



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y
AGRIMENSURA

***“Especiación de algunos elementos
contaminantes, Cd y Pb, en aguas del
río Paraná”***

TRABAJO DE TESIS PRESENTADO POR:

Bioq. Roberto Gerardo Pellerano

Para optar al grado de DOCTOR EN QUIMICA

Asesor Científico: Prof. Dr. **EDUARDO JORGE MARCHEVSKY**
Co-Asesor: Prof. Dr. **FRANCISCO ANTONIO VAZQUEZ**

2006

PREFACIO

Esta tesis forma parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Química de la Universidad Nacional del Nordeste y no ha sido presentada para la obtención de otro título en esta Universidad u otras. Contiene resultados obtenidos en las investigaciones realizadas en la FACENA Cátedra de Química Analítica, Laboratorio Prof. Don Baldemar Turn y en el Área de Química Analítica "Dr. Carlos B. Marone" de la Facultad de Química Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis, bajo la dirección de los Doctores Eduardo Jorge Marchevsky y Francisco Antonio Vazquez.

Bioq. Roberto Gerardo Pellerano

RECONOCIMIENTOS

Deseo expresar mi más profunda gratitud a los Doctores Eduardo Jorge Marchevsky y Dr. Francisco Antonio Vazquez, quienes dirigieron esta tesis y sin los cuales no hubiera sido posible su realización, habiéndome brindado sus inestimables conocimientos, experiencia, confianza y constante estímulo siempre en un marco de amistad y afecto fundamentales para la concreción de este trabajo. Quiero agradecerles también por su bonhomía y por enseñarme a lo largo de todos estos años que la perseverancia y el esfuerzo son el único camino para lograr objetivos.

A los investigadores y profesores del departamento de química de la UNSL, por brindarme todo su apoyo, buena predisposición y calidez, permitiendo que se generaran así profundos lazos de amistad. No puedo dejar de mencionar también a los investigadores de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Jaén, quienes abrieron todas sus puertas para permitirme aprender.

También debo agradecer a mis amigos y compañeros de trabajo, por su presencia constante, palabras de aliento, ilimitada colaboración y alegrías brindadas, haciendo una mención muy especial al Dr. Hugo A. Acevedo y al Lic. César H. Romero, que transformaron largas jornadas de trabajo en momentos imborrables y amenos.

Agradezco a la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la UNNE, por las becas otorgadas que auspiciaron económicamente este trabajo y a la Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura de la UNNE que me permitió realizar la carrera del doctorado.

Finalmente doy gracias y les dedico este trabajo a mis padres, a mi hermana y a mi querida abuela, por su infinita paciencia y cariño incondicional.

PROLOGO

En los últimos años se han reportado informaciones sobre los problemas ambientales derivados de los elementos cadmio y plomo. La información se ha focalizado principalmente en que la distribución, movilidad y disponibilidad biológica de los elementos químicos no depende solamente de su concentración total, sino que depende de sus asociaciones físicas y químicas con el medio en el que se encuentra. Luego un pequeño cambio en las condiciones ambientales, de origen natural o antropogénico, provoca fuertes variaciones en la distribución de un determinado elemento variando así su biodisponibilidad.

Las técnicas de separación empleando filtración a través de membrana, para clasificar las especies químicas entre las fracciones solubles e insolubles, y luego a continuación la extracción en fase sólida con resina tipo Silica C-18 capaz de retener la fracción soluble que se encuentra formando complejos de naturaleza variable con sustancias de naturaleza hidrófoba, fueron introducidas para definir el fraccionamiento operacional de los metales en aguas naturales.

El fraccionamiento químico de Cd(II) y Pb(II) es de interés práctico porque permite obtener información sobre las distintas formas de unión en las cuales los metales pesados aparecen asociados a las fracciones químicas componentes de matrices naturales, dado que tal información es relevante para estudios llevados a cabo para investigar la distribución, movilidad y disponibilidad biológica de los metales a nivel de vestigios en la biosfera. La justificación que sostiene el método reside en el grado de selectividad que algunos métodos separativos pueden exhibir respecto de fases y formas de enlace específicas de los elementos. Por otro lado, los métodos de extracción en fase sólida pueden presentar cierta falta de especificidad para retener exclusivamente la fracción deseada y los resultados pueden discrepar de acuerdo a las condiciones experimentales seleccionadas. Al ser necesario alcanzar altas selectividades y sensibilidades en el análisis de las fracciones que usualmente contienen relativamente elevadas concentraciones de los componentes de la matriz, los protocolos de fraccionamiento se benefician con las técnicas de determinación por espectrometría atómica. Sin embargo éstas técnicas presentan como principal desventaja el elevado costo, desde el punto de vista no solo de la operación sino también de la instalación de

los instrumentos necesarios, convirtiendo a los estudios de especiación en análisis reservados para laboratorios de mediana o elevada complejidad. Esto justifica la necesidad de desarrollar métodos aptos y de bajo costo para la determinación de éstos elementos a nivel de vestigios, que asocien a un elevado grado de sensibilidad, un grado de selectividad suficiente, tal que permita obviar el efecto interferente de los concomitantes más comunes en las muestras de interés. Este trabajo se propone el objetivo de realizar fraccionamiento químico de Cd(II) y Pb(II) en aguas del Río Paraná en inmediaciones de la ciudad de Corrientes, con determinación de éstos metales por espectrofotometría en fase sólida (SPS) a nivel de vestigios.

La metodología desarrollada ha demostrado ser adecuada y confiable para la determinación de la concentración de estos metales en las diferentes fracciones, presentando como principales ventajas la sencillez y el bajo costo de aplicación, simultáneamente se utilizó como método de contraste el ICP-OES. Se empleó la comparación de las concentraciones metálicas totales con la suma de las concentraciones asociadas a las fracciones individuales para evaluar las posibles contaminaciones o pérdidas de analitos. Los balances de masa mostraron buenas concordancias. Por último resulta importante destacar que no se encontraron antecedentes bibliográficos hasta el presente que se refieran al fraccionamiento químico con aplicación de la espectrofotometría en fase sólida y tampoco se encuentran antecedentes de estudios de fraccionamiento químico de Cd(II) y Pb(II) en aguas de este río en zonas cercanas a la toma de muestra.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES Y
AGRIMENSURA

***“Especiación de algunos elementos
contaminantes, Cd y Pb, en aguas del
río Paraná”***

RESUMEN

TRABAJO DE TESIS PRESENTADO POR:

Bioq. Roberto Gerardo Pellerano

Para optar al grado de DOCTOR EN QUIMICA

Asesor Científico: Prof. Dr. **EDUARDO JORGE MARCHEVSKY**
Co-Asesor: Prof. Dr. **FRANCISCO ANTONIO VAZQUEZ**

2006

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La química mediante los grandes avances de las técnicas analíticas, ha introducido el término *especiación química* para referirse a la clasificación y cuantificación de las diferentes formas en las que se puede encontrar un mismo elemento en un sistema químico determinado. No existe una sola definición para la especiación química.

DEFINICIÓN DE ESPECIACIÓN QUÍMICA.

En una revisión realizada por el IUPAC, se define al término especiación química como “el proceso por el cual se pone en evidencia la forma atómica o molecular de un analito”. La validez de esta definición puede acomodarse a componentes que se encuentran en forma de complejo orgánico. En el último caso, se toma a la determinación de complejos con sus combinaciones moleculares específicas con un elemento y los diferentes estados de oxidación de un átomo.

ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA

La Espectrofotometría en Fase Sólida (SPS – Solid Phase Spectrophotometry) es una técnica basada en la preconcentración de un analito, formando un compuesto cromogénico o no, sobre un sustrato sólido (resina de intercambio o adsorción) y medición de la absorbancia del compuesto coloreado directamente sobre la fase sólida. Este proceso permite obtener mayor sensibilidad y precisión que los métodos de absorción molecular en solución.

ESPECIACIÓN DE METALES PESADOS EN AGUAS DE RÍO

- Constituyentes de las aguas naturales

La naturaleza de los compuestos orgánicos e inorgánicos que pueden estar presentes en una muestra de agua, resulta de un complicado proceso de producción y degradación de biomasa terrestre y acuática, erosión de rocas y lixiviados de los terrenos, adsorción sobre partículas suspendidas, actividad química, biológica y entrada por aerosoles. La composición de estos sistemas químicos es muy sensible y se encuentra formada por:

Constituyentes inorgánicos. La concentración de macroconstituyentes inorgánicos es muy diferente en varios tipos de aguas según si son de río, de lagos o agua de lluvia. El agua de mar es la única que puede considerarse con una composición prácticamente constante en todo el mundo, salvo el caso de mares cerrados, en los que la salinidad, generalmente, se ve aumentada.

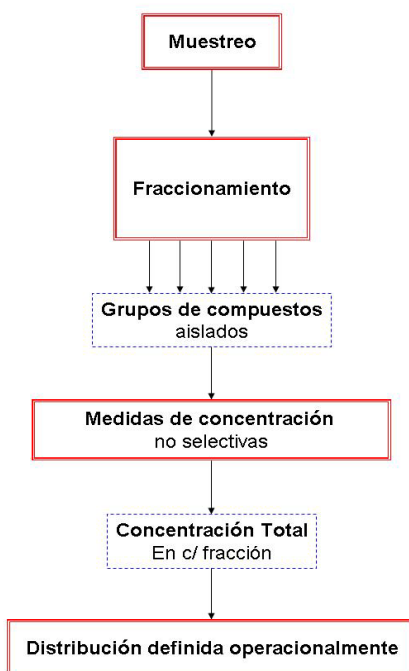
Constituyentes orgánicos. La materia orgánica en aguas naturales se debe a la presencia de organismos vivos, en particular los exudados de algas (numerosos polipéptidos y polisacáridos) y también debido a la polución. Gran parte de esa materia orgánica está constituida por sustancias húmicas en las aguas naturales

TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA LA ESPECIACIÓN QUÍMICA

En este trabajo se utilizó la espectrofotometría en fase sólida (SPS) para determinar la concentración del analito en agua de río, por lo que para realizar la especiación se requiere la incorporación de etapas previas para clasificar la muestra en diferentes fracciones.

- Esquemas de especiación (Fraccionamiento)

Se denomina esquema de fraccionamiento de especies químicas a la combinación de diferentes métodos de separación de especies con métodos muy sensibles de determinación. Como resultado se obtienen diferentes fracciones (familias químicas) clasificadas operacionalmente para un mismo analito. Un esquema general de aplicación de este procedimiento puede verse en la figura siguiente.



DISEÑO EXPERIMENTAL

- Metodología de superficies de respuesta

La metodología de las superficies de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés

es influenciada por otras. El objetivo es optimizar la variable de interés. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema.

LOS REACTIVOS COMPLEJANTES PAN y 5-Br-PADAP

PAN es la abreviatura de 1-(2-piridilazo)-2-naftol. Es una sustancia roja, insoluble en agua pero fácilmente soluble en alcohol y otros solventes orgánicos. El PAN forma complejos (usualmente rojos) con muchos metales polivalentes, pero no forma complejos coloreados con los metales alcalinotérreos o con el aluminio. El reactivo 5-Br-PADAP se presenta bajo la forma de cristales de coloración rojo púrpura. La solubilidad del reactivo en agua es muy escasa y sus soluciones manifiestan carácter ácido muy débil. Es soluble en metanol, dioxano, acetona, cloroformo, menos soluble en etanol y alcohol isoamílico.

CONDICIONES SELECCIONADAS PARA LA MEDICIÓN DE Cd(II).

Condiciones óptimas para la determinación de Cd(II) por SPS.

<i>A(nm) máximo</i>	550
<i>Volumen de muestra (mL)</i>	50
<i>Reactivo</i>	PAN
<i>Soporte sólido</i>	Dowex 1X8
<i>Masa de resina (g)</i>	0,070
<i>pH de trabajo</i>	9 – 11
<i>Buffer seleccionado</i>	NH_4^+/NH_3
<i>Tiempo de agitación (minutos)</i>	20

PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE Cd(II)

Parámetros Analíticos para la determinación de Cd(II)

	Volumen de muestra
	50 mL
Pendiente ($\mu\text{g}^{-1} \text{L}$)	0,01444
Intersección	0,00864
Rango Lineal	5 – 100
Coefficiente de correlación (r)	0,9995
% R. S. D. (n = 10)	0,9
Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,22
Límite de cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,72

CONDICIONES SELECCIONADAS PARA LA MEDICIÓN DE Pb(II)

A continuación se describen las condiciones óptimas para la determinación de Pb(II)

<i>A(nm) máximo</i>	550
<i>Volumen de muestra (mL)</i>	50
<i>Soporte sólido</i>	Dowex 1X8
<i>Masa de resina (g)</i>	0,070
<i>pH de trabajo</i>	9 – 11
<i>Buffer seleccionado</i>	NH_4^+/NH_3
<i>Tiempo de agitación (minutos)</i>	20

PARÁMETROS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE Pb(II)

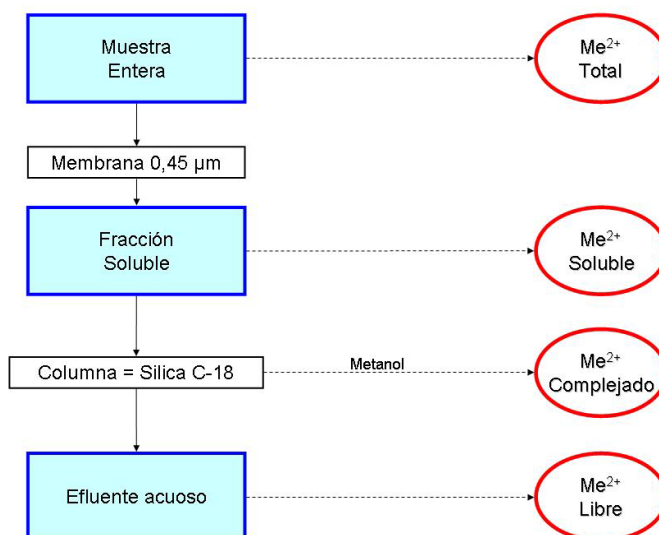
Parámetros analíticos para la determinación de Pb(II)

Parámetro	
Pendiente ($\mu\text{g}^{-1} \text{L}$)	0,012
Intersección	-0,104
Rango Lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5 – 100
Coefficiente de correlación	0,998
% R. S. D. (n = 10)	1,7
Límite de Detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,8
Límite de Cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,7

APLICACIONES

- Fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II) en muestras de aguas superficiales

Esquema propuesto para el fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II). Para el fraccionamiento de las muestras de agua del Río Paraná se realizaron las siguientes operaciones en forma sucesiva: Extracción de la muestra de agua de río con muestreador de teflón. Conservación de la muestra por congelamiento a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Filtración de la muestra a través de membrana de celulosa de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ de diámetro de poro. Se pasa el filtrado por columna conteniendo resina Sílica C-18. Elusión de la fracción retenida con metanol. Todas las fracciones obtenidas fueron digeridas con mezcla $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$, excepto la correspondiente a la concentración de metal libre. Determinación de los analitos en cada una de las fracciones obtenidas. Cálculos para la presentación de resultados.



Esquema aplicado para el fraccionamiento de las muestras de agua

EXPERIMENTAL

FRACCIONAMIENTO QUÍMICO DE Cd(II) EN AGUAS SUPERFICIALES DEL RÍO PARANÁ

- Determinación del contenido total de Cd(II)

Tabla. Concentración de Cd(II) total medidas en muestras provenientes del Río Paraná (intervalo de confianza 95%, n = 6)

Procedencia	Fecha [mm-aaaa]	Concentración Total [$\mu\text{g L}^{-1}$]	
		SPS	ICP-OES
Río Paraná	Mar-2005	$2,7 \pm 0,2$	$2,55 \pm 0,13$
	May-2005	$1,3 \pm 0,2$	$1,40 \pm 0,15$
	Ago-2005	$< 0,7$	$0,55 \pm 0,10$
	Oct-2005	$< 0,7$	$0,45 \pm 0,13$
	Dic-2005	$3,6 \pm 0,2$	$3,88 \pm 0,12$
	Feb-2006	$3,3 \pm 0,2$	$3,42 \pm 0,03$

Con el objeto de validar los resultados obtenidos, se realizó en paralelo la determinación de la concentración del Cd(II) aplicando una técnica estandarizada (ICP-OES).

Tabla. Concentración total de Cd(II) medidas en muestras provenientes del Río Paraná – 300 mL de muestra con el método propuesto (intervalo de confianza 95%, n = 6)

Procedencia	Fecha [mm-aaaa]	SPS [$\mu\text{g L}^{-1}$]	ICP-OES [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Recuperación [%]
Río Paraná	Mar-2005	$2,6 \pm 0,2$	$2,55 \pm 0,13$	101,9
	May-2005	$1,4 \pm 0,2$	$1,45 \pm 0,15$	96,5
	Ago-2005	$0,5 \pm 0,2$	$0,55 \pm 0,10$	90,9
	Oct-2005	$0,4 \pm 0,2$	$0,45 \pm 0,13$	88,8
	Dic-2005	$3,9 \pm 0,2$	$3,90 \pm 0,12$	100,0
	Feb-2006	$3,4 \pm 0,2$	$3,45 \pm 0,03$	98,5

Tabla. Concentración de Cd(II) fracciones total, soluble y particulada.

Fecha [mm-aaaa]	Fracciones de Cd(II) [$\mu\text{g L}^{-1}$]		
	Total	Soluble	Particulada
Mar-2005	$2,6 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,4$
May-2005	$1,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$
Ago-2005	$0,5 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,2$
Oct-2005	$0,4 \pm 0,2$	$< 0,1$	$0,4 \pm 0,2$
Dic-2005	$3,9 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$
Feb-2006	$3,4 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,3$

- Determinación de la fracción complejada y libre

Tabla. Separación de la fracción soluble de Cd(II) en dos sub-grupos: Fracción complejada y fracción libre

Muestra	Fecha [mes-año]	Cd(II) soluble [$\mu\text{g L}^{-1}$]	
		Cd(II) complejado	Cd(II) libre
Río Paraná	Mar-2005	$0,8 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
	May-2005	$0,2 \pm 0,1$	$< 0,1$
	Ago-2005	$0,2 \pm 0,1$	$< 0,1$
	Oct-2005	$< 0,1$	$< 0,1$
	Dic-2005	$1,1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
	Feb-2006	$0,9 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$

- Patrón de distribución del Cd(II) en aguas del Río Paraná

La figura a) muestra los diferentes valores de concentración total de Cd(II) expresada en $\mu\text{g L}^{-1}$ en aguas del Río Paraná como gráfico de barras obtenidas durante el año 2005 - 2006. En la figura b) se exhibe el patrón de distribución del Cd(II) como gráfico de barras indicando el porcentaje de Cd(II) asociado a cada fracción definida por el esquema de fraccionamiento.

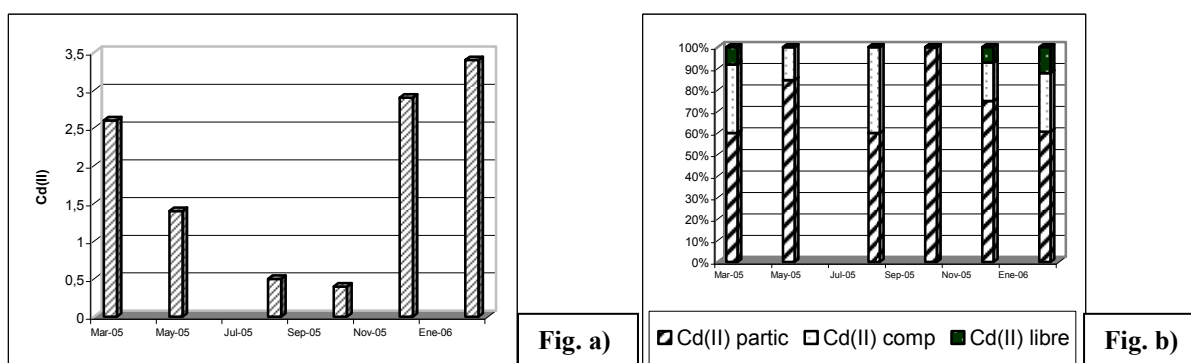


Figura a). Gráfico de concentraciones totales de Cd(II) [$\mu\text{g L}^{-1}$]

Figura b). Gráfico de distribución de Cd(II) entre las diferentes fracciones obtenidas.

- Validación del método aplicado para Cd(II)

Tabla. Validación del método para determinación de Cd(II) aguas naturales

Alicuota	Valor Base [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Cd(II) adicionado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Cd(II) encontrado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	% recuperación*
1	--	0,00	$3,4 \pm 0,1$	--
2	3,4	1,00	4,3	97,0
3	3,4	2,00	5,3	98,0
4	3,4	4,00	7,2	97,0
5	3,4	8,00	11,4	100,0

* $100 \times [(\text{Cd(II) encontrado} - \text{Cd(II) base}) / \text{Cd(II)adicionado}]$

Tabla. Comparación entre las concentraciones de Cd(II) totales determinadas con ICP-OES y la sumatoria de las concentraciones obtenidas en cada fracción por SPS.

Muestra	Cd(II)	
Mar-2005	Conc. Total	$2,60 \pm 0,2$
	\sum fracciones	$2,5 \pm 0,6$
	% recuperación	96,2
May-2005	Conc. Total	$1,45 \pm 0,2$
	\sum fracciones	$1,3 \pm 0,3$
	% recuperación	89,6
Ago-2005	Conc. Total	$0,55 \pm 0,2$
	\sum fracciones	$0,5 \pm 0,3$
	% recuperación	90,9
Oct-2005	Conc. Total	$0,45 \pm 0,2$
	\sum fracciones	$0,4 \pm 0,2$
	% recuperación	88,8

Dic-2005	Conc. Total	3,90 ± 0,2
	\sum fracciones	3,6 ± 0,4
	% recuperación	92,3
Feb-2006	Conc. Total	3,45 ± 0,2
	\sum fracciones	3,3 ± 0,5
	% recuperación	97,0

FRACCIONAMIENTO QUÍMICO DE Pb(II) EN AGUAS SUPERFICIALES DEL RÍO PARANÁ

- Determinación del contenido total de Pb(II)

Tabla. Concentración de Pb(II) total medidas en aguas del Río Paraná – (intervalo de confianza 95%, n = 6)

Muestra	Fecha [mm-aaaa]	Concentración Total [$\mu\text{g L}^{-1}$]		Recuperación [%]
		SPS	ICP-OES	
Río Paraná	Mar-2005	42,0 ± 0,1	41,95 ± 0,30	100,1
	May-2005	51,5 ± 0,2	51,88 ± 0,42	99,2
	Ago-2005	10,2 ± 0,1	10,20 ± 0,12	100,0
	Oct-2005	8,2 ± 0,1	8,22 ± 0,14	99,7
	Dic-2005	48,0 ± 0,3	48,32 ± 0,35	99,3
	Feb-2006	55,8 ± 0,5	56,00 ± 0,42	99,6

- Determinación de Pb(II) en la fracción soluble y particulada.

Tabla. Concentración de Pb(II) correspondiente a las fracciones total, soluble y particulada.

Fecha [mmm-aaaa]	Fracciones [$\mu\text{g L}^{-1}$]		
	Total	Soluble	Particulada
Mar-2005	42,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	36,0 ± 0,2
May-2005	51,5 ± 0,2	10,2 ± 0,1	41,3 ± 0,3
Ago-2005	10,2 ± 0,2	< 2,7	10,2 ± 0,2
Oct-2005	8,2 ± 0,1	< 2,7	8,2 ± 0,1
Dic-2005	48,0 ± 0,3	16,4 ± 0,1	31,6 ± 0,4
Feb-2006	55,8 ± 0,5	11,2 ± 0,2	44,6 ± 0,7

- Determinación de Pb(II) en la fracción complejada y libre

Tabla. Separación de la fracción soluble de Pb(II) en dos sub-grupos: Fracción complejada y fracción libre

Muestra	Fecha [mmm-aaaa]	Pb(II) soluble [$\mu\text{g L}^{-1}$]	
		Pb(II) complejado	Pb(II) libre
Río Paraná	Mar-2005	5,4 ± 0,1	< 2,7
	May-2005	11,3 ± 0,1	< 2,7
	Ago-2005	< 2,7	< 2,7
	Oct-2005	< 2,7	< 2,7
	Dic-2005	13,0 ± 0,2	4,6 ± 0,1
	Feb-2006	10,2 ± 0,1	3,7 ± 0,2

- Patrón de distribución del Pb(II)

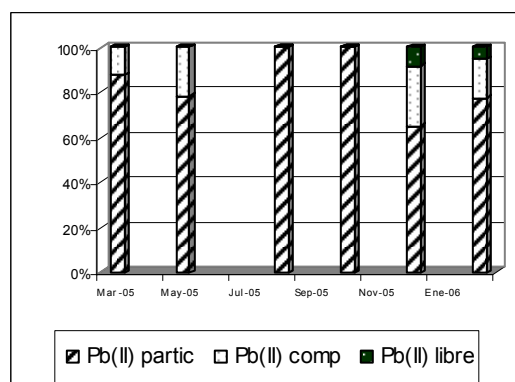
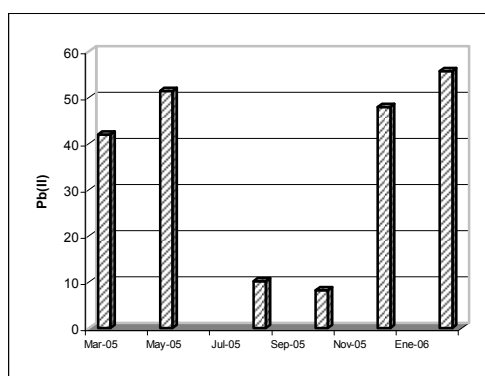


Gráfico de concentraciones totales de Pb(II) [$\mu\text{g L}^{-1}$]

Gráfico de distribución de Pb(II) entre las diferentes fracciones obtenidas.

- Validación del método aplicado para Pb(II)

Se tomaron 500 mL de muestra y se la dividió en 10 porciones iguales de 50 mL cada una. El método propuesto se aplicó a 6 alícuotas y la concentración de Pb(II) obtenida como promedio, se tomó como valor base. Luego cantidades crecientes de Pb(II) fueron adicionadas a las otras alícuotas de la muestra y sus concentraciones determinadas por el mismo método.

Tabla. Validación del método para determinación de Pb(II) aguas naturales

Alicuotas	Valor Base [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Pb(II) adicionado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Pb(II) encontrado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	% recuperación*
1	--	0,0	$10,2 \pm 0,3$	--
2	10,2	3,0	13,1	99,2
3	10,2	6,0	16,1	99,4
4	10,2	10,0	20,2	100,0
5	10,2	20,0	30,3	100,3

Tabla. Comparación entre las concentraciones de Pb(II) totales determinadas con ICP-OES y la sumatoria de las concentraciones obtenidas en cada fracción por SPS.

Muestra	Pb(II)	
Mar-2005	Conc. Total	$41,95 \pm 0,30$
	\sum fracciones	$41,4 \pm 0,3$
	% recuperación	98,6
May-2005	Conc. Total	$51,88 \pm 0,42$
	\sum fracciones	$52,6 \pm 0,4$
	% recuperación	101,4
Ago-2005	Conc. Total	$10,20 \pm 0,12$
	\sum fracciones	$10,2 \pm 0,2$
	% recuperación	100,0
Oct-2005	Conc. Total	$8,22 \pm 0,14$
	\sum fracciones	$8,2 \pm 0,1$
	% recuperación	99,7
Dic-2005	Conc. Total	$48,32 \pm 0,35$
	\sum fracciones	$49,2 \pm 0,7$
	% recuperación	101,8

Feb-2006	Conc. Total	56,00 ± 0,42
	\sum fracciones	58,5 ± 1,0
	% recuperación	104,5

Finalmente se realizó la comparación entre las concentraciones totales obtenidas por procedimientos independientes y la suma de las concentraciones individuales de las fracciones. En este caso se comparó la suma de concentraciones medidas en cada fracción con respecto a la concentración total medida por el método de referencia. Los valores de las concentraciones obtenidas e informadas para Pb(II), se incluyen en la tabla anterior.

PROPÓSITOS

Desarrollar métodos espectrométricos aptos para la determinación de Cd y Pb que asocien sensibilidad y selectividad suficiente, tal que permita obviar el efecto interferente de los concomitantes más comunes en las muestras de interés y el bajo costo. Realizar fraccionamiento químico de Cd(II) y Pb(II) en aguas del Río Paraná, con determinación de éstos metales por espectrofotometría en fase sólida (SPS) a nivel de vestigios. Es importante destacar también que no se encontraron antecedentes bibliográficos similares a este trabajo hasta el presente.

