



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
POSGRADO INSTITUCIONAL EN QUIMICA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

"DESARROLLO DE NUEVOS MICRO-PROCEDIMIENTOS
EXTRACTO-ESPECTROFOTOMETRICOS CON EMPLEO DE
ESTANDAR INTERNO PARA LA DETERMINACION DE
ALGUNOS IONES METALICOS EN MATERIALES DE
INTERES MEDIO AMBIENTAL Y CLINICO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS (QUIMICA)

P R E S E N T A :

GUSTAVO CRUZ JIMENEZ

GUANAJUATO, GTO.

AGOSTO DE 1999.

AGOSTO DE 1999.

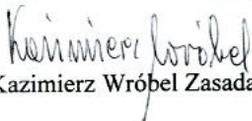
EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

El Q.F.B. Gustavo Cruz Jiménez agradece a *CONACyT*
la beca otorgada en el período Octubre 1997-Julio 1999
para la realización de este trabajo.

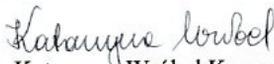
Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo titulado:

**“DESARROLLO DE NUEVOS MICRO-PROCEDIMIENTOS
EXTRACTO-ESPECTROFOTOMÉTRICOS CON EMPLEO DE
ESTÁNDAR INTERNO PARA LA DETERMINACIÓN DE
ALGUNOS IONES METÁLICOS EN MATERIALES DE
INTERÉS MEDIO AMBIENTAL Y CLÍNICO”**

ATENTAMENTE



Dr. Kazimierz Wróbel Zasada



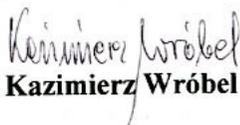
Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk

Guanajuato, Gto. a 6 de Agosto de 1999.

Los sinodales asignados como miembros del jurado para obtener el grado de Maestría en Ciencias con especialidad en Química que presenta el C. Q.F.B. Gustavo Cruz Jiménez.



Presidente : **Dra. Leticia López Martínez.**



Secretario: **Dr. Kazimierz Wróbel Zasada.**



Vocal: **Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk.**

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada, gracias a Dios, por haberme prestado vida, salud y fuerza para cumplir mis objetivos.

A mis queridísimos padres: Ma. Elena Jiménez González y Leobardo Cruz Rodríguez por todo el gran amor, comprensión y apoyo incondicional brindado. También con todo mi cariño a mis hermanos: Luzma, Sergio, Héctor, Silvia, Juan José y Martha Elena.

De una manera muy especial y con un profundo reconocimiento para los Dres. Wróbel: Kazimierz Wróbel Zasada y Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk por su valiosa asesoría para el desarrollo del presente trabajo y por el gran caudal de conocimientos ofrecido.

A los Dres.: Leticia López Martínez, Pedro Luis López de Alba, Uriel Estrada Robles e Irene Cano por sus consejos.

A todo el personal Académico y Administrativo del Instituto de Investigaciones Científicas y de la Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato.

A mis compañeros de trabajo en la Escuela de Minas y el Depto. de Informática de la Facultad de Química, que me proporcionaron su ayuda.

A mis maestros por el gran caudal de conocimientos proporcionados.

A todos aquellos que me proporcionaron su ayuda desinteresada para la realización satisfactoria del presente trabajo de tesis



DEDICATORIAS

El presente trabajo está dedicado, con todo mi cariño y amor a mis padres: Ma. Elena Jiménez González y Leobardo Cruz Rodríguez.

A mis hermanos: Luzma, Sergio, Héctor, Silvia, Juan José y Martha Elena. A mis cuñadas: Genoveva y Meche; mis cuñados: Marcos y Octavio. Para todos mis sobrinos: Mely, Leobardo, Sergio, Jéssica, Viri, Claudia, Alan, Vianey, Karen, Edgar, Octavio, Paola, Elena, Paco y Héctor. A mis abuelitos: Ernestina^º, Conchita^º, José^º y Juan.

Esta tesis va dedicada muy especialmente para mis asesores del Posgrado: Dr. Kázimierz Wróbel Zasada y Dra. Katarzyna Wróbel Kaczmarczyk.

Para mis amigos de la Generación "Perrones": Moncho, Bombín, Pedro, Oliva, Marrero, Hugo, Alonso, Toño, Armando, Liz, Quique, Ulises, Javier, Lucía, Chopan, Chilo, Vicky, Rosita, Moni, Dora, Caro, Irma y Maru. También para mis amigos del Posgrado: Laura Eugenia, Jesús, Maricela, Paco, Manuel V., Iliana, Edith y Lalo.

Para el Personal Académico y Administrativo del Instituto de Investigaciones Científicas. Asimismo, a todos mis Maestros que me impartieron clases durante el Posgrado.

A mis compañeros con los que comparto casa en Guanajuato: J. Alberto, Ricardo, Jack, Luis A., Adrián, Alfredo, Luis H., Arturo, Julio, Joel y Oscar.

A todos mis compañeros del Depto. de Informática de la Facultad de Química: Ramiro, Manuel Hernández, Manuel Medel y Felipe.

Para los Dres.: Leticia López M., Dr. Pedro Luis López, Uriel Estrada R. e Irene Cano.

Para la familia Méndez Ramírez y para la maestra Mari Arenas de la Facultad de Minas.

Finalmente, a todos mis amigos del Instituto y para mi amiga Lupita Medina.



ÍNDICE

	Pág.
CAPÍTULO I	
I. INTRODUCCIÓN	2
I.1. Efectos biológicos de hierro y del cobre	2
I.1.1. El cobre	2
I.1.2. El hierro.....	4
I.2. Resumen de los datos sobre farmacocinética y los contenidos normales de cobre y de hierro en el organismo humano y sobre sus niveles en el medio ambiente	5
I.3. Métodos analíticos para la determinación de cobre en aguas naturales y en fluidos biológicos	7
I.3.1. El método espectrofotométrico para la determinación de cobre	10
I.4. Revisión de los métodos analíticos en la determinación de hierro	12
I.4.1. Determinación de hierro (II) con batofenantrolina por espectrofotometría UV/VIS	16
I.5. Aplicaciones del método de estándar interno en química analítica	17
I.5.1. Espectrometría de emisión	20
I.5.2. Espectrometría de masas	23
I.5.3. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	24
I.5.4. Técnicas cromatográficas	26
I.5.5. Otras aplicaciones	28
I.5.6. Espectrofotometría UV/Vis	28
 CAPÍTULO II	
II. OBJETIVO	32
 CAPÍTULO III	
III. PARTE EXPERIMENTAL	34
III.1. Aparatos y equipo	34
III.2. Reactivos y disoluciones	35
III.2.1. Análisis de cobre	35
III.2.2. Análisis de hierro	36
 CAPÍTULO IV	
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
IV.1. Determinación de cobre	38
IV.1.1. Selección de estándar interno	38
IV.1.2. Procedimiento para el análisis de suero	40
IV.1.3. Procedimiento para el análisis de aguas naturales	44
IV.2. Determinación de hierro	48
IV.2.1. Procedimiento para el análisis de hierro total en aguas naturales	48

ÍNDICE (Continuación.....)

IV.2.2. Estudios de especiación de Fe(II)/Fe(III) en aguas naturales	61
CAPÍTULO V	
V. CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFÍA	71



ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Resumen de los datos sobre farmacocinética y sobre los contenidos normales de cobre y de hierro en el organismo humano	6
TABLA 2. Niveles promedio de Cu y de Fe en algunos materiales medio ambientales y niveles máximos permitidos (NMP) en agua potable establecidos por diferentes normas	6
TABLA 3. Algunos interferentes en el método de batocuproína y sus máximas concentraciones que no afectan la señal analítica (cambios aceptables de $\pm 2\%$)	11
TABLA 4. Algunas aplicaciones de las técnicas de espectrometría atómica en la determinación de hierro total en muestras medio ambientales	13
TABLA 5. Revisión de los procedimientos espectrofotométricos en la determinación de Fe(II)/Fe(III) en muestras medio ambientales	14
TABLA 6. Potenciales de reducción de diferentes formas de Fe(III) presentes en aguas naturales	16
TABLA 7. Ejemplos del uso de EI en la determinación de hierro y de cobre por espectrometría de emisión	22
TABLA 8. Algunas aplicaciones del método de EI en la determinación de hierro y de cobre utilizando espectrometría de masas	24
TABLA 9. Aplicación del método de EI en la determinación de Fe, Cu y otros elementos por técnicas cromatográficas	27
TABLA 10. Aplicaciones de EI en las técnicas instrumentales tales como espectrometría de Rayos X, técnicas electroanalíticas y de radioanálisis	29
TABLA 11. Parámetros analíticos en la determinación de cobre en suero evaluados sin y con empleo de estándar interno	42
TABLA 12. Parámetros instrumentales y experimentales en la determinación de cobre en suero y en aguas por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito	43
TABLA 13. Resultados de análisis de sueros de tres voluntarios sanos	44

ÍNDICE DE TABLAS (Continuación.....)

	Pág.
TABLA 14. Parámetros analíticos en la determinación de cobre en aguas naturales evaluados sin y con empleo de estándar interno	46
TABLA 15. Resultados de la determinación de cobre en muestras de agua subterránea	47
TABLA 16. Parámetros analíticos en la determinación de hierro total en agua naturales evaluados sin y con empleo de estándar interno	59
TABLA 17. Parámetros instrumentales y experimentales en la determinación de hierro en aguas naturales por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito	60
TABLA 18. Resultados de la determinación de hierro total en muestras reales por el procedimiento propuesto y por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito	60
TABLA 19. Constantes de formación global ($\log \beta$) de algunos ligantes con Fe(II) y Fe(III)	61



ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Efecto de la concentración de aliquat 336 en cloroformo (150µl) en los rendimientos de extracción del complejo Cu(I)-batocuproína (10 mg·l ⁻¹ Cu) y de azul de bromofenol (4·10 ⁻³ %). (Volumen de fase acuosa 1ml, pH 5.6)	39
FIGURA 2. Espectros de absorción A - de complejo de cobre con disulfato de batocuproína (3.5 mg·l ⁻¹ Cu), B - de azul de bromofenol(1.3·10 ⁻³ %) en presencia de 0.01 mol·l ⁻¹ de aliquat 336, utilizando la solución de aliquat en cloroformo como referencia	40
FIGURA 3. Espectros de las soluciones de calibración obtenidos en el procedimiento para el análisis de suero: (1) EI, (2) 0.67mg·l ⁻¹ Cu + EI, (3) 1.33 mg·l ⁻¹ Cu + EI, (4) 2.0 mg·l ⁻¹ Cu + EI.	42
FIGURA 4. Espectros de las soluciones de calibración obtenidas en el procedimiento para el análisis de aguas: (1) EI (azul debromofenol, 2·10 ⁻⁵ %), (2) 5.0µg·l ⁻¹ Cu + EI, (3) 10µg·l ⁻¹ Cu + EI, (4) 20µg·l ⁻¹ Cu + EI, (5) 30µg·l ⁻¹ Cu + EI, (6) 40µg·l ⁻¹ Cu + EI	45
FIGURA 5. Efecto de la concentración del ácido húmico en la señal analítica de 40µg·l ⁻¹ de Cu. (procedimiento propuesto para el análisis de aguas naturales).	47
FIGURA 6. Esquema general del procedimiento a desarrollar (determinación de hierro total en aguas naturales)	49
FIGURA 7. Estructuras moleculares del ión disulfonato de batofenantrolina, de azul de bromofenol, de erioglauцина A y de aliquat 336.	50
FIGURA 8. Espectros de absorción de complejo Fe(II)-batofenantrolina (0.2mg·l ⁻¹ de Fe) y de EI (8·10 ⁻⁵ % de azul de bromofenol) después de extracción a 0.03mol·l ⁻¹ aliquat 336 en cloruro de metileno. (Volumen de fase acuosa 10ml, volumen de fase orgánica 1.7ml, referencia cloruro de metileno)- (a) - espectros de cero orden; (b) - espectros derivados de segundo orden	52



ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación.....)

	Pág.
FIGURA 9. Efecto de pH en la señal analítica para $0.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe y $8\cdot 10^{-5}\%$ de EI. La señal fue obtenida después de extracción a $0.03\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ aliquat 336 en cloruro de metileno. (Volumen de fase acuosa 10ml, volumen de fase orgánica 1.7ml, referencia cloruro de etileno)	53
FIGURA 10. Efecto de la concentración de aliquat 336 en el rendimiento de extracción de: (♦) complejo Fe(II)-batofenantrolina ($0.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y (●) EI ($8\cdot 10^{-5}\%$ de azul de bromofenol). (Volumen de fase acuosa 10ml, volumen de fase orgánica 1.7ml)	54
FIGURA 11. Espectros de las soluciones de calibración (las concentraciones se refieren a la solución acuosa, antes de llevar a cabo el procedimiento): 1 - $10^{-3}\%$ EI; 2 - $10\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe(II) + EI; 3 - $20\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe(II) + EI; 4 - $40\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe(II) + EI; 5 - $50\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe(II) + EI. (a) - espectros de cero orden (b) - espectros derivados de segundo orden	56
FIGURA 12. El protocolo del procedimiento propuesto para determinación de hierro total en aguas naturales	58
FIGURA 13. Efecto de la concentración de enmascarante en la señal relativa de Fe(II)-batofenantrolina en el procedimiento para la determinación de hierro total (-●-) y de Fe(II) (-♦-) (condiciones en el texto). (a) Fluoruro de sodio (b) Acido oxálico (c) EDTA	64



GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Símbolo ó abreviatura	Significado
%	Porcentaje
λ	Longitud de onda
β	Constante de formación global del complejo
AES	Espectrometría atómica de emisión
Anal.	Analítica
ANOVA	Test estadístico por el análisis de varianza
Arc	Arco
BTAB	Bromuro de benciltributilamonio
CEASG	Comisión Estatal de Agua y Saneamiento de Guanajuato
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
col.	Colaboradores
comp.	Componente
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CV	Coefficiente de variación
DDS	Ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfónico
DE	Desviación estándar
DI	Dilución isotópica
DPD	N,N-dimetil-p-fenilelendiamina
DPKBH	di-2-piridil benzoilhidrazin cetona
DPPS	Disulfonato de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batofenantrolina sulfonada)
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EEC	Comunidad Económica Europea
EI	Estándar interno
EPA	Normas Ambientales de Estados Unidos (<i>Enviromental Protection Agency</i>)
ETA-AAS	Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito
FAAS	Espectrometría de absorción atómica con llama
FIA	Análisis por inyección en flujo
FID	Detector de ionización de llama
Fig.	Figura
GC	Cromatografía de gases
GD	Descarga eléctrica a baja presión (<i>glow discharge</i>)
ICP	Plasma acoplado inductivamente
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
Instr.	Instrumental
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LA	Evaporación por láser
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
LIF	Fluorescencia atómica con excitación por láser
Máx.	Máximo

Símbolo ó abreviatura	Significado
MID	Plasma de microondas
MS	Espectrometría de masas
n	Número de réplicas
NAA	Análisis por activación de los neutrones
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (USA)
NMP	Nivel Máximo Permitido por normas oficiales
NOM	Norma Oficial Mexicana
ODS	Octadecisilano (C ₁₈)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAPS	2-(5-nitro-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)-fenol
PIXE	Emisión de rayos X inducida por los protones
PLS	Método de mínimos cuadrados parciales
R ²	Coefficiente de regresión lineal
Ref.	Referencia
RMN	Resonancia magnética nuclear
RSD	Desviación estándar relativa
SRM	Material de referencia certificado
TCA	Ácido tricloroacético
T _{ebull}	Temperatura de ebullición
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
Vis	Visible
XRF	Fluorescencia de rayos X



CAPÍTULO I

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Efectos biológicos de hierro y del cobre.

I.1.1. El cobre.

El cobre es un metal de color rojizo con un punto de fusión de $1,083\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una densidad de $8.94\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$. En el estado elemental no es reactivo, pero con el tiempo, y en la presencia del CO_2 del aire libre se pasiva formando una película de carbonato básico de cobre (color verde). El metal se disuelve mejor en ácido nítrico. El ataque con ácidos clorhídrico o sulfúrico requiere de altas temperaturas.

El cobre no es muy abundante en la corteza terrestre, su contenido se aproxima a $70\text{g}/1000\text{kg}$ (ocupa el 25 lugar entre todos los elementos y el 17 entre los metales). En cuanto a sus formas químicas en la naturaleza, se presenta como cobre elemental, enlazado con azufre (sulfuro de cobre, Cu_2S , calcopirita CuFeS), con oxígeno (CuO ; cuprita, Cu_2O) o en forma de carbonatos (malaquita, $\text{CuCO}_3\cdot\text{Cu}(\text{OH})_2$ o azurita $2\text{CuCO}_3\cdot\text{Cu}(\text{OH})_2$). Los dos estados de oxidación son el +2 y el +1 [1].

Considerando el papel biológico del cobre, este elemento es necesario para el buen funcionamiento tanto de las plantas, como de los animales y el hombre. Las funciones biológicas del cobre en las plantas se relacionan con la síntesis de clorofila y con la actividad de diferentes enzimas que catalizan los procesos de óxido-reducción. Cabe mencionar, que tanto la deficiencia como el exceso de cobre en suelos y en aguas naturales afectan las plantas que crecen en este ambiente.

En el organismo humano, la principal función del cobre es su participación en la eritropoyesis. El cobre se utiliza para movilizar el hierro y es esencial para la formación de la hemoglobina, además se requiere para la modificación postraslacional de algunos componentes del tejido conjuntivo como el colágeno y la elastina.

El contenido total del cobre en el organismo de un adulto oscila entre 100 a 150 mg ; en músculos se encuentran aproximadamente 65 mg , en huesos 23 mg y en el hígado 18 mg [2]. En cuanto a la concentración de cobre en fluidos biológicos, el nivel normal en suero es de $0.8\text{-}1.2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [3]. Estos niveles pueden aumentar en el embarazo y cuando se ingieren anticonceptivos orales [4]. Cerca del 95% del cobre total en suero está unido a ceruloplasmina ($\alpha\text{-}2$ -globulina) y el resto se encuentra en otras formas fisicoquímicas menos estables (fracción "lábil"). La concentración en orina es mucho más baja que en suero (puede variar entre 15 y $45\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) [5]. Esto se debe al hecho de que solo una pequeña fracción del elemento se elimina por los riñones

debido a que la mayoría del cobre en el suero está unido a proteínas de alto peso molecular [2]. La ruta principal de excreción del cobre es por las vías biliares [6].

La ingesta de cobre diaria recomendada para un adulto es de 2.0-5.0 mg y 0.08 mg·kg⁻¹ de peso corporal para lactantes y niños, respectivamente [7]. Las fuentes principales de este elemento son los alimentos y el agua potable. Entre los alimentos ricos en cobre tenemos a los crustáceos, mariscos, hígado, riñones, sesos, nueces, leguminosas secas, aves de corral, uva pasa, cacao y cereales de grano entero [8]. La leche contiene normalmente 2 mg·l⁻¹ de cobre y el hígado de mamífero cerca de 80 µg·g⁻¹ [4].

De los datos que se acaban de presentar se ve claramente, que los efectos esenciales del cobre se presentan con contenidos bastante altos de este elemento en el organismo humano. Por tanto, el nivel de este elemento en agua potable, restringido como el nivel máximo permitido (NMP) por diferentes normatividades internacionales es considerablemente alto (2 mg·l⁻¹ establecido por la Organización Mundial de la Salud [3]). Cabe mencionar que, los niveles normales de cobre en aguas naturales son muy inferiores (del orden de µg·l⁻¹), pero el uso de tuberías de cobre en los sistemas de distribución del agua influye en que las concentraciones en el agua potable puedan ser más elevadas.

De acuerdo con la característica bien conocida de los elementos esenciales, existe solo un intervalo bien definido del contenido de cobre en el organismo humano, en el cual el elemento ejerce su efectos benéficos en la salud. La deficiencia de cobre puede causar alteraciones en el metabolismo de colágeno, desmineralización de huesos, anemia microcítica [8] y reducción de la producción de interleucina-2 por linfocitos T [9]. Se observan bajas concentraciones de cobre en nefrosis, fibrosis cística, kwashiorkor, enfermedad celíaca, síndrome de mala absorción, síndrome de Menkes y enfermedad de Wilson. Sin embargo cabe mencionar que se han reportado muy pocos casos de insuficiencia de cobre [4]. Por otro lado, la exposición a concentraciones elevadas de cobre a largo plazo conduce a una acumulación de cobre en el organismo. La acumulación excesiva de cobre en el citoplasma de hepatocitos causa disturbios en el sistema microtubular, causando retención de agua y la formación del hialino de Mallory [6]. Se ha reportado que un exceso de cobre es causa de hemólisis [10]. El cobre se ve incrementado en leucemias, enfermedad de Hodgkin, infarto del miocardio [4], leucoplasia oral y cáncer [11].

Aunque la toxicidad del cobre es generalmente baja, la ingestión de una dosis muy grande de cobre (del orden de 100 g) provoca una intoxicación aguda, que se manifiesta en cambios de la función hepática y renal [2]. La difusión plasmática del cobre y su distribución lisosomal sugieren que tiene un efecto citotóxico [12]. La evidencia de una toxicidad crónica es derivada de pacientes con enfermedad de Wilson y en casos de cirrosis infantil que están relacionados con una ingesta excesiva de cobre [6].

I.1.2. El hierro.

El hierro puro es un metal blanco, brillante, que funde a 1528 °C. En estado elemental, el hierro es muy reactivo. Se disuelve fácilmente en ácidos minerales, en el aire húmedo se oxida rápidamente dando un óxido hidratado que no lo protege porque se desprende exponiendo nuevas superficies a la oxidación. Se combina vigorosamente con el cloro al ser calentado suavemente en una atmósfera de este gas y también se combina con diversos no metales, incluso con los halógenos restantes, azufre, fósforo, boro, carbono y silicio.

En cuanto a su distribución en la corteza terrestre, el hierro es el cuarto elemento y el segundo metal (después del aluminio) más abundante (50 kg / 1000 kg). Los minerales de hierro más importantes son la hematita, Fe_2O_3 , la magnetita, Fe_3O_4 , la limonita $\text{FeO}(\text{OH})$ y la siderita, FeCO_3 . Los dos estados de oxidación más estables del hierro son el +2 y el +3 [13].

Las principales especies del hierro en el medio ambiente (óxidos y carbonatos) son poco solubles en agua, sin embargo sus hidróxidos forman soluciones coloidales y de esta manera se dispersan en el agua provocando su contaminación. Por otra parte, los óxidos o carbonatos del Fe (III) pueden solubilizarse como resultado de los procesos de reducción [14]. La cinética de las reacciones de oxidación es lenta y por eso las formas reducidas pueden persistir por algún tiempo en agua aireada a pH ligeramente ácidos ($\text{pH} < 6$). Como consecuencia de estos procesos, en las aguas corrientes naturales, los niveles de hierro se encuentran generalmente en un intervalo de 0.5 a 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Aunque durante los procesos de potabilización del agua, se elimina gran parte de hierro, su nivel en agua potable puede ser afectado por utilización de coagulantes de hierro (en el tratamiento de agua) o por la corrosión de las tuberías de acero y hierro fundido.

El hierro es uno de los elementos esenciales para el hombre. Su absorción en el organismo humano es regulada de acuerdo con las necesidades, de manera que se establece un balance entre la dosis ingerida y la cantidad eliminada del cuerpo. Las fuentes principales de hierro para el hombre son algunos alimentos (carne, hígado, espinacas, etc.) y el agua potable.

Como ya se ha mencionado, las especies mayoritarias de hierro en el medio ambiente y también en alimentos son poco solubles (hidróxido, fosfatos férricos, etc.), por lo que la absorción en el tracto digestivo se lleva a cabo en el estómago. La acidez del estómago solubiliza estos compuestos de Fe(III), los cuales se reducen al Fe(II) con ayuda de agentes reductores tales como ácido ascórbico (presente en los alimentos). En esta forma (Fe(II)), el hierro atraviesa la mucosa intestinal oxidándose a Fe(III). Posteriormente, es transportado en la sangre, donde aproximadamente 30-40% de hierro se encuentra unido a la transferrina, proteína transportadora, llegando a los lugares de almacenamiento (hígado), y el resto (60-70%) se encuentra en la hemoglobina. Su presencia es indispensable para la síntesis de hemoglobina y de ciertas enzimas redox, como citocromo oxidasa, catalasa, peroxidasa, etc.

