115]
Se	ETAAS	0.1–3 µg·L^{-1}	70	0.05 µg·L^{-1}	4.5 (n = 10; 2 µg·L^{-1})	Aguas	[116]
Se	GC-ECD	0.015–10 µg·L^{-1}	122	0.005 µg·L^{-1}	4.1 (n = 10; 2 µg·L^{-1})	Aguas	[117]
Organoestaño	GC-FPD	0.5–1000 ng·L^{-1} (como Sn)	825–1036	0.2–1 ng·L^{-1}	2.3–5.9 (n = 7; 20 ng·L^{-1})	Aguas	[118]

4.3.3.1. PRECONCENTRACIÓN DLLME DE AS(III) Y AS(V)

El procedimiento optimizado aquí se basa en uno desarrollado previamente por nuestro grupo de investigación (http://www.um.es/aim) para la determinación con especiación de As y Sb en aguas [119]. Para la extracción de arsénico se precisa el empleo de un ligando con el que forme complejos neutros. Si éste se elige de forma adecuada es posible llevar a cabo procesos de especiación distinguiendo entre As(III) y As(V). Así, serían adecuados aquellos ligandos que forman complejo únicamente con el analito en un estado de oxidación concreto. En este trabajo hemos seleccionado pirrolidín ditiocarbamato amónico, APDC [120], al comprobar que forma complejos con As(III) y no con As(V) y MA. APDC es un ligando no específico que forma complejos con la mayoría de los metales de transición y que ha sido utilizado numerosas veces en las distintas técnicas de LPME [121].

4.3.3.1.1. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE COMPLEJACIÓN Y EXTRACCIÓN

Es de primordial importancia tener en cuenta las características del disolvente a utilizar en la extracción DLLME. El mismo ha de tener una densidad superior a la del agua, alta capacidad de extracción de los analitos en estudio y baja solubilidad en agua. Diclorometano (CH_2Cl_2), cloroformo ($CHCl_3$) y tetracloruro de carbono (CCl_4) fueron estudiados como disolventes de extracción utilizando 200 µL metanol como agente dispersante para un volumen de fase acuosa de 5 mL. Como la solubilidad en agua de los tres disolventes es diferente, se utilizaron respectivamente 100, 75 y 50 µL de $CHCl_3$, CH_2Cl_2 y CCl_4, de esta manera se consiguen, en los tres casos, 35 µL de fase orgánica sedimentada en el fondo del tubo. El factor de enriquecimiento encontrado fue de 95, 78 y 115 para $CHCl_3$, CH_2Cl_2 y CCl_4, respectivamente. En consecuencia, CCl_4 fue elegido como disolvente extractante en subsiguientes experimentos.

En el procedimiento propuesto, 35 µL de fase orgánica sedimentada es el mínimo volumen utilizable para poder introducir con seguridad una alícuota representativa del extracto en el atomizador empleando el automuestreador. Para ello, tras la centrifugación, con una micropipeta de 50 µL se toma toda la fase orgánica sedimentada y un pequeño volumen de fase acuosa para ser trasvasados a un vial eppendorf de polipropileno de 500 µl, que a su vez ha de ser colocado inserto dentro de un vial de 1200 µl. La altura que alcanza la fase orgánica en el vial desde el fondo del eppendorf hasta la interfase es de 5 mm, suficiente para que el automuestreador tome 20 µL como puede apreciarse en la Figura 4.26.

Otra característica básica en la microextracción DLLME es que el agente dispersante de la fase orgánica ha de ser miscible en ambas fases. En el presente trabajo se han probado acetonitrilo, acetona, metanol y etanol para tal fin. La eficiencia de la extracción para cada uno de estos cuatro dispersantes, se evaluó usando un volumen de 400 µL del mismo, conteniendo el agente quelante (0.2 mg mL^{-1} APDC), y CCl_4 al 12.5%, lo que libera 50 µL del disolvente inmiscible. No se encontraron diferencias significativas en la eficiencia de extracción entre los cuatro dispersantes por lo que finalmente fue seleccionado metanol.

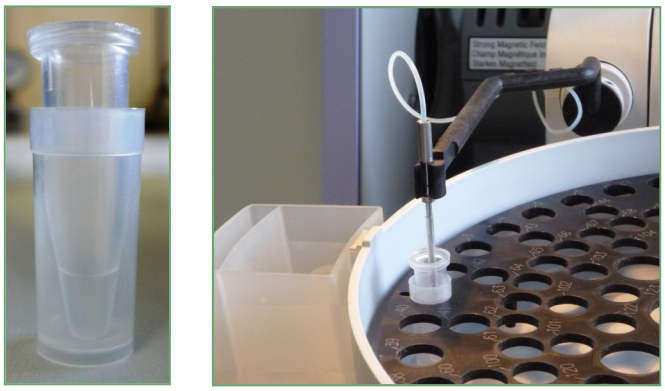


Figura 4.26: Disposición del extracto utilizado en el automuestreador del equipo de espectrometría ETAAS.

Se estudió la cantidad de metanol idónea para la formación de la fase dispersa fijando 50 µL de tetracloruro de carbono como fase inmiscible y 5 mL de fase acuosa. Se probaron volúmenes de metanol entre 100 y 500 µL, encontrándose que a volúmenes bajos la dispersión no era correcta ya que las gotas eran apreciables a simple vista y sedimentaban rápidamente sin centrifugación. Por otro lado, para volúmenes que exceden los 500 µL se encontró un descenso importante en el volumen final de tetracloruro de carbono. Finalmente fue elegido como apropiado un volumen de 400 µL de agente dispersante para la realización de la extracciones.

El pH de las muestras no es un factor importante que afecte significativamente la formación de los complejos de arsénico y antimonio con APDC. Se ha estudiado el efecto del pH en el intervalo de 0.2 a 6 y los resultados obtenidos aparecen en la Figura 4.27. Nótese que el valor óptimo se encuentra en las proximidades de pH = 1. Este valor de pH viene dado por el eluyente utilizado.

Se evaluó la influencia de la concentración de APDC sobre la extracción de As(III) utilizando disoluciones de APDC en metanol en un intervalo de concentraciones entre 0.01 y 0.4 $mg \cdot mL^{-1}$. En todos los casos se añadieron 400 mL de estas disoluciones. Los resultados muestran que existe un incremento en la señal de As(III) a medida que aumenta la concentración de APDC y a partir de 0.12 $mg \cdot mL^{-1}$ de APDC la señal se mantiene constante. Los resultados obtenidos aparecen en la Figura 4.27. En consecuencia, se escogió una concentración de APDC fija de 0.2 $mg \cdot mL^{-1}$, tomando en cuenta la eventual coexis-

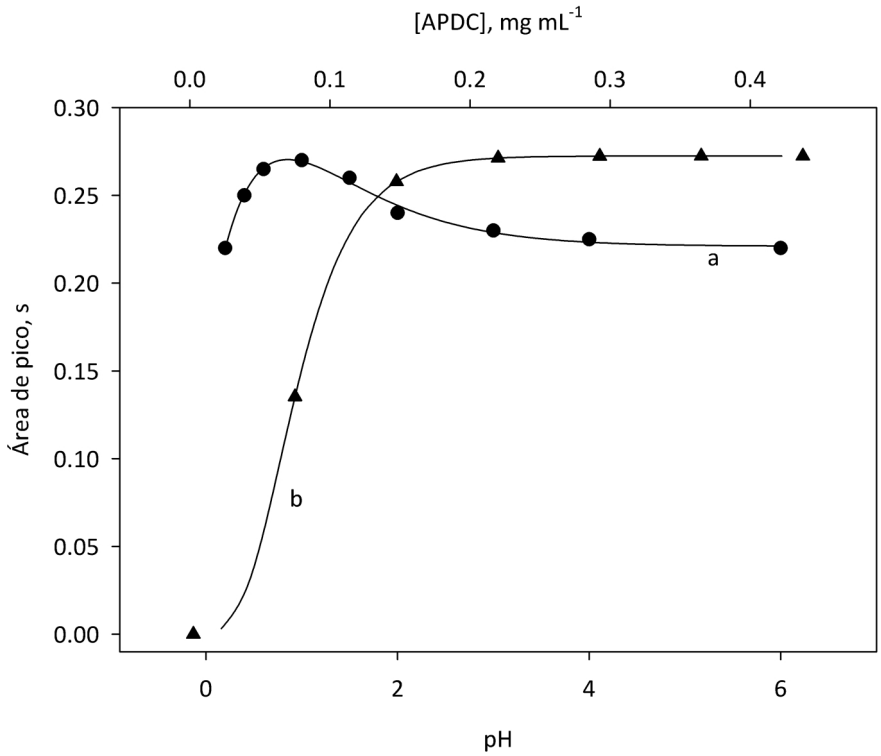


Figura 4.27: Efecto del pH y la concentración de APDC en la microextracción de 1.1 µg L^{-1} de As(III) aplicando el procedimiento propuesto.

tencia de otros iones extraíbles presentes en las muestras, y que pudieran consumir APDC dificultado así la extracción del complejo de As(III).

En DLLME, el tiempo de extracción está definido como el intervalo de tiempo transcurrido desde la inyección de la mezcla dispersante a la disolución acuosa hasta el momento de comenzar la centrifugación de la mezcla. Este tiempo fue estudiado en un intervalo entre 5 y 30 minutos bajo las mismas condiciones experimentales constantes. El resultado condujo a señales constantes independientes del tiempo de contacto, con lo que podemos concluir que la extracción es prácticamente instantánea. Esto es consecuencia de la enorme superficie de contacto entre la disolución acuosa y el tetracloruro de carbono. Esta circunstancia convierte a DLLME en una técnica de extracción muy ventajosa en términos de tiempo de análisis. La mayoría del tiempo requerido para esta extracción se lleva a cabo durante la etapa de centrifugación, que toma aproximadamente 5 minutos.

4.3.3.1.2. CURVAS DE CALCINACIÓN Y ATOMIZACIÓN

El propósito de una etapa de calcinación previa a la atomización de la muestra es eliminar la matriz que acompaña al analito sin pérdidas de éste. Esto reduce la magnitud de la señal de fondo a ser corregida por el espectrómetro. Sin embargo, para evitar que existan pérdidas de As por volatilización durante esta etapa ha de seleccionarse adecuadamente la temperatura de la misma. Para tal fin se realizó un estudio en donde se variaron tanto la temperatura de calcinación como la de atomización. En el primer caso podremos determinar cuando el analito empieza a perderse por volatilización previa y en el segundo optimizaremos la temperatura de atomización con el fin de obtener una señal en forma de pico bien formado y en condiciones isotermas.

Las curvas de calcinación y atomización se obtuvieron con disoluciones acuosas estándar de As(III) de 1 ng mL^{-1} sometidas al procedimiento de DLLME. La Figura 4.28 muestra las curvas de calcinación en ausencia de modificador químico (curva a). Nótese que en estas condiciones se aprecian pérdidas de analito durante la etapa de calcinación desde temperaturas tan bajas como 200 °C. La estabilización del arsénico se puede conseguir fácilmente con el empleo de modificadores químicos. En este sentido se ensayaron níquel, paladio o la mezcla de paladio y magnesio [122]. Sin embargo, estos modificadores químicos, que se aplican habitualmente desde disoluciones acuosas, no son adecuados en nuestro caso ya que ahora inyectamos la muestra en tetracloruro de carbono y por tanto no existe una mezcla íntima entre muestra y modificador. Una solución a este inconveniente consiste en inyectar primero el modificador, secarlo mediante la ejecución de la primera etapa del programa de calentamiento y a continuación inyectar la muestra ejecutando de nuevo el programa completo. Esto supone un consumo de tiempo adicional y tampoco garantiza una buena mezcla ya que el residuo sólido del modificador puede que no coincida físicamente en la superficie de la plataforma con el de la muestra.

Para evitar este inconveniente se consideró el empleo de modificadores “permanentes”. Esto es, especies metálicas que se adsorben por distintos procedimientos sobre

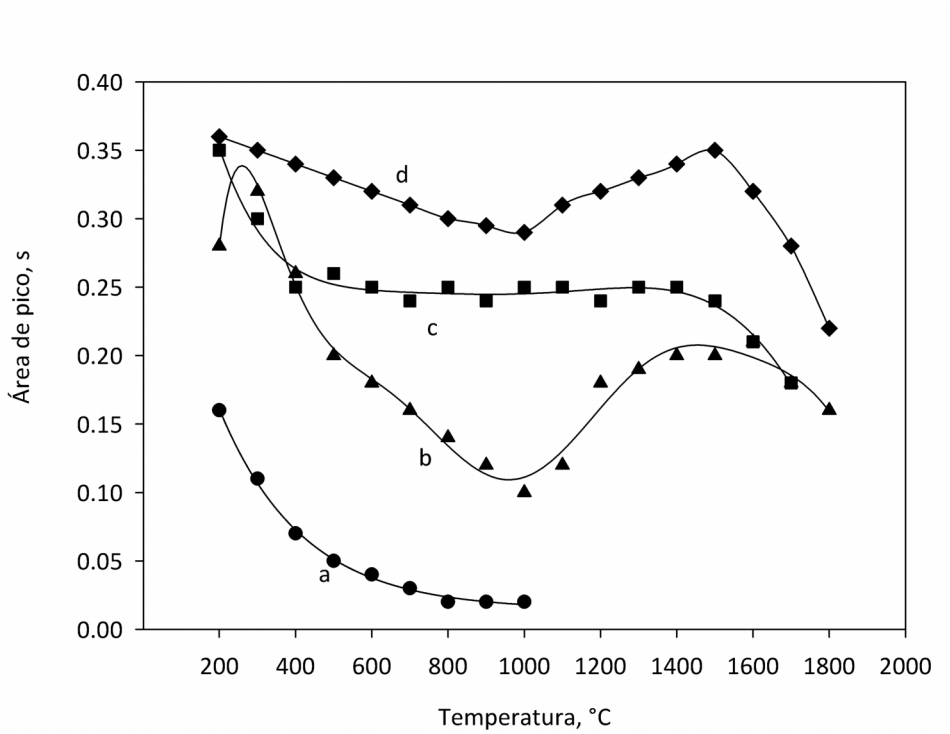


Figura 4.28: Curvas de calcinación para el extracto en CCl_4 del complejo de As(III)-APDC en ausencia de modificador químico (curva a) y en presencia de molibdeno, iridio y volframio (curvas b-d, respectivamente).

la superficie de la plataforma generando un recubrimiento homogéneo. De esta forma creemos que este simple tratamiento puede ser efectivo para un número suficiente de determinaciones, al menos durante una jornada completa de trabajo. En este sentido se estudiaron las prestaciones de modificadores químicos que o bien conducen a la formación de carburos estables (Mo y W) o bien se impregnan fuertemente en el atomizador (como Ir) provocando un "modificación permanente" de la superficie de grafito pirolítico con una penetración de aproximadamente 10 µm [123].

Los tubos de grafito a utilizar fueron tratados con dichos modificadores de dos formas diferentes, por inmersión del tubo en una disolución concentrada del modificador por un tiempo prolongado (toda la noche) o mediante inyecciones sucesivas de disoluciones concentradas del mismo. En cualquiera de los dos casos es preciso preacondicionar el tubo mediante el empleo del programa de calentamiento que aparece en la Tabla 4.3. Cuando se utiliza Ir la cuarta etapa debe ajustarse a 2000 °C.

Los resultados obtenidos con el empleo de estos tres modificadores químicos sobre la determinación de As(III) extraído como complejos con APDC en CCl_4 aparecen en

la Figura 4.28. Como puede observarse, el uso de estos modificadores permitió estabilizar al arsénico extraído en tetracloruro de carbono durante la etapa de calcinación hasta los 1400 °C. Sin embargo, se obtuvo un valle en las curvas de calcinación entre los 300 y los 1000 °C (curva b). La magnitud de este valle es más evidente en el sentido Mo>W>Ir y se mostró independiente del procedimiento seguido en el pretratamiento del tubo, desapareciendo cuando la temperatura de calcinación es elevada [92, 124]. Los mejores resultados se obtuvieron con W e Ir.

Debido a que el proceso de extracción conlleva una importante etapa de aislamiento del analito, ya que ahora únicamente le acompañan en la fase orgánica las especies extraídas, no fue necesario considerar altas temperaturas de calcinación. Sin embargo, cuando se usaron temperaturas de calcinación menores de 300 °C se observó una señal de fondo pronunciada y también la aparición de humo al momento de la atomización que conllevaron a un descenso en la precisión de las lecturas.

Para mejorar este parámetro en la determinación de arsénico, además de prolongar la vida útil del horno de grafito, se estableció una temperatura de calcinación de 400 °C con la que fueron resueltos los problemas anteriormente mencionados.

En estas condiciones, la mejor sensibilidad se obtuvo con el empleo de W como modificador químico. Utilizando el procedimiento de inmersión en una disolución de volframato sódico de 1000 µg mL^{-1} de volframio durante 12 horas y aplicando el programa de calentamiento que aparece en la Tabla 4.3. El efecto de estabilización fue efectivo durante al menos 100 ciclos de atomización bajo las condiciones (programa) de calentamiento descritas en la Tabla 4.2.

El efecto de la temperatura de atomización fue estudiado en el intervalo de temperaturas desde 1600 °C hasta los 2200 °C. No se observaron cambios significativos en la señal integrada de la absorbancia. Sin embargo, por debajo de los 1700 °C la señal se hace más ancha y se deteriora ampliamente la relación señal ruido. En base a estos resultados, se seleccionó como temperatura de atomización 1900 °C para la determinación de As.

En las condiciones recomendadas la masa característica para arsénico es de 46 pg. Este valor es suficientemente bajo, pero aún puede mejorar. En efecto, si se desea aumentar la sensibilidad de la determinación podemos utilizar disolución acuosa de nitrato de paladio de 1000 μg mL^{-1} como modificador químico. En estas condiciones, la masa característica disminuye hasta 34 pg, lo que supone un aumento en la sensibilidad de aproximadamente el 40 %. Por el contrario obliga a inyectar primero el modificador, secar y a continuación inyectar la muestra ejecutando el programa de calentamiento completo.

Utilizando nitrato de paladio como modificador químico, la estabilización del analito es mucho más eficaz y se puede calcinar hasta 800 °C y la temperatura de atomización ha de ser mayor que cuando el modificador es tubo recubierto con volframio. En efecto, utilizando paladio como modificador la señal es máxima para una temperatura de atomización de 2200 °C. La Tabla 4.2 muestra el programa de calentamiento propuesto. Nótese que en estas condiciones es imprescindible la inyección en etapas separadas del modificador químico y la muestra.

4.3.3.1.3. DETERMINACIÓN DE AS(V)

Los iones pentavalentes de arsénico no forman complejos con APDC [125], por tanto, As(V) puede ser extraído tras la reducción de los iones pentavalentes a As(III) con tiosulfato de sodio. El efecto de la cantidad de tiosulfato de sodio en la determinación de As fue examinado a pH 1. La Figura 4.29 muestra cómo la absorbancia debida al arsénico extraído con APDC en CCl_4 aumenta a medida que aumenta la concentración de tiosulfato en el medio acuoso hasta alcanzar un valor máximo a un nivel 5 mmol L^{-1} de tiosulfato sódico. En estas condiciones la reducción es cuantitativa.

Para verificar la exactitud del método propuesto, se analizaron diferentes muestras de aguas a las que se añadieron distintas concentraciones del analito. Los resultados de las cantidades de arsénico encontradas en comparación a las cantidades añadidas se muestran en la Tabla 4.10. Las cantidades de analito añadidas permitieron obtener diferentes relaciones de concentración de especies tri y pentavalentes. La aplicación de la

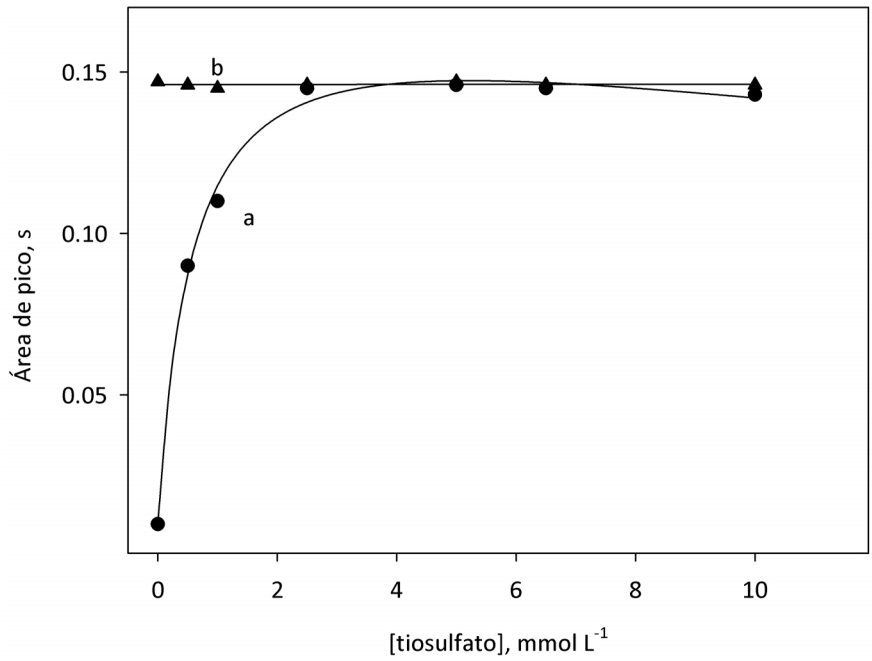


Figura 4.29: Efecto de la concentración de tiosulfato en la reducción de As en forma pentavalente (curva a). La curva b corresponde a experiencias similares con As(III).

prueba de los órdenes con signo de Wilcoxon reveló la ausencia de diferencias significativas entre los valores puestos y los encontrados al 95 % de nivel de confianza.

Tabla 4.10: Resultados (promedio ± s, n=5) de la determinación de arsénico en diferentes muestras sintéticas de agua.

Agregado, µg L^{-1}		*Determinado, µg L^{-1}*		*Calculado, µg L^{-1}*
As(III)	As(V)	As(III)	As(III)+As(V)	As(V)
1	0	0.98 ± 0.04	1.01 ± 0.04	0.03 ± 0.04
0.5	0.5	0.52 ± 0.03	1.02 ± 0.04	0.50 ± 0.04
0.2	0.8	0.21 ± 0.04	0.99 ± 0.03	0.78 ± 0.04
0	1	0.02 ± 0.04	1.01 ± 0.04	0.99 ± 0.04

4.3.3.1.4. EFECTO DE LOS IONES COEXISTENTES

Se realizó un estudio para conocer el efecto que otras sustancias que podrían estar presentes en los eluidos de la columa DSC-SAX tienen en la respuesta del detector cuando se someten al procedimiento propuesto. En estas experiencias se realizó la extracción habitual recomendada a disoluciones de 1 µg L^{-1} de As(III) conteniendo diferentes concentraciones de iones coexistentes potencialmente interferentes. Los resultados se

muestran en La Tabla 4.11. En esta tabla se presenta el límite de tolerancia del procedimiento para cada analito definido como la concentración de los iones coexistentes que pueden cambiar la señal del analito puro en como máximo ± 10 %. Tal y como se puede observar, los cationes y aniones más comunes no poseen efectos adversos en el análisis de arsénico, lo que hace al método lo suficientemente selectivo.

Tabla 4.11: Límites de tolerancia de iones coexistentes

Ion coexistente	Límite de tolerancia, mg L^{-1}
Na^{+}, K^{+}	5000
Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}	1000
Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+}	50
Ni^{2+}, Pb^{2+}	10
Fe^{3+}, Al^{3+}, Cr^{3+}	5
SO_4^{2-}	5000
PO_4^{3-}	500

4.3.3.1.5. CALIBRACIÓN

Las características analíticas del procedimiento propuesto aparecen resumidas en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12: Características del procedimiento propuesto para la determinación de As(III) utilizando la DLLME con ETAAS

Parámetro	
Intervalo de trabajo, µg L^{-1}	0.06-2
Frecuencia de muestreo[a] (Número de muestras por hora)	24
Factor de enriquecimiento[b]	115
Consumo de muestra, mL	5
Consumo de reactivos, mL	
Disolución de APDC de 0.2 mg mL^{-1} en metanol	0.4
Tetracloruro de carbono	0.05
Eficiencia de extracción[c], %	100
Límite de detección (3s), µg L^{-1}	0.02
Precisión (RSD, n=5), %	3.1
Curva de calibrado (5 estándares, n=3, µg L^{-1})	
Con recubrimiento de volframio	$A_{int}=0.006 + 0.221C_{As}$
Con nitrato de paladio	$A_{int}=0.005 + 0.309C_{As}$

[a] Calculada centrifugando seis muestras al mismo tiempo; [b] Comparada con la determinación directa de estándares acuosos; [c] Comparada con la masa total de analito introducida en la fase acuosa;

El factor de enriquecimiento se ha calculado como la relación entre la pendiente de la curva de calibración resultante de patrones acuosos no sujetos al proceso de preconcentración, y la pendiente de la curva de calibrado de patrones sometidos al procedimientos de extracción propuesto.

El límite de detección (LOD) se ha calculado en base al criterio de tres veces el error estándar de la estimación ($s_{y/x}$) para un ajuste lineal de los datos de la recta de calibrado. Como puede observarse el valor es bastante bajo, lo cual es un factor decisivo para la determinación de concentraciones muy bajas de arsénico.

4.3.3.2. PRECONCENTRACIÓN POR DLLME DE MA Y DMA

Los ácidos monometil arsínico y dimetil arsínico no forman complejos con APDC. Por tanto la presencia de MA en el eluido del cartucho DSC-SAX no supone una interferencia para la determinación de As(III) y As(V). Además, en el esquema de separación propuesto, MA eluye del intercambiador aniónico mientras que DMA lo hace del catiónico, es decir están separados.

Para poder realizar la preconcentración por DLLME es preciso formar especies neutras con estos analitos de forma que sean solubles en disolventes inmiscibles con el agua. Como es sabido tioles y ditioles se utilizan ampliamente en espectrometría de

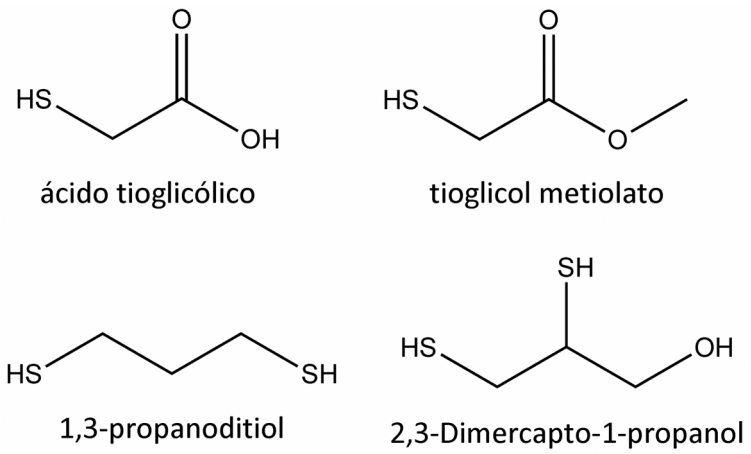


Figura 4.30: Estructura química de algunos tioles utilizados en la derivatización de las formas químicas de arsénico.

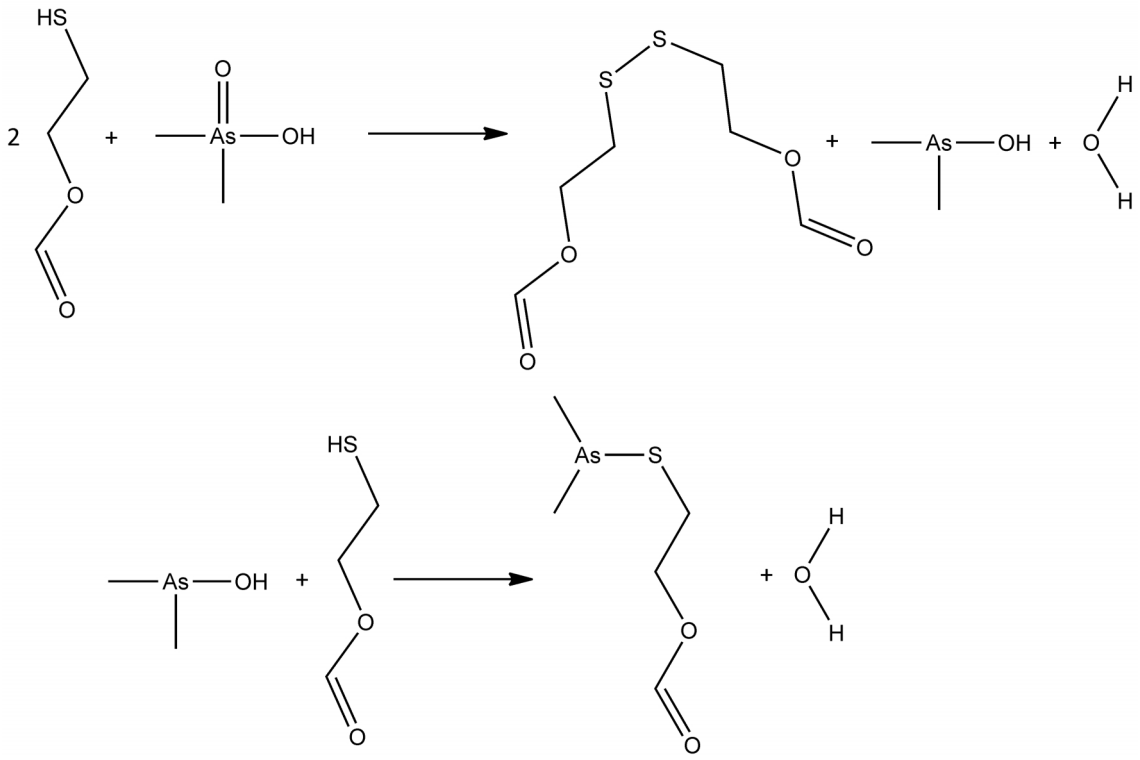


Figura 4.31: Reacciones químicas entre tioglicol metilato y DMA.

fluorescencia atómica porque tienen un efecto nivelante en la sensibilidad de la técnica de generación de hidruros (AsH_3) para la determinación de las especies As(III), As(V), MA y DMA [126]. En cromatografía de gases y líquidos también se utilizan como agentes derivatizantes para la formación de compuestos volátiles neutros de las formas de arsénico mencionadas [127-131].

Quizás los más ampliamente utilizados sean los monotioles como el ácido tioglicólico [126, 132] y el tioglicol metiolato [127-129], aunque los ditioles también se han utilizado ampliamente [130, 133 y 134]. La Figura 4.30 muestra algunas estructuras de este tipo de compuestos.

La hipótesis más ampliamente aceptada, al menos en el caso de los monotioles es que primero As(V), MA y DMA se reducen a As(III) por acción del tiol y seguidamente se forma un compuesto neutro según se esquematiza en la Figura 4.31.

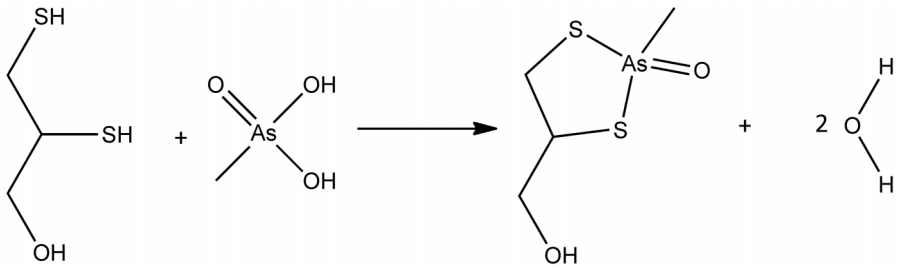
En general, As(V), MA y DMA reaccionan según:

$$2T\text{-}SH + R_nAsO(OH)_{3-n} \rightarrow T\text{-}S\text{-}S\text{-}T + R_nAs(OH)_{3-n} + H_2O$$

$$R_nAs(OH)_{3-n} + (3\text{-}n)T\text{-}SH \rightarrow R_nAs(\text{-}ST)_{3-n} + (3\text{-}n)H_2O$$

donde T-SH es el ácido tioglicólico, y n varía entre 2 (para DMA) y 0 (para As(V)).

En el caso de empleo de ditioles como 2,3-dimercapto-1-propanol, también conocido como BAL[1] los espectros de masas obtenidos en HPLC con electrospray no evidencian la presencia de especies MA-BAL ni DMA-BAL [133], solamente se han observado señales debidas a As(III)-BAL, As(V)-BAL y aductos de estas formas con el disolvente (metanol). No obstante los autores proponen estructuras similares a las comentadas anteriormente en el caso de que no se produjera la reducción a As(III). Estas estructuras tendrían la forma:



para MA. Sin embargo, para DMA no se propone estructura resultante de la reacción.

La reducción de MA y DMA a As(III) por estos tioles durante la reacción de derivatización no supone un inconveniente en nuestro caso pues ambas formas se encuentran separadas durante el proceso de intercambio iónico.

Si bien ácido tioglicólico y su metil ester han sido ampliamente utilizados como agentes derivatizantes en la determinación de arsénico con GC-MS [127-130], GC-AED [131] y en la generación de hidruros volátiles [135], el empleo de los ditioles está menos extendido en el campo de la Química Analítica. En efecto, el 2,3-dimercapto-1-propanol

[1] Recibe de las siglas de *British-Anti-Lewisite,* y se utilizaba como antídoto en el envenenamiento por la lewisita, arma química conteniendo 2-cloroetenildicloroarsina.

(BAL) se ha utilizado mucho en el campo médico para el tratamiento de intoxicaciones por elementos metálicos como bismuto [136], cinc y cobre [137], manganeso [138], mercurio [139] y hierro (II) [140] y (III) [141] y por supuesto arsénico [142-146].

En cuanto a sus aplicaciones analíticas se ha utilizado en la especiación de arsénico inorgánico mediante la elución selectiva de As(III) retenido en una columna de sílice [147], en la formación de hidruros volátiles [126], como quelatante en la extracción con disolventes seguida de HPLC [134] y como agente derivatizante para la especiación de arsénico mediante HPLC-MS [133]. La reactividad de BAL con As(III), As(V), MA y DMA es conocida desde hace tiempo [148, 149], pero la interpretación de las condiciones de reacción y la reactividad de todas las formas ha cambiado [133].

Si bien en nuestro grupo de investigación ya se había utilizado el metil tioglicolato (TGM) para la derivatización y especiación de As(III), As(V), MA y DMA en diversos tipos de muestras con GC-AED [131], en esta ocasión hemos optado por un ditiol para la formación de especies neutras con MA y DMA susceptibles de extraerse con disolventes orgánicos mediante DLLME.

A continuación se detallan los resultados obtenidos en la optimización de las condiciones experimentales para la extracción de los compuestos neutros resultantes de la reacción de derivatización de MA y DMA con BAL.

4.3.3.2.1 ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN Y EXTRACCIÓN

De la revisión bibliográfica efectuada se deduce que son muy variados los disolventes que permiten extraer los compuestos formados en la reacción de las especies de arsénico con BAL. En este sentido se ha propuesto el empleo de benceno, ciclohexano, hexano, diclorometano, acetato de butilo, metil isobutil cetona y tolueno entre otros. Desde el punto de vista de su empleo en DLLME resulta más práctico usar un disolvente más denso que el agua de modo que tras la centrifugación se deposite en el fondo del tubo de ensayo. En consecuencia se pensó inicialmente en el empleo de diclorometano (DCM) como el disolvente más adecuado y ya utilizado por nosotros anteriormente

[131]. Teniendo en cuenta su densidad (1.33 g cm^{-3}) quedará en la parte baja del tubo de extracción y atendiendo a su solubilidad en agua (13 g L^{-1}) es de esperar que en 5 mL de fase acuosa se disuelvan aproximadamente 49 µL. Por tanto se ensayaron volúmenes de DCM entre 70 y 120 µL para la extracción.

Como agente dispersante se ensayaron primero los habituales en DLLME: metanol, etanol, acetonitrilo y acetona. Puesto que todos conducen a resultados similares, y teniendo en cuenta que la disolución de BAL se prepara en metanol, hemos seleccionado este disolvente como el agente dispersante más adecuado. El volumen adecuado de agente dispersante se ha estimado a partir de los valores de señal obtenidos para la determinación por DLLME de una disolución de MA conteniendo 1 µg L^{-1} de arsénico. En todos los casos se mantuvo constante el volumen de DCM en 90 µL y el de metanol se varió entre 100 y 400 µL. El tamaño de las microgotas formadas aumenta al disminuir el contenido de metanol y por tanto disminuye la eficiencia de la extracción. Cuando la concentración de metanol es alta se produce un aumento indeseable de la cantidad de DCM que se disuelve en la fase acuosa y la señal medida aumenta pero como consecuencia de que disminuye el volumen de DCM recogido. Corrigiendo este efecto por el cambio de volumen se obtiene que la señal de arsénico en el extracto es máxima y constante a partir de 250 µL de metanol. Los mejores resultados se obtuvieron para la mezcla dispersante-extractante constituida por 300 µL de metanol y 90 µL de DCM. Esto equivale a la adición, a 5 mL de fase acuosa, de 400 µL de una disolución al 23 % v/v de DCM en etanol. En estas condiciones el volumen que se recoge en el fondo del tubo al acabar el proceso DLLME es de 45 µL.

La apreciable solubilidad del DCM en la fase acuosa supone un problema de reproducibilidad en las medidas. En efecto, pequeños cambios en el volumen de DCM recogido provocan importantes modificaciones en la señal medida. Por este motivo se ensayaron otros disolventes menos solubles en agua. En este sentido, encontramos que Cl_4C, aunque nunca antes ha sido propuesto para la extracción de los compuestos resultantes de la reacción de MA y DMA con BAL, también lo extrae con idéntica eficacia.

Estudios de optimización similares a los realizados para DCM nos llevan a proponer una composición de disolventes dispersante y extractante similar a la utilizada en la de-

terminación de As(III) y As(V) con APDC. Es decir, se propone el empleo de 400 µL de metanol conteniendo el 12.5 % de Cl_4C. En este caso, a diferencia de lo que ocurre con As(III) y As(V), el reactivo BAL no se puede añadir junto con la mezcla de disolventes ya que resulta necesario provocar previamente la reacción en condiciones enérgicas.

En las condiciones recomendadas el volumen de Cl_4C recogido tras el proceso de microextracción es de aproximadamente 35 µL, lo que supone, si el porcentaje de extracción del analito es del 100 %, un factor de preconcentración de aproximadamente 120 veces.

Como veremos más adelante, a partir del cociente entre las pendientes con y sin microextracción se calcula un factor de preconcentración de 110 veces, lo que sugiere que el porcentaje de extracción ha de ser prácticamente del 100 %.

El reactivo 2,3-dimercapto-1-propanol se presenta comercialmente en estado líquido con una pureza del 98 %. Resulta ligeramente soluble en agua de forma que se pueden preparar disoluciones hasta el 0.4 % v/v. Sin embargo, esta concentración resultó baja para nuestras necesidades, por lo que optamos por disolverlo en metanol. De esta forma se prepararon disoluciones de hasta el 10 % v/v sin dificultad.

Se ha estudiado el efecto que la concentración de BAL tiene en la señal medida de arsénico en el extracto de Cl_4C resultante del proceso DLLME cuando el analito es MA y DMA. La Figura 4.32 muestra los resultados obtenidos. Como puede observarse, en ambos analitos, la señal se hace máxima y constante a partir de una concentración de BAL en fase acuosa del 0.06 % v/v. Para evitar defecto de reactivo debido a la presencia de otras especies que puedan formar complejo o reaccionar con BAL se ha optado por proponer como concentración óptima de BAL la del 0.12 % v/v que equivale a la adición de 100 µL de BAL al 6 % v/v.

Un aspecto importante a considerar es el pH del medio de reacción. En este momento es preciso recordar que la especie MA viene de la elución en HCl 0.5 M desde el cartucho intercambiador aniónico (DSC-SAX), mientras que la especie DMA viene de la elución en NH_4OH 0.5 M desde el cartucho de intercambiador catiónico (DSC-SCX). Aunque la reacción de ambas especies transcurre incluso a pH alcalino, la cinética y la extensión

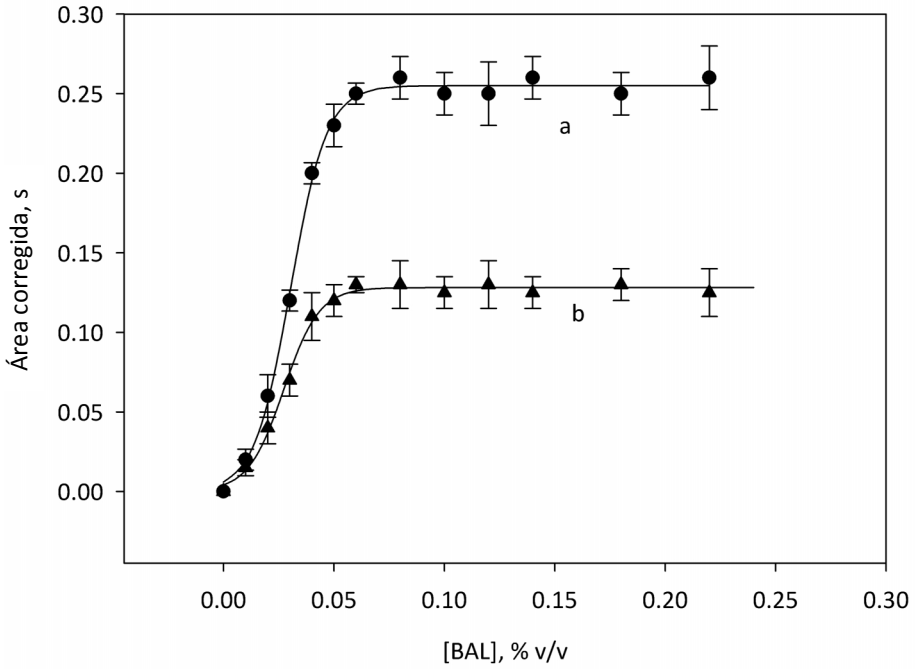


Figura 4.32: Efecto de la concentración de BAL en la señal medida para el extracto en Cl_4C de disoluciones conteniendo MA (curva a) y DMA (curva b), 1.2 y 0.5 µg L^{-1} de As, respectivamente.

de la reacción son diferentes. En efecto, como puede apreciarse en la Figura 4.33 la eficacia de la reacción comienza a disminuir en medio alcalino. Por tanto optamos por, en el caso del DMA, acidular el medio de reacción hasta pH = 4 utilizando unos pocos microlitros de HCl 1 M. En el caso del MA no es preciso rebajar la acidez ya que la reacción es cuantitativa en esas condiciones.

La reacción entre BAL y MA o DMA es cinéticamente lenta a temperatura ambiente. La Figura 4.34 muestra el cambio en la extensión de la reacción cuando ambos analitos se encuentran a pH=4 con el tiempo de reacción en presencia y/o ausencia de ultrasonidos. Un ligero aumento de la temperatura acorta aún más el tiempo de reacción reduciéndolo a unos pocos minutos. Por tanto se propone el calentamiento del eluido a 40 °C durante 15 min al tiempo que se somete a la acción de los ultrasonidos. Ambas cosas pueden llevarse a cabo simultáneamente empleando un baño de ultrasonidos termostatizado como el que se comenta en la Parte Experimental.