CONCLUSIONES

Determinación de Cd(II) por SPS. El reactivo seleccionado para la determinación de Cd(II) por SPS fue el PAN. Los mejores resultados se alcanzaron cuando se utilizó un tensoactivo no iónico, Tritón X-100, en una concentración del orden de 0,05% v/v.; pH entre 8,5 y 10,5; cantidad de resina Dowex 1X8, 0,0700 g; tiempo de agitación de 20 minutos

La gráfica de calibración fue lineal, con un coeficiente de correlación de 0,9995, la linealidad se mantuvo desde valores cercanos al límite de detección y hasta al menos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ el valor del límite de detección obtenido para 50 mL de muestra de una solución de Cd(II) fue de 0,22 $\mu\text{g L}^{-1}$. La selectividad del método alcanzada para el Cd(II) es adecuada para su aplicación en aguas provenientes del Río Paraná.

Determinación de Pb(II) por SPS. El reactivo seleccionado para la determinación de Pb(II) por SPS fue el 5-Br-PADAP. Por ser el 5-Br-PADAP y su complejo con el Pb(II), escasamente solubles en agua, se incorporó un agente tensoactivo no iónico, Tritón X-100, en una concentración del orden de 0,05% v/v; pH entre 8,5 y 10,5; la cantidad de resina Dowex 1X8 es, 0,0700 g; tiempo de agitación de 20 minutos

Dado el intenso color de las soluciones de 5-Br-PADAP, se hizo necesario modificar el proceso para la realización de la SPS. Se decidió fijar el reactivo a la resina (funcionalización de la resina). La gráfica de calibración fue lineal, con un coeficiente de correlación de 0,998; la linealidad se mantuvo desde valores cercanos al límite de detección y

hasta al menos $100 \mu\text{g L}^{-1}$. El valor del límite de detección obtenido para 50 mL de muestra de una solución de Cd(II) fue de $0,8 \mu\text{g L}^{-1}$. Finalmente se realizó el estudio de posibles interferencias, donde se pudo observar la selectividad del método alcanzada para el Pb(II), se concluyó que la selectividad es adecuada para su aplicación en aguas provenientes del Río Paraná.

Fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II) en aguas del Río Paraná. Se realizó el fraccionamiento químico de Cd(II) y Pb(II) en aguas provenientes del Río Paraná, pudiéndose diferenciar una fracción insoluble (particulada), que se separó por filtración a través de membrana de $0,45 \mu\text{m}$. de la fracción soluble. Para la diferenciación de las diferentes fracciones solubles se estudiaron las resinas para retener la fracción de metal complejado.

De la validación del método. Se contrastaron los resultados obtenidos para la concentración total de los analitos en los mineralizados con otras determinaciones realizadas en forma independiente por ICP-OES. Se encontró una excelente concordancia entre los valores obtenidos tanto para Cd(II) como para Pb(II). Se realizaron también estudios de recuperación, con sobre agregado de estándar, obteniéndose excelentes resultados para ambos analitos.

CONCLUSIONES FINALES

Los resultados obtenidos confirman que la metodología diseñada es apropiada para el fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II) a nivel de vestigios en muestras de agua del Río Paraná.

Las principales ventajas de la metodología propuesta son la sencillez y el bajo costo de los equipos y reactivos requeridos (además de la adecuada sensibilidad), esto permite que sea de fácil aplicación para el control y distribución de elementos vestigios de interés ambiental.

INTRODUCCION

CAPITULO I

1.	Introducción	1
1.1.	Definición de especiación química	1
1.2.	Importancia de la especiación química	2
1.3.	Problemas analíticos de la especiación química	4
1.3.1.	Disturbios en el estado de equilibrio	5
1.4.	Estrategia para la especiación química	6
1.4.1.	Especiación basada en métodos de cálculo	7
1.4.2.	Métodos directos de especiación.....	7
1.4.3.	Métodos discontinuos (Off-Line).....	8
1.4.4.	Métodos continuos (On-Line).....	8
1.5.	Propiedades generales del cadmio y sus minerales.....	12
1.5.1.	Propiedades físico-químicas	13
1.5.2.	Compuestos que forma el cadmio	13
1.5.3.	Usos industriales del cadmio.....	15
1.5.4.	Distribución ambiental del cadmio	15
1.5.5.	Toxicología del cadmio.....	18
1.5.6.	Toxicocinética del cadmio	19
1.6.	Propiedades generales del plomo y sus minerales	20
1.6.1.	Producción y usos industriales.....	21
1.6.2.	Distribución ambiental del plomo.....	22
1.6.2.1.	Contaminación del aire:	22
1.6.2.2.	Contaminación del agua y alimentos:	23
1.6.3.	Fisiología del plomo.....	23
1.6.4.	Acción patológica:	25

CAPITULO II

2.	Espectrofotometría en Fase Sólida.....	30
2.1.	Definición de espectrofotometría en fase sólida	30
2.1.1.	Breve reseña histórica	30
2.2.	Tipos de soportes	31
2.2.1.	Polímeros de Estireno.	31
2.3.	Procedimiento para el desarrollo del color	34
2.4.	Medida de la absorbancia en espectrofotometría en fase sólida	35

CAPITULO III

3.1.	Especiación de Metales Pesados en Aguas de Río	39
3.1.1.	Constituyentes de las aguas naturales	39
3.1.1.1.	Constituyentes inorgánicos	39
3.1.1.2.	Constituyentes orgánicos	39
3.1.1.3.	Material particulado y coloides.....	40
3.1.2.	Origen y transporte de metales pesados en aguas	40
3.1.3.	Tipos de especies que forman los metales en aguas naturales	43
3.1.4.	Factores ambientales que afectan la especiación	45
3.2.	Técnicas Experimentales para la Especiación Química.....	46
3.2.1.	Técnicas físicas	47

3.2.1.1.	Centrifugación:.....	47
3.2.1.2.	Filtración:	47
3.2.1.3.	Ultrafiltración.....	50
3.2.1.4.	Diálisis	52
3.2.1.5.	Permeación en geles.....	53
3.2.1.6.	Electroforesis (plana y capilar)	54
3.2.2.	Técnicas químicas	55
3.2.2.1.	Columnas de intercambio iónico.....	55
3.2.2.2.	Resinas quelantes	55
3.2.2.3.	Columnas de adsorción en fase sólida	56
3.2.2.4.	Extracción líquido-líquido	56
3.2.3.	Esquemas de especiación (Fraccionamiento)	57
3.2.4.	Validación del fraccionamiento de muestras	58

CAPITULO IV

4.	Diseño Experimental.....	62
4.1.	Metodología de superficies de respuesta	62
4.2.	Superficies de respuesta para dos factores de tratamiento	62
4.3.	Modelos polinomiales aproximados	62
4.4.	Experimentos secuenciales para el análisis de respuesta	63
4.5.	Identificación de variables significativas con análisis factorial.....	63
4.6.	Método de Doehlert	64
4.7.	Determinación del punto óptimo.....	67
4.7.1.	Inspección de la superficie de respuesta	68
4.7.2.	Análisis canónico	68
4.8.	Caracterización de la superficie de respuesta	70

EXPERIMENTAL

CAPITULO V

5.1.	Generalidades sobre los Piridilazo Reactivos	72
5.1.1.	El reactivo complejante PAN.....	74
5.1.2.	El reactivo complejante 5-Br-PADAP.....	75
5.2.	Reactivos Utilizados Durante el Desarrollo del Trabajo.....	78
5.2.1.	Solución de 5-Br-PADAP (2×10^{-3} mol L ⁻¹).....	78
5.2.2.	Solución de PAN (2×10^{-3} mol L ⁻¹).....	78
5.2.3.	Solución "tipo" de Cd(II) (1000 ppm)	79
5.2.4.	Solución "tipo" de Pb(II) (1000 ppm).....	79
5.2.5.	Solución "tipo" de Ca(II) (1×10^{-2} mol L ⁻¹).....	79
5.2.6.	Solución de EDTA (1×10^{-2} mol L ⁻¹)	79
5.2.7.	Solución reguladora de Amoníaco Cloruro de amonio.....	79
5.2.8.	Solución de Tetraborato de sodio 0,1 mol L ⁻¹	79
5.2.9.	Solución de indicador Arsenazo	79
5.2.10.	Solución de Tritón X-100 (5% v/v).	79
5.2.11.	Resina aniónica Dowex 1X8.....	80
5.2.12.	Resina Silica C-18.....	80
5.3.	Instrumental y Materiales.....	80
5.3.1.	Medidas absorciométricas.....	80
5.3.2.	Titulaciones.....	80

5.3.3.	Medidas y ajustes de pH	80
5.4.	Cadmio	81
5.4.1.	Parámetros que afectan la formación del complejo Cd-PAN	81
5.4.2.	Influencia del pH.....	81
5.4.3.	Composición y concentración de la solución reguladora.....	82
5.4.4.	Orden de adición de los reactivos	83
5.4.5.	Selección de la resina	83
5.4.6.	Aumento de la sensibilidad en fase sólida	83
5.4.7.	Estudio de la influencia de las variables químicas.....	84
5.4.8.	Optimización de KI y PAN por el método de Doehlert	86
5.4.8.1.	Diseño 1	87
5.4.9.	Influencia de la cantidad de resina.....	91
5.4.10.	Influencia del tiempo de agitación	96
5.4.11.	Estabilidad del complejo fijado en la resina	97
5.4.12.	Distribución del complejo entre la resina y la fase acuosa	98
5.4.13.	Resumen de las condiciones seleccionadas para Cd(II).....	99
5.4.14.	Parámetros analíticos para la determinación de Cd(II).....	99
5.4.15.	Estudio de las posibles interferencias	102
5.5.	Plomo	104
5.5.1.	Parámetros que afectan la formación del Pb(II)-5-Br-PADAP.....	104
5.5.2.	Influencia del pH.....	104
5.5.3.	Composición y concentración de la solución reguladora.....	105
5.5.4.	Selección de la resina.....	105
5.5.5.	Influencia de la concentración de 5-Br-PADAP.....	106
5.5.6.	Fijación del reactivo complejante a la resina	107
5.5.7.	Influencia de la concentración de tensoactivo	107
5.5.8.	Orden de adición de los reactivos	108
5.5.9.	Aumento de la sensibilidad en fase sólida	108
5.5.10.	Influencia de la cantidad de resina.....	108
5.5.11.	Influencia del tiempo de agitación	110
5.5.12.	Estabilidad del complejo en función del tiempo.....	110
5.5.13.	Resumen de las condiciones seleccionadas para Pb(II)	110
5.5.14.	Parámetros analíticos para la determinación de Pb(II)	111
5.5.15.	Estudio de posibles interferencias.....	111

CAPITULO VI

6.1.	Aplicaciones – Aspectos Generales	114
6.1.1.	Fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II) en aguas superficiales	115
6.1.2.	Esquema propuesto para el fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II)	117
6.2.	Experimental	119
6.2.1.	Determinación de la concentración total de analito	119
6.2.2.	Selección de la resina.....	120
6.2.3.	Recolección y conservación de muestras.....	122
6.3.	Fraccionamiento de Cd(II) en Aguas Superficiales del Río Paraná..	123
6.3.1.	Determinación del contenido total de Cd(II)	123
6.3.2.	Fraccionamiento químico experimental de Cd(II)	125
6.3.2.1.	Determinación de la fracción soluble y particulada.....	125
6.3.2.2.	Determinación de la fracción complejada.....	126

6.3.2.3.	Determinación de la fracción metal libre	127
6.3.3.	Patrón de distribución del Cd(II) en aguas del Río Paraná	127
6.3.4.	Validación del método aplicado para Cd(II)	128
6.4.	Fraccionamiento de Pb(II) en Aguas Superficiales del Río Paraná ..	130
6.4.1.	Determinación del contenido total de Pb(II)	130
6.4.2.	Fraccionamiento químico experimental de Pb(II)	131
6.4.2.1.	Determinación de Pb(II) en la fracción soluble y particulada	131
6.4.2.2.	Determinación de Pb(II) en la fracción complejada	131
6.4.2.3.	Determinación de Pb(II) en la fracción metal libre	132
6.4.3.	Patrón de distribución del Pb(II)	132
6.4.4.	Validación del método aplicado para Pb(II)	133

CONCLUSIONES

CAPITULO VII

7.1.	Propósitos	137
7.2.	Conclusiones	138
7.2.1.	Determinación de Cd(II) por SPS	138
7.2.2.	Determinación de Pb(II) por SPS	139
7.2.3.	Fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II) en aguas del Río Paraná	141
7.2.4.	De la validación del método propuesto	142
7.2.5.	Conclusiones generales	142

CAPITULO I

1. *Introducción*

El término *especiación* se refiere a la clasificación de algo en *especies*. Éste término ha sido utilizado por las ciencias biológicas para clasificar los seres vivos en *especies* y define a las especies como grupo de individuos semejantes en cuanto a características estructurales y funcionales¹. La química mediante los grandes avances de las técnicas analíticas, ha introducido el término *especiación química* para referirse a la clasificación y cuantificación de las diferentes formas en las que se puede encontrar un mismo elemento en un sistema químico determinado. Sin embargo no existe una sola definición para la especiación química.

1.1. **Definición de especiación química**

Probablemente la definición más acertada del termino especiación es la dada en una revisión realizada por el I.U.P.A.C², de numerosas publicaciones y trabajos hechos por organismos especializados, y define al término *especiación química* como “el proceso por el cual se pone en evidencia la forma atómica o molecular de un analito”. La validez de esta definición puede acomodarse a componentes que se encuentran en forma de complejo orgánico. En el último caso, se toma a la determinación de complejos con sus combinaciones moleculares específicas con un elemento y los diferentes estados de oxidación de un átomo³.

En este contexto se puede definir a la especiación como, (a) el proceso de identificación y cuantificación de las diferentes especies definidas, formas o fases presentes en un material; o (b) la descripción de las cantidades y tipos de dichas especies formas o fases presentes. Dadas estas definiciones tenemos que las especies, formas o fases pueden definirse (i) funcionalmente, (ii) operacionalmente⁴, o (iii) compuestos químicos específicos o estados de oxidación.

- (i) La clasificación funcional se ejemplifica al clasificar las diferentes formas en “Fracción biodisponible para vegetales”, otros ejemplos son “biológicamente activos” o “formas móviles”.
- (ii) En la definición operacional (fraccionamiento químico), se aplican procesos físicos o químicos de fraccionamiento a la muestra. Por ejemplo las extracciones secuenciales son comúnmente usadas para aislar o separar, metales en sus fracciones “solubles en agua”, “intercambiable”, “reducible”, “oxidable”, y “residual” (entre otras) asociada con muestras de sedimentos. Entre los procesos físicos más utilizados en muestras de aguas podemos clasificar entre fracción soluble y fracción insoluble basándonos en la capacidad de las especies para atravesar una membrana de filtración con un tamaño de poro de 0,45 μm .
- (iii) La tercera forma de especiación es aquella en la que se determina precisamente la forma química en la que se encuentra el elemento, y no puede llevarse a cabo si no se dispone de una metodología analítica de gran selectividad y sensibilidad. En algunos casos se lleva a cabo en el análisis de aguas mediante la correcta elección de adsorbentes o reactivos, pudiendo separar en fracciones según su estado de oxidación (Ej: Cr(III) y Cr(VI)).

Es decir que el término especiación química se aplicará a la identificación y cuantificación de las diferentes especies de los componentes químicos presentes en un sistema en sus formas inorgánica, órgano-metálica u orgánica. Esto no siempre es una tarea fácil ya que la especiación se refiere a la identificación de cada una de las formas químicas y medida de la concentración de cada fracción, lo que representa una tarea muy diferente de la determinación de la concentración total de un elemento.

1.2. Importancia de la especiación química

Durante los últimos años se ha visto un gran aumento del interés de las ciencias biológicas y ambientales por lo que se ha llamado especiación química, lo que se refleja en el gran número de publicaciones recientes con respecto a éste tema⁵. Este gran incremento de información se ha focalizado en la distribución, movilidad y disponibilidad biológica de los elementos químicos no depende solamente de su

concentración, pero si de sus asociaciones físicas y químicas con el medio en el que se encuentra. Los cambios en las condiciones ambientales, que pueden ser naturales o antropogénicas, ejercen una fuerte influencia en la forma en la que se encuentran los elementos tóxicos o esenciales⁶. Alguno de esos factores incluyen al pH, potencial redox y disponibilidad de “especies reactivas” como por ejemplo, complejos (orgánicos o inorgánicos), partículas que ofrecen una superficie de adsorción, y coloides. Así por ejemplo el Arsénico es extremadamente tóxico en su forma inorgánica pero relativamente inocuo como arsenobetaína (forma común en peces).

Cuando se desea comprender la química ambiental de un elemento se hace necesario caracterizar sus formas químicas y proporciones en las que se distribuye⁷, bajo diversos rangos de condiciones que sean posibles de ocurrir en la naturaleza. Dado que esto no siempre es posible de realizar en la práctica, la especiación busca caracterizar, por ejemplo, las formas más importantes en las que se encuentra un elemento como una manera de conocer sus transformaciones y además intenta inferir con esta información cuales serán las consecuencias ambientales de los cambios. En consecuencia vemos que la especiación es un tema de interés para investigadores con diferentes campos de acción como el de los químicos, biólogos, especialistas en nutrición y medicina, y otros que puedan requerir este tipo de información⁸.

Con el advenimiento de las técnicas de espectroscopia de fluorescencia de rayos X, espectroscopia de emisión atómica, análisis de activación de neutrones y espectroscopia de absorción atómica los datos de los elementos se obtienen más fácilmente y son cada vez más usados en muestras ambientales. Los resultados son referidos a “concentraciones máximas permisibles”, en términos de concentración total, esto fue utilizado con éxito en estudios ambientales o monitoreos pero esto solo es correcto para algunos elementos. Sin embargo, desafortunadamente, las formas específicas de los elementos son estudiadas correctamente recientemente a través de la especiación.

La especiación es importante desde varios puntos de vista, como por ejemplo la actividad biológica de las diferentes especies, ya que la toxicidad de un elemento puede variar en sus diferentes formas, por lo que es importante conocer cuan tóxicas son éstas y la presencia de cada una en el ambiente. Las diferentes formas de un mismo elemento pueden variar en las propiedades físicas de volatilidad y solubilidad, esto podría causar

grandes cambios en los ciclos geoquímicos⁹, ciclos de descomposición o ciclos de transporte de varios elementos inclusive a escala global.

Otro aspecto de la especiación es la necesidad de realizar un monitoreo global de localidades sin polución de las formas específicas, ya que no existe gran cantidad de datos de este tipo. Esto nos permitiría conocer que parámetros se afectarían en sus valores normales, además podemos establecer las condiciones de equilibrio en ciclos globales o locales para prevenir cambios con graves consecuencias.

A pesar del transporte realizado por los surcos de aguas o la acción del viento, los contaminantes tienen tiempo suficiente para interactuar con los sistemas físicos y biológicos, esto podría modificar el equilibrio y llevar a concentraciones inusuales de algún componente.

Los estudios de especiación requieren de condiciones muy específicas, las que deben tenerse en cuenta para su uso en la prevención del impacto ambiental. Cuando se enfrentan problemas de contaminación la concentración total de los analitos no es suficiente para evaluar la potencial toxicidad inherente a cada elemento. Por otro lado cuando se extrapolan datos de estudios anteriores en otras localidades deben tenerse en cuenta también los cambios en las condiciones físicas, químicas y biológicas, en la nueva área (pH, pE, composición del agua, temperatura, hidrología, etc.), es decir que un pequeño cambio en alguna de estas condiciones puede dar resultados totalmente diferentes.

Los estudios de especiación pueden influenciar en la selección de los equipos de monitoreo ambiental. En algunos casos será útil seguir la evolución de un solo elemento.

1.3. Problemas analíticos de la especiación química

Generalmente la especiación química presenta los siguientes problemas analíticos:

- i. Las muestras son mezclas complejas de varias especies químicas, incluidas las diferentes formas de los metales.
- ii. Parte o el total de la muestra puede ser sensible a la oxidación por el aire, o reducción química durante el muestreo o tratamiento de la muestra.

- iii. Parte o el total de la muestra puede ser sensible a los cambios de pH
- iv. Pueden estar presentes algunos complejos o polímeros
- v. A veces la presencia de algunos componentes no puede ser probada realmente en la muestra ambiental, pero surge de una inteligente especulación o una opinión o el trabajo de modelos de laboratorio.
- vi. Generalmente la concentración total del analito se encuentra por debajo de 1µg por muestra.
- vii. Hay que tener en cuenta la volatilidad de las diferentes formas químicas.
- viii. Finalmente se cuenta con pocas vías para verificar que el método analítico seleccionado sea el más adecuado.

Usualmente la lógica analítica nos dice que primero se debe conocer el parámetro que se quiere seguir y luego se busca el método que mejor se adapte. Lamentablemente en especiación el parámetro a seguir representa el mayor problema¹⁰.

1.3.1. Disturbios en el estado de equilibrio

La posibilidad de producir disturbios en las condiciones de equilibrio durante los análisis de especiación, es muy alta, particularmente durante la etapa de muestreo. Esto puede demostrarse si se considera un cuerpo de agua que se encuentra contaminado con metales pesados. Las interacciones entre los iones metálicos y otros componentes del sistema resultan en la formación de numerosas especies metálicas (ej: iones hidratados, pares iónicos, polímeros con hidroxilo, formación de complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos, iones adsorbidos en partículas coloidales, o asociado con pequeños microorganismos) y el modelo final de distribución de un elemento en la fase agua refleja su afinidad por los ligandos orgánicos e inorgánicos, modificaciones por adsorción en material particulado e interacción con la biota.

Las diferentes formas químicas coexisten en un estado de equilibrio o cuasi-equilibrio. Por esto se debe considerar a cada una de las etapas del esquema de análisis previsto para producir la menor cantidad de disturbios posible. No siempre se pueden reconocer los cambios introducidos, sobre todo si éstos se producen durante el

muestreo, pasos de preparación de la muestra o durante el almacenamiento. Por ejemplo, si se colecta una muestra de agua y se aísla de otros componentes con los que forma el cuasi-equilibrio, se filtra para remover las partículas suspendidas, se puede causar algún disturbio. Dado que los iones en la fase acuosa tenderán a adsorberse a las paredes del recipiente que contiene la muestra, éste proceso puede prevenirse mediante el agregado de ácido al agua. Desafortunadamente la acidificación de la muestra de agua causa un aumento en la disociación de las especies de complejos.

En el caso de los sedimentos de ríos, la distribución de los elementos de interés entre los diferentes componentes, varía según el grado de exposición al aire y la temperatura de los diferentes pasos de sedimentación. Los componentes minoritarios no presentan en los sedimentos una distribución uniforme, una parte puede presentarse unida a fragmentos minerales provenientes de la propia roca madre, mientras que otras partes pueden asociarse con distintos componentes, como ser compuestos de carbonato, óxidos hidratados de hierro, aluminio, manganeso y materia orgánica. Algunas fracciones pueden perderse por adsorción a la superficie de algunas partículas o también por unión a sitios de intercambio iónico de algunas superficies.

1.4. Estrategia para la especiación química

El interés en los procedimientos de especiación química sufrió un considerable aumento debido a que gran proporción de la comunidad científica reconoce que la existencia de enfermedades, toxicidad y biodisponibilidad, dependen de la especie química, antes de su concentración total.

Se cuenta con varias estrategias alternativas que pueden ser usadas en el diseño del esquema experimental para el estudio de dos categorías de especiación química: (i) La determinación de especies particulares en una muestra dada, teniendo la identificación y cuantificación de éstas. (ii) Los estudios de la distribución y abundancia de las especies, lo que provee de una distribución numérica (o abundancia) de las diferentes especies de un elemento, en una muestra dada.

La determinación de la concentración de las especies individuales representa un desafío mucho más complicado que la determinación de la concentración total de un elemento debido a: (i) las dificultades asociadas con el aislamiento de los compuestos de interés de matrices complejas; (ii) la mayoría de las técnicas de especiación producen disturbios en el equilibrio existente entre las diferentes formas químicas; (iii) pocas

técnicas tienen un grado de sensibilidad suficiente para las especies presentes como vestigios; (iv) prácticamente no se dispone de materiales de referencia adecuados, dada la gran variación de la naturaleza de la matriz de las diferentes muestras de aguas o sedimentos.

1.4.1. Especiación basada en métodos de cálculo

En vista de los errores asociados con el muestreo, preparación de muestras y las limitaciones de las técnicas experimentales usadas en la especiación, muchos investigadores prefieren calcular la distribución de las especies de un elemento mediante el uso de modelos teóricos de distribución. Estas aproximaciones requieren la resolución de varias ecuaciones en forma simultánea, algunas que describen los equilibrios químicos que se encuentran compitiendo y otras que se ocupan de los balances de masa. Para crear éstos modelos debemos ingresar los datos de concentración total de cationes, aniones y ligandos de las especies presentes y los valores de las constantes de equilibrio teniendo en cuenta la interacción entre varias especies. En estos modelos se hace necesario asumir arbitrariamente el número y tipos de especies presentes y estimar los “mejores valores” para varias constantes de equilibrio, según se encuentran en la literatura. Estas decisiones preliminares, son la fuente de mayor discrepancia entre los especialistas, dado que ocurren muchas variaciones y generalmente no se dispone de valores de constantes de equilibrio para la materia orgánica, coloides o material particulado.

1.4.2. Métodos directos de especiación

Estos métodos incluyen técnicas, que son capaces de mostrar suficiente selectividad para responder a niveles de vestigios de las especies presentes en la muestra. Probablemente las técnicas más difundidas en el sentido de la especiación son las de naturaleza electroquímica. Alguna técnica especie-específicas como la potenciometría con electrodo ion selectivo (ISE) es una de las mas usadas en aguas naturales y fluidos biológicos para la especiación de Ca^{2+} y Mg^{2+} en suero. Sin embargo la sensibilidad y selectividad de esta técnica no es suficiente para determinar niveles de vestigios de otros metales tales como Cd(II), mercurio, etc. en fluidos biológicos.

Otras técnicas más sensibles como la voltamperometría y particularmente los métodos de redisolución se han vuelto muy populares en este sentido. Estas técnicas

permiten distinguir los diferentes estados de oxidación y los compuestos lábiles e inertes que forman los elementos en una muestra. Ellas han sido muy utilizadas en muestras de aguas.

En términos generales las técnicas electroquímicas pueden presentar una baja selectividad en muestras biológicas para elementos en concentración del orden de vestigios (trabajan bien en sistemas en solución, pero presentan algunos problemas cuando las especies se enmascaran en material biológico). Por ello es que en sistemas biológicos se ha propuesto la utilización de técnicas como la clásica espectrofotometría molecular UV-Vis, la fluorimetría, etc. como métodos directos de especiación. A partir del uso de biosensores ópticos, la selectividad necesaria se logra a través de un proceso de reconocimiento (reacción química), integrado con un transductor físico-químico (detector de fluorescencia).

Dentro de la categoría de métodos directos de especiación podemos incluir también a los llamados métodos físicos que se encargan de la identificación química. Estos incluyen a las técnicas con Rayos X, resonancia magnética nuclear, espectroscopia Mossbauer con Rayos γ , técnicas UV-Vis basadas en el dicroísmo electrónico circular o vibracional como la espectrometría IR, o con trazas radioactivas. Estos métodos permiten realizar la determinación de la estructura química de la especie del elemento que se está determinando sin producir cambios en la muestra.

1.4.3. Métodos discontinuos (Off-Line)

Esta clasificación comprende a aquellos métodos o esquemas de análisis en los que la etapa de separación no se encuentra unida directamente a la etapa de determinación, por eso se los llama discontinuos (Off-Line) En otras palabras, las diferentes fracciones obtenidas, luego de pasar la muestra a través de la etapa de separación, son recogidas en recipientes adecuados para introducirlas en la etapa de cuantificación que puede ser de naturaleza espectroquímica o electroquímica.

En las tablas 1.1. y 1.2. se enumeran algunas de las técnicas de clasificación de especies más utilizadas en los estudios de especiación.

1.4.4. Métodos continuos (On-Line)

Estos métodos se caracterizan porque se pueden diferenciar dos etapas, una primer etapa de separación de las especies que se encuentran presentes en la muestra y

una segunda etapa de determinación o cuantificación de las diferentes especies separadas.

La selección de una técnica efectiva de separación va a estar en función de la naturaleza de las especies a separar y la matriz de la muestra.

En cuanto a la técnica de determinación puede ser de naturaleza espectroquímica o electroquímica, pero los detectores más ampliamente usados en la actualidad son los de espectrometría atómica. Estos poseen especificidad y sensibilidad ideal para los metales al nivel de vestigios, particularmente los detectores de plasma los que permiten un monitoreo continuo de las especies separadas.

Tabla 1.1.