La toxicidad del hierro es generalmente baja, la dosis letal reportada es entre 11 y 300 mg del hierro por kg de peso corporal, siendo los niños especialmente susceptibles a una sobredosis. Lógicamente, las sales solubles de hierro son más tóxicas que sus sales insolubles y los complejos estables, ya que el hierro iónico es el más biodisponible. La intoxicación aguda se manifiesta en vómitos, aletargamiento y coma, incluso se han mencionado diversos casos de muertes accidentales. A largo plazo, la sobrecarga corporal de hierro puede provocar lesión al hígado, a los órganos endocrinos y al corazón. Cabe mencionar, que la deficiencia de hierro provoca anemia microcítica hipocrómica [15].

Aunque la presencia de concentraciones elevadas de hierro en agua potable no parece ser directamente peligrosa para la salud del hombre, el hierro está incluido en las normativas de los niveles máximos permitidos tanto nacionales como internacionales. En primer lugar, niveles excesivos de hierro en el agua ($> 300 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) provocan mal sabor y mal olor, el agua deja manchas en los dientes, etc. Por otro lado, el hierro favorece el desarrollo de "bacterias del hierro" que obtienen su energía de la oxidación que transforma el hierro ferroso en hierro férrico y, durante el proceso, depositan un revestimiento viscoso en las tuberías.

1.2. Resumen de los datos sobre farmacocinética y los contenidos normales de cobre y de hierro en el organismo humano y sobre sus niveles en el medio ambiente.

Durante la búsqueda bibliográfica realizada, se encontró una serie de datos cuantitativos que permiten comparar la farmacocinética, los contenidos y los requerimientos en el organismo humano de los dos elementos estudiados [16]. Como se puede observar en la Tabla 1, el organismo de un adulto contiene más hierro que cobre, lo que refleja de alguna manera el papel biológico de los dos elementos. Por otro lado, el hierro se absorbe menos y se elimina más que el cobre, entonces su ingesta diaria tiene que ser más alta. De la comparación de los intervalos seguros en la dosis diaria de hierro y de cobre se puede ver que el hierro tiene un intervalo más amplio, lo que significa también que existe menor riesgo de intoxicación por el hierro.

En párrafos anteriores se mencionó que las principales fuentes de Cu y de Fe para el hombre son algunos alimentos y el agua potable. En la Tabla 2 se comparan los niveles promedio de estos dos elementos en materiales medio ambientales con las normativas vigentes de los niveles máximos permitidos (NMP) en agua potable establecidos por diferentes normas nacionales e internacionales [17,18,19].



Tabla 1 Resumen de los datos sobre farmacocinética y sobre los contenidos normales de cobre y de hierro en el organismo humano.

Parámetro	Hierro	Cobre
Contenido promedio en la dieta balanceada	10 – 15 mg/día	2.5 – 5 mg/día
Absorción en el tracto digestivo	10 – 15 %	50 – 80 %
Eliminación del cuerpo	1.2 – 2.0 mg/día	0.5 – 1.3 mg/día
Pérdidas durante menstruación	20 – 40 mg/periodo	0.1 – 0.8 mg/periodo
Contenido total en el organismo de un adulto	4 – 5 g	80 – 150 mg
Concentración en suero	0.6 – 1.2 mg/l	0.8 – 1.2 mg/l
INTERVALO SEGURO ESTIMADO EN LA DOSIS DIARIA	6 – 30 mg/día	1.5 – 7.0 mg/día

Tabla 2 Niveles promedio de Cu y de Fe en algunos materiales medio ambientales y los niveles máximos permitidos (NMP) en agua potable establecidos por diferentes normas.

	Hierro	Cobre
Suelo	Aprox. 30 000 mg/kg	Aprox. 50 mg/kg
Aguas naturales	1-1000 µg/l	Aprox. 0.5 µg/l
Agua de mar	≥ 10 ng/l	Aprox. 3.15 µg/l
NMP, NOM*	300 µg/l	2.0mg/l
NMP, OMS**	300µg/l	1.0mg/l
NMP, EPA***	300µg/l	1.0mg/l
NMP, EEC****	100µg/l	50µg/l

* - Norma Oficial Mexicana (NOM)[20].

** - Normas de la Organización Mundial para la Salud (OMS) [21].

*** - Normas de los Estados Unidos (EPA) [21].

**** - Normas de la Comunidad Europea (CEE) [21].



I.3. Métodos analíticos para la determinación de cobre en aguas naturales y en fluidos biológicos.

Los métodos analíticos utilizados para la determinación del cobre a nivel de trazas pueden clasificarse en dos grandes grupos: métodos espectrales, tanto atómicos como moleculares [22-28] y métodos electroanalíticos [22, 29-31]. Cabe mencionar que recientemente ha incrementado el número de procedimientos en sistema de flujo, donde se utiliza detección electroquímica o espectrométrica [32]. Se han reportado también los procedimientos que incluyen una etapa de separación cromatográfica, esto generalmente para estudios de especiación y análisis multielemental.

En cuanto a técnicas electroanalíticas, estas se aplican fácilmente en la determinación de cobre y de otros elementos traza en aguas naturales, pero en el caso de fluidos biológicos se observan importantes interferencias relacionadas con la presencia de materia orgánica, lo que hace necesario una mineralización previa de las muestras clínicas. Se han reportado diferentes sistemas de mineralización por vía húmeda utilizando mezclas de los ácidos (HCl/HNO₃ (3:1), HClO₄/HNO₃/H₂SO₄ (5:5:2) [33] y HNO₃/HClO₄ (5:1) [34]) y varios sistemas de calentamiento (bloque de calentamiento [34], energía de microondas [33]). Además de que la etapa de mineralización hace el procedimiento más largo y laborioso, esta etapa puede ser una fuente de errores analíticos. Por ello, las técnicas electroanalíticas no son las más adecuadas para llevar a cabo el análisis de muestras clínicas, sobre todo en laboratorios de rutina. Sin embargo, se han reportado procedimientos de especiación de cobre (determinación de la fracción "lábil") utilizando electrodos modificados con los ligandos de diferente poder de acomplejar el cobre. Estos ligandos orgánicos, como rojo de alizarina S, rojo de eriocromo B, batocuproína, etc., fueron inmovilizados en la película de tris-(4-metil-4'-vinil-2,2'-bipiridil) rubidio depositada en un electrodo de platino [35]. En el trabajo más reciente, el rojo de alizarina S, batocuproína y ácido acetilsalicílico fueron inmovilizados en la película de polipirrol depositada en un electrodo de carbono vítreo [36].

Las técnicas de espectrometría atómica son las más adecuadas para llevar a cabo la determinación de cobre y también de otros elementos traza tanto en aguas naturales como en fluidos biológicos. Su buena selectividad, el alto poder de detección y los pocos problemas de interferencias de matriz aseguran un resultado exacto y preciso en corto tiempo. En espectrometría de absorción atómica con horno de grafito el límite de detección para el cobre es 0.2 µg·l⁻¹, así que el suero puede diluirse hasta 100 veces disminuyendo de esta manera el contenido de interferencias posibles con proteínas, carbohidratos, sales inorgánicas, etc. En la dilución se utiliza agua desionizada o disoluciones de Tritón X-100 (0.1-0.2%) y de ácido nítrico (0.01-0.10 mol·l⁻¹). Entre los modificadores de matriz utilizados pueden mencionarse al nitrato de

paladio, nitrato de magnesio, nitrato de amonio y fosfatos de amonio [37-41]. Una desventaja de la espectrometría de absorción atómica es su carácter unielemental, por ello la espectrometría de emisión atómica con excitación en plasma acoplado inductivamente ofrece mejores condiciones para el análisis de rutina, ya que en una corrida de muestra se puede obtener la información sobre el contenido de una serie de elementos. En este caso el problema es la alta viscosidad de los fluidos biológicos, que disminuye el rendimiento de introducción de la muestra por medio de un nebulizador. Debido a que el límite de detección del cobre por espectrometría de emisión es del orden de $70 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, no es posible un alto factor de dilución, así que para disminuir la viscosidad de la muestra se ha propuesto el procedimiento de precipitación de proteínas con el ácido tricloroacético [42].

Otra alternativa para el análisis de cobre en aguas naturales y en fluidos biológicos es la espectrofotometría ultravioleta-visible (UV/Vis). En el caso del suero, la primera etapa es la desproteínización utilizando procedimientos de mineralización ($\text{HNO}_3/\text{HClO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ [43]; $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ [24]; $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ [44]) o precipitación de proteínas con ácido tricloroacético [45-47]. Entre los agentes cromogénicos utilizados pueden mencionarse a la rodamina B ($\lambda_{\text{max}}=555 \text{ nm}$) [37,45], ácido bicinorínico ($\lambda_{\text{max}1}=562 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}2}=345.5 \text{ nm}$) [46], disulfonato de batocuproína (sal disódica del ácido 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolindisulfónico) ($\lambda_{\text{max}}=484 \text{ nm}$) y disulfonato de batocuproína en presencia de derivados de fluoresceína ($\lambda_{\text{max}}=545 \text{ nm}$) [48,49]. Algunos autores han reportado un aumento de sensibilidad con adición de tensoactivos; por ejemplo el complejo de cobre con 1-(2-piridilazo)-2-naftol fue cuantificado en presencia de BTAB (bromuro de benciltributilamonio), ($\lambda_{\text{max}}=559 \text{ nm}$) [44] y el complejo con 2-(5-nitro-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)fenol (nitro PAPS) fue determinado en presencia de dodecil sulfato de sodio ($\lambda_{\text{max}}=560 \text{ nm}$) [50]. Cabe mencionar, que el zincón se utilizó para la determinación de cobre y zinc ($\lambda_{\text{max}}=620 \text{ nm}$), en este procedimiento se determinó en primer lugar la suma de dos iones y luego el zinc fue enmascarado con EDTA [47].

Se ha mencionado el uso creciente de procedimientos en flujo para la determinación de cobre en aguas naturales y en fluidos biológicos. Este tipo de procedimientos presenta una serie de ventajas frente a los procedimientos en sistema estacionario como son: rapidez, ahorro de los reactivos, posibilidad de separación/preconcentración en línea y fácil automatización. Geriotti y col. automatizaron el procedimiento (incluyendo etapa de precipitación de proteínas) de determinación de cobre en suero utilizando batocuproína [49]. El sistema de inyección en flujo fue utilizado también por Adachi y col. para la determinación de cobre en suero desproteínizado con ácido-4,4',4'',4'''-(21H, 23H-porfino-5,10,15,20-tetral) tetrabencensulfónico ($\lambda_{\text{max}}=413 \text{ nm}$) [53]. En un trabajo de Wada y col. se realizó la determinación directa de cobre en suero (sin

eliminación de proteínas) con ácido 4-metil-5-(sulfonometilamino)-2-(2-tiazolilazo)-benzoico ($\lambda_{an}=600$ nm) llegándose a correr hasta 60 muestras en una hora [52].

Otra de las ventajas de los procedimientos por inyección en flujo es la posibilidad de llevar a cabo el análisis multielemental. Así, en suero desproteínizado, el cobre fue determinado junto con zinc utilizando zincón como agente cromogénico ($\lambda_{max}=606$ nm) [53]. En primer lugar se cuantificó la suma de dos iones y para la cuantificación de zinc se adicionaba el flujo de tiourea al 5% enmascarando el cobre. La concentración de cobre fue obtenida como la diferencia de los dos resultados. Kang y col. determinaron cobre y hierro en suero utilizando dos miniceldas de flujo conectadas en línea y el espectrofotómetro de doble haz [54]. Los iones Cu(II) y Fe(II) forman el complejo con 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)anilina ($\lambda_{max}=558$ nm). Antes de llegar a la primera celda del espectrofotómetro, el hierro se oxida con KIO₄ en medio ácido y la señal obtenida corresponde al contenido de cobre en la muestra. Después se adiciona el flujo del ácido ascórbico y, en la segunda celda, se obtiene la señal invertida de Fe(II) y la señal positiva de Cu(II).

En el caso de agentes cromogénicos, cuyos complejos con iones de dos metales presentan diferentes bandas de absorción, se utilizaron los métodos de calibración multivariante. Hernández y col. desarrollaron el procedimiento por inyección en flujo para determinación directa simultánea de cobre y zinc en suero utilizando 4-(4'-metil-2'-tiazolilazo)-2-metilresorcinol (registro de espectros en la región 520-620 nm) y el método quimiométrico PLS (método de mínimos cuadrados parciales) [55]. Se han reportado también los procedimientos de análisis multielemental donde se utilizan dos agentes cromogénicos selectivos para los dos analitos a determinar. Así, el cobre y el hierro fueron determinados en suero desproteínizado utilizando respectivamente batocuproína y ferrozina [56]. Los espectros de los complejos formados fueron registrados en el intervalo de 390 hasta 590 nm y la cuantificación de cobre y hierro se llevó a cabo utilizando el programa de computo ORTHO. Debido a la selectividad limitada de los agentes cromogénicos mencionados, el método fue válido para las muestras donde la relación molar entre el cobre y el hierro variaba entre 1:10 y 10:1.

Como se ha mencionado al principio, en la determinación de cobre en fluidos biológicos, se han utilizado también los procedimientos cromatográficos. Nagaosa y col. separaron el cobre en forma de su complejo con dietilditiofosfato en la columna ODS utilizando acetonitrilo con tampón de acetatos (3:2, pH 4.6) como fase móvil y la detección electroquímica (0.4V *versus* Ag/AgCl). En el análisis de suero se obtuvo el límite de detección de 3 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [57]. Utilizando una columna de filtración en gel y detección electroquímica (electrodo de carbono vítreo recubierto con una película de polianilina, -0.10V, *versus* Ag/AgCl), Ye y col. determinaron la fracción del cobre unida a ceruloplasmina en suero [58]. Las técnicas cromatográficas han sido utilizadas también para el análisis multicomponente. Así, Nagaosa y col. separaron el Cu(II) y el Fe(III) en

suero desproteinizado, después de derivación de los iones con 8-hidroxiquinoleína, utilizando columna ODS y detección electroquímica [59].

Finalmente, es necesario mencionar que entre los métodos normalizados para la determinación del cobre se encuentran: el método por espectrometría de absorción atómica; el método de espectrometría atómica de emisión con excitación en plasma acoplado inductivamente y el método espectrofotométrico [60]. En espectrometría atómica la determinación del cobre en suero y en aguas naturales se realiza en muestras diluidas con agua. En el método espectrofotométrico se aprovecha la formación del complejo del ión cobre con disulfonato de batocuproína (sal disódica del ácido 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolindisulfónico), el cual tiene color naranja y es soluble en agua.

Debido al alto costo y al requerimiento de un analista entrenado, el método espectrofotométrico es el más adecuado para los laboratorios de rutina.

1.3.1. El método espectrofotométrico para la determinación de cobre.

Los complejos de cobre y de hierro con derivados de fenantrolina presentan una alta estabilidad con absorptividades molares de aproximadamente $12,000$ a $23,000 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$ lo que asegura alta sensibilidad en la determinación espectrofotométrica de estos iones. Smith y Wilkins [61] utilizaron la batocuproína (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-fenantrolina) como agente cromogénico selectivo para el cobre. Sin embargo, la batocuproína presenta el inconveniente de ser insoluble en agua; lo que hacía necesario una extracción en fase orgánica. Además en soluciones neutras un exceso de reactivo tendía a la precipitación formándose un complejo insoluble en agua. Zak resolvió este problema de la insolubilidad sulfonando la batocuproína, (proceso de derivación) con lo cual también se eliminó la turbidez de las soluciones [62].

En el método normalizado actual se utiliza disulfonato de batocuproína. Para el análisis de aguas naturales, la muestra es diluida con agua y, en el caso del suero, la muestra se trata con ácido clorhídrico y se calienta en un baño de agua hasta cerca del punto de ebullición durante 5 minutos. Se enfría la muestra y se le adiciona ácido tricloroacético al 10% para precipitar las proteínas. Después de la centrifugación, al sobrenadante se le adiciona ácido ascórbico (puede usarse también clorhidrato de hidroxilamina [61]) para reducir el cobre a su estado de oxidación Cu(I). Se adiciona el sulfonato de batocuproína mezclando muy bien. El complejo se forma en el intervalo de pH 3.5 a 11.0 y el pH recomendado es entre 4 y 5. El complejo tiene color naranja ($\lambda_{\text{max}}=485 \text{ nm}$) con un coeficiente de absorptividad molar de $12,250 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$. El método puede aplicarse al cobre hasta al menos $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ con una sensibilidad de $20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ utilizando una celda de 5 cm [60].

El método de la batocuproína presenta algunas interferencias; incluidas en Tabla 3 que pueden tolerarse con un error inferior a 2% [60].

Tabla 3. Algunos interferentes en el método de batocuproína y sus máximas concentraciones que no afectan la señal analítica (cambios aceptables de $\pm 2\%$).

Sustancia	Concentración $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Cationes	
Aluminio	100
Berilio	10
Cadmio	100
Calcio	1000
Cobalto (II)	5
Cromo (III)	10
Estroncio	200
Hierro (II)	100
Hierro (III)	100
Litio	500
Magnesio	100
Manganeso (II)	500
Níquel (II)	500
Sodio	1000
Torio (IV)	100
Zinc	200
Aniones	
Clorato	1000
Cloruro	1000
Fluoruro	500
Nitrato	200
Nitrito	200
Ortofosfato	1000
Perclorato	1000
Sulfato	1000
Compuestos	
Alquil sulfonato lineal (ASL)	40
Cloro residual	1
También pueden interferir cianuro, tiocianato, persulfato y EDTA.	

I.4. Revisión de los métodos analíticos en la determinación de hierro.

El análisis directo de hierro total en los materiales medio ambientales puede realizarse solamente utilizando técnicas de espectrometría atómica o espectrometría de masas. Por el contrario, los métodos espectrométricos moleculares y electroanalíticos permiten cuantificar uno de los dos estados de oxidación del hierro (Fe(II) o Fe(III)). Generalmente, estos métodos se basan en la reacción de una de las formas de hierro (óxido-reducción, formación de complejo, propiedades catalíticas, etc.). Cabe mencionar que la selectividad de los métodos reportados no siempre es buena, ya que la reacción empleada puede afectar la especiación natural de hierro en la muestra. Por ejemplo, si se forma un complejo de Fe(II) espectrofotométricamente activo, esta reacción influye en la posición de equilibrio entre Fe(II)/Fe(III) en la muestra provocando desplazamiento de dicho equilibrio hacia la formación de Fe(II). Los procedimientos analíticos para la determinación de hierro total siempre incluyen una etapa de pre-reducción o pre-oxidación de analito con el fin de obtener todo el hierro presente en la muestra en un estado de oxidación determinado.

En cuanto a las técnicas de espectrometría atómica, estas son excelentes herramientas analíticas, ya que ofrecen muy buena selectividad y sensibilidad en la determinación de hierro. En la Tabla 4 se resumen algunas aplicaciones reportadas en la bibliografía para el análisis total. Por otro lado, se han reportado los métodos de especiación de Fe(II)/Fe(III) utilizando las técnicas de espectrometría atómica o espectrometría de masas como detectores específicos de átomos (iones). Dependiendo del procedimiento de separación, ha sido posible no solamente la cuantificación de los dos estados de oxidación de hierro, sino también la identificación y la cuantificación de otras formas y especies presentes en la muestra tales como, fracción unida a sustancias húmicas y/o complejos con diferentes ligandos. Así que la lixiviación, filtración y/o extracción han sido utilizadas para caracterizar la distribución de hierro entre diferentes fracciones en sedimentos y suelos [63-65]. Se han reportado los procedimientos utilizando técnicas de separación cromatográficas para el análisis de Fe(II)/Fe(III) [66-69], así como para la cuantificación de algunos complejos de hierro (tartratos, citratos, etc.) presentes en muestras medio ambientales [70,71].



Tabla 4. Algunas aplicaciones de las técnicas de espectrometría atómica en la determinación de hierro total en muestras medio ambientales.

Muestra	Analitos	Técnica anal.	Procedimiento	Parámetros analíticos	Ref.
Agua salada	Fe, Mn	FAAS	Análisis directo	LD _{Fe} = 38 µg/l	72
Agua de río, Agua de mar	Fe, Co, Cu y otros	ICP-AES	Preconcentración via extracción	LD _{Fe} = 0.6 µg/l	73
Sedimentos	Fe, Si, Al	<i>Slurry</i> ETA-AAS	Análisis directo		74
Sedimentos	Fe, Ca, Mg	<i>Slurry</i> ETA-AAS	Análisis directo		75
Plantas	Fe, Mn, Cu y otros	ICP-AES	Mineralización por vía húmeda	LD en intervalo 10 – 500 µg/l	76
Vegetales	Fe, Zn, Mg y otros	<i>Slurry</i> FIA-FAAS	Análisis directo	LC = 12.4 µg/g	77
Suelos	Fe, Mn, Cu y otros	LA-ICP-AES	Análisis directo	RSD en intervalo 4.9 – 12.7 %	78
Sedimentos	Fe, Al, Cu y otros	ETA-AAS	Mineralización por vía húmeda	LD en intervalo 5 – 25 ng/g	79
Agua de lluvia	Fe, Cd, Cu y otros	ICP-AES	Preconcentración en minicolumna	LD en intervalo 0.2 – 1 µg/g	80
Agua de mar	Fe, Cd, Cu y otros	ETA-AAS	Preconcentración en minicolumna	LD en intervalo 0.36 – 2.04 ng/l	81
Agua de mar	Fe, Ni, Pb y otros	FIA-ICP-MS	Preconcentración en minicolumna	LD _{Fe} = 47 ng/l	82
Agua	Fe	LIF	Análisis directo	LD = 5 µg/l	83
Agua mineralizada	Fe, Ni, Co y otros	ICP-AES	Preconcentración en minicolumna	LD en intervalo 0.1 – 3.0 µg/l	84
Agua de mar	Fe, Cd, Pb y otros	ETA-AAS	Preconcentración en minicolumna	LD _{Fe} = 25 ng/l	85

FAAS – espectrometría de absorción atómica con llama FIA – análisis por inyección en flujo

ETA-AAS – espectrometría de absorción atómica con horno de grafito

Slurry – introducción de la muestra en forma de suspensión

ICP-AES – espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.

LIF – fluorescencia atómica con excitación por láser.

LA – evaporación por láser.

Considerando las técnicas espectrométricas moleculares, la mayoría de los procedimientos reportados utiliza espectrofotometría UV/Vis con diferentes agentes quelantes. Como puede observarse en la Tabla 5, estos agentes quelantes reaccionan selectivamente con un estado de oxidación de Fe (principalmente con Fe(II)) permitiendo el análisis de especiación. Para obtener la información sobre el contenido total, es necesario transformar todo el hierro presente en la muestra a un estado de oxidación. Si se procura realizar el análisis a nivel de trazas, los métodos espectrofotométricos a menudo incluyen una etapa de preconcentración [86, 87]. Además de una sensibilidad moderada, otra limitación de estos procedimientos son las interferencias de matriz y un posible cambio de especiación Fe(II)/Fe(III) en la muestra analizada debido a formación del complejo o debido al ajuste del pH. Por ejemplo, en el método con 2,2',2''-tripiridina la reacción se lleva a cabo a pH 9,6 [88], mientras que el pH de aguas naturales normalmente se encuentra en un intervalo de 6 a 8.

Tabla 5. Revisión de los procedimientos espectrofotométricos en la determinación de Fe(II)/Fe(III) en muestras medio ambientales.