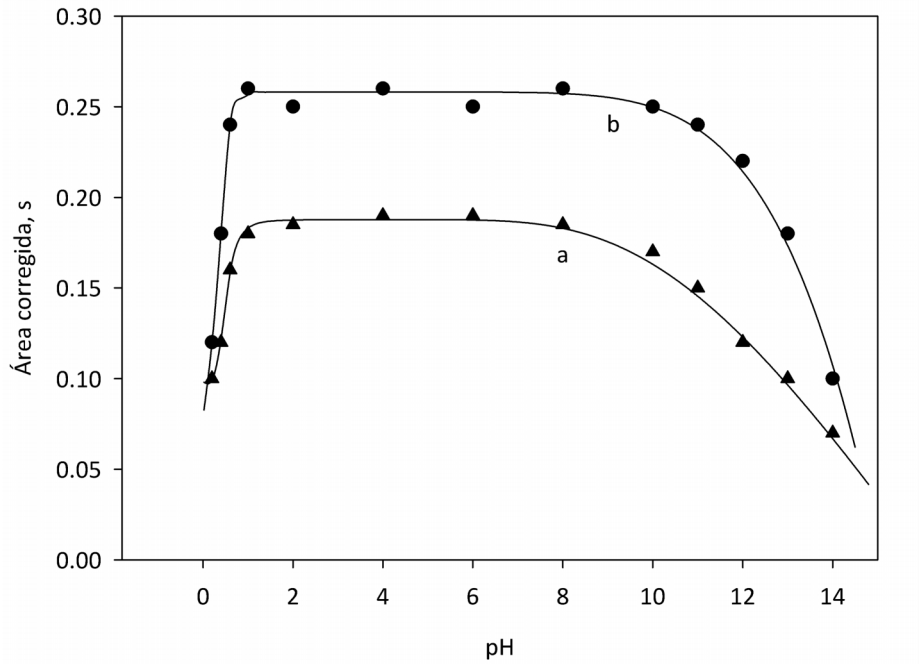


Figura 4.33: Efecto del pH en la señal medida para el extracto en Cl_4C de disoluciones conteniendo MA (curva a) y DMA (curva b), 1.2 y 0.8 µg L^{-1} de As, respectivamente.

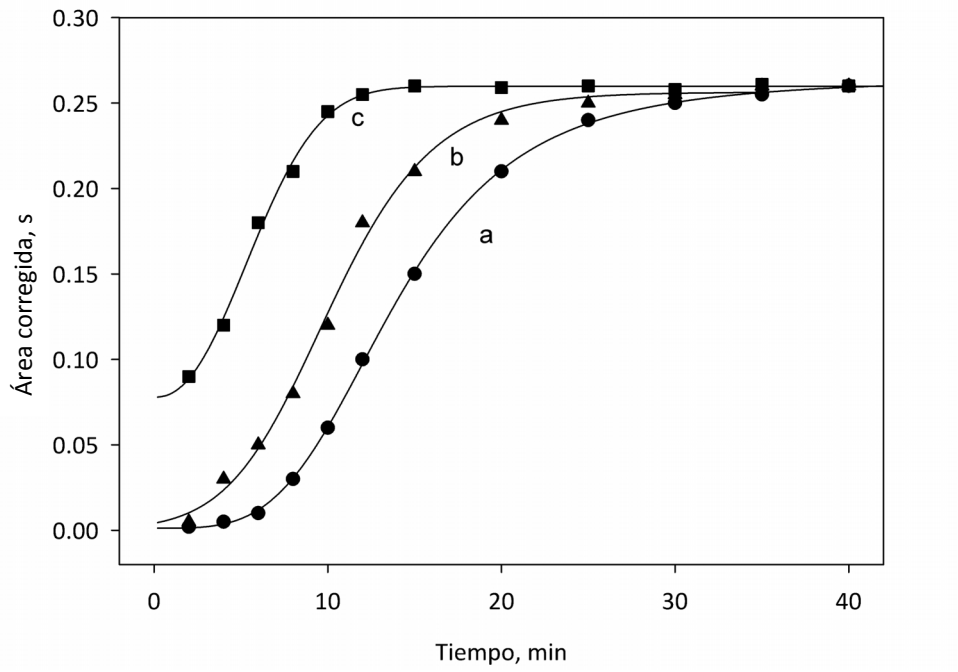


Figura 4.34: Efecto de la temperatura y los ultrasonidos en la reacción de BAL con DMA. Curvas a-c, señales medidas para el extracto en Cl_4C para reacciones a temperatura ambiente, 40 °C y 40 °C + ultrasonidos, respectivamente.

4.3.3.2.2. CURVAS DE CALCINACIÓN Y ATOMIZACIÓN

Se estudió el comportamiento en el atomizador de los productos de reacción de MA y DMA con BAL extraídos en Cl_4C. Para ello se realizaron curvas de calcinación y atomización a partir de disoluciones acuosas estándar de MA y DMA conteniendo 1 µg L^{-1} sometidas al procedimiento de DLLME.

Aunque en un principio era de esperar un comportamiento similar al observado en la determinación de As(III) y As(V) por extracción con APDC, la realidad no fue así. En efecto, como ya comentamos en el Capítulo 2, al medida que aumenta el grado de metilación del arsénico la sensibilidad en el atomizador cambia para determinados modificadores químicos. La Figura 4.35 muestra las señales obtenidas para una misma cantidad de arsénico en forma de As(III), MA, DMA y AB cuando se utilizan las siguientes condiciones experimentales:

A) Tubo de grafito pirolítico recubierto de volframio.
B) Tubo de grafito pirolítico recubierto de volframio con bis(benzonitrilo) dicloro paladio como segundo modificador.
C) bis(benzonitrilo) dicloro paladio como modificador en tubo de grafito pirolítico sin modificar.
D) Nitrato de paladio como modificador químico en tubo de grafito pirolítico sin recubrir.

En las condiciones A, B y C no es preciso inyectar de forma separada modificador químico y muestra, por lo que el proceso resulta más cómodo. En la condición D muestra y modificador químico son inmiscibles.

El uso del tubo de grafito recubierto de volframio ya ha sido comentado en 4.3.3.1.2 y el empleo de bis(benzonitrilo) dicloro paladio como modificador químico ha sido propuesto en la bibliografía [150]. Esta sustancia se prepara a partir del producto comercial disuelto en etanol como se indica en la Parte experimental. De esta forma el modificador químico resulta miscible con el extracto orgánico.

Concentraciones de 50 µg L^{-1} de As(III), MA, DMA y AB en metanol se han medido directamente empleando las cuatro condiciones comentadas. Como puede apreciarse en la Figura 4.35, en las condiciones A la respuesta del detector depende de la forma química de arsénico. La señal disminuye con el grado de metilación. La AB sigue un comportamiento diferente, mostrando la máxima sensibilidad. La estabilización de As(III), MA y DMA mejora cuando además del recubrimiento de volframio utilizamos el paladio orgánico como modificador (condiciones B). La capacidad estabilizante del paladio orgánico no es muy alta ya que como puede apreciarse en las condiciones C la señal para MA, DMA y AB no es demasiado buena. Los mejores resultados de sensibilidad se han obtenido en las condiciones D. Aquí, además, la respuesta del detector no depende de la forma química de arsénico.

Como el producto que se extrae en Cl_4C de la reacción de MA y DMA con BAL no es ninguno de estos se evaluó la respuesta del detector a extractos de estas dos especies tras ser sometidas al procedimiento de extracción propuesto. No se observó diferencia de comportamiento entre los extractos correspondientes a los productos de reacción de

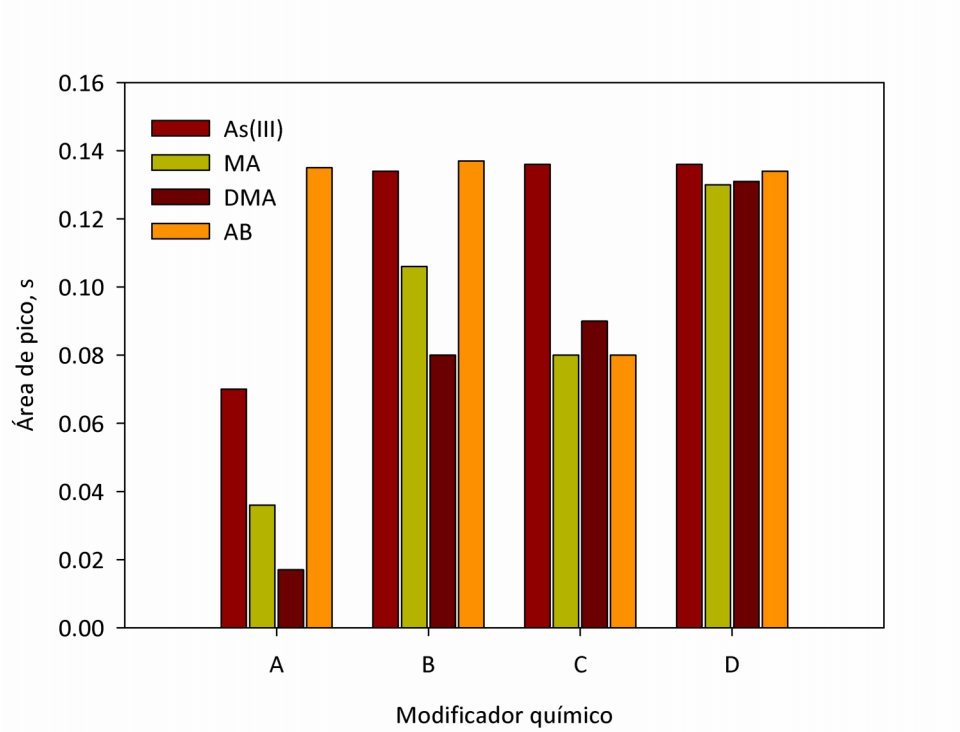


Figura 4.35: Señal analítica obtenida para las distintas especies de arsénico cuando se emplean diferentes modificadores (ver texto para detalles).

MA y DMA con BAL en las cuatro condiciones comentadas. Sin embargo, ahora los extractos se encuentran en tetracloruro de carbono y eso es la causa de que la sensibilidad en el tubo de grafito recubierto de volframio sea ligeramente inferior a la que se observa para el empleo de nitrato de paladio. Este efecto ya se comentó en el apartado 4.3.3.1.2 en la determinación del complejo formado por As(III) con APDC en Cl_4C.

De nuevo aquí como allí se ofrecen dos alternativas. Por una parte se puede utilizar un tubo de grafito recubierto de volframio con el que se consigue una masa característica de 46 pg o bien se puede utilizar nitrato de paladio de 1000 µg mL^{-1} como modificador químico en tubo de grafito pirolítico. En este caso se obtiene una masa característica de 36 pg, lo que supone un aumento de la sensibilidad de aparentemente el 40 %. Por el contrario, es preciso inyectar separadamente modificador y muestra. La Tabla 4.2 muestra los programas de calentamiento propuestos para ambas alternativas.

4.3.3.2.3. EFECTO DE LOS IONES COEXISTENTES

Se realizó un estudio para conocer el efecto que otras sustancias que podrían estar presentes en los eluidos de la columa DSC-SCX tienen en la respuesta del detector cuando se someten al procedimiento propuesto. En estas experiencias se realizó la extracción habitual recomendada a disoluciones de 1 µg L^{-1} de As como MA conteniendo diferentes concentraciones de iones coexistentes potencialmente interferentes. Los resultados se muestran en La Tabla 4.13. En esta tabla se presenta el límite de tolerancia del procedimiento para cada analito definido como aquella concentración máxima de los iones coexistentes que pueden cambiar la señal del analito puro en menos del ± 10 %. Tal y como se puede observar, los cationes y aniones más comunes no poseen efectos adversos en el análisis de arsénico, lo que hace al método lo suficientemente selectivo.

Tabla 4.13: Límites de tolerancia de iones coexistentes

Ion coexistente	Límite de tolerancia, mg L^{-1}
Na^+, K^+	5000
Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}	3000
Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+}	500
Ni^{2+}, Pb^{2+}	30
Fe^{3+}, Al^{3+}, Cr^{3+}	15
SO_4^{2-}	5000
PO_4^{3-}	500

4.3.3.2.4. CALIBRACIÓN

Las características analíticas del procedimiento propuesto aparecen resumidas en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14: Características del procedimiento propuesto para la determinación de MA y DMA utilizando la DLLME con ETAAS

Parámetro	*Expresado como As*
Intervalo de trabajo, µg L^{-1}	0.1-2
Frecuencia de muestreo[a] (Número de muestras por hora)	24
Factor de enriquecimiento[b]	110
Consumo de muestra, mL	5
Consumo de reactivos, mL	
Disolución de BAL 10 % v/v en metanol	0.1
Tetracloruro de carbono	0.05
Eficiencia de extracción[c], %	100
Límite de detección (3s), µg L^{-1}	0.03
Precisión (RSD, n=5), %	3.5
Curva de calibrado (5 estándares, n=3, µg L^{-1})	
Con tubo recubierto de volframio	$A_{int}=0.006 + 0.213C_{As}$
Con nitrato de paladio como modificador	$A_{int}=0.005 + 0.307C_{As}$

[a] Calculada centrifugando seis muestras al mismo tiempo; [b] Comparada con la determinación directa de estándares acuosos; [c] Comparada con la masa total de analito introducida en la fase acuosa;

El factor de enriquecimiento se ha calculado como la relación entre la pendiente de la curva de calibración resultante de patrones acuosos no sujetos al proceso de preconcentración, y la pendiente de la curva de calibrado de patrones sometidos al procedimientos de extracción propuesto.

El límite de detección (LOD) se ha calculado en base al criterio de tres veces el error estándar de la estimación ($s_{y/x}$) para un ajuste lineal de los datos de la recta de calibrado. Como puede observarse el valor es bastante bajo, lo cual es un factor decisivo para la determinación de concentraciones muy bajas de arsénico.

4.3.4. APLICACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS PROPUESTOS

Se ha determinado el contenido de As(III), As(V), MA, DMA y AB en las seis muestras de harina de arroz y los materiales de referencia comentados en 4.2.4. Se ha trabajado mayoritariamente con extractos en medio alcalino (4.2.8) excepto para la determinación de As(III) que se ha utilizado el extracto en medio ácido (4.2.9).

Aplicando el procedimiento detallado en 4.2.12 se ha determinado todo el arsénico inorgánico. El contenido en As(III), y por diferencia el de As(VI), se ha obtenido aplicando el procedimiento 4.2.12 a los eluidos del proceso de separación 4.2.11.

El contenido en MA se ha obtenido aplicando el procedimiento detallado en 4.2.13 sobre el eluido de la separación en el cartucho intercambiador aniónico del extracto alcalino (4.2.10). El contenido en DMA se ha determinado aplicando el procedimiento detallado en 4.2.13 sobre el eluido de la separación en el cartucho intercambiador catiónico del extracto alcalino (4.2.10). Del sobrenadante de este tratamiento se ha determinado el contenido en AB.

Teniendo en cuenta que la extracción de las formas de arsénico se realiza a partir de suspensiones al 10 % m/v de las harinas de arroz y las condiciones experimentales que se detallan en la Parte Experimental, los límites de detección para el contenido de estas especies en la muestra original aparecen recogidos en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15. Límites de detección y valores de desviación estándar relativa obtenidos por aplicación del procedimiento propuesto para las distintas formas de arsénico.

Analito	LOD, µg de As L^{-1}	LOD, ng de As g^{-1}	RSD, %
As(III)	0.02	0.2	2.7
As(V)	0.02	0.2	3.5
MA	0.03	0.3	3.4
DMA	0.03	0.3	3.8
AB	3	30	4.2

La Tabla 4.16 muestra los resultados obtenidos para las distintas especies en las muestras de harina de arroz. Para comprobar la validez de los procedimientos utilizados se ha actuado de dos formas. Por una parte hemos añadido cantidades conocidas de As(III), As(V), MA, DMA y AB a una muestra de harina de arroz y hemos estudiado los valores de recuperación de estas cantidades. La Tabla 4.17 muestra los resultados obtenidos. Nótese que la recuperación no difiere significativamente del 100 % para todos los analitos.

Por otro lado se han aplicado los procedimientos propuestos a la determinación de estas especies en los materiales de referencia que se detallan en la Parte Experimental. Si bien estos materiales no tienen certificados los contenidos en las distintas formas, sino solamente el contenido total, hay una gran cantidad de publicaciones en donde se ha realizado la especiación y la validez de los resultados se puede contrastar por comparación entre los obtenidos por diversos autores con distintas técnicas. Los dos materiales más ampliamente utilizados son la harina de arroz (NIST 1568a) y el músculo de pez (NRC-CNRC DORM-2). Los resultados obtenidos junto con algunos de los ya publicados aparecen en la Tabla 4.18. Además de los valores recogidos en esta tabla el lector interesado podrá encontrar muchos más en algunas publicaciones que han recogido gran cantidad de los mismos para 1568a [71,151,152] y DORM-2[153,154]. Como puede apreciarse la concordancia es muy buena y, en algunos casos, debido a la excelente sensibilidad derivada de los procesos de preconcentración DLLME ha sido posible cuantificar contenidos de especies no detectadas por otras técnicas muy sensibles.

Tabla 4.17: Resultados obtenidos (n=3) en la determinación de los contenidos de las distintas formas de arsénico en las muestras de harina de arroz.

	Contenido en As, ng g^{-1}							
	As(III)+As(V)[a]	As(III)[b]	As(V)[c]	MA[d]	DMA[e]	AB[f]	ΣC_i [g]	C_{As} [h]
HA1	289 ± 5	224 ± 4	65 ± 5	6 ± 1	43 ± 2	<LOD	338 ± 5	335 ± 5
HA2	224 ± 6	177 ± 5	47 ± 6	4 ± 1	32 ± 2	<LOD	260 ± 6	256 ± 5
HA3	139 ± 4	87 ± 3	52 ± 5	8 ± 2	62 ± 3	<LOD	209 ± 6	215 ± 5
HA4	171 ± 3	134 ± 3	37 ± 4	3 ± 1	116 ± 3	<LOD	280 ± 5	284 ± 5
HA5	52 ± 5	27 ± 4	25 ± 6	2 ± 1	81 ± 2	<LOD	135 ± 5	130 ± 5
HA6	56 ± 4	30 ± 3	26 ± 5	5 ± 2	57 ± 2	<LOD	118 ± 5	112 ± 5

[a] Extracción en medio alcalino, retención en cartucho intercambiador aniónico y DLLME en Cl_4C con APDC previa reducción a As(III); [b] Extracción en medio ácido, retención en cartucho aniónico y DLLME en CL4C con APDC; [c] Calculado por diferencia; [d] Extracción en medio alcalino, retención en cartucho intercambiador aniónico y determinación en el sobrenadante de la determinación de iAS mediante DLLME con BAL en Cl_4C; [e] Extracción en medio alcalino, retención en cartucho intercambiador catiónico tras pasar por el aniónico, reacción con BAL y preconcentración mediante DLLME con Cl_4C; [f] Medido en el sobrenadante después del proceso DLLME para la determinación de DMA; [g] Suma aritmética de todas las formas; [h] Arsénico total obtenido por HG-AFS tras digestión en horno microondas.

Tabla 4.18: Resultados obtenidos (n=3) en la determinación de los contenidos de las distintas formas de arsénico en la muestra de harina de arroz HA3 adulterada.

	Contenido en As, ng g^{-1}							
	As(III)+As(V)[a]	As(III)[b]	As(V)[c]	MA[d]	DMA[e]	AB[f]	ΣC_i [g]	Recuperación, %
HA3 + As(III) [h]	190 ± 4	138 ± 4	52 ± 5	8 ± 2	62 ± 3	<LOD	260 ± 5	102 ± 4
HA3 + As(V) [i]	187 ± 5	86 ± 3	101± 6	8 ± 2	62 ± 2	<LOD	261 ± 6	98 ± 6
HA3 + MA [j]	139 ± 6	87 ± 4	52 ± 5	17± 3	62 ± 3	<LOD	219 ± 5	90 ± 6
HA3 + DMA [k]	139 ± 5	87 ± 3	52 ± 5	8 ± 2	63 ± 4	<LOD	220 ± 6	110 ± 6
HA3 + AB [l]	139 ± 5	87 ± 4	52 ± 5	8 ± 2	62 ± 3	96 ± 3	218 ± 6	96 ± 6

[a] Extracción en medio alcalino, retención en cartucho intercambiador aniónico y DLLME en Cl_4C con APDC previa reducción a As(III); [b] Extracción en medio ácido, retención en cartucho aniónico y DLLME en CL4C con APDC; [c] Calculado por diferencia; [d] Extracción en medio alcalino, retención en cartucho intercambiador aniónico y determinación en el sobrenadante de la determinación de iAS mediante DLLME con BAL en Cl_4C; [e] Extracción en medio alcalino, retención en cartucho intercambiador catiónico tras pasar por el aniónico, reacción con BAL y preconcentración mediante DLLME con Cl_4C; [f] Medido en el sobrenadante después del proceso DLLME para la determinación de DMA; [g] Suma aritmética de todas las formas; [h] muestras de harina adulteradas con 50 ng g^{-1} de As(III) antes de la extracción; [i] muestras de harina adulteradas con 50 ng g^{-1} de As(V) antes de la extracción; [j] muestras de harina adulteradas con 10 ng g^{-1} de As como MA antes de la extracción; [k] muestras de harina adulteradas con 10 ng g^{-1} de As como DMA antes de la extracción; [l] muestras de harina adulteradas con 100 ng g^{-1} de As como AB antes de la extracción

Tabla 4.19: Resultados obtenidos (n=3) en la determinación de los contenidos de las distintas formas de arsénico en los materiales de referencia.

	Contenido en As, µg g^{-1}								
	As(III)+As(V)	As(III)	As(V)	MA	DMA	AB	ΣC_i	C_{As} [b]	Ref.
Harina de arroz (SRM 1568a)[a]	92 ± 4	-	-	8 ± 2	174 ± 9	-	274	290 ± 30	[68]
	102 ± 1	69 ± 1	33 ± 1	9.2 ± 0.2	155 ± 2	-	267 ± 3		[71]
	101 ± 7	-	-	11 ± 0.5	148 ± 7	-	260 ± 10		[48]
	99 ± 8	-	-	15 ± 2	158 ± 9	-	272 ± 9		[52]
	96 ± 7	55 ± 6	41 ± 3	10 ± 2	166 ± 6	-	272 ± 4		[155]
	109 ± 4	55 ± 1	54 ± 3	14.8 ± 1.8	165 ± 8	-	288 ± 6		[84]
	104 ± 8	74 ± 7	30 ± 3	15 ± 0.7	165 ± 7	-	285 ± 10		[151]
	109.5 ± 1.0	74.4 ± 0.1	35.1 ± 0.9	10.5 ± 0.1	158 ± 2	-	278 ± 3		[156]
	96 ± 3	52 ± 1	44 ± 2	12 ± 0.8	173 ± 2	-	281 ± 2		[72]
	101 ± 4	47 ± 3	54 ± 3	14 ± 2	160 ± 8	<LOD	275 ± 9		Este trab.
Hojas de tomate (SRM 1573)	-	290 ± 4	-	-	-	-	290 ± 4	270 ± 2	[157]
	131.2 ± 2	85.7 ± 1.9	45.5 ± 1.3	6.2 ± 0.3	119.2 ± 2.3	-	256.7 ± 5.5		[158]
	134.6 ± 5	82.5 ± 4	52.1 ± 4	8.1 ± 2	125.6 ± 5	<LOD	268.3 ± 8		Este trab.
Hojas de tomate (SRM 1573a)[a]	-	62.6 ± 7	47.91 ± 6	-	-	-	110.5 ± 1	112 ± 4	[159]
	-	22.6 ± 0.3	87.9 ± 2.1	-	-	-	110.2 ± 1.7		[160]
	111 ± 4	25 ± 2	86 ± 3	<LOD	<LOD	<LOD	111 ± 4		Este trab.
Hojas de cítrico (SRM 1572)	-	2.9 ± 0.1	-	-	-	-	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.3	[157]
		2.75 ± 0.05	0.45 ± 0.05	<LOD	<LOD	<LOD	3.2 ± 0.1		Este trab.
Tejido de ostra (1566a)		<LOD	70[a]	40[a]	1.69	1.24	4.38	14.0 ± 1.2	[161]
		<LOD	<LOD	<LOD	0.86	1.24	4.56		[162]
		<30[a]	<40[a]	<30[a]	1.05 ± 0.04	1.26 ± 0.09	7.06 ± 0.4		[58]
		<LOD	<LOD	<LOD	0.6 ± 0.1	11.9 ± 0.4	13.7 ± 0.5		[163]
		<LOD	<LOD	<LOD	0.8 ± 0.1	13.3 ± 0.4	14.1 ± 0.5		[52]
		<LOD	80 ± 20[a]	<LOD	2.4 ± 0.1	8.9 ± 0.1	14.1 ± 0.4		[164]
		45[a]	72 ± 2[a]	55 ± 2[a]	2.2 ± 0.1	11.9 ± 0.1	14.1 ± 0.4		Este trab.

Músculo de pez (DORM-2)	77 ± 0.5[a]	<0.04	<0.03	0.35 ± 0.01	16.2 ±0.4	16.6 ± 0.1	18.0 ± 1.1	[153]
	81 ± 0.5[a]	<LOD	<LOD	0.31 ± 0.03	16.5 ±0.3	16.9 ± 0.3		[165]
	79 ± 8[a]	<LOD	<LOD	0.31 ± 0.03	16.2 ± 0.4	16.6 ± 0.4		[166]
	31[a]	29[a]	61[a]	0.36	16.7	17.9		[154]
	75[a]	24[a]	<LOD	0.28	18.3	18.8		[167]
	<LOD	0.33 ±0.01	0.12 ± 0.01	0.61 ± 0.04	16.7	17.8 ± 0.5		[51]
	<LOD	<LOD	<LOD	0.56 ± 0.2	16.3 ± 0.7	17.6 ± 0.5		[52]
	83 ± 2[a]	32 ± 2[a]	75 ± 2[a]	0.51 ± 0.2	16.8 ± 0.4	17.8 ± 0.4		Este trab.
Hígado de pez (DOLT-2)	<LOD	7 ± 1[a]	42 ± 7[a]	1.24 ± 0.26	6.09 ± 0.6	9.15 ± 0.6	16.6 ± 1.1	[62]
	<LOD	<LOD	<LOD	1.45 ± 0.08	6.47 ± 0.09			[168]
	<LOD	<LOD	<LOD	1.1 ± 0.1	15.1 ± 0.4	16.2 ± 0.5		
	21 ± 3	12 ± 2	53 ± 3	1.18 ± 0.23	14.8 ± 0.3	16.1 ± 0.4		Este trab.

[a] ng g^{-1} de As; [b] valor certificado.

4.4. CONCLUSIÓN

Se propone un procedimiento de extracción cuantitativa de As(III), As(V), MA, DMA y AB en harina de arroz mediante el empleo de un medio alcalino aportado por TMAH. La extracción de los analitos resultó completa con la colaboración de un medio hidroalcohólico, la temperatura y los ultrasonidos. Con este procedimiento se produce la oxidación de As(III) a As(V).

Los analitos en el sobrenadante se separan por intercambio aniónico primero y catiónico después. En el primer caso se retienen en el soporte As(V) y MA. En el segúndo proceso de intercambio se retienen DMA y AB. El resto de la matriz se desecha. La elución de los analitos retenidos permite la determinación de los mismos en un ambiente "limpio".

Para aumentar la sensibilidad de la determinación se recurre a un procedimiento de preconcentración por microextracción dispersiva líquido-líquido en Cl4C de la especies neutra formada por As(III) con APDC y MA y DMA con AB. El resultado de este proceso es un descenso del LOD hasta 0.3 ng As por gramo de harina de arroz.

Para cuando se desee conocer la concentración de As(III) se ha desarrollado un proceso de extracción y separación diferentes que evitan la oxidación de As(III).

Los procedimientos desarrollados se han validado con estudios de recuperación sobre muestras de harina de arroz y comparación con los valores obtenidos para estas especies por otros autores en diversos materiales de referencia.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

1 *Toxicological profile for arsenic, U.S. Department of health and human services*, (2007), http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp2.pdf, consultado 24 de Enero de 2012.

2 S. Lebow, R. S. Williams, P. Lebow , *Effect of simulated rainfall and weathering on release of preservative elements from CCA treated wood*, Environ Sci. Technol., 37 (2003) 4077-4082.

3 L. L. Arnold, M. Eldan, A. Nyska, M. van Gemert y S. M. Cohen, *Dimethylarsinic acid: Results of chronic toxicity/oncogenicity studies in F344 rats and B6C3F1 mice*, Toxicology, 223 (2006) 82-100.

4 S. J. S. Flora, S. N. Dube, R. Vijayaraghavan y S. C. Pant, *Changes in certain hemetological and physiological variables following single gallium arsenide exposure in rats*, Biol. Trace Elem. Res., 58 (1997) 197 - 208.

5 J. S. Tsuji, M. D. Van Kerkhove, R. S. Kaetzel, C. G. Scrafford, P. J. Mink, L. M. Barraj, E. A. Crecelius y M. Goodman, *Evaluation of exposure to arsenic in residential soil*, Environ. Health Perspect., 113 (2005) 1735-1740.

6 R. G. McLaren, R. Naidu , J. Smith y K. G. Tiller, *Fractionation and distribution of arsenic in soils contaminated by cattle dip*, J. Environ. Qual., 27(1998) 348–354.

7 E. Smit, J. Smith, y R. Naidu, *Distribution and nature of arsenic along former railway corridors of South Australia*, Sci. Total Environ., 363 (2006) 175–182.

8 L. Carrizales, I. Razo, J.I. Tellez-Hernandez, R. Torres-Nerio, A. Torres, L. E. Batres, A. C. Cubillas y F. D. Barrigas, *Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children*, Environ. Res., 101 (2006) 1–10.

9 S. H. Lamm, A. Engel, M. B. Kruse, M. Feinleib, D. M. Byrd, S. Lai y R. Wilson, *Arsenic in drinking water and bladder cancer mortality in the United States: An analysis based on 133 U.S. counties and 30 years of observation*, J. Occup. Environ. Med., 46 (2004)298-306.

10 E. Sanz, R. M. Olivas, y C. Cámara, *A rapid and novel alternative to conventional sample treatment for arsenic speciation in rice using enzymatic ultrasonic probe*, Anal. Chim. Acta, 535 (2005) 227–235.

11 EPA. 2003b. *Technical summary of information available on the bioaccumulation of arsenic in aquatic organisms*. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency. EPA822R03032. http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/aqlife/pollutants/arsenic/upload/2004_01_14_criteria_arsenic_tech-sum-bioacc.pdf, consultado el 24 Enero 2012.

12 R. A. Schoof, J. Eickhoff, L. J. Yost, E. A. Crecelius, D. W. Cragin, D. M. Meacher y D. B. Henzel, *Dietary exposure to inorganic arsenic. In: . Arsenic exposure and health effects*, W. R. Chappell, C. O. Abernathy, R. L. Calderon (eds) Elsevier Science, Amsterdam (1999) 81-88.

13 J. M. Laparra, D. Velez, R. Montoro, R. Barberá y R. Farré, *Estimation of arsenic bioaccessibility in edible seaweed by an in vitro digestion method*, J. Agric. Food Chem. 51(2003) 6080-6085.

14 R. L. Calderon, E. Hudgens, C. X. Le, R. Schreinemachers y D. J. Thomas, *Excretion of arsenic in urine as a function of exposure to arsenic in drinking water*, Environ Health Perspect., 107(1999) 663-667.

15 H. Ahsan, Y. Chen, F. Parvez, L. Zablotska, M. Argos, I. Hussain, H. Momotaj, D. Levy, Z. Cheng, V. Slavkovich, A van Geen, G. R. Howe y J. H. Graziano, *Arsenic exposure from drinking water and risk of premalignant skin lesions in Bangladesh: Baseline results from the health effects of arsenic longitudinal study*, Am. J. Epidemiol., 163 (2006) 1138-1148.

16 S. M. Cohen, L. L. Arnold, M. Eldan, A. S. Lewis y B. D. Beck, *Methylated arsenicals: The implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment*, Crit. Rev. Toxicol., 36 (2006) 99-133.

17 A. A. Meharg, *Arsenic in rice—understanding a new disaster for South-East Asia*, Trends Plant Sci., 9 (2004) 415–417.

18 A. H. Smith, E. O. Lingas y M. Rahman, *Contamination of drinking water of arsenic in Bangladesh, A public health emergency*, B. World Health Organ., 78 (2000)1093–1103.

19 D. Chakraborti, M. K. Sengupta, M. M. Rahman, S. Ahamed, U. K. Chowdhury, S. C. Mukherjee, S. Pati, K. C. Saha, R.N. Dutta y Q. Quamruzzaman, *Groundwater arsenic contamination and its health effects in the Ganga-Meghna-Brahmaputra plain*. J. Environ. Monitor., 6 (2004) 74–83.

20 R. A. Pyles, y E. A. Woolson, *Quantitation and characterization of arsenic compounds in vegetables grown in arsenic treated soil*, J. Agr. Food Chem., 30(1982) 866–870.

21 G. P. Cobb, K. Sands, M. Waters, B. G. Wixson y E. Dorward-King, *Accumulation of heavy metals by vegetables grown in mine wastes*, Environ. Toxicol. Chem., 19 (2000) 600–607.

22 F. Queirolo, S. Stegen, M. Restovic, M. Paz, P. Ostapczuk, M. J. Schwuger y L. Muñoz, *Total arsenic, lead, and cadmium levels in vegetables cultivated at the Andean villages of northern Chile*, Sci. Total Environ., 255 (2000) 75–84.

23 K. Bunzl, M. Trautmannsheimer, P. Schramel, y W. Reifenhauser, *Availability of arsenic, copper, lead, thallium and zinc to various vegetables grown in slagcontaminated soils*, J. Environ. Qual., 30 (2001) 934–939.

24 G. P. Warren, B. J. Alloway, N. W. Lepp, B. Singh,F. J. M. Bochereau y C. Penny, *Field trial to assess the uptake of arsenic by vegetables from contaminated soil and soil remediation with iron oxides*, Sci. Total Environ., 311 (2003) 19–33.

25 S. M. Ullah, *International Conference on arsenic Pollution of Ground Water in Bangladesh: Causes, Effects and Remedies Dhaka Community Hospital (1998) Dhaka*, Bangladesh, 133.

26 M. Fontcuberta, J. Calderon, J. R. Villalbí, F. Centrich, S. Portaña, A. Espelt, J. Duran y M. Nebot, *Total and Inorganic Arsenic in Marketed Food and Associated Health Risks for the Catalan (Spain) Population*, J. Agric. Food Chem., 59 (2011) 10013–10022.

27 A. A. Meharg, P. N. Williams, E. Adomako, Y. Y. Lawgali, C. Deacon, A. Villada, R. C. J. Campbell, G. Sun, Y.G. Zhu, J. Feldmann, A. Raab, F. J. Zhao, R. Islam, S. Hossain y J. Yanai, *Geographical Variation in Total and Inorganic Arsenic Content of Polished (White) Rice*, Environ. Sci. Technol., 43(2009) 1612-1617.

28 M. M. Rahman, G. Owens y R. Naidu, *Arsenic levels in rice grain and assessment of daily dietary intake of arsenic from rice in arsenic-contaminated regions of Bangladesh—implications to groundwater irrigation*, Environ. Geochem. Health, 31 (2009) 179–187.

29 S. W Al Rmalli, P. I. Haris, C. F. Harrington y M. Ayub, *A survey of arsenic in foodstuffs on sale in the United Kingdom and imported from Bangladesh*, Sci. Total Environ., 337 (2005) 23–30.

30 J. M. Duxbury, A. B. Mayer, J. G. Lauren y N. Hassan, *Food chain aspects of arsenic contamination in Bangladesh: Effects on quality and productivity of rice*, J. Environ. Sci. Health, 38 (2003) 61–69.

31 H. K. Das, A. K. Mitra, P. K. Sengupta, A. Hossain, F. Islam y G. H. Rabbani, *Arsenic concentrations in rice, vegetables, and fish in Bangladesh: A preliminary study*, Environ. International, 30 (2004) 383–387.

32 P. N. Williams, A. H. Price, A. Raab, S. A. Hossain, J. feldmann y A. A. Meharg, *Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure*, Environ. Sci. Technol., 39 (2005) 5531–5540.

33 A. A. Meharg y M. M. Rahman, *Arsenic contamination of Bangladesh paddy field soils: Implications for rice contribution to arsenic consumption*, Environ. Sci. Technol., 3 (2003) 229–234.

34 P. N. Williams, M. R. Islam, E. E. Adomako, A. Raab, S. A. Hossain, Y. G. Zhu, J. Feldmann y A. A. Meharg, *Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters*, Environ. Sci. Technol., 40 (2006) 4903–4908.

35 T. Roychowdhury, H. Tokunaga y M. Ando, *Survey of arsenic and other heavy metals in food composites and drinking water and estimation of dietary intake by the villagers from an arsenic affected area of West Bengal, India*, Sci. Total Environ., 308 (2003) 15–35.

36 U. K. Chowdhury, M. M. Rahman, B. K. Mondal, K. Paul, D. Lodh, b. K. Biswas, G. K. Basu, C. R. Chanda, k. C. saha, S. C. Mukherjee, S. Roy, R. Das, I. Kaies, A. K. Barua, S. K. Palit, Q. Quamruzzaman y D. Chakraborti *Groundwater arsenic contamination and human suffering in West Bengal, India and Bangladesh*, Environ. Sci., 8 (2001) 393–415

37 Z. M. Xie y C. Y. Huang, *Control of arsenic toxicity in rice plants grown on an arsenic-polluted paddy soil*, Commun. Soil Sci. Plan., 29 (1998) 2471–2477.

38 R. A. Schoof, L. J Yost, E. Crecelius, K. Irgolic, W. Goessler, H. R. Guo y H. Greene, *Dietary arsenic intake in Taiwanese districts with elevated arsenic in drinking water*, Hum. Ecol. Risk Assess., 4 (1998) 117–135.

39 T. D. Phuong, S. Kokot, P. V. Chuong y D. T. Khiem, *Elemental content of Vietnamese rice. Part 1. Sampling, analysis and comparison with previous studies*, Analyst, 124 (1999) 553–560.

40 Y. J. Zavala y J. M. Duxbury, *Arsenic in Rice: I. Estimating normal levels of total arsenic in rice grain*, Environ. Sci. Technol., 42 (2008) 3856–3860.

41 Y. J. Zavala, R. Gerads, H. Güleyük y J. M. Duxbury, *Arsenic in rice: II. Arsenic speciation in USA grain and implications for human health*, Environ. Sci. Technol., 42 (2008) 3861–3866.

42 A. A. Carbonell-Barrachina, M. A. Aarabi, R. D. DeLaune, R. P. Gambrell y W. H. Patrick, *The influence of arsenic chemical form and concentration on Spartens patens and Spartina alterinflora growth and tissue arsenic concentration*, Plant and Soil, 198 (1998) 33–43.

43 A. A. Carbonell-Barrachina, F. Burlo, D. Valero, E. López, D. Martínez-Romero y F. Martínez-Sánchez, *Arsenic toxicity and accumulation in turnip as affected by arsenic chemical speciation*, J. Agr. Food Chem., 47 (1999) 2288–2294.

44 M. Quaghebeur y Z. Rengal, *Arsenic uptake, translocation and speciation in pho1 and pho2 mutants of Arabidopsis thaliana*, Physiol. Plantarum, 120 (2004) 280–286.

45 K. Francesconi, P. Visoottiviseth, W. Sridokchan y W. Goessler, *Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, Pityrogramma calomelanos: A potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils*, Sci. Total Environ., 284 (2002) 27–35.

46 E. Smith, A. L. Juhasz y J. Weber, *Arsenic uptake and speciation in vegetables grown under greenhouse conditions*, Environ Geochem. Health, 31 (2009) 125–132.

47 F. Rahman, Z. L. Chen y R. Naidu, *A comparative study of the extractability of arsenic species from silverbeet and amaranth vegetables*, Environ Geochem. Health, 31 (2009) 103–113.

48 A. H. Ackerman, P. A. Creed, a. N. Parks, M. W. Fricke, C. A. Schwegel, J. T. Creed, D. T. Heitkemper y N. P. Vela, *Comparison of a chemical and enzymatic extraction of arsenic from rice and an assessment of the arsenic absorption from contaminated water by cooked rice*, Environ. Sci. Technol., 39 (2005) 5241–5246.

49 A. A. Meharg, E. Lombi, P. N. Williams, K. G. Scheckel, J. Feldmann, A. Raab, Y. Zhu y R. Islam, *Speciation and localization of arsenic in white and brown rice grains*, Environ. Sci. Technol., 42 (2008) 1051-1057.

50 A. L. Juhasz, E. Smith, J. Weber, M. Rees, A. Rofe, T. Kuchel, L. Sansom y R. Naidu, *In vivo assessment of arsenic bioavailability in rice and its significance for human health risk assessment*, Environ. Health Persp., 114 (2006) 1826-1831.

51 P. Cava-Montesinos, K. Nilles, M. L. Cervera y M. de la Guardia, *Non-Chromatographic speciation of toxic arsenic in fish*, Talanta, 66 (2005) 895-901.

52 I. López-García, M. Briceño y M. Hernández-Córdoba, *Non-chromatographic screening procedure for arsenic speciation analysis in fish-based baby foods by using electrothermal atomic absorption spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 699 (2011) 11-17.

53 M. Resano, E. García Ruiz, V. G. Mihucz, A. M. Móricz, G. Záray y F. Vanhaecke, *Rapid screening method for arsenic speciation by combining thin layer chromatography and laser ablation-inductively coupled plasma-dynamic reaction cell-mass spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 22 (2007) 1158-1162.

54 Z. L. Gong, X. F. Lu, M. S. Ma, C. Watt, y X. C. Le, *Arsenic speciation analysis*, Talanta, 58 (2002) 77–96.

55 J. A. Brisbin, C. B'Hymer y J. A. Caruso, *A gradient anion exchange chromatographic method for the speciation of arsenic in lobster tissue extracts*, Talanta, 58 (2002) 133–145.

56 J. E. Day, M. Montes-bayon, A. P. Vonderheide y J. A. Caruso, *A study of method robustness for arsenic speciation in drinking water samples by anion exchange HPLC-ICP-MS*, Anal. Bioanal. Chem., 373(2002) 664–668.

57 K. Akter, Z. Chen, L. Smith, D. Davey y R. Naidu, *Speciation of arsenic in ground water samples: A comparative study of CE-UV, HG-AAS and LC-ICP-MS*, Talanta, 68 (2005) 406–415.

58 Z. Slejkovec, J. T. van Elteren y A. R. Byrne, *Determination of arsenic compunds in reference materials by HPLC-UV-HG-AFS*, Talanta, 49 (1999) 619-627.

59 I. Koch, C. Hough, S. Mousseau, K. Mir, A. Rutter, C. Ollson, E. Lee, P. Andrewes, S. Granhchino, B. Cullen y K. Reimer, *Sample extraction for arsenic speciation*, Can. J. Anal. Sci. Spect., 47 (2002) 109–118.