Técnica no-cromatográfica	Principio de separación	Ejemplos
Filtración	Tamaño de partícula	Filtración en muestras de agua (filtros de 0,45 μm de poro)
Ultrafiltración	Tamaño molecular	Análisis en suero; distribución entre especies ultrafiltrables y no filtrables.
Diálisis	Tamaño molecular	Análisis clínicos; eliminación de especies tóxicas durante la diálisis.
Centrifugación	Densidad de partícula	Análisis citológico; diferenciación de diferentes fracciones histológicas.
Extracción	Solubilidad	Análisis en muestras de suelos o sedimentos; determinación de fracciones solubles.
Electroforesis	Movilidad eléctrica en solución	Análisis en suero; determinación de la unión de Se a las diferentes fracciones de proteínas.

Tabla 1.2.

Técnicas Cromatográficas	Principio de separación	Ejemplos
Cromatografía Gaseosa	Interacciones hidrofílicas/hidrofóbicas	Especies volátiles en muestras de agua (Ej. Metilmercurio)
Cromatografía Líquida	Diferentes mecanismos son posibles (exclusión por tamaño, intercambio iónico, fase reversa, etc.)	Especies no-volátiles en orina (Ej. Al-transferrina)

En algunos casos la sensibilidad puede aumentarse por técnicas específicas como de generación de hidruros, o especies volátiles, o agregando pasos de preconcentración, etc.

A diferencia de los métodos Off-Line, en los métodos On-Line, las etapas de separación y detección de las diferentes especies, se encuentran unidas directamente o a través de una interfase. De esta combinación de técnicas surge un instrumento de gran poder y de excelente performance para los estudios de especiación, que presenta como principales ventajas la disminución de fuentes de contaminación y la disminución de pasos del proceso analítico. Sin embargo el mayor inconveniente que presenta el acople de éstos instrumentos es que cada uno de estos equipos no han sido diseñados para ser acoplados.

De la revisión de publicaciones recientes, surge que la mayor proporción de técnicas híbridas para la determinación de especies inorgánicas utilizan la cromatografía líquida para la etapa de separación, dado que numerosas especies organometálicas forman especies cargadas que no son volátiles, en cambio las especies que se separan con la cromatografía gaseosa (GC) deben ser térmicamente estables, y no descomponerse al someterlas a altas temperaturas.

En cuanto a los dispositivos utilizados para la determinación se prefieren los métodos de espectrometría atómica, que pueden ser de absorción como llama, tubos de cuarzo calentados o de emisión con plasmas inducidos por microondas (MIP), ICP-AES, o ICP-MS que se encuentra entre los más utilizados.

Cuando se usa la GC como primer etapa, la línea de transferencia que hace de puente entre los dos instrumentos debe ser calentada para prevenir la condensación de

los analitos. Se debe tener mucho cuidado de que no quede ningún espacio muerto o áreas frías dentro de la línea.

La GC se utiliza para un número limitado de determinaciones y puede ofrecer algunas ventajas sobre la cromatografía líquida ya que los instrumentos de emisión atómica por plasma (ICP) o Absorción atómica por llama (FAAS) deben generar átomos en gases calientes (llama o plasma) y la corriente del efluente de la columna que surge del GC puede introducirse directamente, dado que el mismo ya es un gas caliente. Los sistemas de llama que utilizan nebulizador para la introducción de muestras líquidas, tienen solo un 10% de eficiencia, entonces se logra que el efluente gaseoso de la GC se introduzca completamente en la llama. Se produce entonces un aumento de la sensibilidad.

En general para la GC el sistema GC-MIP-AES es el más utilizado, aunque también se acopla muy bien con los equipos ICP-MS, con lo que se obtiene una mejora en la sensibilidad debido a que el ICP-MS es una técnica muy sensible de por sí.

En cuanto a la combinación de Cromatografía Líquida (LC) con las técnicas de espectrometría atómica, presenta más problemas que los sistemas que utilizan a la cromatografía gaseosa. El acople directo de una columna de LC a un sistema AAS, puede resultar en una disminución de la sensibilidad, dado que la velocidad de salida de flujo de la columna deberá igualar la velocidad de entrada al equipo de AAS. Además la dilución del analito en la fase móvil de la LC podrá aportar también una disminución de la sensibilidad.

Esta disminución de la sensibilidad también es aplicable a las técnicas de emisión con plasma (ICP), y reciben menor consideración en las técnicas de ICP-MS donde los límites de detección son muy bajos y poseen una sensibilidad muy alta.

Entre los principales problemas que se presentan en las técnicas ICP es que los solventes orgánicos utilizados en LC, produce una disminución en la estabilidad del plasma, resultando en un incremento del ruido y obtención de datos variables. Los nebulizadores también pueden bloquearse si los líquidos poseen altas concentraciones de sales. Esto puede prevenirse aspirando soluciones de HNO₃ después de cada determinación. El problema de los solventes orgánicos también puede disminuirse si se usan microcolumnas o aumentando la cantidad de O₂ en los gases del plasma, pero esto trae como consecuencia una disminución de la vida media de los equipos.

Existen numerosos trabajos que combinan separaciones cromatográficas con detectores atómicos, un ejemplo ilustrativo es la utilización de HPLC acoplada a un sistema ICP-AES, para la especiación de especies tóxicas de As en orina humana. Por supuesto que la sensibilidad con un nebulizador convencional del ICP-AES, resulta insuficiente para la detección del As, por lo que se le agregó una etapa de generación de hidruros en línea con lo que el sistema acoplado en línea total sería HPLC-Generación de Hidruros-ICP-AES.

1.5. Propiedades generales del cadmio y sus minerales

El descubrimiento del Cadmio como un elemento distinto fue realizado por Shrohmeyer y Hermann, en Alemania en 1817, de manera independiente y casi simultánea.¹¹

Como el Cd(II) y el Zn son similares en su estructura atómica y química, se los encuentra juntos en la naturaleza. El Zn se lo conoce como uno de los metales esenciales y del lado opuesto el Cd(II) es uno de los metales más tóxicos sin que se le haya asignado ninguna función en el metabolismo animal. Numerosas investigaciones se han centrado en el estudio del impacto que éste metal produce en los seres vivos, debido principalmente al incremento en su liberación al ambiente natural. En la tabla 1.3. se pueden ver las concentraciones de Cd(II) normalmente encontradas en la actualidad en los diferentes eco-compartimentos naturales no incursionados por el hombre.

Tabla 1.3. Concentración de Cd(II) normalmente encontrada en ambientes naturales no poluídos

Compartimiento	Concentración de Cadmio
Atmósfera	0,1 a 5 ng L ⁻¹
Corteza terrestre	0,1 a 5 µg g ⁻¹
Sedimentos marinos	Aprox. 1 µg g ⁻¹
Aguas de mar	Aprox. 0,1 µg L ⁻¹

1.5.1. Propiedades físico-químicas

El cadmio es un metal blanco azulado, liviano, que puede ser fácilmente rasgado con cuchillo. En ciertos aspectos es similar al Zn. El punto de fusión es de 320.9 °C, y su punto de ebullición es de 765 °C.¹² Forma parte del grupo de metales llamados de transición. Su posición en la tabla periódica de elementos se encuentra debajo del Zn y por encima del Hg. El grupo del Zn tiene completo el orbital d^{10} , por lo que se encuentra en el límite del bloque de los elementos con orbitales d y los del bloque de los con orbitales p del Boro y otros. En muchos casos los elementos del grupo del Zn reemplazan a los tres metales pesados del grupo del Boro. La otra configuración electrónica del grupo del Zn es $d^{10} s^2$ y su estado de oxidación es +2. Es soluble en ácidos, en nitrato de amonio y en ácido sulfúrico en caliente; e insoluble en agua, en frío o en caliente.

1.5.2. Compuestos que forma el cadmio

El estado de oxidación más común del Cd es el +II pero también puede formar compuestos con un estado de oxidación de +I. El Cd tiene un potencial de reducción relativamente bajo de -0.402 V (para $M^{2+} + 2 e^- = M$), el cual es menor que el potencial del Zn (-0.762V) y del Hg ($+0.854\text{V}$). Esto muestra el bajo poder de reducción del Cd. En disolución acuosa el Cd(II) existe en varias formas, mayormente como ion libre¹³ (Cd^{2+}). El Cd forma también complejos con cuatro y seis sitios de coordinación con diferentes ligandos, con una estabilidad relativa. Los compuestos orgánicos son de la forma R_2Cd^{14} , en general, los de mayor estabilidad se forman con ligandos naturales como sustancias húmicas¹⁵ y con ligandos tales como EDTA y NTA.

Entre los principales compuestos que forma el Cd(II) se encuentran:

Carbonato de cadmio: es un polvo blanco amorfo, que es soluble en ácidos, cianato de potasio y sales de amonio, mientras que es insoluble en amoníaco y agua, ya sea en frío o en caliente. *Cloruro de cadmio*: se presenta como cristales hexagonales pequeños de color blanquecino, es soluble en agua y acetona e insoluble en etanol. *Fluoroborato de cadmio*: es extremadamente higroscópico y muy soluble en agua. Cuando es calentado a descomposición, lleva al desprendimiento de humos tóxicos de cadmio, ácido fluorhídrico y otras compuestos fluorados. *Nitrato de cadmio*: son piezas blancas y amorfas o agujas higroscópicas; es muy soluble en ácidos e insoluble en etanol, acetona,

agua y amoníaco. *Oxido de cadmio*: es un polvo amorfo débilmente coloreado o cristales cúbicos de color marrón rojizo. Es soluble en ácidos, sales de amonio, y álcalis, pero es insoluble en agua fría o caliente. Cuando esta sustancia es calentada a descomposición, se desprenden humos de cadmio. *Sulfato de cadmio*: se presenta como cristales rómbicos de color blanco. Es soluble en agua pero insoluble en alcohol, acetona y amoníaco. El *sulfuro de cadmio* se presenta como polvo amarillo anaranjado a marrón. En agua caliente conduce a la formación de coloides. Es soluble en ácidos y amoníaco, pero insoluble en agua caliente. Cuando el sulfato o el sulfuro son calentados a descomposición, se produce la emisión de humos tóxicos de cadmio y óxidos de azufre (SO_x). La Tabla 1.4. resume las propiedades físico-químicas sobresalientes de los principales compuestos del cadmio.

En los últimos tiempos, las aplicaciones del Cd(II) y sus compuestos se han visto sometidas a una legislación cada vez más rigurosa debido al peligro que representa para la salud de la biosfera. Gran parte de estos hallazgos han surgido del campo de la ecotoxicología.

Tabla 1.4. Propiedades generales del cadmio y sus compuestos¹⁶

Propiedad	Cadmio	Óxido de Cadmio	Cloruro de Cadmio	Sulfuro de Cadmio
Formula química	Cd	CdO	CdCl ₂	CdS
Valencia	0	+2	+2	+2
CASNR	7440-43-9	1306-19-0	10108-64-2	1306-23-6
Peso molecular	112,41	128,41	183,32	144,47
Estado físico	Metal blanco azulado	Polvo marrón oscuro	Cristales débilmente coloreados	Cristales naranja o amarillo brillantes
Punto de fusión	320,9°C	>1500 °C	568 °C	1750 °C
Punto de ebullición	765 °C	900 °C	960 °C	980 °C
Solubilidad en agua	Insoluble	Insoluble	1400 g L ⁻¹	1,3 x 10 ⁻³ g L ⁻¹
Presión de vapor	1 mm Hg a 394°C	1 mm Hg a 1000°C	10 mm Hg a 656°C	Sin datos

1.5.3. Usos industriales del cadmio

El cadmio y sus sales son usados en numerosos y variados procesos industriales. La electrodeposición es el uso mayor del propio metal. El Cd(II) es un constituyente de aleaciones para fusibles y soldadura de aluminio. Se utiliza también en diferentes aplicaciones como el proceso de grabado, amalgama en cirugía dental, y baterías de almacenamiento de níquel-cadmio.

El acetato de este metal, es empleado para producir efectos iridiscentes en la alfarería y porcelana. En fotografía se usan sales de bromuro de cadmio e ioduro para los procesos de grabado y litografía. El óxido se utiliza en la fabricación de vidrios, glaseados de cerámicos, así como en la fabricación de aleaciones de color de plata y en electrodeposición de ésta. El seleniuro de cadmio se encuentra en fotoconductores, células fotoeléctricas y rectificadores. El cloruro de cadmio es usado en fotocopias, tinta para impresoras, colorantes, cubas de electroplaqueo y en la elaboración de pigmentos para plásticos. El sulfuro de cadmio, también conocido como cadmio amarillo, siendo un pigmento de coloración rápida, es usado para colorear vidrios, jabones, textiles, papeles, productos de imprentas y cerámicos.

Durante los comienzos del 1900 algunas sales de Cadmio se utilizaron para el tratamiento de la sífilis y la tuberculosis.¹⁷

1.5.4. Distribución ambiental del cadmio

Los principales países productores de Cd(II) son Estados Unidos, Méjico, Canadá, Australia y Japón. Las principales fuentes de contaminación de la atmósfera son las minas de extracción del metal y las industrias. La tabla 1.5. muestra la contribución derivada de cada aplicación actual del Cd(II) a la polución ambiental.

Los suelos generalmente contienen $< 0,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ en las zonas con concentraciones mayores se revela la actividad antropogénica. Las principales variaciones en el contenido de Cd(II) en suelos están determinadas por la composición de la roca madre y por el suministro de metales que provienen de fertilizantes, abonos, agroquímicos y la contaminación atmosférica. En suelos ácidos el Cd(II) se intercambia fácilmente lo cual lo hace disponible para su absorción por las raíces de los vegetales (el primer escalón de la pirámide alimentaria). Los lodos de las aguas negras y los superfosfatos que se utilizan en la agricultura pueden también contaminar el suelo con

Cd(II) ya que los suelos tratados con estas sustancias pueden llegar a contener hasta 100 mg Cd(II) kg⁻¹ de suelo seco. En un estudio llevado a cabo en Argentina¹⁸ se ha demostrado el aporte a la contaminación del suelo por el Cd(II) contenido en fertilizantes tipo fosfatos inorgánicos comerciales. Además, se han detectado elevadas concentraciones de Cd(II) en suelos de los alrededores de fábricas de cemento y metalúrgicas.

El contenido de Cd(II) del carbón y algunos aceites minerales varía desde < 0,01 a 65 mg Kg⁻¹ en el carbón y mayor a 1 g Kg⁻¹ en los aceites crudos. En el sedimento marino el rango de concentración va desde 0.1 a 1 mg Kg⁻¹, pero en las zonas con nódulos de Mn y fosfatos se encuentran enriquecidas las concentraciones de Cd(II). Con concentraciones por encima de 8 mg Kg⁻¹ para los nódulos y superiores a 25 mg Kg⁻¹ para los fosfatos.

Tabla 1.5. Contribución a la contaminación ambiental con Cd(II) desde las diversas fuentes.

Actividad	Contribución [%]
Uso de fertilizantes tipo fosfato	41,3
Combustión de derivados del petróleo	22,0
Producción de hierros y aceros	16,7
Fuentes naturales	8,0
Producción de metales no ferrosos	6,3
Producción de cemento	2,5
Productos de cadmio	2,5
Incineración de residuos	1,0

Otras fuentes importantes de emisión del Cd(II) al aire, agua y suelos son la industria del acero, la producción de metales sin hierro, refinерías, fábrica de cementos, fábrica de pinturas y fábrica de baterías. Altas concentraciones de Cd(II) se han encontrado en arroz, trigo, ostras, mejillones y corteza de riñón de algunos animales como el cerdo por ejemplo. Animales con un largo ciclo de vida como los caballos o

algunas especies de aves marinas han mostrado altas concentraciones de Cd(II) especialmente en riñón e hígado donde el Cd se acumula¹⁹.

La dosis diarias de Cd(II) depende obviamente de la dieta personal. En un trabajo realizado en Japón se observó que en zonas no poluídas la ingesta diaria de Cd(II) se encontraba en un rango de 59 – 113 μg por día para una persona normal de 70 Kg de peso, pero en zonas contaminadas la ingesta ascendía por encima de 400 μg día⁻¹.

En las aguas, el Cd(II) se presenta generalmente como ion libre Cd(II) y su solubilidad está influenciada por la dureza, el pH, los complejos solubles, los sulfuros coloidales, y su unión a la materia particulada. Cuando las aguas dulces llegan al mar, el Cd(II), al igual que otros iones de otros metales pesados, tiende a depositarse en los sedimentos y así queda limitado a las aguas costeras y los estuarios. Esto explica el por qué de las elevadas concentraciones del metal encontradas en pájaros que habitan en esas regiones.

Las aguas no contaminadas revelan concentraciones de Cd(II) en niveles de vestigios, valores por debajo de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ se han reportado.²⁰ El flujo global de Cd es difícil de establecer dado la gran movilidad de este metal. Las especies disueltas son extremadamente lábiles, es poco adsorbido a las partículas activas con respecto a otros metales traza y se libera primero de los sedimentos y partículas suspendidas si las condiciones químicas del agua sufren algún cambio²¹.

Por lo general las concentraciones de Cd(II) en aguas potables son menores a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo la contaminación de aguas de bebida puede ocurrir como consecuencia de la liberación de Cd(II) en las tuberías galvanizadas, grifos metálicos o a partir de soldaduras por un descenso en el pH del agua que esta en contacto y que contienen Cd(II), el descenso del pH podría deberse al incremento de lluvias ácidas. También ha ocurrido contaminación de las aguas del manto freático por escurrimiento de aguas contaminadas desde lodos que contenían óxidos de cadmio.²²

Para entender la toxicocinética del Cd(II) en la biosfera es importante considerar la acción que ejercen los microorganismos normales de las aguas en el proceso de organificación, que le otorga una toxicocinética muy particular al Cd(II) en la naturaleza por incrementar su hidrofobicidad, su absorción y su difusión a través de las membranas biológicas²³.

1.5.5. Toxicología del cadmio

El Cd(II) actúa como inhibidor de las enzimas con grupos sulfidrilos. Posee afinidad por otros ligandos celulares, como los grupos hidroxilo, carboxilo, fosfatos, cisteína e histidina, como así también por proteínas como las purinas y porfirinas. Esto produce serios disturbios en la fosforilación oxidativa.

El Cd(II) interactúa o compite con otros metales. Por ejemplo, en estudios hechos con animales en los que se incluían altos niveles de Cd en sus dietas se observaron cambios en la distribución y una disminución del Cu tisular.²⁴

Altas ingestiones de Cd(II) al igual que de Zn, Cu y Mn interfieren con la absorción de Hierro, posiblemente por competencia por los sitios de unión a las proteínas de la mucosa intestinal. Axelsson y Piscator²⁵, observaron el desarrollo de una anemia hipocrómica microcítica en conejos a los que se le incluyeron dosis de Cd(II) en su dieta. También se ha comprobado el desarrollo de anemia en otras especies animales. El mecanismo en el que intervendría el Cd(II) aún no es bien conocido, sin embargo en estudios realizados por Jacobs²⁶ en aves, se observó el aumento de la transferrina en plasma acompañada por una anemia severa. Esto sugiere que el Cd(II) interfiere con el transporte del Hierro realizado por la transferrina como posible mecanismo.

Se han observado también el agravamiento de enfermedades causadas por la deficiencia de Zn debido a la ingesta de Cd(II), en varios animales, por lo que se ha demostrado el reemplazo del Zn por el Cd en varios sitios activos tisulares.²⁷

El Cd(II) absorbido desde la luz intestinal es transportado al hígado unido a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina (Alb) y una vez allí se une a glutatión (GSH) hasta que se ha inducido la síntesis de una cantidad suficiente de metalotioneínas (MT). Las MT son proteínas de bajo peso molecular (aprox. 7 kDa), ricas en residuos de cisteínas (un tercio) y que poseen una elevada afinidad hacia el Cd(II) y otros metales. La inducción de la síntesis de MT ocurre en varios tejidos expuestos al Cd(II), Zn, u otros metales, El complejo Cd(II)- MT es luego liberado hacia la sangre y transportado hacia el riñón donde es filtrado en el glomérulo y luego reabsorbido, mediante un proceso de pinocitosis, en el epitelio del tubo proximal de la nefrona. La proteólisis de MT ocurre luego en los lisosomas del túbulo proximal y el Cd(II) liberado, induce la síntesis de nueva MT²⁸. Se ha informado que el daño renal asociado con la exposición al Cd(II) resulta de la concentración del Cd(II) libre en el ambiente tisular. La capacidad

de unión al Cd(II) de la MT renal es menor que la de la MT hepática, lo que sugiere que en el ambiente renal la concentración de Cd(II) libre es mayor, conduciendo a una mayor susceptibilidad del riñón a los efectos tóxicos del Cd(II) (órgano crítico)²⁹.

1.5.6. Toxicocinética del cadmio

La farmacocinética del Cd(II) depende de su forma química, la vía de exposición y del estado fisiológico y dietario del organismo expuesto. La absorción vía respiratoria es mucho mayor que vía gastrointestinal, tanto para las formas químicas solubles o no solubles del metal. Los diferentes compuestos del Cd(II) tienen diferentes solubilidades y esto puede influir en gran medida su biodisponibilidad y sus efectos acumulativos y tóxicos.

La principal fuente de exposición en la población en general es el ambiente natural. La principal vía de exposición de tipo no ocupacional en los seres humanos es la vía gastrointestinal. Por ejemplo a través de la ingesta de aguas o alimentos contaminados.

La vida media de este metal en el ambiente es muy larga (38 años)³⁰. El elemento tiene una velocidad de acumulación diaria de $40 \mu\text{g día}^{-1}$ en el cuerpo humano, por lo que un adulto de entre 40 - 60 años sometido a una dieta normal, probablemente posea unos 300 mg de contenido corporal, de los cuales el 45% puede recuperarse del hígado y del riñón. Sin embargo, las principales intoxicaciones con Cd(II) provienen de la Industria, esto se debe a la mala práctica de normas sanitarias de trabajo. La vía de ingreso principal en este caso es la respiratoria y en algunos casos el ingreso puede realizarse por ingestión.

La enfermedad Itai - Itai es causada por una intoxicación crónica con Cd(II) y es el cuadro clínico que mejor ilustra el efecto de una exposición sostenida al Cd(II). Se manifiesta por una disfunción renal, en combinación con una osteomalacia o una severa osteoporosis. Esta enfermedad es de prevalencia en algunas áreas de Japón, y se produjo por consumir arroz que era cultivado en áreas cercanas a una metalúrgica en el año 1947. Hasta el momento no ha sido posible conocer con exactitud la incidencia de esta enfermedad, pero se estima que hasta fines de 1965 había provocado 100 muertes. En las zonas más contaminadas se detectaron concentraciones de Cd(II) en el orden de 1 a $4 \mu\text{g g}^{-1}$ en los suelos aledaños³¹.

En cuanto a la intoxicación aguda, el órgano crítico depende de la vía de ingreso, si es a través de la vía respiratoria es el pulmón y si es por vía oral el órgano más afectado es el hígado. La ingestión de Cd(II) produce síntomas digestivos parecidos a los causados por una infección bacteriana, náuseas, vómitos, salivación, seguidas por diarrea con dolores abdominales y fuerte sudoración³².

1.6. Propiedades generales del plomo y sus minerales

El plomo es un poluente tóxico, y en general su presencia en sistemas acuáticos resulta de la actividad antropogénica^{33,34}.

Las condiciones de ductilidad y maleabilidad del plomo han hecho que este metal haya sido utilizado por el hombre desde la más remota antigüedad. Hipócrates en el siglo V antes de Cristo describe el cólico saturnino como síntoma de la toxicidad del Pb(II). Hay también referencias a la intoxicación por el Pb(II) en el antiguo Egipto, 4.000 años antes de la era cristiana.

De color azul-grisáceo, se obtiene principalmente a partir de la galena (sulfuro de plomo). Es un elemento al que se lo puede hallar formando compuestos orgánicos e inorgánicos. Generalmente se encuentra actuando con un número de oxidación 2+ [Pb(II)]; pero también puede encontrarse en el estado 4+. El peso atómico es de 207.2 g/mol, densidad 11.34 g cm³⁻¹, el punto de fusión es a 327 °C y el punto de ebullición a 1.525 °C. A partir de 500 °C la emisión de vapores de Pb(II) es ya importante y por tanto lo es su toxicidad. El plomo forma 4 isótopos estables en la naturaleza: ²⁰⁴Pb, (1.48%), ²⁰⁶Pb (23.6%), ²⁰⁷Pb (22.6%) y ²⁰⁸Pb (52.3%).

Es un metal blando, maleable y dúctil. Es un muy buen conductor del calor y la electricidad y muy resistente a la corrosión. En la capa expuesta al aire se forma una capa de protección de carbonato básico. El Pb(II) también reacciona con el agua y en presencia de aire forma hidróxidos de Pb(II). Los compuestos inorgánicos de Pb(II) generalmente son muy insolubles en agua o débilmente solubles, con excepción del clorato de plomo, perclorato, nitrato y acetato. El cloruro de plomo es moderadamente soluble. Los compuestos orgánicos más importantes son los tetrametil y tetraetilplomo, utilizados como antiexplosivo en combustibles.³⁵ Éstos se degradan a R₃Pb⁺, R₂Pb²⁺, y Pb²⁺, cada una de las diferentes formas químicas tienen diferentes niveles de toxicidad por lo que la especiación de cada una es una información importante.³⁶ La disminución de Pb(II) ambiental junto con los progresos hechos en el campo de la prevención han

reducido fuertemente la importancia de las exposiciones al metal a causa de la profesión lo que ha permitido obtener conocimientos más precisos sobre los efectos producidos a dosis bajas tanto en población general como en población laboral. Estos estudios han puesto en evidencia nuevos problemas, lo que ha llevado a algunos autores³⁷ a proponer una revisión de los actuales modelos de conocimiento y de prevención para el Pb(II) con el fin de adaptarlos a las nuevas condiciones de exposición y a los conocimientos más recientes sobre los efectos debidos a los actuales niveles de absorción del metal.

En un medio acuático a un pH entre 7 y 9, el Pb(II) se encuentra como ion libre divalente, Pb^{2+} , así como carbonato disuelto de plomo, $PbCO_3$. Con el ion OH^- forma también complejos solubles estables como $PbOH^{+38}$.

1.6.1. Producción y usos industriales

El Pb(II) se obtiene de suelos en los que viene mezclado con Zn, donde luego de varios pasos de flotación para concentrar el Pb(II) y luego se lo aglutina para obtener los óxidos de Pb(II). Los óxidos son reducidos y se refina el metal. La producción mundial anual se ha mantenido constante durante los últimos 10 años, alrededor de 3.5 millones de toneladas. Los países más importantes para la producción minera son EEUU, la URSS y Australia, a la producción minera hay que sumarle la producción de la escarpa.

En los EEUU, el uso más importante que se le da a éste metal se encuentra en la producción de baterías, aproximadamente el 77% del consumo total.³⁹ Otro porcentaje importante se ocupa para soldaduras, conductores, materiales de edificios, cañerías, y aditivo de combustibles. En Argentina, la Secretaría de Energía de la Nación a través de la Subsecretaría de combustibles reguló el tema del agregado de Pb(II) a los combustibles en 1998 (disposición 285/98). Por la misma resolución se limitaba el contenido máximo de Pb(II) en todas las naftas comercializadas en el territorio a un valor de 19 mg L^{-1} . esta exigencia implicaba la no adición de Pb(II) tetraetilo, práctica totalmente erradicada en el país desde hacía algunos años⁴⁰ El crecimiento de la polución con Pb(II), obligó, en los últimos años a dictar normas que restringen su uso como aditivo de pigmentos.

1.6.2. Distribución ambiental del plomo

El Pb(II) se encuentra ampliamente distribuido por la superficie terrestre. Los principales minerales de Pb(II) son la galena, cerrusita y anglesita que contienen sulfuros de Pb(II), carbonato de Pb(II) y sulfato de Pb(II) respectivamente.

Las diferentes fuentes de exposición al Pb(II) varían en las diferentes áreas geográficas del mundo. En general la exposición en zonas urbanizadas de alta densidad industrial es mucho mayor, comparada con las regiones rurales⁴¹. (Figura 1.1.)