Analito	Agente quelante	λ_{max} nm	LD	Interferencias	Ref.
Fe(II)	1,10 - fenantrolina	510	20 $\mu\text{g/l}$	CN ⁻ , NO ₂ ⁻ , fosfatos, Co, Cu, Ni, Cr, Zn	88,89
Fe(II)	2,2',2''-tripiridina	555	20 $\mu\text{g/l}$	CN ⁻ , NO ₂ ⁻ , fosfatos, cambio de pH	88
Fe(II)	2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropil-amino) anilina	558	2.2 $\mu\text{g/l}$		90
Fe(II)	Ferrozina	562	5.6 $\mu\text{g/l}$	Cu(I)	91-94
Fe(II), Fe(III)	di-2-piridil benzoilhidrazin cetona (DPKBH)	375, 660 390, 680	5.6 $\mu\text{g/l}$ 0.22 $\mu\text{g/l}^*$	Zn, Cu, Ni	95-97
Fe(II)	Disulfonato de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (DPPS)	535	0.01 $\mu\text{g/l}^*$		86
Fe(III)	1-amino-4-hidroxiantraquinona	640	1.1 mg/l	Cambio de pH	98

*- después de preconcentración.

Entre los agentes quelantes para el Fe(II) se menciona el disulfonato de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina (batofenantrolina, DPPS), el cual forma también complejos con Ni, Cu, Zn y Cd. Sin embargo, la formación de complejos depende de pH y cada uno de ellos presenta diferente espectro de absorción [99]. De hecho, Baraj y col. [100] aprovecharon las diferencias en los

espectros de los complejos de Cu ($\lambda_{\text{max}}=425\text{nm}$) y de Fe ($\lambda_{\text{max}}=535\text{nm}$) y con ayuda de un diseño factorial, lograron la determinación simultánea de los dos iones. Cabe mencionar, que el método con DPPS es ampliamente utilizado en la determinación de hierro en suero [101-103]. Por otro lado, se ha reportado la inmovilización del reactivo en las membranas de polivinilo para preconcentración de hierro en las muestras de aguas. El complejo formado en la membrana fue cuantificado espectrofotométricamente con un límite de detección de $14 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [104, 105]. El DPPS ha sido también utilizado para formar complejos con Fe(II) y Cu(I), los cuales posteriormente fueron separados por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de fase reversa, obteniéndose el límite de detección para hierro de $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [106]. Otros autores obtuvieron la separación cromatográfica (CLAR, fase reversa) de complejos de Fe, Ni y Cu con DPPS con los límites de detección en agua del mar respectivamente $2.67 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, $5.42 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $18.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [107].

Se ha reportado un importante número de métodos, donde la determinación espectrofotométrica de hierro se basa en el efecto catalítico de este ión. Por ejemplo, Hirayama y col. utilizaron la reacción de oxidación de N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DPD) con peróxido de hidrógeno, catalizada por iones Fe(III). Este método se basa en el hecho de que la concentración de forma oxidada de DPD, que absorbe en la región visible, depende del tiempo y de la concentración del ión Fe(III) en la solución. El límite de detección reportado fue de $0.23 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [108]. Otros autores utilizaron la reacción de oxidación del ácido sulfanílico con peryodato de potasio y observaron que la actividad catalítica de Fe(III) aumenta en presencia de un surfactante catiónico (cloruro de cetilpiridinio), lo que permitió obtener un límite de detección para Fe(III) de $0.15 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [109]. El efecto catalítico del complejo Fe(III) con EDTA en la reacción de oxidación de hidroxilamina por oxígeno disuelto ha sido utilizado por Cladera y col. [110] en un procedimiento por inyección en flujo ($\text{LD } 2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Hay que mencionar, que el Fe(III) está presente en las muestras medio ambientales no solamente en forma iónica (puede estar unido a sustancias húmicas, en forma de complejos), por lo que los resultados de los procedimientos espectro-catalíticos pueden ser erróneos.

Por último, entre los métodos espectrales moleculares utilizados en la determinación de estados de oxidación de hierro hay que mencionar procedimientos quimiluminiscentes [111,112] y espectrofluorimétricos [113]. En cuanto a los procedimientos por quimiluminiscencia, se utilizaron las reacciones entre la sulfoflavina brillante, agua oxigenada y Fe(II) [101] o la reacción de luminol con agua oxigenada en presencia de Fe(III) [112]. En los dos trabajos se llevó a cabo la etapa de preconcentración y se reportaron muy buenos límites de detección ($25 \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ [111], $2.8 \text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ [112]) que podrían todavía mejorarse utilizando mayor volumen de muestra (agua de mar). En la determinación espectrofluorimétrica de hierro, Yan y col. [113]

aprovecharon las propiedades fluorescentes del complejo de Fe(III) con 5-(4-metilfenilazo)-8-aminoquinolina en presencia de surfactantes. El límite de detección reportado fue de $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Las técnicas electroanalíticas han sido aplicadas en el análisis de Fe(II)/Fe(III) en aguas naturales [114-116] y en algunos materiales biológicos [117]. Se han reportado mejores características analíticas para los procedimientos por voltametría utilizando la técnica de *stripping*. Gracias a largos tiempos de depositación (2-5 min), los límites de detección para Fe(III) fueron de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [115] o de $11.2 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$ [118]. Algunos autores aprovecharon la formación de complejos de Fe(II) o Fe(III) para la preconcentración de estos iones en el electrodo. Así, Zhiqiang y col. [119] modificaron electrodo de carbono con una película de Nafion con 1,10-fenantrolina y, utilizando 5 min para preconcentración de Fe(II), lograron un límite de cuantificación de $0.6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Los agentes complejantes utilizados en el análisis de Fe(III) por voltametría fueron 4-(2-piridilazo)resorcinol [118] y 2-(2-tiazolilazo)-4-metilfenol [115]. Una desventaja importante de las técnicas electroanalíticas es el alto riesgo de interferencias. Por ello, el análisis de hierro total en una muestra medio ambiental requiere de un tratamiento para obtener el hierro en una forma química que se encuentre en un ambiente químico simple. En los estudios de especiación, el análisis tiene que ser llevado a cabo directamente en la muestra o con un tratamiento mínimo. En este caso, hay que recordar que las especies diferentes de Fe(III) presentes por ejemplo en aguas naturales presentan potenciales de reducción muy diferentes respecto a potencial del sistema Fe(III)/Fe(II) (Tabla 6) y esto puede provocar resultados analíticos erróneos.

Tabla 6. Potenciales de reducción de diferentes formas de Fe(III) presentes en aguas naturales [120].

Sistema	Potencial de reducción
Fe(III)/Fe(II)	0.77V
Fe(OH) ₃ /Fe(II)	-0.07V
α -Fe ₂ O ₃ (hematita)/Fe(II)	-0.27V

Resumiendo, hay que mencionar que los métodos oficiales de determinación de hierro en materiales medio ambientales incluyen los métodos de análisis clásico (gravimetría y valoraciones redox), el método espectrofotométrico y el método por espectrometría de absorción atómica [121]. La selección de un método adecuado depende de tipo de muestra a analizar, de los niveles de hierro esperados y del objetivo de este análisis (contenido total o especiación). De la revisión bibliográfica realizada puede verse claramente, que las herramientas más potentes son las técnicas de espectrometría atómica o de espectrometría de masas. Sin embargo, el alto costo de análisis limita el uso de estos métodos. Por otro lado, los métodos espectrofotométricos

ofrecen muy buena exactitud y precisión de los resultados. Aunque su sensibilidad es generalmente moderada y no permite la determinación de hierro a nivel de trazas, el uso de los procedimientos de preconcentración ayuda eliminar esta limitación.

I.4.1. Determinación de hierro (II) con batofenantrolina por espectrofotometría UV/Vis.

La batofenantrolina (4,7-difenil-1,10-fenantrolina) es un agente complejante que permite la determinación de Fe(II) con muy buena sensibilidad [122]. Este reactivo, de manera semejante a la batocuproína utilizada para cobre, es poco soluble en agua. Sin embargo, el derivado sulfonado (disulfonato de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, DPPS) es muy soluble en agua y presenta propiedades acomplejantes semejantes al compuesto original [61].

El procedimiento analítico para determinación de hierro total en agua consiste en adicionar a la muestra hidroxilamina, ajustar el pH a 5.5 con el tampón de acetatos (el complejo se forma en un intervalo de pH 2-11) y adicionar el reactivo acomplejante (en exceso por lo menos de 10:1 respecto a hierro). El complejo formado tiene composición aproximada de Fe:DPPS = 1: 3.17, presenta máximo de absorción en la región visible ($\lambda_{\max} = 535\text{nm}$) con un coeficiente de absortividad molar $\epsilon = 22,140 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$. El rango lineal reportado fue hasta $3.6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$. En cuanto a las posibles interferencias, estas fueron observadas en presencia de exceso de agentes oxidantes tales como Cr(VI), $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ o ClO_4^- , o bien, en presencia de un gran exceso de iones Cu, Co, Ni y Zn [61].

I.5. Aplicaciones del método de estándar interno (EI) en química analítica.

La elección de una técnica de calibración es uno de los puntos clave en el desarrollo de un nuevo procedimiento analítico, ya que la exactitud y la precisión de los resultados analíticos dependen en gran manera de esta etapa. Por un lado, la calibración puede ser afectada por varios parámetros instrumentales (ruido, características de la fuente de luz, intensidad de campo electromagnético, etc.), pero también por las propiedades de la muestra (interferencias de matriz) y/o por el procedimiento analítico previo a la etapa de medición (dilución, preconcentración, etc.) [123,124]. Por estas razones, el procedimiento de calibración debería de llevarse a cabo en condiciones parecidas al análisis de las muestras. El caso ideal sería asegurar las mismas condiciones instrumentales, el mismo tratamiento de muestras y de las soluciones de calibración y el idéntico "ambiente químico" del estándar y de analito en la solución donde se realiza la medición. Tres técnicas de calibración más comúnmente utilizadas son: calibración con estándares externos (curva de calibración), adición de estándar y el método de estándar interno.

Sin duda, la calibración con estándares externos es la más utilizada [125]. Hay que recordar sin embargo, que se obtienen los resultados exactos únicamente en casos cuando no existen interferencias de matriz. Por otra parte, si las interferencias en una muestra dada son bien caracterizadas y no dependen críticamente de la concentración del interferente, estas pueden ser controladas adicionando el mismo interferente a las soluciones de calibración. Tal es el caso de interferencias observadas en la determinación de los elementos traza en suero humano por espectrometría de absorción atómica. La adición de albúmina (componente mayoritario de la muestra) a las soluciones de calibración permite simular su composición respecto a muestras reales y de esta manera asegurar el mismo mecanismo de atomización y obtener los resultados exactos.

El método de adición de estándar se recomienda cuando no es posible suprimir interferencias de matriz. En este método, el estándar se adiciona directamente a las muestras, lo que asegura el mismo ambiente químico para el analito y para el estándar. De esta manera, los interferentes presentes en la muestra afectan de igual manera las señales del analito adicionado (estándar) y del analito presente en la muestra [123]. Esto a su vez, asegura la misma sensibilidad para las dos formas del compuesto (ión, elemento) analizado. Además, el proceso de calibración y de cuantificación del analito en la muestra se lleva a cabo en el mismo ciclo de medida, por lo que disminuyen los errores debido a posible cambio en las condiciones instrumentales. La desventaja importante del método de adición de estándar es que no pueden eliminarse las interferencias aditivas (por ejemplo espectrales). En otras palabras, si las posibles interferencias son de carácter químico (afectan la pendiente de la curva de calibración), el método funciona bien. Sin embargo, si las interferencias causan un error constante en cada una de las soluciones (constante contribución espectral de un componente de la muestra en las condiciones de lectura de la señal del analito), la curva de adición de estándar tiene la misma pendiente que la curva de calibración, pero se traslada en el eje Y por un valor constante causando los errores positivos en los resultados analíticos [123,125,126].

Puede decirse que el método de estándar interno es el más confiable de los tres tipos de calibración, ya que permite:

- ◆ Minimizar las diferencias entre la concentración del analito y de estándar en las soluciones debido a manejo de muestra,
- ◆ Eliminar algunas interferencias de matriz (por ejemplo de tipo espectral),
- ◆ Minimizar el efecto de las condiciones instrumentales en la señal analítica.

En este método, se adiciona una cantidad fija de un compuesto (estándar interno, EI) tanto a las soluciones de calibración como a la muestra. El EI seleccionado para un análisis dado tiene que cumplir con una serie de requisitos, de los cuales el más importante es asegurar las propiedades fisicoquímicas del EI semejantes a las del analito. De esta manera, el

comportamiento de los dos componentes (analito y EI) en cada una de las etapas del procedimiento va a ser semejante y cualquier error analítico cometido va a afectar igualmente el contenido de analito y de EI en la muestra [124]. Ahora, se miden las señales del analito y del EI en cada una de las soluciones (calibración y muestras) y se toma el cociente de las dos respuestas como la señal analítica. De nuevo, si varía uno o más de los parámetros que afectan las respuestas individuales para analito y para EI, dichas respuestas deben ser afectadas por igual. Por lo tanto, el cociente de respuestas ($S_{\text{analito}}/S_{\text{EI}}$) depende solamente de la concentración del analito (concentración de EI constante). Una gráfica de la relación o cociente de respuestas como función de la concentración del analito, da una curva de calibración ($S_{\text{analito}}/S_{\text{EI}} = f(c_{\text{analito}})$). Lo inconveniente del método de EI es su limitación a las técnicas instrumentales donde se puede obtener la información multicomponente en una corrida de la muestra. Por lo tanto, este método es comúnmente utilizado en técnicas cromatográficas, en espectrometrías de emisión o en espectrometría de masas, pero no puede aplicarse por ejemplo en espectrometría de absorción atómica [124,126].

En cuanto a los requisitos que tiene que cumplir el EI, estos dependen del tipo de analito y de muestra, del procedimiento analítico y de la técnica instrumental seleccionada. Por lo general, el EI debe de ser un compuesto de propiedades fisicoquímicas similares a las del analito, con una señal fácilmente medible, que no interfiera con la respuesta del analito. Además el EI y el analito deben responder de manera semejante a cualquier cambio de las variables que pudieran afectar la respuesta del detector (parámetros instrumentales).

Cabe mencionar, que un caso especial del método de EI es la dilución isotópica. A la muestra problema que contiene el analito con un elemento inactivo P, se adiciona una pequeña, conocida cantidad W_1 del mismo compuesto, pero marcado con un isótopo radioactivo *P (conocida actividad específica A_1). Después de incorporación de este EI en la muestra, se toma una pequeña porción y se mide la actividad (A). La magnitud de dilución de radiotrazador (*P) permite evaluar la cantidad W del analito en la muestra:

$$W = W_1 (A_1 / (A - I))$$

Cuando la técnica de detección es una de las técnicas de radioanálisis, el trazador tiene que ser radioactivo, sin embargo en espectrometría de masas pueden utilizarse los isótopos no radioactivos [126].

En este trabajo se realizó la revisión bibliográfica sobre aplicaciones del método de EI en diferentes técnicas analíticas enfocándose al análisis de hierro y de cobre. A continuación se presentan los resultados.

1.5.1. Espectrometría de emisión

El caso más simple del empleo de **EI** en este grupo de técnicas es la fotometría de llama. Esta técnica es prácticamente obsoleta, ya que se han logrado fuentes de atomización/ionización mejores y más potentes. Sin embargo, algunos fabricantes de instrumentos construyeron fotómetros de llama diseñados específicamente para el análisis de sodio y potasio en suero sanguíneo y en otras muestras de origen biológico utilizando el litio como **EI**. En estos instrumentos, la radiación que proviene de la llama se divide en tres haces de aproximadamente la misma intensidad. Cada uno de ellos pasa a través de un sistema fotométrico independiente constituido por un filtro de interferencia (que transmite una línea de emisión de uno de los elementos y absorbe las de los otros dos), un fototubo y un amplificador. Las señales analíticas para el potasio y sodio se obtienen como relación entre de las señales de emisión de estos dos elementos y de la señal de emisión de **EI**. Este sistema permite mejorar la precisión, eliminando errores aleatorios causados por cambios de flujos de los gases, cambios de temperatura de la llama y fluctuación de la línea base [124].

El principal problema en las aplicaciones cuantitativas de la espectrografía y/o espectrometría de emisión de fuente de arco y chispa es el número muy elevado de variables que afectan la negrura de la imagen de una línea espectral en una placa fotográfica, o la intensidad de una línea que llega a un detector fotoeléctrico. La mayoría de las variables relacionadas con la irreproducibilidad de las condiciones de excitación y con los procesos fotográficos son imposibles de controlar, por lo que estas técnicas requieren el uso del método de estándar interno. En la selección de un **EI** adecuado se toman en cuenta los criterios generales, antes mencionados. Además, el **EI** debe de cumplir con los siguientes requisitos, específicos para estas técnicas analíticas:

- ◆ Presentar una línea de emisión que tenga aproximadamente la misma energía de excitación que la del analito, lo que asegura que las señales de emisión de los dos compuestos van a ser afectados igualmente por las fluctuaciones de temperatura en la fuente.
- ◆ Tener energía de ionización similar a la del analito para asegurar que ambos tengan en la fuente la misma razón de distribución entre átomos e iones.
- ◆ Las líneas de emisión del **EI** y del analito deben estar en la misma región espectral y tener una intensidad parecida, a fin de que haya una compensación adecuada de las diferencias en la respuesta del detector fotoeléctrico.

Lógicamente, es difícil encontrar un **EI** que cumpla con todos los requisitos y en la mayoría de los casos se busca una situación de compromiso. Una característica de la fuente de atomización/ionización de chispa o de arco es que la muestra se introduce en forma de un sólido.

De hecho, la mayoría de las aplicaciones actuales de estas técnicas son en el control de los procesos metalúrgicos. Cuando la muestra es metálica, rara vez es posible la introducción de una cantidad pequeña y exacta de un EI. En estos casos se escoge el elemento mayoritario de la muestra asumiendo que su concentración permanece constante en todas las muestras. Por ejemplo, en la determinación de los constituyentes minoritarios del latón, como EI se utiliza el zinc o el cobre. En caso de muestras pulverizadas, la introducción del EI es más fácil, pero es necesaria la homogeneización de la mezcla muestra + EI.

Actualmente, más aplicaciones analíticas por espectrometría de emisión atómica se reporta utilizando diferentes tipos de plasma como fuentes de atomización-ionización y el plasma acoplado inductivamente (ICP) es sin duda más frecuentemente utilizado gracias a una serie de ventajas que ofrece esta fuente. Entre las mencionadas ventajas las más importantes son: muy buena estabilidad y geometría de la "llama", alta temperatura (4,000-8,000 °K), distribución uniforme de temperatura en el plasma, "transparencia espectral", posibilidad de introducción de la muestra en fase gaseosa y líquida, mínimas interferencias químicas, etc. Aunque aparentemente, la precisión de los resultados obtenidos por esta técnica es excelente (RSD<1%), en la calibración comúnmente se emplea el método de EI. El EI seleccionado adecuadamente permite controlar los errores debido a:

- interferencias espectrales (comunes en ICP),
- cambios de temperatura y geometría del plasma causados por propiedades de la muestra introducida (por ejemplo, una alta viscosidad de la muestra afecta la geometría de la "llama")
- manejo de muestra [127].

En la Tabla 7 se presentan algunos ejemplos de estándares internos utilizados en la determinación de cobre y de hierro por espectrometría de emisión con diferentes fuentes de atomización/ionización.



Tabla 7. Ejemplos del uso de EI en la determinación de hierro y de cobre por espectrometría de emisión.

Muestra	Analitos	Técnica	EI	Parámetros analíticos	Ref.
Plantas	Cu, Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb, Zn	ICP-AES	Ar ($\lambda=794.8\text{nm}$)	RSD 0.9-1.5%	128
Aguas subterráneas	Cu, Cr, Ni	ICP-AES	Y, Ga, In, Rh	$LD_{Cu} = 0.2 \mu\text{g/l}$	129
Aleaciones	Fe, Cu, B, Si, Nb	ICP-AES	Cd, Li		130, 131
Bronce	Cu y otros	ICP-AES	Sc	$LD = 0.7 \mu\text{g/l}$	132
Aleaciones	Fe, Cr, Ni, Zn	GD-AES	Varios	RSD 0.1-0.6%	133
Cerámica	Mg, Al, Si, Fe	Láser, MIP-AES	Varios		134
Soluciones de los ácidos inorgánicos	Cu, Mn	ICP-AES	Sc		135
Suero	Fe, Cu y otros	ICP-AES	Y	$LD_{Cu}=0.07\text{mg/l}$ $LD_{Fe}=0.03\text{mg/l}$	136
Jugo de frutas	Fe, Cu y otros	Arc-AES	Co	$LD_{Cu}=1.9\mu\text{g/g}$ $LD_{Fe}=4.0\mu\text{g/g}$	137
Zinc	Cu, Fe, Cd, Pb	Arc-AES	Bi_2O_3	$LC_{Cu}=1.3\mu\text{g/g}$ $LC_{Fe}=6\mu\text{g/g}$	138

- AES - espectrometría de emisión
 ICP - plasma acoplado inductivamente
 MIP - plasma de microondas
 GD - *glow discharge* - descarga eléctrica a baja presión
 Arc - arco



1.5.2. Espectrometría de masas

Las aplicaciones de espectrometría de masas para análisis cuantitativo son de dos tipos. El primero se refiere a la cuantificación de las especies moleculares y el segundo tipo de aplicaciones engloba la determinación de los elementos. Lógicamente, en la determinación de las especies moleculares se requiere una fuente de ionización menos potente que asegure la formación de iones sin descomposición de las especies de interés (ionización química, por electrones, por campo, bombardeo con átomos rápidos etc.). En el segundo tipo de aplicaciones se utilizan fuentes tales como chispa, plasma acoplado inductivamente o láser, donde se obtiene atomización y ionización de la muestra. La introducción de la muestra puede realizarse directamente o después de pasarla por una columna cromatográfica. Este segundo caso permite simplificar los espectros de masas de una muestra y aumentar la información analítica debido a que las especies llegan al detector separadas en el tiempo. Las concentraciones de los analitos se obtienen a partir de la medida de las áreas o las alturas de los picos que aparecen en los espectros de masas (la posición del pico se relaciona con m/z del analito) [124,126].

Aunque el detector (espectrómetro de masas) es altamente selectivo y sensible, existe una serie de variables que limitan la exactitud y la precisión de los resultados. Entre los factores que disminuyen la precisión hay que mencionar la incertidumbre relacionada con la introducción de una pequeña cantidad de la muestra al sistema, las limitantes de los interfaseos columna-fuente de iones-espectrómetro y la imprecisión de los procedimientos de tratamiento de muestra. En el caso de análisis elemental existen algunas limitaciones adicionales, relacionadas con la introducción de la muestra a la fuente de atomización/ionización. El uso del plasma acoplado inductivamente permite el análisis de muestras gaseosas y líquidas (con limitaciones en cuanto a la viscosidad, etc.), mientras que para el análisis de sólidos es posible acoplar el sistema de evaporación de la muestra (horno de grafito, láser). El efecto negativo de todos estos factores que acaban de mencionarse, puede ser reducido y/o eliminado utilizando el método de estándar interno. La importante ventaja en caso de espectrometría de masas es que pueden utilizarse como **EI** los isótopos de los mismos analitos, por lo que el requisito de las propiedades fisicoquímicas semejantes entre el analito y **EI** queda perfectamente cumplido.

En las últimas décadas va aumentando el número de aplicaciones analíticas de espectrometría de masas tanto como una técnica independiente, o empleada como un detector específico de iones. Resulta difícil resumir cuales compuestos, átomos o iones pueden utilizarse como **EI**, por lo que en la Tabla 8 se presentan solamente algunas aplicaciones reportadas en la determinación de hierro y de cobre en diferentes tipos de muestra.

Tabla 8. Algunas aplicaciones del método de EI en la determinación de hierro y de cobre utilizando espectrometría de masas.