60 B. He, Y. Fang, G. B. Jiang y Z. M. Ni, *Optimization of the extraction for the determination of arsenic species in plant materials by high-performance liquid chromatography coupled with hydride generation atomic fluorescence spectrometry*, Spectrochim. Acta Part B, 57(2002) 1705–1711.

61 T. M. Hsiung y C. W. Huang, *Quantitation of toxic arsenic species and arsenobetaine in pacific oysters using an off-line process with hydride generation-atomic absorption spectroscopy*, J. Agric. Food Chem., 54 (2006) 2470-2478.

62 R. Wahlen, S. McSheehy, C. Scriver y Z. Mester, *Arsenic speciation in marine certified materials. Part 2. The quantification of water-soluble arsenic species by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 19 (2004) 876-882.

63 S. Karthikeyan, S. Hirata y C. S. P. Iyer, *Determination of arsenic species by microwave-assited extraction followed by ion-pair chromatography-ICPMS: analysis of reference materials and fish tissues*, Intern. J. Environ. Anal. Chem., 84 (2004) 573-582.

64 M. Quaghebeur, Z. Rengel y M. Smirk, *Arsenic speciation in terrestrial plant material using microwaveassisted extraction, ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 18 (2003) 128–134.

65 U. Kohlmeyer, E. Jantzen, J. Kuballa, S. Jakubik, *Benefits of high resolution IC-ICP-MS for the routine analysis of inorganic arsenic species in food products of marine and terrestrial origin*, Anal. Bioanal. Chem. 377 (2003) 6–13.

66 I. Pizarro, M. Gomez, M.A. Palacios, C. Camara, *Evaluation of stability of arsenic species in rice*, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 102–109.

67 M. J. Abedin, M. S. Cresser, A. A. Meharg J. Feldmann y J. Cotter-Howells, *Arsenic accumulation and metabolism in rice (Oryza sativa L.)*, Environ. Sci. Technol., 36 (2002) 962–968.

68 D. T. Heitkemper, N. P. Vela, K. R. Stewart y C. S. Westphal, *Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 16 (2001) 299–306.

69 J. A. Caruso, D. T. Heitkemper y C. B. Hymer, *An evaluation of extraction techniques for arsenic species from freeze-dried apple samples*, Analyst, 126 (2001) 136–140.

70 N. P. Vela, D. T. Heitkemper y K. R. Stewart, *Arsenic extraction and speciation in carrots using accelerated solvent extraction, liquid chromatography and plasma mass spectrometry*, Analyst, 126 (2001) 1011–1017.

71 M. N. Matos Reyes, M. L. Cervera, R. C. Campos y M. de la Guardia, *Determination of arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid in cereals by hidride generation atomic fluorescence spectrometry*, Spectrochim. Acta, 62 (2007) 1078-1082.

72 T. Narukawa, K. Inagaki, T. Kuroiwa y K. Chiba, *The extraction and speciation of arsenic in rice flour by HPLC-ICP-MS*, Talanta, 77 (2008) 427-432.

73 C. G. Yuan, G. B. Jiang y B. He, *Evaluation of the extraction methods for arsenic speciation in rice straw, Oryza sativa L., and analysis by HPLC-HG-AFS*, J. Anal. Atom. Spectrom. , 20 (2005) 103–110.

74 N. W. Childs, *Production and utilization of rice. In Rice: Chemistry and Technology*, third edition; E. T. Champagne (ed) American Association of Cereal Chemists, Inc. Minnesota, (2004) USA, 1–24.

75 Avances: Superficies y producciones agrícolas; MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica (2007).

76 H. Fritzsche, W. Wegscheider, G. Knapp y H. M. Ortner, *A sensitive atomic-absorption spectrometric method for the determination of tin with atomization from impregnated graphite surfaces*, Talanta, 26 (1979) 219–226.

77 S. S. Chen, C. C. Chen y S. S. Chou, *Determination of arsenic in edible oils by direct graphite furnace atomic absorption spectrometry*, J. Food Drug Anal., 11 (2003) 214-219.

78 Method 3052. *Microwave assisted acid digestion of siliceous and Organically based matrices* http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3052.pdf (consultado enero 2012).

79 Y. G. Zhu, P. N. Williams y A. A. Meharg, *Exposure to inorganic arsenic from rice: A global health issue*, Environ. Pollut., 154 (2008) 169–171.

80 J. L. Guzmán Mar, L. Hinojosa Reyes, G. M. Mizanur Rahman y H. M. Skip Kingston, *Simultaneous Extraction of Arsenic and Selenium Species From Rice Products by Microwave-Assisted Enzymatic Extraction and Analysis by Ion Chromatography-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, J. Agric. Food Chem., 57 (2009) 3005–3013.

81 J. L. Gómez Ariza, E. Morales, D. Sánchez-Rodas e I. Giráldez, *Stability of chyemical species in environmental matrices*, Trends Anal. Chem., 19 (2000) 200-209.

82 P. Quevauviller, M. B. de la Calle-Guntiñas, E. A. Maier y C. Cámara, *A survey on stability of chemical species in solution during storage: the BCR experience*, Mikrochim. Acta, 118 (1995) 131-141.

83 K. Wrobel, K. Wrobel y J. A. Caruso, *Pretreatment procedures for characterization of arsenic and selenium species in complex samples utilizing coupled techniques with mass spectrometric detection*, Anal. Bioanal. Chem., 381(2005) 317–331.

84 M. D'Amato, G. Forte y S. Caroli, *Identification and quantification of major species of arsenic in rice*, J. AOAC Int., 87 (2004) 238-243.

85 I. B. Karadjova, P. K. Petrov, I. Serafimovski, T. Stafilov, D. L. Tsalev, *Arsenic in marine tissues. The challenging problems to electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta Part B, 62 (2007) 258–268.

86 B. M. Gamble, P. A. Gallagher, J. A. Shoemaker, A. N. Parks, D. M. Freeman, C. A. Schwegel y J.T. Creed, *An investigation of the chemical stability of arsenosugars in basic environments using IC-ICP-MS and IC-ESI-MS/MS*, Analyst, 128 (2003) 1458–1461.

87 I. Serafimovski, I. B. Karadjova, T. Stafilov, D. L. Tsalev, *Determination of total arsenic and toxicologically relevant arsenic species in fish by using electrothermal and hydride generation atomic absorption spectrometry*, Microchem. J., 83 (2006) 55–60.

88 Y. Tian, M. L. Chen, X. W. Chen, J. H. Wang, Y. Hirano, H. Sakamoto y T. Shirasaki, *Arsenic preconcentration via solid phase extraction and speciation by HPLC-gradient hydride generation atomic absorption spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 26 (2011) 133-140.

89 H. Matsumiya, T. Kikai y M. Hiraide, *Solid-phase extraction followed by HPLC for the determination of phosphorus (V) and arsenic (V)*, Anal. Sci., 25 (2009) 207-210.

90 S. K. V. Yathavakilla, M. Fricke, P. A. Creed, D. T. Heitkemper, N. V. Shockey, C. Schwegel, J. A. Caruso y J. T. Creed, *Arsenic speciation and identification of monomethylarsonous acid and monomethylthioarsonic acid in a complex matrix*, Anal. Chem., 80 (2008) 775-782.

91 E. H. Larsen, *Electrothermal atomic absorption spectrometry of inorganic and organic arsenic species using conventional and fast furnace programmes*, J. Anal. Atom. Spectrom., 6 (1991) 375-377.

92 V. I. Slaveykova, F. Rastegar y M. J. F. Leroy, *Behaviour of various arsenic species in electrothermal atomic absorption spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 11 (1996) 997-1002.

93 M. B. O. Giacomellia, M. C. Lima, V. Stuppa, R. M. de Carvalho Jr, J. B. B. da Silva y P. Bermejo Barrera, *Determination of As, Cd, Pb and Se in DORM-1 dogfish muscle reference material using alkaline solubilization and electrothermal atomic absorption spectrometry with Ir+Rh as permanent modifiers or Pd+Mg in solution*, Spectrochim. Acta Part B, 57 (2002) 2151–2157.

94 S. Foster, W. Mahera, F. Krikowa, S. Apte, *A microwave-assisted sequential extraction of water and dilute acid soluble arsenic species from marine plant and animal tissues*, Talanta, 71 (2007) 537–549.

95 B.L. Batista, L.R. Nacano, S.S. De Sousa y F. Barbosa Jr., *Rapid sample preparation procedure for As speciation in food samples by LC-ICP-MS*, Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, DOI:10.1080/19440049.2011.645218.

96 I. Komorowicz , D. Barałkiewicz, *Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry—Last decade review*, Talanta, 84 (2011) 247–261.

97 E. Terlecka, *Arsenic speciation analysis in water samples: a review of the hyphenated techniques*, Environ. Monit. Assess., 107 (2005) 259–284.

98 C. B'Hymer y J. A. Caruso, *Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 1045 (2004) 1–13.

99 Z. Mester y R. Sturgeon, *Trace element speciation using solid phase microextraction*, Spectrochim. Acta Part B, 60 (2005) 1243 – 1269.

100 N. E. Korte y Q. Fernando, *A review of arsenic (III) in groundwater*, Crit. Rev. Env. Contr., 21(1991) 1- 40.

101 X. C. Le, S. Yalcin, y M. Ma, *Speciation of submicrogram per liter levels of arsenic in water: on-site species separation integrated with sample collection*, Environ. Sci. Tec., 34 (2000) 2342-2347.

102 M. Rezaee, Y. Assadi, M. R. Millani, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction*, J.Chromatogr., A 1116 (2006) 1-9.

103 E. Z. Jahromi, A. Bidari, Y. Assadi, M. R. M. Hosseini, M. R. Jamali, *Dispersive liquid–liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry Ultra trace determination of cadmium in water samples*, Anal. Chim. Acta, 585 (2007) 305-311.

104 N. Shokoufi, F. Shemirani, Y. Assadi, *Fiber optic-linear array detection spectrophotometry in combination with dispersive liquid–liquid microextraction for simultaneous preconcentration and determination of palladium and cobalt*, Anal. Chim. Acta, 597 (2007) 349-356.

105 H. Xu, Z. Ding, L. Lv, D. Song, Y. Q. Feng, *A novel dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples*, Anal. Chim. Acta, 636 (2009) 28-33.

106 N. Fattahi, S. Samadi, Y. Assadi, M. R. M. Hosseini, *Solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction-ultra preconcentration of chlorophenols in aqueous samples*, J. Chromatogr., A 1169 (2007) 63-69.

107 A. Moghimi, *Preconcentration ultra trace of Cd(II) in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction with salen (N,N-bis(salicylidene)-ethylenediamine) and determination graphite furnace atomic absorption spectrometry*, J. Chin. Chem. Soc 55 (2008) 369-376.

108 M. Gharehbaghi, F. Shemirani, M. Baghdadi, *Dispersive liquid-liquid microextraction and spectrophotometric determination of cobalt in water samples*, Int. J. Environ. Anal. Chem. 88 (2008) 513–523.

109 M. A. Farajzadeh, M. Bahram, B. G. Mehr, J. A. Jönsson, *Optimization of dispersive liquid-liquid microextraction of copper (II) by atomic absortion spectrometry as its oxinate*

chelate: Application to determination of copper in different watersamples, Talanta, 75 (2008) 832-840.

110 M. Shamsipur, M. Ramezani, *Selective determination of ultra-trace amounts of gold by grafite furnace atomic absorption spectrometry after dispersive liquid-liquid microextraction*, Talanta, 75 (2008) 294-300.

111 M. H. Mallah, F. Shemirani, M. Ghannadi Maragheh, *Use of dispersive liquid-liquid microextraction for simultaneous preconcentration of samarium, europium, gadolinium and dysprosium*, J. Radioanal. Nucl. Chem. 278 (2008) 97-102.

112 P. Liang, E. Zhao, F. Li, *Dispersive liquid-liquid microextraction preconcentration of palladium in water samples and determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Talanta, 77 (2009) 1854-1857.

113 M.T. Naseri, P. Hemmatkhah, M. R. M. Hosseini, Y, Assadi, *Combination of dispersive liquid-liquid microextraction with flame atomic absorption spectrometry using microsample introduction for determination of lead in water samples*, Anal. Chim. Acta 610 (2008) 135-141.

114 M. T. Naseri, M. R .M. Hosseini, Y. Assadi, A. Kiani, *Rapid determination of lead in water sampler by dispersive liquid-liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry*,Talanta, 75 (2008) 56-62.

115 P. Liang, H. Sang, *Determination of trace lead in biological and water samples with dispersive liquid-liquid microextraction preconcentration*, Anal. Biochem., 380 (2008) 21-25.

116 A. Bidari, E.Z. Jahromi, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, *Monitoring of selenium in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by iridium-modified tube graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Microchem. J. 87 (2007) 6-12.

117 A. Bidari, P. Hemmatkhah, S. Jafarvand, M. R. M. Hosseini, Y. Assadi, *Selenium analysis in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction based on piazselenol formation and GC-ECD*, Mikrochim. Acta, 163 (2008) 243-249.

118 A.P. Birjandi, A. Bidari, F. Rezaei, M.R.M. Hosseini, Y. Assadi, *Speciation of butyl and phenyltin compounds using dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography-flame photometric detection*, J. Chromatogr. A 1193 (2008) 19-25

119 R. E. Rivas, I. López-García y M. Hernández-Córdoba, *Speciation of very low amounts of arsenic and antimony in waters using dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta B, 64 (2009) 329-333.

120 E. B. Sandell, *Colorimetric Determination of Traces of Metals*, Interscience Publishers, USA, 1959

121 I. Komjarova, R. Blust, *Comparison of liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and co-precipitation preconcentration methods for the determination of cadmium, copper, nickel, lead and zinc in seawater*, Anal. Chim. Acta 576 (2006) 221-228.

122 B. Welz, M. Sperling, "*Atomic Absorption Spectrometry*", (3ª ed) Wiley-VCH, (1999) 483-485.

123 H.M. Ortner, E. Bulska, U. Rohr, G. Schlemmer, S. Weinbruch, B. Welz, *Modifiers and coatings in graphite furnace atomic absorption spectrometry-machanisms of action (A tutorial review)*, Spectrochim. Acta B, 57(2002) 1835-1853.

124 Y. Xiu-Ping, M. Sperling, B. Welz, *On-Line coupling of flow injection microcolumn separation and preconcentration to electrothermal atomic absorption spectrometry for determination of (Ultra)trace selenite and selenate in water*, Anal. Chem., 71 (1999) 4353-4360.

125 K. Anezaki, L. Nukatsuka, K. Ohzeki, *Determination of arsenic (III) and total arsenic (III, V) in water samples by resin suspension graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Anal. Sci., 15 (1999) 829-834.

126 A. G. Howard y C. Salou, *Arsenic speciation by cryogenic trap hydride generation atomic absorption spectroscopy: performance enhancement by pre-derivatization*, J. Anal. Atom. Spectrom, 13 (1998) 683-686.

127 Z. Mester, G. Horváth, G. Vitányi, L. Lelik y P. Fodor, *Simultaneous determination of dimethylarsinic acid and monomethylarsonic acid after derivatization with thioglycol methylate by gas chromatography-mass Spectrometry*, Rapid Commun. Mass Spectrom., 13(1999) 350–353.

128 Z. Mester, G. Vitányi, R. Morabito y P. Fodor, *Speciation of dimethylarsinic acid and monomethylarsonic acid by gas chromatography–mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 832 (1999) 183–190.

129 Z. Mester y J. Pawliszyn, *Speciation of dimetylarsinic acid and momemethyl arsonic acid by solid-phase microextraction-gas chromatography-ion trap mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 873 (1999) 129–135.

130 D. R. Killelea y J. H. Aldstadt, *Solid-phase microextraction method for gas chromatography with mass spectrometric and pulsed flame photometric detection: studies of organoarsenical speciation*, J. Chromatogr. A, 918 (2001) 169–175.

131 N. Campillo, R. Peñalver, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *Speciation of arsenic using capillary gas chromatography with atomic emission detection*, Talanta ,77 (2008) 793–799.

132 K. Schoene, J. Steinhanses, H. J. Bruckert, A. König, *Speciation of arsenic-containing chemical warfare agents by gas chromatographic analysis after derivatization with thioglycolic acid methyl ester*, J. Chromatogr. A , 605 (1992) 257–262.

133 M. Huang, Y. Wang y P. C. Ho, *Quantification of arsenic compounds using derivatization, solvent extraction and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*, J.Pharmaceut. Biomed., 48 (2008) 1381–1391.

134 S. J. Cathum, C.E. Brown, A. Obenauf y M. Punt, *Speciation of arsenic using chelation solvent extraction and high performance liquid*, Chromatography, 35 (2007) 71 – 80.

135 S. Musil, T. Matoušek, *On-line pre-reduction of pentavalent arsenicals by thioglycolic acid for speciation analysis by selective hydride generation–cryotrapping–atomic absorption spectrometry*, Spectrochim. Acta Part B, 63 (2008) 685–691.

136 A. R. Badireddy, S. Chellam, *Bismuth dimercaptopropanol (BisBAL) inhibits formation of multispecies wastewater flocs*, J. Appl. Microbiol., 110 (2011) 1426–1437.

137 S. R. Gooneratne, D. A. Christensen, *Effect of chelating agents on the excretion of copper, zinc and iron in the bile and urine of sheep*, The Vet. J., 153 (1997) 171–178.

138 D. L. Leussing, T. N. Tischer, *Mononuclear and polynuclear complex formation by Manganese(II) and Zinc(II) Ions with 2,3-dimercapto-1-propanol: The Behavior of the Er Function with Mercaptide*, J. Am. Chem. Soc., 83 (1961) 65–70.

139 T. Endo y M. Sakata, *Effects of sulfhydryl compounds on the accumulation, removal and cytotoxicity of inorganic mercury by primary cultures of rat renal cortical epithelial-cells*, Pharmacol. toxicol., 76 (1995) 190-195.

140 D. L. Leussing y J. Jayne, *Mononuclear and polynuclear complex formation between iron (II) and 2,3-dimercapto-1-propanol*, J. Phys. Chem., 66 (1962) 426–429.

141 D. L. Leussing y J. P. Mislan, *A spectrophotometric study of complex formation by iron (III) and 2,3-dimercapto-1-propanol in alkaline solutions*, J. Phys. Chem., 64 (1960) 1908–1910.

142 H. Eagle, H. J. Magnuson y R. Fleischman, *Clinical uses of 2,3—dimercaptopropanol (BAL), I: The systemic treatment of experimental arsenic poisoning (mapharsen, lewisite, phenyl arsenoxide) with BAL*, J. Clin. Invest. 25 (1946) 451–466.

143 A. Cohen, J. Goldman, A. W. Dubbs, *The treatment of acute gold and arsenic poisoning - use of BAL (2,3-dimercaptopropanol, british anti-lewisite)*, Jama-J. Am. Med. Assoc., 133 (1947) 749-752.

144 W. Li, P.K. Chien y A. Furst, *Evaluation of three antidotes on arsenic toxicity in the common earthworm (Lumbricus terrestris)*, J. Appl. Toxicol., 14 (1994) 181–183

145 A. M. Hilmy, N. A. El-Domiaty, M. A. Kamal, M. A. Mohamed, W. E. Abou Samra, *Effect of some arsenic antagonists on the toxicity, distribution and excretion of arsenite and arsenate in rats*, Comp. Biochem. Phys. C., 99 (1991) 357–362.

146 H. Mückter, B. Liebl, F. X. Reichl, G. Hunder, U. Walther y B. Fichtl, *Are we ready to replace dimercaprol (BAL) as an arsenic antidote?*, Hum. Exp. Toxicol., 16 (1997) 460-465.

147 L. F. Braña, F. Sánchez. M. A. Palacios, M. M. Bonilla y R. Torralba, *Inorganic arsenic speciation using BAL in natural waters*, Quim. Anal., 20 (2002) 181-186.

148 S. Fukui, T. Hirayama, M. Nohara, Y. Sakagami, *Determination of arsenite, arsenate and monomethylarsonic acid in aqueous samples by gas chromatography of their 2,3-dimercaptopropanol (BAL) complexes*, Talanta, 30 (1983) 89-93.

149 K. Siu, S. Roberts y S. Berman, *Derivatization and determination of arsenic in marine samples by gas chromatography with electron capture detection*, Chromatographia, 19 (1984) 398-400.

150 S. S. Chen, C. C. Chen y S. S. Chou, *Determination of arsenic in edible oils by direct graphite furnace atomic absorption spectrometry*, J. Food Drug Anal., 11 (2003) 214-219.

151 J. H. Huang, P. Fecher, G. Ilgen, K. N. Hud y J. Yang, *Speciation of arsenite and arsenate in rice grain – Verification of nitric acid based extraction method and mass sample survey*, Food Chem., 130 (2012) 453–459.

152 G. X Sun, P.N. Williams, A. M. Carey, Y. G. Zhu, C. Deacon, A. Raab, J. Feldmann, R. M. Islam y A. A. Meharg, *Inorganic Arsenic in Rice Bran and Its Products Are an Order of Magnitude Higher than in Bulk Grain*, Environ. Sci. Technol., 42(2008) 7542–7546.

153 A. M. Piñeiro, J. M. Piñeiro, P. H. Hermelo, P. B. Barrera, S. M. Lorenzo, P. L. Mahía, D. P. Rodríguez, *Application of fast ultrasound water-bath assisted enzymatic hydrolysis – High performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry procedures for arsenic speciation in seafood materials*, J. Chromatogr. A, 1218 (2011) 6970–6980.

154 A. Leufroy, L. Noël, V. Dufailly, D. Beauchemin, T. Guérin, *Determination of even arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry following microwave assisted extraction: Method validation and occurrence data*, Talanta, 83 (2011) 770–779.

155 J.L. G. Mar, L. H. Reyes, G. M. M. Rahman y H. M. S. Kingston, *Simultaneous extraction of arsenic and selenium species from rice products by microwave-assisted enzymatic extraction and analysis by ion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry*, J. Agric. Food Chem., 57 (2009) 3005-3013.

156 C. Y. Tsai y S. J. Jiang, *Microwave-assisted extraction and ion chromatography dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation analysis of arsenic and selenium in cereals*, Anal. Sci., 27 (2011) 271-276.

157 J. A. G. Neto, R. Montes, A. A. Cardoso, *Spectrophotometric detection of arsenic using flow-injection hydride generation following sorbent extraction preconcentration*, Talanta, 50 (1999) 959–966.

158 M. N. M. Reyes, M. L. Cervera, R. C. Campos y M. de la Guardia, *Non-chromatographic speciation of toxic arsenic in vegetables by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry after ultrasound-assisted extraction*, Talanta, 75 (2008) 811-816.

159 A. Gonzálvez, A. Llorens, M. L. Cervera, S. Armenta, M. de la Guardia, *Non-chromatographic speciation of inorganic arsenic in mushrooms by hydride generation atomic fluorescence spectrometry*, Food Chem., 115 (2009) 360–364.

160 H. S. Ferreira, M. N. M. Reyes, M. L. Cervera, S. L. C. Ferreira y M. de la Guardia, *Screening of Toxic Inorganic Arsenic Species in Garlic (Allium sativum L.)*, Food Anal. Methods, 4(2011) 447–452.

161 E. H. Larsen , G. Pritzl y S. H. Hansen, *Arsenic speciation in seafood samples with emphasis on minor constituents: an investigation using high-performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry*, J. Anal. Atom. Spectrom., 8 (1993) 1075-1084.

162 E. H. Larsen, *Speciation of dimethylarsinyl-riboside derivatives (arsenosugars) in marine reference materials by HPLC-ICP-MS*, Fresen. J Anal. Chem, 352 (1995) 582-588.

163 M. Vilanó, R. Rubio, *Determination of arsenic species in oyster tissue by microwave-assisted extraction and liquid chromatography–atomic fluorescence detection*, Appl. Organomet. Chem., 15 (2001) 658–666.

164 C. F. Yeh y S. J. Jiang, *Speciation of arsenic compounds in fish and oyster tissues by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry*, Electrophoresis, 26(2005) 1615–1621.

165 J. M. Piñeiro, E. A. Rodríguez, A. Piñeiro, C. M. Pérez, S. M. Lorenzo, P. L. Mahía, D. P. Rodríguez, P. B. Barrera, *Simultaneous pressurized enzymatic hydrolysis extraction and clean-up for arsenic speciation in seafood samples before high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry determination*, Anal. Chim. Acta, 679 (2010) 63–73.

166 A. M. Piñeiro, E. P. Vázquez, P. H. Herbello, P. B. Barrera, J. M. Piñeiro, E. A. Rodríguez, S. M. Lorenzo, P. L. Mahía, y D. P. Rodríguez, *Matrix Solid-Phase Dispersion as a Sample Pretreatment for the Speciation of Arsenic in Seafood Products*, Anal. Chem., 80(2008) 9272–9278.

167 V. Dufailly, L. Noél, J. M. Frémy, D. Beauchemin y T. Guérrin, *Optimisation by experimental design of an IEC/ICP-MS speciation method for arsenic in seafood following microwave assisted extraction*, J. Anal. Atom. Spectrom., 22 (2007) 1168–1173.

168 W. Geng, R. Komine, T. Ohta, T. Nakajima, H. Tahanashi y A. Ohki, *Arsenic speciation in marine product samples: comparison of extraction-HPLC method and digestión-cryogenic trap method*, Talanta, 79 (2009) 369-375.

Capítulo V

Determinación de Co(II) y Ni(II) por extracción mediante DLLME en un líquido iónico formado in situ y detección con ETAAS.

CONTENIDO

5.1. Introducción 307
5.1.1. Composición de los líquidos iónicos 316
5.1.2. Nomenclatura de los líquidos iónicos 319
5.1.3. Propiedades de los líquidos iónicos 323
5.1.3.1. Efecto de la estructura en las propiedades físico-químicas 323
5.1.3.2. Densidad, viscosidad y propiedades de transporte 325
5.1.3.3. Tensión superficial y formación de micelas 327
5.1.3.4. Punto de fusión y estabilidad térmica 328
5.1.3.5. Miscibilidad con agua 329
5.1.4. Los líquidos iónicos en procesos de separación "verdes" 332
5.1.5. Los líquidos iónicos en el tratamiento de la muestra 334
5.1.5.1. Extracción 334
5.1.5.2. Cromatografía 335
5.1.5.3. Electroforesis 335
5.1.5.4. Sensores 336
5.1.6. Los líquidos iónicos como disolventes extractantes 336
5.1.6.1. Aplicación de los líquidos iónicos como medios de extracción clásicos 338
5.1.6.2. Los líquidos iónicos en técnicas de microextracción 343
5.1.7. Observaciones finales 351
5.2. Importancia de los elementos traza en los alimentos 352
5.3. Métodos de preconcentración para la determinación de cobalto y níquel 359
5.4. Microextracción de Co(II) y Ni(II) por formación de complejos neutros con PAN en un líquido iónico formado in situ 363
5.4.1. Introducción 363
5.4.2. Parte experimental 366
5.4.2.1. Instrumentación 366
5.4.2.2. Reactivos 367
5.4.2.3. Procedimiento para la determinación de Co y Ni 368
5.4.2.4. Determinación de Co y Ni en muestras de agua 369
5.4.2.5. Determinación de Co y Ni en cerveza 369

5.4.3 Resultados y discusión 370
5.4.3.1. Selección del líquido iónico 370
5.4.3.2. Selección de un agente antiadherente 371
5.4.3.3. Efecto del pH y la concentración de PAN 372
5.4.3.4 Efecto de los volúmenes de fase dadora y aceptora 374
5.4.3.5 Efecto del tiempo de extracción 375
5.4.3.6 Efecto salino 375
5.4.3.7 Estudios de interferencia 376
5.4.3.8 Optimización de las condiciones de atomización 376
5.4.3.9 Calibración 379
5.4.3.10 Determinación de cobalto y níquel en muestras de agua y cerveza 381
5.5 CONCLUSIÓN 382
5.6. BIBLIOGRAFÍA 383

5.1. INTRODUCCIÓN

La industria química responde a la demanda de soluciones para satisfacer las crecientes necesidades materiales de nuestras sociedades aportando nuevos productos y desarrollando nuevos procedimientos de fabricación. Para que sus respuestas sean válidas es necesario que superen las restricciones que actualmente condicionan esta actividad industrial: aumento de la competencia empresarial, crecimiento del riesgo con que la percibe la sociedad y reconocimiento de la limitada capacidad del planeta para actuar como fuente de materias primas y sumidero de residuos.

Encontrar soluciones en el marco del desarrollo sostenible obliga a trabajar simultáneamente con variables económicas, sociales y ambientales. La principal herramienta que tiene la industria química para seguir este camino es el estudio de los productos, de las reacciones químicas y de los procedimientos de fabricación para introducir novedades científicas y tecnológicas en el entorno comercial.

La química, como responsable de la mayor parte de los desechos peligrosos al medio ambiente, ha de ser también la responsable de su control. Todo esto comienza de mano de las personas responsables, los químicos que, entre otros deberes, han de rediseñar las rutas de obtención de productos y sustancias de modo que no se produzcan tantos residuos peligrosos, que muchas veces hacen que la sociedad vuelva sus ojos hacia la comunidad científica identificándola como culpable de tanta contaminación.

Cierto es que este proceso va a ser ralentizado por el verdadero motor de la economía: las ganancias económicas, pero ahora se puede decir abiertamente que, de seguir en este camino, llegará un momento en el que la seguridad del planeta será el factor decisivo para tomar decisiones en cuanto a las rutas sintéticas utilizadas en la química moderna.

A pesar de los enormes beneficios que la química ha proporcionado y proporciona a las sociedades modernas, la percepción social de la misma es cada vez más negativa. En la actualidad existe una opinión bastante generalizada de que la producción y el uso de sustancias químicas no pueden mantenerse dentro de los parámetros actuales.

Son muchos los estamentos de la comunidad global que han realizado grandes esfuerzos en pro de una mejora en la calidad de vida. Uno de los primeros textos, en el que apareció la expresión crecimiento sostenible es "Our common future" en 1987, pero existen más; en 1988 las Naciones Unidas impulsaron la "Declaración Internacional sobre una producción más limpia", en la que aparecieron por primera vez términos como ecoeficiencia, productividad ecológica o prevención de la contaminación; la Agencia de Protección Ambiental, EPA, publicó en 1990 el "Acta de la Prevención de la Contaminación" para prevenir o reducir la contaminación, lo que condujo a la apertura de la oficina para la Prevención de la Contaminación y Sustancias Tóxicas.

Estas son las bases para la aparición de numerosos proyectos, como el "Diseño de Medio Ambiente" e incentivos en forma de premios en certámenes como el "Certamen Presidencial sobre Química Verde" impulsado por la administración Clinton. La cumbre celebrada en Copenhague (2009) ha sido la última gran reunión a nivel global para tratar de cerrar acuerdos conjuntos con el objetivo de evitar el cambio climático en ciernes tras los fracasos de cumbres anteriores como la de Kioto.

La Química Verde pretende dar respuesta a esta necesidad de cambio mediante un uso más racional de nuestros recursos y conocimientos, enmarcando esta nueva filosofía en sus conocidos doce principios [1]:

1. *Prevención*: es preferible evitar la producción de un residuo que tratar de limpiarlo una vez que se haya formado.
2. *Economía atómica*: los métodos de síntesis deben diseñarse de manera que incorporen al máximo, en el producto final, todos los materiales usados durante el proceso, minimizando la formación de subproductos.

3. *Usar metodologías que generen productos con toxicidad reducida*: siempre que sea posible, los métodos de síntesis deben utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad, tanto para el hombre como para el medio ambiente.
4. *Generar productos eficaces pero no tóxicos*: los productos químicos deberán de mantener la eficacia, a la vez que reducir su toxicidad.
5. *Emplear disolventes y materiales auxiliares más seguros*: se evitará, en lo posible, el uso de sustancias que no sean imprescindibles (disolventes, reactivos para llevar a cabo separaciones, etc.) y en el caso de que se utilicen, que sean lo más inocuos posible.
6. *Disminuir el consumo energético*: los requerimientos energéticos serán catalogados por su impacto medioambiental y económico, reduciéndose todo lo posible. Se intentarán llevar a cabo los métodos de síntesis a temperatura y presión ambiente.
7. *Utilizar materias primas renovables*: la materia prima ha de ser preferiblemente renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente viable.
8. *Evitar derivados innecesarios*: se evitará en lo posible la formación de derivados (grupos de bloqueo, de protección/desprotección, modificación temporal de procesos físicos/químicos).
9. *Potenciar la catálisis*: se emplearán catalizadores (lo más selectivos posible), preferentemente reutilizables, en lugar de reactivos estequiométricos.
10. *Generar productos biodegradables*: los productos químicos se diseñarán de tal manera que al finalizar su función no persistan en el medio ambiente sino que se transformen en productos de degradación inocuos.
11. *Desarrollar metodologías analíticas para la monitorización en tiempo real de los procesos*: las metodologías analíticas serán desarrolladas posteriormente para permitir una monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas.
12. *Minimizar el riesgo potencial de accidentes químicos*: se elegirán las sustancias empleadas en los procesos químicos de forma que se minimice el riesgo de accidentes químicos, incluidas las emanaciones, explosiones e incendios.

Un análisis cuidadoso de los principios anteriores muestra que el disolvente está presente, de un modo más o menos directo, en la mayoría de dichos principios. Su pre-

sencia en el quinto principio “Emplear disolventes y auxiliares más seguros” es evidente; sin embargo, también aparece en principios tales como el de la prevención de vertidos, síntesis menos peligrosas y con un menor coste energético, uso de fuentes renovables de materias primas y procesos químicos más seguros.

Hoy en día existe una conciencia generalizada de que el uso de disolventes conlleva graves afecciones medioambientales y para la salud. De hecho, los disolventes constituyen la mayor parte de los compuestos orgánicos volátiles (COVs) emitidos a la atmósfera (aproximadamente un 27% del total) los cuales llevan asociados numerosos riesgos para el medioambiente y la salud.

Hasta el siglo XIX el único medio líquido en el que se efectuaban las reacciones químicas era el agua. La solubilidad de los distintos productos en este medio establecía cuales eran las transformaciones que podían lograrse. Los conocimientos químicos procedían del estudio de las reacciones con sólidos y de las reacciones en fase gas o en fase acuosa. Los productos que aportaba la industria química se limitaban a los que procedían de materias primas sólidas o de reactivos solubles en agua.

Con la aparición de los disolventes orgánicos —hidrocarburos, nitrilos, hidrocarburos clorados, etc— se inicia el estudio y la utilización de reacciones que hasta este momento estaban vetadas por la insolubilidad de los reactivos en agua. La química orgánica y la industrialización de estos nuevos productos desarrollan sus posibilidades gracias a este nuevo medio de reacción. A los disolventes orgánicos se unen otros disolventes como amoniaco líquido, fluidos supercríticos o compuestos perfluorados que permiten avanzar en el conocimiento de las reacciones químicas, introducir nuevos procesos de fabricación o mejorar los existentes.

Todos estos medios líquidos de reacción, desde el agua hasta los compuestos perfluorados, tienen una característica común: son disolventes moleculares. Por ello, el conocimiento de la reactividad química en disolución procede únicamente de los estudios realizados en disolventes moleculares y lo mismo ocurre con los productos de estas reacciones destinados al mercado.

Hasta hace poco tiempo el empleo de una fase líquida constituida por iones se ha limitado a aquellos procesos a elevada temperatura que se basan en la fusión de óxidos o sales para conseguirlo. La obtención de aluminio por reducción electroquímica de alúmina es un ejemplo de una reacción que puede efectuarse en un medio de sales fundidas. Con el descubrimiento de compuestos iónicos cuya temperatura de fusión es inferior a 100°C se dispone de una nueva familia de disolventes cuyas propiedades ofrecen muchas ventajas potenciales, frente a los disolventes orgánicos convencionales, para la síntesis de compuestos orgánicos y para la extracción de determinados componentes de una mezcla. Los disolventes iónicos a temperatura ambiente aportan un nuevo medio líquido para estudiar las reacciones químicas y para la fabricación de productos en las instalaciones químicas.

El requisito que debe satisfacer el disolvente iónico es su adaptación a las condiciones en las que se realiza la transformación química. Esta adaptación implica que debe ser líquido a la temperatura de operación y no debe reaccionar, alterar o alterarse, en presencia de los reactivos, productos o catalizadores, necesarios para que tenga lugar la reacción.

Líquido iónico (IL) es un término no muy preciso. Como líquido iónico podría ser definido el cloruro sódico a más de 800 °C, ya que éste es su punto de fusión y por lo tanto, a partir de esa temperatura tendríamos esa masa fundida. Pero a este tipo de sistemas se les suele conocer más habitualmente como sales fundidas. Se ha dado en determinar cómo líquidos iónicos a aquellas sustancias formadas por iones cuyo punto de fusión es menor de 100 °C, aunque este es un valor arbitrario, pero evita el problema de la concreción del término temperatura ambiente, que, probablemente, es lo que se busca en la muchas de las aplicaciones de este tipo de compuestos; que sean líquidos a temperatura ambiente para facilitar el trabajo.

Por lo tanto, definiremos líquido iónico como aquella sustancia formada por iones (generalmente un catión orgánico y un anión inorgánico, aunque no tiene porqué ser así) y que está en fase líquida a menos de 100 °C.

La primera gran ventaja de los líquidos iónicos viene, por lo tanto, encerrada en su definición; su bajo punto de fusión y relativamente alto punto de ebullición (<400 °C). Con este amplio margen, en caso de que no descompongan antes de llegar a esa temperatura, se abren nuevas perspectivas, lo cual les dota de innumerables oportunidades. También bajo esta definición se encuentra un amplio abanico de combinaciones de iones, entre los que se encuentran asimismo cationes inorgánicos y aniones orgánicos, con grandes variaciones en sus propiedades físicas, lo que nos lleva a su segunda gran ventaja, la posibilidad de diseñar un líquido iónico para cada proceso, de modo que los resultados sean los óptimos.

Esta posibilidad ciertamente choca con el hecho de que no existen todavía datos suficientes del comportamiento de los iones que puedan ser relacionados con las propiedades supramoleculares, ni una base de datos completa de sus propiedades físicas, lo cual hace que el método de trabajo habitual sea, en muchas ocasiones, el de ensayo y error, probando varios líquidos iónicos, en general, los disponibles en el laboratorio o los más fáciles de obtener o los más baratos del mercado, que puedan ser adecuados, según las disponibilidades, en un proceso dado.

La última gran ventaja a resaltar viene dada por la baja volatilidad de estos compuestos. Las sales inorgánicas tienen la capacidad de formar pares de iones en fase gas, pero los líquidos iónicos, debido a las mismas débiles fuerzas que permiten que sean líquidos por debajo de 100 °C, no pueden componer esos pares iónicos, por lo que generalmente se descomponen antes de vaporizarse. Aun así, se han descrito algunos líquidos iónicos de muy baja presión de vapor destilables a elevada temperatura. De cualquier manera, esta baja presión de vapor tiene sus ventajas, ya que permite la separación de compuestos volátiles fácilmente, como los restos de disolventes que hayan sido usados para elaborar la formación del líquido iónico, reactivos que no hayan reaccionado o productos de reacción, facilitando muchas veces la elaboración del proceso químico llevado a cabo en el sistema iónico.

En principio, los líquidos iónicos encajan perfectamente en la Química Verde. La estructura atómica de estos compuestos les confiere unas propiedades particulares que les permiten ajustarse a algunos de los aspectos más destacados de la química verde.

Ciertamente, también cuentan con algunos aspectos negativos, pero la posibilidad de aprovechar sus ventajas en ciertos procesos no puede ser desechada de antemano sin haberlos estudiado previamente. Es por ello que la cantidad de trabajos que se publican cada año crece de forma exponencial (Figura 5.1).

Los 16321 artículos recogidos en la Figura 5.1 cubren distintos campos dentro de la Ciencia entre los que cabe destacar la Química en varias de sus manifestaciones, como se puede apreciar en la Figura 5.2. En esta misma figura se puede ver la evolución en los últimos años de los artículos publicados sobre esta materia dentro del campo de la Química Analítica y que hacen un total de 856 hasta mediados de 2011.

Atendiendo a las nacionalidades, la Figura 5.3 muestra el porcentaje de artículos publicados a lo largo de los últimos años por los distintos países en todas las disciplinas y en la de Química Analítica en particular. Nótese que España figura dentro de los 8 primeros países en ambos casos.

En definitiva, son dos los grandes puntos de unión de los líquidos iónicos con la filosofía de la química verde: su baja presión de vapor y la posibilidad de emplearlos como medios de reacción. Los líquidos iónicos ya han demostrado ampliamente en la bibliografía que pueden ser sustitutos de los medios de reacción habituales.

Sin embargo, debemos decir que los ILs no son totalmente inocuos, ya que siguen siendo tóxicos, la ventaja es que no lo son por vía aérea. Hasta la fecha se han realizado algunos estudios sobre su toxicidad pero hacen falta muchos más para poder conocer el verdadero alcance de este posible aspecto negativo.

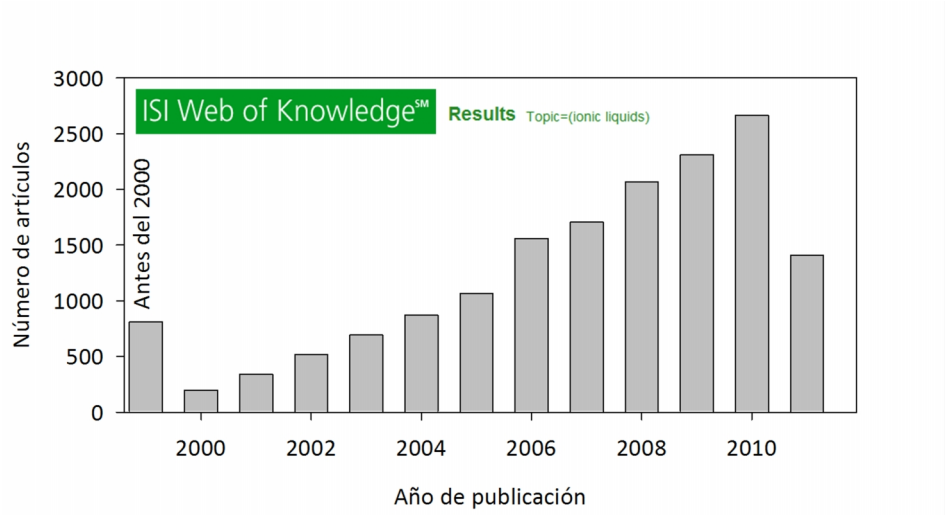


Figura 5.1: Evolución de las publicaciones durante los últimos años recogidas en la ISI Web of Knowledge.