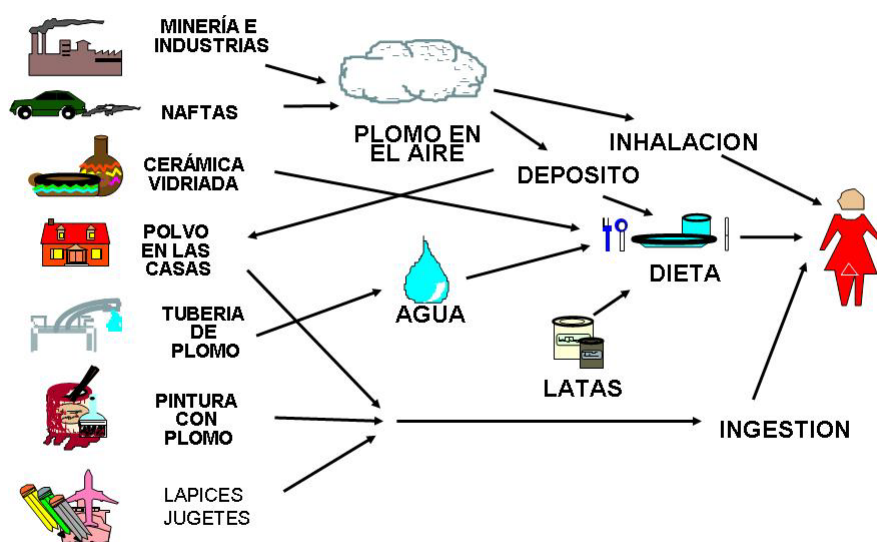


Figura 1.1. Vías de exposición al plomo en los seres humanos

1.6.2.1. Contaminación del aire:

La mayor contribución de Pb(II) en el aire debida a la emisión que se produce en centros urbanos e industriales. En áreas remotas la concentración de Pb(II) en el aire es de $0,04 \text{ nmol m}^3$, pero en zonas industriales o urbanizadas puede llegar a $2,5 - 50 \text{ nmol m}^3$. Estas altas concentraciones también se pueden presentar en los ambientes de trabajo de minerías, fábrica de baterías, etc.

1.6.2.2. Contaminación del agua y alimentos:

La actividad minera es la principal responsable de la contaminación del agua con Pb(II) ya que utiliza los ríos como una forma fácil y de bajo costo para deshacerse de los desechos que conforman lo relaves mineros.

Las especies inorgánicas predominantes en aguas de bebida son PbCO_3 y $\text{Pb(OH)}_2\text{CO}_3$. El Pb(II) tiene una fuerte afinidad por los adsorbentes inorgánicos, en la mayoría de las aguas naturales una fracción significativa de Pb(II) se encuentra asociado con Fe_2O_3 hidratado a $\text{pH} > 7$. La concentración de Pb(II) en aguas de bebida va desde $0,005 - 0,05 \mu\text{mol L}^{-1}$,⁴² pero puede ser mayor en algunos casos por el Pb(II) proveniente de las cañerías de Pb(II) o soldaduras de Pb(II). En la mayoría de los países del mundo la ingesta de Pb(II) a través del agua de bebida es baja, por debajo de $0,05 \mu\text{mol día}^{-1}$, pero la contaminación puede ser mayor en zonas con aguas débilmente ácidas y cañerías de Pb(II).

La ingesta de Pb(II) proveniente de la dieta varía entre $0,5 - 1,5 \mu\text{mol día}^{-1}$.⁴³ Los contenidos de Pb(II) en los alimentos se miden en $\mu\text{mol Kg}^{-1}$ de peso fresco: leche y huevos, $0,05 - 0,8$; carnes, $0,2 - 1,2$; vegetales, $0,1 - 0,7$; frutas, $0,05 - 0,1$; pescados, $0,3 - 1,9$. En general los alimentos tienen contenidos de Pb(II) superiores a los establecidos como límites.⁴⁴

1.6.3. Fisiología del plomo

Las principales fuentes de ingreso del Pb(II) al organismo son el aire inhalado, alimentos y el agua de bebida.

En la mayoría de los países el Pb(II) proveniente de la dieta se encuentra por debajo de $0,5 \mu\text{mol/día}$ de los cuales aproximadamente el 10% es absorbido desde el tubo gastrointestinal. El Fe, Ca y P reducen la absorción de Pb(II), mientras que las dietas pobres en Zn, ácido ascórbico y ácido cítrico favorecen su absorción. Otros factores que también estimulan la absorción del Pb(II) son la ingesta de alcohol, úlcera péptica, etc.

Altas exposiciones al Pb(II) se evidencian por una reducción en la concentración de Ceruloplasmina en sangre.

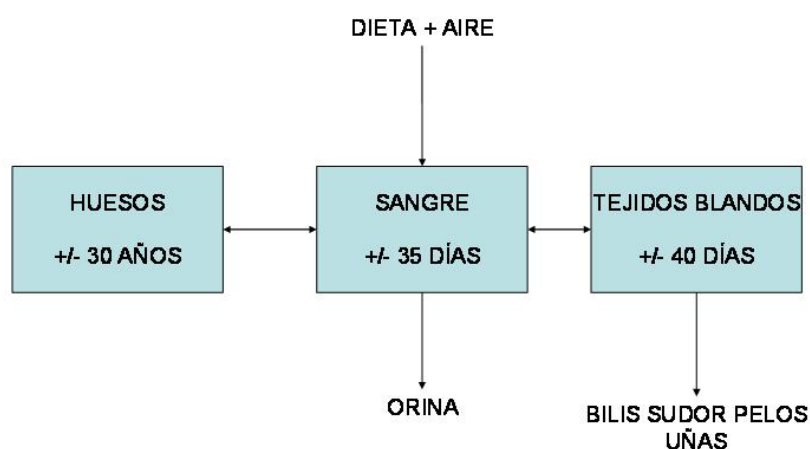


Figura 1.2. Distribución del Pb(II). Modelo de los tres compartimentos en el organismo humano. Puede verse la vida media del Pb(II) en cada uno de ellos.

El Pb(II) luego de ser absorbido pasa a la sangre donde casi inmediatamente es transferido a los eritrocitos, formando complejos con la hemoglobina, quedando aprox. Solo un 6% en plasma. Parte del Pb(II) de los eritrocitos se asocia con la membrana y el resto es complejado por la hemoglobina. Se ha sugerido que solo el Pb(II) difusible, disuelto en el plasma es el que produce los efectos tóxicos, ya que éste es el que puede ser transportado a través de las membranas celulares.

Desde la sangre el Pb(II) es transportado a los tejidos blandos, huesos y dientes. La distribución a los tejidos blandos varía dependiendo del tejido. Así por ejemplo las concentraciones en hígado, riñón y cerebro son 0.29 – 0.77, 0.17 – 0.47 y 0.02 – 0.07 $\mu\text{mol/g}$ respectivamente.⁴⁵ El Pb(II) es acumulado en el sistema nervioso donde la concentración es mayor en los nervios periféricos, que en el sistema nervioso central⁴⁶. El 95% del Pb(II) sanguíneo está unido a los eritrocitos. La vida media del Pb(II) en el torrente sanguíneo es de 35 días, pero pueden existir grandes variaciones individuales.

El esqueleto es quien contiene la gran mayoría (80-90%) del Pb(II) almacenado en el organismo. La vida media del Pb(II) en el hueso es de 20 a 30 años. Una parte del Pb(II) depositado a nivel óseo (tejido óseo trabecular) se encuentra en forma inestable, y por tanto fácilmente movilizable en determinadas condiciones (acidosis, descalcificación) y en equilibrio con la sangre. El resto queda almacenado (tejido óseo compacto) y va aumentando progresivamente a medida que continúa la exposición.

Tanto los tejidos blandos como la sangre constituyen las unidades de intercambio activo, mientras que el esqueleto constituye la unidad de almacenamiento o de intercambio lento

El Pb(II) absorbido se excreta principalmente por la orina y secreciones gastrointestinales. Orina 76%; secreciones gastrointestinales 16%; pelo, uñas, sudor y otros 8%. El Pb(II) también puede ser excretado a través de la leche materna en niveles de alrededor de $0.013 \mu\text{mol L}^{-1}$. Parte de los compuestos orgánicos formados por el Pb(II) son metabolizados hasta Pb(II) inorgánico.⁴⁷

1.6.4. Acción patológica:

El Pb(II) inorgánico inhibe las enzimas responsables de la síntesis del grupo hemo. Inhibe la enzima δ -ácido aminolevulínico deshidrogenasa (ALA-D), la cual cataliza la formación de porfirinógeno a partir del ácido δ -aminolevulínico (ALA), y la síntesis del grupo hemo, el cual incorpora Fe en la protoporfirina IX. Esta acción del Pb(II) produce la acumulación de ALA, coproporfirina, Zn protoporfirina (ZPP) en sangre y por ende aumenta la excreción de los metabolitos de éstos en orina. Estos cambios enzimáticos pueden utilizarse para realizar monitoreos biológicos de la exposición al Pb(II).⁴⁸

La respuesta renal a una exposición prolongada al Pb(II) se caracteriza por una nefritis crónica, el daño es principalmente tubular, si bien puede afectar también al glomérulo. Generalmente se presenta con aminoaciduria, glucosuria y fosfaturia, con daño crónico irreversible. La posibilidad de daño renal tardío puede darse incluso en condiciones de exposición moderada⁴⁹.

El Pb(II) inorgánico es también un sustituyente muy efectivo del Ca por lo que influencia también todos los procesos Ca-dependientes: (1) intercambio de Ca en las células de la médula ósea. (2) bomba de Ca y Ca-ATPasa en los eritrocitos humanos. (3)

Canales de Ca en mitocondrias. (4) procesos Calmodulina dependientes. (5) proteína complejante en el intestino.⁵⁰ (6) permeabilidad Ca dependiente al Potasio en los eritrocitos.⁵¹

Los efectos neurotóxicos del Pb(II) se sugirieron que son debidos a la capacidad de activar la proteínquinasa Ca sensible, responsable de la regeneración de la concentración de Ca en la unión sináptica, ya sea por interacción directa con la enzima o por activación de la Calmodulina la cual produce cambios enzimáticos.⁵²

En la intoxicación aguda se pueden observar diferentes síntomas, a nivel gastrointestinal se produce un cuadro característico llamado cólico saturnino. A nivel de sistema nervioso se produce encefalopatía saturnina con convulsiones y coma que conduce a la muerte en dos o tres días. Sin embargo en la actualidad es muy difícil observar intoxicaciones agudas en nuestro medio.

¹ Villee, Claude A., “*Biología*”, (1998), 4º ed., Editorial Interamericana, Cap.6, 89

² Templeton D. M., Freek A., Cornelis R., D. Lars-Goran, M. Herbert, P.V. Herman and V. Ryszard Lobinsky, “*Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches*”, IUPAC Recommendations, Pure Appl. Chem, (2000) 72, 1453

³ Caroli, S. ed., “*Element Speciation in Bioinorganic Chemistry*”, (1996) John Wiley & Sons

⁴ Batley, G.E. Ed., *Trace Element Speciation. Analytical Methods and Problems*, (1989) CRC Press, Boca Raton, FL

⁵ M. Bernhard, F. E. Brinckman & P. J. Sadler. “*The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes*”, (1986) Springer Verlag, Berlin

⁶ Tessier, A. & Turner, D.R. eds., “*Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*”, (1995) John Wiley and sons

⁷ Salomons, W., Förstner, U. & Mader, P. eds., “*Heavy metals. Problems and solutions*”, (1995) Springer-Verlag

⁸ Ure, AM. & Davidson, CM. ed., “*Chemical Speciation in the Environmental*”, (1995) Blackie Academic & Professional.

⁹ Buffle, J., “*Complexation reactions in aquatic systems. An analytical approach*”, (1987) Ellis Hoorwood.

- ¹⁰ Braman, Robert S., “*Analytical Aspects of Environmental Chemistry*”, (1983) John Wiley & Sons INC., Cap. 1, 2
- ¹¹ Aub, J. C., Fairhall, L. T., Minot, A. S. and Reznikoff, K., *Medicine*, (1925) 4, 1.
- ¹² Weast, R. C., *CRC “Handbook of Chemistry and Physics”*, (1986) CRC Press, Boca Raton
- ¹³ Albert, L., “*Curso básico toxicología ambiental*”, (1990) Editorial Limusa
- ¹⁴ Mackay, K. M. and Mackay, R. A., *Introduction to Modern Inorganic Chemistry*, (1996) 5th edition Intertext Books, London, 94
- ¹⁵ Adriano, D. C., “*Trace elements in the terrestrial environment: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals*”, (1986) Springer-Verlag
- ¹⁶ IRIS. 1999. *Cadmium and compounds (CAS N° 7440-43-9) – Integrated Risk Assessment System* – (1999) Washington D. C
- ¹⁷ Goodman, L. S. and Gelman, A., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, (1955) 2nd edition, Mamillan, New York.
- ¹⁸ Giuffre de Lopez Camelo, L., Ratto de Miguez, S. & Marbán, L. *Sci. Total Environ.* (1997) 204, 245
- ¹⁹ World Health Organization. *Cadmium – Environmental Aspects*. (1992), Environmental Health Criteria, N° 135
- ²⁰ Thornton, I. In “*Cadmium in the Human Environment*”, (1992) IARC, Lyon, 169
- ²¹ Herber, R.F.M. “*Cadmium in: Handbook on Metals in clinical and analytical chemistry*” (1994) Sigel, A. & Sigel, H. Eds. Marcel Dekker Inc. New York, 238
- ²² Firberg, L., Kjelsstrom, T. and Nordberg, G. F., *Handbook on the Toxicology of Metals*, (1986) Elsevier, Amsterdam, 130
- ²³ Muntau, H. and R. Baudo, “*Cadmium in the Human Environment*”, (1992) Lyon, 133
- ²⁴ Hill, C. H., Matrone, G., Payne, W. L. and Barker, W. C., *J. Nutr.*, (1963) 80, 227
- ²⁵ Axelsson, B. and Piscator, M., *Arch. Environ. Health*, (1966) 12, 374
- ²⁶ Jacobs, R. M., Spivey-Fox, M. R. and Aldridge, M. H., *J. Nutr.*, (1969) 99, 119
- ²⁷ Cotzias, G. C. and Papavasiliou, P. S., *Amer. J. Physiol.*, (1964) 206, 287
- ²⁸ Klaassen, CD. & Liu J., *Environ. Health Perspec.* (1998) 106, 297
- ²⁹ Madden, EF & Fowler, BA., *Drug. Chem. Toxicol.* (2000) 23, 1
- ³⁰ Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G. F. and Kjelsstrom, T., *Cadmium in the Environment*, (1974) 2nd edition, CRC Press, Cleveland.

- ³¹ Kjelstrom, in “*Effects and Dose-Response Relationships of Toxic Metals*”, (1976) ed. G. F. Nordberg, Elsevier, Amsterdam, 36, 275
- ³² Jarup, L., Berlund, M. Elinder, CG., Nordberg, G. & Vahter, M., *Scand. J. Work Environ. Health* (1998) 24, 1.
- ³³ Taillefert, M., Lienemann, C., Gallard J.F. & Perret D., *Geochem. Et. Cosmochim. Acta*, (2000) Elsevier science, 64, 169
- ³⁴ Odum, H. T. eds., “*Heavy Metals in the Environment*”, (2000) CRC Press
- ³⁵ Weast, R. C., *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, (1986) CRC Press, Boca Raton
- ³⁶ Batley, Graeme C., *Handbook of Trace Elements Speciation: Analytical Methods*, (1991) CRC Press, Boca Raton
- ³⁷ Apostoli P, Alessio L. “*Il piombo negli anni 90: «Nuove» regole per il più «vecchio» dei tossici ambientali?*”. *Med Lav* (1992) 83(6): 539-56
- ³⁸ Moore, J.W. & Ramamoorthy, S., “*Heavy metals in natural waters*”, (1984) De Santo, R. S. ed., Springer Verlag, 28(4), 263
- ³⁹ “*Non-Ferrous Metal Data 1991*”, (1991) American Bureau of Metal Statistics
- ⁴⁰ Especificaciones actuales de naftas comerciales en Argentina. *Tendencias y comparaciones con Latinoamérica, Europa y Estados Unidos* (1998)
- ⁴¹ Casteel, W., Weis, CP., Henningsen, GM. & Brattin, WJ., *Environmental Health Perspectives*, (2006) 114, 8
- ⁴² WHO, *Inorganic Lead. Environmental Health Criteria 165* (1995) Geneva
- ⁴³ Tsuchia, K., in *Handbook on the Toxicology of Metals*, (1986) Elsevier, Amsterdam, Vol. 2, 288.
- ⁴⁴ Christensen, J. M. and Kristiansen, J., in *Handbook in Metals in Clinical and Analytical Chemistry*, (1994) Marcel Dekker Inc., 35, 425
- ⁴⁵ Moore, M. R., in “*Lead Toxicity: History and Environmental Impact*”, (1986) Johns Hopkins, University Press, Baltimore, 54
- ⁴⁶ Alessio L, Foa V. “*Human biological monitoring of industrial chemicals series. Lead*”. (1983) Commission of the European Communities
- ⁴⁷ Schramel, P., Hasse, S. and Ovcár-Pavlu, *Biol. Trace Elements Res.*, (1988) 15, 111
- ⁴⁸ Moore, M. R. and Goldberg A., “*Dietary and Environmental Lead: Human Health Effects*”, (1985) Elsevier, Amsterdam, 261

⁴⁹ Balbus-Kornfeld, J., Steward, W., Bolla, K. & Schwartz, B., *J. Environ. Med.* (1995) 52, 2

⁵⁰ Rattner, B. A., Burton, . A. and Hoffman, D. J., “*Handbook of Ecotoxicology*”, (2000), 2nd edition, 450

⁵¹ Simons, J. T. B., *Med. Bull.*, (1986) 42, 431

⁵² Markovac, J. and Goldstein, G. W., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, (1988) 96, 14

CAPITULO II

2. *Espectrofotometría en Fase Sólida*

2.1. *Definición de espectrofotometría en fase sólida*

La Espectrofotometría en Fase Sólida (SPS – Solid Phase Spectrophotometry^{1,2}) es una técnica basada en la preconcentración de un analito, formando un compuesto cromogénico o no, sobre un sustrato sólido (resina de intercambio o adsorción) y medición de la absorbancia del compuesto coloreado directamente sobre la fase sólida. Este proceso permite obtener mayor sensibilidad y precisión que los métodos de absorción molecular en solución³.

2.1.1. *Breve reseña histórica*

La Espectrofotometría en Fase Sólida surge como intento de aplicación al análisis cuantitativo de los fundamentos de los “resin spot tests”. A pesar de los numerosos trabajos sobre este tema (resin spot tests) publicados, desde el año 1954, en el que Fujimoto⁴ propusiera la referida técnica de microanálisis cualitativo, en ninguno de ellos se hizo un intento de cuantificación del analito y tuvieron que pasar más de dos décadas hasta que en 1976 Kazuhisa Yoshimura² diera a conocer los primeros métodos de determinación cuantitativa basados en la medida directa de la absorbancia de la especie coloreada sorbida en fase resina, que él llamó Colorimetría de Cambio Iónico y que más ampliamente debemos denominar Espectrofotometría en Fase Sólida (EFS).

Una gran ventaja de la EFS respecto a la Espectrofotometría convencional radica en el notable incremento de sensibilidad que ofrece, pues la misma es función del volumen de muestra a analizar⁵. Con volúmenes de muestra de 1 L, que son de frecuente empleo en EFS⁶, se pueden alcanzar coeficientes de absorción molar aparente del orden de $10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ lo que supone sensibilidades del orden de $10^3 - 10^4$ veces mayores⁷ (con la EFS) que con la Espectrofotometría convencional, pudiendo cuantificarse niveles de concentración inferiores a $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$. Se ofrece así la posibilidad de determinación de elementos vestigios por Espectrofotometría sin que sea obligado el empleo de una preconcentración del analito, tal como se requiere en la Espectrofotometría convencional. Otras ventajas de la EFS son la buena selectividad

que se alcanza (al combinar la naturaleza de los reactivos y la fijación sobre un soporte sólido) y el bajo costo de la técnica.

Asimismo, también se han ampliado las posibilidades con el empleo por ejemplo de técnicas quimiométricas derivativas y se han abierto nuevos horizontes con técnicas similares como la Espectrofluorimetría en Fase Sólida⁸, la Espectrofotometría de Cambio Iónico por Reflectancia Difusa⁹ y la aplicación del sistema de Inyección en Flujo Continuo¹⁰ (FIA) a la EFS

2.2. Tipos de soportes

Todo intercambiador iónico esta compuesto por dos partes, una de naturaleza orgánica o inorgánica, que constituye el esqueleto y la otra formada por grupos intercambiadores de iones (grupos funcionales). Dichos grupos funcionales se encuentran soportados por el esqueleto. Existe gran variedad de productos sintéticos y naturales que muestran propiedades de cambio iónico¹¹.

De entre todos ellos, consideraremos sólo aquellos que han sido empleados en EFS y que podemos clasificar en¹²:

- a) Polímeros de estireno.
- b) Polímeros del dextrano.

2.2.1. Polímeros de Estireno.

Los polímeros de cambio iónico más importantes hoy en día son aquellos basados en el poliestireno. Están constituidos por una matriz hidrofóbica formada por cadenas lineales de poli estireno unidas entre sí por puentes de divinilbenceno (tipo Dowex 1, Dowex 50W, etc), formando una malla tridimensional elástica que presenta suficiente estabilidad física y química en diferentes condiciones. Estas pueden ser representadas así:

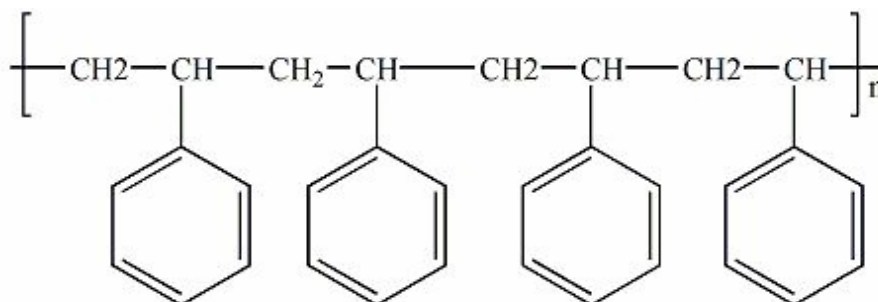


Figura 2.1. Estructura del esqueleto de estireno

Unidos a los anillos aromáticos se hallan grupos funcionales iónicos tales como:



en intercambiadores catiónicos y



en intercambiadores aniónicos.

Son materiales porosos y poseen grupos hidrófilos, por lo que son afectados por las características del medio de reacción (Ej: pH, constante dieléctrica, etc) y al ponerlos en suspensión en agua o cualquier disolvente polar, lo absorben en su interior, se hinchan y se convierten en “geles”. El grado de entrecruzamiento (relacionado directamente con el porcentaje de DVB) determina el tamaño de los microporos de la matriz, la capacidad de hinchamiento y la movilidad de los contra-iones en la resina. Esta última determina a su vez la velocidad del proceso de cambio iónico.

Las resinas microporosas no pueden emplearse cuando lo que interesa es fijar una muestra compleja, de naturaleza orgánica. Es necesario en estos casos recurrir a las resinas macro porosas o reticulares” que poseen una gran superficie interna y permiten

un acceso más fácil de las moléculas reaccionantes y por tanto un cambio iónico más rápido que los polímeros convencionales tipo “gel”.

3.2.2. Polímeros del Dextrano.

Son polisacáridos que se obtienen entrecruzando dextrano con epiclorhidrina. Son absorbentes polares con grupos no iónicos. Pueden introducirse grupos funcionales iónicos obteniéndose cambiadores iónicos con carácter ácido fuerte (Sephadex SE y SP) y ácido débil (Sephadex CM), base fuerte (Sephadex GE, TEAE, QAE) y base débil (Sephadex DEAE, AE, ECTEOLA). La utilidad de estos cambiadores dependerá en gran medida del pH. El esqueleto del polisacárido puede ser representado de la forma siguiente:

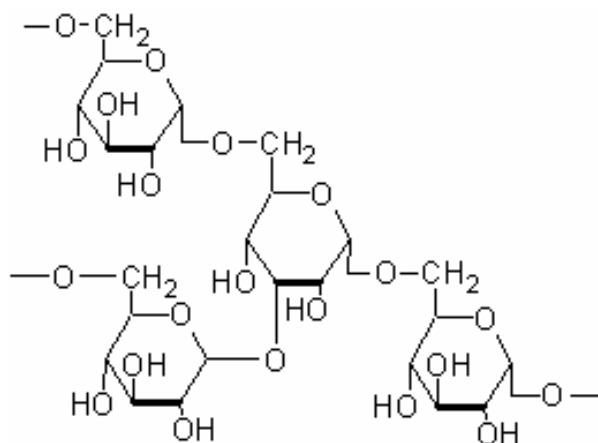


Figura 2.2. Estructura del esqueleto del dextrano

Aparte de los soportes de cambio iónico comentados anteriormente se pueden usar en EFS otro tipo de soportes, las resinas absorbentes constituidas por cadenas de poliestireno entrecruzadas mediante moléculas de DVB (al igual que las resinas tipo Dowex), pero carentes de grupos funcionales cambiadores de iones (otro tipo, menos frecuente, está fabricado a base de acrilato). Bien conocidas son las resinas macro porosas tipo Amberlita XAD. Estas resinas son materiales porosos por lo que, al igual que las del tipo Dowex, se afectan por las características del medio de reacción, aunque no tanto como aquellas. Las resinas absorbentes son capaces de retener gran cantidad de reactivos aromáticos por absorción; de este modo los grupos activos de dichos reactivos

quedan libres y éstos no pierden su capacidad de complejación. No obstante, su alta opacidad en toda la región del Visible (y UV) limita fuertemente su uso en EFS.

Su obtención se lleva a cabo realizando la polimerización estireno-DVB en presencia de un disolvente orgánico como el tolueno, apropiado para disolver los monómeros pero no para el polímero. Estas resinas macro porosas son muy útiles para su uso en disolventes no polares, en los que las resinas de cambio iónico ordinarias apenas se hinchan y el cambio iónico es por tanto lento. Su uso es frecuente en la industria, debido a que son fácilmente regenerables.

2.3. Procedimiento para el desarrollo del color

Podemos distinguir tres formas de desarrollar el color en el soporte sólido, que dependerán de la naturaleza del analito, del reactivo cromogénico, del pH y de otros factores:

1) Fijación del analito en el soporte sólido desde la disolución muestra seguida por la reacción de éste último con el agente cromogénico. Este procedimiento puede aplicarse cuando el reactivo posee una selectividad baja por el analito. Es el caso de la determinación de cinc con zincón o de ferricianuro por formación del azul Turnbull P. No obstante, este procedimiento ofrece el inconveniente de requerir dos equilibraciones sucesivas en su ejecución.

2) Fijación del reactivo en el soporte sólido seguida por la reacción del mismo con el analito. Este procedimiento se aplica en los casos en los que la especie compleja coloreada no puede ser fijada directamente sobre el soporte sólido. La fijación del reactivo sobre el soporte debe ser irreversible, comportándose éste último como una resina quelante. Se ha determinado así cobre con zincón y níquel con PAN.

3) La reacción entre analito y reactivo tiene lugar en la disolución y posteriormente el producto de la reacción se fija sobre el soporte sólido. Este procedimiento es el más ampliamente usado. Requiere que el complejo formado pueda fijarse sobre el cambiador. Es el caso de la determinación de cromato con difenilcarbazida uranio(VI) con tiocianato amónico vanadio con PAN y Fe(III) (Ac. ascórbico como reductor) con ferrozina.

2.4. Medida de la absorbancia en espectrofotometría en fase sólida

La absorbancia de la fase sólida con la especie fijada, a una determinada longitud de onda, A_T , es suma de varias contribuciones¹³:

$$A_T = A_E + A_{sol} + A_{Res} + A_{Reac}$$

siendo:

A_E : Absorbancia debida a la especie sorbida a la resina

A_{sol} : Absorbancia correspondiente a la disolución intersticial que queda entre los granos de resina.

A_{Res} : Absorbancia de fondo debida a la resina.

A_{Reac} : Absorbancia correspondiente a los reactivos fijados en la resina, en el caso de que éstos absorban a la longitud de onda de medida.

La absorbancia de la disolución intersticial, A_{sol} , puede ser despreciada cuando los coeficientes de distribución de los componentes de la muestra son muy altos, lo que suele ocurrir normalmente.

Por otra parte, los valores de A_E , A_{Res} y A_{Reac} (y en consecuencia de A_T) son afectados por el empaquetamiento de los granos de resina en la celda. Es por esto que el valor de la absorbancia correspondientes a la especie sorbida en la resina, no puede ser obtenido por medida de la absorbancia a la longitud de onda del máximo de absorción frente a un blanco de resina preparado en iguales condiciones pero exento de analito.

No obstante, si la medida de la absorbancia se realiza a dos longitudes de onda, correspondiendo una al máximo de la especie, λ_E , y otra situada en una región en la que sólo absorbe la resina, λ_R , (700 – 800 nm), la diferencia de absorbancia, $\Delta A = A_{\lambda E} - A_{\lambda R}$ se mantendrá constante bajo las condiciones de empaquetamiento similares.