Muestra	Analitos	Fuente	EI	Parámetros analíticos	Ref
Eu ₂ O ₃ puro	Cu, Cr, Mn, Co, Ni, Cd, Pb	ICP	Rh	LD en intervalo 0.12 - 2.28 µg/l	139
Plasma, orina	Cu, Zn	ICP	⁸⁹ Y		140
Gasavión	Cu(I)/Cu(II)	Electrospray	M-cristal violeta	LD en intervalo 30-150 µg/l	141
Suero	Cu, Fe, V, Zn, Ag	ICP	Co	Cuantificación en el intervalo de µg/l	142
Suero	Fe, Cu, , Zn, Rb, Co, Mo, Cs	ICP	In		143, 144
Rocas	Cu, Fe y otros 47 elementos	Láser-ICP	Diferentes isótopos	LD aprox. 0.01µg/g	145
Mármol	Fe, Mg, Al, Mn, Zn, Sr, Ba, La y Pb	Láser-ICP	⁴³ Ca	RSD en rango 1.6 - 12% (para 25-1000 µg/g del analito)	146
Tejidos	Fe (especiación con separación por CLAR)	ICP	Rh		147
Alimentos	Fe	Bombardeo por átomos rápidos	⁵⁴ Fe	LD en nivel de µg/g	148

ICP - plasma acoplado inductivamente

1.5.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

En esta técnica instrumental, el EI es requerido tanto para aplicaciones cualitativas como para cuantitativas. En primer caso, el análisis se basa en la magnitud del desplazamiento químico, cuyo origen son los pequeños cambios en un campo magnético debido al movimiento de los electrones alrededor de los núcleos en las moléculas del compuesto estudiado [126,149]. La determinación de la intensidad absoluta del campo magnético (resultado de interacción de los campos pequeños con el campo aplicado) con la exactitud necesaria para el trabajo de alta resolución es difícil o imposible. Sin embargo, es factible determinar (con una exactitud de la décima de miligauss o mejor) la magnitud de un cambio en la intensidad de campo. Por tanto, en la técnica de RMN se establece la posición de los picos relativa al pico de resonancia de una sustancia estándar que se mide a la vez (EI). Además, el uso del EI ofrece la ventaja que los desplazamientos químicos se pueden establecer independientemente de la frecuencia del

oscilador. La selección de un EI adecuado depende del núcleo que se estudia y del disolvente empleado. El compuesto más utilizado para estudio del protón es el tetrametilsilano (TMS). En este compuesto todos los protones están en un ambiente idéntico y la constante de apantallamiento para el TMS es más grande que para mayoría de los protones [125,126,149]. Así que, cuando se aplica un campo intenso, este compuesto proporciona un sólo pico agudo, bien separado de la mayoría de los picos de interés en el espectro de la muestra. Además el TMS es inerte y fácilmente soluble en muchos solventes orgánicos, por lo que cumple con los requisitos de un EI. Cabe mencionar, que en el análisis de las soluciones acuosas es necesario utilizar otro EI (comúnmente la sal de sodio del ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfónico, DDS). Los protones de los metilo de este compuesto producen un pico análogo al del TMS, sin embargo, los protones metileno dan una serie de pequeños picos que pueden interferir con las señales del analito. Por tanto, el DDS para aplicaciones en RMN tiene los grupos metileno deuterados [125,126].

En las aplicaciones cuantitativas de la técnica RMN se aprovecha la proporcionalidad directa entre las áreas de los picos y el número de los núcleos en la muestra, responsables de la absorción. Como consecuencia, esta técnica no requiere de un proceso de calibración externa. Sin embargo, es necesario conocer el área de la señal obtenida en condiciones dadas por un protón. Para evaluar este parámetro se emplea el método de EI (el mismo disolvente excepto benceno, agua, ciclohexano o derivados orgánicos de silicio).

Cabe mencionar que el uso de la técnica de RMN para el análisis cuantitativo no se ha generalizado debido al alto costo y complejidad de los espectros en las muestras reales.



I.5.4. Técnicas cromatográficas

En principio, el método de **EI** fue utilizado en las técnicas cromatográficas con el fin de reducir los errores relacionados con baja precisión de introducción de un pequeño volumen de la muestra en la columna. Con el desarrollo tecnológico, las válvulas de inyección han mejorado y actualmente esta fuente de errores no es tan importante. Sin embargo, el empleo de **EI** permite controlar los efectos relacionados con los cambios de las condiciones en la columna (por ejemplo, la temperatura) y sobre todo permite reducir errores cometidos durante el manejo de la muestra [150,151].

Un **EI** ideal para las técnicas cromatográficas es un compuesto (análogo, homólogo, isómero, enantiómero del analito, o uno de ellos marcado con un isótopo estable) que cumple con los siguientes requisitos:

- ◆ Propiedades fisicoquímicas del **EI** y del analito semejantes.
- ◆ Idéntica forma de incorporación de **EI** y del analito en la muestra (casi imposible).
- ◆ Tiempo de retención del **EI** semejante al del analito, pero con una resolución cromatográfica de los compuestos completa (hasta la línea base).
- ◆ Respuesta del detector parecida para el **EI** y para el analito, presentes en la muestra en las concentraciones semejantes.
- ◆ El **EI** no debe ser un componente natural de la muestra.

En pocas aplicaciones analíticas es posible encontrar un **EI** ideal y por lo general se buscan las condiciones de compromiso. Sin embargo, si la separación cromatográfica se acopla a un detector de espectrometría de masas, son más las ventajas que ofrece el método de **EI**. Utilizando un isótopo estable (o un compuesto marcado con el isótopo), las propiedades de los dos compuestos pueden ser más parecidas, ya que no es necesario obtener la resolución cromatográfica hasta la línea base.

En la Tabla 9 se presentan algunos ejemplos de aplicación del método de **EI** en la determinación cromatográfica de cobre, de hierro y de otros elementos.



Tabla 9. Aplicación del método de EI en la determinación de Fe, Cu y otros elementos por técnicas cromatográficas.

Muestra	Analitos	Derivación	Técnica cromatogr.	Detector	EI	Parámetros analíticos	Ref.
Pelo	Cu, Ni, Mn y otros	-	Intercambio iónico	UV	Co	LD aprox. 1 µg/g	152
Aguas naturales	Cu, Cd, Cr y otros	Dibencil ditiocarbamato de sodio	CLAR	UV	Co	LD: 0.1-1.8 µg/l	153
Aguas naturales	Cu, Se, Ni y otros	Acido N,N-dietil Ditiocarbámico	CLAR	UV	Pd	LC _{Cu} = 3ng	154
Aguas naturales	Cu, Cr, Ni, Zn	Acetilcetona Dietil ditiocarbamato de sodio y otros	GC	MS	DI	LD en nivel de µg/l	155
Aguas naturales	Cu, Ni	Dietil ditiocarbamato de sodio	GC	FID	C ₂₂ H ₄₆	LD aprox. 10 µg/l	156
Aguas naturales	Cu, Co, Ni	Di-isobutil ditiocarbamato	CLAR GC	UV/Vis FID	Pd	LD _{Cu} = 800 pg LD _{Co} = 40pg	157
Aleaciones	Fe, Al, Co y otros	-	Intercambio aniónico	ICP-AES	Mg		158
Sedimentos	As, Se, Sn y otros	NaBH ₄	GC	ICP-MS	¹⁰³ Rh ²⁰³ Tl		159
Minerales	Cu, Mo, especiac.	-	CLAR	ICP-MS	DI		160
Fuidos biológicos	Ca	-	EFC	Vis	Azul de bromo-fenol	LD = 5µM	161
Agua de mar	Fe, Cu y otros	Dibencil ditiocarbamato de sodio	CLAR	Total reflection XRF		LC en intervalo ng/l - µg/l	162

DI - dilución isotópica

FID - detector de ionización de llama

Total reflection XRF - fluorescencia de rayos X por reflexión total

GC - cromatografía de gases

MS - espectrometría de masas

EFC - electroforesis capilar

1.5.5. Otras aplicaciones

Además de las técnicas espectrales y de separación discutidas hasta ahora, el método de **EI** se utiliza también en diferentes técnicas de rayos X, de electroanálisis y de radioanálisis. De manera semejante, el empleo de **EI** en estas técnicas permite corregir tanto errores originados por el cambio de las condiciones instrumentales, debido a la composición de la muestra o por errores cometidos durante el manejo de muestra. En la Tabla 10 se presentan algunos ejemplos de las aplicaciones que se acaban de mencionar.

1.5.6. Espectrofotometría UV/Vis

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

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

En base a estos dos hechos que se acaban de mencionar, se ha propuesto el empleo del método de estándar interno en espectrofotometría UV/Vis [177,178]. Considerando los requisitos que tiene que cumplir un estándar interno (**EI**) en otras técnicas analíticas [151], se han definido los siguientes parámetros para **EI** en espectrofotometría UV/Vis:

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

Tabla 10. Aplicaciones de EI en las técnicas instrumentales tales como espectrometrías de rayos X, técnicas electroanalíticas y de radioanálisis.

Muestra	Analitos	Técnica instr.	EI	Parámetros analíticos	Ref.
Sangre	Pb	Potenciometría con <i>stripping</i>	Bi(III)	LD = 1.8 µg/l (t=3min)	163
Vino de mesa	Pb	Potenciometría con <i>stripping</i>	Bi(III)	LD = 3.0 µg/l	164
Aguas naturales	Cu, Cd, Pb	Voltametría anódica por <i>stripping</i>	In(III)	LD aprox. 1µg/l	165
Minerales	Cu, Fe, Pb, Zn, Mn	XRF	V(VI)	LD aprox. 0.2%, RSD<1.8%	166
Suero	Cu, Fe, Zn, Br	Total reflection XRF	Y	LD en intervalo 20 – 50 µg/l	167
Agua de río	Fe, Cu y otros	PIXE	Pd	Exactitud en intervalo de ± 5%	168
Agua potable	Fe, Cu y otros	Total reflection XRF	Ga	LD en intervalo de 0.5-11 µg/l	169
Tejidos	Fe, Cu y otros	PIXE	S – comp. natural de la muestra	LD _{Cu} =60mg/l LD _{Fe} =100mg/l	170
Suero	Fe, Cu y otros	Total Reflection XRF	Y	LD en intervalo 20-50mg/l	167
Aguas naturales	Fe, Cu y otros	PIXE (preconc.)	Pd	LD _{Cu} =10ng/l, LD _{Fe} =24ng/l (sample volume 300ml)	171
Sedimentos	U, Th	NAA	²³⁸ U, ²³² Th	Mejor precisión con EI	172
Muestras arqueológicas	Fe, Al, Ca y otros	NAA	Si – comp. natural de la muestra	Mejor precisión con EI	173
Tejido de hígado	Al	NAA	Na – comp. natural de la muestra		174
Suero	Se, Zn	NAA	Ce	CV _{Se} = 3%, CV _{Zn} = 5%	175
Suero	V	NAA	⁴⁸ V(V)	CV = 6%	176

XRF – fluorescencia de rayos X

Total reflection XRF – fluorescencia de rayos X por reflexión total

PIXE – Emisión de rayos X inducida por los protones

NAA – Análisis por activación de los neutrones

GC – Cromatografía de gases

Siguiendo estos criterios se ha demostrado que, utilizando el método de estándar interno y espectros derivados, los errores debido a la dilución de la muestra [177] y errores cometidos en la etapa de preconcentración [178] pueden ser reducidos o eliminados. Para la determinación de Cr(VI) en aguas naturales, la preconcentración del analito se llevo a cabo vía extracción seguida por evaporación del disolvente (factor de preconcentración aproximado: 400) [178], mientras que en el análisis de azinfos en formulaciones requería una dilución aproximada de 10^3 veces. En ambos casos se obtuvieron mejores parámetros analíticos (límite de detección, coeficiente de regresión lineal y precisión) con respecto a los mismos procedimientos pero sin utilizar el método de EI. En los trabajos más recientes se aplicó el método de EI en la determinación de miconazol en cremas farmacéuticas [179] y en la determinación de arsénico con dietil ditiocarbamato de plata en aguas naturales [180]. Se demostró, que en presencia de una matriz química bastante compleja como es la crema farmacéutica, el método de EI también permite mejorar las características analíticas obtenidas en los procedimientos espectrofotométricos.

La ventaja más importante del método de EI es que, el uso de procedimientos analíticos menos rigurosos permite obtener excelentes parámetros analíticos (reducción de errores cometidos en cada una de las etapas definiendo la señal analítica $S = S_{\text{analito}}/S_{\text{EI}}$). Esto a su vez permite simplificar los procedimientos y trabajar con micro volúmenes (en el análisis de azinfos el factor de dilución de aprox. 10^3 se obtuvo utilizando solo 10 ml de metanol). Resumiendo, el método de EI permite llevar los procedimientos espectrofotométricos a micro escala, obtener muy buenas características analíticas, ahorrar los reactivos y acortar el tiempo de análisis.

Por último, cabe mencionar que los compuestos seleccionados como EI en los trabajos mencionados fueron diferentes colorantes azules. En el caso de la determinación de arsénico, la resolución espectral de las bandas de absorción del complejo de analito y de EI (erionglauцина A) fue lo suficiente para leer las señales de analito y de EI directamente de los espectros de cero orden sin necesidad de derivar dichos espectros, lo que forma una ventaja adicional del procedimiento desarrollado y permite utilizar este procedimiento en los laboratorios de rutina.



CAPÍTULO II

Objetivo

II. OBJETIVO DEL TRABAJO

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar los procedimientos micro extracto-espectrofotométricos adecuados para la determinación de hierro y de cobre a nivel de trazas. Como punto de partida se tomaron los métodos espectrofotométricos basados en la reacción de cobre con disulfonato de batocuproína y la reacción de Fe(II) con disulfonato de batofenantrolina. Con el fin de aumentar el poder de detección, se ha propuesto incluir en los procedimientos analíticos una etapa de preconcentración y, para controlar posibles errores debido al manejo de la muestra, utilizar el método de estándar interno.



CAPÍTULO III

Parte experimental

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1. Aparatos y Equipo.

1. Purificador de agua (Calidad de agua MilliQ), LABCONCO WATER PRO PS.
2. Espectrofotómetro con arreglo de diodos MILTON ROY SPECTRONIC ARRAY 3000, con paquete de software versión 2.01.
3. Espectrómetro de absorción atómica modelo Perkin-Elmer 3110 equipado con Horno de Grafito modelo HGA-600 y con automuestreador AS-60, controlado por el paquete de software WinLab de Perkin-Elmer.
4. Tubos Eppendorff de 1.5 ml.
5. Tubos Falcon 50 ml.
6. Micropipetas Eppendorff de 0.5-10 μ l, 20-200 μ l y 200-1000 μ l.
7. Equipo de plástico.
8. Sistema de flujo de aire frío.
9. Gradilla para tubos Eppendorff.
10. Microcelda de cuarzo SIGMA de 50 μ l.
11. Vortex GENIE 2.
12. Microcentrifuga DENVER INSTRUMENT.
13. Guantes de látex.
14. Computadora personal HP/ VECTRA 500, equipada con el Programa de Software GRAMS/32 V. 5.01, de Galactic Industries Corporation.



III.2. Reactivos y disoluciones.

III.2.1. Análisis de cobre

1. Solución stock, concentración de cobre $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ fue estándar para espectrometría de absorción atómica de Sigma. La solución de trabajo ($2\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) se preparó diariamente con la dilución correspondiente.
2. Solución acuosa de azul de bromofenol 0.1%, se preparó de reactivo Merck. La solución de trabajo al $4\cdot 10^{-3}\%$ se preparaba diariamente.
3. Solución de ácido batocupreindisulfónico (sal disódica) $3.5\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo Sigma.
4. Solución de clorhidrato de hidroxilamina $1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo Sigma.
5. Solución de ácido clorhídrico $2\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo Sigma.
6. Solución de hidróxido de sodio $0.2\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo Sigma.
7. Solución de citrato de sodio (sal trisódica) $1.5\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo Sigma.
8. Solución de ácido tricloroacético (TCA) $0.6\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo Sigma.
9. Solución de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) $0.15\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en cloroformo, reactivo Sigma.
10. Solución de bromuro de benciltributilamonio (BTAB) $0.15\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en cloroformo, reactivo Sigma.
11. Solución de cloruro de tricaprilmetilamonio (aliquat 336) $0.15\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ en cloruro de metileno o cloroformo, reactivo Aldrich.
12. Cloroformo, J.T. Baker.
13. Cloruro de metileno, J.T. Baker.
14. Material de Referencia (SRM 1643d - elementos traza en aguas naturales), Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, EUA.
15. Suero Control Precipath U (171760), Boehringer Mannheim GmbH, Alemania.
16. Muestras de agua de pozo, Comisión Estatal de Agua y Saneamiento de Guanajuato (CEASG).



III.2.2. Análisis de hierro

1. Solución stock de Fe(II) $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, se preparó a partir de la sal $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, reactivo J. T. Baker. La solución de trabajo ($2\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) se preparó diariamente con la dilución correspondiente.
2. Solución stock de Fe(III) $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ fue estándar para espectrometría de absorción atómica de Sigma. La solución de trabajo ($2\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) se preparó diariamente con la dilución correspondiente.
3. Solución acuosa de azul de bromofenol 0.1% se preparó de reactivo Merck. La solución de trabajo al $2.5\cdot 10^{-3}\%$ se preparaba diariamente.
4. Solución de hidroxilamina $1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo Sigma. La solución resultó estar contaminada por el hierro, por lo que se llevó a cabo el procedimiento de purificación. Para ello se tomaron 50 ml de la solución $1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, se adicionaron 200 μl de batofenantrolina $3.5\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ y se realizaron tres extracciones del complejo Fe(II)-batofenantrolina a cloruro de metileno.
5. Solución del ácido clorhídrico $2\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo Sigma.
6. Tampón de acetatos (pH 5.5, $1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), reactivo Sigma
7. Disulfonato de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina $3.5\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo Sigma.
8. Solución $3.5\ \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ de aliquat 336 fue preparada en cloruro de metileno (reactivo Sigma).
9. Solución de fluoruro de sodio $1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo J. T. Baker.
10. Solución de ácido oxálico $0.5\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo J. T. Baker.
11. Solución EDTA $0.1\ \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, reactivo Monterrey.
12. Cloruro de metileno, J.T. Baker. .
13. Material de Referencia (SRM 1643d - elementos traza en aguas naturales), Instituto Nacional de Estándares y Tecnología, EUA.
17. Muestras de agua de pozo, Comisión Estatal de Agua y Saneamiento de Guanajuato (CEASG).

CAPÍTULO IV

Resultados y Discusión

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Determinación de cobre.

En esta parte del trabajo se propone una modificación al método espectrofotométrico para la determinación de cobre con disulfonato de batocuproína [60] y su aplicación para el análisis de suero y de aguas naturales. Dicha modificación consiste en incluir una etapa de separación/preconcentración del analito y en utilizar el método de estándar interno con el fin de reducir los posibles errores analíticos cometidos en el procedimiento. Las ventajas esperadas del procedimiento modificado son las siguientes: un aumento del poder de detección, mejor precisión de los resultados, disminución del tamaño de muestra y el uso de menor cantidad de reactivos.

Tomando en cuenta la composición química diferente del suero y de las aguas naturales y, los diferentes niveles de cobre en los dos tipos de muestra, se diseñaron dos propuestas para la etapa de separación/preconcentración. El punto común de las dos propuestas es la extracción del complejo del analito y de **EI** a fase orgánica apolar. Por tanto, en primer lugar se procedió con la selección del **EI**, adecuado para cumplir con el criterio espectral y con el requisito de comportamiento semejante del complejo de analito y de **EI** en la etapa de extracción.

IV.1.1. Selección de estándar interno.

En la selección de **EI** se tomó en cuenta el criterio espectral. Además, se consideró que las condiciones experimentales de la formación del complejo de cobre recomendadas en el método normalizado (pH 5.6, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ hidroxilamina, capítulo I.3.1.) no deben afectar al espectro de **EI** y por último, los rendimientos de extracción del **EI** y del complejo del analito tienen que ser parecidos. Como posibles **EI** se estudiaron una serie de colorantes azules, que contienen en su estructura grupos sulfonados. Se observó que para azul de bromofenol existe una buena resolución espectral entre el complejo de cobre y este colorante, por lo que azul de bromofenol fue considerado como posible **EI**. A continuación se verificó experimentalmente, que el espectro de este colorante (concentración $1\cdot 10^{-3} \%$) no cambia en presencia de hidroxilamina hasta su concentración de $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Para lograr la extracción del complejo de cobre y del azul de bromofenol a la fase apolar, es necesario neutralizar la carga negativa de estos dos compuestos en la solución acuosa. Como posibles contra-iones se probaron tres aminas cuaternarias (CTAB, BTAB y aliquid 336) seleccionando finalmente el aliquid 336, ya que en su presencia se obtuvieron mejores rendimientos de extracción. Cabe mencionar que, el azul de bromofenol es un indicador ácido-base (cambio de color en el intervalo de pH 3.0 – 4.6), por lo que se verificó experimentalmente

Gustavo Cruz Jiménez.

que, a pH de fase acuosa >2.6 , después de la extracción, aproximadamente 99% del colorante en fase orgánica está en forma azul.

Se estudió el efecto de la concentración de aliquat 336 en cloroformo en la extracción de Cu(I)-batocuproína y de EI a cloruro de metileno. Se observó que, en la presencia del surfactante en concentraciones por encima de $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, los rendimientos de extracción fueron de $97.2 \pm 0.4\%$ para el complejo de cobre y de $99.4 \pm 0.2\%$ para el azul de bromofenol (Fig.1). Finalmente, se seleccionó la concentración de aliquat 336 de $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

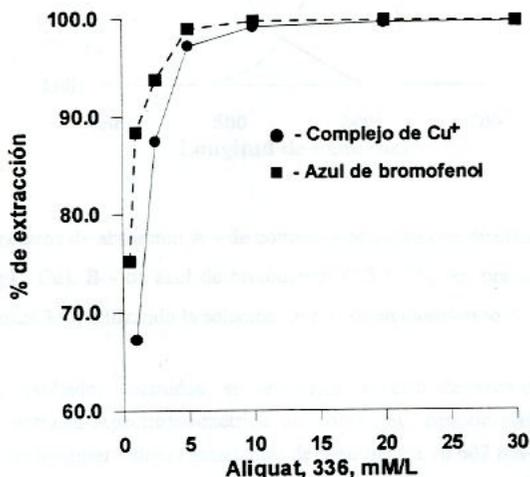


Figura 1. Efecto de la concentración de aliquat 336 en cloroformo ($150\mu\text{l}$) en los rendimientos de extracción del complejo Cu(I)-batocuproína ($10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cu) y de azul de bromofenol ($4\cdot 10^{-3}\%$). (Volumen de fase acuosa 1ml , pH 5.6)

En la Fig. 2 se presentan los espectros del complejo de cobre y de azul de bromofenol en presencia de aliquat 336, donde puede verse claramente que no existe ninguna contribución espectral de azul de bromofenol en 477nm (máximo de absorción del complejo de analito). Asimismo, no hay contribución espectral del complejo Cu(I)-batocuproína en 602 nm (máximo de absorción para azul de bromofenol), por lo que las señales netas de los dos compuestos pueden obtenerse en sus respectivos máximos de las bandas de absorción de los espectros de orden cero.

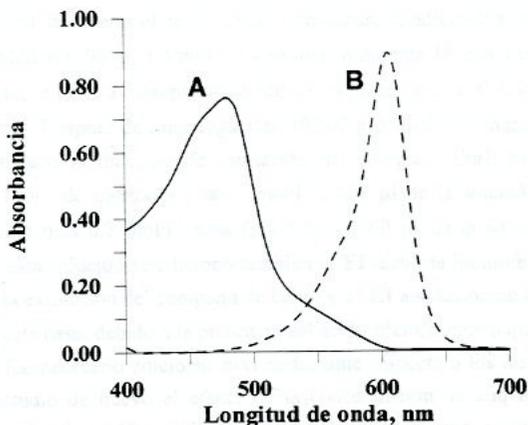


Figura 2. Espectros de absorción A - de complejo de cobre con disulfato de batocuproína ($3.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cu}$), B - de azul de bromofenol ($1.3\cdot 10^{-3}\%$) en presencia de $0.01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de alícuat 336, utilizando la solución de alícuat en cloroformo como referencia.

De los resultados obtenidos, se seleccionó el azul de bromofenol como EI en la determinación extracto-espectrofotométrica de cobre. Su concentración en la muestra fue seleccionada para asegurar valores semejantes de absorbancia en 602 nm y en 477 nm (complejo del analito) en la solución de calibración que contiene la concentración más alta de cobre.

IV.1.2. Procedimiento para el análisis del suero.