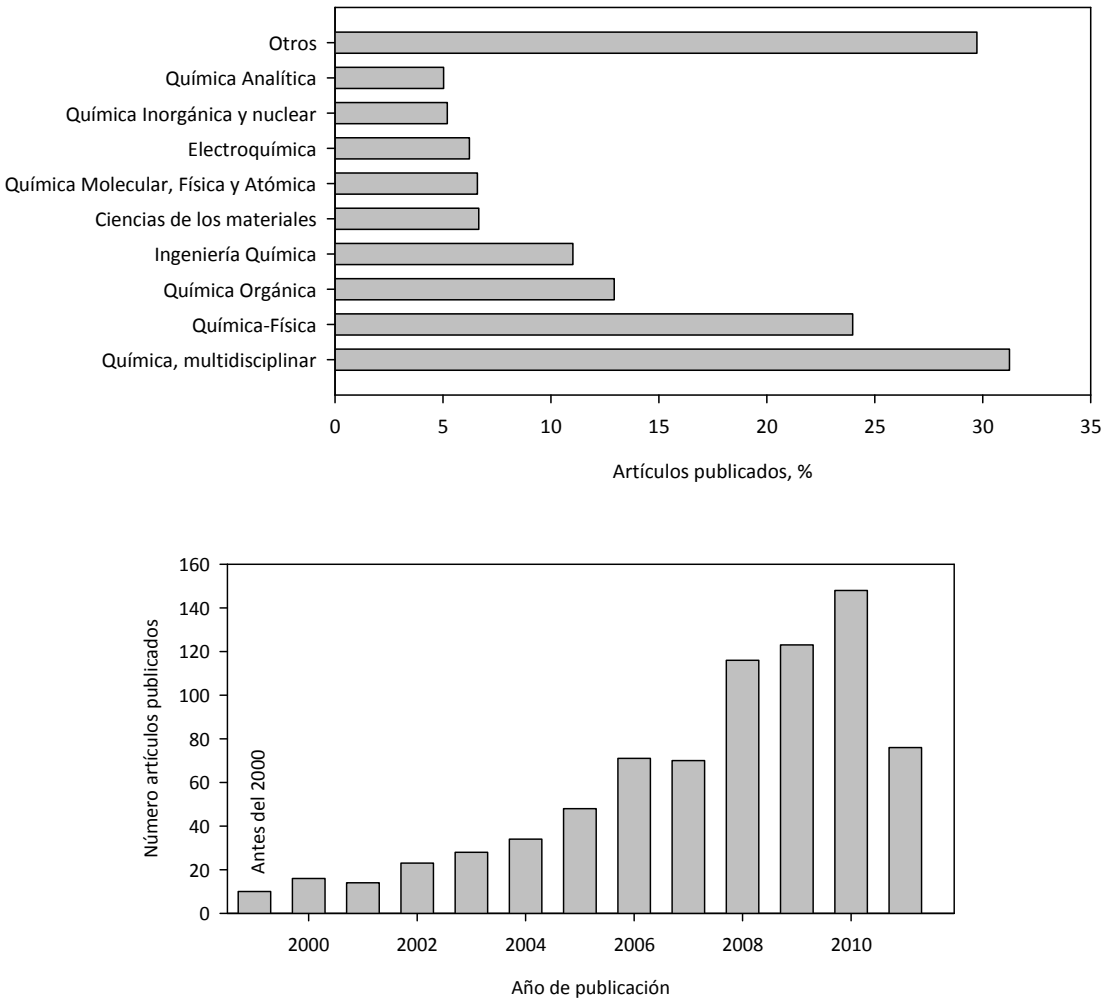


Figura 5.2: Distribución de los artículos publicados sobre líquidos iónicos según la materia y número de artículos publicados dentro de la disciplina de Química Analítica a lo largo de los últimos años.

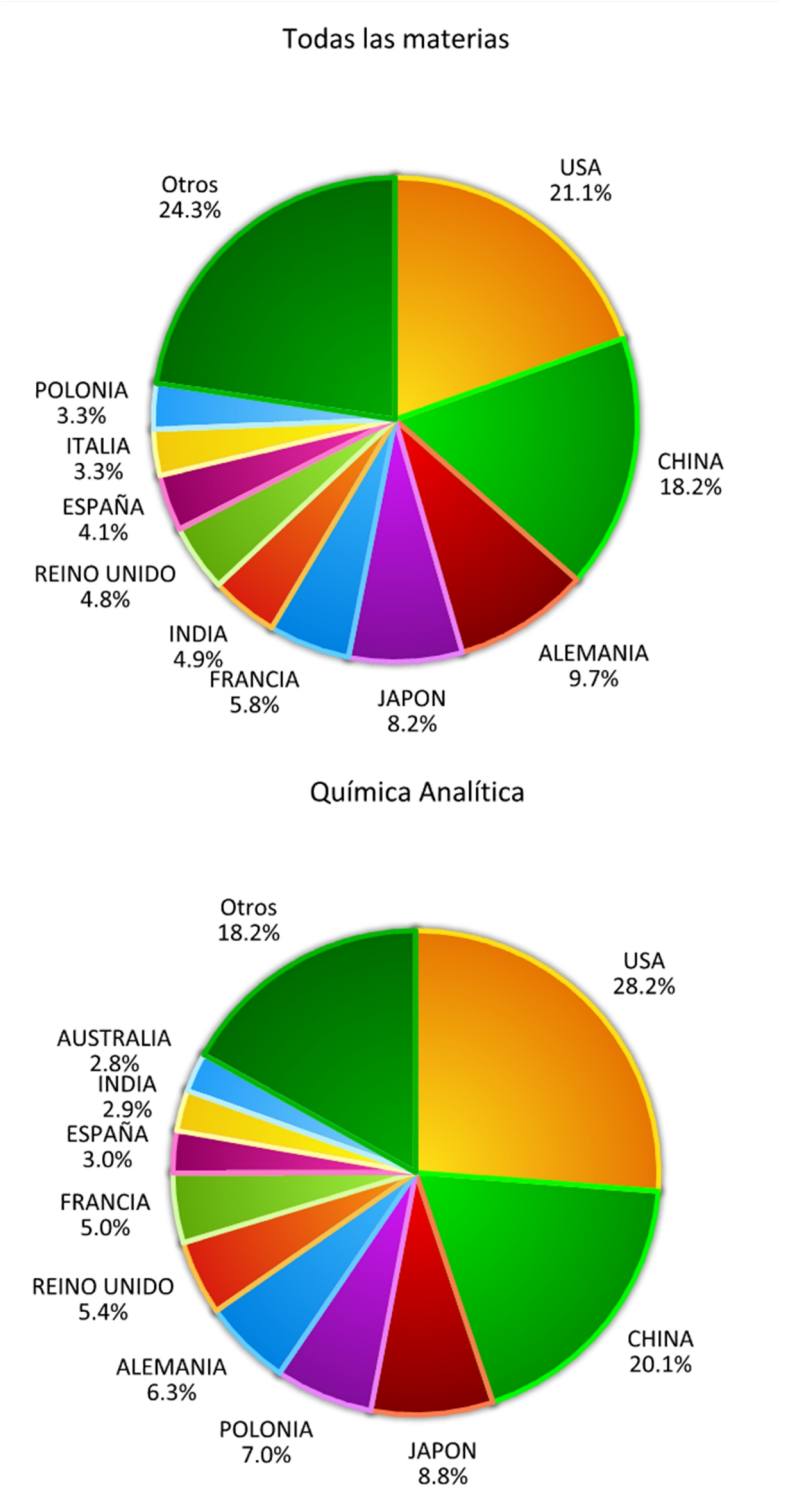


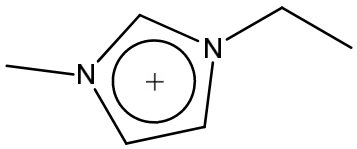
Figura 5.3: Porcentaje de artículos publicados a lo largo de esto últimos años para todas las ramas del conocimiento y en el campo concreto de la Química Analítica según el país de los autores.

5.1.1. COMPOSICIÓN DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS

Existen referencias a este tipo de compuestos desde 1914 pero es en la segunda mitad del siglo XX cuando se descubre que se pueden sintetizar sales que son líquidas a temperatura ambiente [2]. Mezclando cloruro de alquilpiridinio con cloruro de aluminio se produce una reacción cuyo resultado es un líquido iónico incoloro. Este descubrimiento permanece mucho tiempo como una curiosidad sin suficiente interés para los químicos hasta que se van conociendo sus propiedades singulares como líquidos y se inician los estudios electroquímicos. A medida que se van realizando estudios de diferentes reacciones químicas en líquidos iónicos se va poniendo de manifiesto que su comportamiento es diferente al observado en medios convencionales. La atención que despiertan los primeros resultados de las reacciones en líquidos iónicos impulsa la síntesis de este tipo de compuestos.

Utilizando diferentes precursores del catión y del anión se obtiene un gran número de compuestos cuya caracterización pone de manifiesto la gran variedad de propiedades que ofrecen los ILs. En estas pocas décadas en las que se ha trabajado en la síntesis de líquidos iónicos se ha logrado disminuir la temperatura necesaria para conseguir un líquido formado por iones desde los 800 °C, el procedente de la fusión de cloruro sódico, hasta temperaturas inferiores a los -90°C. Además, se ha sustituido el entorno corrosivo que caracteriza a las sales fundidas por otro que, al ser mucho más suave e inerte, es adecuado para efectuar reacciones químicas entre compuestos orgánicos.

Los diferentes líquidos iónicos están formados por un catión y un anión. La mayor parte de los cationes tienen naturaleza aromática con átomos de nitrógeno en el anillo, heterociclos nitrogenados, mientras que los aniones suelen estar constituidos por diferentes elementos químicos. En la Figura 5.4 se muestra el catión y el anión que forman uno de estos líquidos iónicos. Los líquidos iónicos más conocidos y utilizados corresponden a los sistemas formados a partir de cloruro de 1-etil 3-metilimidazolio/cloruro de aluminio (III).



$[AlCl_4]^-$

Figura 5.4: Catión y anión de un líquido iónico. Catión: 1-etil-3- metili-midazolio. Anión: tetracloroaluminato.

Para facilitar su identificación se utiliza la siguiente notación: $[C_2C_1Im][Cl]$-$AlCl_3$.

En la Figura 5.5 se muestran diferentes cationes y en la Figura 5.6 diferentes aniones con los que se pueden construir un gran número de líquidos iónicos al combinar cationes y aniones.

Al disponer de un gran número de aniones y de cationes para diseñar los líquidos iónicos se puede elegir la combinación más apropiada para que se adapte a las exigencias de una determinada aplicación. El diseñador del líquido iónico dispone de un componente, el catión, principal responsable del comportamiento químico y de otro, el anión, que aporta la mayor parte de las propiedades físicas.

Estos compuestos se presentan líquidos a temperatura ambiente porque son sales formadas por iones muy asimétricos y de gran tamaño, por eso las fuerzas atractivas catión-anión son más débiles que las fuerzas que intervienen en las sales iónicas convencionales (sales fundidas).

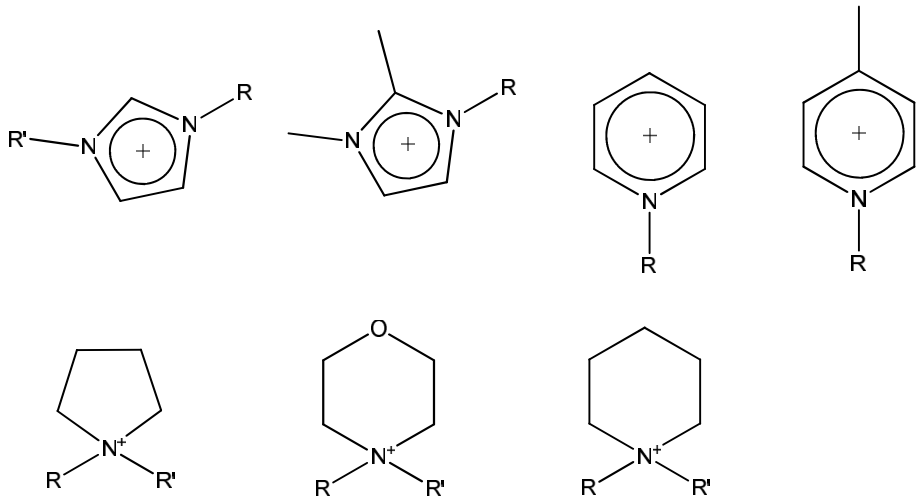


Figura 5.5: Diferentes cationes que configuran los líquidos iónicos. R y R´ son cadenas orgánicas lineales: Etil, Propil, Butil, Pentil, Hexil, etc

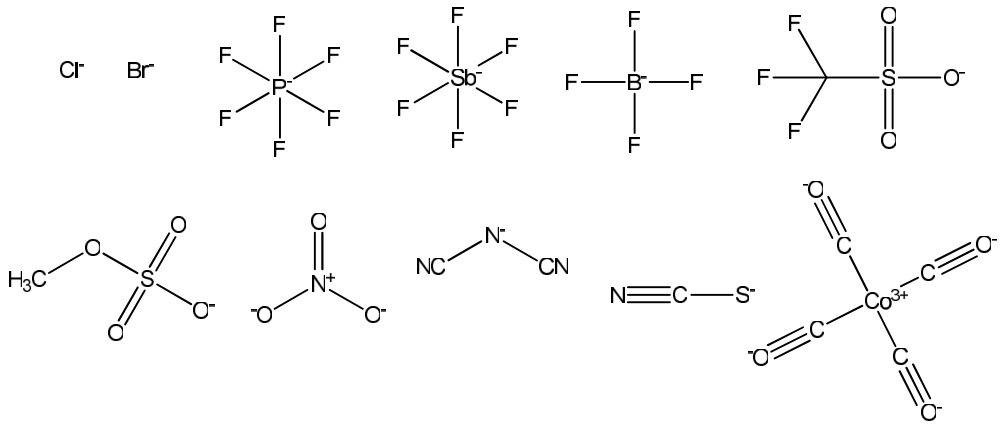


Figura 5.6: Diferentes aniones que configuran los líquidos iónicos.

Cuando se van uniendo los iones negativos de cloro con los iones positivos de sodio se produce un elevado empaquetamiento entre ellos para formar el cristal de cloruro sódico. Sin embargo, al partir de dos iones poco uniformes y uno de ellos, el catión orgánico, muy asimétrico no puede lograrse un empaquetamiento que evolucione a una estructura compacta. Basta un pequeño aporte de energía para separar los aniones y los cationes que configuran el sólido y transformarlo en un líquido. Este pequeño aporte se logra cuando se expone a temperaturas próximas a las del ambiente. Para fundir un cristal de cloruro sódico se necesita aportar una gran cantidad de energía, hay que calentarlo a temperaturas superiores a 800 °C, para lograr la separación de los iones que lo forman. En la Figura 5.7 se visualiza un líquido iónico, $[C_{14}C_1Im][PF_6]$, cuyo radical tiene una gran longitud [3].

De la posibilidad de combinar el catión (generalmente orgánico, voluminoso y asimétrico), con diversos aniones generalmente inorgánicos aunque también puedan ser orgánicos, ha surgido el término "disolventes de diseño", puesto que la elección de los iones determina las propiedades físico-químicas del líquido iónico (punto de fusión, viscosidad, solubilidad, etc.).

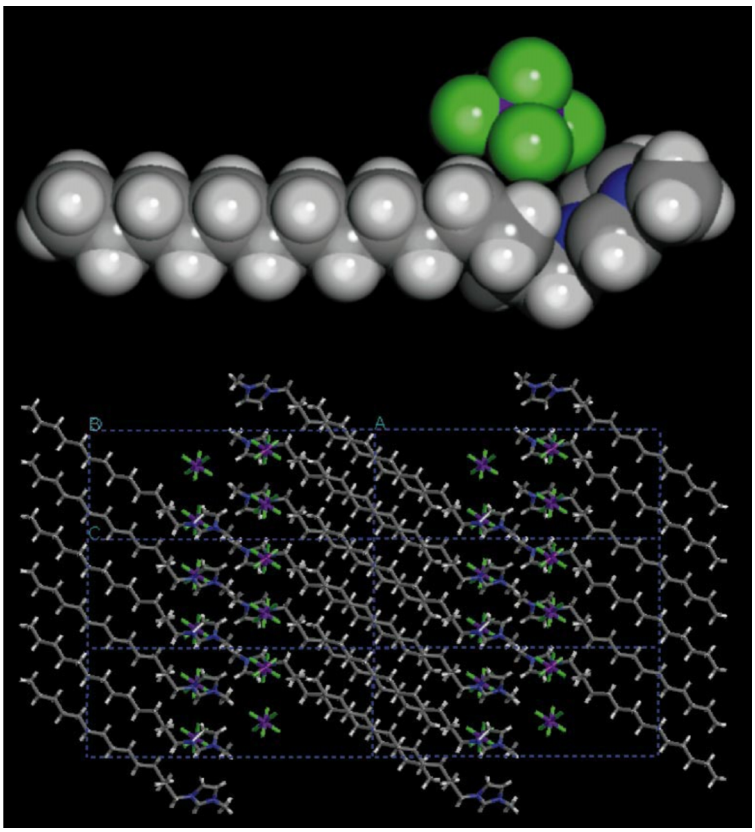


Figura 5.7: Estructura de una molécula de $[C_{14}C_1Im][PF_6]$ y su empaquetamiento.

5.1.2. NOMENCLATURA DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS

Los líquidos iónicos más habituales contienen los cationes amonio, fosfonio, sulfonio, guanidinio, piridinio, imidazolio y pirrolidinio. El empleo de una nomenclatura común no es muy habitual y la forma de nombrarlos puede tener algunas variaciones de unos autores a otros. En nuestro caso vamos a denominar a los líquidos iónicos como $[C_nC_mC_z\,\mathrm{Im}]$, $[C_npy]$ y $[C_nC_mpyr]$ a los que llevan los cationes alquilimidazolio (Im), piridinio (py) y pirrolidinio (pyr), respectivamente. El número de carbonos en la cadena alquilo se expresa por *n*, *m* y *z*.

Los aniones más comunes son Cl^-, Br^-, $[BF_4]^-$ y $[PF_6]^-$. En un intento de simplificar, al anión trifluoro metano sulfonilo, $[CF_3SO_2]^-$, lo abreviaremos como $[TfO]^-$, al *bis*(trifluoro metano sulfonilo) imida, $[(CF_3SO_2)_2N]^-$, como $[Tf_2N]^-$ y al anión dicianoamida,

$[N(CN)_2]^-$, como [dca]. El esquema de numeración lo podemos apreciar en la siguiente figura utilizando como modelo el catión 1-hexil-3-metilimidazolio, $[C_6C_1\text{Im}]^+$. Nótese que los hidrógenos del anillo se nombran como H2, H4 y H5.

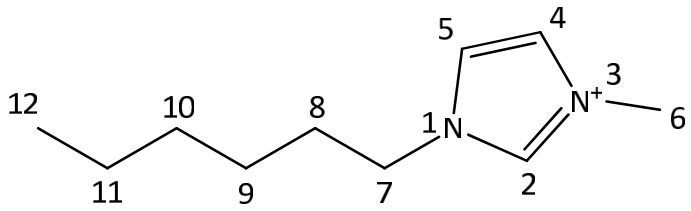
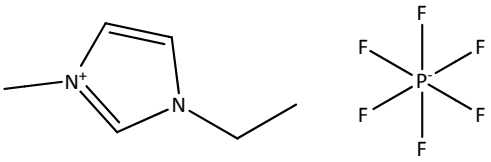
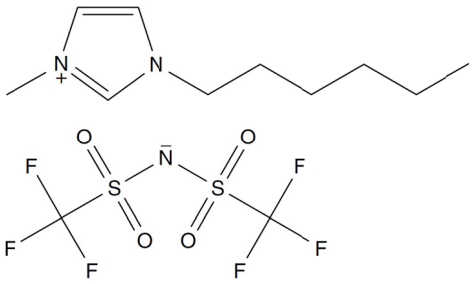
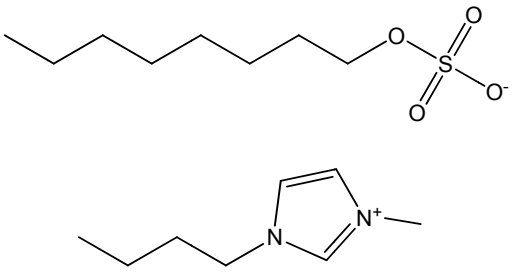
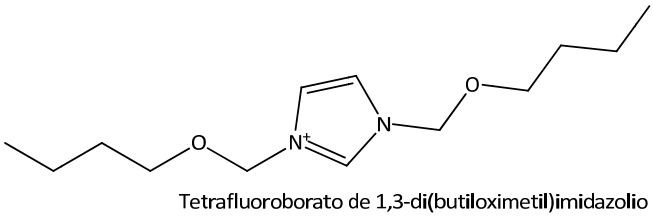
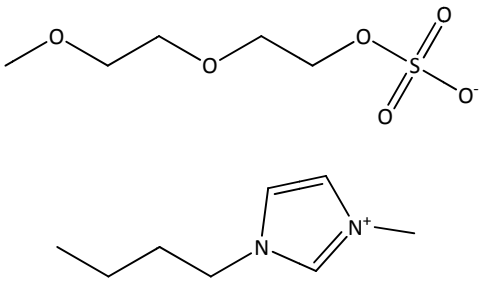
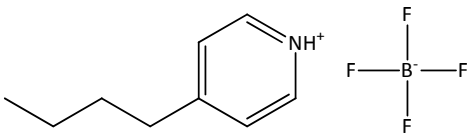


Figura 5.8: Esquema de numeración para la nomenclatura.

La Tabla 5.1 muestra alguno de los líquidos iónicos más habituales.

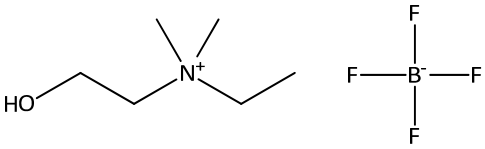
Tabla 5.1: Algunas estructuras de líquidos iónicos comunes

Estructura y nombre	*Abreviatura*
 Hexafluorofosfato de 1-etil-3-metilimidazolio	$[C_2C_1Im][PF_6]$
 *bis*(trifluorometilsulfonil)imida de 1-hexil-3-metilimidazolio	$[C_6C_1Im][Tf_2N]$
 Octil sulfato de 1-butil-3-metilimidazolio	$[C_4C_1Im][C_8SO_4]$
 Tetrafluoroborato de 1,3-di(butiloximetil)imidazolio	$[(C_4H_9OCH_2)_2Im][BF_4]$
 2-(2-metoxietoxi) etil sulfato de 1-butil-3-metilimidazolio	$[C_4C_1Im][MDEGSO_4]$



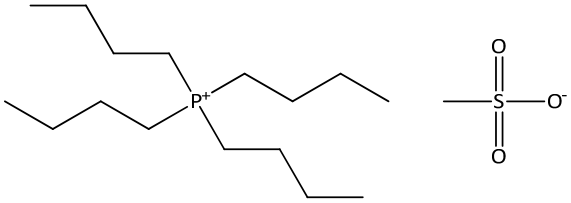
Tetrafluoroborato de 4-butil-piridinio

$[4\text{-}C_4py][BF_4]$



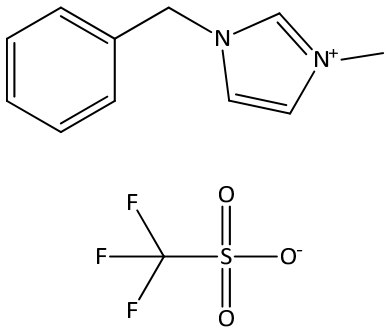
Hexafluoroborato de etil-(2-hidroxietil)-dimetilamonio

$[(C_1)_2C_2\ HOC_2N][PF_6]$



Metano sulfonato de tetrabutilfosfonio

$[(C_4)_4P][C_1SO_3]$



Trifluorometanosulfonato de 1-Benzil-3-metilimidazolio

$[BeC_1Im][TfO]$

5.1.3. PROPIEDADES DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS

Los líquidos iónicos son uno de los grupos de compuestos más amplios de la Química debido a la enorme cantidad de cationes y aniones posibles. Se estima que puede existir del orden de 10^{18} compuestos. Para la adecuada selección del líquido iónico apropiado a cada aplicación es preciso conocer las propiedades físicas de estos compuestos y su comportamiento frente a gases, líquidos y sólidos. Aunque su principal aplicación se encuentra en el campo de la síntesis a temperatura ambiente, en los últimos años se ha abierto un amplio abanico de aplicaciones que van desde su empleo como disolvente, catalizador, en Electroquímica, en Química Física debido a sus propiedades termodinámicas y también en Química Analítica. Está generalmente aceptado que las propiedades de los líquidos iónicos dependen de las estructuras de los cationes y los aniones, la interacción entre ellos y con el disolvente o compuestos coexistentes [4].

5.1.3.1. EFECTO DE LA ESTRUCTURA EN LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

La gran aplicación de los líquidos iónicos a la ciencia y la industria se debe fundamentalmente a sus singulares propiedades como son su muy baja presión de vapor, buena estabilidad térmica, viscosidad y miscibilidad con el agua, comportamiento electroquímico, elevadas conductividad y capacidad calorífica, y su empleo como disolvente capaz de controlar reacciones. Suelen estar presentes en estado líquido desde 180 a 600 K y los cinco grupos más populares son los que se denominan imidazolio, piridinio, pirrolidinio, amonio y tetraalquil fosfonio.

Desde hace tiempo se sabe que los líquidos iónicos son sustancias enlazadas por puente de hidrógeno con fuertes interacciones en iones. Por ejemplo, las estructuras de los cristales isomorfos de ioduro y bromuro de 1-etil-3-metilimidazolio constan de capas de aniones y cationes interconectadas con enlaces por puente de hidrógeno, donde cada catión está enlazado a tres aniones y cada anión está enlazado por puente de hidrógeno

a tres cationes [5] como se puede apreciar en la Figura 5.9. En el caso de que el anión sea cloruro la estructura es más complicada porque si bien se une a tres hidrógenos no siempre son el mismo dentro en el anillo. Aunque la capacidad de formar enlace por puente de hidrógeno parece que desciende a medida que al anión es más básico, el estudio de las propiedades de bis(trifluorimetil sulfonil) imida $[Tf_2N]^-$ muestra que esto no es exactamente así y que además coexisten importantes interacciones entre el líquido iónico y otros disolventes como es el caso de $[Tf_2N]^-$ y NO_3^-. Aunque la polaridad de los disolventes, expresada como su constante dieléctrica es la encargada de explicar la interacción entre disolventes, en el caso de los IL no se han conseguido buenas correlaciones y se recurre a otras características como la acidez o basicidad del enlace por puente de hidrógeno y efectos de polarizabilidad.

Si además el líquido iónico contiene grupos funciones capaces de aumentar su interacción por formación de enlaces π-π y n-π la posibilidad de predecir un comportamiento es aún más difícil. Así, dos líquidos iónicos distintos con similar polaridad pueden producir resultados muy diferentes cuando se emplean para la extracción de compuestos orgánicos. No obstante, se ha presentado una clasificación de 17 líquidos iónicos en base a la dipolaridad y la basicidad del enlace por puente de hidrógeno [6] en estudios de Cromatografía de gases (GC). En este estudio se considera un modelo de solvatación que supone que el proceso de solvatación ocurre en tres etapas. En la primera se genera una

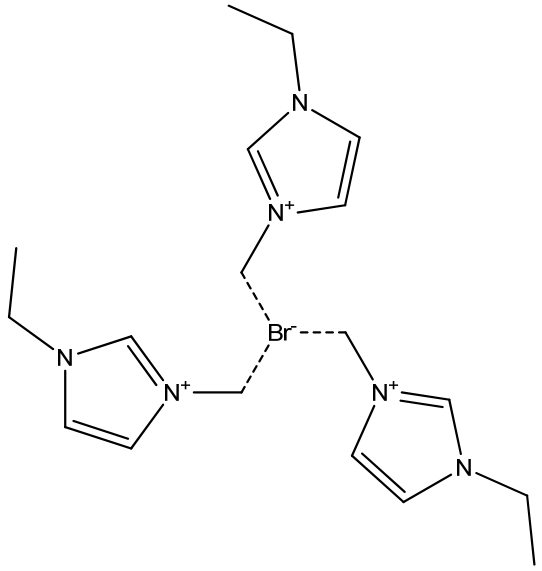


Figura 5.9: Estructura alrededor de un anión simple

cavidad de tamaño adecuado al soluto con el que se va a interaccionar, en la segunda las moléculas de disolvente se reorganizan dentro de la cavidad y finalmente, en la tercera, el soluto entra en la cavidad y se producen las interacciones [7]. La excelente correlación obtenida puede ser la base para la selección del líquido iónico adecuado en procesos GC.

Los factores estructurales del catión como es la simetría, densidad de carga, número de átomos en la cadena alquílica, flexibilidad, simetría rotacional del anillo y funcionalidad del grupo de cola junto con factores estructurales del anión y la deslocalización de carga alrededor del átomo central se han discutido [8] recientemente.

5.1.3.2. DENSIDAD, VISCOSIDAD Y PROPIEDADES DE TRANSPORTE

El efecto que tienen las estructuras de los aniones y cationes de un líquido iónico en su densidad se ha estudiado por distintos autores [9]. En general son más densos que el agua con valores que van desde 1 hasta 2.3 $g.cm^{-3}$. La densidad depende fuertemente del tamaño del anillo en el catión, la longitud de la cadena alquílica, la simetría de los iones y las fuerzas de interacción entre catión y anión. En general se puede decir que los IL con anillos aromáticos presentan mayores densidades que los piridinios y éstos más que los imidazolios. La densidad aumenta con la simetría de los iones, la presencia de grupos funcionales y disminuye con el aumento de la longitud de la cadena alquílica. Respecto de un catión en concreto (1,2-dialquilimidazolio), la densidad incrementa con el tipo de anión en el sentido: $[Cl]^-<[BF_4]^-<[C_2SO_4]^-<[PF_6]^-<[Tf_2N]^-$. Las Figuras 5.10 y 5.11 (tomadas de [10]) muestran este comportamiento.

Las propiedades de transporte juegan un papel muy importante en las reacciones químicas, electroquímica y procesos de extracción líquido-líquido. Estas propiedades están directamente relacionadas con la viscosidad de los líquidos iónicos. Los valores de viscosidad se encuentran en el intervalo de 10 a 500 cP a temperatura ambiente (mucho mayor que la del agua, 0.89 cP). La Tabla 5.2 muestra los valores de viscosidad de algunos IL con catión común.

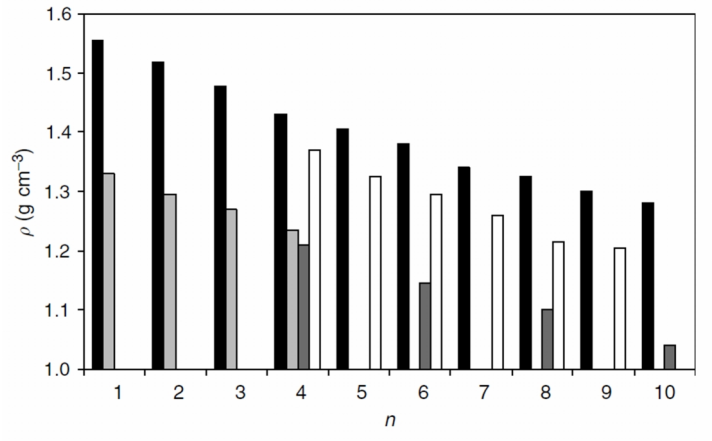


Figura 5.10: Influencia del catión y del anión en la densidad del imidazolio $[C_nC_1Im][X]$ a 298 K, donde n = 1-10 y los aniones $[X]^-$ son $[Tf2N]^-$ (negro), $[AlCl_4]^-$ (gris claro), $[BF_4]^-$ (gris oscuro) y $[PF_6]^-$ (blanco).

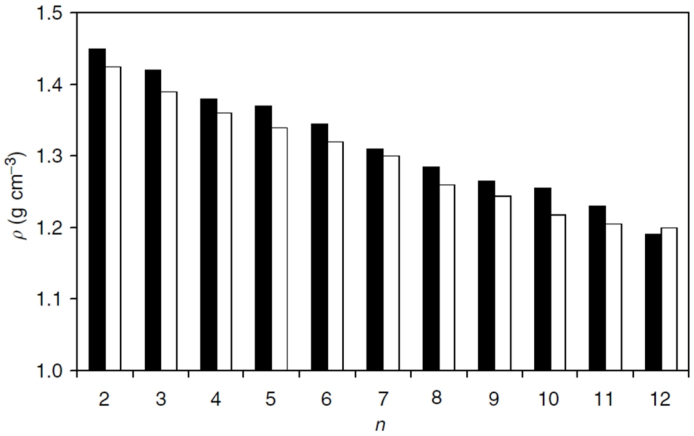


Figura 5.11. Influencia del anión en la densidad de los líquidos iónicos de alcoximetil (2-hidroxietil)-dimetilamonio (negro) y 2-acetoxietil)alkoximetil-dimetil (blanco) con $[Tf2N]^-$ del imidazolio a 298 K

Tabla 5.2. Viscosidad a 298 K de algunos líquidos iónicos con $[C_4C_1Im]^+$ como catión

Anión	$[I]^-$	$[NO_3]^-$	$[BF4]^-$	$[PF6]^-$	$[NbF_6]^-$	$[CF_3SO_3]^-$	$[CF_3CO_2]^-$	$[Tf_2N]^-$
η, cP	963	266	233	312	95	90	73	52

La viscosidad de los líquidos iónicos viene determinada por las fuerzas de van der Waals, los puentes de hidrógeno y en menor extensión por el desplazamiento de carga del anión y las fuerzas electrostáticas. Para el catión $[C_4C_1Im]^+$ la viscosidad desciende según el anión en el siguiente orden: $[I]^-$>$[PF_6]^-$>$[BF_4]^-$>$[TfO]^-$>$[CF_3CO_2]^-$>$[Tf_2N]^-$. Del mismo modo, manteniendo constante al anión en $[PF_6]^-$ o $[BF_4]^-$ la viscosidad e hidrofobicidad del líquido iónico aumenta con la longitud de la cadena, mientras que disminuye la densidad y la tensión superficial debido a una intensificación de las fuerzas de van der Waals que provocan un aumento de la energía necesaria para el movimiento de las mo-

léculas [11]. Del mismo modo, la introducción de grupos hidroxilo en la cadena alquílica conduce a un aumento de la viscosidad debido a la participación de los enlaces por puente de hidrógeno [12].

El efecto de la temperatura en la viscosidad es mucho más complicado en los líquidos iónicos que en los disolventes moleculares (no puede describirse con la ecuación de Arrhenius). También esta propiedad se modifica con el número de carbonos del radical del anillo aromático. La viscosidad aumenta al aumentar la longitud de la cadena del sustituyente del imidazol.

5.1.3.3. TENSIÓN SUPERFICIAL Y FORMACIÓN DE MICELAS

Se han realizado pocos estudios sistemáticos sobre el cambio de la tensión superficial de los líquidos iónicos con su estructura [13]. Se han encontrado valores desde 33.8 m Nm^{-1} para $[C_8C_1Im]Cl$, 46.6 m Nm^{-1} para $[C_4C_1Im][BF_4]$ y 48.8 m Nm^{-1} para $[C_4C_1Im][PF_6]$ hasta 54.7 m Nm^{-1} para $[C_4C_1Im]I$. Como puede apreciarse estos valores son inferiores a los de la tensión superficial del agua (72.7 m Nm^{-1} a 293.15 K) pero superiores a los de los alcanos (23.39 m Nm^{-1} para decano a 298.15 K).

Se ha observado que la tensión superficial aumenta con el número de átomos de carbono en el imidazolio y, respecto del anión, los menores valores de tensión superficial se consiguen con $[Tf_2N]^-$, siendo más elevados con $[I]^-$ y $[PF_6]^-$.

Como es sabido los tensioactivos pueden formar micelas en multitud de disolventes. A baja concentración se forma una capa monómera en la superficie y al aumentar la concentración del tensioactivo llega un momento en que se forman las micelas (concentración micelar crítica, CMC) en el seno de la disolución [14]. Estas micelas, en disolución acuosa, pueden ser normales (con las colas hidrofóbicas hacia el centro y los grupos de cabeza hidrofílica hacia la superficie externa) o inversas. Durante la formación de esa monocapa, los tensioactivos orientan sus cadenas hidrofóbicas hacia el aire disminuyendo la tensión superficial de la disolución acuosa. Se ha observado que la adición de tensioactivos a líquidos iónicos también disminuye la tensión superficial y forman también

micelas con valores de CMC mayores que en agua [15]. Del estudio del efecto de la concentración de líquido iónico en sistemas acuosos con tensioactivos se deduce que la presencia de IL provoca el descenso de la CMC debido a la formación de micelas mixtas [16].

5.1.3.4. PUNTO DE FUSIÓN Y ESTABILIDAD TÉRMICA

Cuando el anión del líquido iónico es un halógeno los puntos de fusión son superiores a aquellos que tienen aniones más complejos como $[Tf_2N]^-$. La Tabla 5.3 muestra algunos valores de puntos de fusión. Se ha encontrado, fundamentalmente para el catión imidazolio, que el aumento de la longitud de la cadena al principio hace disminuir el punto de fusión hasta aproximadamente 8 átomos de carbono, para a continuación y hasta llegar a 12 aumentar progresivamente.

Tabla 5.3: Puntos de fusión de algunos líquidos iónicos

Anión	Catión	Punto de fusión, K
Cl^-	$[C_4C_1Im]^+$	341.9
	$[C_8C_1Im]^+$	285.4
	$[C_{10}C_1Im]^+$	311.2
	$[C_{12}C_1Im]^+$	369.8
$[Tf_2N]^-$	$[C_4C_1Im]^+$	267.0
	$[C_8C_1Im]^+$	189.0
	$[C_{10}C_1Im]^+$	244.0
	$[C_{12}C_1Im]^+$	256.3

Los líquidos iónicos más habituales son térmicamente estables hasta 700 K. En general la temperatura de descomposición es más alta cuando el anión es complejo (menor punto de fusión). Por ejemplo, para el catión $[C_4C_1Im]^+$ la temperatura de descomposición aumenta en el orden: $[Br]^- < [BF_4]^- < [CF_3SO_3]^- < [Tf_2N]^-$. La Tabla 5.4 muestra algunos de los datos recogidos de la bibliografía [10].

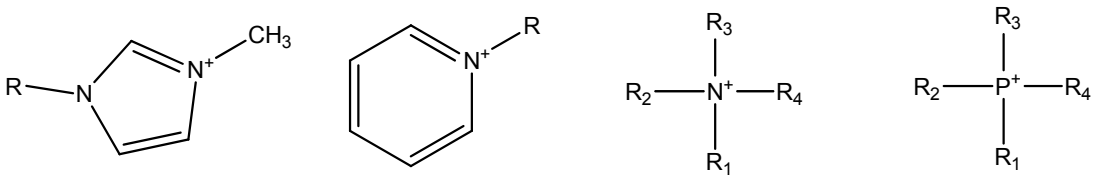
Tabla 5.4: Puntos de fusión y descomposición de algunos líquidos iónicos

Líquido iónico	Temp. fusión, K	Temp. descomposición, K
$[C_6H_{13}OCH_2–C_1Im][BF_4]$	190.7	522
$[C_6H_{13}OCH_2–C_1Im][Tf_2N]$	194.0	530
$[(C_1)_2C_2HOC_2N]Br$	541.4	559
$[(C_1)_2C_2HOC_2N]\ [BF_4]$	426.8	583
$[(C_1)_2C_2HOC_2N]\ [PF_6]$	272.0	556
$[(C_1)_2C_4HOC_2N]Br$	359.3	525
$[4C_4py][BF_4]$	361.9	575
$[Be(C_1)_2C_n][NO_3]$	309.4	215
$[(C_{10})_2(C_1)2_N][NO_3]$	291.9	234
$[C_4C1Im][Tf_2N]$	271.0	695
$[C_3C_1C_1Im][Tf_2N]$	288.0	735
$[C_1C_1Im][C_1SO_4]$	308.9	649

5.1.3.5. MISCIBILIDAD CON AGUA

La solubilidad de los líquidos iónicos en agua está regulada fundamentalmente por la naturaleza del anión, debido a la fuerte interacción por puentes de hidrógeno que se produce entre éste y el agua. En el caso del imidazolio, los que utilizan haluros, etanoato, nitrato y trifluoroacetato son completamente solubles en agua, mientras que las sales con $[BF_4]^-$ y $[CF_3SO_3]^-$ son parcialmente solubles en agua. Por otro lado la longitud de la cadena también influye en la miscibilidad con el agua. Así se sabe que la solubilidad disminuye al aumentar la longitud de la cadena [17]. La Figura 5.12 muestra el efecto de la estructura en la solubilidad del líquido iónico en agua.

El coeficiente de reparto K_{OW} de un compuesto orgánico en un sistema octanol/agua se utiliza como un procedimiento para conocer la bioacumulación potencial de drogas y contaminantes. El coeficiente de reparto para los líquidos iónicos depende de la fuerza de los enlaces por puente de hidrógeno formados y será menor que 1 debido a su elevada solubilidad en agua. Una sustancia es menos peligrosa desde el punto de vista de la bioacumulación cuanto menor es su coeficiente de reparto K_{OW}. Así valores de K_{OW} elevados (aprox. 105) como el caso del DDT (~ 106) es un ejemplo de peligrosidad. La



Insoluble en agua ⟶ Soluble en agua

$[PF_6]^-$ $[BF_4]^-$ $[CH_3CO_2]^-$

$[Tf_2N]^-$ $[CF_3SO_3]^-$ $[CF_3CO_2]^-$, $[NO_3]^-$

$[BR_1R_2R_3R_4]^-$ $[Br]^-$, $[Cl]^-$, $[I]^-$,

$[Al_2Cl_7]^-$, $[AlCl_4]^-$

Figura 5.12: Variación de la solubilidad en agua del líquido iónico en función de los iones constituyentes

Tabla 5.5 muestra los valores de K_{OW} calculados para algunos líquidos iónicos. Como puede apreciarse los valores son muy pequeños, por lo que podemos decir que su peligrosidad para el medioambiente es, desde este punto de vista, muy baja.

Estos valores de K_{OW} están influenciados por la polaridad del líquido iónico. La forma más común de medida de la polaridad es mediante la constante dieléctrica. Sin embargo, su medida requiere que el medio sea no conductor, que no es el caso de los líquidos iónicos. Las medidas de polaridad en los líquidos iónicos pueden realizarse mediante estudios solvatocrómicos empleando para ello especies absorbentes en el visible-ultravioleta aniónicas (reactivo de Reichardt) y catiónicas (rojo Nilo).

El reactivo de Reichardt, 2,4,6-trifenilpiridinio-N-4-(2,6-difenilfenóxido)betaina, es un colorante solvatocrómico negativo que presenta un desplazamiento de 375 nm. Puede registrar efectos derivados de la dipolaridad del disolvente, puentes de hidrógeno y de acidez de Lewis, viniendo la contribución más importante del efecto dador de puente de hidrógeno del disolvente [18]. Las medidas de polaridad basadas en el reactivo de Reichardt indican que la polaridad de estos líquidos iónicos es similar a la de alcoholes de cadena corta. El valor normalizado de la polaridad de Reichardt (E_T^N) viene determi-

nado fundamentalmente por la naturaleza del catión. El valor de E_T^N para las sales de imidazolio sustituidas depende de forma importante de si la posición 2 del anillo está protonada o metilada, a la vez éste decrece conforme aumenta la longitud de la cadena del catión. Este hecho es totalmente consistente con la importancia del efecto hidrógeno dador de estos cationes en los valores de E_T^N. El efecto del anión en los valores de polaridad es menor que el del catión. En este sentido, la diferencia en los valores de polaridad al cambiar el anión para un catión determinado es, en general, más pequeña que la existente al cambiar el catión manteniendo fijo el anión. Lo que sí está claro es que el efecto del cambio del anión depende de la naturaleza del catión. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, los valores de E_T^N N vienen determinados fundamentalmente por la capacidad del líquido iónico de actuar como dador de puentes de hidrógeno a través del catión, moderado por la habilidad aceptora de puentes de hidrógeno que posee el anión. De esta manera, el equilibrio competitivo entre el catión y el anión o el reactivo de Reichardt determinará los valores finales de E_T^N.