Además, si la absorbancia del blanco de resina, que viene dada por:

$$A_B = A_{B,sol} + A_{B,Res} + A_{B,Reac}$$

se mide a estas mismas dos longitudes de onda (λ_E y λ_R), la diferencia de absorbancia, $\Delta A_B = A_{\lambda_{EB}} - A_{\lambda_{RB}}$, se mantendrá igualmente constante bajo similares condiciones de empaquetamiento.

Por tanto, la absorbancia neta de la especie, A_{Neta} (que está relacionada con la concentración del analito en la disolución) puede obtenerse a partir de la ecuación siguiente:

$$\Delta A - \Delta A_B = \left| A_E + (A_R + A_{Reac}) - (A'_R + A'_{Reac}) \right| - \left| (A_{B,ResE} + A_{B,Reac}) - (A'_{B,Res} + A'_{B,Reac}) \right| = A_{Neta}$$

Donde las absorbancias A'_x son las correspondientes a la longitud de onda λ_R donde no absorbe el complejo). La figura siguiente ilustra los términos anteriormente usados:

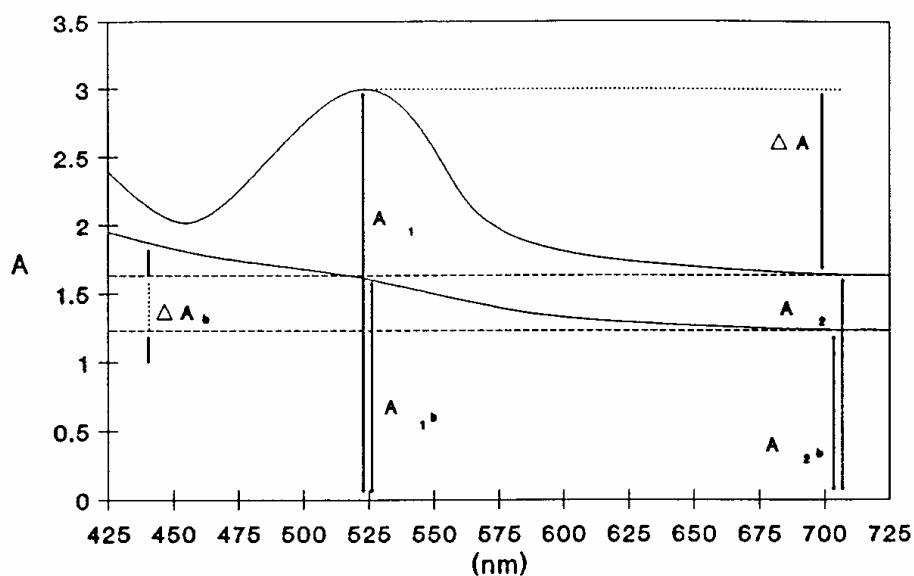


Figura 2.3. Diferentes contribuciones a la absorbancia de un sistema de espectrofotometría en fase sólida

¹ Yoshimura, K., Waki, H. and Ohashi, S., *Talanta* (1976) 23, 449.

² Capitán García, F., Capitán Vallvey, L. F., Valencia, M. C., Bosque Sendra, M. C., Molina, F. and Orbe de I., *Analisis* (1991) 19, 177.

³ Ibrahim Narin and M. Soylak, *Talanta*. (2003) Vol. 60, Issue 1, 215 – 221.

⁴ Fujimoto, M., *Bull. Chem. Soc. Japan*. (1954) 27, 48.

⁵ M.L. Fernandez-de Córdova, A. Molina-Díaz, M.I. Pascual-Reguera and L.F. Capitán-Vallvey, *Fresenius J. Anal. Chem.*(1994) 348, 1668.

⁶ K. Yoshimura, H. Waki, *Talanta* (1985) 32, 345.

⁷ Fernandez de Cordova, M. L., Ruiz Medina, A. and Molina Díaz, A., *J. Anal. Chem.* (1997) 357, p. 44 – 49.

⁸ Capitán, F., Manzano, E., Vilchez J.L. and Capitán-Vallvey, L.F. *Anal. Sci.* (1989) 5, 549–555.

⁹ Ghauch, A., Turnar, C., Fachinger, C., Rima, J., Charef, A., Suptil, J. and Martin-Bouyer, M., *Chemosphere* (2000) 40, 1327-1333.

¹⁰ Ruiz-Medina, A., Fernández de Córdova, M.L. and Molina-Díaz, A. *Eur. J. Pharm. Sci.* (2001) 13, 385–391.

¹¹ Marhol, M. “*Ion Exchangers in Analytical Chemistry: Their Properties and Use in Inorganic Chemistry*”, (1982) vol. XIV, Wilson and Wilson’s, Elseiver.

¹² Johann Korskich, Ph. D., “*Handbook of Ion Exchange Resins: Their Application to Inorganic Analytical Chemistry*” (1989) vol 1, CRC Press

¹³ A. Molina-Diaz, J.M. Herrador-Mariscal, M.I. Pascual-Reguera and L.F. Capitán-Vallvey, *Talanta* (1993) 40, 1059.

CAPITULO III

3.1. Especiación de Metales Pesados en Aguas de Río

3.1.1. Constituyentes de las aguas naturales

La naturaleza de los compuestos orgánicos e inorgánicos que pueden estar presentes en una muestra de agua, resulta de un complicado proceso de producción y degradación de biomasa terrestre y acuática, erosión de rocas y lixiviados de los terrenos, adsorción sobre partículas suspendidas, actividad química, biológica y entrada por aerosoles. La composición de estos sistemas químicos es muy sensible y se encuentra formada por:

3.1.1.1. Constituyentes inorgánicos

La concentración de macroconstituyentes inorgánicos es muy diferente en varios tipos de aguas según si son de río, de lagos o agua de lluvia. El agua de mar es la única que puede considerarse con una composición prácticamente constante en todo el mundo, salvo el caso de mares cerrados, en los que la salinidad, generalmente, se ve aumentada.

3.1.1.2. Constituyentes orgánicos

La materia orgánica en aguas naturales se debe a la presencia de organismos vivos, en particular los exudados de algas (numerosos polipéptidos y polisacáridos) y también debido a la contaminación.

Gran parte de esa materia orgánica está constituida por sustancias húmicas en las aguas naturales. La materia húmica proviene de la descomposición de organismos y se trata de una mezcla de polímeros orgánicos con grupos hidrofóbicos y grupos cargados hidrofílicos, que le otorgan características polielectrolíticas y polifuncionales. Operacionalmente se los puede dividir en tres diferentes fracciones que corresponden a sus diferentes pesos moleculares y complejidad: *húmico* (fracción no soluble), *ácidos húmicos* (que precipitan a valores bajos de pH) y *ácidos fúlvicos* (fracción soluble). En solución esta sustancia se puede encontrar en estado libre o asociado, por ejemplo con

aminoácidos como la glicina, ácido aspártico, alanina, serina, ácido glutámico y fracciones menores de la descomposición de organismos.

3.1.1.3. *Material particulado y coloides*

La adsorción de cationes y aniones en los óxidos de metales es considerada una reacción de coordinación (reacciones de superficie) en la que protones o iones oxidrilo son removidos de la superficie de la partícula. Por ello las fuerzas electrostáticas y los aspectos químicos juegan un importante papel en estos procesos, tales como competición entre el solvente y otras moléculas en solución por la superficie.

Las cargas eléctricas de las superficies de cada partícula, forman una doble capa alrededor que previene la floculación de las partículas coloidales. Una disminución de esta doble capa como puede presentarse cuando hay un aumento de la salinidad (la que comprime la doble capa por neutralización de cargas), puede hacer disminuir el porcentaje de materia suspendida por el proceso de agregación. Algunas macro moléculas, polielectrolitos, e iones de gran carga (ej: Fe(III) y Al(III)) tienen una gran afinidad por grupos de superficie dadores de oxígeno y en consecuencia una fuerte tendencia a producir agregaciones, desestabilizando así los coloides y aumentando la floculación o coagulación. Por otro lado, hay coloides que son estabilizados por formación de films orgánicos, como en el caso de los coloides de óxidos de Fe(III) que generalmente se encuentran cubiertos por sustancias húmicas en las aguas naturales.

3.1.2. **Origen y transporte de metales pesados en aguas**

Tanto la atmósfera como los ambientes acuáticos son ambientes fluidos con numerosas propiedades en común. El transporte y dispersión de contaminantes en el ambiente acuático se encuentra controlado por la convección (Movimiento de masa) y mezcla o difusión (sin movimiento del agua)¹.

Al igual que en la atmósfera el movimiento vertical de agua en los ambientes acuáticos también se encuentra restringido. En los grandes cuerpos de agua esto se debe a la estratificación, causada por las diferentes capas que se forman con diferentes temperaturas, salinidad o densidad, sin embargo en los ríos este fenómeno se encuentra limitado por la escasa profundidad. Así también en los cuerpos de agua los contaminantes tienden a acumularse en los sedimentos del fondo.

Como consecuencia de la similitud de factores físicos de los fluidos, que gobiernan la dispersión de poluentes en la atmósfera y en cuerpos de agua, ambos utilizan la ecuación Gaussiana. Para los ríos, el modelo simple de disminución exponencial de la concentración desde el punto de contaminación puede aplicarse:

$$C_x = C_0 e^{-Kt}$$

donde C_x es la concentración en el punto x , C_0 es la concentración en el punto de descarga, K es la velocidad de disminución de la concentración y t es el tiempo que transcurre desde el punto 0 hasta el punto x de medida. Otros modelos de estudios de el movimiento de los contaminantes en ríos, consiste en dividir el curso del río en diferentes secciones y considerar a cada una como una serie de tanques de agitación, uno a continuación del otro. El mecanismo de dispersión es el agregado de una “zona muerta” que corresponde a la zona entre dos puntos de muestreo, el modelo es una combinación entre el de los tanques de agitación y un factor que cuantifica el componente de dispersión².

Los metales pesados se encuentran en el aire en forma particulada o como aerosoles y están presentes en los sistemas acuáticos naturales en diversas formas químicas. Se puede esquematizar el ciclo hidrológico de transporte resumido (Salomons and Förstner³) cuya gráfica se muestra en la figura 4.1. Poseen, principalmente, tres modos de acceso al medio acuático. La vía atmosférica, debida a la sedimentación de partículas emitidas hacia la atmósfera por procesos naturales o antropogénicos (principalmente combustión de combustibles fósiles y procesos de fundición de metales). La vía terrestre, producto de filtraciones de vertidos, del escurrimiento superficial de terrenos contaminados (minas, utilización de lodos como rellenos, lixiviación de residuos sólidos, precipitación atmosférica, etc.) y otras causas naturales. La vía directa es debido a los vertidos directos de aguas residuales industriales y urbanas. Los metales pesados se originan en fuentes naturales o antropogénicas. En un sistema no perturbado por el hombre, el origen natural del contenido de elementos metálicos depende inicialmente de la composición de la roca madre originaria y de los procesos de desgaste climático o erosión sufridos por los materiales que constituyen el terreno. La acción de los factores medioambientales es

determinante de las diferentes concentraciones o niveles de fondo o de base (“background”) de metales pesados. Como ya se ha mencionado las diferencias en la composición físico-química de las aguas como el tamaño de las partículas, distribución y mineralogía afectan a las concentraciones de los metales pesados de origen natural. Una alta concentración de metales en sedimentos puede resultar en ciertos casos de su material geológico sin que haya sufrido una contaminación puntual.

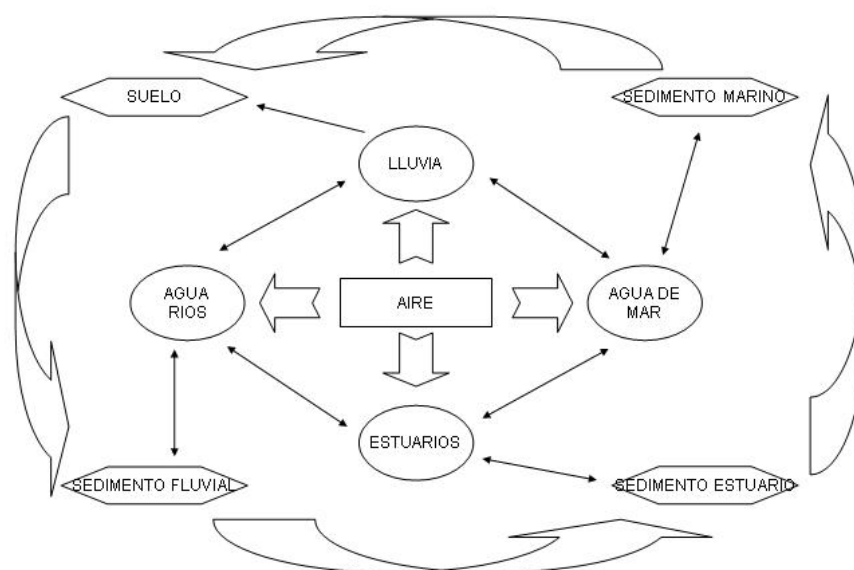


Figura 3.1. Ciclo hidrológico de los metales pesados³.

Se entiende por contaminación de origen antropogénico la proveniente de la intervención humana en el ciclo biogeoquímico de los metales pesados. El uso de los metales pesados ha ido aumentando paralelamente al desarrollo industrial y tecnológico. Actualmente es difícil encontrar una actividad industrial o un producto manufacturado en los que no intervenga algún metal pesado. La tendencia actual, aunque lenta, es sustituir progresivamente en la industria, algunos metales pesados potencialmente tóxicos por otros materiales más inocuos⁴.

Las principales fuentes de metales pesados en los sistemas acuáticos son las actividades industriales. Con frecuencia, los vertidos de aguas residuales o efluentes industriales no son sometidos a procesos de depuración o tratamiento. Son de

importancia también las descargas de la actividad agrícola, que se producen por la lixiviación de áreas cultivadas afectadas por el uso de pesticidas, fertilizantes y otro tipo de abonos que contienen metales pesados. Los contaminantes metálicos de origen ganadero son producidos por desechos de animales que han ingerido metales pesados (Cu y Zn) como suplementos dietarios. Entre las fuentes antropogénicas de metales pesados cabe destacar las de origen doméstico, como las descargas cloacales y los lixiviados que pueden producirse a partir de depósitos de residuos urbanos.

El quemado de combustibles fósiles y las emanaciones gaseosas de los automotores producen partículas que contienen metales pesados y que por precipitación llegan a los sistemas acuáticos.

3.1.3. Diferentes tipos de especies que pueden formar los metales en aguas naturales

Las diferentes especies que pueden formar los metales pesados en aguas naturales pueden clasificarse en los siguientes grupos⁵:

a) *Iones metálicos libres*: ($\text{Cu}^{2+}_{\text{aq}}$, $\text{Pb}^{2+}_{\text{aq}}$) en general los metales pesados que se encuentran en su forma de iones libres son muy tóxicos para los organismos vivos. Los iones libres, como el Cd^{2+} por ejemplo, son muy tóxicos para especies unicelulares de algas, probablemente porque éste forma complejos con ligandos que se encuentran en la superficie de la membrana celular, bloqueando así el primer paso de asimilación, esto hace posible que se produzca un cambio en la química de coordinación dando lugar a cambios intracelulares.

b) *Complejos Inorgánicos*: (CdCl_2 , PbCO_3) En general los metales pesados tienen una menor toxicidad para la microbiota cuando el agua es dura y alcalina, en cuyo caso los componentes mayoritarios son: Ca^{2+} , Mg^{2+} y CO_3^{2-} . Ocasionalmente no queda claro en la literatura cual tipo de complejo es más tóxico que otro, además de que esto es proporcional a la concentración de metal libre, generalmente se determina ésta frente a un exceso de ligando.

c) *Compuestos Organometálicos de Bajo Peso Molecular*: (alquil-compuestos, Metal-S-R, Metal-OOC-R) La presencia de ligandos orgánicos naturales en las aguas

naturales, pueden producir un cambio total en la distribución de las diferentes fracciones. Por ejemplo, los exudados orgánicos de un determinado microorganismo que acompleje fuertemente los metales pesados contribuyendo así a la disminución de la toxicidad de éstos en el ecosistema, tal es el caso de la especie de alga *Selenastrum capricornutum*.

Los alquil-compuestos son mucho más tóxicos, debido a su liposolubilidad lo que le permite atravesar las diferentes membranas biológicas. Por ejemplo los aerosoles emitidos por los automóviles son muy ricos en alquil-Pb, los que entran en los pulmones en la respiración y pasan directamente al flujo sanguíneo.

d) *Complejos Orgánicos con Peso Macromolecular*: (Metal-lípidos, Metal-Ac. Húmicos, Metal-polisacáridos) La complejación de los metales pesados con moléculas orgánicas de alto peso molecular, reducen generalmente la toxicidad de éstos para la biota, debido a que estos complejos no pueden pasar las membranas biológicas con facilidad debido a su gran tamaño.

e) *Especies Metálicas que forman coloides suspendidos*: ((FeO)OH, Fe(OH)₃, Ag₂S y CuS) En general el producto de solubilidad de las diferentes especies en aguas naturales no es alcanzado. Sin embargo el Fe y Mn en aguas oxigenadas se encuentran principalmente como óxidos e hidróxidos, y en medios anaerobios los iones Ag(I) y Cu(I) pueden existir formando sulfuros.

f) *Especies Metálicas Adsorbidas a Coloides, Material Particulado o Incorporado a Microorganismos*: Los coloides, las partículas, junto con los sedimentos que se encuentran en aguas naturales tienen un gran nivel de metales pesados. Algunos minerales (Kaolin, etc.) que son frecuentes en aguas naturales poseen una superficie con numerosas cargas negativas lo que les permite absorber los iones metálicos en los rangos de pH que se presentan generalmente en las aguas naturales. Lo mismo pasa con los óxidos de metales hidratados que pueden intercambiar protones o iones oxidrilo por aniones o cationes respectivamente. La capacidad de absorción depende seriamente de factores abióticos como el pH y el tipo y concentración del ligando. También se debe tener en cuenta que los iones adsorbidos pueden redisolverse con ácidos por ejemplo. La

presencia de ligandos orgánicos puede aumentar o disminuir la adsorción de metales en las partículas sólidas. Por ejemplo la presencia de ácido glutámico incrementa la adsorción de Cu(II) en partículas de óxido de Fe(III).

3.1.4. Factores ambientales que afectan la especiación

a) *Condiciones Redox*: El potencial redox del ambiente determina el estado de oxidación de algunos iones metálicos, por ejemplo el Fe(III) puede reducirse a Fe(II), Mn(IV) a Mn(II), Cu(II) a Cu(I), Cr(VI) a Cr(III) o As(V) a As(III), lo cual tiene una influencia muy importante con respecto a la toxicidad y actividad biológica de cada elemento. El caso del Fe(II) y Mn(II) que son solubles en aguas naturales con poco oxígeno y a pH normales. El Cr(VI) en general es más tóxico que el Cr(III). En los sedimentos de las aguas naturales existen condiciones reductoras generalmente debido a la biomasa, la que consume oxígeno debido a los microorganismos y reduce a las sales de Mn(II) y Fe(III). Como resultado de esta reducción obtenemos principalmente Fe(II) y sulfuros, los que pueden interactuar con especies como el As(V) o el Cr(VI) produciendo la reducción de éstos a As(III) y Cr(III) y luego la oxidación de estas especies reducidas, por el oxígeno, generalmente suele ser un proceso lento.

b) *Macro constituyentes y Fuerza Iónica*: Los cationes pertenecientes al grupo de los alcalinos térreos existen en un porcentaje muy alto comparados con los metales pesados en la mayoría de las aguas naturales. Sin embargo no podemos esperar a que éstos compitan por la formación de complejos dado que éstos cationes tienen una mayor afinidad por ligandos que tengan grupos dadores de oxígeno, al contrario de lo que sucede con los metales pesados que son cationes que tienen una mayor afinidad por los grupos que contengan N y S.

c) *pH*: Los valores de pH afectan la especiación dado que produce cambios en el equilibrio ácido base, reacciones redox, o por competición entre los protones y los iones metálicos por los ligandos o por los grupos de superficie en los procesos de adsorción

d) *Presión y Temperatura* Estos parámetros afectan la estabilidad y las constantes de equilibrio de los diferentes procesos específicos. Como así también afecta el tipo de organismos y la fotosíntesis.

e) *Efectos Sinérgicos y Antagónicos*: La presencia de más de un metal pesado en el ambiente simultáneamente, puede hacer que éstos compitan por los mismos o diferentes sitios de unión, lo que afecta la toxicidad y biodisponibilidad. Así por ejemplo el par Cu y Zn son 2.5 veces más tóxicos para los peces (del grupo: *Poecilia reticulata*) que por separado.

3.2. Técnicas Experimentales para la Especiación Química

En el contexto de desarrollo de éste trabajo, se utiliza la espectrofotometría en fase sólida (SPS) para determinar la concentración de analito en una muestra, por lo que para realizar la especiación se requiere la incorporación de algunas etapas previas para clasificar la muestra en diferentes fracciones que contengan similitudes en sus formas moleculares de un mismo analito.

Los pretratamientos se pueden clasificar según si están basados en el tamaño de partícula, tamaño y carga de partícula o la interacción química, para separar las diferentes fracciones de una muestra⁶. Dichos pretratamientos se agrupan en la tabla 4.1.

Finalmente de la combinación de los diferentes pretratamientos surgen los esquemas de fraccionamiento químico.

Tabla 3.1.

Técnicas de pretratamiento de muestras	
1. <i>Técnicas Físicas</i> Basadas en el tamaño, densidad o carga de las especies químicas	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifugación • Filtración • Ultrafiltración • Diálisis • Permeación en geles • Electroforesis
2. <i>Técnicas Químicas</i> Basadas en reacciones de complejación, redox o propiedades de adsorción de las diferentes especies	<ul style="list-style-type: none"> • Columnas de intercambio iónico • Resinas quelantes • Columnas de Adsorción en Fase Sólida • Extracción líquido-líquido

3.2.1. Técnicas físicas

3.2.1.1. Centrifugación:

La centrifugación al igual que la filtración puede ser utilizada para separar partículas en suspensión en aguas naturales, la velocidad de rotación y el tiempo necesario para realizar la sedimentación preferencial de las partículas es cuidadosamente seleccionado por la técnica elegida.

Ambas técnicas (filtración y centrifugación) pueden ser utilizadas para separar iones metálicos disueltos en aguas naturales, de la fracción asociada con las macromoléculas o partículas coloidales. Por ejemplo todas las partículas con diámetros superiores a $\geq 190\text{nm}$ y una densidad específica sobre los 2.5 pueden ser separadas de aguas de ríos y lagos por 30 min a 3000 r.p.m. de centrifugación, en estas condiciones no se remueve la materia húmica de la matriz acuática⁷.

La técnica de centrifugación no depende solo del tamaño de las partículas sino también de su densidad, entonces las partículas poco densas pueden producir una agregación durante la centrifugación, contrariamente de lo que se produce con las partículas de baja y alta densidad. En realidad, la materia retenida por la centrifugación es mayor que la retenida en una filtración convencional (espesor de poro $0.4 - 0.5 \mu\text{m}$) especialmente las partículas de baja densidad de metales (ej.: partículas de Al, Fe, Mn o Ti) están presentes en la solución.

Entonces para partículas con diámetros $> 15 \text{ nm}$ (por debajo de éste es necesaria la ultra filtración) la filtración en general es preferible a la centrifugación, dado que los efectos de densidad son eliminados y el fraccionamiento por tamaño de partícula puede realizarse más cuidadosamente. Sin embargo la filtración también posee otros problemas, y la centrifugación en general es más rápida y requiere menor atención del operador.

3.2.1.2. Filtración:

Las especies químicas en aguas naturales pueden dividirse operacionalmente en fracciones “disueltas” (filtrables) y “particuladas” (no filtrables), dependiendo de la habilidad de cada una para pasar a través de un filtro con un tamaño de poro nominal en el rango de $0,4$ a $0,5 \mu\text{m}$. Así mismo las sustancias que se encuentran entre las dos

fracciones, como los coloides y polímeros con diámetros $\leq 1 \mu\text{m}$ pueden atravesar el filtro. En la siguiente tabla se visualiza el radio de varias especies en aguas naturales.

Tabla 3.2.

ESPECIES	DIAMETRO ESTIMADO μm
Partículas suspendidas	1 – 100
Coloides	$5 \times 10^{-3} - 1$
Sustancias Húmicas	$2 \times 10^{-3} - 6 \times 10^{-3}$
Iones Hidratados	$3 \times 10^{-4} - 8 \times 10^{-4}$
Molécula de H_2O	2×10^{-4}

La aplicabilidad de la filtración a la especiación de vestigios depende de su capacidad de separar por diferencia de tamaño específico a partículas que se encuentran en una suspensión.

Esta capacidad se encuentra relacionada no solo a la selectividad del tamaño del poro, sino también a la susceptibilidad del filtro de contaminarse o de adsorber partículas cuyo diámetro sea menor que el tamaño nominal del poro de la membrana, lo cual depende de la naturaleza química de la membrana filtrante principalmente. Es decir que los poros de la membrana filtrante deben tener un tamaño uniforme y además deben permanecer constantes durante la filtración, dado que el tamaño nominal del poro es el que nos da la efectividad del filtro. Este valor puede estimarse haciendo curvas de retención (porcentaje de retención vs. diámetro de partícula) donde la pendiente de la curva refleja la uniformidad de los poros de la membrana (cuanto más pronunciada es la pendiente más selectiva es la membrana).

Dos tipos de filtros son los mas utilizados actualmente:

- filtro de membrana de celulosa
- filtros de policarbonato

Los filtros de celulosa son de gran profundidad con un espesor de alrededor de $150\mu\text{m}$, con una forma irregular de los poros y algunas partes de los poros interconectadas. Además presentan una gran superficie de adsorción.

El espesor de filtración de los poros de los filtros de policarbonato, es pequeño en proporción, los cuales son más usados como filtros de membrana. Estos consisten en láminas de un espesor de aproximadamente de $10 \mu\text{m}$. Aparte su estructura ofrece una

pequeña área de adsorción. La desventaja que presentan estos filtros es que son más propensos a obstruirse y requieren una mayor presión para hacer atravesar la solución pudiéndose así romper las macromoléculas.

El proceso de filtración presenta también algunos problemas como ser la posibilidad de contaminación de las membranas o las pérdidas de metales por adsorción, lo cual es muy significativo en muestras ambientales que contienen concentraciones extremadamente bajas de elementos. En este orden la contaminación con metales pesados puede eliminarse lavando el filtro con HNO₃ diluido, mientras que la adsorción puede disminuirse mediante el pretratamiento de la membrana con una solución de CaSO₄ 0,10 mol L⁻¹, dado que el Ca²⁺ forma complejos superficiales y satura los grupos de los filtros y aparatos.

Otro problema surge si los períodos de almacenamiento o de filtración de la muestra son muy prolongados, el primero debido a la degradación por tratarse de muestras de aguas naturales y el segundo si el flujo a través de la membrana es muy bajo, lo cual puede producir cambios en la presión osmótica, o en la interacción entre solutos o de los solutos con la membrana que pueden variar la resistencia hidráulica y producir el fenómeno de la coagulación. La coagulación se produce cuando el flujo de filtración es demasiado bajo, entonces las partículas comienzan a agregarse formando geles del lado de la fase de retención, produciéndose así un taponamiento de la membrana.

Por otro lado los coloides o sustancias con un diámetro menor que los poros de la membrana pueden quedar retenidos por adsorción debida a interacciones específicas entre la superficie de la membrana y los coloides lo cual depende principalmente de la naturaleza química de las sustancias, en particular la de la membrana.

La relación entre la concentración de sustancia retenida en la membrana (C₀) y la concentración de sustancia en la solución filtrada (C) puede representarse aproximadamente por la siguiente ecuación⁸:

$$C_0 / C = \exp(r\sigma\delta D)$$

Donde: *r* es la velocidad de flujo por unidad de área (cm/s); σ es el coeficiente de retención ($\sigma = 1$, se retiene toda la sustancia; $\sigma = 0$, no se retiene), δ es el espesor de la

capa de difusión (cm) y D es el coeficiente de difusión (cm^2/s)

Con el objeto de minimizar la coagulación debemos tratar de disminuir el valor de la relación C_0/C usando:

(a) velocidad de flujo muy bajas (así mismo debe tenerse en cuenta que con grandes volúmenes de muestra, la velocidad baja implica largos tiempos de filtración lo que aumenta las posibilidades de adsorción y contaminación); (b) desobstruir eficientemente en la membrana, lo que incrementa el flujo inverso de difusión reduciendo el taponamiento, aumentando el flujo de filtración y mejorando la discriminación por tamaño de partícula (también debe considerarse que la turbulencia, o movimiento controlado aumenta la coagulación de los coloides en la solución), (c) pequeños valores de factor de concentración V_0/V_f (V_0 y V_f representa el volumen inicial y final) para que la concentración en el filtrado no aumente excesivamente, y (d) lavando el filtro agregando solvente cuidando de no aumentar demasiado el volumen del filtrado. Esta técnica (llamada filtración concentrada) consume más tiempo que la filtración convencional, pero permite resultados reproducibles porque la concentración de las especies en los compartimientos se mantiene prácticamente constante durante todo el proceso.