En el análisis del suero, se propuso el siguiente esquema de procedimiento: precipitación de las proteínas en la muestra, formación del complejo Cu(I) -batocuproína, adición de EI y extracción del complejo de cobre junto con EI a cloroformo. El objetivo fue minimizar el tamaño de la muestra y disminuir la cantidad de los reactivos (cloroformo) respecto a los procedimientos reportados en la bibliografía [48,62]. En el desarrollo del procedimiento se tomó en cuenta la concentración de cobre en el suero, la sensibilidad del método con batocuproína [60] y el volumen mínimo necesario para registrar el espectro ($100 \mu\text{l}$). A continuación se describe el procedimiento desarrollado.

Con el fin de liberar el cobre unido a proteínas, se adicionó a muestras de suero (300 μl) el ácido clorhídrico (100 μl , $1.4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) y se incubó durante 15 min a una temperatura de $95 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, se llevó a cabo precipitación de las proteínas con el ácido tricloroacético (200 μl , $0.6 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) [62]. Después de centrifugación (10,000 g, 5 min) se tomaron 400 μl de sobrenadante y se llevó a cabo la reacción de formación del complejo Cu(I)-batocuproína. Para ello se adicionaron 100 μl de hidroxilamina ($1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 400 μl de la solución reguladora ($1.5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ citrato de sodio más $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ sosa (pH 5.6)) y 100 μl de la solución de batocuproína $3.5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. A esta solución se adicionó también el EI (azul de bromofenol, 50 μl , $4\cdot 10^{-3} \%$) y se llevó a cabo la extracción del complejo de cobre y de EI a solución de aliquat 336 en cloroformo (150 μl). En este caso, debido a la presencia del ácido tricloroacético que forma pares iónicos con aliquat 336, fue necesario adicionar más surfactante respecto a los resultados presentados en la Fig. 1. Se estudió de nuevo el efecto de la concentración de aliquat 336 en este sistema y, utilizando la solución $0.15 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de aliquat 336 en cloroformo, se obtuvieron rendimientos de extracción de $96.7 \pm 0.4 \%$ y de $99.1 \pm 0.3 \%$ para Cu(I)-batocuproína y para EI respectivamente. Después de extracción y centrifugación (3,000 g, 2 min), se obtuvieron las lecturas de absorbancia a 477nm (A_{analito}) y a 602nm (A_{EI}) en fase de cloroformo utilizando como referencia el blanco, preparado en paralelo (blanco contenía todos los reactivos menos suero y menos EI). La señal analítica (S) se definió como la relación entre estos dos valores:

$$S = A_{\text{analito}} / A_{\text{EI}}$$

La calibración se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento. Es decir, se tomaron alícuotas de 0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 μl de la solución estándar de trabajo ($2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), se completó el volumen hasta 300 μl con agua desionizada y se procedió con los mismos pasos que para muestras de suero. Los espectros de las soluciones de calibración se presentan en la Fig.3. La función de calibración se construyó relacionando la señal analítica con la concentración de cobre en la solución inicial (sin emplear el procedimiento). Gracias a esto, a partir de las lecturas de las señales en muestras reales se obtuvieron directamente las concentraciones de cobre en suero.

Los parámetros analíticos se evaluaron de acuerdo con las recomendaciones de la IUPAC [181]. En la Tabla 11 se comparan las funciones de calibración, los límites de detección y de cuantificación así como los coeficientes de variación obtenidos para dos concentraciones de cobre obtenidos utilizando como la señal analítica A_{analito} (sin EI) y la relación $A_{\text{Analito}}/A_{\text{EI}}$ (con EI). Se puede observar en esta Tabla, que el uso del método de EI permitió mejorar significativamente todas características analíticas.

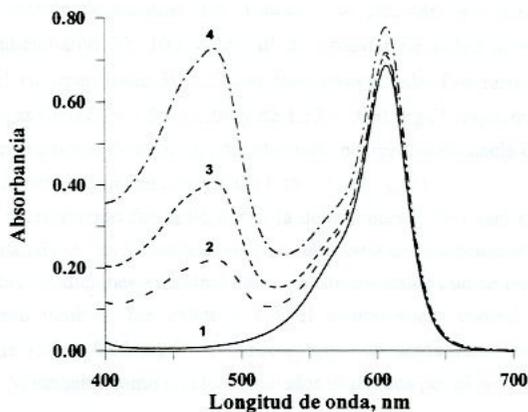


Figura 3. Espectros de las soluciones de calibración obtenidos en el procedimiento para el análisis de suero: (1) EI, (2) $0.67 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Cu} + \text{EI}$, (3) $1.33 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Cu} + \text{EI}$, (4) $2.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1} \text{ Cu} + \text{EI}$.

Tabla 11. Parámetros analíticos en la determinación de cobre en suero evaluados sin y con empleo de estándar interno.

Parámetro	Con EI	Sin EI
Función de calibración ($S = a \cdot c_{\text{Cu}} + b$)	$0.453c_{\text{Cu}} + 0.003$	$0.352c_{\text{Cu}} - 0.010$
Coefficiente de regresión (R^2)	0.9991	0.9897
Desviación estándar de la pendiente (DE_a)	$7.70 \cdot 10^{-3}$	$1.24 \cdot 10^{-2}$
Desviación estándar del intercepto (DE_b)	$9.31 \cdot 10^{-3}$	$1.50 \cdot 10^{-2}$
Rango lineal ($\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$)	0.1 – 2.0	0.6 – 2.0
Límite de detección ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	0.03	0.18
Límite de cuantificación ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	0.10	0.55
Precisión para $0.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de Cu (CV, %)	2.2	6.7
Precisión para $1.5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de Cu (CV, %)	1.6	5.4

c_{Cu} - concentración de Cu en $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, CV - coeficiente de variación, $n=6$.

En la validación del procedimiento desarrollado, se llevó a cabo la determinación de cobre en un material de referencia (suero control, Precipath U) utilizando la calibración externa y el Gustavo Cruz Jiménez.

método de adición de estándar. En la adición de estándar, se tomaron alícuotas de 100 μl de suero, se adicionaron 50, 100 y 150 μl de estándar de cobre de trabajo ($2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Cu}$) y se completó el volumen hasta 300 μl con agua desionizada. Los resultados promedios obtenidos para 5 réplicas fueron de 1.56 ± 0.04 y de $1.53 \pm 0.04 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ respectivamente para la calibración externa y en la adición de estándar, demostrando buena concordancia con el intervalo señalado en el certificado del material de referencia ($1.45 - 1.96 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

El procedimiento fue aplicado en la determinación de cobre en suero de tres voluntarios sanos. El análisis se llevó también por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito utilizando las condiciones experimentales e instrumentales que se resumen en la Tabla 12. Este procedimiento también fue validado con el mismo suero control obteniéndose el resultado promedio de $1.53 \pm 0.03 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (5 réplicas) que concuerda tanto con el intervalo indicado por Boehringer Mannheim como con los resultados obtenidos por el procedimiento propuesto.

Tabla 12. Parámetros instrumentales y experimentales en la determinación de cobre en suero y en agua por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.

Longitud de onda	324.8 nm		
Corrección del fondo	Lámpara de deuterio		
Técnica de atomización	Atomización desde la pared		
Superficie de atomización	Grafito recubierto piroliticamente		
Modificador	Sin modificador		
Soluciones de calibración	0, 10, 20, 30, 40 y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$		
Dilución de la muestra	Suero – diluido 40 veces		
	Agua – sin dilución		
	SRM 1643d – sin dilución		
Programa de temperatura			
Etapa	Temperatura, °C	Tiempo “ramp”, s	Tiempo “hold”, s
Secado	120	10	50(suero), 20 (agua)
Pirólisis	1000	1	30
Enfriamiento	20	1	15
Atomización	2300	0	5
Limpieza	2600	1	5

Los resultados obtenidos en sueros de los voluntarios, por el procedimiento propuesto y por espectrometría de absorción atómica se presentan en la Tabla 13, no se detectó una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de las dos técnicas (ANOVA, $p < 0.05$).

Tabla 13. Resultados de análisis de sueros de tres voluntarios sanos (n=5).

Muestra	Concentración promedio de cobre, $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1} \pm \text{DE}$	
	Procedimiento espectrofotométrico	Espectrometría de absorción atómica
1	0.88 ± 0.01	0.89 ± 0.01
2	1.24 ± 0.02	1.25 ± 0.01
3	0.92 ± 0.02	0.94 ± 0.01

IV.1.3. Procedimiento para el análisis de aguas naturales.

La composición química de aguas naturales es muy diferente a la del suero, además la concentración esperada de cobre es inferior (en orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), por lo que el esquema del procedimiento a desarrollar tuvo que ser distinto. En este caso, la separación/preconcentración de cobre se llevó a cabo en dos etapas: por extracción del complejo a fase apolar y por evaporación del disolvente seguida por redisolución del residuo en un micro volumen. Debido a la necesidad de evaporar el disolvente, se utilizó cloruro de metileno ($T_{\text{eb}} = 39.8 \text{ }^\circ\text{C}$) en lugar de cloroformo ($T_{\text{eb}} = 61.2 \text{ }^\circ\text{C}$), ya que este disolvente es más volátil y menos tóxico. El objetivo en esta parte fue lograr preconcentración del analito y también llevar el procedimiento a micro escala (menor uso de reactivos, procedimiento menos riguroso). De manera semejante como en caso de suero, en el desarrollo del procedimiento se tomó en cuenta la concentración de cobre en la muestra, la sensibilidad del método con batocuproína [60] y el volumen mínimo necesario para registrar el espectro (100 μl). A continuación se describe el procedimiento desarrollado.

Se tomaron 10 ml de muestra de agua, se filtró (0.45 μm) y acidificó ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ HNO}_3$) y se llevó a cabo la reacción de formación del complejo Cu(I)-batocuproína. Para la reducción del cobre se adicionaron 200 μl del ácido clorhídrico ($2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) y 500 μl de hidroxilamina ($1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Después de agitar, la muestra se filtró (0.22 μm), se adicionó 1ml de la solución de citrato de sodio ($1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, asegurando el pH final de 5.6), 50 μl de azul de bromofenol (EI, $4\cdot 10^{-3}\%$) y 200 μl de la solución de batocuproína ($3.5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Se dejó la solución 15 minutos para completar la reacción y se siguió con la extracción a cloruro de metileno (1.7 ml de $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ alíquot 336 en cloruro de metileno, Fig. 1). Después de centrifugar, se tomó aproximadamente 1.5 ml de la fase orgánica y se evaporó el disolvente en flujo de aire (temperatura ambiente). El residuo obtenido (Cu(I)-batocuproína + EI + exceso de alíquot 336) se redisolvió en 150 μl de cloruro de metileno y se registraron los espectros de absorción (400 – 700 nm) tomando cloruro de metileno como

referencia. La señal analítica se obtuvo de la misma manera que en el procedimiento para suero ($S = A_{analítico} / A_{EI}$). El blanco fue preparado en paralelo (todos los reactivos menos cobre) y las señales netas fueron obtenidas restando la señal del blanco ($S_{blanco} = A_{477nm} / A_{602nm}$).

La calibración se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento. Es decir, se tomaron alícuotas de 0, 25, 50, 100, 150 y 200 μl de la solución estándar de trabajo ($2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), se completó el volumen hasta 10 ml con agua desionizada y se procedió con los mismos pasos que para muestras de agua. Los espectros de las soluciones de calibración se presentan en la Fig.4. De manera semejante como para el suero, la función de calibración se construyó relacionando la señal analítica con la concentración de cobre en la solución inicial (sin emplear el procedimiento).

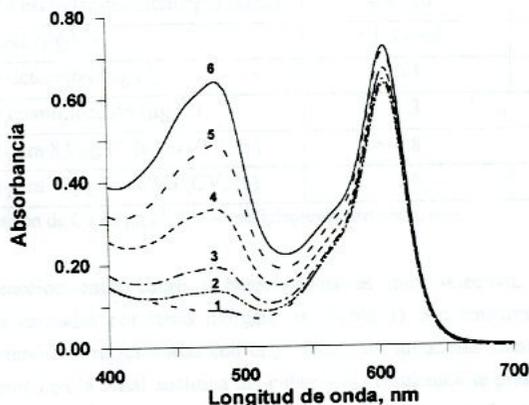


Figura 4. Espectros de las soluciones de calibración obtenidas en el procedimiento para el análisis de aguas: (1) EI (azul de bromofenol, $2 \cdot 10^{-5} \%$), (2) $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Cu + EI, (3) $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Cu + EI, (4) $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Cu + EI, (5) $30 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Cu + EI, (6) $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Cu + EI.

Las características analíticas evaluadas se presentan en la Tabla 14, donde puede observarse el efecto benéfico del uso de estándar interno. El procedimiento en el cual la señal analítica fue obtenida como la relación entre las absorbancias del complejo de analito (A_{477nm}) y del EI (A_{602nm}) presentó mejor sensibilidad y precisión en la determinación de cobre respecto al procedimiento sin EI.

Tabla 14. Parámetros analíticos en la determinación de cobre en aguas naturales evaluados sin y con empleo de estándar interno.

Parámetro	Con EI	Sin EI
Función de calibración ($S = a \cdot c_{Cu} + b$)	$2.17 \cdot 10^{-2} c_{Cu} - 1.17 \cdot 10^{-2}$	$1.76 \cdot 10^{-2} c_{Cu} - 2.11 \cdot 10^{-2}$
Coefficiente de regresión (R^2)	0.9995	0.9934
Desviación estándar de la pendiente (DE_a)	$2.17 \cdot 10^{-4}$	$4.40 \cdot 10^{-4}$
Desviación estándar del intercepto (DE_b)	$4.42 \cdot 10^{-3}$	$1.03 \cdot 10^{-2}$
Rango lineal ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	1.3 – 40	4.6 – 40
Límite de detección ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	0.4	1.4
Límite de cuantificación ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	1.3	4.6
Precisión para $8.0 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de Cu (CV, %)	4.8	10.7
Precisión para $40 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de Cu (CV, %)	1.6	10.6

c_{Cu} - concentración de Cu en $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, CV - coeficiente de variación, $n=6$.

La reacción entre cobre y batocuproína es muy selectiva, por lo que hay pocas interferencias causadas por iones inorgánicos (Tabla 3). Sin embargo, en aguas naturales se esperan interferencias relacionadas con la presencia de sustancias húmicas. Se estudió el efecto del ácido húmico en la señal analítica del cobre y los resultados se presentan en la Figura 5. Se puede observar en esta Figura que, la señal de cobre disminuye con la creciente concentración del interferente. En el intervalo de $1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ a $6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ de ácido húmico, esta supresión de la señal no es significativa (aprox. 3 %), pero en presencia de $10 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ la señal del cobre baja aprox. 17 % respecto a la señal obtenida en ausencia del interferente. Estos resultados indican que el procedimiento propuesto puede ser aplicado en el análisis de aguas naturales que contienen bajas concentraciones de las sustancias húmicas ($\leq 6 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), por ejemplo de aguas subterráneas [182].

El procedimiento desarrollado fue validado utilizando el material de referencia certificado (SRM1643d, elementos traza en aguas naturales, NIST). El resultado promedio en la determinación de cobre en este material de referencia (5 réplicas) fue $20.3 \pm 0.6 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ por el procedimiento propuesto y $21.2 \pm 0.4 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (Tabla 12). Los dos valores obtenidos concuerdan satisfactoriamente con el valor certificado para el cobre ($20.5 \pm 3.8 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) demostrando la validez de los dos procedimientos.

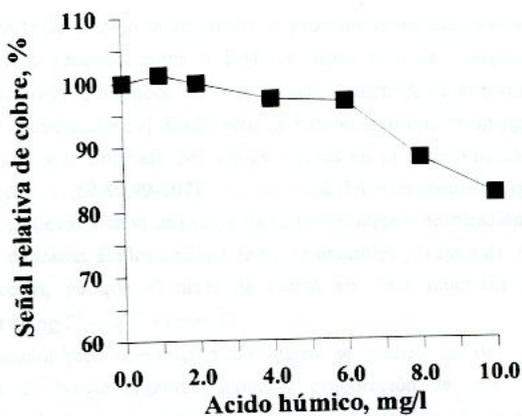


Figura 5. Efecto de la concentración del ácido húmico en la señal analítica de $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de Cu. (procedimiento propuesto para el análisis de aguas naturales).

Se analizaron tres muestras de agua subterránea utilizando el procedimiento propuesto y espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. Los resultados se presentan en la Tabla 15, donde se puede observar muy buena concordancia entre los dos procedimientos (no se detectó la diferencia estadísticamente significativa por ANOVA, $p < 0.05$).

Tabla 15. Resultados de la determinación de cobre en muestras de agua subterránea.

Muestra	Concentración promedio \pm DE, $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (n=5)	
	Procedimiento propuesto	ETA-AAS
1	5.6 ± 0.3	5.2 ± 0.1
2	23.6 ± 0.5	23.3 ± 0.4
3	11.7 ± 0.3	11.5 ± 0.2

IV.2. Determinación de hierro.

En esta parte del trabajo se desarrolla un procedimiento analítico para la determinación de hierro basado en la reacción entre el Fe(II) y disulfonato de batofenantrolina formando un complejo de color rojo, que puede ser cuantificado espectrofotométricamente. Como se discute en la parte de la Introducción, el disulfonato de batofenantrolina es un ligante bastante selectivo para el Fe(II) y ha sido utilizado por varios autores en la determinación de este elemento en diferentes matrices [61,62,86,99-107]. La novedad del procedimiento que se presenta en este trabajo consiste en llevar a cabo una etapa de separación/preconcentración para poder determinar el hierro a nivel de trazas. En los análisis de aguas naturales y/o agua de mar es requerido un alto poder de detección, ya que el nivel de hierro en estas muestras puede bajar hasta las concentraciones de $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ - $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Tabla 2).

La separación/preconcentración de hierro se planeó en dos etapas: extracción del complejo a un disolvente orgánico apolar y evaporación de este disolvente seguida por redisolución del residuo en un micro volumen. Gracias a este diseño, se espera poder cuantificar el hierro a niveles más bajos. Por otra parte, el aumento de poder de detección permite llevar el procedimiento a micro escala, con lo que disminuye el tamaño de muestra requerido y se usa menos cantidad de reactivos. Hay que destacar que en este tipo de procedimientos, en la etapa de extracción y utilizando pequeños volúmenes de solventes volátiles, crece el riesgo de cometer errores analíticos. Con el fin de reducir o eliminar estos errores se utiliza el método de estándar interno.

En el desarrollo del procedimiento los problemas a resolver fueron los siguientes:

- ◆ Selección de estándar interno adecuado.
- ◆ Selección de las condiciones experimentales en la etapa de extracción.
- ◆ Selección de un disolvente orgánico adecuado.
- ◆ Definición de la señal analítica.
- ◆ Estudio de las posibles interferencias.
- ◆ Estudios de especiación Fe(II)/Fe(III).

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los estudios sistemáticos para abordar cada uno de estos puntos que se acaban de mencionar.

IV.2.1. Procedimiento para el análisis de hierro total en aguas naturales.

El primer objetivo del trabajo fue lograr la cuantificación de hierro total en la muestra. La reacción con disulfonato de batofenantrolina es selectiva para el Fe(II), por lo que se llevó a cabo una pre-reducción de Fe(III) a Fe(II) con hidroxilamina en medio ácido [183]. De manera

semejante como en la determinación de cobre, se tomó en cuenta la concentración de hierro esperada en las muestras (del orden de $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), la sensibilidad del método con disulfonato de batofenantrolina [61] y el volumen mínimo requerido para registrar el espectro (100 μl). En base a estos datos se diseñó el esquema general del procedimiento que se presenta en la Figura 6. El factor de preconcentración esperado es de aproximadamente 50.

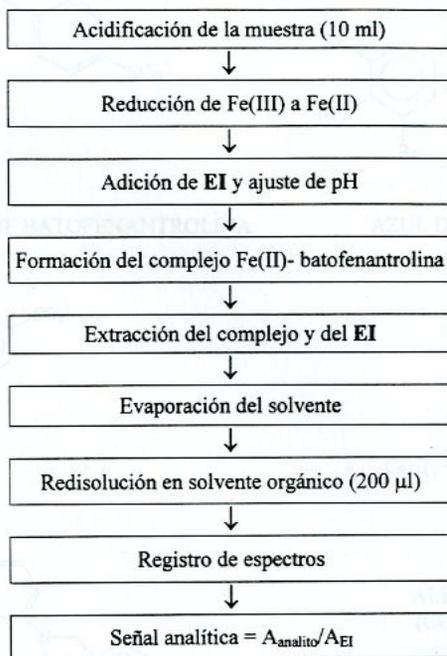
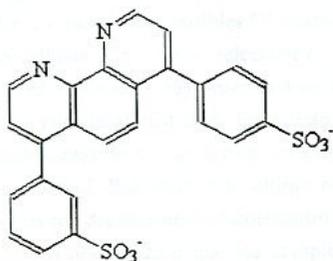


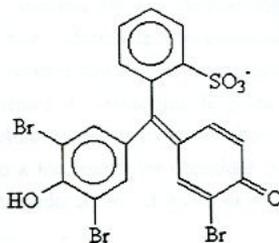
Figura 6. Esquema general del procedimiento a desarrollar (determinación de hierro total en aguas naturales).

En la selección de un estándar interno adecuado se tomó en cuenta el criterio espectral y el requisito de comportamiento semejante del analito y de EI en la etapa de extracción. El complejo Fe(II)-batofenantrolina presenta la banda de absorción en la región visible con el máximo a 535 nm, por lo que se consideraron algunos compuestos de color azul como posibles estándares internos. En la Fig. 7 se pueden comparar las estructuras moleculares de disulfonato

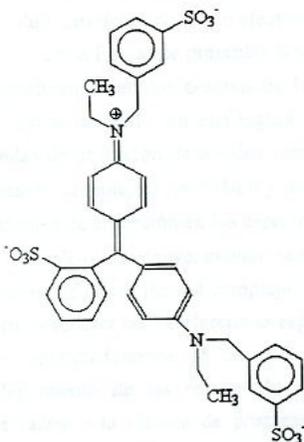
de batofenantrolina con las de azul de bromofenol y de erio glucina A, seleccionados debido a que se observó buena resolución espectral con el complejo de hierro y debido a presencia de grupos sulfónicos en sus estructuras.



DISULFONATO DE BATOFENANTROLINA



AZUL DE BROMOFENOL



ERIOGLAUCINA A

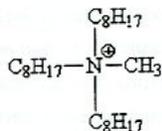
ALIQUAT 336
(CONTRA IÓN)

Figura 7. Estructuras moleculares del ión disulfonato de batofenantrolina, azul de bromofenol, erio glucina A y aliquat 336.

En la solución acuosa, el complejo Fe(II)-batofenantrolina presenta carga negativa y es necesario neutralizar esta carga para poder extraer el complejo a fase orgánica apolar. De manera semejante que en los procedimientos desarrollados para el cobre, se adiciona una amina cuaternaria que forma pares iónicos con el complejo. Además, los dos compuestos sulfonados seleccionados como posibles **EI** también deberían extraerse en forma de respectivos pares iónicos con aliquat 336. En la selección de contra-ión se probaron tres aminas cuaternarias (CTAB, BTAB y aliquat 336) observándose mejores rendimientos de extracción de pares iónicos en presencia de aliquat 336. En cuanto a **EI**, en los estudios preliminares se observó un bajo rendimiento de extracción de erioglaucina A respecto a los resultados obtenidos para azul de bromofenol. Por tanto, este último compuesto fue utilizado como **EI** en la determinación de hierro con disulfonato de batofenantrolina.

Cabe destacar que los complejos de Cu(I) – batocuproína y Fe(II) – batofenantrolina presentan estructuras semejantes por lo que parece lógico utilizar el mismo surfactante como contra-ión y el mismo compuesto como **EI** en los procedimientos extracto-espectrofotométricos basados en la formación de estos dos complejos. También hay que recordar, que el espectro de azul de bromofenol no se vió afectado en presencia de hidroxilamina (capítulo IV.1.1).