Tabla 5.5: Coeficientes de reparto octanol/agua para algunos IL

Líquido iónico	K_{OW}
1*H*-imidazol	0.49
2-Metil-1*H*-imidazol	0.67
1,2-Dimetilimidazol	0.83
Benzimidazol	16.90
2-Metilbenzimidazol	28.51
$[C_{10}C_1Im]Cl$	0.52
$[C_{12}C_1Im]Cl$	0.73
$[C_4C_1Im][PF_6]$	0.022
$[C_4C_1Im][BF_4]$	0.003
$[C_4C_1Im][NO_3]$	0.0038
$[C_4C_1Im][Tf_2N]$	0.11–0.62
$[C_6C_1Im][Tf_2N]$	1.42–1.66
$[C_8C_1Im][Tf_2N]$	6.3–11.1
$[C_2C_1Im][PF_6]$	0.015
$[C_2C_1Im][Tf_2N]$	0.09–0.11
$[C_6H_{13}OCH_2–C_1Im][Tf_2N]$	0.39
$[C_6H_{13}OCH_2–C_1Im][BF_4]$	0.64
$[(C_6H_{13}OCH_2)_2Im][BF_4]$	0.44

Como el reactivo solvatocrómico de Reichardt es negativo, sugiere la capacidad de interacción del catión, por tanto las conclusiones derivadas de la interpretación de los

valores de polaridad dados por el mismo van a reflejar principalmente el comportamiento del catión.

Utilizando el colorante solvatocrómico positivo Rojo Nilo se ha estudiado la polaridad de líquidos iónicos basados en 1-alquil-3-metilimidazolio. La polaridad decrece según la serie $[NO_2]^-$ > $[NO_3]^-$ > $[BF_4]^-$ > $[PF_6]^-$. Esta disminución de la polaridad está relacionada con el incremento en el tamaño del anión y la consiguiente reducción de la densidad de carga efectiva. Como el reactivo solvatocrómico de Rojo Nilo es positivo, por lo tanto, el análisis de los valores del mismo debe ser referido principalmente el comportamiento del anión.

Como conclusión general, para los líquidos iónicos basados en el catión 1-alquil-3-metilimidazolio se puede decir que la polaridad está aparentemente determinada por el anión para aquellos que contienen grupos alquílicos de cadena corta, y por el catión para aquellos cuyos grupos alquílicos son de cadena larga.

5.1.4. LOS LÍQUIDOS IÓNICOS EN PROCESOS DE SEPARACIÓN "VERDES"

Desde que los líquidos iónicos se ganaron la reputación de verdes hay un interés creciente en su aplicación a procesos de separación, entre otros campos. La baja o despreciable presión de vapor, su no inflamabilidad y no toxicidad son características frecuentemente etiquetadas como verdes aunque algunos líquidos iónicos pueden destilar, algunos pueden arder y los productos de descomposición de algunos líquidos iónicos son tóxicos [19]. Por lo tanto, la aplicación de los líquidos iónicos en procesos de separación favorables al medio ambiente no es sencilla y merece alguna aclaración.

La típica afirmación de que se trata de disolventes de diseño, lo cual es cierto, no es algo único, ya que los disolventes orgánicos convencionales o sus mezclas también pueden ser diseñados molecularmente para conseguir una determinada capacidad extractante.

Sin embargo, los líquidos iónicos poseen propiedades de separación únicas, que permiten nuevos conceptos de separación, y ofrecen la oportunidad de nuevos procesos. Los líquidos iónicos se pueden utilizar en la separación debido a su estabilidad, no volatilidad, miscibilidad y polaridad ajustable.

Los líquidos iónicos pueden ser hidrófilos o hidrófobos en función de la estructura de sus cationes y aniones. El anión parece ser el más importante en lo referente a su miscibilidad con agua [13]. Por ejemplo, las sales habituales de 1,3-dialquilimidazolio con acetato, haluro, nitrato y trifluoroacetato son completamente miscibles con agua, mientras que hexafluorofosfato y bis (trifluorometanosulfonil) amida son inmiscibles con agua [17]. La baja solubilidad en agua de los líquidos iónicos con $[PF_6]^-$ y $[Tf_2N]^-$ los hace particularmente interesantes para la mayoría de las aplicaciones de extracción de líquido iónico. Sin embargo, se ha observado que los líquidos iónicos que contienen $[PF_6]^-$ no deben considerarse como verdes debido a la formación de HF a temperaturas elevadas [20] y los que utilizan $[Tf_2N]^-$ resultan habitualmente de elevado precio.

Las principales ventajas de los líquidos iónicos en procesos de separación son:

- Baja presión de vapor: mínimas emisiones a la atmósfera
- Intervalo de temperatura de uso muy amplio
- Propiedades físico-químicas fácilmente modulables
- Fácil regeneración por evaporación o redisolución de los compuestos separados.

Entre los inconvenientes podemos mencionar los siguientes:

- Con frecuencia muestran una elevada viscosidad
- Presentan elevada densidad
- Mayor precio que los disolventes orgánicos
- Algunos líquidos iónicos son tóxicos para el medio acuático.

Si lo que se pretende es sustituir un proceso de separación convencional por un proceso que utiliza líquidos iónicos, este proceso debe ser más económico, es decir, debe poseer una menor demanda de energía, menor utilización de materias primas, menor generación de residuos, etc. En general, es difícil cambiar los procesos existentes, excepto cuando los ahorros en las inversiones y los gastos de funcionamiento son sustanciales y/o si el nuevo proceso que utiliza líquido iónico puede realizarse en los equipos existen-

tes, con poca o ninguna modificación. Por eso, aplicar un nuevo proceso de separación con líquidos iónicos, en principio, es más fácil que la adaptación, pero la tecnología debe ser probada en una escala razonable y durante un período de tiempo prolongado.

5.1.5. LOS LÍQUIDOS IÓNICOS EN EL TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Los líquidos iónicos pueden ser adecuados en algunas etapas del proceso (bio) químico de medida. Además de la selectividad y la mejora de la sensibilidad de los métodos existentes, los ILs pueden ofrecer a los científicos analíticos alternativas originales para proponer nuevas aplicaciones. Probablemente, su uso en las primeras etapas del proceso analítico es ventajoso y puede reducir notablemente el pretratamiento de la muestra al tiempo que mejorar su eficiencia. En este apartado se muestra una panorámica actual de la contribución de los líquidos iónicos a la mejora del proceso analítico. Hay que tener en cuenta que las secciones siguientes se dedican exclusivamente a la función de los líquidos iónicos en la preparación y/o pretratamiento de la muestra.

5.1.5.1. EXTRACCIÓN

Los líquidos iónicos han sido usados en la extracción liquido-líquido de metales (con ayuda de agentes complejantes), moléculas orgánicas pequeñas y biomoléculas como proteínas y ADN merced a las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, además de los efectos “salting out”. De modo general podemos decir que se han encontrado elevados coeficientes de reparto para metales utilizando líquidos iónicos de catión corto del tipo $[C_4C_1Im]^+$, mientras que para la extracción de proteínas se precisan formas catiónicas de cadena larga. Más adelante trataremos estos aspectos con más detalle.

Como todos sabemos, las tendencias actuales de los procesos de extracción líquido-líquido se dirigen hacia la miniaturización del proceso con el fin de evitar sus connotaciones negativas. Así los líquidos iónicos se han aplicado en distintas variantes de técnicas de microextracción en fase líquida (LPME): dinámica, con fibra hueca, dispersi-

va, con gota suspendida, etc. A modo de ejemplo podemos mencionar los excelentes resultados que se han obtenido con el empleo de $[C_8C_1Im][PF_6]$ para la extracción de hidrocarburos policíclicos aromáticos. Su aplicabilidad en microextracción en fase sólida (SPME) es clara, como se puede comprobar a partir del procedimiento propuesto para la determinación de benceno, tolueno, etilbenceno y xileno en pinturas [21].

5.1.5.2. CROMATOGRAFÍA

Los líquidos iónicos han sido utilizados como fases estacionarias en gran variedad separaciones cromatográficas. Así por ejemplo, aprovechando su alta viscosidad y estabilidad térmica, se han utilizado en cromatografía de gases inmovilizándolos en la superficie interna del capilar de sílice fundida [22]. Aunque la versatilidad de los líquidos iónicos permite eficientes separaciones tanto de especies polares como no polares, en algunos casos se han descrito elevados tiempos de retención y picos con larga cola en alcoholes y ácidos orgánicos e incluso interacciones irreversibles con alquilaminas.

En cromatografía de líquidos se pueden emplear como modificadores de la fase móvil e incluso como fase estacionara. Existe una importante limitación como fase móvil que se deriva de su alta viscosidad y su capacidad de absorción en el ultravioleta. Sin embargo, su presencia a baja concentración (como aditivo) conduce a un descenso en la anchura del pico y por tanto a la mejora de la resolución. Este efecto se atribuye a la competencia de los líquidos iónicos, en concreto de los cationes imidazolio, y los grupos polares de los analitos por los grupos silanol superficiales de la sílice. Más recientemente se han propuesto fases estacionarias con líquidos iónicos inmovilizados que trabajan en fase reversa y como intercambiador aniónico fuerte.

5.1.5.3. ELECTROFORESIS

Los líquidos iónicos se han empleados para mejorar la separación en medios no acuosos debido a que su uso en la forma convencional está dificultado por su alta visco-

sidad y conductividad. Se han propuesto para separar colorantes insolubles en agua debido a la modificación de la movilidad electroforética global del sistema y la disociación de los analitos en presencia de líquidos iónicos. Varias investigaciones han demostrado la capacidad de mejorar la separación electroforética de compuestos quirales y aquirales ayudados por tensioactivos poliméricos [23]. Biomoléculas, drogas, cationes inorgánicos y ácidos alquilfosfónicos han sido separados usando capilares modificados con líquidos iónicos para reducir la adsorción de los analitos [24]. Los capilares son reutilizables hasta aproximadamente 100 veces.

5.1.5.4. SENSORES

La alta viscosidad de los líquidos iónicos ha sido aprovechada para el desarrollo de electrodos libres de membrana modificados con una fina capa de líquido iónico [25]. Resultan particularmente adecuados a temperaturas elevadas debido a su baja volatilidad. La combinación de líquidos iónicos hidrofóbicos, como $[C_2C_1Im][TfO]$ con membrana, como Nafion, se ha propuesto para la construcción de sensores y dispositivos electromecánicos ya que son más estables en atmósfera abierta, aunque su respuesta sea ligeramente más lenta. La variación de la viscosidad de los líquidos iónicos ha sido satisfactoriamente empleada como material sensible para la fabricación de microbalanzas de cristal de cuarzo [26].

5.1.6. LOS LÍQUIDOS IÓNICOS COMO DISOLVENTES EXTRACTANTES

El análisis directo de muestras, independientemente de su origen, aunque deseable, resulta inviable en la mayoría de casos debido a la complejidad de la matriz de la muestra, la baja concentración de los analitos, o incluso la incompatibilidad con el detector. En estos casos es precisa una etapa de pretratamiento de la muestra para la eliminación de las interferencias y separación/preconcentración de los analitos. A pesar de los importantes avances en la ciencia de separación, la extracción con disolventes tradicionales es todavía muy utilizada para la preparación de muestras. El principal inconveniente

de la extracción con disolventes es el empleo de grandes cantidades de disolventes, de alta pureza, costosos y tóxicos, y la generación de residuos peligrosos.

Por lo tanto, la búsqueda de nuevos disolvente es una tendencia muy actual. En este sentido, la capacidad disolvente de los líquidos iónicos ha llamado mucho la atención no solamente desde el punto de vista de su capacidad para la extracción sino también para su empleo como disolvente en procesos de síntesis [27].

A las excelentes características ya comentadas hay que añadir la enorme variedad de líquidos iónicos disponibles (104) [28], lo que unido a su comportamiento amigable con el medio ambiente [29] justifica el enorme interés despertado en el desarrollo de procedimientos de extracción tanto de compuestos orgánicos como iones metálicos.

La extracción líquido-líquido (LLE), una técnica de tratamiento de muestras clásica, se basa en reparto de una sustancia química entre dos fases inmiscibles. En su enfoque habitual, la muestra acuosa, que contiene los analitos, se mezcla con un disolvente orgánico adecuado que presenta una afinidad química hacia el analito en las condiciones de trabajo (temperatura, pH, fuerza iónica, etc). Al agitar fuertemente, las fases se mezclan de forma intensa y se produce la transferencia de los analitos desde la fase dadora a la aceptora. A pesar de las diferentes variantes desarrolladas, LLE se mantiene como una técnica manual que involucra diferentes etapas (retro extracción, extracciones consecutivas, evaporación de los extractos, etc) que son una fuente potencial de contaminación o de pérdida de analito, afectando directamente a la reproducibilidad de las medidas finales. Por otra parte, la técnica es tediosa, consume mucho tiempo y requiere el uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos puros que son caros y peligrosos para los trabajadores y el medio ambiente.

En este escenario, la microextracción en fase líquida, LPME, surge como una alternativa a la clásica LLE [30]. Esta metodología se ha desarrollado espectacularmente y se ha convertido en una realidad en la rutina de los laboratorios. En este sentido se han desarrollado un gran número de sub-técnicas con el fin de resolver los diferentes problemas analíticos.

Recientemente los líquidos iónicos se han estudiado como disolventes para la extracción líquida a escala micro porque permite alcanzar mayores eficiencias de extracción y factores de enriquecimiento que los procesos convencionales de extracción. En particular, la microextracción líquido-líquido en fase dispersa (DLLME) se muestra muy rápida y efectiva. Estos procesos de microextracción se han combinado con técnicas de detección como Cromatografía de Líquidos de Alta resolución (HPLC) y Cromatografía de Gases (GC) para compuestos orgánicos y Espectrometría de Absorción Atómica con Llama (FAAS) y de Atomización Electrotérmica (ETAAS) para iones metálicos.

5.1.6.1. APLICACIÓN DE LOS LÍQUIDOS IÓNICOS COMO MEDIOS DE EXTRACCIÓN CLÁSICOS

5.1.6.1.1. EXTRACCIÓN DE METALES

Los líquidos iónicos han sido ampliamente utilizados en extracción líquido-líquido (LLE) para el aislamiento de muestras acuosas de una gran variedad de compuestos. En este sentido, han sido seleccionados para la extracción de metales siguiendo alguno de los siguientes procedimientos [31]:

- La extracción de metales mediante el uso de éteres corona. El complejo resultante presenta una alta hidrofobicidad, pero todavía sigue teniendo una carga eléctrica residual. El uso de líquido iónico para la extracción de estos complejos presenta eficiencias de hasta 104 veces más que con disolventes orgánicos convencionales [32].
- La extracción de metales en forma de complejos neutros con ligandos aniónicos [33,34]. Este enfoque ha sido muy utilizado para la extracción de diversos metales como el mercurio [35], aluminio [36] o níquel [37].
- Extracción de metales con líquidos iónicos específicos con grupos catiónicos intercambiables en su estructura [38].

Estudios sobre la influencia de las variaciones estructurales del líquido iónico en la selectividad y eficiencia de la extracción competitiva de sales de metales alcalinos con

éteres de corona han demostrado que la eficiencia de extracción por lo general disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena del grupo alquilo unido a la posición 1 del imidazolio [39].

Después de la extracción del ión metálico se suele realizar una retroextracción en medio muy ácido o muy básico. Sin embargo, este proceso de separación es muy lento aunque se puede acelerar utilizando una mezcla de agua y acetona como medio de retroextracción. Este procedimiento sirve también para dejar el líquido iónico en condiciones de reutilizarse. El líquido obtenido en la retroextracción puede llevarse a cualquier técnica de AAS o bien, si es transparente y el complejo formado entre el metal y el ligando posee características cromogénicas adecuadas, puede determinarse por absorción molecular en el visible-ultravioleta [40]. La Tabla 5.6 muestra algunos de los procedimientos de extracción de metales con líquidos iónicos desarrollados hasta la fecha.

En general las sales inorgánicas tienen baja solubilidad (5-50 mM) en líquidos iónicos sean estos hidrofílicos o hidrofóbicos [41]. Es evidente por tanto la necesidad de agentes complejantes para conseguir la extracción de cationes metálicos como cuando se emplean disolventes convencionales. Estos complejantes pueden añadirse directamente al medio de reacción o bien incluirse mediante síntesis en la estructura de las cadenas alquílicas de los líquidos iónicos. En la extracción del complejo neutro formado juega un papel importante la fuerza iónica del medio, que se fija habitualmente añadiendo un electrolito inerte.

En el caso de los líquidos iónicos, la fuerza iónica la aporta el propio disolvente. Por ejemplo, la fuerza iónica, para $[C_4C_1Im][BF_4]$, $[C_4C_1Im][PF_6]$ y $[C_4C_1Im][Tf_2N]$ es 5.35, 4.83 y 2.91 mM, debido a la parcial solubilidad de los mismos en agua. Este punto es importante a la hora de calcular la constante aparente de formación de los complejos metálicos.

Aunque existe una importante variabilidad en la forma que distintos autores realizan estos cálculos, en general podemos decir que las constantes de formación en líquidos iónicos son mayores que en agua pero menores que en disolventes orgánicos poco polares. La Tabla 5.7 muestra algunos ejemplos [42].

Tabla 5.6. Procedimientos para la determinación de metales utilizando líquidos iónicos como extractantes.

Ión metálico	Líquido iónico	Ligando	Detección/LOD	Ref.
Ni^{2+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	PAN	FI-FAAS/12.5 µg.L^{-1}	[37]
Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}	Salicilato de trioctiltrimetrilamonio			[43]
Cd^{2+}	LI funcionalizado 2-mercaptobenzothiazole	Pirrolidin ditiocarbamato amónico y dietilditiocarbamato	AAS	[44]
Pb^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Cd^{2+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	2-aminofenol		[45]
Co^{2+}	$[C_6Py][PF_6]$ [	1-fenil-3-metil-4-benzoil-5-pirazolona	AAS/0.7 µg L^{-1}	[46]
Cd^{2+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	2-mercaptobenzotiazol	AAS/4.6 ng L^{-1}	[47]
La^{3+}	$[C_4C_1Im][Tf_2N]$	18-crown-6 y 2 tenoiltrifluoroacetona		[48]
Sr^{2+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	DHC-18-C-6		[49]
Am^{3+}	$[C_4C_1Im][Tf_2N]$	Tributilfosfato y óxido de n-octil(fenil)-N,N-diisobutilcarbamoilmetilfosfina		[50]
UO_2^{2+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	tributilfosfato		[51]
Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$, $[C_4C_1Im][Tf_2N]$			[52]
Pb^{2+}, Cd^{2+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	Ioduro de tretapropilamonio	Voltametría de redisolución anódica/1 µg L^{-1}	[53]
Th^{4+}	$[C_8C_1Im][PF_6]$	Amina primaria N-1293		[54]
UO_2^{2+}	$[C_4C_1Im][Tf_2N]$	tributilfosfato		[55]
Y^{3+}	$[C_8C_1Im][PF_6]$	Cyanex-923 y AEDT		[56]
Pu^{4+}	$[C_8C_1Im][PF_6]$	Óxido de carbamoilmetilfosfina		[57]
La^{3+}	$[C_4C_1Im][Tf_2N]$	2-tenoiltrifluoroacetona y 18-crown-6		[58]
Ni^{2+}	$[C_4C_1Im][Tf_2N]$	2-piridinaldoxima		[59]
Pb^{2+}	$[C_8C_1Im][PF_6]$	ditizona	ETAAS/1 ng L^{-1}	[60]
Al^{3+}	$[C_8C_1Im][PF_6]$	3,5-diterbutilsalicilfluorona	ETAAS/ 60 ng L^{-1}	[36]
Zn^{2+}	$[C_4C_1Pyr][TfSO_3]$	2,4-dinitrofenolato		[61]
Pb^{2+}	$[C_8C_1Im][PF_6]$	ditizona		[62]
Sc^{3+}	$[C_8C_1Im][PF_6]$	Cianez-925		[63]
Mg^{2+}	$[C_8C_1Im][PF_6]$	Bensoil trifluoroacetona, 2-naftoiltrifluoroacetona y trifluroacetilactona		[64]
Pd^{2+}	$[[(C_8C_1)_3N]Cl$	Aliquat-336		[65]
Cu^{2+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	1-metil imidazol		[66]
La^{3+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	N,N,N',N',-tetraquis(2-piridilmetil) etilendiamina		[67]
Ge^{4+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	metilbenzenoazosalicilfluorona	Vis-UV/0.2 µg L^{-1}	[40]
UO_2^{2+}, Am^{3+}, Nd^{3+}, Eu^{3+}	$[C_9C_1Im][Tf_2N]$	Ácidos dialquilfosfóricos		[68]
UO_2^{2+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	tribulfosfato		[65]
Cu^{2+}	$[C_4C_1Im][Tf_2N]$	dicetonato		[69]
Cu^{2+}	$[C_4C_1Im][PF_6]$	Ditizona, oxina y PAN		[70]

Tabla 5.7. Constantes de formación aparente de algunos complejos en distintos medios

Complejo	logβ				
	$[C_4C_1Im][Tf_2N]$	H_2O	Acetonitrilo	DMSO	Metanol
$[UO_2NO_3]^+$	4.8	0.3	7.9		
$[UO_2(NO_3)_2]$	8.3	0.31	15.0		
$[UO_2(NO_3)_3]^-$	12.2		20.0		
[As(Crytand 222)]$^+$	10	9.6	9.01	8.4	12.3
[Cs(16-crown-6]$^+$	3.4	0.91	4.8		4.6
$[Cs(18\text{-crown-6})_2]^+$	1.29		0.6	3.04	2.06

5.1.6.1.2. EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS

Los líquidos iónicos se han aplicado ampliamente a la extracción y separación de compuestos orgánicos, tanto mediante procesos de extracción líquido-líquido como soportados en membranas líquidas para la separación de gases. Por ejemplo, $[C_4C_1Im][PF6]$ se ha utilizado en membrana para la separación de hidrocarburos. Aunque la eficiencia del proceso es menor que en estado líquido, la selectividad mejora bastante [71]. Como etapa previa al empleo de HPLC permite alcanzar separaciones hasta ahora no conseguidas. Utilizados como electrolitos en Electroforesis capilar pueden mejorar la capacidad eléctrica del capilar [72]. Utilizados en conjunción con dióxido de carbono supercrítico ($scCO_2$) aumenta la capacidad de extracción de este disolvente como se ha puesto de manifiesto en la separación de compuestos aromáticos y alifáticos con la combinación $[C_4C_1Im][PF6]$:$scCO_2$ [73].

Los primeros trabajos sobre el empleo de ILs en la extracción de compuestos orgánicos datan de 1998 [74] cuando se estudió el empleo de $[C_4C_1Im][PF_6]$ como extractante en disoluciones acuosas de anilina y ácidos carboxílicos aromáticos con coeficientes de reparto menores que los que se obtiene en el sistema agua/octanol, aunque mejora al aumentar la hidrofobicidad del líquido iónico, por ejemplo, aumentando la longitud de la cadena alquílica [75].

Un estudio interesante en este campo es la extracción de compuestos fenólicos, ya que estas sustancias son importantes contaminantes medioambientales que afectan muy negativamente a los seres vivos. Su extracción en disolventes convencionales no es

cuantitativa y el problema analítico para la determinación de cantidades traza de estas sustancias es de gran interés. Los estudios llevados a cabo con líquidos iónicos indican que para que la extracción sea importante hemos de situarnos en unas condiciones experimentales de pH por debajo del pK_a de la sustancia. Además se ha observado que los compuestos fenólicos hidrofóbicos se extraen incluso a valores de pH superiores al pK_a lo que se explica por la formación de enlaces por puente de hidrógeno entre éstos y los líquidos iónicos [76].

No hay que olvidar las posibilidades que tienen los líquidos iónicos derivadas de su capacidad de actuar como intercambiadores iónicos. Este punto se ha puesto de manifiesto en un estudio sobre la extractabilidad en líquido iónico de diversos aminoácidos. Se ha comprobado que la mejor extracción se produce en la zona de pH donde el aminoácido se encuentra cargado positivamente y disminuye al aumentar el pH pasando primero a una forma zwiterion y posteriormente aniónica. Sin embargo, para que la extracción sea alta no se precisa el empleo de un contraión, sino que los mejores resultados se obtuvieron con un complejante neutro como un éter de corona. La reacción propuesta es la siguiente:

$$\left(AmH_2^+\right)_{fa} + \left(CE\right)_{fo} + \left(\left[C_4C_1IM\right]^+\right)_{fo} \rightarrow \left(AmH_2^+ \cdot CE\right)_{fo} + \left(\left[C_4C_1IM\right]^+\right)_{fa}$$

Como puede verse esta reacción corresponde a un proceso de intercambio iónico donde el catión del aminoácido va hacia la fase orgánica y el dialquilimidazolio pasa a la fase acuosa [77]. Este mismo proceso de intercambio se ha observado para las catecolaminas al pH de trabajo en el que sus grupos amino se encuentran protonados [78] y los compuestos fenólicos cuando están a pH en donde se encuentran cargados negativamente merced a un intercambio con PF_6^-.

Muchos compuestos biológicos de gran importancia, son difícilmente recuperados usando disolventes convencionales por su alta polaridad, naturaleza polimérica e inestabilidad. El sistema bifásico líquido iónico/agua conteniendo $[C_4C_1Im]Cl$ y K_2HPO_4 ha sido propuesto para complejar testosterona y epistosterona en la orina humana y posterior análisis por HPLC [79]. El líquido iónico $[C_8C_1Im][BF_4]$ se ha utilizado para la extracción de dos antibióticos, amoxicilina y ampicilina, desde disoluciones acuosas a pH

4 y 8 [80]. La penicilina G se ha conseguido extraer con un porcentaje de extracción del 93% empleando de $[C_4C_1Im]Cl$ y NaH_2PO_4 [81]. Incluso ADN se puede extraer con $[C_4C_1Im][PF_6]$ con porcentajes de extracción superiores al 95% [82].

5.1.6.2. LOS LÍQUIDOS IÓNICOS EN TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN

El pretratamiento de la muestra es un paso clave en el proceso de análisis con el fin de mejorar la sensibilidad (por la preconcentración de los analitos) y selectividad (al evitar la presencia de posibles interferencias), así como para superar la incompatibilidad con el sistema de detección. El tratamiento ideal de la muestra debe ser [83]:

a) simple, reduciendo el número de pasos,

b) automático, reduciendo o minimizando la manipulación del operador,

c) adecuado para la miniaturización, por reducción del consumo de muestra y disolvente,

d) rápido, para permitir una alta frecuencia de muestreo y así poder resolver problemas en tiempo real,

e) barato, y

f) seguro para los operadores y el medioambiente.

Las técnicas de microextracción, incluyendo microextracción en fase sólida (SPME) y líquida (LPME), surgieron en la década de 1990 como consecuencia de la evolución de la Química Analítica hacia la automatización, miniaturización y simplificación. En este contexto, las inusuales propiedades físicas de los líquidos iónicos, así como sus excelentes propiedades disolventes se han estudiado extensamente.

5.1.6.2.1. LOS LÍQUIDOS IÓNICOS EN MICROEXTRACCIÓN EN UNA GOTA (SDME)

La técnica de microextracción en una gota, que se propuso por primera vez en 1996 [84-86], se fundamenta en el soporte de un microvolumen de fase aceptora en la punta de una microjeringa. Este microvolumen puede estar entonces sumergido en la disolución de la muestra o bien en el espacio inmediatamente superior de la disolución. El empleo de una u otra de las variantes depende de la volatilidad de los analitos. Así, en el caso de analitos poco volátiles resulta precisa la inmersión de la gota dentro de la disolución (DI-SDME). Esto supone una extracción menos selectiva y más dependiente de posibles problemas derivados de la agitación de la muestra, como puede ser la caída de la gota desde su soporte hacia el fondo de la disolución. Sin embargo, cuando el analito es volátil se puede recurrir a colocar la gota en la fase gaseosa por encima de la disolución, esto es en el denominado espacio de cabeza (HS-SDME). Obviamente el sistema ha de estar cerrado para alcanzar un equilibrio gas-líquido.

En las dos opciones, transcurrido el tiempo necesario para la extracción que, como puede comprenderse, será de varios minutos, ya que la transferencia de fases no está favorecida por un íntimo contacto entre ellas, el microvolumen de fase aceptora se recoge con la jeringa y se puede llevar directamente al detector.

La determinación del contenido de hidrocarburos policíclicos aromáticos en disoluciones acuosas fue el primer trabajo publicado sobre el empleo de líquidos iónicos tanto con DI-SDME como HS-SDME [87]. En este caso se utilizó $[C_8C_1Im][PF_6]$, que debido a la mayor viscosidad y tensión superficial que los disolventes orgánicos, por ejemplo octanol, permite la formación segura de microgotas de mayor tamaño sin reducción de tamaño por evaporación durante el proceso de extracción en espacio de cabeza.

En el caso de DI-SDME se requiere baja solubilidad en agua, buena estabilidad en la punta de la microjeringa y afinidad por los analitos. En este punto se han aplicado extensamente los líquidos iónicos de estructura $[C_nC_1Im][PF_6]$ donde n puede ser 4, 6 u 8, pudiéndose alcanzar fácilmente factores de preconcentración de 100 veces para compuestos orgánicos [88].

En el caso de la determinación de iones metálicos es preciso recurrir a la formación previa de complejos metálicos neutros para lograr la extracción. Así se han propuesto procedimientos para la determinación simultánea de diversas formas de mercurio que pueden separarse mediante HPLC y determinarse por absorción en el ultravioleta [89] y contenidos muy bajos de plomo en aguas con detección por ETAAS [90,91]. El principal problema de la metodología DI-SDME es la estabilidad de la gota en la punta de la jeringa, lo que obliga a emplear volúmenes en el intervalo de 2 a 10 µL. Una forma de evitar este inconveniente es insertar la microjeringa en una pequeña celda de flujo de forma que la disolución fluye de forma repetitiva por la gota [92].

La metodología HS-SDME resulta especialmente adecuada para la determinación de compuestos orgánicos volátiles como anilinas cloradas [93], pesticidas organoclorados [94], fenoles [95], clorobencenos [96] y aminas aromáticas [97]. Una vez extraídos estos compuestos resulta necesaria su separación. Para ello, en la mayoría de los casos se recurre al empleo de HPLC debido a que la temperatura de ebullición de los líquidos iónicos es demasiado alta para su empleo de GC. Se han realizado muchos intentos para desarrollar una interfase que permita la desorción de los analitos retenidos en el líquido iónico antes de su entrada a la columna de GC [98]. Otras interfases que permiten la desorción de los analitos están basadas en modificaciones del inyector [99] o el empleo del sistema de desorción propio del proceso de extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE) [100].

5.1.6.2.2. LOS LÍQUIDOS IÓNICOS EN MICROEXTRACCIÓN CON FIBRA HUECA

La fibra hueca es un soporte polimérico, generalmente polipropileno, de 600 µm de diámetro interno y 200 µm de espesor de pared en cuyos intersticios se pueden alojar submicrovolúmenes de compuestos hidrófobos, como los disolventes orgánicos y los líquidos iónicos, actuando como un soporte de los mismos y constituyendo lo que se denominan membranas líquidas [101]. Habitualmente esta fibra está soportada en una jeringa como se muestra en la Figura 5.13. Al sumergir la fibra impregnada con el disolvente (fase aceptora) dentro de la disolución de la muestra (fase dadora) se produce la

retención del analito en la fase aceptora. Si el interior de la fibra también está relleno del mismo disolvente, el analito migra hacia el interior y transcurrido el tiempo preciso para la extracción se recoge el volumen interno que se lleva al detector. En este caso estamos ante un sistema de dos fases al que se le denomina microextracción en fibra hueca líquido-líquido (LL-HFLPME). En otros casos se puede mejorar la selectividad del proceso rellenando el interior de la fibra con otra fase inmiscible con el disolvente y que involucra la retroextracción del analito. Esta es ahora la fase aceptora, mientras que el disolvente soportado en la fibra actúa como un transportador del analito. Este sistema de tres fases se denomina LLL-HFLPME.

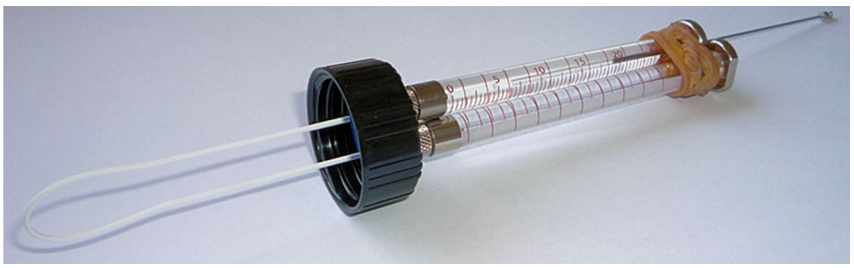


Figura 5.13: Disposición de una fibra hueca utilizando jeringas como soporte.

La aplicación de esta metodología con el empleo de líquidos iónicos ha sido puesta de manifiesto en la determinación de clorofenoles [102] con $[C_8C_1Im][PF_6]$, sulfonamidas [103] y algunas especies metálicas como plomo y níquel [104] en sistemas LL-HFLPME. La determinación de hidrocarburos aromáticos y alifáticos se ha propuesto con el empleo de LLL-HFLPME y GC [105].

5.1.6.2.3. LOS LÍQUIDOS IÓNICOS EN MICROEXTRACCIÓN EN FASE DISPERSA

Las técnicas de microextracción son procesos que dependen de la superficie. Si la superficie de contacto entre muestra y extractante es pequeña, la cinética del proceso de extracción es muy lenta y el tiempo necesario para llevar a cabo el proceso demasiado largo. La microextracción en fase dispersa (DLLME) aparece con la intención de evitar estos inconvenientes [106]. En DLLME la fase aceptora se dispersa en la dadora física, químicamente o mediante una fuente de energía externa (por ejemplo, ultrasonidos) con el fin de formar una nube de finas gotas de extractante que al aumentar enorme-

mente la superficie de contacto, reducen al mínimo el tiempo de extracción. Un disolvente adecuado para DLLME debe ser:

a) Inmiscible con agua,
b) Con buena afinidad por los analitos y
c) Baja presión de vapor

Además, teniendo en cuenta que el disolvente se recupera por centrifugación es deseable, aunque no imprescindible que sea más denso que el agua. De todo lo expuesto resulta evidente que los líquidos iónicos son muy adecuados para DLLME.

La primera vez que se propuso el empleo de IL en DLLME fue mediante el empleo de la dispersión física de $[C_4C_1Im][PF_6]$ que se consigue por inyección-aspiración-inyección repetidas veces del IL en la disolución acuosa. De esta forma se han propuesto procedimientos para la determinación de aminas aromáticas con factores de preconcentración en el intervalo de 30 a 270 [107].

Sin embargo, los resultados que se consiguen son mucho mejores si se recurre a la dispersión química, es decir a la mezcla del IL con un disolvente orgánico miscible tanto en agua como en el propio líquido iónico. Cuando se encuentran en proporciones adecuadas la inyección de esta mezcla en la fase acuosa provoca la rápida formación de una nube de microgotas como se aprecia en la Figura 5.14. Transcurrido un corto periodo de tiempo la dispersión se centrifuga y el líquido iónico se recoge del fondo del tubo como se puede apreciar en la Figura 5.15.

Esta estrategia se empleó en la determinación de pesticidas organofosforados [108], hidrocarburos policíclicos aromáticos [109] y bactericidas en muestras de agua [110], triazinas en miel [111] y pesticidas en frutas [112,113].

La fuerza iónica suele ser un problema en esta estrategia ya que se puede producir una reacción de intercambio entre el Cl^- del medio y el ión $[PF_6]^-$ del IL originando un líquido iónico, por ejemplo, $[C_6C_1Im][Cl]$ que sea soluble en agua. Este inconveniente ha sido aprovechado para el desarrollo de una nueva variante de DLLME denominada microextracción por formación in situ (ISFME) [114]. En este caso se ha propuesto el empleo de $[C_4C_1Im][Cl]$ y $LiNTf_2$ como reactivos solubles en disolución acuosa para originar

el IL de estructura $[C_4C_1Im][Tf_2N]$ insoluble incluso en medios muy salinos lo que permite la determinación de cadmio en agua de mar [115].

Además de la dispersión de la fase aceptora mediante procedimientos físicos o químicos también se puede recurrir al empleo de fuentes de energía externas. En este sentido se han desarrollado tres técnicas que comentaremos brevemente. La microextracción en fase líquida dispersa con líquidos iónicos controlada térmicamente (TILDLME) consta de dos etapas [116]. En la primera se añade el IL y se calienta a temperatura entre 45 y 90 °C para conseguir la solubilización del mismo. De esta forma se consigue un íntimo contacto entre fase aceptora y dadora. Seguidamente se enfría la disolución en baño de hielo de forma que el líquido iónico se separa de la disolución acuosa por disminución de su solubilidad. Tras centrifugar se consigue separar el IL como una fase homogénea. Con esta técnica se consiguen elevados valores de enriquecimiento, especialmente en sustancias polares, como pesticidas organoclorados [117], herbicidas [118] y bactericidas [119]. Desde el punto de vista de su aplicación a la determinación de especies inorgánicas se ha utilizado en la extracción de vanadio [120] y plomo [121].

Una variante de esta técnica donde la temperatura de incubación es menor se denomina microextracción por agregación inducida en frío (CIAM) [122] y se ha aplicado a la determinación de cobalto [123].

Finalmente, la aplicación de ultrasonidos también permite dispersar la fase aceptora. A esta técnica se le ha denominado microextracción líquido-líquido en fase dispersa asistida por ultrasonidos (USA-DLLME) [124]. La potencia de los ultrasonidos no es crítica [125] y se ha aplicado a la determinación de cadmio en aguas [126].

5.1.6.2.4. LOS LÍQUIDOS IÓNICOS EN MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La microextracción en fase sólida (SPME) [127,128] consiste en el reparto del analito entre la muestra y una fase extractante dispersa e inmovilizada en un soporte sólido y nació en un intento de ofrecer una técnica simple, libre de disolventes y relativamente

rápida que integrara en un solo paso el muestreo, aislamiento y preconcentración del analito además de su acoplamiento directo con las técnicas de detección [129].

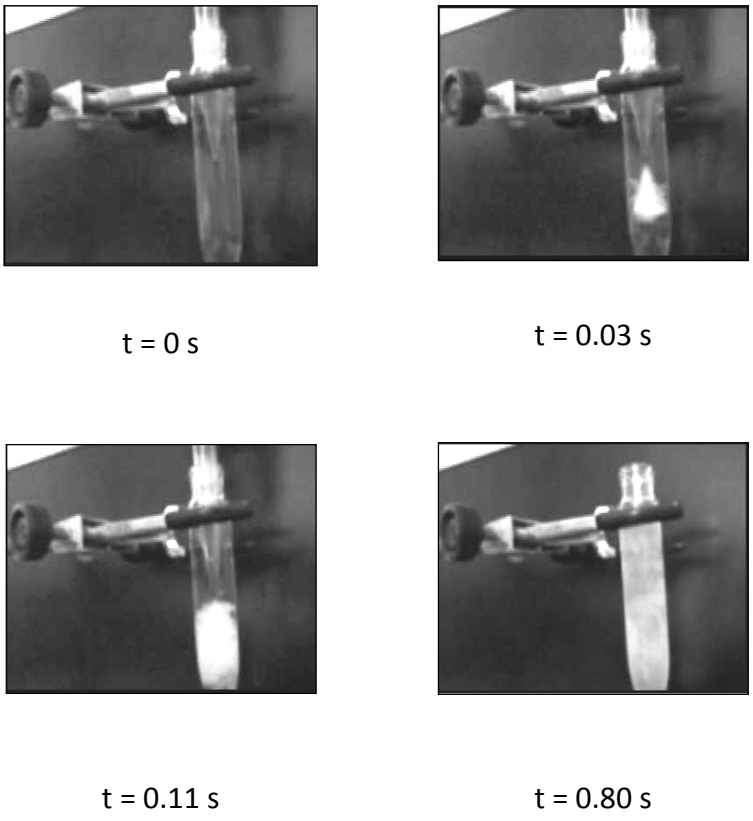


Figura 5.14. Fotogramas de la formación de una fase dispersa utilizando metanol y $[C_4C_1Im][PF_6]$.

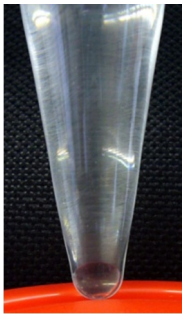


Figura 5.15: Fotografía de un tubo con la fase aceptora en el fondo tras centrifugar la dispersión en un proceso DLLME

La SPME clásica usa una fibra con un recubrimiento adsorbente adecuado como unidad de extracción. La fibra, integrada en un montaje del tipo jeringa permite el desarrollo de la extracción y su posterior desorción en un detector, por ejemplo GC. La Figura 5.16 muestra un esquema de la técnica. El recubrimiento ideal debe cumplir los siguientes requisitos:

a) Buena afinidad por el analito para alcanzar una elevada preconcentración,
b) Estabilidad térmica, especialmente cuando se requiere un tratamiento a elevada temperatura para forzar la desorción del analito,
c) Estabilidad química, especialmente en aquellos casos en donde la desorción se realiza por vía química,
d) Largo tiempo de uso,
e) Bajo efecto de memoria,
f) Reproducibilidad entre experimentos elevada y
g) Bajo precio.

Atendiendo a estas características, los líquidos iónicos pueden ofrecer interesantes alternativas. En este sentido se ha propuesto el empleo de $[C_8C_1Im][PF_6]$ como recubrimiento de una fibra de sílice fundido [21]. El recubrimiento es de naturaleza física, sin enlace covalente y se consigue por inmersión de la fibra de sílice fundida en una disolución del IL en diclorometano y posterior secado al aire. Este proceso se repite tres veces

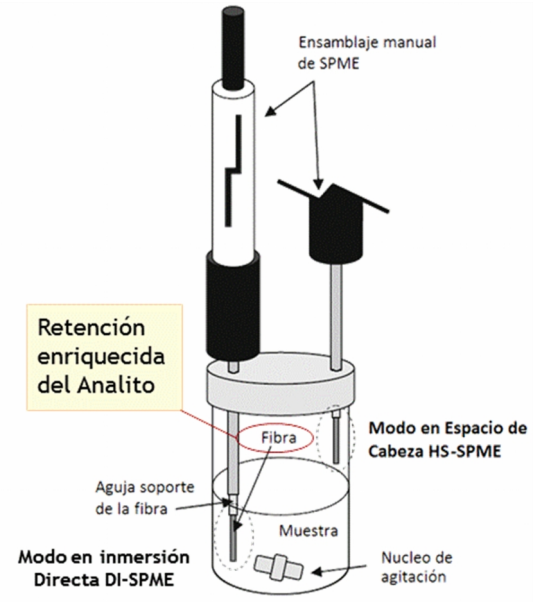


Figura 5.16: Diagrama esquemático de la microextracción en fase sólida en las modalidades de inmersión directa y espacio de cabeza.

con el fin de conseguir un recubrimiento de grosor adecuado. Las ventajas que se presentan para este tipo de recubrimientos son las siguientes:

a) Debido a su naturaleza líquida debe ser fácilmente eliminado con el empleo de disolventes,
b) Por el mismo motivo debe mostrar altos coeficientes de difusión que permitan alcanzar cinéticas de extracción elevadas y
c) Debido a su alta viscosidad, los ILs cubren fácilmente la fibra.