Para tratar de disminuir el tiempo de filtración, se puede aplicar presión, positiva o negativa, para aumentar la velocidad del flujo a través de la membrana. La presión positiva con un gas inerte generalmente se prefiere, ya que esta reduce la contaminación por aire y elimina las fluctuaciones de pH por el CO_2 atmosférico, en cambio si se aplica un vacío a la solución (presión negativa), en aguas con poca capacidad buffer se puede observar variaciones de pH de 2 unidades al atravesar la membrana.

Cabe agregar que la separación entre coloides y moléculas disueltas no siempre se lleva a cabo con éxito por la filtración, dado que las partículas coloidales de los metales Fe y Mn formando complejos con los ácidos húmicos y la arcilla pueden atravesar membranas con un tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$. Esta fracción es muy importante en la especiación de metales pesados.

3.2.1.3. Ultrafiltración

Esta técnica es similar a la filtración pero las membranas tienen un tamaño nominal de poro mucho menor, en el orden de 1 a 20 nm y pueden utilizarse para

discriminar más profundamente los materiales por su tamaño que se encuentran en suspensión en las aguas naturales. La ultrafiltración puede distinguir entre sustancias “disueltas” y “no disueltas”, los problemas son los mismos descriptos para el proceso de filtración, siendo estos problemas más acentuados en la ultrafiltración debido a que las concentraciones de los grupos de especies involucradas es mucho menor.

Tabla 3.3. Tamaño de los poros de las membranas para ultrafiltración

FILTROS AMICON	TAMAÑO DE PORO (nm)
XM 300	14
XM 100 A	6.0
XM 50	3.5
PM 30	2.4
PM 10	1.8
UM 2	1.2
UM 05	1.0

Las membranas Visking[®] con un peso molecular límite (MWCO) de 14.000 son las más utilizadas en la ultrafiltración, pero en los estudios de especiación la “Spectrapor” con 6.000 MWCO es la que da mejores resultados. El MWCO es la capacidad de retención de una membrana de ultrafiltración, y se refiere al peso molecular de la sustancia retenida en un 90%, con un tamaño de poro entre 1 a 20 nm.

Dicho valor es solo nominal dado que la filtración se realiza por el tamaño de las partículas y no por su peso. Para las moléculas esféricas (Ej.: proteínas globulares, etc.) se obtiene una relación concordante entre el peso y la capacidad de la sustancia para atravesar el filtro, contrariamente de lo que sucede con las moléculas lineales (Ej.: polietileno, glicol, etc.) los cuales pueden difundir a través de la membrana⁹.

Buffle y colaboradores informan que los factores como la concentración de los electrolitos, presión y nivel de pH no tienen una influencia significativa en la ultrafiltración a no ser que tengan valores extremos¹⁰. Así mismo los buenos resultados de la ultrafiltración dependen de la interacción de las moléculas orgánicas con las sustancias disueltas o de la interacción de las sustancias coloidales con la membrana o con otras formando agregados. Las etapas de lavado y concentración de sustancias orgánicas durante la ultrafiltración son examinadas por Buffle, este autor recomienda

realizar una ultrafiltración secuencial (sistema de cascada) con MWCO de 10.000 luego bajar a 5.000 y después a 500 como método para reducir la adsorción de los componentes de alto peso molecular observado cuando las muestras son filtradas a través de membranas de tamaño de poro muy pequeño.

Hoffman y colaboradores utilizaron la técnica de concentración y ultrafiltración secuencial, donde se evitaron los pronunciados gradientes de concentración reduciendo el volumen de la solución solo un 50% en cada paso, luego se hace un balance de masas para calcular la concentración de cada fracción¹¹.

3.2.1.4. Diálisis

En la técnica de diálisis la muestra se pone en contacto con un blanco a través de una membrana que es permeable a las sustancias disueltas, ésta se usa para separar los coloides de las moléculas en solución. Idealmente la membrana de diálisis solo es permeable a las sustancias disueltas, pero en la realidad esta membrana también es permeable para sustancias de alto peso molecular y algunos coloides, que pueden pasar a través de ella, con un tamaño de poro de 1 a 5 nm y 1000 a 5000 MWCO.

Así como en la filtración y la ultrafiltración, la capacidad de retención depende del tamaño de la partícula y de la membrana utilizada.

Una vez alcanzado el equilibrio en la diálisis las sustancias neutrales (sin carga) poseen la misma concentración en ambos compartimientos, el de retención y el dializado, pero si el compartimiento de retención contiene sustancias con carga iónica que no pueden atravesar la membrana se observará diferentes concentraciones de las especies iónicas disueltas entre ambos compartimientos, dicha distribución se realizará de acuerdo con la teoría de Donnan¹².

Los dos mayores inconvenientes que tiene la diálisis son el largo tiempo que requiere la técnica para alcanzar el equilibrio y el hecho de que la membrana posee cargas negativas que interfieren con el pasaje a través de ella de las moléculas cargadas. Bajo estas condiciones las especies cargadas negativamente reciben una repulsión por poseer cargas del mismo signo y entonces requieren un tiempo mayor para alcanzar el equilibrio.

Este fenómeno es aplicado en la diálisis Donnan donde se utiliza una membrana cargada negativamente para realizar la separación de los complejos aniónicos. Por ejemplo para estudiar la configuración de los ácidos húmicos¹³.

El largo período de tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es el principal problema dado que se corre el riesgo de la disociación de complejos, produciendo cambios en el equilibrio.

Como ventajas de la diálisis podemos decir que esta se puede llevar a cabo sin asistencia no presenta los efectos de concentración como en la filtración y ultrafiltración y por último los volúmenes del dializado y retenido se mantienen constantes durante todo el proceso.

La contaminación por elementos en cantidad de vestigios es uno de los problemas presentes en la diálisis al igual que en la filtración que puede minimizarse realizando lavados con ácidos minerales de la membrana.

3.2.1.5. Permeación en geles

En esta técnica se utilizan polímeros porosos que son impregnados con un solvente y empaquetados dentro de columnas cromatográficas. Agua destilada o más comúnmente una solución diluida de los cationes Grupos I y II de la tabla periódica se pueden usar como eluyente¹⁴.

Cuando la muestra se coloca en la columna y luego se adiciona el eluyente se produce un fraccionamiento por tamaño dependiendo de la velocidad de difusión de cada molécula adentro y afuera de las cavidades intersticiales de la resina. Así las grandes moléculas se expulsan de los poros entonces se eluyen primero, seguidas de otras moléculas en orden decreciente de tamaño. El rango de tamaño de las moléculas puede cambiarse seleccionando el tamaño del poro de la resina.

La permeación en geles posee como ventaja sobre la ultrafiltración que puede acoplarse a un detector continuo a la salida de la columna cromatográfica como un espectrómetro por ejemplo. Tiene como desventajas, la necesidad de que los elementos se encuentren en grandes concentraciones en la muestra, debido al gran volumen de eluyente utilizado lo cual implica grandes factores de dilución.

Esta técnica debe realizarse con control muy cuidadoso del eluyente como ser del pH, fuerza iónica, composición y temperatura, con el objetivo de evitar los procesos de disociación de los complejos presentes. Los procesos de preconcentración deben tratar de evitarse como en la mayoría de los esquemas de especiación.

3.2.1.6. Electroforesis (plana y capilar)

Los procesos de separación de especies por electroforesis se basan en la carga total, signo y en menor medida con respecto al tamaño. En los procedimientos de electroforesis plana, la migración diferencial se logra mediante la aplicación de un potencial eléctrico a lo largo de una lámina de polímero poroso y conductor de la electricidad (soportado en una base inerte). Uno de los extremos de la lámina se encuentra sumergido en un reservorio de solución buffer que controla el pH y la conductancia del proceso. Cuando se toma una pequeña alícuota de muestra en la línea central de la lámina de polímero, los cationes y aniones se mueven en direcciones opuestas, y las moléculas neutras permanecen cerca del punto de siembra. Con muestras de aguas frescas, por ejemplo, nos encontramos que los iones hidratados simples (Ej: de metales alcalinos y alcalinos térreos) se mueven fuertemente hacia el cátodo.

Los metales trivalentes (Ej: Fe, Ce, Sc) sin embargo migran hacia ambos el ánodo y cátodo, lo que sugiere que coexisten especies coloidales cargadas positiva y negativamente. Las especies del Zinc tienen tendencia de migrar principalmente hacia el ánodo.

La electroforesis capilar de alta performance (HPCE o CE) usa un largo tubo capilar de silicio fundido (25-200 μm de diámetro interno) en lugar de un polímero poroso¹⁵. El tubo se encuentra equipado con una ventana óptica de visión, y una entrada para la introducción de pequeñas cantidades de muestra (<1 μl).

El tubo capilar y los reservorios contienen un electrolito apropiado. Esta es una técnica de un gran potencial de separación, dado que las especies moleculares se mueven con distintas velocidades dentro del capilar. La detección de las especies separadas puede llevarse a cabo mediante espectroscopía de absorción UV (límite de detección alrededor de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) o fluorescencia (100-1000 veces más sensible).

Se puede aumentar aún más la sensibilidad y obtener información sobre la estructura molecular usando un espectrómetro de masas. Esta técnica es muy utilizada para separar iones y ácidos orgánicos, proteínas, DNA, y otros productos naturales¹⁶. Uno de los principales problemas que presenta es que se genera mucho calor durante la corrida pero puede minimizarse haciendo circular gas fluorocarbono inerte como refrigerante alrededor del capilar.

3.2.2. Técnicas químicas

3.2.2.1. Columnas de intercambio iónico

El intercambio iónico se utiliza ampliamente para diferenciar entre las especies metálicas, basados en sus diferentes cargas electrostáticas¹⁷ o en la labilidad de los complejos formados. Esta técnica resulta rápida y sensible para diferenciar entre la fracción libre y la complejada¹⁸.

Dado que la carga eléctrica de las especies de los metales presentes en una muestra de agua puede variar desde positiva (cationes cargados), neutra (moléculas) y negativa (especies aniónicas), el pasaje secuencial a través de una resina de intercambio aniónica y catiónica, dispuesta en una columna, nos sirve para diferenciar las diferentes especies cargadas. En la práctica los patrones de distribución pueden distorsionarse por procesos secundarios, como la disociación de complejos inestables, retención de las partículas que contienen metal y retención de algunas partículas neutras por adsorción de la molécula al sustrato de polímero.

El intercambio iónico puede realizarse tanto en columna como en batch, por lo que solo es capaz de retener aquellos complejos que reúnan un valor mínimo en sus constantes de estabilidad. Una importante revisión bibliográfica realizada por Pohl¹⁹ (2006) fue publicada recientemente, ésta reúne las técnicas de intercambio iónico utilizadas para realizar especiación química.

3.2.2.2. Resinas quelantes

La introducción de grupos quelantes (Ej: amino diacetato) en un polímero nos da como resultado un producto con gran afinidad por los iones metálicos y que a la vez es capaz de excluir las moléculas de alto peso molecular o las partículas coloidales según el tamaño de sus poros (en algunas situaciones la columna puede actuar diferenciando por tamaño).

Comparada con otras técnicas (como la diálisis, ultrafiltración y extracción con solventes), las columnas quelantes son más rápidas y simples de utilizar, además el equipo generalmente es más barato.

Las columnas con resina quelante (Ej: Chelex 100) son muy utilizadas para preconcentrar niveles muy bajos de iones metálicos presentes en aguas naturales²⁰. La precisión de éste procedimiento puede variar según la naturaleza del anión contenido en

la columna. Los mejores resultados se han obtenido cuando la resina se convierte a la forma de Na^+ o NH_4^+ . En este estado la columna es capaz de retener la mayoría de los iones metálicos hidratados y/o iones metálicos de complejos lábiles presentes en la muestra²¹.

No son retenidos los metales asociados a coloides. Solo una pequeña fracción del contenido total de metal de la muestra puede que sea lábil, y la fracción retenida puede variar según el metal considerado. Por ejemplo, cuando el agua del río Susquehanna es pasada a través de una columna que contiene la resina Chelex 100 en su forma Ca^{2+} , solo un 22% del total de Cu, 34% del contenido de Zn, 67% del total del Pb y un 94% del Cd son retenidos por la resina²².

3.2.2.3. Columnas de adsorción en fase sólida

Son columnas rellenas con un adsorbente no cargado (Ej: copolímero hidrofóbico) y son utilizadas para realizar separaciones específicas tales como el aislamiento de niveles traza de compuestos orgánicos (Ej: ácido fúlvicos y húmicos) y complejos organometálicos formados por éstos²³, presentes en aguas. También existen algunas resinas no polares para aislar y preconcentrar de complejos orgánicos de metales (Ej: Sep-Pak[®] cartuchos²⁴ que contienen una base de material de silicatos cubierta con un hidrocarburo C_{18}). Estas resinas pueden utilizarse para extraer las especies no polares en la modalidad, extracción en fase sólida, también muy utilizada para estudios de especiación²⁵.

Algunos metales no complejados pueden ser parcialmente adsorbidos²⁶. Luego las especies retenidas se extraen con diferentes solventes orgánicos. Sin embargo en algunos sistemas la extracción de compuestos orgánicos no es cuantitativa.

3.2.2.4. Extracción líquido-líquido

Si se pone en contacto una muestra de agua con un solvente orgánico inmisible, las especies no cargadas, tienden a ser extraídas por la fase orgánica. Los procesos de extracción líquido-líquido tienen cierta aplicación en los estudios de especiación². Por ejemplo, las especies liposolubles (que poseen una alta toxicidad) pueden estimarse por extracción con solventes orgánicos como el cloroformo y mezclas de hexano-butanol (la cual posee una constante dieléctrica similar a la membrana celular), luego el contenido de metales se determina en la fracción orgánica.

La extracción líquido-líquido tiene una baja eficiencia en algunos casos debido a (i) los complejos con cargas no son transferidos entre las fases y (ii) el metal adsorbido en partículas coloidales puede extraerse solo parcialmente (las partículas tienden a acumularse en la interfase de los dos líquidos).

La extracción de especies polares del metal puede hacerse transformando éstas en especies no cargadas, por ejemplo agregando agentes quelantes como ditizona o dietilditiocarbamato a la fase acuosa.

Ocasionalmente también se utiliza la extracción con solventes para separar iones de diferentes estados de oxidación de un mismo elemento. (Ej: As o Sb en agua de mar mediante la extracción de complejos de dietilditiocarbamato en cloroformo).

3.2.3. Esquemas de especiación (Fraccionamiento)

Se denomina esquema de fraccionamiento de especies químicas, a la combinación de diferentes métodos de separación o clasificación de especies con métodos muy sensibles de determinación^{27,28}. Como resultado se obtiene diferentes fracciones (familias químicas) clasificadas operacionalmente para un mismo analito.

Las separaciones pueden realizarse en base al tamaño de partículas a las que se encuentra unida el analito por filtración, centrifugación, etc. O también en base a la estabilidad de los complejos que son capaces de formar los analitos, mediante el uso de resinas quelantes. Una vez separadas las distintas fracciones de una misma muestra se cuantifica la concentración de analito en cada una de ellas, previa digestión o destrucción de la materia orgánica en cada fracción. Un esquema general de aplicación de este procedimiento puede verse en la gráfica 3.2. adaptación del esquema de Buffle²⁹.

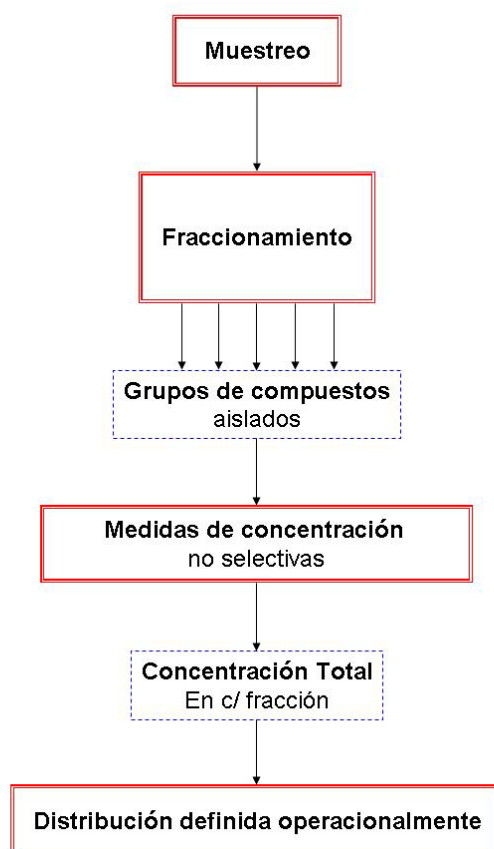


Figura 3.2. Esquema de fraccionamiento aplicado en este trabajo

3.2.4. Validación del fraccionamiento de muestras

Dada las múltiples etapas que se deben realizar para lograr el fraccionamiento de una muestra (Ej: muestreo, pretratamientos, intercambio con resinas, y medición de las concentraciones) el control de calidad de los resultados obtenidos para cada fracción depende en gran parte de la calidad de los procesos de cada una de las etapas intermedias, por lo que se requiere atención especial. Cada tratamiento de las muestras, principalmente en la etapa de fraccionamiento propiamente dicho (conservación de la muestra, filtración, digestión, diluciones, preconcentración), podrían ser potenciales fuentes de error (por contaminación o pérdidas) que se acarrearían hasta el resultado final.

En general los errores por contaminación pueden detectarse preparando soluciones blanco adecuadas^{30,31,32,33}. Diferentes tipos de solución blanco pueden

utilizarse, soluciones blanco en contacto con el material de muestreo (para detectar contaminaciones en esta etapa), soluciones blanco a través de filtros o columnas y blancos de reactivos (detecta contaminaciones provenientes de los reactivos y del método de fraccionamiento en general).

Para evaluar la incertidumbre de las mediciones realizadas podrían usarse materiales de referencia, éstos, solamente permiten ver como se mide la concentración total de un determinado analito, o se utilizan sobreagregados de analito para determinar el porcentaje de recuperación^{34,35}. Éste tipo de pruebas para determinar la confiabilidad de un nuevo método de fraccionamiento, sólo permite establecer con seguridad los límites de confianza para la determinación de la concentración total de analito pero no dice nada sobre como mide el método la concentración de analito en cada fracción.

Una forma mejor de validar o controlar la calidad de un nuevo método de fraccionamiento, es comparar los resultados obtenidos para cada fracción, con mediciones realizadas con otros métodos analíticos^{36,37} (mejor aún si los métodos con los que se compara son métodos estándar de referencia).

¹ Hewitt C. N. and Harrison R. M., *“Understanding our Environment”* (1986) 1, Royal Society of London.

² Young P. C., *“Quantitative System Methods in Evaluation of Environmental Pollution Problems”* (1990) Royal Society of Chemistry, Cambridge

³ Salomons, W. & Forstner, U. *“Trace metal analysis on polluted sediments. Part 2: Evaluation of the environmental impact”*, Environ. Technol. Lett. (1984) 1, 506 – 517

⁴ Albert, L. (OPS/OMS), *“Curso básico de toxicología ambiental”* (2002) Editorial Limusa, Mejico.

⁵ Fish, H., *“Understanding our Environment”*, (1992) 3, Royal Society of Cambridge

⁶ De Mora, S.J. & Harrison, R.M., *Hazzard Asses. Chem.: Curr. Der.* (1984) 3, 1

⁷ Benes, P., Gjessing, E.T. & Steinnes, E., *Water Res.* (1976) 10, 711

⁸ Perret, D., de Vitre, R., Leppard, G.G. and Buffle, J., *“Large Lakes. Ecological structure and function”*, (1990) 12, Springer Verlag

⁹ Kwak, J. C., Nelson, R. W. P. and Gamble, D. S., *Geochim. Cosmochim. Acta* (1977) 41, 993

¹⁰ Buffle, J., Deladoey, P. and Haerdi, W. *Anal. Chim. Acta* (1978) 101, 339

-
- ¹¹ Hoffman, M. R., Yost, E. C., Eisenreich, S. J. and Maier, W. J., *Environ. Sci. Technol.* (1981) 15, 655
- ¹² Sun, S. F., “*Physical Chemistry of Macromolecules: Basic Principles and Issues*”, (2004) 2nd Edition, Wiley and sons
- ¹³ De Haan H., Jones R. I. and Salonen K., *Freshwater biology* (1987) 20, 453
- ¹⁴ Sterinberg, C. *Water Res.* (1980) 14, 1239
- ¹⁵ Loconto, P., “*Trace Environmental Quantitative Análisis*”, (2001) Dekker ed., 4, 450
- ¹⁶ Ding Y, Xue J, Lin B., *Chinese Journal of chromatography*, (1998) 16(3), 215-219
- ¹⁷ Kiekens, L. and Cottenie, A., in: “*Chemical methods for assessing bio-available metals in sludges and soils*” (1984) R. Leschber, R.D. Davis and P. L'Hermite, eds. Elsevier, London 32-41
- ¹⁸ Berggren, D, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* (1989) 35, 1-15
- ¹⁹ Pohl, P., *Trends in Analytical Chemistry* (2006) 25, 1
- ²⁰ Batley, G.E. and Florence, T.M., *Anal. Lett* (1976) 9, 79
- ²¹ Batley, G.E. and Florence, T.M., *Mar. Chem.* (1976) 4, 347
- ²² Kingston, H. M. and Greenberg, R. R., *Environm. International* (1985) 10, 2, 153–161
- ²³ Tokalioglu, S., Kartal, S. and Elci, L. *Anal. Sci.* (2000) 16, 1169
- ²⁴ Bjiirklund, L. B. and Morrison, G. M., *Analytica Chimica Acta* (1997) 343 259-266
- ²⁵ Abollino, O., Aceto, M., Sarzanini, C. and Mentaste, E., *Anal. Chim. Acta* (2000) 411, 223-237
- ²⁶ Fernandez, F., Tudino, M.B. and Troccoli, O., *J. Anal. At. Spectrom.* (2000) 15, 687-695
- ²⁷ Hart, B.T. and Davies, S. H:R:, *Aust. J. Mar. Freshwater.* (1977) 28, 105-112
- ²⁸ Pettersson, C., Håkansson, K., Karlsson, S. and Allard, B., *Water Res.* (1993) 27, 863-871
- ²⁹ Buffle, J., “*Complexation reactions in aquatic systems. An analytical approach*” (1987) Ellis Hoorwood
- ³⁰ Laxen, D.P.H. Harrison, R.M., *Sci. Total Environ.* (1989) 19, 59
- ³¹ Figura, P., McDuffie, B., *Anal. Chem.* (1980) 52, 1433
- ³² Buykx, S.E.J., Cleven, R.F.M.J., Hoegge-Wehmann, A.A. and von den Hoop, M.A.G.T., *Fresen. J. Anal. Chem.* (1999) 363, 599

³³ Florence, T.M., *Anal. Chim. Acta* (1982)141, 73

³⁴ Baffi, F., Cardinale, A.M., Bruzzone, R., *Anal. Chim. Acta* (1992) 270, 79

³⁵ Lu, Y., Chakrabarti, C.L., Back, M.H., Gregoire, D.C., Schroeder, W.H., *Int. J. Environ. Anal. Chem.* (1995) 60, 313

³⁶ Vasconcelos, M.T.S.D., Leal, M.F.C., *Anal. Chim. Acta* (1997) 353, 189

³⁷ Jiann, K.-T., Presley, B.J. *Anal. Chem.* (2002) 74, 4716

CAPITULO IV

Se incluye este capítulo para facilitar la lectura y comprensión de este trabajo sobretodo en la parte experimental y el procesamiento de datos.

4. Diseño Experimental

4.1. Metodología de superficies de respuesta

La metodología de las superficies de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras¹. El objetivo es optimizar la variable de interés. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema².

4.2 Superficies de respuesta para dos factores de tratamiento

El objetivo de todos los experimentos realizados incluye describir la respuesta a los factores de tratamiento. La ecuación de regresión cuadrática estimada se puede graficar como una superficie en la que se pueden visualizar las respuestas a todos los niveles de los factores en el experimento³.

La ecuación de respuesta cuadrática se representa como una superficie sólida en tres dimensiones o también puede representarse como curvas de nivel⁴, donde las líneas con valores de respuesta iguales son similares a las elevaciones mostradas en un mapa topográfico.

La superficie de respuesta permite que el operador inspeccione, de manera visual, el área experimental para cierta zona de los niveles de los factores de interés y evaluar su sensibilidad a los factores de tratamiento.

4.3 Modelos polinomiales aproximados

El diseño de superficies de respuesta supone que la media de la variable de respuesta μ_y está en función de los niveles de los factores cuantitativos representados por las variables x_1, x_2, \dots, x_k . Los modelos polinomiales se usan como aproximaciones prácticas a la función de respuesta verdadera o real. En general, la función real se desconoce, entonces las funciones polinomiales proporcionan aproximaciones en zonas relativamente pequeñas de los factores cuantitativos.

Los modelos polinomiales comúnmente usados para el análisis de superficies de respuesta son el modelo lineal (primer orden) y el modelo cuadrático (segundo orden). El modelo de primer orden para dos factores es:

$$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2$$

y el modelo de segundo orden es:

$$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

Las gráficas de las curvas de nivel para los modelos de primer orden tienen una serie de líneas paralelas que representan los niveles de los factores. Para los modelos cuadráticos las gráficas son más complejas y tienen varios patrones de curvas posibles.

4.4. Experimentos secuenciales para el análisis de respuesta

El uso de la experimentación secuencial con el propósito de obtener las condiciones operativas óptimas fue utilizada en un principio para procesos industriales⁵.

El enfoque general comienza con la identificación de las variables de tratamiento de mayor importancia que influyen en el proceso. Luego en experimentos subsecuentes se usan las combinaciones de tratamientos para localizar un área en el espacio del factor que tenga oportunidad de producir respuestas óptimas, y por último, se realiza la exploración de esta región en busca del punto óptimo.

4.5. Identificación de variables significativas con análisis factorial

Cuando la región de respuesta óptima se desconoce se usan diseños factoriales completos o fraccionarios para comenzar el análisis.

Los diseños factoriales completos (2^n) son diseños adecuados para estimar las respuestas medias para el modelo lineal, o de primer orden, y también se utilizan para saber cuál es el peso o significatividad de la varianza de cada una de las variables independientes en la respuesta o variable dependiente.

Los diseños factoriales producen experimentos más eficientes, pues cada observación proporciona información sobre todos los factores (variables

independientes), y es factible ver las respuestas de un factor en diferentes niveles de otro factor en el mismo experimento. La respuesta a cualquier factor observado en diferentes condiciones indica si los factores actúan en las unidades experimentales de manera independiente. La interacción entre factores ocurre cuando su actuación no es independiente.

La principal desventaja que presenta el diseño factorial completo es que al aumentar las variables independientes que se quieren estudiar, aumenta en forma significativa el número de experiencias que se deben realizar. Sin embargo generalmente para el diseño de sensores con espectrofotometría en fase sólida las variables químicas en estudio no son más de tres, por lo que éstos diseños resultan muy adecuados para los experimentos iniciales.

Para cuantificar la significatividad de cada uno de los factores se realiza un análisis de la varianza de a un factor (ANOVA) y se utiliza al valor “ p ” como criterio.

Los resultados obtenidos mediante el ANOVA se presentan mediante gráfico de los efectos principales de Pareto^{6, 7}. Este es un gráfico de barras, que se analiza teniendo en cuenta que la longitud de cada barra representa la importancia relativa de cada uno de los factores.

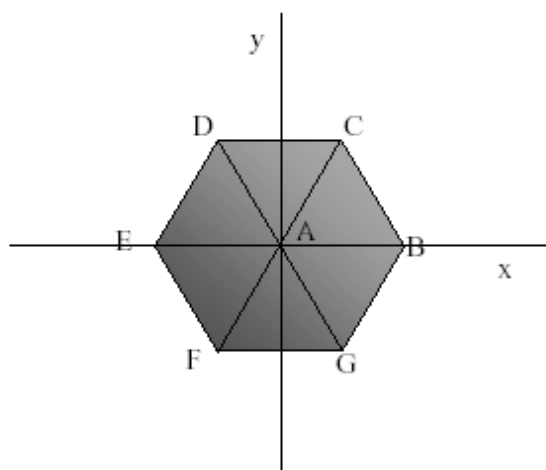
4.6. Método de Doehlert

El método de Doehlert⁸ es un diseño de superficie de respuesta que posibilita encontrar máximos o mínimos en la zona del ensayo. Este método permite manejar un número apreciable de variables a la vez, sin que el número de ensayos se haga operativamente inmanejable⁹.