En la Fig. 8a se presentan los espectros del complejo Fe(II)-batofenantrolina y del azul de bromofenol obtenidos después de la extracción con la solución $0.03 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de aliquat 336 en cloruro de metileno. En esta Figura se puede observar que existe un pequeño solapamiento entre bandas de absorción de los dos compuestos, por lo que no se pueden obtener las absorbancias netas del complejo a $\lambda = 535 \text{ nm}$ y del **EI** a $\lambda = 602 \text{ nm}$, (longitudes de onda correspondientes a los máximos de absorción en los espectros). Sin embargo, la contribución espectral de **EI** en la señal del complejo disminuye, cuando se utiliza la longitud de onda $\lambda = 490 \text{ nm}$, que no corresponde al máximo de absorción del complejo. Este cambio de longitud de onda para el complejo de analito permite reducir las interferencias espectrales, pero se tendrá pérdida de sensibilidad para el hierro de aproximadamente 18 %. Por otro lado, los posibles errores analíticos causados por solapamiento de las bandas de absorción podrían ser eliminadas utilizando los espectros derivados y la técnica de cruzamiento en cero (*zero-crossing*). Se obtuvieron los espectros derivados de primer, segundo y tercer orden. Las mejores condiciones para la técnica de cruzamiento en cero se observaron utilizando segunda derivada (Fig. 8b).

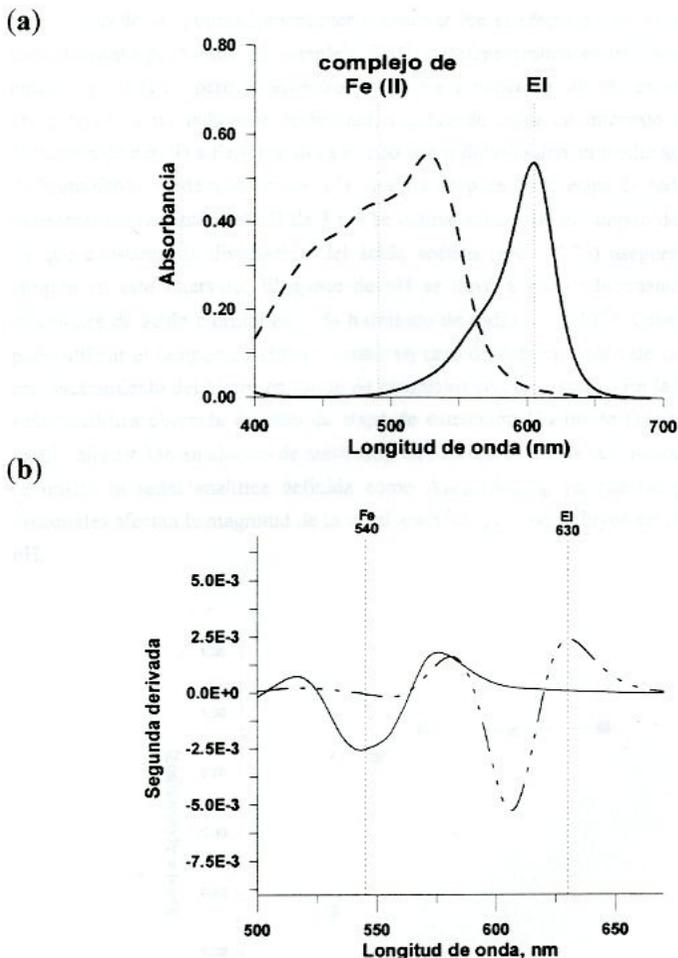


Figura 8. Espectros de absorción de complejo Fe(II)-batofenantrolina ($0.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe) y de EI ($8\cdot 10^{-5}$ % de azul de bromofenol) después de extracción a $0.03 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ alícuat 336 en cloruro de metileno. (Volumen de fase acuosa 10 ml, volumen de fase orgánica 1.7 ml, referencia cloruro de metileno)-

(a) – espectros de cero orden; (b) – espectros derivados de segundo orden.

Uno de los puntos importantes a estudiar fue el efecto de pH en la señal analítica en el procedimiento propuesto. El complejo Fe(II)-batofenantrolina es estable en el intervalo de pH entre 3 y 10 [61], pero el espectro de EI va a depender de pH en este intervalo (azul de bromofenol es un indicador ácido-base, cambio de color en intervalo de pH 3.0 – 4.6). La reducción de Fe(III) a Fe(II) se lleva a cabo con hidroxilamina en medio ácido, por lo que el azul de bromofenol puede adicionarse a la muestra después de la etapa de reducción (Fig 6). En los experimentos realizados el pH de 3 a 7 se obtuvo utilizando el tampón de acetatos ($0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), ya que constante de disociación del ácido acético ($\text{pK}_a = 4.78$) asegura buena capacidad del tampón en este intervalo. El ajuste de pH se llevó a cabo adicionando respectivamente las soluciones de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio ($2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Cabe mencionar, que no se pudo utilizar el tampón de citratos, como en caso de determinación de cobre, debido al posible enmascaramiento del hierro en forma de complejos con los citratos. En la Figura 9 se presenta la señal analítica obtenida después de etapa de extracción (10 ml de fase acuosa, 1.7 ml de $0.03 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ alíquot 336 en cloruro de metileno), en función de pH de la solución acuosa. En este caso se utilizó la señal analítica definida como $A_{490\text{nm}}/A_{602\text{nm}}$, ya que las posibles interferencias espectrales afectan la magnitud de la señal analítica, pero no influyen en el resultado de efecto de pH.

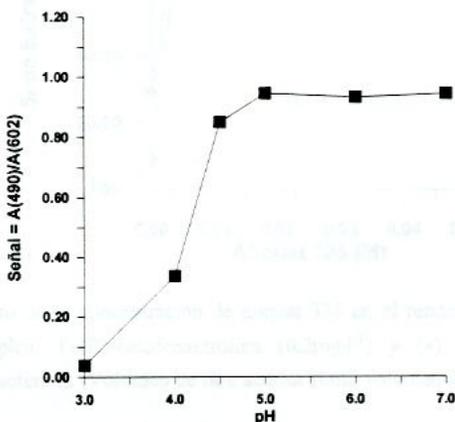


Figura 9. Efecto de pH en la señal analítica para $0.2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe y $8\cdot 10^{-5} \%$ de EI. La señal fue obtenida después de extracción a $0.03 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ alíquot 336 en cloruro de metileno. (Volumen de fase acuosa 10 ml, volumen de fase orgánica 1.7 ml, referencia cloruro de metileno).

Una vez seleccionado el pH de fase acuosa de 5.5, se procedió con los estudios para definir las condiciones experimentales en la etapa de separación/preconcentración. En primer lugar, se decidió utilizar el cloruro de metileno debido a su alta volatilidad ($T_{\text{ebull}} = 39.8 \text{ }^\circ\text{C}$) y menor toxicidad (respecto a otros solventes como tetracloruro de carbono o cloroformo). Se estudió el efecto de la concentración de aliquat 336 en cloruro de metileno en el rendimiento de extracción del complejo Fe(II)-batofenantrolina y de EI. De los resultados obtenidos (Fig. 10) se seleccionó la concentración de $0.03 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de aliquat, ya que resultó ser la mínima que aseguró el rendimiento de extracción de los dos compuestos aprox. al 100 %. Cabe mencionar que después de evaporación del solvente, es posible que un exceso del surfactante se quede en el residuo seco aumentando el riesgo de turbidez de las soluciones finales, por lo que es necesario utilizar su concentración más baja posible.

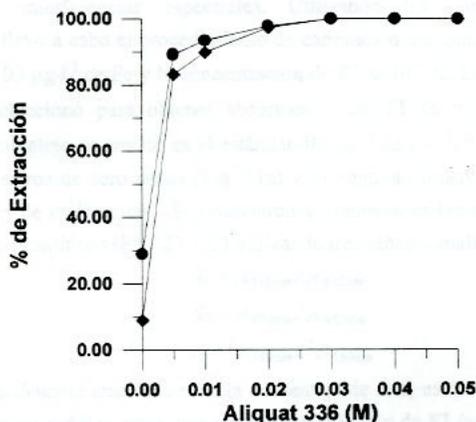


Figura 10. Efecto de la concentración de aliquat 336 en el rendimiento de extracción de: (\blacktriangle) complejo Fe(II)-batofenantrolina ($0.2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y (\bullet) EI ($8\cdot 10^{-5}$ % de azul de bromofenol). (Volumen de fase acuosa 10ml, volumen de fase orgánica 1.7ml).

Después de la extracción de pares iónicos de Fe(II) – batofenantrolina y de EI con aliquat 336 a cloruro de metileno, se llevó a cabo la segunda etapa de preconcentración por evaporación del solvente seguida por redisolución del residuo seco en un micro volumen. El residuo seco contiene el complejo de hierro, el EI y el aliquat 336. En la selección de las condiciones de

redisolución se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: solubilidad de los compuestos mencionados en disolvente, posibilidades instrumentales de obtener la lectura en un micro volumen y el factor de preconcentración deseado. Se probaron los siguientes solventes: metanol, cloroformo, cloruro de metileno y la mezcla (1:1) metanol – cloroformo. Los mejores resultados se obtuvieron con cloruro de metileno, se utilizó su volumen de 200 μl y la solución obtenida fue centrifugada (3,000 g, 1min) para separar trazas de agua que provocan turbidez. En cuanto al factor de preconcentración, en las condiciones descritas se obtiene la preconcentración total de aproximadamente 50 veces (volumen de muestra 10 ml, volumen final 200 μl , rendimiento de extracción de aprox. 100 %).

Los resultados presentados hasta ahora han permitido seleccionar las condiciones experimentales más adecuadas para el procedimiento propuesto. El siguiente problema a resolver fue como definir la señal analítica. En la discusión sobre selección del EI se mencionó que existe una pequeña sobreposición de las bandas de absorción del complejo Fe(II)-batofenantrolina y del azul de bromofenol (Fig. 8a) y se propusieron algunas alternativas para evitar errores analíticos debido a estas interferencias espectrales. Utilizando las condiciones experimentales seleccionadas, se llevó a cabo el procedimiento de calibración utilizando las soluciones de 0, 20, 40, 50, 60, 80 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe y la concentración de EI al $10^{-3}\%$. La concentración de azul de bromofenol se seleccionó para obtener absorbancia del EI ($\lambda = 602\text{ nm}$) semejante a la absorbancia del complejo de analito en el estándar 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe ($\lambda = 535\text{ nm}$). En la Fig. 11 se presentan los espectros de cero orden (Fig. 11a) y de segundo orden (Fig. 11b) obtenidos para algunas soluciones de calibración. Se obtuvieron y compararon las funciones de calibración y algunos parámetros analíticos (R^2 , LD, LC) utilizando tres señales analíticas:

$$S_1 = A_{535\text{nm}} / A_{602\text{nm}}$$

$$S_2 = A_{490\text{nm}} / A_{602\text{nm}}$$

$$S_3 = {}^1D_{540\text{nm}} / {}^1D_{630\text{nm}}$$

De acuerdo con lo descrito anteriormente, la desventaja de la S_1 es que las absorbancias medidas no corresponden a las señales netas de complejo de analito y de EI (solapamiento de las bandas espectrales). En cuanto a la S_2 , el solapamiento espectral es menos notorio, pero se obtiene una pérdida de sensibilidad para el hierro (aprox. 18 %). La técnica de derivación (S_3) permite eliminar los errores debido a la solapamiento espectral de los dos compuestos. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando la señal S_2 . Esto significa que la pérdida de sensibilidad debido al procedimiento de derivación de los espectros tiene el efecto predominante en comparación con los errores debido al solapamiento de espectros de cero orden utilizando longitudes de onda de 490 nm para Fe(II)-batofenantrolina y 602 nm para EI.

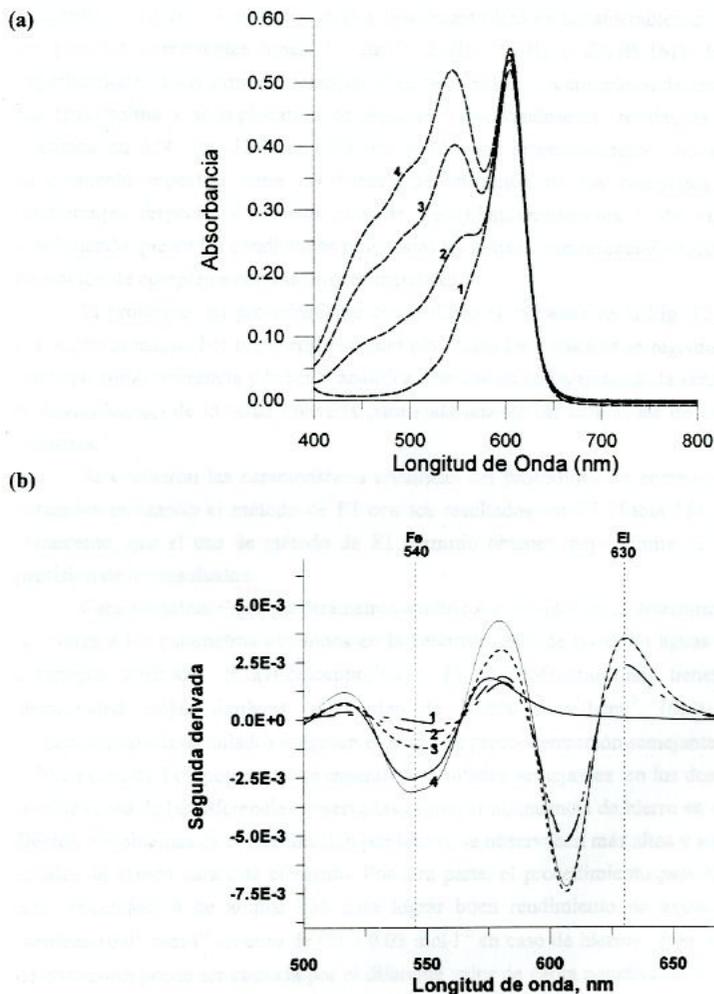


Figura 11. Espectros de las soluciones de calibración (las concentraciones se refieren a la solución acuosa, antes de llevar a cabo el procedimiento): 1 - 10^{-3} % EI; 2 - $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe(II) + EI; 3 - $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe(II) + EI; 4 - $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ Fe(II) + EI.

(a) - espectros de cero orden

(b) - espectros derivados de segundo orden

A continuación se llevó a cabo el estudio de posibles interferencias en el procedimiento desarrollado. La reacción entre Fe(II) y batofenantrolina es considerablemente selectiva, siendo los posibles interferentes iones de Cu(II), Zn(II), Ni(II) y Co(II) [61]. En las condiciones experimentales anteriormente seleccionadas, se formaron los complejos de estos cuatro iones con batofenantrolina y se registraron los espectros observándose las bandas de absorción con los máximos en 324 nm, 321 nm, 323 nm y 324 nm respectivamente. No se observó ningún solapamiento espectral entre las bandas de absorción de los complejos con los posibles interferentes respecto a los espectros de Fe(II)-batofenantrolina y de azul de bromofenol confirmando que en las condiciones propuestas no existen interferencias espectrales causadas por formación de complejos con otros iones metálicos.

El protocolo del procedimiento desarrollado se presenta en la Fig. 12. El blanco (todos los reactivos menos Fe) fue corrido en paralelo, todos los espectros se registraron con cloruro de metileno como referencia y la señal analítica neta fue obtenida restando la señal de blanco ($S_{\text{blanco}} = A_{490\text{nm}}/A_{602\text{nm}}$) de la señal obtenida para cada una de las soluciones de calibración y de las muestras.

Se evaluaron las características analíticas del procedimiento comparando los resultados obtenidos utilizando el método de EI con los resultados sin EI (Tabla 16). En la Tabla se ve claramente, que el uso de método de EI permitió obtener mejor límite de detección y mejor precisión de los resultados.

Cabe mencionar que los parámetros analíticos obtenidos en la determinación de hierro son inferiores a los parámetros obtenidos en la determinación de cobre en aguas naturales. Los dos complejos utilizados (Cu(I)-batocuproína y Fe(II)-batofenantrolina) tienen coeficientes de absorptividad molar similares (del orden de $20,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$, [61]), además los dos procedimientos desarrollados aseguran el factor de preconcentración semejante (60 en caso de Cu y 50 en caso de Fe), por lo que se esperaban resultados semejantes en los dos casos. La primera posible causa de las diferencias observadas es mayor abundancia de hierro en el medio ambiente. Debido a problemas de contaminación por hierro, se observaban más altos y menos reproducibles señales de blanco para este elemento. Por otra parte, el procedimiento para hierro requiere más alta concentración de aliquat 336 para lograr buen rendimiento de extracción a cloruro de metileno ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ en caso de Cu y $0.03 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ en caso de hierro). Esta diferencia en efecto de contra-ion puede ser causada por el diferente valor de carga negativa de los dos complejos en fase acuosa. Como ya se ha mencionado antes, el hecho de utilizar más altas concentraciones de aliquat 336, provoca turbidez de las soluciones finales que también empeora los resultados analíticos. Comparando los datos presentados en las Tablas 14 y 16, se observa peor precisión de los resultados para hierro, lo que confirma las posibles causas de peores resultados para este elemento, mencionadas en la discusión.

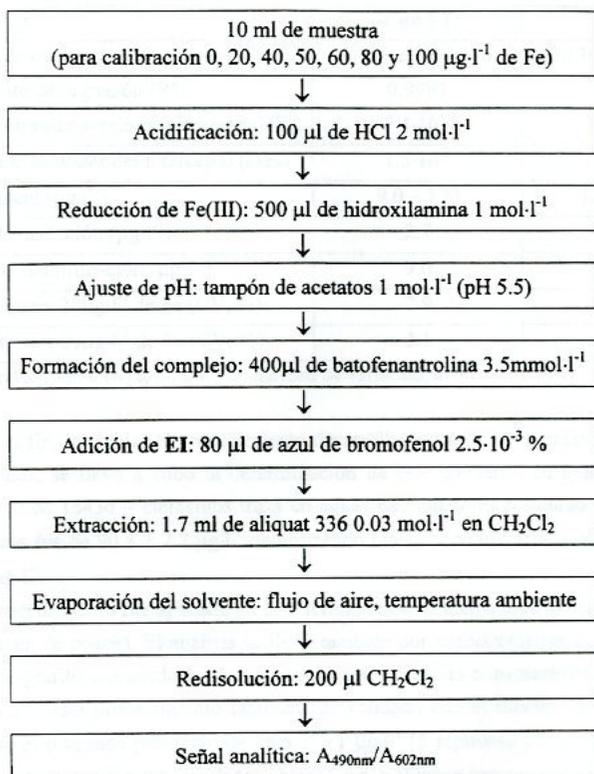


Figura 12. El protocolo del procedimiento propuesto para determinación de hierro total en aguas naturales.

Tabla 16. Parámetros analíticos en la determinación de hierro total en aguas naturales evaluados sin y con empleo de estándar interno.

Parámetro	Con EI	Sin EI
Función de calibración ($S = a \cdot c_{Fe} + b$)	$0.115 \cdot c_{Fe} + 0.016$	$0.139 \cdot c_{Fe} + 0.017$
Coefficiente de regresión (R^2)	0.9983	0.9862
Desviación estándar de la pendiente (DE_a)	$5.4 \cdot 10^{-4}$	$1.7 \cdot 10^{-3}$
Desviación estándar del intercepto (DE_b)	$1.5 \cdot 10^{-2}$	$4.7 \cdot 10^{-2}$
Rango lineal ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	9.0 – 100	12.0 – 100
Límite de detección ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	2.7	3.6
Límite de cuantificación ($\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$)	9.0	12.0
Precisión para $20 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de Fe (CV, %)	7.9	14.8
Precisión para $80 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ de Fe (CV, %)	3.1	7.1

c_{Fe} - concentración de Fe en $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, CV - coeficiente de variación, $n=6$.

Con el fin de validar el procedimiento desarrollado para determinación de hierro total en aguas naturales, se llevó a cabo la determinación de este elemento en material de referencia certificado (SRM 1643d - elementos traza en aguas naturales). El resultado promedio obtenido para 5 réplicas fue de $90.8 \pm 2.7 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ demostrando buena concordancia con el valor certificado $91.2 \pm 3.9 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.

El procedimiento fue aplicado en la determinación de hierro total en muestras reales (agua de grifo y agua de pozos). El análisis se llevó también por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito utilizando las condiciones experimentales e instrumentales que se resumen en la Tabla 17. Este procedimiento también fue validado con el mismo material de referencia obteniéndose el resultado promedio de $88.5 \pm 3.1 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ (5 réplicas) que concuerda tanto con el valor certificado como con los resultados obtenidos por el procedimiento propuesto.

Los resultados de los análisis de muestras reales se presentan en la Tabla 18, donde se puede observar muy buena concordancia entre los resultados obtenidos por el procedimiento propuesto y por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito para más altas concentraciones de hierro. En caso de agua de pozo #1 (la concentración de Fe aprox. $20 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) se obtuvo una diferencia significativa entre los resultados de los dos procedimientos, siendo el resultado del procedimiento propuesto el más confiable debido a mejor poder de detección (LD de Fe por espectrometría de absorción atómica en las condiciones utilizadas para este trabajo fue de $4.5 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$).

Tabla 17. Parámetros instrumentales y experimentales en la determinación de hierro en aguas naturales por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.

Longitud de onda	248.3 nm		
Corrección del fondo	Lámpara de deuterio		
Técnica de atomización	Atomización desde la pared		
Superficie de atomización	Grafito recubierto pirolíticamente		
Modificador	Mg(NO ₃) ₂ (5µg de Mg)		
Soluciones de calibración	0, 16, 32, 48, 64 y 80 µg·l ⁻¹		
Dilución de la muestra	1:1 con agua desionizada (SRM 1643d igual)		
Programa de temperatura			
Etapas	Temperatura, °C	Tiempo "ramp", s	Tiempo "hold", s
Secado	130	25	20
Pirólisis	1100	10	10
Enfriamiento	20	1	15
Atomización	2300	0	4
Limpieza	2800	1	3

Tabla 18. Resultados de la determinación de hierro total en muestras reales por el procedimiento propuesto y por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.

Muestra	Concentración promedio de hierro, µg·l ⁻¹ ± DE (n=5)	
	Procedimiento propuesto	ETA-AAS
Agua de grifo	74.1 ± 1.3	74.0 ± 2.1
Agua de pozo #1	24.2 ± 2.1	19.8 ± 4.1
Agua de pozo #2	35.0 ± 1.7	37.6 ± 1.4



IV.2.2. Estudios de especiación de Fe(II)/Fe(III) en aguas naturales.

La mayoría de los ligantes y agentes quelantes utilizados para la determinación espectrofotométrica de hierro reaccionan selectivamente con un estado de oxidación del elemento, por lo que se han reportado numerosos estudios sobre especiación de Fe(III)/Fe(II) por espectrofotometría [120]. Sin embargo, pocos autores tomaron en cuenta los cambios en potencial redox de Fe(III)/Fe(II) que ocurren cuando una de las formas del elemento se encuentra en forma de complejo. La reacción de complejación afecta el equilibrio entre iones Fe(II)/Fe(III) existente en la muestra, favoreciendo el estado de oxidación que forma el complejo estable y causando posibles errores analíticos.

El disulfonato de batofenantrolina, como agente complejante selectivo para Fe(II) ha sido utilizado en la cuantificación de esta forma del elemento [86]. En este trabajo, la reacción con batofenantrolina se utilizó para desarrollar el procedimiento de determinación de hierro total (previa reducción de Fe(III) a Fe(II)). La última parte de trabajo consiste en estudios sobre la posible especiación de Fe(total) / Fe(II) por el procedimiento propuesto. La idea a desarrollar fue llevar a cabo un enmascaramiento de Fe(III) en la muestra. De esta manera, se esperaba evitar el cambio de especiación natural del elemento provocada por la complejación de Fe(II) con batofenantrolina.

En la Tabla 19 se presentan los ligantes de Fe(II) y Fe(III) junto con las respectivas constantes de formación de complejos.

Tabla 19. Constantes de formación global ($\log \beta$) de algunos ligantes con Fe(II) y Fe(III) [184,185].