Sin embargo, puesto que la interacción entre el soporte y el recubrimiento es de tipo físico, el grosor de la capa aceptora nunca es muy grande y por tanto su capacidad de retención es baja. Para mejorar este aspecto se ha propuesto el empleo de membranas de nafion, fluoropolímero con grupos sulfonato, como recubrimiento interno [130] que merced a la interacción de los grupos aniónicos con los cationes imidazolio se consigue un mayor espesor en el recubrimiento. Otros autores recomiendan el empleo de elastómeros para mejorar la consistencia del recubrimiento que actúan a su vez recubriendo al IL [131].

Todas las opciones mencionadas se basan en la combinación de una fase aceptora líquido en un soporte sólido, LPME-SPME, con sus ventajas y también sus evidentes inconvenientes. Un cambio sustancial en cuanto a estabilidad y consistencia del material absorbente se consigue empleando líquidos iónicos poliméricos (PIL) [132]. El recubrimiento se consigue de forma similar, es decir, tras repetidos procesos de inmersión y secado en una disolución de PIL en un disolvente orgánico.

Es posible enlazar de forma covalente el IL al soporte de sílice fundido mediante la derivatización del IL con un reactivo adecuado. El recubrimiento tiene unas características físicas excelentes, el IL pierde su estado líquido, pero sus propiedades más interesantes (presión de vapor, estabilidad térmica y afinidad) permanecen inalteradas [133].

5.1.7. OBSERVACIONES FINALES

Debido al hecho de que la mayoría de las etapas previas del proceso analítico se basan en el uso de disolventes, cualquier contribución que permita reducir al mínimo o

evitar el empleo de disolventes convencionales poco aconsejable desde el punto de vista medioambiental debe ser bienvenida. Tal es el caso de los líquidos iónicos que, desde hace dos hace décadas, han abierto nuevas perspectivas y enfoques prometedores en este campo [134].

Las principales ventajas de los líquidos iónicos como disolventes en comparación con los tradicionales pueden explicarse por sus propiedades únicas ya comentadas. Sin embargo, en la actualidad hay varios inconvenientes que limitan su utilización en Química Analítica y los más relevantes son los siguientes:

a) Higroscopicidad, se puede producir la hidrólisis de los componentes
b) Las impurezas, restos de otros compuestos (por ejemplo agua) que modifican sus propiedades
c) Inestabilidad, derivada de la descomposición del IL por calentamiento, ultrasonidos o energía de microondas, con frecuencia utilizados en la preparación de la muestra,
d) Alteración de la estructura de los analitos disueltos (por ejemplo, biomoléculas), y
e) Toxicidad, a pesar de la reputación de los IL como disolventes verdes, estudios recientes evidencian que puede existir toxicidad relativa de alguno de ellos [135].

5.2. IMPORTANCIA DE LOS ELEMENTOS TRAZA EN LOS ALIMENTOS

Los alimentos y las bebidas son el camino de entrada al organismo de elementos minoritarios o trazas de bajo valor nutricional o incluso tóxicos. De los aproximadamente 90 elementos minerales que aparecen de forma natural en el medioambiente solamente la tercera parte se cree que puede ser esencial para la vida [136].

El cuerpo humano en su conjunto está formado por seis elementos mayoritarios: oxígeno, carbono, hidrógeno, nitrógeno calcio y fósforo; y seis elementos minoritarios: azufre, potasio, sodio, cloro, magnesio y silicio. Todos juntos suman el 98.9 % del peso total del cuerpo humano (Tabla 5.8) [137]. Si quitamos los seis gases nobles, que debido a su baja reactividad es posible que tengan poca relevancia en la vida, nos quedan 71

elementos que se presentan en los seres vivos en muy baja concentración y que se denominan “elementos traza”.

La concentración de los elementos mayoritarios y minoritarios en los tejidos de los seres vivos se puede expresar en g kg^{-1}, mientras que los elementos traza estarán en el intervalo de 0.01 a 100 mg kg^{-1} (Tabla 5.9). Aunque existe una gran tendencia a clasificarlos entre tóxicos y esenciales, quizás no sea adecuado ya que el comportamiento tóxico de un elemento depende en ocasiones de la concentración a la que se encuentra presente. Diremos que un elemento es esencial cuando si al disminuir su concentración por debajo de niveles “adecuados y seguros” se produce una empeoramiento de la función fisiológica [138,139].

Tabla 5.8: Concentraciones de los elementos mayoritarios y minoritarios en el cuerpo humano

Elemento mayoritario	Porcentaje (%)	Elementos minoritario	Porcentaje (%)
O	61	S	0.2
C	23	K	0.2
H	10	Na	1.4
N	2.6	Cl	1.2
Ca	1.4	Mg	0.03
P	1.1	Si	0.03

Tabla 5.9: Intervalo de concentraciones de elementos traza En el cuerpo humano

Elemento	mg kg^{-1}
Fe, F, Zn	100.0
Rb, Sr, Cu, Pb, Br	10.0
Sn, Sc, Cd, Mn, Ba, Al	1.0
Cs, Co, Cr, Mo, Au, Ni	0.1

De lo expuesto se deduce que una clasificación lógica sería denominar esenciales a aquellos de los 71 elementos comentados de los que se conoce su función beneficiosa, dejando fuera de este grupo a aquellos de los que en la actualidad no se dispone de suficiente información al respecto. Esta clasificación queda por tanto abierta a que en un futuro se incluyan en el grupo de esenciales aquellos elementos de los que se pruebe su esencialidad.

En los últimos años hay un interés creciente en investigar el papel de los elementos traza en los sistemas biológicos. En este sentido se sabe desde hace mucho tiempo que el desarrollo de algunos procesos esenciales para la vida dependen de la presencia de un elemento traza, siendo por tanto indispensables para el crecimiento y persistencia de la vida humana y animal.

Así por ejemplo se sabe que Cr, Fe, Co, Cu, Zn, Se, Mo y I son elementos traza esenciales, mientras que Mn, Si, Ni, B, V y Sn son probablemente elementos traza esenciales. Otros como F, As, Cd, Pb, Al y Hg, considerados como potencialmente tóxicos, pueden ser esenciales para la vida. La toxicidad de un elemento traza depende en fin de si se ingiere en cantidades elevadas durante un periodo de tiempo suficientemente alto. La Figura 5.15 recoge una clasificación de los elementos traza en cuatro grupos dependiendo de su esencialidad.

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra																

Elemento mayoritario esencial
Elemento traza esencial
Elemento traza posiblemente esencial
Elemento traza potencialmente tóxico, en ocasiones posiblemente esencial

Figura 5.15: Clasificación actual sobre la esencialidad de los elementos.

El ser humano requiere entre 0.05 y 20 µg dia^{-1} de elementos traza esenciales, su presencia resulta vital para el crecimiento del organismo o para que complete si ciclo vital y no puede ser sustituido por otro elemento. La biodisponibilidad de los elementos esenciales depende de su forma química, la composición de la dieta y el estado de salud del individuo. Por tanto se comprende que no resulta fácil establecer las necesidades diarias de estos elementos [140].Se pueden distinguir varias etapas en función de la concentración de elementos traza que van desde la total deficiencia, lo que provoca la muerte, pasando por una ingesta limitada donde el organismo sobrevive, pero puede

mostrar una insuficiencia marginal. A concentraciones superiores se aprecia una meseta donde se alcanza la máxima funcionalidad. Al aumentar aún más la concentración empieza a aparecer una toxicidad marginal hasta hacerse mortal si aumenta aún más su concentración.

El descubrimiento de los elementos traza esenciales ha sido recopilado por Schrauzer [141]. En este sentido hasta principios del siglo XX únicamente dos elementos se consideraban esenciales. Hierro, por su efecto para corregir la anemia y el iodo porque su insuficiencia se relacionó con el bocio. En el siglo XX se experimentó el gran desarrollo. Podemos distinguir dos grandes periodos. Durante el primero, que va desde 1925 a 1956, se aceptaron como esenciales Cu, Zn, Co, Mn y Mo. En el segundo, 1957-1980, se incluyó también Se, Cr, Sn, V, F, Si, Ni, Pb, Cd, As y más recientemente Li. La Tabla 5.10 muestra la funcionalidad de estos elementos.

La influencia de estos elementos en la salud humana y los métodos analíticos adecuados para su determinación en distintos tipos de alimentos están siendo contínuamente revisados [142]. En este capítulo nos hemos centrado en el desarrollo de procedimientos sensibles para la determinación de cobalto y níquel. Cobalto está considerado como un elemento esencial, ampliamente distribuido en el cuerpo humano sin acumulación selectiva en ninguna parte, aunque las mayores concentraciones se dan el el hígado, los riñones y los huesos. El contenido total de cobalto en una persona de 70 kg se estima que es de 1 mg [143]. Su principal actividad se encuentra en la vitamina B_{12}, aunque también contribuye a la formación de las células rojas de la sangre. Como aparece en multitud de alimentos resulta fácilmente asequible [144]. Casi cualquier dieta permite la ingesta de entre 15 y 60 µg d^{-1}. La Tabla 5.11 muestra los contenidos de Co encontrados en varios tipos de plantas [145]. La mayor parte de la ingesta de cobalto por el ser humano es de naturaleza inorgánica, mientras que la vitamina B_{12} representa solamente una pequeña fracción. La Tabla 5.12 muestra los contenidos promedio de vitamina B_{12} en alimentos [146].

Tabla 5.10: Funciones de los elementos esenciales

Elemento	Principal función en el cuerpo humano
Calcio	Principal constituyente de los huesos y los dientes: interviene en la contracción y relajación muscular, la función nerviosa, la coagulación de la sangre, presión sanguínea.
Fósforo	Componente de todas las células, participa en la regulación del pH
Magnesio	Participa en la mineralización de los huesos, síntesis de proteínas, acción enzimática, contracción muscular y transmisión nerviosa
Sodio	Ayuda a mantener la fuerza iónica de los fluidos corporales
Cloro	Parte de la acidez del estómago, necesario para hacer correctamente la digestión
Potasio	Facilita el transcurso de muchas reacciones incluyendo la síntesis de proteínas, transmisión nerviosa y contracción muscular
Azufre	Componente de ciertos aminoácidos, biotina, tiamina e insulina
Iodo	Parte de la tirosina que regula el metabolismo
Hierro	Formación de la hemoglobina, parte de la mioglobina, utilización de energía
Zinc	Parte de algunos enzimas; presente en la insulina; participa en la fabricación de material genético y proteínas; sistema inmunitario; transporte de vitamina A, sentido del sabor, cicatrización de heridas; fabricación de esperma, desarrollo del feto
Cobre	Absorción de hierro, parte de algunos enzimas
Fluor	Formación de huesos y dientes
Selenio	Ayuda a prevenir la oxidación del cuerpo humano
Cromo	Se asocia a la insulina y se necesita para regular la liberación de energía de la glucosa
Molibdeno	Facilita funciones de los enzimas y algunos procesos celulares
Manganeso	Facilita funciones de los enzimas y algunos procesos celulares
Cobalto	Parte de la vitamina B1 involucrada en la función nerviosa y formación de sangre
Vanadio	Controla la bomba de sodio, inhibe ATP-asa
Níquel	Constituyente de la ureasa, reduce la hemopoyesis
Cadmio	Estimula la elongación Betois en los ribosomas
Estaño	Interacciona con la riboflavina
Plomo	Tierne efectos en algunos enzimas
Litio	Controla la bomba de sodio
Silicio	Juega un papel estructural en la conectividad entre los tejidos y las células osteogénicas
Arsénico	Incrementa arginina, urea y ornitina, participa en el metabolismo de los compuestos metilados
Boro	Controla la función de la membrana, participa en la biosíntesis de los ácidos nucleicos y lignina

Tabla 5.11: Cobalto en plantas de distintos paises, ng g^{-1}

Planta	Intervalo	Media
Granos de trigo (Noruega)	1.5-14	4.7
Granos de trigo (Suecia)	1.1-18	4.5
Granos de trigo (Australia)	13-231	82
Granos de trigo (Egipto)	160-380	270
Granos de cebada	4.4-44	18
Granos de avena	10-300	96
Hojas de lechuga	100-160	-
Zanahoria	37-120	-
Cebolla	28-80	-
Tomate	20-62	-
Pepino	87-170	
Patatas	36-160	
Manzana	8-16	
Naranja	19-45	

Tabla 5.12: Contenidos de vitamina B_{12} en algunos alimentos

Alimento	$[B_{12}]$, ng g^{-1}
Carne de hígado	400
Carne de riñón	200
Carne de cerdo (corazón)	170
Arenque	140
Caballa	50
Leche de vaca	25
Carne de vaca	25
Queso	10
Huevos enteros	4

Aunque la ingesta diaria de Co se ha estimado en 11 µg d^{-1} [147], en algunos países como E.E.U.U. se han determinado ingestas entre 493 y 1489 µg d^{-1} sin registrar episodios peligrosos para la salud. Durante la década de 1960 se introdujo el empleo de sulfato de cobalto para estabilizar la espuma de la cerveza en Bélgica, E.E.U.U. y Canadá en concentraciones de 0.8 a 1.6 µg mL^{-1} debido a las quejas de los clientes. Este hecho provocó importantes problemas cardíacos a los grandes consumidores (10 L d^{-1}) y esa práctica fue rápidamente abandonada. Más tarde se pudo comprobar que la pequeña cantidad de espuma era consecuencia de un inadecuado enjuage de los vasos y que por tanto presentaban restos de detergente [148].

Por su parte el níquel es un elemento considerado probablemente esencial. Se sabe que está presente en cuatro enzimas habituales en plantas y microorganismos: ureasa, hidrogenasa, reductasa del metilcoenzima M y deshidrogenasa del monóxido de carbono [23,24]. Su deficiencia está ligada a estados de bajo crecimiento y depresión de la hematopoyesis. Las concentraciones de níquel en suero sanguíneo son inferiores a 1 µg L^{-1}. El níquel se ingiere principalmente a partir de pan, cereales y bebidas, lo que supone aproximadamente 150 µg d^{-1} [149,150]. La Tabla 5.13 muestra la ingesta diaria de este elemento en personas no expuestas a problemas de contaminación ambiental. Como puede apreciarse el agua es la segunda fuente de entrada de níquel al organismo.

Tabla 5.13: Niveles de ingesta diaria de níquel en humanos por distintas vías [151]		
Tipo de exposición	Ingesta, mg d^{-1}	Absorción, mg
Productos alimenticios	<0.3	0.045 (<15%)
Agua de bebida	<0.02	0.003 (<15%)
Aire respirado (ambiente urbano)	<0.0008	0.0004 (50%)
Aire respirado (fumador)	<0.023	0.012 (50%)

Experimentos realizados con animales a los que se adiministró una dosis diaria equivalente a 600 µg d^{-1} para los seres humanos, mostraron síntomas de toxicidad por alteraciones epidérmicas.

La Tabla 5.14 muestra los contenidos de Ni encontrados en varios tipos de plantas [145].

Tabla 5.14: Níquel en plantas de distintos paises, µg g^{-1}		
Planta	Intervalo	Media
Granos de trigo	0.17-0.67	0.34
Granos de cebada	0.10-0.67	0.41
Granos de avena	0.2-8.0	1.28
Guisantes y habas	0.2-0.25	-
Hojas de lechuga	0.6-3.3	1.03
Zanahoria	0.26-0.98	-
Hojas de lechuga	0.59-0.4	-
Tomate	0.43-0.48	-
Pepino	1.3-2.0	-
Patatas	0.29-1.0	-
Manzana	-	0.06
Naranja	-	0.39
Avellana	1.6-1.7	-
Cacao en polvo	5-10	-

Las concentraciones de cobalto y níquel son tan bajas que no resulta posible su determinación con el empleo de FAAS. Es preciso recurrir a técnicas más sensibles como ETAAS e ICP-MS.

Los alimentos, dejando aparte el agua y el aire, suponen la mayor parte de la ingesta diaria de elementos traza por el ser humano. Si tenemos en cuenta, que como consecuencia del desarrollo industrial, la contaminación ambiental ha crecido considerablemente, existe una preocupación bastante fundamentada sobre que esta contaminación

se traslade a los alimentos. En efecto, la contaminación del suelo y el agua, el empleo de productos químicos de forma generalizada, aerosoles, conservantes, aditivos y envasado de alimentos pueden tener un efecto adverso en la calidad de los alimentos. Por tanto es imprescindible disponer de medios eficaces para controlar continuamente los niveles de los contaminantes en los distintos productos alimenticios. Por otra parte el control de la ingesta de elementos traza en la dieta permite explicar situaciones de salud pública en grupos de individuos.

5.3. MÉTODOS DE PRECONCENTRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE COBALTO Y NÍQUEL

Como ya hemos comentado a lo largo de esta Memoria, la extraccción líquido-líquido, basada en la transferencia de analito desde una fase acuosa a un disolvente invisidble con ella, es una técnica ampliamente utilizada. Sin embargo, algunos inconvenientes como la formación de emulsiones, empleo de grandes volúmenes de muestra y disolventes orgánicos tóxicos y generación de grandes cantidades de contaminantes, hacen que esta técnica sea cara, lenta y poco amigable con el medioambiente.

La miniaturización de esta técnica cambia completamente el panorama. En este sentido se han desarrollado multitud de variantes que hemos ido comentando a lo largo de esta Memoria. La Tabla 5.15 muestra algunos procedimientos desarrollados para la determinación de cobalto y níquel en diversos tipos de muestra empleando SDME, HF-LPME y DLLME [152].

Como puede apreciarse, casi todos los procedimientos recurren a la combinación DLLME-ETAAS ya que con ella se consiguen muy bajos límites de detección con una instrumentación relativamente sencilla.

La extracción de quelatos metálicos con líquidos iónicos ha sido revisada recientemente [153-156]. Como ya hemos comentado, también los líquidos iónicos pueden ser utilizados a fines de microextracción. En este sentido se han publicado algunos artículos

que abordan la determinación de cobalto y níquel y que aparecen recogidos en la Tabla 5.16.

Tabla 5.15: Algunos procedimientos propuestos para la microextracción de Co y Ni con disolventes orgánicos.

Elemento	Técnica	Extracción	TE,[a] min	FE[b]	LOD, ng L^{-1}	RSD, %	Ref.
Co	CFME-LTETV-ICP-MS	Benzoilactina-Benceno	10	215	0.56	14	[157]
	Microextracción en flujo cerrado-LTETV-ICP-MS	Benzoilactina-Benceno	10	125	0.99	14	[157]
	DLLME-FO-LADS	1,2-Diclorobenceno/etanol	<3	165	200	<4	[158]
	DLLME-UV-VIS	Cloroformo/etanol	<3	125	500	2.5	[159]
	DLLME-ETAAS	Tetraclorometano/acetona	<3	101	21	7.5	[160]
	DLLME-FAAS	Cl_4C/metanol	<3	16	900	3.5	[161]
	DLLME-FAAS	Ácido decanoico	5	58	4200	2.1	[162]
Co, Ni	DLLME-ETAAS	Tetraclorometano/acetona	<3	200	33	8.2	[160]
	SFODME–ETAAS	Undecanol	30	500	0.3	4	[163]
	DLLME-ETAAS		<3	150	25	7.8	[160]

[a] Tiempo de extracción
[b] Factor de enriquecimiento
CFME-LTETV-ICP-MS: continuous-flow microextraction with low-temperature electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-mass spectrometry
DLLME-FO-LADS: dispersive liquid–liquid microextraction with fiber optic-linear array detection spectrophotometry
DLLME-UV-VIS: dispersive liquid–liquid microextraction with ultraviolet-visible spectrometry
DLLME-ETAAS: dispersive liquid–liquid microextraction with electrothermal atomic absorption spectrometry
SFODME–ETAAS: solidified floating organic drop microextraction with electrothermal atomic absorption spectrometry

Tabla 5.16: Algunos procedimientos propuestos para la microextracción de Co y Ni con líquidos iónicos.

Elemento	Técnica	Extracción	TE,[a] min	FE[b]	LOD, ng L^{-1}	RSD, %	Ref.
Co	DLLME-ETAAS	Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil imidazolio	7	120	3.8	3.4	[164]
	DLLME-ETAAS	Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil imidazolio	5	60	700	2.4	[46]
	DLLME-ETAAS	Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil imidazolio	5	118	100	2.9	[165]
	HF-LPME-ETAAS	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio	15	120	40	4.5	[166]
Ni	DLLME-ETAAS	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio	-	100	5	5.6	[167]
	HF-LPME-ETAAS	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio	15	60	30	4.2	[104]

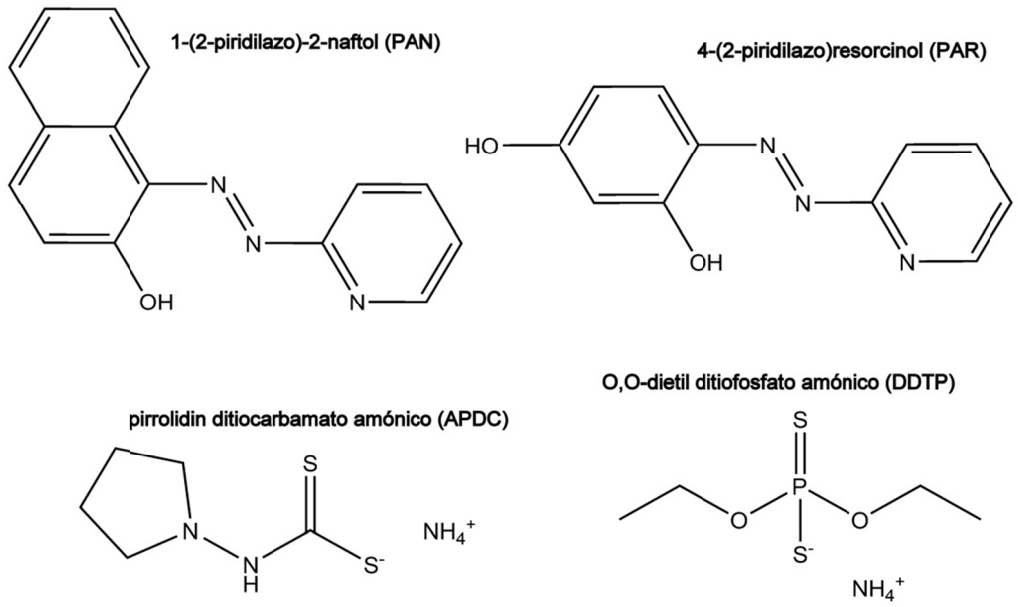
[a] Tiempo de extracción
[b] Factor de enriquecimiento
DLLME-ETAAS: dispersive liquid–liquid microextraction with electrothermal atomic absorption spectrometry
HF-LPME: Hollow fiber based-liquid phase microextraction

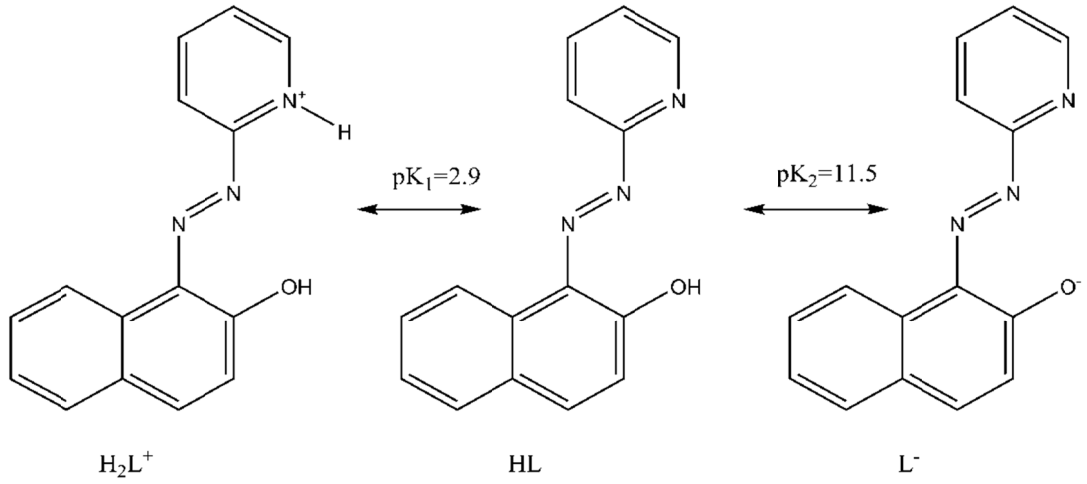
Para conseguir la transferencia de un ión metálico desde una disolución acuosa a una fase orgánica o líquido iónico es preciso formar previamente un compuesto neutro. Una alternativa eficaz es el empleo de agentes quelatantes que originan compuestos neutros estables solubles en las fase aceptoras. La Figura 5.16 muestra los ligandos seleccionados en este trabajo para la formación de complejos neutros con Co(II) y Ni(II).

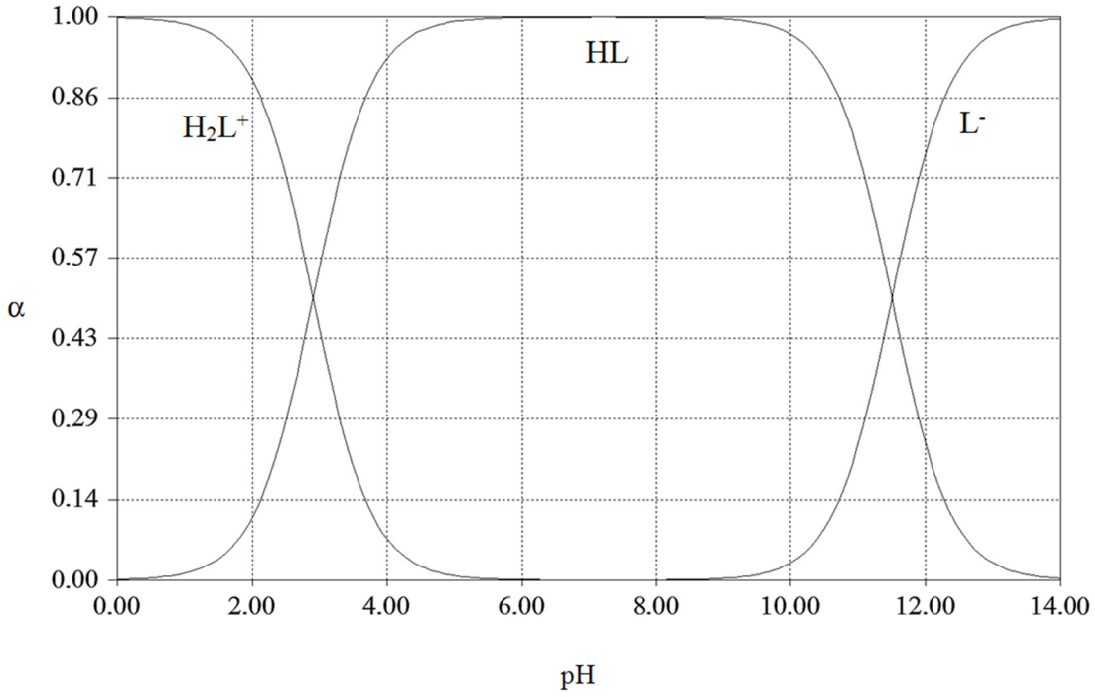
Aunque los cuatro ligandos estudiados son conocidos por su formación de compuestos de cobalto extraíbles en fase orgánica, no todos resultaron adecuados para un sistema DLLME. De todos los experimentos realizados con estos ligandos encontramos los mejores resultados con el empleo de 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN). Es difícil predecir la validez de un ligando ya que son muchos los factores que influyen en que la transferencia del analito desde la fase acuosa dadora hasta la fase acuosa aceptora sea eficaz.

PAN muestra un equilibrio ácido base como el que aparece en la Figura 5.17. Los valores de pK_a en disolución acuosa, extrapolados de una mezcla dioxano:agua son de 2.9 y 11.5, lo que conduce a una gráfica de predominancia de formas como la que se observa en la Figura 5.18.

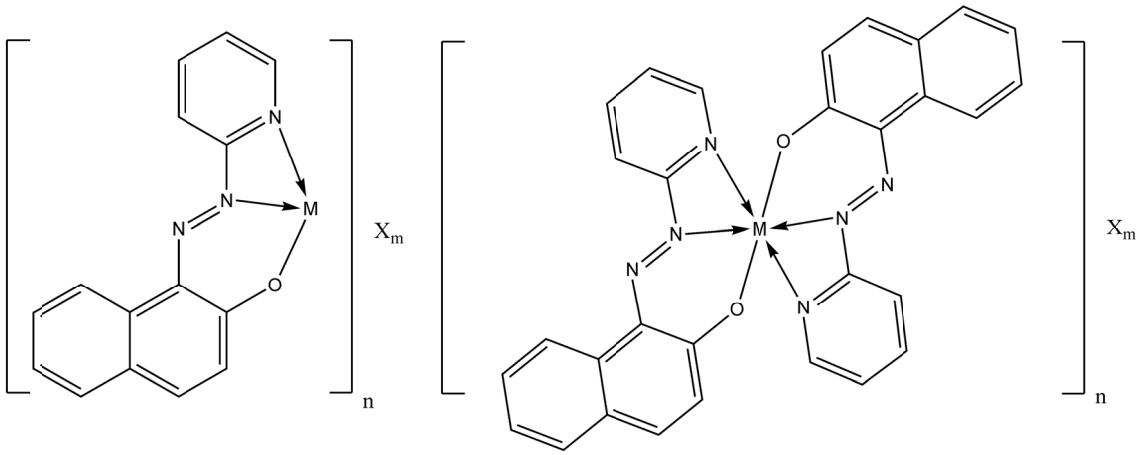
Nótese que la forma neutra es mayoritaria entre pH 3 y 11. En este intervalo de pH







es donde PAN forma la mayor parte de complejos con diversos iones metálicos. La estructura de estos complejos es el tipo 1:1 o 1:2 (metal:ligando) dependiendo del medio y del pH. En el caso de Co(II) se ha descrito [168,169] una estructura 1:1 y en el caso de Ni(II) se han descrito estructuras 1:1 y 1:2. La Figura 5.19 muestra las estructuras propuestas para estas estequiometrías. La mayoría de los autores [170, 168] coinciden en que n=1 y m=1 ó 0, siendo X un anión univalente como cloruro o acetato.



5.4. MICROEXTRACCIÓN DE Co(II) Y Ni(II) POR FORMACIÓN DE COMPLEJOS NEUTROS CON PAN EN UN LÍQUIDO IÓNICO FORMADO IN SITU

5.4.1. INTRODUCCIÓN

Generalmente se consideran metales pesados a aquellos cuya densidad es superior a 5 g cm^{-3} y representan algunos de los contaminantes más tóxicos para el medio ambiente. Debido a su naturaleza no biodegradable, alta solubilidad en agua y potencial para acumularse en diferentes partes del cuerpo humano tienen efectos secundarios graves para la salud [171]. Se les atribuyen propiedades cancerígenas [172], y también se sabe que pueden dañar el hígado, los nervios y los huesos e interfieren asimismo con el funcionamiento normal de los diversos metaloenzimas [173]. La presencia de metales pesados contaminantes en las aguas residuales de las industrias, la ineficacia de las técnicas de manejo de residuos y las fugas de desechos peligrosos, tienen un impacto enorme en la calidad de las aguas subterráneas, el suelo y los ecosistemas asociados [174].

Se sabe que cobalto y níquel pueden ser esenciales o tóxicos, dependiendo de los niveles, para los procesos metabólicos de los seres humanos, animales y plantas [175]. Los

alimentos y el agua potable son las principales fuentes de exposición al cobalto para la población general. El cobalto está presente en las aguas residuales de las plantas de energía nuclear y muchas otras industrias tales como galvanoplastia, pinturas, pigmentos y electrónica [176]. Los efectos toxicológicos debidos a niveles elevados de cobalto en humanos y animales incluyen vasodilatación, enrojecimiento y cardiomiopatía [177]. El níquel es un elemento moderadamente tóxico comparado con otros metales de transición. Sin embargo, se sabe que la inhalación de níquel y sus compuestos puede conducir a serios problemas de salud, incluyendo el cáncer [178]. Otros estudios [179] demuestran que el consumo de bebidas con elevados contenidos de níquel provoca enfermedades en los seres humanos. La Agencia de Protección Ambiental de los E.E.U.U. (EPA) ha establecido un límite para el contenido de cobalto y níquel en agua potable de 2 y 100 µg L^{-1}, respectivamente [180,181]. Los métodos instrumentales, como la espectrofotometría (UV-VIS), la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS) [182], la espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (ETAAS) [183,184] y espectrometría de emisión óptica por plasma de acoplamiento inducido (ICP-OES) [185,186], habituales para la determinación de trazas de iones metálicos, no resultan apropiados en muchos casos prácticos debido a los bajos niveles de concentración de los analitos y las matrices complejas en las que se encuentran [187].

Para resolver estos problemas es preciso incluir en el análisis una etapa de separación/preconcentración. La extracción convencional líquido-líquido (LLE), como técnica de pretratamiento de la muestra, es muy utilizada en los análisis de rutina para la determinación de trazas de metal debido a su simplicidad y adaptabilidad. Sin embargo, como se ha indicado repetidas veces a lo largo de esta Memoria, esta metodología presenta algunas deficiencias. Por este motivo, como ya ha sido también comentado se han desarrollado recientemente varias técnicas de microextracción como la microextracción en una sola gota (SDME) [84], extracción en punto de nube (CPE) [188], extracción homogénea líquido-líquido (HLLE) [189], microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) [161], microextracción en gota flotante sólida (SFODME) [163], etc.

Dentro de este contexto, el uso de líquidos iónicos como disolventes en la preparación de la muestra resulta de evidente interés, debido a las propiedades discutidas

[135]. Aunque la LLE clásica basada en líquidos iónicos ya ha sido utilizada anteriormente [33,35,190], el procedimiento resulta caro ya que los volúmenes de IL consumidos son elevados y el precio de los mismos es superior al de los disolventes orgánicos. Además, debido a la viscosidad relativamente alta de los líquidos iónicos, la velocidad de transferencia de masa en el IL es notablemente más baja [191].

Los líquidos iónicos se han utilizado como disolvente extractante en diversas técnicas de microextracción líquido-líquido tales como SDME [89,92,192], microextracción en agregados inducidos por frio (CIAME) [122,123], microextracción por formación in situ del disolvente (ISFME) [193], y DLLME [126,159,194].

La DLLME, ya sea convencional o basada en el empleo de líquidos iónicos, es una técnica de microextracción muy aceptada. La DLLME presenta varios rasgos distintivos: rápida de ejecución, no necesita elevadas cantidades de extractante, elevadas recuperaciones de analito, económica en el tiempo y el costo y fácilmente vinculable a muchos métodos analíticos de detección. En comparación con la DLLME convencional, en la DLLME con líquidos iónicos se evita el uso de disolventes tóxicos (tales como hidrocarburos clorados). Esta técnica se ha utilizado tanto para la determinación de compuestos orgánicos como inorgánicos. Sin embargo, su rendimiento disminuye significativamente en presencia de altas concentraciones de sal. En efecto, cuando la fuerza iónica de la disolución acuosa aumenta también lo hace la solubilidad de los líquidos iónicos. Por lo tanto, el volumen final de la fase extractante depende mucho de la concentración de sal de la muestra. Por otra parte, al aumentar aún más la concentración de sal, los líquidos iónicos se disuelven por completo y la dispersión no se forma, suponiendo esto una limitación de la técnica.

En este trabajo, hemos introducido una nueva técnica basada en DLLME en la que se consigue la máxima dispersión por formación in situ del líquido iónico. La técnica es también robusta ya que tolera un alto contenido de sal y se ha aplicado a la preconcentración de cobalto y níquel en muestras de agua y bebidas. En esta técnica se añaden a la fase dadora los componentes catiónico y aniónico de un líquido iónico por separado de forma que al encontrarse en disolución forman el líquido iónico (fase extractante). El exceso de iones del mismo que quedan en fase acuosa evita la solubilización del líquido

iónico al aumentar la fuerza iónica de la disolución (ión común). En este trabajo hemos utilizado cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio ([C8MIm]Cl) y bis(trifluorometilsulfonil)imida de litio ([NTf2]Li), precursores de bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metilimidazolio ([C8MIm][NTf2]). El procedimiento general de este método es similar al de cualquier DLLME convencional. Al formarse el líquido iónico se produce la extracción de los compuestos neutros de Co(II) y Ni(II) con PAN [195]. Tras centrifugar se retira el líquido iónico con jeringa cromatográfica y se lleva al detector de ETAAS para la determinación.

5.4.2. PARTE EXPERIMENTAL

5.4.2.1. INSTRUMENTACIÓN

Se ha utilizado un espectrómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer modelo 800 (Perkin-Elmer, Shelton, USA) como el que se muestra en la Figura 1.7 equipado con un sistema de corrección de absorción de fondo basado en el efecto Zeeman. El equipo consta además de un atomizador para tubos de grafito de calentamiento transversal (THGA) y un automuestrador modelo AS-800. Los tubos de grafito pirolítico utilizados disponían de plataformas de L'Vov y se compraron directamente al fabricante del equipo (referencia B050-4033). Se utilizó gas argón como gas inerte a un flujo constante de 250 mL min^{-1} en todas las etapas del programa de calentamiento, excepto durante la de atomización, en la que se cortó el flujo de gas interno. Las medidas se realizaron utilizando lámparas de cátodo hueco de cobalto y níquel (Cathodeon, UK) como fuente de radiación. Los parámetros instrumentales aparecen resumidos en la Tabla 5.17.

5. 4.2.2. REACTIVOS

Todas las disoluciones se prepararon con agua pura (18 MΩ cm) obtenida con un sistema Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA). Para reducir el peligro de contaminación se utilizó material de vidrio y plástico (polipropileno) lavado con ácido nítrico al 1 % v/v y enjuagado con agua antes de su empleo. Para realizar el proceso DLLME se utilizaron tubos de vidrio, ya que la adherencia del líquido iónico es menor en este material. Las disoluciones estándar (1000 µg mL^{-1}) de cobalto (II) y níquel (II) se prepararon a partir de $Co(NO_3)_2$ y $Ni(NO_3)_2$ (Fluka, Buchs SG, Switzerland), respectivamente en agua pura. Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de las disoluciones estándar por dilución adecuada. La disolución de 1-(2-piridilazo) 2-naftol (PAN) se preparó al 0.2 % m/v a partir de la cantidad apropiada del compuesto disuelta en metanol (Sigma). El resto de los productos químicos utilizados fueron de Fluka. Para la determinación de cobalto y níquel por ETAAS se utilizó una disolución de 4000 µg mL^{-1} de paladio (nitrato) como modificador químico. Las disoluciones 0.1 mol L^{-1} en agua de los líquidos iónicos precursores: cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio ($[C_8MIm]Cl$) y bis(trifluorometilsulfonil)imida de litio ($[NTf_2]Li$), se prepararon a partir de los correspondientes productos obtenidos de IOLITEC (Heilbronn, Germany). Para ello se pesaron 1.15 y 1.43 g, respectivamente, que se disolvieron en 50.0 mL agua pura. El líquido iónico bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metilimidazolio ($[C_8MIm][NTf_2]$) se obtuvo también de IOLITEC y se utilizó con fines de comparación. Como agente antiadherente se preparó una disolución acuosa 0.2 mol L^{-1} a partir de (1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilen glicol (Triton X-114) obtenido de Sigma que fue utilizado. Para la separación de Co(II) y Ni(II) de la matriz de la cerveza se han utilizado cartuchos de fase sólida de intercambio iónico DSC-SCX (Supelco).

Tabla 5.17: Parámetros instrumentales recomendados para la determinación de cobalto y níquel

Parámetro			
Corriente de la lámpara, mA	30 (Co); 25 (Ni)		
Longitud de onda, nm	242.5 (Co); 232.0 (Ni)		
Rendija, nm	0.2		
Tipo de atomizador	Tubo de grafito pirolítico con plataforma de L'Vov insertada		
Volumen inyectado, µL	30		
Modificador químico	Pd(II) 4000 µg ml^{-1}		
Corrección de fondo	Zeeman		
Programa de calentamiento			
Etapa	Temperatura, °C	Rampa, s	Mantenido, s
1: Secado	120	5	30
2: Secado	350	15	30
2: Calcinación	600	10	20
3: Atomizacion[a,b]	2400	0	5
4: Limpieza	2600	1	5
Secuencia:			
Paso A: Inyectar modificador y ejecutar la etapa 1			
Paso B: Inyectar la muestra y ejecutar las etapas 1 a 4.			

[a] Flujo de gas detenido; [b] Etapa de lectura de señal.

5.4.2.3. PROCEDIMIENTO PARA LA DETERMINACIÓN DE Co Y Ni

En un tubo de vidrio de 15 mL se colocan 10 mL de una disolución acuosa conteniendo Co(II) y Ni(II) entre 0.01 y 0.3 µg L^{-1}. Se añade 200 µL de reguladora $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ 1 M y 100 µL de disolución de PAN al 0.2 % m/v. En estas condiciones se complejan ambas especies. A continuación se añaden 150 µL de $[C_8MIm]Cl$ 1 mol L^{-1} y 100 µL de una disolución 0.2 mol L^{-1} de Triton X-114. Tras homogenizar se añaden 100 µL de $[NTf_2]Li$ 1 mol L^{-1}. La dispersión se forma instantáneamente como se puede apreciar en la Figura 5.20. La mezcla se centrifuga durante 5 min a 4000 rpm. Con esto se consigue la sedimentación del IL en el fondo del tubo (35 ± 1 µL). Con una jeringa de tipo cromatográfico se toman 30 µL que se llevan al tubo de grafito del detector, aplicándose el programa de calentamiento que aparece en la Tabla 5.17. De esta forma se determina una de las especies. Para determinar la otra es preciso hacer una segunda extracción o bien reducir el volumen de inyección a 15 µL.

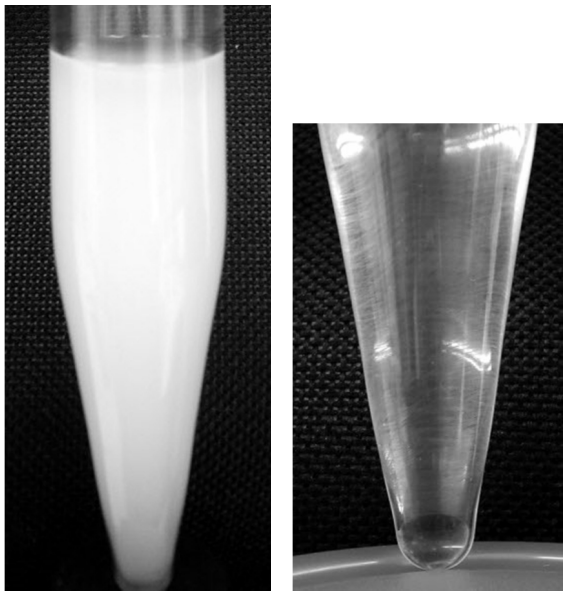


Figura 5.20: La adición de $[C_8MIm]Cl$ sobre la fase acuosa conteniendo $[NTf_2]Li$ provoca la formación instantánea de una fase dispersa que tras la centrifugación se deposita en el fondo del tubo.