Para la realización de este método los valores que se le asignan a las variables se distribuyen uniformemente alrededor de un valor central. Por ejemplo, en el caso de investigar dos variables se distribuyen alrededor de un hexágono.

A diferencia de otros diseños de superficie de respuesta, el de Doehlert tiene la ventaja que puede ser ampliado, cambiando el centro del hexágono en un nuevo ensayo.

A fin de determinar el valor en todos los puntos de las variables x e y , y para asegurar que estén equidistantes se toma como imagen generatriz al triángulo equilátero ABC de lado unitario y se determina la posición de cada punto tomando arbitrariamente al punto A como $x = 0, y = 0$.



Teniendo en cuenta este valor, los extremos del triángulo quedan situados en

$$A(0.000,0.000)$$

$$B(1.000,0.000)$$

$$C(0.500,0.866)$$

El resto de los extremos del hexágono se ubican en los siguientes puntos.

$$D(-0.500,0.866)$$

$$E(-1.000,0.000)$$

$$F(-0.500,-0.866)$$

$$G(0.500,-0.866)$$

A fin de generalizar las coordenadas de los vértices de la figura característica del modelo (en este caso el hexágono), se aprovecha la propiedad de que cada punto surge de la sustracción de dos puntos cualesquiera de la figura generatriz (en este caso el triángulo ABC). Por ejemplo, el punto D resulta de $C - B$, E resulta de $A - B$, etc.

Este cálculo no resultó muy útil en dos dimensiones pero fue muy práctico cuando el modelo se complica y se usan tres variables o más.

Estos valores corresponden a las variables codificadas y a partir de ellos se calculan los valores reales de las variables x e y .

Por ejemplo, si x es concentración de cadmio e y es pH y se quiere barrer valores entre 10 y 100 mM de Cd(II) y entre 3.0 y 7.0 de pH, se determina la diferencia entre el

máximo y el mínimo valor de las variables codificadas y las reales, en este caso tenemos que $D_{x\text{cod}} = 2$, $D_{y\text{cod}} = 1.732$, $D_{x\text{real}} = 90$, $D_{y\text{real}} = 4$. Para calcular los valores de Cd y pH a utilizar se determina el valor medio de las dos variables, 45 y 4.0 y sobre estos valores se determina el resto mediante la ecuación:

$$x_{\text{real}} = x_{\text{codif}} \cdot \frac{\Delta x_{\text{real}}}{\Delta x_{\text{codif}}} + x_0$$

donde x_0 es el valor de la variable x en el punto central. El mismo tratamiento se sigue para las demás variables.

Del punto central se realiza un triplicado, el cual se utiliza para determinar la varianza propia del experimento. Junto con los valores centrales quedan en total 9 experimentos a realizar.

Una gran ventaja que posee este método es que si se desea aumentar el rango de estudio en alguna de las variables, simplemente se corre el punto central y se recalculan los nuevos valores de las variables x e y .

En el caso de estudiar tres variables el número de experimentos a realizar es 15 (12 puntas y 3 centrales).

Para dos factores, se estudian 3 valores del primero y 5 del segundo, si el estudio es de 3 variables, se estudian 3 valores de la primera, 5 de la segunda y 7 de la tercera.

Una vez realizada la experiencia y medida la variable dependiente (en nuestro caso Absorbancia máxima) se determinan los coeficientes de un polinomio del tipo

$$z = b_0 + b_1x + b_2y + b_3x^2 + b_4y^2 + b_5xy$$

Los coeficientes se determinan por el método de cuadrados mínimos. La forma más sencilla de manejar este número de datos es mediante el cálculo matricial¹⁰.

Si se definen las siguientes matrices:

$$X = \begin{bmatrix} 1 & x_1 & y_1 & x_1^2 & y_1^2 & x_1 y_1 \\ 1 & x_2 & y_2 & x_2^2 & y_2^2 & x_2 y_2 \\ 1 & x_3 & y_3 & x_3^2 & y_3^2 & x_3 y_3 \\ 1 & x_4 & y_4 & x_4^2 & y_4^2 & x_4 y_4 \\ 1 & x_5 & y_5 & x_5^2 & y_5^2 & x_5 y_5 \\ 1 & x_6 & y_6 & x_6^2 & y_6^2 & x_6 y_6 \\ 1 & x_7 & y_7 & x_7^2 & y_7^2 & x_7 y_7 \\ 1 & x_8 & y_8 & x_8^2 & y_8^2 & x_8 y_8 \\ 1 & x_9 & y_9 & x_9^2 & y_9^2 & x_9 y_9 \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ b_3 \\ b_4 \\ b_5 \end{bmatrix} \quad Y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ y_3 \\ y_4 \\ y_5 \\ y_6 \\ y_7 \\ y_8 \\ y_9 \end{bmatrix}$$

donde los x_i e y_i son los valores codificados de x e y para cada experiencia, B es el vector de los coeficientes a determinar e Y es el vector de los resultados experimentales de cada ensayo, se observa que $X \cdot B = Y$. Este es un sistema de ecuaciones redundantes, con más ecuaciones que incógnitas, así que no puede despejarse directamente B del producto anterior. Para resolverse este sistema se debe obtener la matriz pseudo inversa de X a partir de $(X^T \cdot X)^{-1} X^T$ donde X^T es la matriz transpuesta de X (los cálculos matriciales se realizaron por computadora utilizando el programa Unscramble).

Como hay más ecuaciones que incógnitas los valores obtenidos, los coeficientes B son estimadores que minimizan la distancia entre las variables reales y las obtenidas.

Realizando el análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos para cada parámetro del polinomio se decide cuales de ellos son significativos y cuales no. Con aquellos que son significativos se vuelven a calcular los parámetros del polinomio y con ellos puede realizarse el grafico de la superficie de respuesta o bien calcular en forma analítica la existencia de máximos o mínimos en la zona del estudio.

4.7. Determinación del punto óptimo

Existen tres herramientas o métodos para encontrar el punto óptimo, en este caso el correspondiente al máximo valor de absorbancia:

1. Inspección de la superficie de respuesta
2. Análisis Canónico

4.7.1. Inspección de la superficie de respuesta

Se pueden examinar visualmente los gráficos correspondientes a la superficie de respuesta o el gráfico de contornos para encontrar y aproximar los valores correspondientes a los picos o valores máximos. Se debe ser muy cuidadoso en esta tarea ya que el gráfico de la superficie de respuesta no corresponde a valores verdaderos, sino a los resultados de la regresión realizada en los pasos anteriores. Además si se consideran más de 3 variables para poder realizar los gráficos algunos de ellos tuvo que haberse dejado constante.

4.7.2. Análisis canónico

El análisis de correlación canónica puede verse como una extensión lógica de un análisis de regresión múltiple. Recordando que el análisis de regresión múltiple implica una única variable dependiente y varias variables independientes. Con el análisis canónico el objetivo es correlacionar simultáneamente varias variables dependientes y varias variables independientes. Mientras que la regresión múltiple implica una única variable dependiente, la correlación canónica implica múltiples variables dependientes. El principio subyacente es desarrollar una combinación lineal de cada conjunto de variables (tanto independientes como dependientes) para maximizar la correlación entre los dos conjuntos. O dicho de otra forma, el procedimiento implica obtener un conjunto de ponderaciones para las variables dependientes e independientes que proporcione la correlación única máxima entre el conjunto de variables dependientes y el conjunto de variables independientes

Este tipo de cálculo corresponde al cálculo matemático para encontrar puntos estacionarios en las funciones polinómicas. Suponiendo que se desea maximizar la respuesta, el máximo (punto óptimo) será el conjunto $x_1, x_2 \dots x_k$ tal que las derivadas parciales

$$\frac{\partial y}{\partial x_1} = \frac{\partial y}{\partial x_2} = \dots = \frac{\partial y}{\partial x_k} = 0$$

Dicho punto se denomina punto estacionario y corresponde al máximo de absorbancia para este trabajo.

Se puede obtener el punto estacionario usando la notación matricial para el modelo de segundo orden

$$Y = \beta_0 + x'b + x'Bx$$

donde

$$x = \begin{bmatrix} x_1 \\ x_2 \\ M \\ x_k \end{bmatrix} \quad b = \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \\ M \\ \beta_k \end{bmatrix} \quad B = \begin{bmatrix} \beta_{11} & \beta_{12}/2 & K & \beta_{1k}/2 \\ \beta_{21}/2 & \beta_{22} & K & \beta_{2k}/2 \\ M & & & \\ \beta_{k1}/2 & \beta_{k2}/2 & K & \beta_{kk} \end{bmatrix}$$

b es el vector ($k \times 1$) de coeficientes de regresión de primer orden y B es una matriz simétrica ($k \times k$) cuya diagonal principal está formada por los coeficientes de los términos cuadráticos puros (β_{ii}) mientras que los elementos fuera de ésta corresponde a un medio del valor de los coeficientes cuadráticos mixtos ($\beta_{ij}, i \neq j$)

La derivada de Y con respecto al vector x igualada a cero es

$$\frac{\partial Y}{\partial x} = b + 2Bx = 0$$

El punto estacionario es la solución de la ecuación, es decir

$$x_s = -B^{-1} b/2$$

Sustituyendo esta en la ecuación matricial para el modelo segundo orden se obtiene:

$$Y = \beta_0 + 1/2 x_0 b$$

4.8. Caracterización de la superficie de respuesta

Una vez encontrado el punto estacionario, hay que caracterizar la superficie de respuesta, es decir determinar si se trata de un punto de respuesta máximo, mínimo o silla. La forma directa de hacer esto es mediante la gráfica de contornos del modelo ajustado, sin embargo es útil un análisis más formal.

La forma canónica de una ecuación cuadrática es eficaz para visualizar la superficie y determinar la sensibilidad relativa de las variables de respuesta a cada factor. Es difícil visualizar la superficie mediante el examen de los coeficientes estimados para la forma normal de la ecuación de respuesta cuadrática. De la misma manera, es difícil determinar los cambios necesarios en los niveles de los factores para producir un cambio específico en la respuesta.

El análisis canónico gira los ejes de las variables x , a un nuevo sistema de coordenadas y el centro de este nuevo sistema se coloca en el punto de respuesta estacionario de la superficie. La forma canónica de la ecuación con dos variables es:

$$\hat{Y} = \hat{Y}_s + \lambda_1 Z_1^2 + \lambda_2 Z_2^2$$

donde Z_1 y Z_2 son las variables de los ejes rotados. Observese que solo influyen los términos cuadráticos de las variables canónicas. Los λ_i son constantes y representan los autovalores de la matriz B.

La naturaleza de la superficie de respuesta se determina a partir del punto estacionario y el signo y magnitud de los λ_i . Si todos los λ_i son positivos entonces es un punto de respuesta mínimo, en cambio si son negativas, entonces es un punto de respuesta máximo, por último si tienen signos diferentes entonces es un punto de respuesta de silla.

Es muy importante recordar que tanto la respuesta estimada en forma original en la forma canónica solo es válida para la zona de los niveles de los factores incluida en el experimento. Cualquier intento para estimar la respuesta fuera de los límites acotados por los niveles tenidos en cuenta para el cálculo de la región de estudio, será engañoso.

¹ Araujo, P.W. and Brereton, R.G. "Experimental design II. Optimization", Trends Anal. Chem. (1996) 15, 63–70.

- ² Morgan, E. “Chemometrics: Experimental Design” (1991) Wiley, London
- ³ Khuri, A. I. and Cornell, J. A. “Response Surfaces: Design and Analysis”, (1996) Dekker, New York.
- ⁴ Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nystrom, A., Pettersen, J. and Bergman, R. “Experimental design and optimization”, (1998) Chemom. Intell. Lab. Syst. 42, 3–40.
- ⁵ Box, G. E. P. and Wilson, K. G. “On the experimental attainment of optimum conditions”. Journal of the Royal Statistical Society B 13, (1951) 1 – 45
- ⁶ Bermejo-Barrera, P., Moreda-Pineiro, A. and Bermejo-Barrera, A. “Factorial designs for Cd, Cr, Hg, Pb and Se ultrasound-assisted acid leaching from human hair followed by atomic absorption spectrometric determination”, J. Anal. At. Spectrom. (2000) 15, 121–130.
- ⁷ Bermejo-Barrera, P., Muniz-Naveiro, O., Moreda-Pineiro, A. and Bermejo-Barrera, A. “The multivariate optimisation of ultrasonic bath-induced acid leaching for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry”, Anal. Chim. Acta (2001) 439, 211–227.
- ⁸ Doehlert, D. H. “Uniform shell designs”. Applied Statistics (1970) 231-239.
- ⁹ Nechar, M., Molina, M. F. M., Rodriguez, L.C. and Bosque-Sendra, J.M. “The application of Doehlert designs in the optimization of experimental variables in solid-phase spectrophotometry”, Anal. Chim. Acta (1995) 316, 185–193.
- ¹⁰ Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B. Nystrom, A., Petterson, J. and Bergman, R. “Experimental Design and Optimization”, Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems (1998), 42, 3.

CAPITULO V

5.1. Generalidades sobre los Piridilazo Reactivos

La mayor parte de los piridilazo fenoles utilizados como reactivos cromogénicos en la determinación absorciométrica de numerosos iones metálicos se presentan como sólidos cristalinos, de diferentes colores dependiendo de la naturaleza y la cantidad de los sustituyentes presentes.

La característica común a los reactivos piridilazo es poseer en su estructura un grupo azo derivado de la 2-aminopiridina.

Estos reactivos son escasamente solubles en agua pero se solubilizan sin dificultad en alcoholes tales como metanol y etanol; en acetona, en dioxano, y también en cloroformo, en 1,2-dicloroetano, en benceno, etc.

De los resultados obtenidos por diversos investigadores¹ y, de los derivados de la experiencia desarrollada en el Grupo de Trabajo del Área de Química Analítica de UNSL, se desprende que las diferencias de comportamiento más notorias, están condicionadas básicamente, al grupo sustituyente ubicado sobre el anillo bencénico en la posición orto respecto del grupo "azo".

Estos sustituyentes pueden ser amino, u oxidrilo; mostrando claras diferencias de comportamiento en cuanto a la cantidad de reacciones químicas que pueden llevar a cabo según el sustituyente.

Existen marcadas diferencias en cuanto a la menor selectividad que muestran los reactivos cuyo sustituyente es el radical oxidrilo; en cambio, en lo que hace a la sensibilidad, ésta resulta similar, independientemente de que el radical sustituyente sea amino u oxidrilo.

Los reactivos piridilazo o-hidroxi sustituidos se combinan con iones metálicos a través de uniones covalentes y coordinadas, formando generalmente quelatos neutros, insolubles en agua, pero solubles en solventes orgánicos.

Los reactivos piridilazo o-amino sustituidos se combinan con los iones metálicos a través de uniones coordinadas dando origen a quelatos cargados, solubles en agua.

Estas significativas diferencias existentes entre los piridilazo reactivos, que si bien aparecen como las más interesantes, no son las únicas.

Es posible introducir modificaciones menores de comportamiento, en cuanto a la sensibilidad, efectuando diversas sustituciones tanto sobre el anillo bencénico, como piridínico.

Las variantes más ensayadas, han sido, sustitución de hidrógeno por halógenos sobre el núcleo de la piridina y, sustitución de hidrógeno en posición "para" respecto del grupo azo en el anillo bencénico, por amino mono o di sustituido.

El cambio más importante por su trascendencia, ha sido la sustitución de uno o dos hidrógenos por uno o dos átomos de un mismo halógeno. Algunos autores^{2,3} han encontrado que el sustituyente halógeno sobre la posición cinco produce aumento de sensibilidad con apreciable desplazamiento batocrómico; haciéndose más marcado según el siguiente orden: 5-Cl-R, 5-Br-R, 5-I-R; siendo aún mayor el efecto cuando se incorpora un segundo halógeno en posición tres.

Asimismo, se encuentra que debido a esta sustitución se incrementa el carácter ácido del hidrógeno fenólico. Otra variante ensayada en el sentido de mejorar la sensibilidad de las reacciones cromáticas utilizadas en este tipo de metodología absorciométrica ha sido la inclusión en posición "para" respecto del grupo azo (anillo bencénico), mono o di-sustituído por grupos dadores de electrones.

Han sido utilizados preferentemente metil y etil derivados produciendo aumento de la sensibilidad en ese orden respecto de compuestos similares carentes de la agrupación mencionada.

La síntesis química de los reactivos piridilazo no es simple, y su rendimiento en general es bajo; una vez obtenida la droga sólida se conserva bien.

Sus disoluciones en alcoholes son estables a temperatura ambiente, cuando se las guarda al abrigo de la luz.

Esta situación ha hecho que numerosos investigadores realizaran esfuerzos para lograr nuevos derivados, en procura de aumentar la selectividad y sensibilidad de la reacción cromática, logrando, en muchos casos, propuestas de metodologías analíticas simples que compiten en su sensibilidad con otras que requieren de sofisticados y costosos equipos, como por ejemplo, Espectrometría de Absorción Atómica, Espectroscopía Atómica de Emisión producida por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-AES) y Fluorescencia de Rayos X.

Los reactivos piridilazo precursores de los que actualmente constituyen una serie abundante han sido el 1-(2-piridilazo)-1-naftol (PAN) y el 4-(2-piridilazo)-resorcinol (PAR).

En la actualidad el 2-(5-Bromo-piridilazo)-5-dietilaminofenol (5-Br-PADAP) junto a PAN y PAR son preparados por diversos laboratorios especializados, por lo que resultan asequibles.

5.1.1. El reactivo complejante PAN

PAN es la abreviatura de 1-(2-piridilazo)-2-naftol. Es una sustancia roja, insoluble en agua pero fácilmente soluble en alcohol y otros solventes orgánicos. El PAN forma complejos (usualmente rojos) con muchos metales polivalentes, pero no forma complejos coloreados con los metales alcalinotérreos o con el aluminio. Esto constituye una gran ventaja al ser utilizado como reactivo colorimétrico para la determinación de metales a niveles de vestigios.

El PAN por debajo de pH 8 es amarillo. Los complejos metálicos también son insolubles en agua, por lo que se hace necesario agregar una sustancia tensoactiva al medio que permita mantenerlos en solución o también se puede agregar etanol a la solución en distintas proporciones.

El PAN forma complejos muy estables, especialmente con Cobalto, Cobre, Zinc, Cadmio⁴ y Escadnio.

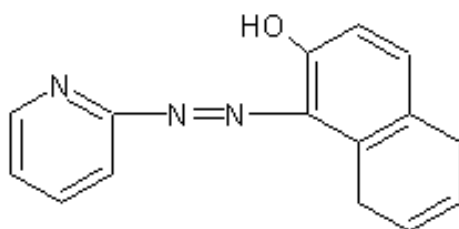


Figura 5.1. Fórmula del reactivo PAN

Este reactivo presenta también actividad ácido base, las constantes de disociación según la bibliografía disponible le corresponden los siguientes valores: $K_1 = 9,55 \times 10^{-2}$ y $K_2 = 1,15 \times 10^{-12}$ cuando la fuerza iónica del medio le corresponde un valor 1 mol L^{-1} .^{5,6}

5.1.2. El reactivo complejante 5-Br-PADAP

El reactivo fue inicialmente sintetizado y utilizado por Johnson y Florence¹ para la determinación espectrométrica de Uranio.

El 5-Br-PADAP se obtiene por reacción de amida sódica suspendida en tolueno y calentada a reflujo con agitación mecánica en atmósfera de nitrógeno con 2-amino-5-Br-piridina disuelta en benceno.

El precipitado obtenido, 5-Br-2-piridildiazotato, disuelto en solución hidroetanólica, se hace reaccionar con m-dietilaminofenol disuelto en etanol y en atmósfera de anhídrido carbónico.

El producto obtenido es purificado por sucesivas recrystalizaciones en etanol-agua (50% v/v).

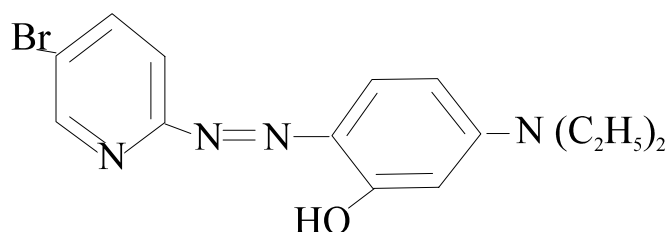


Figura 5.2. Fórmula del reactivo 5-Br PADAP

El reactivo 5-Br-PADAP se presenta bajo la forma de cristales de coloración rojo púrpura. La solubilidad del reactivo en agua es muy escasa y sus soluciones manifiestan carácter ácido muy débil. Es soluble en metanol, dioxano, acetona, cloroformo, menos soluble en etanol y alcohol isoamílico.

La solubilidad en medio acuo-alcohólico cambia con la acidez, por ende la naturaleza de las especies moleculares disueltas por lo que, las curvas espectrales de las soluciones manifiestan modificaciones importantes, todo lo cual revela la existencia de interacciones, consecuencia de reacciones de protólisis de acuerdo al siguiente esquema de la figura 5.3.

Las constantes de disociación ácida obtenidas por Johnson y Florence¹ muestran los siguientes valores:

$$pK_{a_1} = 0,1 \pm 0,1 \quad pK_{a_2} = 2,02 \pm 0,05 \quad pK_3 = 11,30 \pm 0,04$$

Con estos datos de constantes de protólisis se calcularon y trazaron las curvas de distribución de especies ácido-base del reactivo en función del pH. Figura 5.4.

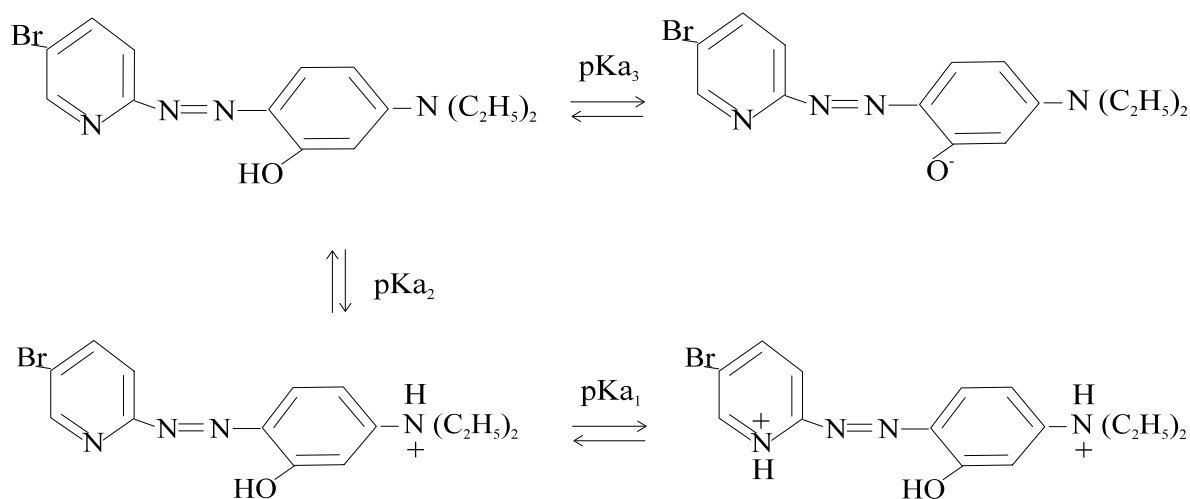


Figura 5.3. Reacciones de protólisis del 5-Br PADAP

Estas curvas serán utilizadas posteriormente para la dilucidación de algunas reacciones de complejación del 5-Br-PADAP con el Pb(II), ya que permitirán decidir cuales son las especies químicas del reactivo prevalecientes en el ámbito de pH en que tenga lugar la reacción de complejación.

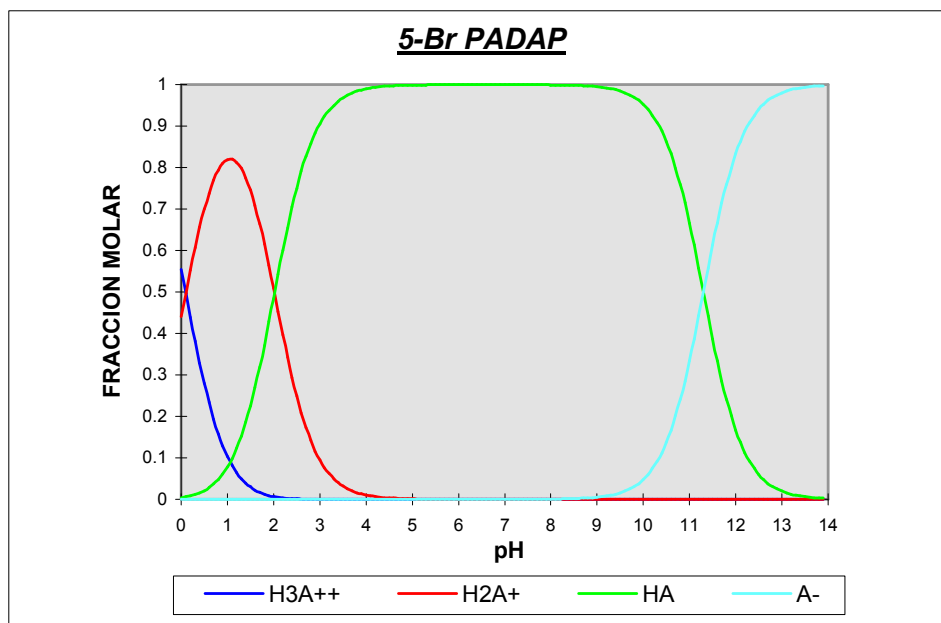


Figura 5.4. Curvas de distribución de especies del reactivo 5-Br-PADAP en función del pH

Lo más frecuente es que el reactivo y el metal complejoado se combinen en relaciones molares 1:1 ó 2:1, salvo el caso de algunos complejos que forman elementos plurivalentes que lo hacen en relación 3:1.

De la información de diversas fuentes⁷ puede inferirse que no existe una vinculación directa entre los estados de oxidación de los distintos elementos y la estequiometría de la reacción de los mismos, con 5-Br-PADAP.

Algunos autores^{8,9}, atribuyen las diferentes estequiometrías que se obtienen para un mismo estado de oxidación de un mismo elemento a que puedan variar cuando la reacción transcurre en presencia o no de un tensoactivo.

Un ejemplo, es el caso del Zn(II) para el que en condiciones similares de acidez, diversos autores^{10,11,12} encuentran estequiometrías 1:1 y 2:1 (R:Me) en ausencia y presencia de tensoactivo respectivamente.

De algunas de las experiencias del Grupo de Química Analítica de la UNSL, para los casos en que se forman especies extraíbles mediante solventes orgánicos donde el número de moléculas del reactivo es menor que la valencia del ión metálico, la

formación de complejos con ligandos mixtos es probable, y en ello, pueden estar involucrados fenómenos de impedimento estérico.

No obstante, podría excluirse de la explicación anterior a ciertos casos, como V(V), Ti(IV), Sb(III), Ta(V), Bi(III), Nb(V), etc., cuya conocida aptitud de formar oxocaciones, aún en medios ácidos, puede posibilitar la formación de complejos eléctricamente neutros combinándose con un número de moléculas que sea bastante inferior a la valencia real del ión metálico.

En lo que respecta a la selectividad se observa que la mayoría de los complejos que forma el reactivo 5-Br-PADAP con los lantánidos presentan la máxima absorción en el intervalo de 550-620 nm, siendo en muchos casos el intervalo de acidez para la formación de dichos complejos bastante amplio.

Por este motivo las técnicas absorciométricas donde se utiliza 5-Br-PADAP son de escasa selectividad, dado que no solo se producen interferencias espectrales, sino que también existe consumo de reactivo por parte de iones concomitantes.

Esto ha hecho que investigadores se dediquen a la búsqueda de nuevas metodologías analíticas en la que se asocie a la elevada sensibilidad de la reacción cromática, la adecuada selectividad.

5.2. Reactivos Utilizados Durante el Desarrollo del Trabajo

5.2.1. Solución de 5-Br-PADAP ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)

Se disolvieron 0,0698 g del reactivo 5-Br-PADAP en un vaso de precipitación con un pequeño volumen de etanol 96% (v/v, destilado), y posteriormente se transfirió a un matraz de 100 mL, y se completó el volumen con el mismo solvente.

A partir de ésta, se prepararon por dilución con etanol las soluciones de concentraciones menores. El reactivo 5-Br-PADAP se adquirió a Aldrich Chemical Co. y previo a la preparación de sus soluciones se purificó por sucesivas recristalizaciones en etanol-agua 50% (v/v).

5.2.2. Solución de PAN ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$)

Se disolvieron 0,0498 g del reactivo PAN marca Fluka, en un vaso de precipitados con un pequeño volumen de etanol 96%, y posteriormente se transfirió a un matraz de 100 mL, y se completó el volumen con el mismo solvente. A partir de ésta, se prepararon por dilución con etanol las soluciones de concentraciones menores.