LIGANTES	Fe(II), $\log \beta$		Fe(III), $\log \beta$		
	FeL	FeL ₂	FeL	FeL ₂	FeL ₃
Acido 5-sulfosalicílico	5.9	10	14.4	25.2	32.2
Acido oxálico	----	----	8.0	14.3	18.5
Fluoruro	<1.5	----	5.2	9.2	11.9
Acetilacetona	4.7	8.0	9.3	17.9	25.1
EDTA	14.3	----	25.1	----	----
Ferrón	----	----	8.9	17.3	25.2
8-hidroxiquinoleína	8.0	15.0	12.3	23.6	33.9

El logaritmo de la constante de formación global del complejo Fe(II)-batofenantrolina (1:3) es de 22.7 [61], por lo que no se espera fuerte competencia de los enmascarantes con la

batofenantrolina en la complejación de Fe(II). Para el estudio de enmascaramiento de Fe(III) se tomaron en cuenta iones fluoruro, el ácido oxálico y EDTA, ya que los respectivos complejos pueden formarse a pH 5.5 (seleccionado anteriormente) y no presentan espectros en la región visible.

En primer lugar se estudió el efecto del orden de adición de reactivos en la formación de Fe(II)-batofenantrolina y en el enmascaramiento de Fe(III). Se preparó una serie de soluciones de $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe(III), $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe(II) y $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe(III) + $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe(II), se ajustó el pH a 5.5 y luego se adicionaron los iones enmascarantes ($0.05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ácido oxálico, $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaF) y la batofenantrolina ($35 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) en orden diferente.

Es muy importante que, en ausencia de enmascarante, se observó un aumento en la absorbancia a 535nm medida en la solución de Fe(II) + Fe(III) con el tiempo. Esto demuestra que, la formación del complejo Fe(II)-batofenantrolina afecta el equilibrio entre las dos formas del elemento en la solución favoreciendo el estado de oxidación Fe(II). En otras palabras, con el tiempo parte de Fe(III) se reduce y forma el complejo observándose el aumento de la señal analítica. De ahí que, para llevar los estudios de especiación, es necesario enmascarar el Fe(III) con el fin de evitar su reducción en la solución después de formar el complejo Fe(II)-batofenantrolina.

En el caso de las soluciones de Fe(II), cuando el enmascarante fue adicionado primero, se observó más baja absorbancia a 535nm respecto al resultado obtenido en ausencia de enmascarante. El efecto más notorio fue obtenido en la presencia de EDTA, donde no se formó el complejo Fe(II)-batofenantrolina. La primera causa posible puede ser la formación del complejo estable Fe(II)-enmascarante, que no se descompone totalmente al adicionar batofenantrolina. Por otro lado, la presencia de los enmascarantes utilizados puede afectar potencial redox del sistema Fe(III)/Fe(II) en la solución, favoreciendo al Fe(III) debido a formación de complejo Fe(III)-enmascarante. Sin embargo, al adicionar primero batofenantrolina, la absorbancia a 535 nm en las soluciones de Fe(II) no se vió afectada, lo que indica que el complejo Fe(II)-batofenantrolina no se descompone al adicionar uno de los tres posibles enmascarantes de Fe(III).

En las soluciones de Fe(III), independientemente del orden de adición de reactivos, la señal de Fe(II)-batofenantrolina fue menor que el 2% respecto a absorbancia de este complejo formado en la solución de Fe(II) y en ausencia de enmascarante.

Finalmente, en caso de las soluciones de Fe(III) + Fe(II) y adicionando en primer lugar batofenantrolina, se obtuvo la absorbancia a 535 nm constante con el tiempo (valores semejantes que en las soluciones de Fe(II)). Sin embargo, cambiando orden de adición de reactivos, se obtuvo más bajas absorbancias, lo que confirma el efecto de presencia del complejo Fe(III)-

enmascarante (antes de formar el complejo Fe(II)-batofenantrolina) en el potencial redox de Fe(III)/Fe(II).

Los resultados obtenidos demuestran que, en los estudios de especiación Fe(III)/Fe(II), es necesario en primer lugar formar el complejo Fe(II)-batofenantrolina y posteriormente enmascarar el Fe(III).

Se estudió el efecto de la concentración de cada uno de los posibles enmascarantes en la señal analítica de Fe total y de Fe(II). Para ello, en tubos de Eppendorff, se agregaron 50 μl de la solución de 25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe(III) + 25 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de Fe(II) y los tubos se dividieron en dos series. En la primera serie de tubos se llevó a cabo el procedimiento desarrollado en el presente trabajo para el hierro total. Es decir, se realizó la reducción de Fe(III) a Fe(II) (50 μl de HCl 2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ + 100 μl de hidroxilamina 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), luego se ajustó el pH a 5.5 (200 μl de tampón de acetatos 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), se agregaron 100 μl de batofenantrolina 3.5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ para formar el complejo con Fe(II) y finalmente se adicionaron diferentes concentraciones de enmascarante (0.2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA: 0 - 500 μl ; 1.0 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ácido oxálico: 0 - 350 μl ; 1.0 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ fluoruro de sodio: 0 - 500 μl). El volumen final fue de 1 ml en cada uno de los tubos (completado con agua desionizada). En la segunda serie de los tubos se llevó el procedimiento para determinación de Fe(II), omitiendo la etapa de reducción y enmascarando el Fe(III). El procedimiento consistió en ajustar el pH a 5.5, adicionar la batofenantrolina y posteriormente los enmascarantes (las mismas concentraciones que en la primera serie de los tubos). En la Fig. 13 se presentan las señales relativas de Fe(II)-batofenantrolina en las dos series de soluciones (100 % - absorbancia de Fe(II)-batofenantrolina en ausencia de enmascarante, obtenida utilizando el procedimiento para hierro total). Lógicamente, en caso de un buen enmascaramiento la señal relativa obtenida en el procedimiento para el Fe(II) debería ser el 50 %.

En primer lugar se puede observar, que la presencia de enmascarantes en el procedimiento para hierro total no afecta la señal analítica, lo que significa que la reducción de Fe(III) es completa y que no se presenta la reacción entre los enmascarantes estudiados y el Fe(II)-batofenantrolina.

Por otra parte, en el procedimiento para el Fe(II) se observa el efecto de todos los enmascarantes en la señal analítica (la señal analítica se midió 5 min después de adición de todos los reactivos). En ausencia de enmascarante la señal relativa de Fe(II)-batofenantrolina es más alta que 50 %, lo que significa que se comete el error analítico positivo. Este resultado confirma, que la formación de Fe(II)-batofenantrolina favorece el estado de oxidación Fe(II) en la solución provocando un cambio en la especiación natural de hierro en la muestra (en el caso estudiado la muestra contiene 50 % de cada una de las dos formas de hierro). Con la creciente concentración de enmascarantes, la absorbancia de Fe(II)-batofenantrolina disminuye acercándose al valor 50 %

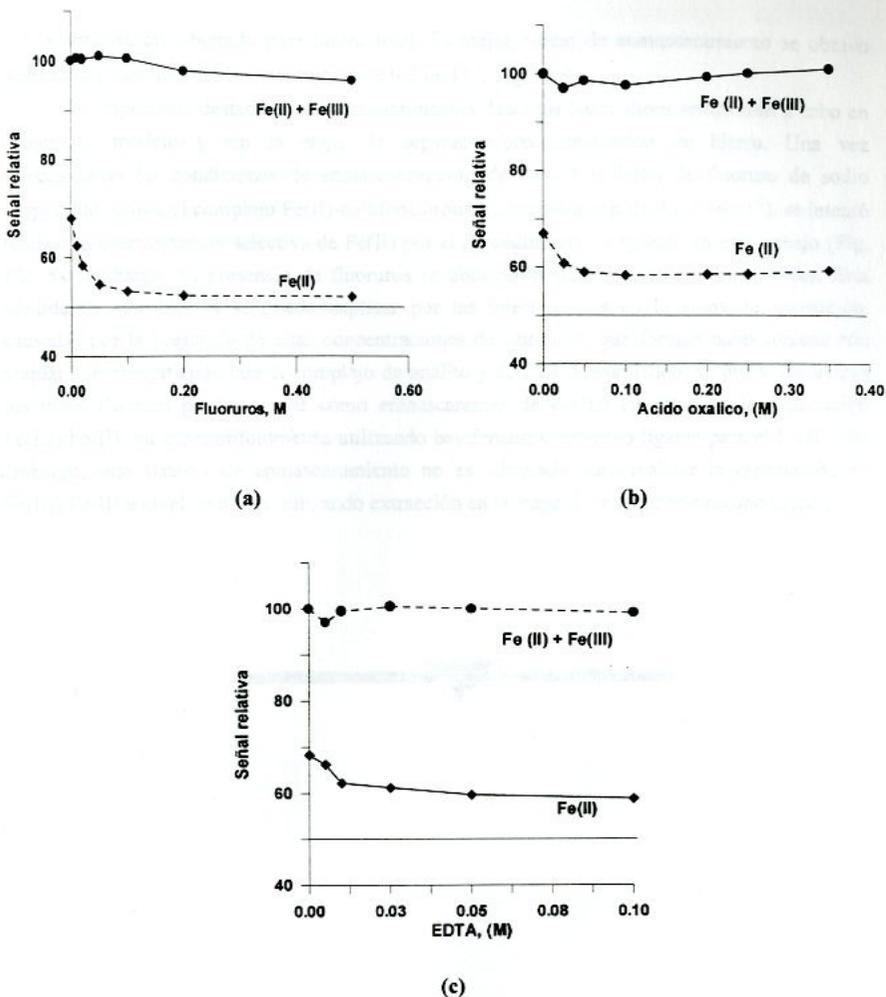


Figura 13. Efecto de la concentración de enmascarante en la señal relativa de Fe(II)-batofenantrolina en el procedimiento para la determinación de hierro total (-●-) y de Fe(II) (-◆-) (condiciones en el texto).

(a) Fluoruro de sodio

(b) Ácido oxálico

(c) EDTA.

de la absorbancia obtenida para hierro total. El mejor efecto de enmascaramiento se obtuvo utilizando iones fluoruro (concentración de $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$, Fig. 13a)

Es importante destacar que, los experimentos descritos hasta ahora se llevaron a cabo en soluciones modelo y sin la etapa de separación/preconcentración de hierro. Una vez seleccionadas las condiciones de enmascaramiento de Fe(III) (adición de fluoruro de sodio después de formar el complejo Fe(II)-batofenantrolina, concentración final $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), se intentó realizar la determinación selectiva de Fe(II) por el procedimiento propuesto en este trabajo (Fig. 12). Sin embargo, en presencia de fluoruros se obtuvieron señales analíticas más bajas. Esta pérdida de sensibilidad se puede explicar por las interferencias en la etapa de extracción, causadas por la presencia de altas concentraciones de fluoruros, que forman pares iónicos con aliquat 336 compitiendo con el complejo de analito y con EI. Resumiendo, se puede decir, que los iones fluoruro pueden servir como enmascarantes de Fe(III) en estudios de especiación Fe(III)/Fe(II) por espectrofotometría utilizando batofenantrolina como ligante para el Fe(II). Sin embargo, este sistema de enmascaramiento no es adecuado para realizar la especiación de Fe(III)/Fe(II) a nivel de trazas utilizando extracción en la etapa de separación/preconcentración.

CAPITULO V



Conclusiones

CAPÍTULO V

Conclusiones

V. CONCLUSIONES

Los estudios realizados en el presente trabajo han permitido poner a punto dos procedimientos extracto espectrofotométricos para la determinación de cobre y un procedimiento para la determinación de hierro. Los procedimientos desarrollados se basan en la formación de complejos Cu(I)-batocuproína y Fe(II)-batofenantrolina, que pueden ser cuantificados por espectrofotometría en la región visible.

La novedad del trabajo realizado consiste en diseñar las etapas de separación/preconcentración de los analitos, logrando su cuantificación a nivel de trazas con el uso de un volumen menor de muestra y gastando menos reactivos (micro procedimientos). Los posibles errores analíticos cometidos durante el manejo de muestra y debido al uso de pequeños volúmenes de solventes orgánicos fueron controlados utilizando el método de estándar interno.

En el diseño de cada uno de los procedimientos se tomó en cuenta la composición química de la muestra (suero o agua natural), el poder de detección del método espectrofotométrico utilizado (Cu(I)-batocuproína y Fe(II)-batofenantrolina), el nivel esperado del analito en la muestra y el factor de preconcentración deseado.

La etapa más importante del trabajo fue la selección de un estándar interno adecuado. Tomando en cuenta el criterio espectral y el requisito de comportamiento semejante del complejo de analito y del EI en cada una de las etapas del procedimiento, se llevaron a cabo los estudios sistemáticos comparando diferentes compuestos. Como resultado de estos estudios, el azul de bromofenol fue seleccionado como EI tanto para la determinación de cobre como para la determinación de hierro. Cabe mencionar que la concentración de EI utilizado aseguró un valor semejante de absorbancia del EI y del complejo en la solución de calibración correspondiente al más alto estándar del analito o correspondiente al punto central de la curva de calibración.

En el procedimiento propuesto para la determinación de cobre en suero, la separación del analito se llevó a cabo por extracción de pares iónicos Cu(I)-batocuproína - alíquot 336 a cloroformo. El diseño en escala micro ha permitido disminuir el tamaño de muestra (300 μ l) respecto a los resultados reportados por otros autores [48]. Gracias al uso del método de estándar interno se obtuvieron muy buenas características analíticas. El procedimiento fue validado utilizando un material de referencia (suero control) y comparando los resultados de los análisis de muestras reales con los resultados obtenidos por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. Los resultados del procedimiento propuesto estuvieron de acuerdo con el intervalo indicado por el suero control para el cobre y con los resultados por espectrometría de absorción atómica.

Debido a que se esperan más bajas concentraciones de cobre en muestras de agua natural, en el procedimiento propuesto para este tipo de muestra, la separación/preconcentración del

analito se llevo a cabo en dos etapas: extracción de pares iónicos Cu(I)-batocuproína – aliquat 336 a cloruro de metileno y evaporación del disolvente seguida por redisolución del residuo en 150 μl de cloruro de metileno. En este caso, además de obtener muy buenas características analíticas que permiten cuantificar cobre a partir de una concentración $1.3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, otra ventaja del micro procedimiento desarrollado es el uso de menos cantidad de solvente orgánico en comparación con otros trabajos publicados [48,186,187]. El procedimiento propuesto fue validado utilizando el material de referencia certificado (SRM, elementos traza en aguas naturales) y comparando los resultados obtenidos en análisis de muestras reales con los resultados obtenidos por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito. Se obtuvo buena concordancia de los resultados por el procedimiento propuesto con el valor certificado para cobre en SRM y con los resultados por espectrometría de absorción atómica.

En el caso del análisis de hierro, se desarrolló el procedimiento para la determinación de hierro total en aguas naturales y se intentó desarrollar el procedimiento para especiación de Fe(III)/Fe(II), los dos para el análisis a nivel de trazas. En cuanto a la determinación de hierro total, el procedimiento propuesto consiste en pre-reducción de Fe(III) a Fe(II), formación del complejo Fe(II)-batofenantrolina y su extracción en forma de pares iónicos con aliquat 336 a cloruro de metileno. En la segunda etapa de preconcentración se lleva a cabo la evaporación del solvente y se redissuelve el residuo en 200 μl de cloruro de metileno. Gracias al uso del método de estándar interno se logró obtener el límite de cuantificación de $9.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, a pesar de los posibles errores aleatorios cometidos durante el manejo de la muestra en micro escala (uso de pequeños volúmenes de solvente orgánico volátil). Este límite de cuantificación y también otros parámetros analíticos resultaron ser peores respecto a los parámetros obtenidos en la determinación de cobre en aguas naturales. Los dos complejos utilizados (Cu(I)-batocuproína y Fe(II)-batofenantrolina) tienen coeficientes de absorción molar similares (del orden de $20,000 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{l}\cdot\text{cm}^{-1}$, [61]), además los dos procedimientos desarrollados aseguran el factor de preconcentración semejante (60 en caso de Cu y 50 en caso de Fe), por lo que se esperaban resultados semejantes en los dos casos. En la discusión se consideraron dos posibles causas de las diferencias observadas: (1) problemas de contaminación por hierro (elemento muy abundante en el medio ambiente) y (2) uso de más alta concentración de aliquat 336 en la extracción del complejo de Fe(II). En la etapa de validación del procedimiento propuesto para el hierro total, se determinó el hierro en el material de referencia certificado (SRM, elementos traza en aguas naturales) y en cuatro muestras reales, obteniéndose muy buena concordancia tanto con el valor certificado para hierro en el SRM, como con los resultados obtenidos por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito.

En cuanto a los resultados obtenidos en los estudios para la posible especiación Fe(III)/Fe(II), se propuso el siguiente esquema: en primer lugar determinar hierro total por el

procedimiento desarrollado y, posteriormente determinar el Fe(II) en la misma muestra. Para la determinación de Fe(II) se utiliza un procedimiento analítico semejante que para hierro total, omitiendo sin embargo la etapa de pre-reducción de Fe(III) a Fe(II) y enmascarando el Fe(III). Se logró poner a punto las condiciones de enmascaramiento de Fe(III) utilizando la solución de fluoruro de sodio $0.2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ que se adiciona a la solución después de formación de complejo Fe(II)-batofenantrolina. A la hora de implementar la etapa de enmascaramiento en el procedimiento desarrollado, se obtuvieron resultados negativos debido a la competencia de iones fluoruro con el complejo de analito y con **EI** por formar pares iónicos con aliquat 336. En presencia de fluoruros se obtuvo una pérdida importante de sensibilidad, por lo que el esquema de especiación propuesto no puede ser utilizado en el análisis a nivel de trazas. Sin embargo, este esquema puede ser recomendado para especiación Fe(III)/Fe(II) para concentraciones más altas, sin llevar a cabo la etapa de separación/preconcentración.

Resumiendo las conclusiones que se acaban de presentar, los procedimientos desarrollados en este trabajo pueden ser recomendados para la determinación de cobre en suero y en aguas subterráneas, así como para la determinación de hierro total en aguas naturales debido a las siguientes ventajas:

- 1 – Procedimientos no rigurosos y simples.
- 2 – Lectura de absorbancias del complejo de analito y del **EI** a dos longitudes de onda utilizando espectros de orden cero.
- 3 – Buenas características analíticas.
- 4 – Pequeño volumen de muestra (muy importante en el análisis clínico).
- 5 – Ahorro de reactivos.
- 6 – Posibilidad de aplicarse en cualquier tipo de laboratorio.



BIOPHILA

1. [Faint text]

2. [Faint text]

3. [Faint text]

4. [Faint text]

5. [Faint text]

6. [Faint text]

7. [Faint text]

8. [Faint text]

9. [Faint text]

10. [Faint text]

11. [Faint text]

12. [Faint text]

13. [Faint text]

14. [Faint text]

15. [Faint text]

16. [Faint text]

17. [Faint text]

18. [Faint text]

19. [Faint text]

20. [Faint text]

Bibliografía

21. [Faint text]

22. [Faint text]

23. [Faint text]

24. [Faint text]

25. [Faint text]

26. [Faint text]

27. [Faint text]

28. [Faint text]

29. [Faint text]

30. [Faint text]

31. [Faint text]

32. [Faint text]

33. [Faint text]

34. [Faint text]

35. [Faint text]

36. [Faint text]

37. [Faint text]

38. [Faint text]

39. [Faint text]

40. [Faint text]

BIBLIOGRAFÍA

- 1  ENCICLOPEDIA VAN NOSTRAND'S.
Ed. Van Nostrand Reinhold Company. Fifth Edition. New York, USA, 1976.
- 2  H. A. HARPER, V.W. RODWELL, MAYES.
"Review Physiological Chemistry". Ed. Lange Medical Publications, 1979.
- 3  S. CAROLI (Editor).
"Element Speciation in Bioinorganic Chemistry". Ed. John Wiley & Sons. New York, USA, 1996.
- 4  Z. D. PÉREZ.
"Determinación espectrofotométrica de sacarina y aspartame y cuantificación de Cu por polarografía diferencial de pulsos". Tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB. Fac. de Química, Universidad de Guanajuato, Marzo de 1997.
- 5  D. J. HALL., G.S. FELL, P.M. DUNBAR.
Clin. Chim. Acta., 1981, **114**, 21.
- 6  M.J.LYNCH, S.S. RAPHAEL, L.D. MELLOR, P.D. SPARE, M.J. INWOOD.
"Métodos de Laboratorio". 2da. Edición. Ed. Interamericana. Vol. I, 1997.
- 7  T.P. COULTATE.
"Food. The chemistry of its components". Ed. RSCH. USA, 1992.
- 8  C. K. TIMBERLAKE.
"Chemistry". 6ta. Edición. Ed. Harper Collins. New York, EUA, 1996.
- 9  R.G. HOPKINS, M.L. FAILLA.
J. Nutr. 1997, **127(2)**, 257.
- 10  FERNANDEZ, M.L. MIRA, M.S. ACEVEDO, C. MANSO.
Free Radic Res Commun. 1998, **4(5)**, 291.
- 11  A. JAYADEEP, P.K. RAVEENDRAN, S. KANNAN, K.R. NALINAKUMMARI, B. MATHEW, M.N. NAIR, V.P. MENON.
J. Exp. Clin Cancer Res., 1997, **16(3)**, 295.
- 12  H. HOPPER, S. G OLDFISHER, I. STERNLIEB, N.C. NAYAC, T.V. MMADHAVAN.
Lancet. 1979, **1(8128)**, 1205.
- 13  FERGUSON
"The earth Chemical Resources, their extracts & environmental impact", 1993.
- 14  W. STUMM, J.J. MORGAN.
Aquatic Chemistry. Ed. Wiley-Interscience, New York, USA, 1970.
- 15  L.E. PANTOJA-VILLAGÓMEZ.
"Desarrollo y validación de un método analítico por espectrometría de absorción atómica con horno de grafito, para algunos elementos traza en aguas naturales del Estado de Guanajuato". Tesis de Licenciatura para obtener el título de QFB. Fac. de Química, Universidad de Guanajuato, Agosto de 1997.
- 16  C.A. CURTIS, E.R. ASHWOOD.
"Tietz textbook of Clinical Chemistry". 3rd Edition.
Chapter 30. "Trace Elements". Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia, USA, 1999.
- 17  P. O'NEILL
"Environmental Chemistry". 2nd. Edition. Ed. Chapman & Hall. Plymouth, UK., 1993

- 18  S. PEKONEN.
Analyst., 1995, **120**, 2655. *
- 19  G. E. BATLEY.
"Trace element speciation. Analytical methods and problems". Ed. CRC PRESS, 1989.
- 20  NOM-127-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación. 18 de Enero de 1996.
- 21  F.N. KEMMER, J. McCALLION.
"Nalco. Manual del Agua. Su naturaleza, tratamiento, aplicaciones". 1ra. Edición. Tomo III. Capítulo 35. Ed. Mc. Graw Hill. México, 1996.
- 22  Y. NAGAOSA, T. MIZUTUKI.
Anal. Chim. Acta. 1995, **311(2)**, 225.
- 23  B.C. LIU, Y. ZHAO-SONG, X.H. LIU, X.Y. JIN, Y. G. WANG.
Fenxi Huaxue. 1994, **22(10)**, 1084.
- 24  A.M. GARCÍA-RODRÍGUEZ, A. GARCÍA-DE-TORRES, J.M. CANO-PAVÓN, C. BOSCH-OJEDA.
Talanta, 1993, **40(12)**, 1861.
- 25  A.L.J. RAO, N. VERMA.
Indian J. Forensic Sci., 1990, 441.
- 26  F. MOLINA, D.G.FERNANDES, J.M. BOSQUE-SENDRA, P. ESPINOSA.
J. Pharm. Biomed. Anal., 1998, **6**, 1019.
- 27  M.C. GUTIÉRREZ, A. GÓMEZ-HENS, M. VARCARCEL.
Talanta, 1986, **33(7)**, 567.
- 28  D. SEHEN, D. GUAN.
Fenxi Huaxue., 1983, **11(11)**, 853.
- 29  Y. NAGAOSA, T. SUENAGA, A.M. BOND.
Anal. Chim. Acta., 1990, **235(2)**, 279.
- 30  E. B. SMIRNOVA, E.D. STRELRSOVA, I.A. NARYCHEVA, I.F. DOLMANOVA
Vestn. Mosk. Univ. Ser.:Khim., 1987, **28(5)**, 462.
- 31  D.G. THEMELIS, G.S. VASILIKIOTIS.
Analyst, 1987, **112(6)**, 797.
- 32  J.FF. STADEN, C.J. HATTING.
Anal. Chim. Acta, 1995, **308**, 214.
- 33  H. AYDIN, O. ORUC.
Fresenius'-J-Anal-Chem., 1997, **358(7-8)**, 859.
- 34  B. FANG, L. WANG, T. WU, J.L.W.
Lihua-Jianyan,-Huaxue-Fence., 1995, **31(5)**, 271.
- 35  S.K. CHA, H.D. ABRUNA.
Anal. Chem., 1990, **62(3)**, 274.
- 36  K.K. SHIU, O.Y. CHAN, S.K. PANG.
Anal. Chem., 1995, **67(17)**, 2828.
- 37  J.E. TAHAN, V.A. GRANADILLO, R.A. ROMERO.
Anal. Chim. Acta., 1994, **295(1-2)**, 187.
- 38  J. ZHAO, S. JIANG, S. CHEN, D. JIANG, D. CHAKRABORTI.
Fresenius'. J. Anal. Chem., 1990, **337(8)**, 877.
- 39  S. LAPOINTE, A. LEBLANC.
At. Spectrosc., 1996, **17(4)**, 163.