5. 4.2.4. DETERMINACIÓN DE Co Y Ni EN MUESTRAS DE AGUA

Tome 10 ml de agua y trátela como se indica en 5.2.3. La cuantificación se realiza frente a patrones acuosos tratados de la misma forma, o si se conoce el factor de preconcentración, se puede comparar frente a patrones acuosos directamente.

5. 4.2.5. DETERMINACIÓN DE Co Y Ni EN CERVEZA

Las muestras de cerveza requieren un proceso de limpieza previo mediante extracción en fase sólida de los iones metálicos utilizando un cartucho relleno de intercambiador iónico del tipo catiónico (DSC-SCX). El cartucho se acondiciona pasando 10 mL de ácido nítrico al 5 % y lavando con agua hasta pH neutro. A continuación se pasan 10 mL de cerveza. Co(II) y Ni(II) quedan cuantitativamente retenidos. Se lava con 5 mL de fase acuosa y se eluye con 10 mL de ácido nítrico al 6 % v/v. El eluido se ajusta a pH=8 con hidróxido amónico 1 mol L^{-1} y se aplica el procedimiento detallado en 5.2.3.

5.4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.3.1. SELECCIÓN DEL LÍQUIDO IÓNICO

El empleo de líquidos iónicos como alternativa al de disolventes orgánicos en procesos de microextracción exige que el IL presente bajos valores de solubilidad en agua y viscosidad. Como ya se ha demostrado [196], la solubilidad en agua de los líquidos iónicos basados en imidazolio depende de la longitud de la cadena alquílica del catión y del número de hidrógenos sustituidos en el catión imidazolio. Además, la solubilidad también depende mucho del anión constituyente. En este sentido se ha encontrado que la solubilidad cambia según $[BF_4]^-$ > $[C(CN)_3]^-$>$[PF_6]^-$>$[N(SO_2CF_3)_2]^-$. En este trabajo hemos seleccionado el empleo de cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio ($[C_8MIm]Cl$) como catión y bis(trifluorometilsulfonil)imida de litio ($[NTf_2]Li$) como anión (ambos solubles en agua, incluso a concentración elevada y fácilmente asequibles) para la formación de bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metilimidazolio ($[C_8MIm][NTf_2]$). La Tabla 5.18 muestra algunas propiedades físicas de estos compuestos. Nótese que la viscosidad de $[C_8MIm][NTf_2]$ se mantiene en un valor discreto lo que permite su fácil manipulación. Además el IL resultante es líquido a temperatura ambiente.

Tabla 5.18. Líquidos iónicos utilizados en este trabajo

Sustancia	Abreviatura	Fórmula molecular	Masa molecular, g	ρ, g cm^{-3}	η, cp	Punto de fusión, K
cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio	$([C_8MIm]Cl$	$C_{12}H_{23}ClN_2$	230.78	1.01	337	285.4
bis(trifluorometilsulfonil)imida de litio	$[NTf_2]Li$	$C_2F_6LiNO_4S_2$	287.08	1.33	-	507
bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metilimidazolio	$[C_8MIm][NTf_2]$	$C_{14}H_{23}F_6N_3O_4S_2$	475.47	1.33	119	-

Para conseguir una transferencia rápida de fases es preciso aumentar al máximo el área superficial de contacto entre las fases dadora y aceptora. Esta circunstancia se ha logrado en este caso mediante el empleo de una reacción de intercambio o desplazamiento (reacción de metatesis) que permite la formación de microgotas de un IL insoluble a partir de sus constituyentes, ambos solubles en agua:

$$[C_8MIm]Cl + [NTf_2]Li \rightarrow [C_8MIm][NTf_2] + LiCl$$

Si en estas condiciones existen en el medio de reacción complejos neutros de iones metálicos es posible conseguir la extracción de los mismos en el IL formado merced a su mayor solubilidad en este disolvente. Esta metodología ya ha sido utilizada para la ex-

tracción de compuestos aromáticos en agua [114] y supone una simplificación de la tradicional DLLME ya que evita el empleo de un agente dispersante y también permite su realización en un menor tiempo ya que no se requieren ciclos de calentamiento y enfriamiento o ultrasonidos.

Experimentalmente se encontró que el empleo de 150 µL de $[C_8MIm]Cl$ 0.1 mol L^{-1} y 150 µL de $[NTf_2]Li$ 0.1 mol L^{-1} permite obtener una fase dispersa en 10 mL de fase acuosa como la que aparece en la Figura 5.20 y que tras su centrifugación a 4000 rpm durante 5 minutos conduce a una fase condensada de IL en el fondo del tubo que, experimentalmente, se cuantificó en aproximadamente 35 µL, lo que coincide bastante con la predicción teórica [197] teniendo en cuenta la densidad de $[C_8MIm][NTf_2]$.

Como es fácil de comprender el volumen de IL formado resulta de vital importancia en la reproducibilidad de los resultados ya que pequeños cambios en este volumen, al estar afectados del factor de concentración, se traducen en importantes cambios de señal. Cuando se utiliza como extractante el propio IL resulta muy difícil tomar de forma reproducible microvolúmenes del mismo para llevar a cabo la extracción. Sin embargo, trabajando en las condiciones propuestas, la formación de IL *in situ* permite alcanzar reproducibilidades en el volumen del IL aceptor formado mejores que el 5%. Además, como veremos más adelante, el volumen recogido resulta independiente de la fuerza iónica del medio acuoso en un amplio intervalo.

5.4.3.2. SELECCIÓN DE UN AGENTE ANTIADHERENTE

En las primeras experiencias se observó que tras la centrifugación una parte del líquido iónico quedaba adherido a las paredes del tubo de centrífuga disminuyendo de esta forma el volumen del IL sedimentado. Para obviar este inconveniente algunos autores [122] han recomendado el empleo de tensioactivos con el fin de recubrir las microgotas de IL generado en la fase dispersa evitando su interacción con las paredes interiores del tubo y permitiendo de esta forma una sedimentación más eficaz en el fondo del tubo.

Se ha estudiado el empleo de Triton X-100, Triton X-114, Tween 20 y Span 20. Los mejores resultados en cuanto a volumen de IL sedimentado conseguido se consiguieron con el empleo de Triton X-114. El volumen de IL sedimentado alcanza un valor máximo y constante para una concentración de Triton X-114 de 0.004 mol L^{-1}. Concentraciones superiores provocan que la fase dadora no quede traslúcida después de la centrifugación. Por tanto se ha seleccionado como valor óptimo la adición de 100 µL de Triton X-114 (0.2 mol L^{-1}) a 5 mL de fase dadora. La Figura 5.20 muestra como las paredes del tubo de centrífuga quedan limpias tras el proceso de separación por centrifugación.

5.4.3.3. EFECTO DEL pH Y LA CONCENTRACIÓN DE PAN

1-(2-piridilazo-2-naftol), PAN es un ligando estable en un amplio intervalo de pH que forma complejo con multitud de iones metálicos [169,198]. También ha sido propuesto para la determinación de cobalto y níquel, incluyendo Ni en un medio con microemulsión [199], Co en presencia de Triton X-100 [200], Co como optrodo [201], mezclas de Co y Ni [202] etc. En técnicas de microextracción también se ha aplicado para la preconcentración de Co y Ni en medio micelar [203], extracción en disolventes orgánicos [169], DLLME [160,165], DLLME + ultrasonidos (USADLLME) [204], dispersiva supramolecular (SM-DLLME) [162], microextracción en punto de nube [205] y microextracción en gota solidificada [163], entre otros.

El efecto que tiene el pH en la formación y extracción de los complejos neutros de Co y Ni con PAN se ha estudiado en el intervalo de 2 a 10 utilizando, en principio disoluciones diluidas de ácido nítrico e hidróxido sódico. La Figura 5.21 muestra los resultados obtenidos. Nótese como en el caso de cobalto la formación y extracción es cuantitativa desde pH ácido (pH>5) hasta pH alcalino, mientras que en el caso de níquel la señal va aumentando hasta hacerse constante a partir de pH=8. Con el fin de utilizar un pH único y válido para ambos iones se propone el empleo de una reguladora fosfato 1 M para ajustar el pH a 8. Experimentalmente se ha comprobado que a partir de 100 µL de reguladora la señal es máxima y constante. Sin embargo se propone el empleo de 200 µL de reguladora para un más seguro control de pH en muestras con diferente acidez.

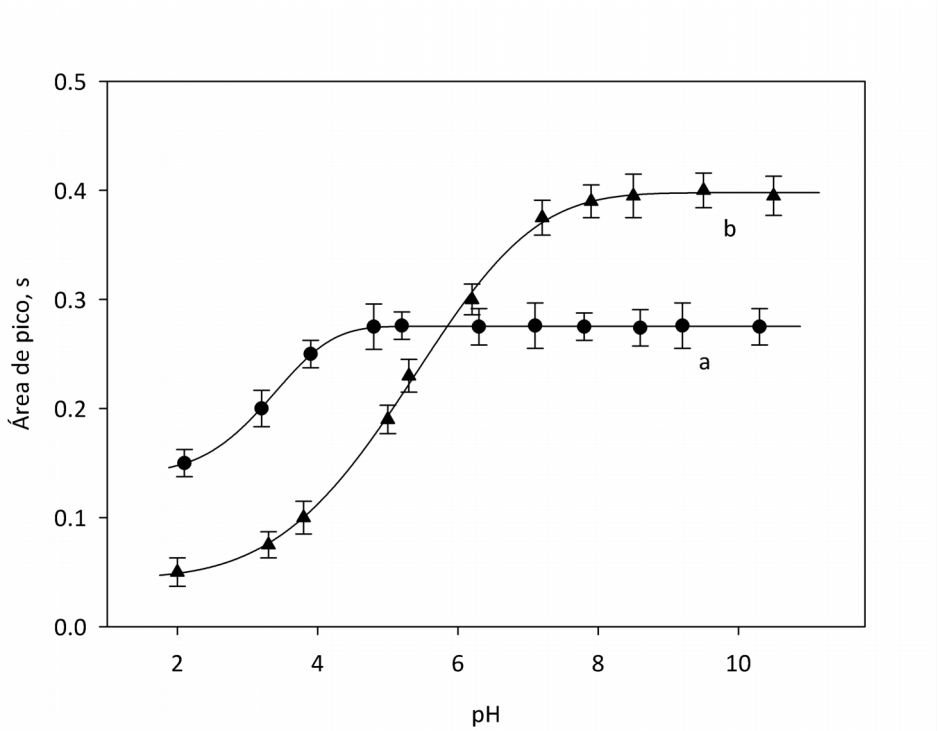


Figura 5.21: Efecto del pH en la señal debida a 0.15 y 0.2 µg L^{-1} de Co(II) y Ni(II) (curvas a y b, respectivamente) en fase acuosa sometidas al procedimiento de microextracción recomendado.

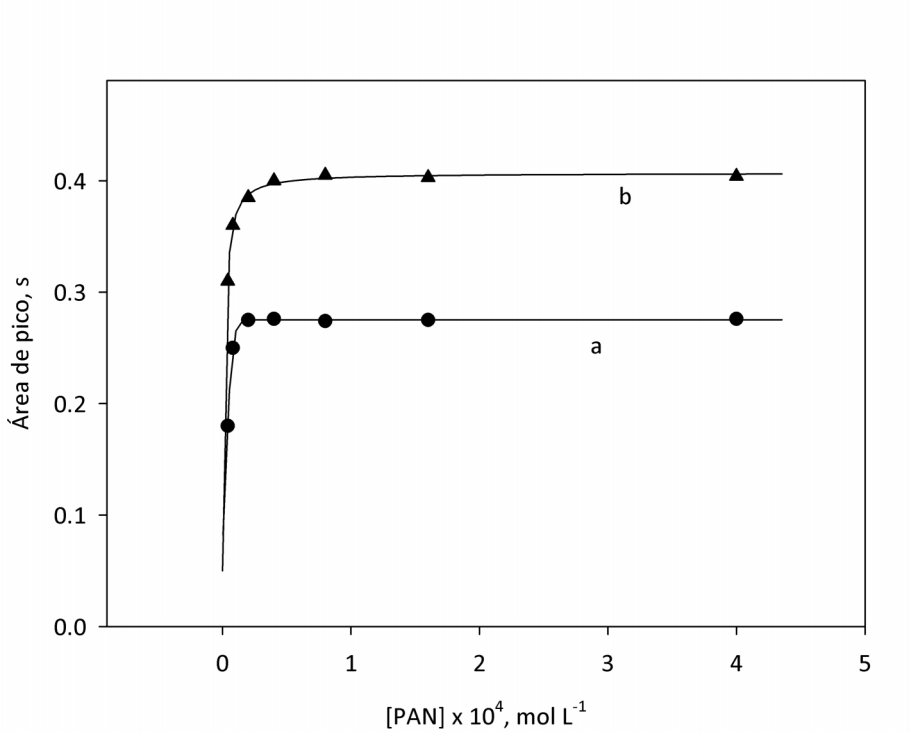


Figura 5.22: Efecto de la concentración de PAN en la señal debida a 0.15 y 0.2 µg L^{-1} de Co(II) y Ni(II) (curvas a y b, respectivamente) en fase acuosa sometidas al procedimiento de microextracción recomendado.

Al pH seleccionado se ha estudiado el efecto que la concentración de PAN tiene en la extensión del proceso de separación. La Figura 5.22 muestra los resultados obtenidos. Como la disolución de PAN se prepara en metanol, para evitar cambios de comportamiento del proceso de separación como consecuencia del empleo de distintos volúmenes de PAN, se prepararon disoluciones de distinta concentración de PAN y el volumen de las mismas añadido siempre fue siempre de 100 µL. Nótese como a partir de una concentración 2 10^{-5} mol L^{-1} la señal es máxima y constante para ambos analitos, por tanto se recomienda el empleo de una concentración 8 10^{-5} mol L^{-1}, lo que supone la adición de 100 mL de una disolución de PAN al 0.2 % en metanol.

5.4.3.4 EFECTO DE LOS VOLÚMENES DE FASE DADORA Y ACEPTORA

Evidentemente el primer paso para conseguir un elevado factor de preconcentración es disponer de una relación elevada de fase dadora a fase aceptora. Como ya se ha comentado, el empleo de 150 µL de $[C_8MIm]Cl$ 1 mol L^{-1} + 150 µL $[NTf_2]Li$ 1 mol L^{-1} permite obtener 35 µL de $[C_8MIm][NTf_2]$. Se ha estudiado el efecto que tiene sobre la señal de cobalto extraído el volumen de la fase dadora entre 2 y 10 mL manteniendo constantes la adición de los reactivos generadores del IL aceptor y la concentración de cromo en la fase dadora. Los resultados obtenidos muestran un comportamiento lineal entre la señal medida para cobalto en el extracto y la relación de volúmenes, lo que subraya la baja solubilidad del IL formado en la fase acuosa.

Los estudios de porcentaje de extracción realizados a partir de dos extracciones consecutivas de una misma disolución acuosa de Co(II) y Ni(II) revelaron un valor próximo al 100 % en ambos casos (99 ± 4 y 98 ± 5 %, respectivamente), lo que nos permite calificar la extracción como de cuantitativa para ambos iones en las condiciones recomendadas.

El factor de enriquecimiento, que se calcula a partir del cociente de las concentraciones de analito en la fase aceptora y la concentración inicial de analito en la fase dadora, se estimó a partir del cociente entre la pendiente de la gráfica de calibrado obtenida para Co(II) o Ni(II) en fase acuosa y la que se obtiene para estos iones en la fase acepto-

ra. Los resultados fueron similares para ambos iones y condujeron a un factor de enriquecimiento de 285 y 280 para cobalto y níquel, respectivamente, cuando se utilizan 10 mL de fase acuosa.

La señal obtenida en el detector resulta proporcional al volumen inyectado en el intervalo de 5 a 30 µL ensayado. Con el fin de conseguir la máxima sensibilidad en la determinación se propone el empleo de 30 µL de IL. Para tomar este volumen desde el tubo de extracción recomendamos el empleo de jeringas de tipo cromatográfico de vidrio en lugar de micropipetas, ya que la viscosidad y densidad del IL formado impiden un correcto muestreo con micropipeta.

5.4.3.5 EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Definimos en DLLME como tiempo de extracción el que transcurre desde que se mezclan los agentes dispersantes con la fase acuosa hasta la centrifugación. En nuestro caso lo contabilizamos desde el momento en que se añade el microvolumen de disolución de $[NTf_2]Li$ a una disolución acuosa que ya contiene $[C_8MIm]Cl$ hasta que se lleva el tubo a la centrífuga. Se estudió si tiempos de extracción en el intervalo de 15 s a 10 min tienen efecto en la señal obtenida para cobalto y níquel en el extracto sedimentado. Los resultados mostraron que la señal permanece constante e independiente del tiempo de extracción, con lo que podemos concluir que el proceso es prácticamente instantáneo y la eficacia de la dispersión formada máxima.

5.4.3.6 EFECTO SALINO

En general, la adición de sal a la disolución de la muestra causa un incremento en la fuerza iónica que disminuye la solubilidad de las sustancias en fase acuosa (fase dadora) mejorando así la distribución de las sustancias en la fase aceptora. Por otra parte aumenta la solubilidad de los líquidos iónicos en agua. Sin embargo, en nuestro caso, como el líquido iónico se encuentra en equilibrio con los iones constituyentes disueltos en fase acuosa, existe un importante efecto de ión común que impide la solubilización del IL. Para comprobar esta afirmación se estudió el cambio en la señal del extracto con la fuerza iónica del medio. Para ello se varió la concentración de cloruro sódico del medio

entre 0 y 20 % m/v. En todos los casos la concentración de cobalto se mantuvo constante. Los resultados obtenidos no mostraron cambios significativos en la señal obtenida para los iones de cobalto extraídos. La señal se mantuvo constante en todo el intervalo estudiado, de lo que se deduce que la solubilidad del IL formado y el porcentaje de reparto de los complejos formados resultan prácticamente independientes de la fuerza iónica. Este excelente comportamiento es un aval para el empleo del procedimiento propuesto a la determinación de cobalto y níquel en muestras de agua de elevado contenido salino.

5.4.3.7 ESTUDIOS DE INTERFERENCIA

Se realizaron experiencias para evaluar el efecto que tiene en la señal medida para concentraciones conocidas de cobalto y níquel la presencia de los componentes mayoritarios habituales en aguas naturales: NO_3^-, SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, K^+, Ca^{2+} y Mg^{2+}. Concentraciones hasta 0.1 mol L^{-1} de cada una de estas especies no provocan cambios significativos en la señal medida, tolerándose en algunos casos hasta concentraciones de 1 mol L^{-1}.

Otros metales podrían influir debido a que forman complejos con PAN. En este sentido se encontró que Ba(II), Mn(II), As(III) y As(V), Sb(III) y (V) y Se(IV) se toleran hasta un nivel de 1 g L^{-1}, nivel máximo ensayado, Fe(III) y Hg(II) hasta 0.5 g L^{-1}, Cu(II), Co(II) y Zn(II) hasta 0.1 g L^{-1} y Pb(II), Cd(II) y Ni(II) hasta 50 mg L^{-1}.

Estos datos muestran que la metodología propuesta resulta adecuada para la determinación de cobalto y níquel en aguas naturales donde los niveles de estos elementos son usualmente inferiores a los que hemos encontrado como interferentes.

5.4.3.8 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE ATOMIZACIÓN

Se comprobó que la presencia del IL aceptor durante el ciclo de calentamiento en el atomizador provoca un descenso en la señal de cobalto. Este descenso se pudo corregir con el incremento en la concentración de modificador químico. La Figura 5.23 muestra los resultados obtenidos para 0.1 µg L^{-1} de cobalto extraídos por aplicación del procedi-

miento propuesto. Nótese como una concentración de modificador químico de 1000 µg mL^{-1}, suficiente para la estabilización de cobalto en disolución acuosa, no lo es cuando el analito se encuentra en presencia del líquido iónico. Como puede observarse, es preciso aumentar la concentración de paladio hasta 4000 µg mL^{-1} para conseguir una señal máxima y constante. Esta situación no es tan acusada en el caso de la determinación de níquel. Entonces una disolución de nitrato de paladio conteniendo 2000 µg mL^{-1} de paladio es suficiente. Sin embargo, con fines de homogeneización recomendamos el empleo de 4000 µg mL^{-1} de paladio en ambos casos.

La Figura 5.24 muestra el estudio realizado sobre extractos en el IL conteniendo cobalto cuando se cambió la temperatura de calcinación manteniendo constante la de atomización. Nótese como en presencia del IL la señal se hace inestable a temperaturas mucho más bajas que cuando el analito se encuentra en disolución acuosa. El estudio de la temperatura de atomización condujo a recomendar el empleo de 2400 °C como óptima para la determinación de cobalto. En el caso del níquel, se observan fenómenos similares que nos llevan a proponer el empleo de una temperatura de calcinación de 600 °C y una de atomización de 2400 °C para ambos analitos.

La Tabla 5.17 muestra el programa de calentamiento propuesto. Como puede apreciarse consta de dos etapas de secado. La primera se utiliza para secar el modificador que se inyectará primero siguiendo la secuencia que aparece en la mima tabla. La segunda temperatura de secado garantiza que el IL queda seco antes de llegar a la etapa de calcinación.

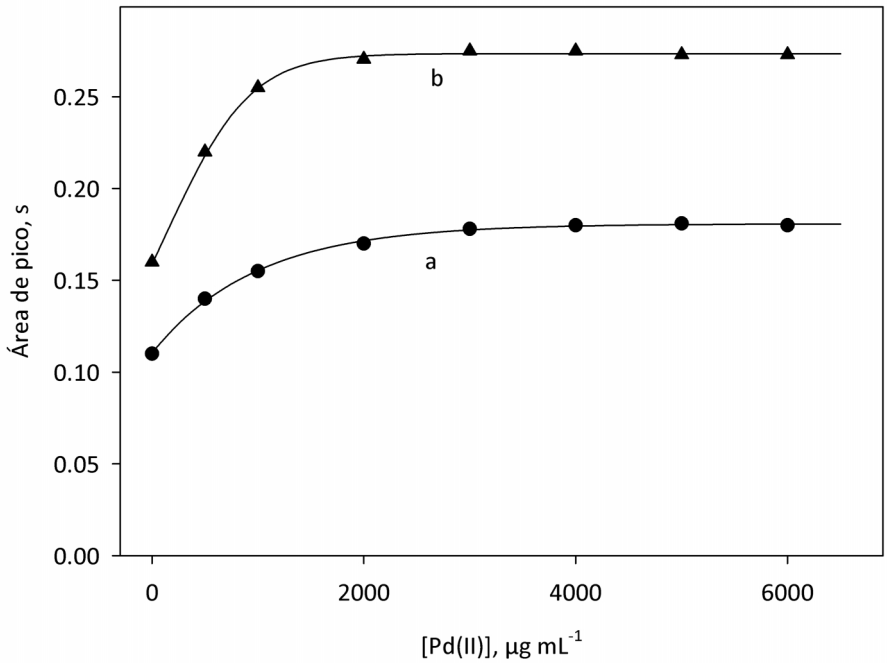


Figura 5.23: Efecto de la concentración Pd(II) utilizado como modificador en la señal debida a 0.1 y 0.15 µg L^{-1} de Co(II) y Ni(II) (curvas a y b, respectivamente) en fase acuosa sometidas al procedimiento de microextracción recomendado.

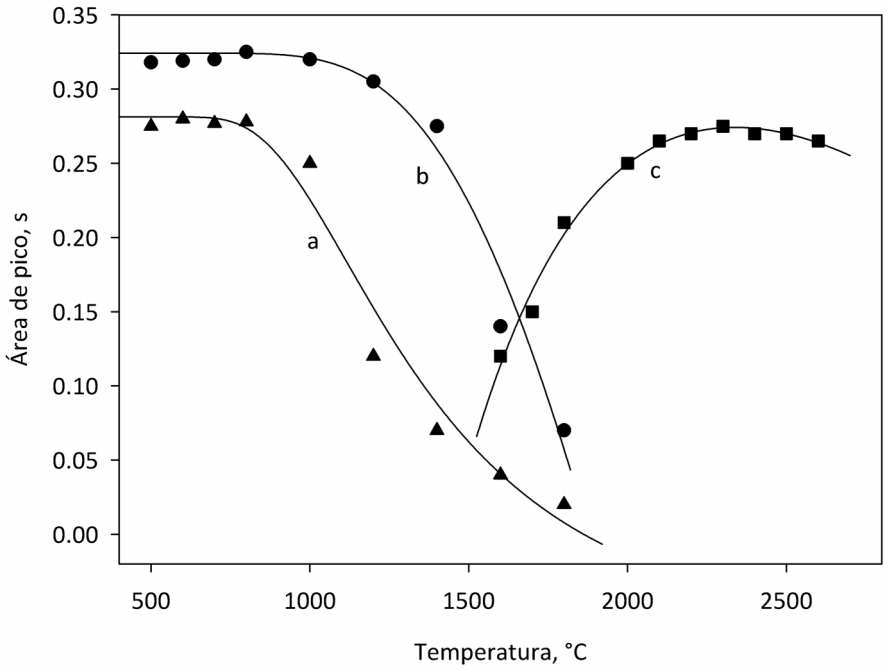


Figura 5.24: Influencia de la temperatura en la calcinación del cobalto extraído en el líquido iónico desde una disolución de 0.15 µg L^{-1} de Co(II) (curva a) y en 50 µg L^{-1} de Co(II) en disolución acuosa (curva b). La curva c corresponde a la señal obtenida a distintas temperaturas de atomización para Co en líquido iónico.

5.4.3.9 CALIBRACIÓN

Trabajando en las condiciones recomendadas en la parte experimental para 10 mL de fase acuosa y con la adición de 150 µL de disoluciones 1 mol L^{-1} de $[NTf_2]Li$ y $[C_8MIm]Cl$ se observó un comportamiento lineal entre la concentración de cobalto en fase acuosa y la señal en área de pico medida por el detector en el intervalo de concentraciones de 0.01 a 0.3 µg L^{-1} . El límite de detección se ha calculado como la concentración de cobalto que conduce a una señal equivalente a tres veces el error estándar de la estimación de la regresión ($s_{y/x}$). Teniendo en cuenta que la pendiente de calibración resultó ser 1.845 s μg^{-1} L y $s_{y/x}$ presentó el valor de 0.006 s, el LOD que se obtiene es de 9 ng L^{-1}. En el caso de níquel, la gráfica de calibrado resultó lineal entre 0.02 y 0.4 µg L^{-1} en fase acuosa. La pendiente de esta gráfica resultó ser 1.791 s μg^{-1} L y $s_{y/x}$ alcanzó el valor de 0.007, lo que supone un LOD de 10 ng L^{-1}.

El factor de enriquecimiento se ha calculado a partir del cociente entre la pendiente de calibrado obtenida por el proceso de extracción y la que resulta de la determinación directa en fase acuosa de cobalto (0.0065 s μg^{-1} L) y níquel (0.0063 s μg^{-1} L) resultando ser de aproximadamente 285. Este valor resulta superior a la mayoría de los que aparecen recogidos en la bibliografía reciente para procesos de preconcentración de cobalto y níquel por microextracción como podemos apreciar en la Tabla 5.19.

La precisión del método se ha estudiado tanto en repetitivilidad como reproducibilidad para la determinación de Co(II) y Ni(II). La repetitibilidad se ha estimado a partir de 10 experiencias consecutivas y se encontraron valores de desviación estándar relativa del 5.2 y 4.1 % para Co(II) y Ni(II), respectivamente. La reproducibilidad se medió a lo largo de cinco días obteniéndose valores de desviación estándar relativa del 8.7 y 9.2 %, respectivamente.

Tabla 5.19. Comparación del procedimiento propuesto con otros publicados recientemente basados en técnicas de microextracción

Especies	Agente quelatante	Técnica sep/preconc.	Fase aceptora	Técnica detec-ción	Intervalo lineal, µg L^{-1}	FE	LOD, µg L^{-1}	Ref.
Co(II)	PAN	DLLME	[Hmin][PF_6]	FAAS	0.4-120	118	0.1	[165]
Co(II), Ni(II)	5-Br PADAP[a]	DLLME-SFO[b]	1-undecanol	ETAAS	0.005-0.055/0.005-0.040	800	0.0013	[206]
Co(II)	PAN	SM-DLLME[c]	Ácido decanóico	FAAS	10-280	58	4.2	[162]
Co(II), Ni(II)	Antralin[d]	CMP[e]	Bromuro de cetil trimetil amonio	ICP-AES	0.03-700/0.01-800	9.4/14.4	0.009/0.004	[205]
Ni(II)	--	USA-DLLME[f]	Cl_4C	FAAS	1-1000	--	0.34	[204]
Co(II)	Br-TAO[g]	DLLME	Cl_4C	FAAS	3-100	16	0.9	[207]
Co(II), Ni(II)	TPTS[h]	SPME	Fibra PMDS[i]	HPLC-UV	0.1-500	10	0.009/0.006	[208]
Co(II)	1N2N[j]	DLLME	[C_6min][PF_6]	ETAAS	0.038-3.5	120	0.0004	[164]
Co(II)	PMBP[k]	DLLME	[C_6py][PF_6]	FAAS	2-166	60	0.7	[46]
Co(II)	PAN	CIAME[l]	[Hmin][PF_6]+ [Hmin][TF_2N]	UV-VIS	<65	165	0.14	[123]
Co(II),Ni(II)	PAN	DLLME-SFO	1-undecanol	ETAAS	0.005-0.06/0.005-0.05	502/497	0.004/0.003	[163]
Co(II),Ni(II)	PAN	DLLME	Cl_4C	ETAAS	--	101/200	0.002/0.003	[160]
Co(II), Ni(II)	APDC	DLLME	[C_8MIm] [NTf_2]	ETAAS		285		Este tr.

[a] 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(dietil amino)fenol; [b] solidification of floating organic drop dispersive liquid-liquid microextraction; [c] supramolecular based DLLME; [d] 1,8-dihidroxiantrona; [e] cationic micellar precipitation; [f] ultrasonic probe-assisted dispersive liquid-liquid microextraction; [g] 3 4-(5′-bromo-2′-tiazolilazo)orcinol; [h] 2-thiophenaldehyde-3-thiosemicarbazone; [i] polidimetilsiloxano; [j] 1-nitroso-2-naftol; [k] 1-Phenyl-3-methyl-4-benzoyl-5-pyrazolone; [l] Cold-induced aggregation microextraction

5.4.3.10 DETERMINACIÓN DE COBALTO Y NÍQUEL EN MUESTRAS DE AGUA Y CERVEZA

El procedimiento propuesto se ha aplicado a distintos tipos de agua donde se han realizado estudios de recuperación para conocer la existencia o no de efecto matriz. La Tabla 5.20 muestra los resultados obtenidos. Como puede apreciarse el contenido de cobalto y níquel se encuentra en todos los casos por debajo de 1 y 5 µg L^{-1}, respectivamente, lo que no supone riesgo alguno para la salud y demuestra la validez del procedimiento propuesto para la determinación de muy bajas concentraciones de estos elementos ya que los porcentajes de recuperación encontrados en todas las muestras se encuentran en el intervalo de 99.1 ± 2.6 %

En el caso de la determinación de cobalto y níquel en cerveza no resulta posible la aplicación directa del procedimiento propuesto porque el líquido iónico sedimentado tras la centrifugación contiene a su alrededor abundante cantidad de material que dificulta su extracción del tubo de ensayo. Por tanto se estudió la posibilidad de separar previamente los analitos mediante un proceso de "limpieza de matriz". En este sentido los mejores resultados se obtuvieron con el empleo de cartuchos de fase sólida con un soporte de intercambio catiónico. Al pasar la cerveza por el cartucho quedan retenidos los cationes y eluye la mayor parte del material que de otra forma resulta un gran inconveniente. La elución posterior de los iones retenidos con ácido nítrico al 6 % v/v permite obtener una disolución "limpia", a la que tras ajustar el pH con hidróxido amónico se le aplica el procedimiento de microextracción recomendado.

Los contenidos de Co(II) y Ni(II), encontrados en cerveza por aplicación del procedimiento propuesto tal y como se detalla en la Parte Experimental aparecen en la Tabla 5.20. En el caso de las medidas de níquel, debido a su mayor concentración, la muestra se diluyó convenientemente para llevar a cabo el procedimiento. Como puede apreciarse los niveles encontrados en todas las muestras de agua son inferiores a 0.5 y 10 µg L^{-1} de Co(II) y Ni(II), respectivamente. Los contenidos encontrados en cerveza son los suficientemente bajos como para garantizar que incluso la ingesta de 10 L diarios suponga ningun problema para la salud.

Tabla 5.20: Concentraciones de Co(II) y Ni(II) encontradas en distintas muestras de agua y cerveza

	Co(II)[a], µg L^{-1}			Ni(II)[a], µg L^{-1}		
Muestra	Añadido	Encontrado	Rec., %	Añadido	Encontrado	Rec., %
Agua de grifo	0	0.19 ± 0.01	-	0	3.31 ± 0.02	-
	0.1	0.29 ± 0.01	101	1	4.30 ± 0.04	98
Agua de grifo tratada por ósmosis	0	0.02 ± 0.01	-	0	0.12 ± 0.01	-
	0.1	0.12 ± 0.01	99	1	1.13 ± 0.02	103
Agua mineral sin gas 1	0	0.08 ± 0.01	-	0	2.76 ± 0.02	-
	0.1	0.18 ± 0.01	99	1	3.75 ± 0.02	99
Agua mineral sin gas 2	0	0.05 ± 0.01	-	0	2.16 ± 0.03	-
	0.1	0.14 ± 0.01	95	1	3.16 ± 0.03	102
Agua mineral con gas 1	0	0.08 ± 0.01	-	0	4.12 ± 0.02	-
	0.1	0.19 ± 0.02	102	1	5.11 ± 0.03	96
Agua mineral con gas 2	0	0.13 ± 0.02	-	0	5.35 ± 0.02	-
	0.1	0.22 ± 0.01	94	1	6.34 ± 0.03	97
Agua de mar 1	0	0.11 ± 0.01	-	0	2.71 ± 0.02	-
	0.1	0.20 ± 0.01	95	1	3.70 ± 0.03	99
Agua de mar 2	0	0.07 ± 0.01	-	0	2.66 ± 0.02	-
	0.1	0.17 ± 0.02	102	1	3.65 ± 0.03	99
Agua de pozo	0	0.27 ± 0.01	-	0	2.87 ± 0.02	-
	0.1	0.36 ± 0.02	99	1	3.89 ± 0.03	102
Cerveza (5.6 %)[b]	0	0.26 ± 0.01	-	0	8.76 ± 0.03	-
	0.1	0.37 ± 0.01	105	1	9.75 ± 0.04	96
Cerveza (2.4 %)[b]	0	0.32 ± 0.01	-	0	9.23 ± 0.03	-
	0.1	0.41 ± 0.01	93	1	10.25 ± 0.02	105
Cerveza (0.0 %)[b]	0	0.18 ± 0.01	-	0	7.45 ± 0.03	-
	0.1	0.29 ± 0.01	103	1	8.47 ± 0.04	104

[a] valor medio ± desviación estándar de tres determinaciones; [b] contenido alcohólico de la cerveza

5.5 CONCLUSIÓN

Se ha desarrollado una variante simplificada de DLLME basada en la formación in situ de un líquido iónico inmiscible con agua. En comparación con otros procedi-mientos DLLME que utilizan líquidos iónicos, la formación in situ de este permite la ex-tracción instantánea del analito de interés. Además la técnica no precisa del empleo de agente dispersante químico, ultrasonidos o ciclos de calentamiento-enfriamiento. El método propuesto es simple, rápido y seguro y se ha aplicado a la determinación de cobalto y níquel en muestras de agua y cerveza. En empleo de cartuchos de separación en fase sólida por intercambio iónico permite aislar eficazmente los analitos del resto de la ma-triz.

5.6. BIBLIOGRAFÍA

1 P. Anastas y J. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York (1998).

2 F. H. Hurley y T. P. Weir, *The electrodeposition of aluminium from nonaqueous solutions at room temperature*, J. Electrochem. Soc., 98 (1951) 207-212.

3 J. D. Holbrey y K. R. Seddon, Ionic Liquids, *Clean Products and Processes*, 1 (1999) 223–236.

4 M. Koel, *Ionic liquids in chemical analysis*, Cr. Rev. Anal. Chem., 35 (2005) 177-192.

5 A. Elaiwi, P. B. hitchcock, K. R. Seddon, N. Srinivasan, Y. M. Tan, T. Welton y J. A. Zora, *Hydrogen bonding in imidazolium salts and its implications for ambient-temperature halogenoaluminate (III) ionic liquids*, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 21 (1995) 3467-3472.

6 J. L. Anderson, J. Ding, T. Welton y D. W. Armstrong, *Characterizing ionic liquids on the basis of multiple solvation interactions*, J. Am. Chem. Soc., 124 (2002) 14247-14254.

7 M. H. Abraham, G. S. Whiting, R. M. Doherty y W. J. J. Shuely, *Hydrogen-bonding.15. A new characterization of the McReynolds 77-stationary phase set*, J. Chromatogr., 518 (1990) 329-348.

8 S. Shiro Seki, T. Kobayashi, Y. Kobayashi, K. Takei, H. Miyashiro, N. Hayamizu, S. Tsuzuki, T. Mitsugi y Y. Umebayashi, *Effects of cation and anion on physical properties of room-temperature ionic liquids*, J. Mol. Liq., 152 (2010) 9–13.

9 J. Jacquemin, P. Husson, A.A.H. Padua, V. Majer, *Density and viscosity of several pure and water-saturated ionic liquids*, Green Chem., 8 (2006) 172-180.

10 M. Koel, *Ionic Liquids in Chemical Analysis*, CRC Press, 2009.

11 F. Endres y S.Z. El Abedin, *Air and water stable ionic liquids in physical chemistry*, Phys. Chem. Chem. Phys., 8 (2006) 2101-2116.

12 J. Pernak, P. Chwała y A. Syguda, *Room temperature ionic liquids—new choline derivatives*, Polish. J. Chem., 78 (2004) 539-546.

13 J. G. Huddleston, A. E. Visser, W. M. Reichert, H. D. Willauer, G. A. Broker y R. D. Rogers, Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, Green Chem., 3 (2001) 156-164.

14 J. H. Fendler y E. J. Fendler, *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, New York (1975).

15 J. L. Anderson, V. Pino, E. C. Hagberg, V.V. Sheares y D. W. Armstrong, *Surfactant solvation effects and micelle formation in ionic liquids*, Chem. Comm., 19 (2003) 2444-2445.

16 A. Modaressi, H. Sifaoui, B. Grzesiak, R. Solimando, U. Domanska y M. Rogalski, *CTAB aggregation in aqueous solutions of ammonium based ionic liquids; conductimetric studies*, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 296 (2007) 104-108.

17 K .R. Seddon, A. Stark, M. J. Torres, *Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids*, Pure Appl. Chem., 72 (2000) 2275-2287.

18 M. J. Muldoon, C. M. Gordon y I. R. Dunkin, *Investigations of solvent-solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes*, J. Chem. Soc., Perkin Trans., 2 (2001) 433-435.

19 W. Meindersma, F. Onink y A. B. de Haan, *Handbook of Green Chem., Vol. 6, Ionic liquids*, Wiley-VCH (2010) 139.

20 R. P. Swatloski, J. D. Holbrey y R. D. Rogers, *Ionic liquids are not always green: hydrolysis of 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate*, Green Chem., 5 (2003) 361–363.

21 J. F. Liu, N. Li, G .B. Jiang, J. M. Liu, J. A. Jönsson y M. J. Wen, *Disposable ionic liquid coating for headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in paints followed by gas chromatography-flame ionization detection*, J. Chromatogr. A, 1066 (2005) 27-32.

22 D. W. Armstrong, L. He y Y. S. Liu, *Examination of ionic liquids and their interaction with molecules, when used as stationary phases in gas chromatography*, Anal. Chem., 71 (1999) 3873-3876.

23 S. M. Mwongela, A. Numan, N. L. Gill, R. A. Agbaria y I. M. Warner, *Separation of Achiral and Chiral Analytes Using Polymeric Surfactants with Ionic Liquids as Modifiers in Micellar Electrokinetic Chromatography*, Anal. Chem., 75 (2003) 6089-6096.

24 W. Qin y S. F. Y. Li, *An ionic liquid coating for determination of sildenafil and UK-103,320 in human serum by capillary zone electrophoresis-ion trap mass spectrometry*, Electrophoresis, 23 (2002) 4110-4116.

25 M.C. Buzzeo, C. Hardacre y R.C. Compton, *Use of room temperature ionic liquids in gas sensor design*, Anal. Chem., 76 (2004) 4583–4588.

26 C. Liang, C. Y. Yuan, R. J. Warmack, C. E. Barnes y S. Dai, *Ionic liquids: a new class of sensing materials for detection of organic vapors based on the use of a quartz crystal microbalance*, Anal. Chem., 74 (2002) 2172-2176.

27 C. F. Poole y S. K. Poole, *Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids*, J. Chromatogr. A., 1217 (2010) 2268-2286.

28 C. Chiappe y D. Pieraccini, *Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity*, J. Phys. Org. Chem., 18 (2005) 275-297.

29 D. J. Couling, R. J. Bernot, K. M. Docherty, J. K. Dixon y E. J. Maginn, *Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure–property relationship modeling*, Green Chem., 8 (2006) 82-90.

30 H. Liu y P. K. Dasgupta, *Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop*, Anal. Chem., 68 (1996) 1817-1821.

31 H. Zhao y S. Xia, P. Ma, *Use of ionic liquids as green solvents for extractions*, J. Chem. Technol. Biotechnol., 80 (2005) 1089-1096.

32 S. Dai y Y. H. Ju, C. E. Barnes, *Solvent extraction of strontium nitrate by a crown ether using room-temperature ionic liquids*, J. Chem. Soc. Dalton Trans., 8 (1999) 1201-1202.

33 G. T. Wei, Z. Yang y C. J. Chen, *Room temperature ionic liquid as a novel medium for liquid-liquid extraction of metal ions*, Anal. Chim. Acta, 488 (2003) 183-192.

34 N. Hirayama, M. Deguchi, H. Kawasumi y T. Honjo, *Use of 1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate room temperature ionic liquids as chelate extraction solvent with 4,4,4-trifluoro-1-(2-thienyl)-1,3-butanedione*, Talanta, 65 (2005) 255-260,

35 Z. Li, Q. Wei, R. Yuan, X. Zhou, H. Liu, H. Shan y Q. Song, *A new room temperature ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate as a solvent for extraction and preconcentration of mercury with determination by cold vapor atomic absorption spectrometry*, Talanta, 71 (2007) 68-72.

36 Z. Li, N. Lu, X. Zhou y Q. Song, *Extraction spectrophotometric determination of aluminum in dialysis concentrates with 3,5-ditertbutylsalicylfluorone and ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate*, J. Pharm Biomed Anal., 43 (2007) 1609-1614.