- 40 ㊦ S.T. WANG, H.P. DEMSHAR.
Clin. Chem (Winston-Salem, NC). 1993, **39(9)**, 1907.
- 41 ㊦ H. HOHMANN, A. KLOSE.
Labor. Med., 1996, **19(4)**, 155.
- 42 ㊦ L.A. MELTON, M.L. TRACY, G. MOELLER.
Clin. Chem.(Winston-Salem, NC). 1990, **36(2)**, 247.
- 43 ㊦ H.M. MAO.
J. Microchem. 1996, **53(3)**, 303.
- 44 ㊦ A. CYGANSKY, J. KRYSZEK.
B. Chem. Anal (Warsaw). 1992, **37(3)**, 377.
- 45 ㊦ W. C. YANG, G.L. LI.
Lihua, Jianyan, Huaxue. Fence. 1995, **31(3)**, 176.
- 46 ㊦ A.J. BRENNER, E.D. HARRIS.
Anal. Biochem. 1995, **226(1)**, 80.
- 47 ㊦ Y.M. HU, L.E. ZHOU.
Yaowu. Fenxi. Zazhi., 1993, **13(1)**, 41.
- 48 ㊦ F. BUHL, K. KANIA.
Chem. Anal. (Warsaw). 1988, **33(1)**, 111.
- 49 ㊦ F. CERIOTTI, C. A. FERRERO, F. ROTA, G. CERIOTTI.
G. Ital. Chim. Clin. 1988, **13(4)**, 277.
- 50 ㊦ S. YAMASHITA, A. ABE, A. NOMA.
Clin. Chem (Winston-Salem, NC). 1992, **38(7)**, 1373.
- 51 ㊦ H. ADACHI, S. IGARASHI, T. YOTSUYANAGI.
Bunseki. Kagaku., 1995, **44(10)**, 797.
- 52 ㊦ H. WADA, X.J. ZHOU, T. ISHIZUKI, H. YAMADA, G. NAKAGAWA. Anal.
Chim. Acta., 1992, **261(1-2)**, 87.
- 53 ㊦ R.M. LIU, D.J. LIU, A.L. SUN.
Talanta., 1993, **40(4)**, 511.
- 54 ㊦ S.W. KANG, T. SAKAI, N. OHNO, K. IDA.
Anal. Chim. Acta., 1992, **261(1-2)**, 197.
- 55 ㊦ O. HERNÁNDEZ, F. JIMÉNEZ, A.I. JIMÉNEZ, J.J. ÁRIAS.
Analyst (Cambridge, UK), 1996, **121(2)**, 169.
- 56 ㊦ F. BUHL, K. KANIA.
Chem. Anal (Warsaw), 1998, **33(1)**, 111.
- 57 ㊦ Y. NAGAOSA, M. KIMATA, J. MIURA.
Bunseki. Kagaku., 1992, **41(8)**, 371.
- 58 ㊦ J. YE, R.P. BALDWIN, J.W. SCHLAGER.
Electroanalysis (NY). 1989, **1(2)**, 133.
- 59 ㊦ Y. NAGAOSA, K. ISHIDA.
Bunseki. Kagaku., 1992, **41(5)**:T73-T76.
- 60 ㊦ M.A.H. FRENSON (Editor).
APHA-AWWAA-WPCF, Díaz Santos, España, 1992.
- 61 ㊦ D. BLAIR, H. DIEHL.
Talanta, 1961, **7**, 163.
- 62 ㊦ B. ZAK.
Clin. Chim. Acta, 1958, **3**, 328.

- 63  R.R. HAESE, K. WALLMANN, A. DAHMKE, U. KRETZMANN, P.J. MUELLER, H.D. SCHULZ.
Geochim-Cosmochim-Acta. 1997, **61(1)**, 63.
- 64  J.E. KOSTKA, W. LUTHER.
Geochim-Cosmochim-Acta. 1994, **58(17)**, 1701.
- 65  P. HOFFMANN, T. SINNER, A.N. DEDIK, V.K. KARANDASHEV, A.A. MALYSHEV, S. WEBER, H.M. ORTNER.
Fresenius' J. Anal. Chem. 1994, **350(1-2)**, 34.
- 66  U.T. KUMAR, J.G. DORSEY, J.A. CARUSO, E.H. EVANS.
J. Chromatogr. A. 1993, **654**: 261.
- 67  J.M. CAREY, N.P. VELA, J.A. CARUSO.
J. Chromatogr. A. 1994, **662**, 329.
- 68  J.R. PRETTY, E.A. BLUGAUGH, J.A. CARUSO, T.M. DAVIDSON.
Anal. Chem. 1994, **66**, 1540.
- 69  G. WEBER.
Anal. Chim Acta. 1993, **283(1)**, 354.
- 70  G. WEBER, H. BERNDT.
Int. J. Environ. Anal. Chem. 1993, **52(1-4)**, 195.
- 71  G. WEBER.
Fresenius' J. Anal. Chem. 1991, **340(3)**, 161.
- 72  J.J. BERZAS-NEVADO, L.F. GARCÍA BERMEJO, R.C. RODRÍGUEZ-MARTÍN-DOIMEADIOS.
Quim. Anal. (Barcelona). 1998, **17(1)**, 3.
- 73  X.J. LI, P. SCHRAMEL, H.Z. WANG, P. GRILL, A. KETTRUP.
Fresenius' J. Anal. Chem. 1996, **356(1)**, 52.
- 74  M. SPELLMAEKER, B. OUDDANE, J.C. FISHER, M. HOENIG.
Analisis. 1996, **24(3)**, 76.
- 75  I. LÓPEZ-GARCÍA, M. SANCHEZ-MERLOS, M. HERNÁNDEZ-CÓRDOBA.
At. Spectrosc. 1996, **17(3)**, 107.
- 76  P. MASSON, J.M. ESVAN.
Analisis. **23(9)**:437-440. 1995.
- 77  P. VINAS, N. CAMPILLO, I. LÓPEZ-GARCÍA, M. HERNÁNDEZ-CÓRDOBA.
Anal. Chim. Acta. 1993, **283(1)**, 393.
- 78  L. MOENKE-BLANKENBURG, T. SCHUMAN, J. NOEITE.
J. Anal. At. Spectrom. 1994, **9(9)**, 1059.
- 79  J.E. TAHAN, V.A. GRANADILLO, R.A. ROMERO.
Anal. Chim. Acta. 1994, **295(1-2)**, 187.
- 80  Z. ZHUANG, X. WANG, P. YANG, C. YANG, B. HUANG.
J. Anal. At. Spectrom. 1994, **9(7)**, 779.
- 81  L.C. AZEREDO, R.E. STURGEON, A.J. CURTIUS.
Spectrochim. Acta, Part-B. 1993, **48B(1)**, 91.
- 82  J.W. McLAREN, J.W.H. LAM, S.S. BERMAN, K. AKATSUKA, M. APARECIDA-AZEREDO.
J. Anal. At. Spectrom. 1993, **8(2)**, 279.

- 83  G.C. TURK.
Appl. Spectrosc. 1992, **46(8)**, 1223.
- 84  G.P. PANTELEEV, G.I. TSIZIN, A.A. FORMANOVSKII, N.P. STARSHINOVA, E.M. SEDYKH, N.M. KUZ'MIN, YuA. ZOLOTOV.
Zh. Anal. Khim. 1991, **46(2)**, 355.
- 85  V. PORTA, O. ABOLLINO, E. MENTASTI, C. SARZANINI.
J. Anal. At. Spectrom. 1991, **6(2)**, 119.
- 86  U. HASE, K. YOSHIMURA.
Analyst, 1992, **117**, 1501.
- 87  Y. ERE, S.O. PEHKONEN, M.R. HOFFMANN.
J. Geophys. Res., Part A. 1993, **98**, 18423.
- 88  M.L. MOSS, M.G. MELLON.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1942, **14**, 862.
- 89  W.B. FORTUNE, M.G. MELLON.
Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 1938, **10**, 60.
- 90  S.W. KANG, T. SAKAI, N. OHNO, K. IDA.
Anal. Chim. Acta. 1992, **261**, 197.
- 91  G. ZHUANG, Z. YI, R.A. DUCE, P.R. BROWN.
Nature, London. 1992, **355**, 537.
- 92  L.L. STOOKEY.
Anal. Chem. 1970, **42**, 119.
- 93  P. CARTER.
Anal. Biochem. 1971, **40**, 450.
- 94  D.W. KING, J. LIN, D.R. KESTER.
Anal. Chim. Acta. 1991, **247**, 125.
- 95  S. O. PEHKONEN, Y. EREL, M.R. HOFFMANN.
Environ. Sci. Technol. 1992, **26**, 1731.
- 96  M. GARCÍA-VARGAS, M. BELIZON, M.P. HERNÁNDEZ-ARTIGA. C. MARTÍNEZ, J. A. PÉREZ BUSTAMANTE.
Appl. Spectrosc. 1986, **40**, 1058.
- 97  M.E.V. SUÁREZ-IHA, S.O. PEHKONEN, M.R. HOFFMAN.
Environ. Sci. Technol. 1994, **28**, 2080.
- 98  M. S. ABU-BAKR, H. SEDAIRA, E.Y. HASHEM.
Talanta. 1994, **41**, 1669.
- 99  E. B. SANDELL, H. ONISHI.
"Photometric determination of trace of metals". 4th Edition.
Volume III. Part I. John Wiley & Sons, 1991,
- 100  B. BARAJ, J.L. CORTINA, A. SASTRE, M. GRANADOS.
Fresenius' J. Anal. Chem. 1998, **360(2)**, 263.
- 101  M. DELESPINE, D. LABBE, H.T. PHUNG, A. VASSAULT, M. BAILLY.
Clin. Chem. (Winston-Salem, N.C.). 1992, **38(5)**, 782.
- 102  D.P. DERMAN, A. GREEN, T.H. BOTHWELL, B. GRAHAM, L. McNAMARA, A.P. MacPHAIL, R.D. BAYNES.
Ann. Clin. Biochem. 1989, **26(2)**, 144.
- 103  S. YAMASHITA, A. ABE, A. NOMA.
Clin. Chem. (Wiston-Salem, N.C.). 1992, **38(7)**, 1373.

- 104  T. SAITO.
J. AOAC. Int. 1994, **77(4)**, 1031.
- 105  T. SAITO.
Anal. Chim. Acta. 1992, **268(2)**, 351.
- 106  MUDASIR, M. ARAI, N. YOSHIOKA, H. INOUE.
J. Chromatogr.-A. 1998, **799(1-2)**, 171.
- 107  MUDASIR, N. YOSHIOKA, H. INOUE.
Talanta. 1997, **44(7)**, 1195.
- 108  K. HIRAYAMA, N. UNOHARA.
Anal. Chem. 1988, **60**, 2573.
- 109  A. ALEXIEV, S. RUBIO, M. DEYANOVA, A. STOYANOVA, D. SICILIA.
Anal. Chem. Acta. 1994, **295**, 211.
- 110  A. CLADERA, E. GÓMEZ, J.M. ESTELA, V. CERDÁ.
Analyst. 1991, **116**, 913.
- 111  V.A. ELROD, K.S. JOHNSON, K.H. COALE.
Anal. Chem. 1991, **63**, 893.
- 112  H. OBATA, H. KARATANI, E. NAKAYAMA.
Anal. Chem. 1991, **65**, 1524.
- 113  G.F. YAN, G.R. SHI, Y.M. LIU.
Anal. Chim. Acta. 1992, **264**, 121.
- 114  C.M.G. van den BERG, M. NIMMO, O. ABOLLINO, E. MENTASTI.
Electroanalysis (N.Y.). 1991, **3**, 447.
- 115  P.A.M. FARIAS, A.K. OHARA, S.L.C. FERREIRA.
Anal. Lett. 1992, **25**, 1929.
- 116  K. YOKOI, C.M.G. van den BERG.
Electroanalysis (N.Y.). 1992, **4**, 65.
- 117  Y. NAGAOSA, A.M. BOND.
Electroanalysis (N.Y.). 1992, **4**, 581.
- 118  L.Z. WANG, C.S. MA, X.L. ZHANG, J.G. WANG.
Anal. Lett. 1994, **27**, 1165.
- 118  G. ZHIQIANG, L. PEIBIAO, W. GUANGQING, Z. ZAOFAN.
Anal. Chim. Acta. 1990, **241**, 137.
- 120  S. PEHKONEN.
Analyst. 1995, **120**, 2655.
- 121  AOAC INTERNATIONAL.
"Official Methods of Analysis of AOAC International". 16th. Edition. Volume I.
Chapter 11, p. 13-14. Virginia, U.S.A. , 1995.
- 122  F. SMITH, W.H. McCURDY Jr., H. DIEHL.
Analyst, 1952, **77**, 418.
- 123  D.A. SKOOG, D.M. WEST, F.J. HOLLER.
"Química Analítica". 6ta. Edición. Ed. Mc. Graw Hill. México, 1998.
- 124  L.H.J. LAJUNEN.
"Spectrochemical analysis by atomic absorption and emission". 1st Edition.
Oulu, Finland, 1991.
- 125  D.A. SKOOG, J.J. LEARY
"Análisis Instrumental". 4ta. Edición. Ed. Mc Graw Hill, México, 1994.

- 126  H.H. WILLARD, L.L. MERRIT, J.A. DEAN.
"Métodos Instrumentales de Análisis". Ed. Grupo Editorial Iberoamérica.
México, 1991.
- 127  J.B. Ko, W.Sdorra, K. Niemax. Fresenius
J. Anal. Chem. 1989, **335**, 648.
- 128  M. HOENING, H. DOCEKALOVA, H. BAETEN.
J. Anal. At. Spectrom. 1998, **13(3)**: 195.
- 129  J.L.M. de BOER, W. Van-LEEUEWN, U. KOHLMAYER, P.M. BREUGEM.
Fresenius' J. Anal. Chem. 1998, **360(2)**, 213.
- 130  D. WUESTKAMP, R. KUCHARKOWSKI, J.A.C. BROEKAERT.
Fresenius' J. Anal. Chem. 1996, **355(3-4)**, 281.
- 131  D. WUESTKAMP, R. KUCHARKOWSKI, J.A.C. BROEKAERT.
Fresenius' J. Anal. Chem. 1996, **354(7-8)**, 879.
- 132  I. SEGAL, A. KLONER, I.B. BRENNER.
J. Anal. At. Spectrom. 1994, 9737-9742.
- 133  T.R. HARVILLE, R.K. MARCUS.
Anal. Chem. 1993, **65(24)**, 3636.
- 134  A. CIOCAN, L. HIDDEMANN, J. UEBBING, K. NIEMAX.
J. Anal. At. Spectrom. 1993, **8(2)**, 273.
- 135  L.M. GARDEN, J. MARSHALL, D. LITTLEJOHN.
J. Anal. At. Spectrom. 1991, **6(2)**, 159.
- 136  L.A. MELTON, M.L. TRACY, G. MOELLER.
Clin. Chem. (Wiston-Salem, N.C.), 1990, **36(2)**, 247.
- 137  J. JAMBOR, V. OTRUBA, L. SOMMER.
Chem. Listy. 1988, **82(5)**, 544.
- 138  S. WANG, L. BAI, J. WANG, G. ZHOU, X. LIN, Y. WANG.
Fenxi. Huaxue. 1985, **13(2)**, 136.
- 139  X.S. LIU, W. ZHANG, J.Y. CHEN.
Fenxi. Shiyanshi. 1997, **16(2)**, 74.
- 140  J. SZPUNAR, J. BETTMER, M. ROBERT, H. CHASSAIGNE, K. CAMMAN,
R. LOBINSKI, O.F.X. DONARD.
Talanta. 1997, **44(8)**, 1389.
- 141  C.L. GATLIN, F. TURECEK, T. VAISAR.
Anal. Chem. 1994, **66(22)**, 3950.
- 142  L. MOENS, P. VERREPT, R. DAMS, U. GREB, G. JUNG, B. LASER.
J. Anal. At. Spectrom. 1994, **9(9)**, 1075.
- 143  H. VANHOE, C. VANDECASTEELE, J. VERSIECK, R. DAMS. Mikrochim.
Acta. 1989, **III(3-6)**, 373.
- 144  H. VANHOE, C. VANDECASTEELE, J. VERSIECK, R. DAMS.
Anal. Chem. 1989, **61(17)**, 1851.
- 145  F.E. LICHTÉ.
Anal. Chem. 1995, **67(14)**, 2479.
- 146  K. ULENS, L. MOENS, R. DAMS, S. Van WINCKLE, L. VANDEVELDE.
J. Anal. At. Spectrom. 1994, **9(11)**, 1243.
- 147  L. STUHNE-SEKALEC, S.X. XU, J.G. PARKES, N.F. OLIVIERI, D.M.
TEMPLETON.
Anal. Biochem. 1992, **205(2)**, 278.

- 148  AA.R. GHARAIBEH, J. EAGLES, R. SELF.
Biomed. Mass Spectrom. 1985, **12(7)**, 344.
- 149  J. K. M. SANDERS
"Modern NMR spectroscopy. A guide for chemist". 2nd. Edition. Oxford, USA,
1997.
- 150  C. I. POOLE, S.K. POOLE.
"Chromatography today". Ed. Elsevier. 1991.
- 151  E.J. KIKTA, A.E. STANGE.
J. Chromatogr. 1977, **138**, 41.
- 152  A. STURARO, G. PARVOLI, L. DORETTI, S. ZANCHETTA, G. ALLEGRI,
G.A. BATTISTON.
Anal. Chim. Acta. 1993, **274(1)**, 163.
- 153  J.H. SHOFSTAHL, J.K. HARDY.
J. Chromatogr. Sci. 1990, **28(5)**, 225.
- 154  P. LUKKARI, J. HANNUKSELA, M.L. MATTINEN, M. VIROLAINEN,
V.M.A. HAKKINEN, M.L. RIEKKOLA.
J. High Resolut. Chromatogr. 1990, **13(3)**, 170.
- 155  S.K. AGGARWAL, M. KINTER, M.R. WILLS, J. SAVORY, D.A. HEROLD.
Anal. Chim. Acta. 1989, **224(1)**, 83.
- 156  M. TERMONIA, J. WALRAVENS, J. VANDEGANS, C. NEVE.
J. High Resolut. Chromatogr. Commun. 1986, **9(6)**, 357.
- 157  M. L. RIEKKOLA, S. JUNTTO.
Mikrochim. Acta. 1985, **III(3-4)**, 265.
- 158  M. KOHRI, O. KUJIRAI, K. YAMADA, H. OKOCHI.
Anal. Sci. 1988, **4(3)**, 293.
- 159  E.M. KRUPP, R. GRUEMPING, U.R.R. FURCHTBAR, A.V. HIRNER. .
Fresenius' J. Anal. Chem. 1996, **354(5-6)**, 546.
- 160  L. ROTTMANN, K.G. HEUMANN.
Fresenius' J. Anal. Chem. 1994, **350(4-5)**, 221.
- 161  D.H. PATTERSON, B.J. HARMON, F.E. REGNIER.
J. Chromatogr. A. 1994, **662(2)**, 389.
- 162  Freimann,-P; Schmidt,-D.
Spectrochim. Acta. Part B. 1989, **44B(5B)**, 505.
- 163  C. JAGNER, L. RENMAN, Y. WANG.
Electroanalysis (N.Y.). 1994, **6(4)**, 285.
- 164  C. JAGNER, L. RENMAN, Y.D. WANG.
Electroanalysis (NY). 1993, **5(4)**, 283.
- 165  K.W. PRATT, W.F. KOCH.
Anal. Chim. Acta. 1988, **215**, 21.
- 166  H.L. ZHENG, M.J. WU.
Fenxi. Shiyanshi. 1994, **13(1)**, 74.
- 167  C.T. YAP.
Appl. Spectrosc. 1988, **42(7)**, 1250.
- 168  V.J. KENNEDY, A. AUGUSTHY, K.M. VARIER, P. MAGUDAPATHY, S.
PANCHAPAKESAN, C. RAMESH, K.G.M. NAIR, V. VIJAYAN.
Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res. Sect. B. 1998, **B134(2)**, 224.

- 169  M.A. BARREIROS, M.L. CARVALHO, M.M. COSTA, M.I. MARQUES, M.T. RAMOS.
X. Ray Spectrom. 1997, **26(4)**, 165.
- 170  H.J. ANNEGAM, A.E. PILLAY, J.C.A. DAVIES, D. FAURE, J.P.F. SELLSCHOP.
Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res, Sect. B. 1988, **B35(3-4)**, 415.
- 171  R. CECCHI, G. GHERMANDI, G. CALVELLI, P. MITNER.
Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res, Sect. B. 1986, **B15(1-6)**, 605.
- 172  A.R. BYRNE, L. BENEDIK.
Anal. Chem. 1997, **69(6)**, 996.
- 173  K. SUEKI, K. KOBAYASHI, W. SATO, H. NAKAHARA, T. TOMIZAWA.
Anal. Chem. 1996, **68(13)**, 2203.
- 174  Z.B. ALFASSI, B. RIETZ.
Analyst (London). 1994, **119(11)**, 2407.
- 175  C. YONEZAWA, H. IMAI, T. HONGO, M. HOSHI, E. TACHIKAWA, M. KABUTO, T. SUZUKI.
Bunseki. Nagaku. 1992, **41(11)**, 581.
- 176  M. SIMONOFF, Y. LLABADOR, A. MacKINZIE-PEERS, G.N. SIMONOFF.
Clin. Chem. (Winston-Salem N.C.). 1984, **30(10)**, 1700.
- 177  K. WRÓBEL, K. WRÓBEL, P.L. LOPEZ-DE-ALBA, L. LÓPEZ-MARTÍNEZ, M.A. GARCÍA-LÓPEZ.
Talanta, 1996, **43**, 1055.
- 178  K. WRÓBEL, K. WRÓBEL, P.L. LOPEZ-DE-ALBA, L. LÓPEZ-MARTÍNEZ.
Talanta. 1997, **44**, , 2129.
- 179  J. Pharm. Biol. An. (en revisión)
- 180  E.M. COLUNGA URBINA.
"Empleo del estándar interno en la determinación de arsénico a nivel de trazas por espectrofotometría UV/VIS". Tesis para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Químicas con especialidad en Química Analítica. Monterrey, México, Marzo de 1999.
- 181  ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY (UK).
Analyst. 1987, **112**, 199.
- 182  S.A. WILSON, J.H. WEBER.
Chem. Geol. 1979, **26**, 345.
- 183  K. WRÓBEL, K. WRÓBEL, G. CRUZ-JIMÉNEZ, F. ANGULO-ROMERO.
Anal. Chim. Acta.1999,**387**,217.
- 184  A. RINGBOM.
"Formación de complejos en química analítica". Ed. Alhambra. Madrid, España, 1979.
- 185  JANOS INCZÉDY.
"Equilibrios de formación de complejos en química analítica". Ed. PWN. Varsovia, 1979.
- 186  T. SAITO.
Bunseki Kagaku, 1991,**40**, 227.
- 187  L.B. BJORKLUND, G.M. MORRISON.
Anal. Chim. Acta., 1997, **343**, 259.