37 S. Dadfarnia, A. M. Shabani, M. S. Bidabadi y A. A. Jafari, *A novel ionic liquid/micro-volume back extraction procedure combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace nickel in samples of nutritional interest*, J. Hazard Mater., 173 (2010) 534-538.

38 A. E. Visser, R. P. Swatloski, W. M. Reichert, J. H. Davis, R. D. Rogers, R. Mayton, S. Sheff y A. Wierzbicki, *Task-specific ionic liquids for the extraction of metal ions from aqueous solutions*, Chem. Commun., 1 (2001) 135 – 136.

39 S. K. Chun, S. V. Dzyuba y R. A. Bartsch, *Influence of structural variation in room-temperature ionic liquids on the selectivity and efficiency of competitive alkali metal salt extraction by a crown ether*, Anal. Chem., 73 (2001) 3737-3741.

40 X. Zhou, Z. J. Li, R. Yuan y H. Z. Liu, *A novel room temperature ionic liquid extraction spectrophotometric determination of trace germanium in natural water with methybenzeneazosalicylfluorone*, Anal. Lett., 39 (2006) 863-877.

41 N. Yan, Z. Fei, R. Scipelliti, G. Laurenczy, Y. Kou y P. J. Dyson, *Crystallisation of inorganic salts containing 18-crown-6 from ionic liquids*, Inorg. Chim. Acta, 363 (2010) 504-508.

42 K. Popov, A. Vendilo, I. Pletnev, M. Lajunen, H. Ronkkomaki y L. H. J. Lajunen, *Formation of complexes in RTIL and ion separations, cap. 20 de "Ionic Liquids: Theory, Properties, New Approaches"*, A. Kokorin (ed) Intech ,Croatia (2011) 488.

43 V. M. Egorov, D. I. Djigailo, D. S. Momotenko, D. V. Chernyshov, I. I. Torocheshnikova, S. V. Smirnova y I. V. Pletnev, *Task-specific ionic liquid trioctylmethylammonium salicylate as extraction solvent for transition metal ions*, Talanta, 80 (2010) 1177-1182.

44 N. Li, G. Z. Fang, B. Liu, J. Zhang, L. J. Zhao y S. Wang, *A Novel Hydrophobic Task Specific Ionic Liquid for the Extraction of Cd(II) from Water and Food Samples as Applied to AAS Determination*, Anal. Sci., 26 (2010) 455-459.

45 R. Lertlapwasin, N. Bhawawet, A. Imyim y S. Fuangswasdi, *Ionic liquid extraction of heavy metal ions by 2-aminothiophenol in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and their association constants*, Sep. Purif. Technol., 72 (2010) 70-76.

46 H. Abdolmohammad-Zadeh y E. Ebrahimzadeh, *Determination of cobalt in water samples by atomic absorption spectrometry after pre-concentration with a simple ionic liquid-based dispersive liquid-liquid micro-extraction methodology*, Cent. Eur. J. Chem., 8 (2010) 617-625.

47 N. Pourreza y K. Ghanemi, *Solid phase extraction of cadmium on 2-mercaptobenzothiazole loaded on sulfur powder in the medium of ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and cold vapor generation-atomic absorption spectrometric determination*, J. Hazard. Mater., 178 (2010) 566-571.

48 H. Okamura, N. Hirayama, K. Morita, K. Shimojo, H. Naganawa y H. Imura, *Synergistic Effect of 18-Crown-6 Derivatives on Chelate Extraction of Lanthanoids(III) into an Ionic Liquid with 2-Thenoyltrifluoroacetone*, Anal. Sci.,26 (2010) 607-611.

49 C. Xu, X. H. Shen, Q. D. Chen y H. C. Gao, *Investigation on the extraction of strontium ions from aqueous phase using crown ether-ionic liquid systems*, Sci. China Ser. B, 52 (2009) 1858-1864.

50 A. Rout, K. A. Venkatesan, T. G. Srinivasan y P. R. V. Rao, *Extraction of americium (III) from nitric acid medium by CMPO-TBP extractants in ionic liquid diluent*, Radiochim. Acta, 97 (2009) 719-725.

51 J. S. Wang, C. N. Sheaff, B. Yoon, R. S. Addleman y C. M. Wai, *Extraction of Uranium from Aqueous Solutions by Using Ionic Liquid and Supercritical Carbon Dioxide in Conjunction*, Chem- Eur. J., 15 (2009) 4458-4463.

52 K. Kidani, N. Hirayama y H. Imura, *Extraction Behavior of Divalent Metal Cations in Ionic Liquid Chelate Extraction Systems Using 1-Alkyl-3-methylimidazolium Bis(trifluoromethanesulfonyl)imides and Thenoyltrifluoroacetone*, Anal. Sci., 24 (2008) 1251-1254.

53 A. Kamio y Y. Nagaosa, *1-Butyl-3-methylimidazolium Hexafluorophosphate Ionic Liquid as a New Solvent for the Determination of Lead (II) and Cadmium (II) by Anodic Stripping Voltammetry after Extraction of the Iodide Complexes*, Anal. Sci., 24 (2008) 1363-1367.

54 Y. Zuo, J. Chen y D. Q. Li, *Reversed micellar solubilization extraction and separation of thorium (IV) from rare earth (III) by primary amine N1923 in ionic liquid*, Sep. Purif. Technol., 63 (2008) 684-690.

55 P. Giridhar, K. A. Venkatesan, S. Subramaniam, T. G. Srinivasan y P. R. V. Rao, *Extraction of uranium (VI) by 1.1 M tri-n-butylphosphate/ionic liquid and the feasibility of recovery by direct electrodeposition from organic phase*, J. Alloy. Compd., 448 (2008) 104-108.

56 X. Q. Sun, B. Peng, J. Chen, D. Q. Li y F. Luo, *An effective method for enhancing metal-ions' selectivity of ionic liquid-based extraction system: Adding water-soluble complexing agent*, Talanta, 74 (2008) 1071-1074.

57 K. V. Lohithakshan y S. K. Aggarwal, *Solvent extraction studies of Pu (IV) with CMPO in 1-octyl 3-methyl imidazolium hexa fluorophosphate (C_8mimPF_6) room temperature ionic liquid (RTIL)*, Radiochim. Acta, 96 (2008) 93-97.

58 N. Hirayama, H. Okamura, K. Kidani y H. Imura, *Ionic liquid synergistic cation-exchange system for the selective extraction of lanthanum(III) using 2-thenoyltrifluoroacetone and 18-crown-6*, Anal. Sci., 24 (2008), 697-699.

59 K. Kozaka, K. Fulinaga, J. Noro, Y. Watanabe y Y. Komatsu, *Solvent extraction of nickel (II) using ionic liquid containing 2-pyridinealdoxime*, Bunseki Kagaku, 57 (2008) 593-597.

60 Z. J. Li, Q. P. Peng y H. X. Shan, *Use of a novel medium, the ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate, for liquid-liquid extraction of lead in water and its determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry*, J. AOAC Inter. , 90 (2007) 1191-1196.

61 N. V. Prondzinski, A. Babai, A. V. Mudring y K. Merz, *[(bmpyr)$_2${Zn(OC$_6$H$_3$(NO$_2$)$_2$)$_4$}]: Influence of an ionic liquid on liquid/liquid extraction of metal ions in a biphasic system*, Journal of Inorganic and General Chemistry, 633 (2007) 1490-1492.

62 H. X. Shan, Z. J. Li y M. Li, *Ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate as a solvent for extraction of lead in environmental water samples with detection by graphite furnace atomic absorption spectrometry*, Microchim. Acta, 159 (2007) 95-100.

63 X. Q. Sun, D. B. Wu, J. Chen y D. Q. Li, *Separation of scandium (III) from lanthanides (III) with room temperature ionic liquid based extraction containing Cyanex 925*, J. Chem. Technol. Biotechnol., 82 (2007) 267-272.

64 N. Hirayama, M. Deguchi y T. Honjo, *The behavior of divalent transition metal cations on extraction into 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate room temperature ionic liquid with beta-diketones having a trifluoromethyl group*, Solvent Extr. Res. Dev., 13 (2006) 83-88.

65 P. Giridhar, K. A. Venkatesan, T. G. Srinivasan y P. R. V. Rao, *Extraction of fission palladium by Aliquat 336 and electrochemical studies on direct recovery from ionic liquid phase*, Hydrometallurgy, 81 (2006) 30-39.

66 H. L. Huang, H. P. Wang, G. T. Wei, T. W. Sun, J. F. Huang y Y. W. Yang, *Extraction of nanosize copper pollutants with an ionic liquid*, Environ. Sci. Technol., 40 (2006) 4761-4764.

67 K. Shimojo, H. Naganawa, F. Kubota y M. Goto, *Solvent extraction of lanthanides into an ionic liquid containing N,N,N ',N '-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine*, Chem. Lett., 35 (2006) 484-485.

68 V. A. Cocalia, M. P. Jensen, J. D. Holbrey, S. K. Spear, D. C. Stepinski y R. D. Rogers, *Identical extraction behavior and coordination of trivalent or hexavalent f-element cations using ionic liquid and molecular solvents*, Dalton T. ,11 (2005) 1966-1971.

69 S. Mekki, C. M. Wai, I. Billard, G. Moutiers, C. H. Yen, J. S. Wang, A. Ouadi, C. Gaillard y P. Hesemann, *Cu (II) extraction by supercritical fluid carbon dioxide from a room temperature ionic liquid using fluorinated beta-diketones*, Green Chem., 7 (2005) 421-423.

70 G. T. Wei, J. C. Chen y Z. S. Yang, *Studies on liquid/liquid extraction of copper ion with room temperature ionic liquid*, J. Chin. Chem. Soc., 50 (2003) 1123-1130.

71 M. Matsumoto, Y. Inomoto y K. Kondo, *Selective separation of aromatic hydrocarbons through supported liquid membranes based on ionic liquids*, J. Membrane. Sci. 246 (2005) 77-81.

72 S .D. Qi, S. Y. Cui, X. G.Chen y Z. D. Hu, *Rapid and sensitive determination of anthraquinones in Chinese herb using 1-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquid with beta-cyclodextrin as modifier in capillary zone electrophoresis*, J. Chromatogr. A, 1059 (2004) 191-198.

73 A. M. Scurto, S. N .V. K. Aki y J. F. Brennecke, *CO_2 as a separation switch for ionic liquid/organic mixtures*, J. Am. Chem. Soc., 124 (2002) 10276-10277.

74 J. G. Huddleston, H. D. Willauer, R. P. Swatloski, A. E. Visser y R. D. Rogers, *Room temperature ionic liquids as novel media for clean liquid-liquid extraction*, Chem. Commun., 16 (1998) 1765–1766.

75 A. Fadeev y M. Meagher, *Opportunities for ionic liquids in recovery of biofuels*, Chem. Commun., 3 (2001) 295–296.

76 E. Bekou, D. D. Dionysiou, R. Y. Qian y G. D. Botsaris, *Extraction of chlorophenols from water using room temperature ionic liquids*, ACS Sympos. Ser., 856 (2003) 544-560.

77 S. V. Smirnova, I. I. Torocheshnikova, A. A. Formanovsky y I. V. Pletnev, *Solvent extraction of amino acids into a room temperature ionic liquid with dicyclohexano-18-crown-6*, Anal. Bioanal. Chem., 378 (2004) 1369–1375.

78 N. V. Shvedene, M. Yu. Nemilova, K. S. Khachatryan, N. A. Mamonov, A. V. Shukhaev, A. A. Formanovsky y I. V. Pletnev, *Extraction-voltammetric determination of catecholamines with the use of new-class solvents, ionic liquids*, Moscow Univ. Chem. Bull., 45 (2004) 324–332.

79 C. He, S. Li, H. Liu, K. Li y F. Liu, *Extraction of testosterone and epitestosterone in human urine using aqueous two-phase systems of ionic liquid and salt*, J. Chromatogr. A, 1082 (2005) 143–149.

80 A. Soto, A. Arce y M. K. Khoshkbarchi, *Partitioning of antibiotics in a two liquid phase system formed by water and a room temperature ionic liquid*, Sep. Purif. Tech., 44 (2005) 242–246.

81 Q. Liu, J. Yu, W. Li, X. Hu, H. Xia, H. Liu y P. Yang, *Partitioning behaviour of penicillin G in aqueous two phase system formed by ionic liquids and phosphate*, Sep. Sci. Technol., 41 (2006) 2849–2858.

82 J. H. Wang, D. H. Cheng, X. W. Chen, Z. Du y Z. L. Fang, *Direct extraction of double-stranded DNA into ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and its quantification*, Anal. Chem., 79 (2007) 620–625.

83 R. Lucena, M. Cruz-Vera, S. Cárdenas y M. Valcárcel, *Liquid phase microextraction in bioanalytical sample preparation*, Bioanalysis, 1 (2009) 135-149.

84 M. A. Jeannot y F. Cantwell, *Solvent microextraction into a single drop*, Anal. Chem., 68 (1996) 2236-2240.

85 M. A. Jeannot y F. Cantwell, *Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle*, Anal. Chem., 69 (1997) 235-239.

86 Y. He y H. K. Lee, *Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe*, Anal. Chem., 69 (1997) 4634-4640.

87 J. Liu, G. Jiang, Y. Chi, Y. Cai, Q. Zhou y J. Hu, *Use of ionic liquids for liquidphase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons*, Anal. Chem., 75 (2003) 5870-5876.

88 L. Vidal, A. Chisvert, A. Canals y A. Salvador, *Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples*, Talanta, 81 (2010) 549-555.

89 F.Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, L. Vidal y A. Canals, *Speciation of mercury by ionic liquid-based single-drop microextraction combined with high performance liquid chromatography-photodiode array detection*, Talanta, 78 (2009) 537- 541.

90 J. L. Manzoori, M. Amjadi y J. Abulhassani, *Ultra-trace determination of lead in water and food samples by using ionic liquid-based single drop microextraction electrothermal atomic absorption spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 644 (2009) 48-52.

91 E. M. Martinis, P. Bertón, J. C. Altamirano, U. Hakala y R. G. Wuilloud, *Tetradecyl (trihexyl) phosphonium chloride ionic liquid single-drop microextraction for electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead in water samples*, Talanta, 80 (2010) 2034-2040.

92 L. Xia, X. Li, Y. Wu, B. Hu y R. Chen, *Ionic liquids based single drop microextraction combined with electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry for determination of Co, Hg and Pb in biological and environmental samples*, Spectrochim. Acta Part B, 63 (2008) 1290-1296.

93 J. Peng, J. Liu, G. Jiang, C. Tai y M. Huang, *Ionic liquid for high temperature headspace liquid-phase microextraction of chlorinated anilines in environmental water samples*, J. Chromatogr. A, 1072 (2005) 3-6.

94 C. Ye, Q. Zhou y X. Wang, *Headspace liquid-phase microextraction using ionic liquid as extractant for the preconcentration of dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites at trace levels in water samples*, Anal. Chim. Acta, 572 (2006) 165-171.

95 C. Ye, Q. Zhou, X. Wang y J. Xiao, *Determination of phenols in environmental water samples by ionic liquid-based headspace liquid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatograph*y, J. Sep. Sci,. 30 (2007) 42-4.

96 L. Vidal, E. Psillakis, C. E. Domini, N. Grané, F. Marken y A. Canals, *An ionic liquid as a solvent for headspace single drop microextraction of chlorobenzenes from water samples*, Anal. Chim. Acta, 584 (2007) 189-195.

97 Q. Zhou y C. Ye, *Ionic liquid for improved single-drop microextraction of aromatic amines in water samples*, Microchim. Acta, 162 (2008) 153-159.

98 E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cárdenas y M. Valcárcel, *Ionic liquid-based single drop microextraction and room-temperature gas chromatography for on-site ion mobility spectrometric analysis*, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 5580-5587.

99 J. Zhang y H .K. Lee, *Headspace ionic liquid-based microdrop liquid-phase microextraction followed by microdrop thermal desorption-gas chromatographic analysis*, Talanta, 81 (2010) 537-542.

100 A. Chisvert, I. P. Román, L. Vidal y A. Canals, *Simple and commercial readilyavailable approach for the direct use of ionic liquid-based single-drop microextraction prior to gas chromatography determination of chlorobenzenes in real water samples as model analytical application*, J. Chromatogr. A , 1216 (2009) 1290-1295.

101 S. Pedersen-Bjergaard y K. E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*, Anal. Chem., 71 (1999) 2650-2656.

102 J. Peng, J. Liu, X. Hu y G. Jiang, *Direct determination of chlorophenols in environmental water samples by hollow fiber supported ionic liquid membrane extraction coupled with high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1139 (2007) 165-170.

103 Y. Tao, J. Liu, X. Hu, H. Li, T. Wang y G. Jiang, *Hollow fiber supported ionic liquid membrane microextraction for determination of sulfonamides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 6259-6266.

104 J. Abulhassani, J. L. Manzoori y M. Amjadi, *Hollow fiber based-liquid phase microextraction using ionic liquid solvent for preconcentration of lead and nickel from environmental and biological samples prior to determination by electrothermal atomic absorption spectrometry*, J. Hazard. Mater., 176 (2010) 481-486.

105 C. Basheer, A. A. Alnedhary, B. S. Madhava Rao, R. Balasubramanian y H. K. Lee, *Ionic liquid supported three-phase liquid-liquid-liquid microextraction as a sample preparation technique for aliphatic and aromatic hydrocarbons prior to gas chromatography-mass spectrometry*, J. Chromatogr. A, 1210 (2008) 19- 24.

106 M. Rezaee, Y. Assadi, M. R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi y S. Berijani, *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*, J. Chromatogr. A, 1116 (2006) 1-9.

107 Y. C. Fan, Z. L. Hu, M. L. Chen, C. S. Tu y Y. Zhu, *Ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction of aromatic amines in water samples*, Chinese Chem. Lett., 19 (2008) 985-987.

108 L. He, X. Luo, H. Xie, C. Wang, X. Jiang y K. Lu, *Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water sample*, Anal. Chim. Acta, 655 (2009) 52-59.

109 M. T. Pena, M. Casais, M. C. Mejuto y R. Cela, *Development of an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples*, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 6356-6364.

110 R. Zhao, X. Wang, J. Sun, S. Wang, J. Yuan y X. Wang, Trace determination of triclosan and triclocarban in environmental water samples with ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction prior to HPLC–ESI-MS–MS, Anal. Bioanal. Chem., 397 (2010) 1627-1633.

111 Y. Wang, J. You, R. Ren, Y. Xiao, S. Gao, H. Zhang y A. Yu, *Determination of triazines in honey by dispersive liquid-liquid microextraction high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1217 (2010) 4241-4246.

112 L. M. R. Pérez, J. H. Borges, M. A. Ramos y M. A. R. Delgado, *Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas*, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 7336- 7345.

113 L. M. R. Pérez, J. H. Borges, A. V. H. Herrera y M. A. R. Delgado, *Pesticide extraction from table grapes and plums using ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction*, Anal. Bioanal. Chem., 395 (2009) 2387-2395.

114 C. Yao y J. L. Anderson, *Dispersive liquid-liquid microextraction using an in situ metathesis reaction to form an ionic liquid extraction phase for the preconcentration of aromatic compounds from water*, Anal. Bioanal. Chem., 5 (2009) 1491-1502.

115 S. Mahpishanian y F. Shemirani, *Preconcentration procedure using in situ solvent formation microextraction in the presence of ionic liquid for cadmium determination in saline samples by flame atomic absorption spectrometry*, Talanta, 82 (2010) 471-476.

116 Q. Zhou, H. Bai, G. Xie y J. Xiao, *Temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase micro-extraction*, J. Chromatogr. A, 1177 (2008) 43-49.

117 Q. Zhou, H. Bai, G. Xie y J. Xiao, *Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction*, J. Chromatogr. A, 1188 (2008) 148- 153.

118 Q. Zhou, H. Bai, G. Xie y J. Xiao, *Temperature-controlled ionic liquid-dispersive liquid-phase microextraction for preconcentration of chlorotoluron, diethofencarb and chlorbenzuron in water samples*, J. Sep. Sci., 32 (2009) 3945-3950.

119 R. S. Zhao, X. Wang, J. Sun, J. P. Yuan, S. S. Wang y X. K. Wang, *Temperature controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction for the sensitive determination of triclosan and triclocarban in environmental water samples prior to HPLC-ESI-MS/MS*, J. Sep. Sci., 33 (2010) 1842-1848.

120 P. Berton, E. M. Martinis, L. D. Martinez y R. G. Wuilloud, *Room temperature ionic liquid-based microextraction for vanadium species separation and determination in water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 640 (2009) 40-46.

121 H. Bai, Q. Zhou, G. Xie y J. Xiao, *Temperature-controlled ionic liquid-liquid-phase microextraction for the pre-concentration of lead from environmental samples prior to flame atomic absorption spectrometry*, Talanta, 80 (2010) 1638-1642.

122 M. Baghdadi y F. Sheminari, *Cold-induced aggregation microextraction: a novel sample preparation technique based on ionic liquids*, Anal. Chim. Acta, 613 (2008) 56-63.

123 M. Gharehbaghi, F. Shemirani y M. D. Farahani, *Cold-induced aggregation microextraction based on ionic liquids and fiber optic-linear array detection spectrophotometry of cobalt in water samples*, J. Hazard. Mater., 165 (2009) 1049-1055.

124 Q. Zhou, X. Zhang y J. Xiao, *Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid phase microextraction: a novel approach for the sensitive determination of aromatic amines in water samples*, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 4361-4365.

125 T. Mao, B. Hao, J. He, W. Li, S. Li y Z. Yu, *Ultrasound assisted ionic liquid dispersive liquid phase extraction of lovastatin and simvastatin: a new pretreatment procedure*, J. Sep. Sci., 32 (2009) 3029-3033.

126 S. Li, S. Cai, W. Hu, H. Chen y H. Liu, *Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for a sensitive determination of cadmium in water samples*, Spectrochim. Acta Part B, 64 (2009) 666-671.

127 R. P. Berladi y J. B. Pawliszyn, *The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns*, Water Pollut. Res. J. Can., 24 (1989) 179-191.

128 C. L. Arthur y J. Pawliszyn, *Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*, Anal. Chem,. 62 (1990) 2145–2148.

129 M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas y M. Valcárcel, *Sorptive microextraction for liquid chromatographic determination of drugs in urine*, Trends Anal. Chem., 28 (2009) 1164-1173.

130 H. Hsieh, P. Huang, I. Sun, T. Whang, C. Hsu, H. Huang y C. Kuei, *Nafion membrane-supported ionic liquid–solid phase microextraction for analyzing ultra trace PAHs in water samples*, Anal. Chim. Acta, 557 (2006) 321-328.

131 Y. He, J. Pohl, R. Engel, L. Rothman y M. Thomas, *Preparation of ionic liquid based solid-phase microextraction fiber and its application to forensic determination of methamphetamine and amphetamine in human urine*, J. Chromatogr. A, 1216 (2009) 4824-4830.

132 F. Zhao, Y. Meng y J. L. Anderson, *Polymeric ionic liquids as selective coatings for the extraction of esters using solid-phase microextraction*, J. Chromatogr. A, 1208 (2008) 1-9.

133 E. Wanigasekara, S. Perera, J. A. Crank, L. Sidisky, R. Shirey, A. Berthod y D. W. Armstrong, *Bonded ionic liquid polymeric material for solid-phase microextraction GC analysis*, Anal. Bioanal. Chem., 396 (2010) 511-524.

134 M. Valcárcel y A. Ríos, *The Hierarchy and Relationships of Analytical Properties*, Anal. Chem., 65 (1993) 781-*787*.

135 T. P. Pham, C. W. Cho y Y. S. Yun, *Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review*, Water Res., 44 (2010) 352-372.

136 Namk K. Aras y O. Yavuz Ataman, *Trace Element Analysis of Food and Diet*, The Royal Society of Chemistry (2006).

137 K. Heydon, Proceedings of the First International Conference on Elements in Health and Disease, Vol. 6, New Delhi, India (1983) 42.

138 W. Mertz en *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, W. Mertz (ed), Academic Press (1987).

139 EPA *Guidelines for Exposure Assessment*, Fed. Regst., (1986) 51, 34046. Ref 138

140 E. Frieden, *New perspectives on the essential trace elements*, J. Chem. Educ., 62(1985) 917-923.

141 G. N. Schrauzer, *Biochem. Of the Essential Ultratrace Elements*, E. Frieden (ed), Plenum press, New York (1984) 17.

142 World Health Organization, *Trace elements in human nutrition and health* (1996), parte 1: http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241561734/en/index.html; parte 2: http://whqlibdoc.who.int/publications/1996/9241561734_eng_Part2.pdf.

143 E. J. Underwood, *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 3ª ed, Academic Press, New York (1971).

144 H. Fleck, *Macrominerals and Microminerals, Introduction to Nutrition*, Macmillan, New York (1971) 172.

145 A. Kabata-Pendias, *Trace elements in soils and plants*, 4 ed. (2011), CRC Press.

146 J. Leboulanger, *Vitamine B12, in Les Vitamines, Biochimie, Mode d'action et Intérêt Thérapeutique*, Produits Roche S.A. (ed.), Editions SIF (1977) 153–162.

147 R. W. Dabeka y A. D. McKenzie, *Survey of lead, cadmium, fluoride, nickel, and cobalt in food composites and estimation of dietary intakes of these elements by Canadians in 1986-1988*, J. AOAC Int., 78 (1995) 897-909.

148 C. S. Alexander, *Cobalt-beer cardiomyopathy: A clinical and pathologic study of twenty-eight cases*, Am. J. Med., 53 (1972) 395-417.

149 M. Kirchgessner, A. Reichlmayr-Lais y R. Maier, en *Trace Elements in Man and Animals* - 5, C.F. Mills, I. Bremner y I.K. Chesters (eds), Farnham Royal, U.K., CAB International (1985) 147.

150 N. K. Veien y M. R. Andersen, *Nickel in Danish food*, Acta Derm. Venereol., 66 (1986) 502-9.

151 *Air Quality Guidelines for Europe 2000*, Full Background Material to WHO Regional Publications, European Series. No. 91 [CD-ROM], WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, 2001, Chapter 6.10 (Nickel), Table 1.

152 F. Pena-Pereira, I. Lavilla y C. Bendicho, *Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review*, Spectrochim. Acta Part B, 64 (2009) 1–15.

153 N. Hirayama, *Chelate Extraction of metals into ionic liquids*, Solvent extraction research and development, 18 (2011) 1-14

154 D. Han y K. Ho Row, *Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology*, Molecules 15 (2010) 2405-2426

155 A. Martín-Calero, V. Pino y A. M. Afonso, *Ionic liquids as a tool for determination of metals and organic compounds in food analysis*, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30, No. 10, 2011

156 E.M. Martinis, P. Berton, R.P. Monasterio, R.G. Wuilloud, *Emerging ionic liquid-based techniques for total-metal and metal-speciation analysis*, Trends in Analytical Chemistry, Vol. 29, No. 10, 2010

157 L. Xia, B. Hu, Z. Jiang, Y. Wu y Y. Liang, *Single-drop microextraction combined with low-temperature electrothermal vaporization ICPMS for the determination of trace Be, Co, Pd, and Cd in biological samples*, Anal. Chem., 76 (2004) 2910–2915.

158 N. Shokoufi, F. Shemirani y Y. Assadi, *Fiber optic-linear array detection spectrophotometry in combination with dispersive liquid–liquid microextraction for simultaneous preconcentration and determination of palladium and cobalt*, Anal. Chim. Acta, 597 (2007) 349–356.

159 M. Gharehbaghi, F. Shemirani y M. Baghdadi, *Dispersive liquid–liquid microextraction and spectrophotometric determination of cobalt in water samples*, Int. J. Environ. Anal. Chem., 88 (2008) 513–523.

160 H. Jiang, Y. Qin y B. Hu, *Dispersive liquid phase microextraction (DLPME) combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) for determination of trace Co and Ni in environmental water and rice samples*, Talanta, 74 (2008) 1160–1165.

161 P. X. Baliza, L. S. G. Teixeira y V. A. Lemos , *A procedure for determination of cobalt in water samples after dispersive liquid–liquid microextraction*, Microchem. J., 93 (2009) 220–224.

162 S. Jafarvand y F. Shemirani, *Supramolecular-based dispersive liquid-liquid microextraction: A novel sample preparation technique for determination of inorganic species*, Microchim. Acta, 173 (2011) 353-359.

163 M. Shirani Bidabadi, S. Dadfarnia, A. M. Haji Shabani, *Solidified floating organic drop microextraction (SFODME) for simultaneous separation/preconcentration and determination of cobalt and nickel by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS)*, J. Hazard. Mater., 166 (2009) 291–296.

164 P. Berton y R. G. Wuilloud, *Highly selective ionic liquid-based microextraction method for sensitive trace cobalt determination in environmental and biological samples*, Anal. Chim. Acta, 662 (2010) 155–162.

165 S. R. Yousefi y S. J. Ahmadi, *Development a robust ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction against high concentration of salt combined with flame atomic absorption spectrometry using microsample introduction system for preconcentration and determination of cobalt in water and saline samples*, Microchim. Acta, 172 (2011)75–82.

166 M. Amjadi, J. L. Manzoori y J. Abulhassani, *Ionic Liquid-Based, Single-Drop Microextraction for Preconcentration of Cobalt Before Its Determination by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*, J. AOAC Int., 93 (2010) 985-991.

167 H. Shirkhanloo, A. Rouhollahi y H. Z. Mousavi, *Preconcentration and determination of trace amount of nickel in water and biological samples by dispersive liquid–liquid microextraction*, J. Chin. Chem. Soc., 57(2010) 1035–1041.

168 R. G. Anderson y G. Nickless, *Heterocyclic azo dyestuffs in analytical chemistry. A review*, Analyst, 92 (1967) 207-238.

169 D. Betteridge, Q. Fernando y H. Freiser, *Solvent extraction of certain transition metal ions with 1-(2-pyridilazo)-2-naphtol*, Anal. Chem., 35 (1963) 294-298.

170 S. Shibata, *Solvent extraction and spectrophotometric determination of metals with 1 -(2-pyridylazo)-2-naphthol*, Anal. Chim. Acta, 25 (1961) 348-359.

171 R. Z. Zalups y J. Koropatnick (eds.), *Molecular Biology and Toxicology of Metals*, Taylor & Francis, New York (2000).

172 W. W. S. Nagh y M. A. K. M. Hanafiah, *Removal of heavy metal ions from waste water by chemically modified plant wastes as adsorbents: a review*, Bioresour. Technol., 99 (2008) 3935–3948.

173 U. Garg, M. P. Kaur, G. K. Jawa, D. Sud y V. K. Garg, *Removal of cadmium (II) from aqueous solutions by adsorption on agriculture waste biomass*, J. Hazard. Mater., 154 (2008) 1149–1157.

174 V. K. Gupta, P. J. Carrott, M. M. L. Ribeiro Carrott, J.S. Suhas, *Low cost adsorbents: growing approach to wastewater treatment – review*, Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., 39 (2009) 783–842.

175 A. Safavi, N. Iranpoor, N. Saghir y S. Momeni, *Glycerol–silica gel: A new solid sorbent for preconcentration and determination of traces of cobal (II) ion*, Anal. Chim. Acta, 569 (2006) 139-144.

176 A. Rajabi Khorrami, T. Hashempur, A. Mahmoudi y A. R. Karimi, *Determination of ultra trace amounts of cobalt and nickel in water samples by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry after preconcentration on modified C_{18}-silica extraction disks*, Microchem. J., 84 (2006) 75–79.

177 A. I. Yuzefovsky, R. F. Lonardo, M. H. Wang y R. G. Michel, *Determination of ultratrace amounts of cobalt in ocean water by laser-excited atomic fluorescence spectrometry in a graphite electrothermal atomizer with semi online flowinjection preconcentration*, J. Anal Atom. Spectrom., 9 (1994) 1195-1202.

178 G. D. Nielsen, U. Soderberg, P. J. Jorgensen, D. M. Templeton, S. N. Rasmussen, K. E. Andersen y P. Grandjean, *Absorption and Retention of Nickel from Drinking Water in Relation to Food Intake and Nickel Sensitivity*, Toxicol. Appl. Pharmacol., 154 (1999) 67-75.

179 G. Scansetti, G. Maina, G. C. Botta, P. Bambace y P. Spinelli, *Exposure to cobalt and nickel in the hard-metal production industry*, Int. Arch. Occup. Environ. Health, 71 (1998) 60-63.

180 http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/cobalt.html (acceso 14-III-2012).

181 http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=31396 (acceso 14-III-2012).

182 V. A. Lemos, E. M. Gama y A. da S. Lima, *On-Line Preconcentration and Determination of Cadmium, Cobalt and Nickel in Food Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry Using a New Functionalized Resin*, Microchim. Acta, 153 (2006) 179-186.

183 H. Matsumiya, T. Kageyama, M. Hiraide, *Multielement preconcentration of trace heavy metals in seawater with an emulsion containing 8-quinolinol for graphite-furnace atomic absorption spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 507 (2004) 205-209.

184 S. Cerutti, S. Moyano, J. A. Gasquez, J. Stripeikis, R. A. Olsina y L. D. Martinez, *On-line preconcentration of cobalt in drinking water using a minicolumn packed with activated carbon coupled to electrothermal atomic absorption spectrometric determination*, Spectrochim. Acta 58B (2003) 2015-2021.

185 B. Mikuła, B. Puzio, *Determination of trace metals by ICP-OES in plant materials after preconcentration of 1,10-phenanthroline complexes on activated carbon*, Talanta, 71 (2007) 136-140.

186 A. Sabarudin, N. Lenghor,M. Oshima, L. Hakim, T. Takayanagi,Y.H. Gao, S. Motomizu, *Sequential-injection on-line preconcentration using chitosan resin functionalized with 2-amino-5-hydroxy benzoic acid for the determination of trace elements in environmental water samples by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry*, Talanta, 72 (2007) 1609-1617.

187 Y. A. Zolotov and N. M. Kuzmin, in "*Preconcentration of Trace Elements*", Elsevier, Amsterdam (1990).

188 N. Shokoufi, F. Shemirani y F. Memarzadeh, *Fiber optic-linear array detection spectrophotometry in combination with cloud point extraction for simultaneous preconcentration and determination of cobalt and nickel*, Anal. Chim. Acta, 601 (2007) 204-208.

189 M. R. Jamali, Y. Assadi y F. Shemirani, *Homogeneous liquid–liquid extraction and determination of cobalt, copper, and nickel in water samples by flame atomic absorption spectrometry*, Sep. Sci. Technol., 42 (2007) 3503-3515.

190 H. Luo, S. Dai y P. V. Bonnesen, *Solvent Extraction of Sr^{2+} and Cs^{+} Based on Room-Temperature Ionic Liquids Containing Monoaza-Substituted Crown Ethers*, Anal. Chem., 76 (2004) 2773-2779.

191 R. Fortunato, C. A. M. Afonso, M. A. M. Reis y J. G. Crespo, *Supported liquid membranes using ionic liquids: study of stability and transport mechanisms*, J. Membr. Sci., 242 (2004) 197-209.

192 J.L. Manzoori, M. Amjadi y J. Abulhassani, *Ionic liquid-based single drop microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for the determination of manganese in water samples*, Talanta, 77 (2009)1539-1544.

193 M. Baghdadi y F. Shemirani, *In situ solvent formation microextraction based on ionic liquids: a novel sample preparation technique for determination of inorganic species in saline solutions*, Anal. Chim. Acta, 634 (2009) 186-191.

194 H. Abdolmohammad-Zadeh y G. H. Sadeghi, *A novel microextraction technique based on 1-hexylpyridinium hexafluorophosphate ionic liquid for the preconcentration of zinc in water and milk samples*, Anal. Chim. Acta, 649 (2009) 211-217.

195 W. Thanasarakhan, S. Liawruangrath, S. Wangkarn y B. Liawruangrath, *Sequential injection spectrophotometric determination of zinc(II) in pharmaceuticals based on zinc(II)-PAN in non-ionic surfactant medium*, Talanta, 71 (2007) 1849-1855.

196 M. G. Freire, L. M. N. B. F. Santos, A. M. Fernandes, J. A. P. Coutinho y I. M. Marrucho, *An overview of the mutual solubilities of water-imidazolium-based ionic liquids systems*, Fluid Phase Equilibr., 261 (2007) 449-454.

197 J. Ranke, A. Othman, P. Fan y A. Müller, *Explaining ionic liquid water solubility in terms of cation and anion hydrophobicity*, Int. J. Mol. Sci. 10 (2009) 1271-1289.

198 T. Katami, T. Hayukawa, M. Furukawa, S. Shibata y T. Hara, *Extraction and spectrophotometric determination of zinc in coal fly ash and pond sediments with 2-[2-(3,5-dibromopyridyl)azo]-5-dimethylaminobenzoic acid*, Anal. Chim. Acta, 188 (1986) 289-294.

199 Q. Wei y B. Du, *Rapid and selective method for the spectrophotometric determination of nickel naphthenate in gasoline in a microemulsion*, Talanta, 45 (1998) 957-961.

200 H. Watanabe, *Spectrophotometric determination of cobalt with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol and surfactants*, Talanta, 21 (1974) 295-302.

201 J. E. Madden, T. J. Cardwell, R. W. Cattrall y L. W. Deady, *Nafion-based optode for the detection of metal ions in flow analysis*, Anal. Chim. Acta, 319 (1996) 129-134.

202 A. Afkhami y M. Bahram, *H-point standard addition method for simultaneous spectrophotometric determination of Co (II) and Ni (II) by 1-(2-pyridylazo)2-naphthol in micellar media*, Spectrochim. Acta Part A, 60 (2004) 181-186.

203 M. Arab Chamjangali, G. Bagherian y G. Azizi, *Simultaneous determination of cobalt, nickel and palladium in micellar media using partial least square regression and direct orthogonal signal correction*, Spectrochim. Acta Part A, 62 (2005) 189–196.

204 S. Z. Mohammadi, D. Afzali y Y. M. Baghelani, *Flame Atomic Absorption Spectrometry Determination of Trace Amounts of Nickel Ions in Water Samples after Ligandless Ultrasound-assisted Emulsification Microextraction*, Anal. Sci., 26 (2010) 973-977.

205 A. Beiraghi, S. Babaee y M. Roshdi, *Simultaneous preconcentration of cadmium, cobalt and nickel in water samples by cationic micellar precipitation and their determination by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry*, Microchem. J., 100 (2012) 66–71.

206 M. Mirzaeia, M. Behzadi, N. Mahmoud Abadi y A. Beizaei, *Simultaneous separation/preconcentration of ultra trace heavy metals in industrial wastewaters by dispersive liquid–liquid microextraction based on solidification of floating organic drop prior to determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry*, J. Hazard. Mater., 186 (2011) 1739–1743.

207 P. X. Baliza, L. S. Gomes Teixeira y V. A. Lemos, *A procedure for determination of cobalt in water samples after dispersive liquid–liquid microextraction*, Microchem. J., 93 (2009) 220–224.

208 V. Kaur, J. S. Aulakh y A. K. Malik, *A new approach for simultaneous determination of Co(II), Ni(II), Cu(II) and Pd(II) using 2-thiophenaldehyde-3-thiosemicarbazone as reagent by solid phase microextraction–high performance liquid chromatography*, Anal. Chim. Acta, 603 (2007) 44-50.

Conclusiones

Las técnicas de microextracción, en sus múltiples manifestaciones, han despertado un gran interés en los últimos años en muchos campos de la Química Analítica. No solo permiten aislar el analito de la matriz para colocarlo en una fase adecuada a la técnica de detección sino que además, debido al efecto de preconcentración inherente, conducen a un extraordinario incremento en la sensibilidad de las técnicas analíticas compatibles. La espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS), como otras técnicas que trabajan de forma natural con microvolúmenes, resulta especialmente indicada para su acoplamiento a procesos de microextracción. La microextracción líquido-líquido dispersiva se ha seleccionado en esta Memoria por sus excelentes características: rapidez, sencillez, robustez, eficacia y versatilidad. Por otra parte, debido a sus peculiares características para la atomización, ETAAS admite quizás mejor que cualquier otra técnica la introducción de muestra sólida o en suspensión en el atomizador. Esto permite obviar la tediosa y peligrosa etapa previa de mineralización. Adicionalmente, cuando la introducción del sólido o suspensiones es problemática se pueden incluir procesos de lixiviado eficaces. La combinación de todas estas actuaciones está presente en el trabajo realizado en esta Memoria y nos permite proponer las siguientes conclusiones.

1. Se ha desarrollado una variante simplificada de DLLME basada en la extracción del analito por formación de un compuesto estable con la fase extractante y posterior dispersión con el empleo de ultrasonidos. La fase extractante, fosfato de tributilo, se muestra muy selectiva para la determinación de Cr(VI), especie de gran interés por sus importantes efectos nocivos para la salud. La determinación de cromo total (Cr(VI)+Cr(III)) resulta posible previa oxidación de Cr(III).

2. Alimentos infantiles comerciales con base de pescado adecuadamente suspendidos pueden introducirse directamente en el atomizador electrotérmico, lo que supone un im-portante ahorro en tiempo y reactivos, haciendo al procedimiento especialmente ade-cuado para el empleo en laboratorios de control rutinario que no disponen de técnicas analíticas mucho más sofisticadas y de alto precio. El estudio de la distinta capacidad de estabilización de las formas químicas de arsénico (As(III), As(V), MA, DMA y AB) por parte de diferentes modificadores químicos ha permitido desarrollar un protocolo que posibilita la realización rápida de un procedimiento de especiación semicuantitativo.

3. La importante presencia de distintas formas químicas de arsénico en el pescado nos ha despertado el interés por su determinación en aceites de o en contacto con pescado. Para ello se propone un procedimiento que permite la determinación de la fracción soluble de arsénico en muestras de aceite sin la mineralización previa de la muestra. El proce-dimiento pro-

puesto está basado en la microextracción de las especies solubles de arsé-nico de muestras de aceite comestible y complementos nutricionales de perlas de pes-cado en un pequeño volumen de fase acuosa con un elevado factor de preconcentración. Se presenta también un sencillo procedimiento para distinguir la naturaleza tóxica o no tóxica del arsénico extraído. Al mismo tiempo se caracterizan las fracciones polares y no polares de las formas de arséni-co contenidas en los aceites.

4. El arroz es otro alimento básico en muchos países con gran facilidad para acumular arsénico en distintas formas químicas. Se propone un procedimiento de extracción cuantitativa de As(III), As(V), MA, DMA y AB en harina de arroz mediante el empleo de un medio alcalino aportado por TMAH. La extracción de los analitos resultó completa con la colaboración de un medio hidroalcohólico, la temperatura y los ultrasonidos. Los analitos en el sobrenadante se separan por intercambio aniónico primero y catiónico después. Para aumentar la sensibilidad de la determinación se recurre a un procedimiento de preconcentración por microextracción dispersiva líquido-líquido. El resultado de este proceso es un descenso del LOD hasta 0.3 ng As por gramo de harina de arroz.

5. Una simplificación importante de la DLLME se puede conseguir con la formación in situ de líquidos iónicos inmiscibles con agua. De esta forma se consigue además un procedimiento más amigable con el medioambiente ya que no precisa del empleo de agente dispersante químico y tampoco ultrasonidos ni ciclos de calentamiento-enfriamiento. El método propuesto es simple, rápido y seguro y se ha aplicado a la determinación de cobalto y níquel en muestras de agua y cerveza.