5.2.3. Solución "tipo" de Cd(II) (1000 ppm)

Dilución a partir del patrón marca Merck Titrisol de 1,0 g de Cd(II) por litro.

5.2.4. Solución "tipo" de Pb(II) (1000 ppm)

Dilución a partir del patrón marca Merck Titrisol de 1,0 g de Pb(II) por litro.

5.2.5. Solución "tipo" de Ca(II) ($1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$)

Se preparó disolviendo 0,25 g de CaCO_3 de calidad reactivo analítico en aproximadamente 20 mL de $\text{HCl } 0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

Una vez disuelto completamente el sólido, se transfirió cuantitativamente a un matraz aforado de 250 mL y se completó a volumen con agua bidestilada.

5.2.6. Solución de EDTA ($1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$)

Se preparó disolviendo 1,8613 g de EDTA. p.a. en un pequeño volumen de agua bidestilada, y luego se transfirió a un matraz de 500 mL y se completó a volumen con agua bidestilada.

El título de esta solución se determinó por valoración contra una solución "tipo" de CaCO_3 .

5.2.7. Solución reguladora de Amoníaco Cloruro de amonio

Se mezclaron 1,1 g de NH_4Cl con 5 mL de $\text{NH}_3(\text{c})$ bajo campana, posteriormente se diluyó con agua bidestilada y se llevó a volumen en matraz aforado de 100 mL.

5.2.8. Solución de Tetraborato de sodio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$

3,8144 g de tetraborato de sodio decahidratado se disuelven en 50 mL de agua destilada y luego se lleva a 500 mL con agua exenta de dióxido de carbono.

5.2.9. Solución de indicador Arsenazo

Se disuelven 0,5 g de arsenazo (sal trisódica del ácido 3-(2-arseno fenilazo)-4,5-dihidroxi-2,7-naftalendisulfónico) en 100 mL de agua bidestilada, con la ayuda de un agitador magnético¹³.

5.2.10. Solución de Tritón X-100 (5% v/v).

Se preparó mezclando 5 mL de Tritón X-100 (eter octilfenol poli (etilenglicol)) con agua bidestilada y llevando a un volumen final de 100 mL.

5.2.11. Resina aniónica Dowex 1X8

Para el desarrollo de los sensores de Cd(II) y Pb(II) se utilizó la resina aniónica marca Dowex 1 X8 de 200/400 mallas en forma clorurada marca Fluka de densidad de $0,71 \text{ g cm}^{-3}$. Ésta es una resina del tipo aniónica fuerte con grupos de intercambio amonio cuaternario (NH_4^+).

La resina debió purificarse y regenerarse previo a su uso. Para ello se toma una masa de resina a purificar, 10 g por ejemplo, y se la suspende en un volumen de agua equivalente. Se lo agita y separa por centrifugación. Este ciclo se repite al menos 10 veces. Luego se suspende la resina en un volumen equivalente de HCl $3 - 4 \text{ mol L}^{-1}$ durante 2 horas para regenerar su forma clorurada. Por último se la lava con agua destilada repetidas veces hasta obtener una reacción negativa de detección de cloruros con nitrato de plata en el agua de lavado.

5.2.12. Resina Silica C-18

Adsorbente no polar, se la utiliza para el fraccionamiento de muestras de aguas naturales. Se trata de C_{18} unido a Silica gel marca Sigma-Aldrich. Posee 60 \AA de diámetro promedio de poro y $40 - 63 \text{ \mu m}$ de tamaño de partícula. La resina fue utilizada en su forma original directamente desde el envase, sin pretratamientos.

5.3. Instrumental y Materiales.

5.3.1. Medidas absorciométricas

Para las medidas absorciométricas y trazado de curvas espectrales en UV-Visible se utilizó un espectrofotómetro Metrolab 1700. Las celdas fueron de vidrio o cuarzo, y el paso óptico en todos los casos fue de 10 mm para las mediciones en solución. Para las mediciones en fase sólida se utilizaron celdas de 1 mm de paso óptico colocadas en el mismo espectrofotómetro con un adaptador para el porta cubetas.

5.3.2. Titulaciones

Las titulaciones se realizaron con bureta de vidrio convencional calibradas, de 10 - 25 y 50 mL de capacidad.

5.3.3. Medidas y ajustes de pH

Se utilizó un pH-metro Orion modelo 701-A provisto de electrodo combinado de vidrio, con referencia interna de Ag-AgCl.

5.4. Cadmio

5.4.1. Parámetros que afectan la formación del complejo Cd-PAN

Por ser el PAN y su complejo con Cd(II), muy poco solubles en agua, fue necesario preparar las soluciones del reactivo en etanol.

En todos los casos se hizo necesario la incorporación de un agente tensoactivo que permitiera mantener como un sistema homogéneo al quelato formado y al exceso de reactivo necesario, y que a la vez produjera un aumento en la sensibilidad. La concentración de dicho tensoactivo es una de las variables de estudio en la optimización.

El Cd(II) a partir de sus soluciones acuosas, reacciona con el PAN en presencia de un tensoactivo no-iónico (Tritón X-100), para formar un complejo de color rojo violáceo que se desarrolla completamente luego de 10 minutos de promovida la reacción.

5.4.2. Influencia del pH

La influencia del pH sobre la formación del complejo Cd(II)-PAN se estudió en solución, dado que la formación del complejo Cd(II)-PAN se produce en la fase líquida previo a su fijación en la fase sólida (resina).

Se toman 100 mL de muestra conteniendo al menos 0,1 mg de Cd(II), y se le adicionaron a continuación los siguientes reactivos: 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v), 0,5 mL de solución de PAN $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ y 1,0 mL de KI $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Finalmente se hizo variar el pH de la solución obtenida agregando soluciones de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Los valores de pH ensayados estuvieron comprendidos entre 5 y 12.

La gráfica obtenida de representar los diferentes valores de absorbancia medidos versus los diferentes valores de pH medidos potenciométricamente, luego de homogeneizar cuidadosamente las soluciones, puede verse en la Figura 5.5.

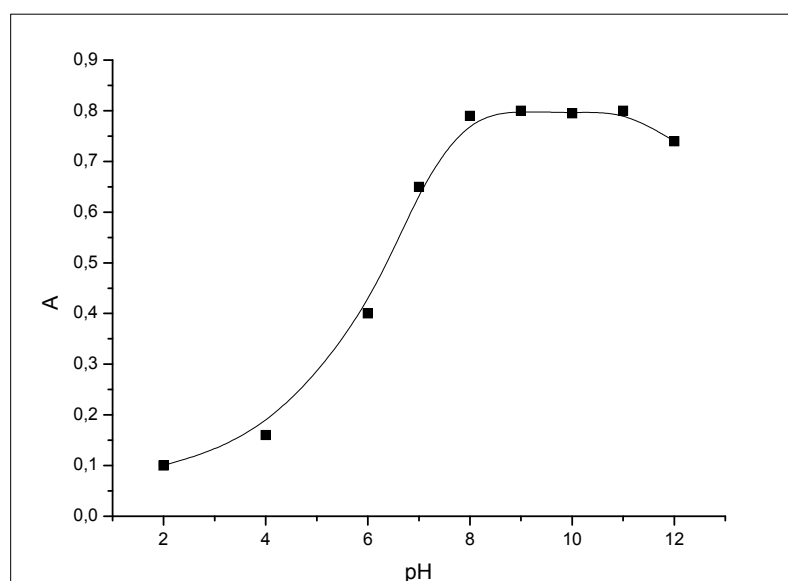


Figura 5.5. Dependencia del pH de la formación del complejo Cd(II)-PAN

Se observa que el intervalo de pH óptimo para la obtención de la máxima absorbancia se encuentra en el rango que va desde 8,5 a 10,5 unidades de pH para la formación del complejo Cd(II)-PAN

5.4.3. Composición y concentración de la solución reguladora

En la evaluación de formación del complejo Cd(II)-PAN en función de la acidez se concluye que el intervalo óptimo se encuentra comprendido para valores de pH que van desde 9 hasta 11 Para satisfacer esta necesidad se evaluaron diferentes soluciones reguladoras que pudieran cubrir este ámbito de pH La composición de la soluciones reguladoras que se evaluaron fueron las que permiten alcanzar el valor de pH mencionado.

Los resultados que se obtuvieron para ambas mezclas: amoníaco/cloruro de amonio y ácido bórico/borato de sodio, fueron similares. Por razones de comodidad y además por mejor estabilidad de sus soluciones se optó por la segunda.

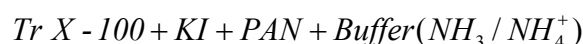
Por otro lado, se encontró que cambios apreciables en la concentración analítica de la solución reguladora de amoníaco/cloruro de amonio, no experimenta modificaciones en los valores de absorbancia del complejo.

5.4.4. Orden de adición de los reactivos

El estudio del orden de agregado de reactivos se realizó en solución, dado que la formación del complejo Cd(II)-PAN se produce en la fase líquida previo a su fijación en la fase sólida (resina).

Se toman 100 mL de muestra conteniendo al menos 0,5 mg de Cd(II), y se le adicionaron a continuación los siguientes reactivos: 0,5 mL Tritón X-100 (5%), 0,5 mL de solución de PAN $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ y 1,0 mL de KI $1,0 \text{ mol L}^{-1}$.

Las variaciones en la absorbancia observadas al alterar el orden de agregado de los reactivos fueron inferiores al 5%, exceptuando el caso en el que se agregaba en primer orden a la solución reguladora de pH. Se elige finalmente el siguiente orden de agregado de reactivos para el resto del trabajo:



5.4.5. Selección de la resina

En la espectrofotometría en fase sólida el primer objetivo que se plantea es la elección del soporte adecuado sobre el que se fija el compuesto en estudio.

Se realizan, en placa de toque, varios ensayos cualitativos de fijación del compuesto en los soportes aniónicos: Dowex 1X8 y de adsorción: Amberlite XAD 7 y Amberlite XAD 16, realizando simultáneamente un ensayo en blanco para cada uno.

Se eligió el soporte aniónico Dowex 1X8, ya que en él la fijación fue rápida y completa, con el resto de las resinas la fijación no fue completa, esto se detecta dado que la solución permanece coloreada luego de un tiempo de contacto prudencial, y además presentan la desventaja de una elevada opacidad al paso de la luz a las longitudes de onda de trabajo.

5.4.6. Aumento de la sensibilidad en fase sólida

Se observa un gran aumento en la sensibilidad de la determinación de Cd(II), mediante la fijación del complejo Cd(II)-PAN, extraído de un gran volumen de solución (fase líquida) a la fase sólida o fase resina.

Por ejemplo si en la primer etapa el complejo coloreado se encuentra en 50 mL de muestra y luego se lleva a un volumen efectivo de 0,240 mL (dimensiones de la cubeta: 1 mm x 8 mm x 30 mm), que es el volumen ocupado por la resina en la cubeta

de 1 mm de paso óptico, representa un aumento de la concentración en un orden de 208 veces.

$$\text{Relación de extracción: } \frac{\text{volumen}_{\text{muestra}}}{\text{volumen}_{\text{resina}}} = \frac{50\text{mL}}{0,240\text{mL}} = 208$$

Dicho aumento de la sensibilidad puede comprobarse preparando una solución de concentración conocida de analito ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) y realizando a continuación en forma paralela la determinación del Cd(II) en ambas fases.

Como se evidencia, al comparar los máximos de absorción obtenidos para cada metodología se observa un gran aumento en el valor de la absorbancia neta al trabajar en fase resina. Dicho aumento se correlaciona con una notable mejora de la sensibilidad de la metodología para una misma reacción cromática. Se evidenció también en la experiencia que tanto en la fase resina como en la solución, el máximo de absorción para el complejo Cd(II)-PAN se encuentra a 550 nm.

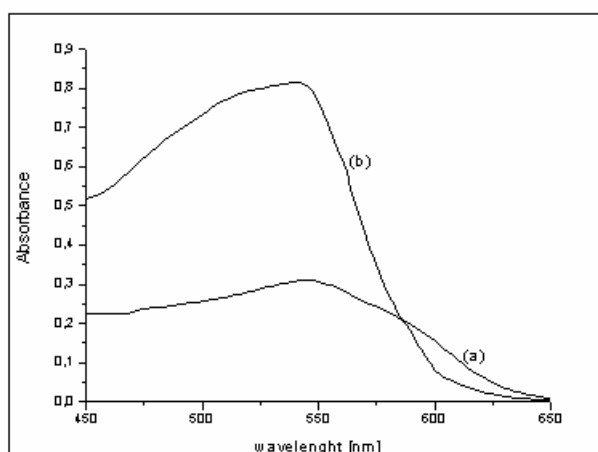


Figura 5.6. Comparación de espectros obtenidos en fase resina (b) y en solución (a).

5.4.7. Estudio de la influencia de las variables químicas

Las variables químicas a ser estudiadas una vez seleccionado el pH, composición y concentración del buffer y el orden de agregado de los reactivos son tres. Concentración del reactivo PAN, concentración del tensoactivo no iónico Tritón X-100 y la concentración del reactivo Ioduro de Potasio (necesario para la formación del complejo iodurado $[\text{CdI}_4]^{2-}$ que posibilita luego su fijación a la resina aniónica).

Para estudiar la influencia de cada uno de estas tres variables sobre la respuesta (Absorbancia máxima) se realiza un estudio inicial tipo de mapeo o screening. Los

valores asignados como niveles máximos y mínimos para cada variable se seleccionaron a partir de ensayos previos semi-cuantitativos, dichos valores asignados y los resultados obtenidos pueden verse en la siguiente tabla. Para los cálculos de las absorbancias netas se tuvieron en cuenta los cálculos explicados en la sección 2.4.

Experimento	(A) Tr X-100	(B) KI	(C) PAN	Abs
1	10	10	2	0,165
2	10	2	10	0,190
3	2	10	2	0,171
4	10	2	2	0,050
5	2	10	10	0,267
6	2	2	2	0,042
7	2	2	10	0,210
8	10	10	10	0,240

Luego, con los datos obtenidos, se realiza un Análisis de la Varianza para cada una de las variables (ANOVA), con el objeto de determinar su influencia en la varianza de la respuesta. Dicho análisis tipo ANOVA se basa en un diseño factorial totalmente aleatorizado para dos niveles de cada una de las tres variables. Los resultados de dicho análisis pueden verse en la tabla 5.1. Y también se grafica la significancia de cada uno de los factores y sus interacciones en la gráfica de Pareto (Figura 5.7.).

Tabla 5.1. ANOVA para las variables químicas

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F-valor	P-Valor
A:Trx100	0,00025	1	0,00025	41,33	0,0982
B:IK	0,01540	1	0,01540	2514,31	0,0127
C:PAN	0,02868	1	0,02868	4682,47	0,0093
AB	0,00006	1	0,00006	9	0,2048
AC	0,00030	1	0,00030	49	0,0903
BC	0,00235	1	0,00235	383,04	0,0325
Error Total	0,00001	1	0,00001		

Del análisis de los resultados se concluye que la variación de la concentración de KI y PAN, como así también la interacción entre ellas, son significativas estadísticamente. En cuanto a la variación de la concentración de Triton X-100 y las demás interacciones no resultan significativas estadísticamente, por lo que no serán tenidas en cuenta en el diseño de optimización de superficie de respuesta.

Gráfico de Pareto estandarizado para Abs

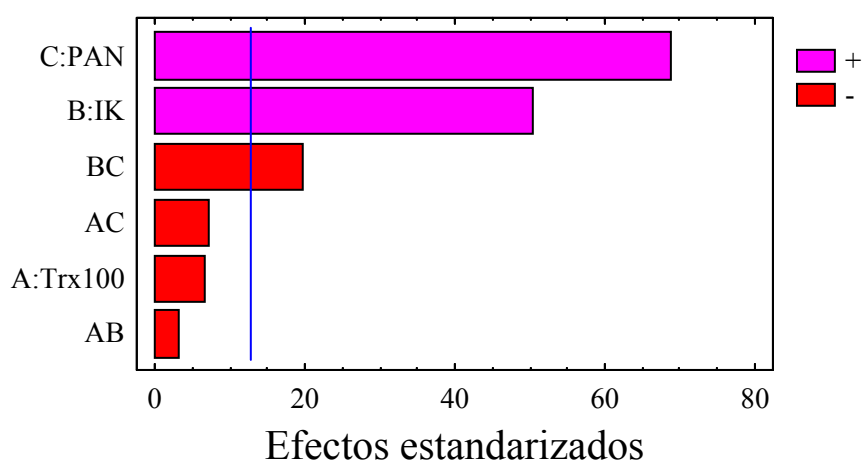


Figura 5.7

5.4.8. Optimización de la concentración de KI y PAN por el método de Doehlert

Se aplica el diseño de Doehlert¹⁴ para el análisis de regresión de superficie de respuesta en búsqueda de los valores óptimos para las variables, concentración de KI y concentración de PAN, según los resultados obtenidos en el estudio de screening o de influencia de las variables químicas.

Se fija la concentración de Triton X-100 en 0,05% v/v en la muestra, que se obtiene agregando 0,5 mL de solución de Triton X-100 a 50 mL de muestra.

Luego si se grafican los niveles asignados para el diseño de Doehlert para dos variables, puede observarse una figura romboidal, un hexágono regular (Figura 5.8.), donde cinco niveles se asignan a la variable de mayor peso o importancia (PAN en este caso) y tres a la otra variable (Tritón X-100)

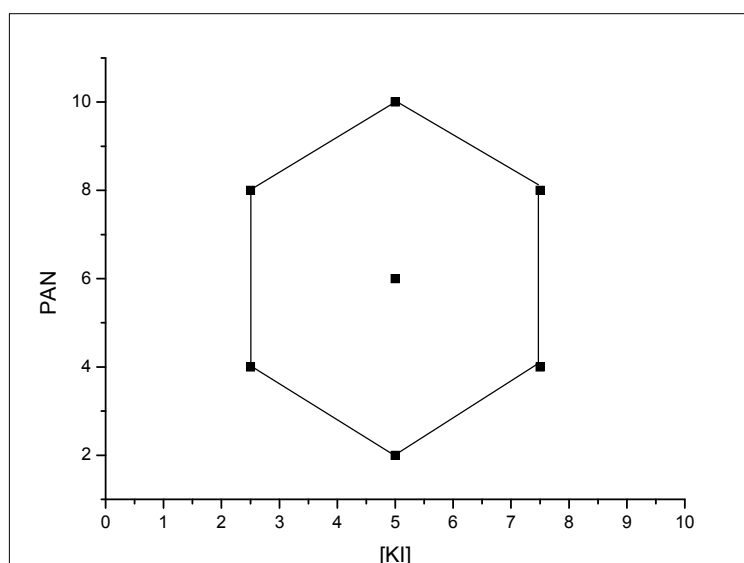


Figura 5.8. Diseño de Doehlert para los valores asignados a las variables [KI] y [PAN]

Se obtiene entonces siete puntos experimentales que deben medirse, para poder procesarse y obtenerse los coeficientes por regresión cuadrática de la siguiente ecuación:

$$A_{net} = a + b[PAR] + C[Triton] + d[PAN]^2 + e[Triton]^2 + f[PAN][Triton]$$

Donde: a es el término independiente, b y c son coeficientes de los términos lineales, d y e son coeficientes cuadráticos y f es el coeficiente de interacción. Cada coeficiente representa la proporción de la variabilidad total de la variable dependiente, que es explicada por la ecuación de regresión. Finalmente se hace la propuesta para el primer diseño.

5.4.8.1. Diseño 1

El primer diseño propuesto se encuentra centrado en el punto $[PAN] = 6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ y $[KI] = 2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 5.8.). El punto central se replica por lo menos tres veces para poder evaluar la curvatura de la superficie. Todas las experiencias se

realizaron por triplicado. Los niveles asignados para cada variable y los resultados obtenidos para la absorbancia neta para cada experiencia figuran en la tabla 5.2.:

Tabla 5.2. Diseño 1 – Basado en el modelo de Doehlert

Experimento	[PAN] x 10 ⁶ mol L ⁻¹	[KI] x 10 ² mol L ⁻¹	A _{neto}
1	2 (-1)	2 (0)	0,331
2	4 (- 0.5)	3 (+1)	0,421
3	4 (- 0.5)	1 (-1)	0,412
4	6 (0)	2 (0)	0,695
5	8 (+ 0.5)	3 (+1)	0,551
6	8 (+ 0.5)	1 (-1)	0,596
7	10 (+ 1)	2 (0)	0,574
4'	6	2	0,690
4''	6	2	0,694
4'''	6	2	0,692

La ecuación que corresponde a la regresión, genera la siguiente ecuación para la superficie de respuesta:

$$A_{net} = 0.695 + 0.0333[PAN] - 0.0090[KI] - 0.0067[PAN][KI] - 0.0156[PAN]^2 - 0.139[KI]^2$$

A continuación se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), del que resulta la tabla del análisis de la varianza (Tabla 5.3.) obtenida para la regresión de la superficie de respuesta:

La tabla de ANOVA permite validar estadísticamente el modelo aplicado, en primer lugar divide la variabilidad correspondiente a la variable de respuesta, Absorbancia Neta (ABS) en distintos segmentos separados para cada uno de los efectos. La significación estadística de cada efecto comparando la media al cuadrado, contra una estimación del error experimental. En este caso, 3 de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza. El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 99,48% de la variabilidad en ABS. El estadístico R-cuadrado ajustado, el cual es más

adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es 98,83%. El error estándar de la estimación muestra la desviación normal de los residuos para ser 0,0146195.

El error absoluto de la media de 0,0078 es el promedio del valor de los residuos. El estadístico Durbin-Watson examina los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos. Puesto que el p-valor es superior a 0,05, no hay indicios de correlación de serie en los residuos.

Tabla 5.3. Tabla ANOVA para validar el modelo aplicado

Fuente	Suma de cuadrados	G L	Cuadrados medios	F-valor	p-valor
A: PAN	0,05333	1	0,05333	249,54	0,0001
B: KI	0,00032	1	0,00032	1,52	0,2857
AA	0,07696	1	0,07696	360,08	0,0000
AB	0,00073	1	0,00073	3,41	0,1385
BB	0,04494	1	0,04494	210,25	0,0001
Error Total	0,00085	4	0,00021		
Total	0,16543	9			

R-cuadrado = 99,4832%

R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98,8372%

Error Estándar de estimación = 0,0146195

Error absoluto de la media = 0,0078

Estadístico Durbin-Watson = 1,76966 (p = 0,2908)

Autocorrelación residual Lag 1 = 0,0329467

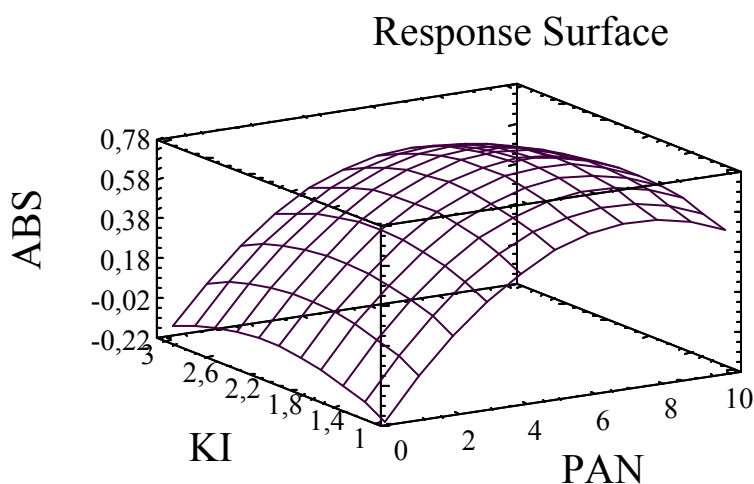


Figura 5.9. Vista de la superficie de respuesta calculada

Contornos de Superficie de la Respuesta Estimada

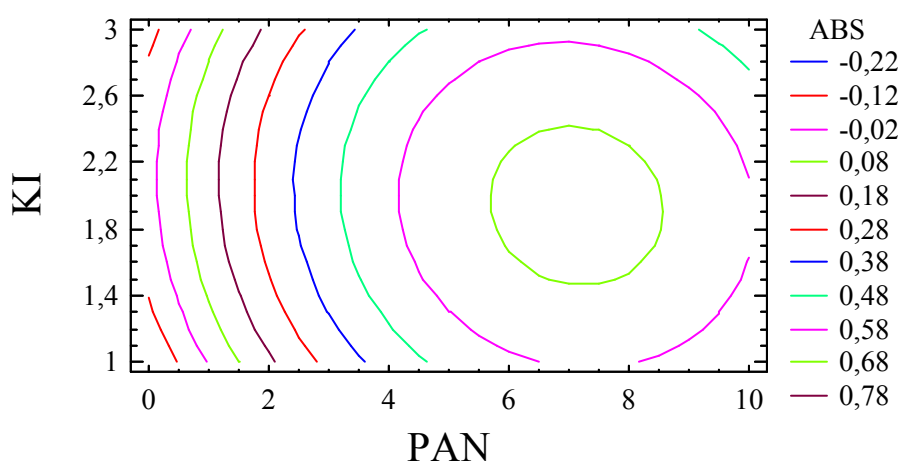


Figura 5.10. Diagrama de contornos de la superficie de respuesta

La superficie de respuesta para esta ecuación aparece representada en forma tridimensional en la Figura 5.9. y en graficada como gráfica de contornos de superficie en la figura 5.10. La aplicación del criterio de Lagrange a esta última ecuación indica que aparece un máximo con las siguientes coordenadas: $[PAN] = 7,12 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ y $[KI] = 1,94 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, le corresponde una respuesta de 0,712 de absorbancia neta. Como se puede observar, dicho máximo aparece en la zona central derecha de la superficie definida por el campo experimental, dada la proximidad del punto

estacionario calculado con el experimento central, no resulta necesario continuar con el proceso de optimización.

5.4.9. Influencia de la cantidad de resina

En todo sistema heterogéneo, una disminución en el volumen o masa de las fases trae como consecuencia el aumento de la concentración de soluto en el equilibrio en dicha fase.

Se realiza esta experiencia para determinar la influencia que en el valor de la absorbancia ejerce la cantidad de resina utilizada y determinar a la vez, la mínima cantidad de ésta, que sin aumentar en gran medida el tiempo de agitación, produzca una absorbancia máxima.

En tubos de centrífuga plásticos con tapa a rosca, se coloca solución estándar, conteniendo al menos 2,5 μg de Cd(II), se le adicionaron a continuación los siguientes reactivos: 0,5 mL Tritón X-100 (5%), 0,4 mL solución de PAN $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ y 0,2 mL KI $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Finalmente se le agregó 1 mL de buffer $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ y se lleva a volumen final de 50 mL en matraz aforado. Seguidamente se agregaron cantidades crecientes de resina, agitando 20 minutos. Se empaquetó la resina en las cubetas, midiendo la absorbancia tanto de las muestras como la de sus respectivos blancos. En la gráfica se representan los valores obtenidos que pueden observarse en la figura 5.11.

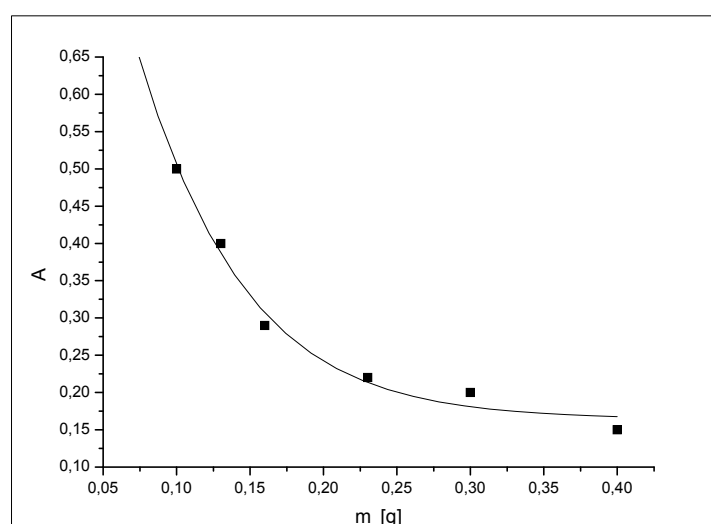


Figura 5.11. Influencia de la cantidad de resina

Se observa que conforme aumenta la cantidad de resina utilizada, la absorbancia decrece debido a que se fija una cantidad prácticamente constante de compuesto en la fase sólida sobre cantidades crecientes de resina, lo que da lugar a su dilución en esta fase.

La cantidad de resina que proporciona una máxima absorbancia es 0,0700 g que es una cantidad fácilmente transferible con gotero.

Si se realiza la transformación logarítmica de los valores experimentales de la absorbancia y de las masas de resina (Figura 5.12.). Se procede luego a un ajuste por mínimos cuadrados.

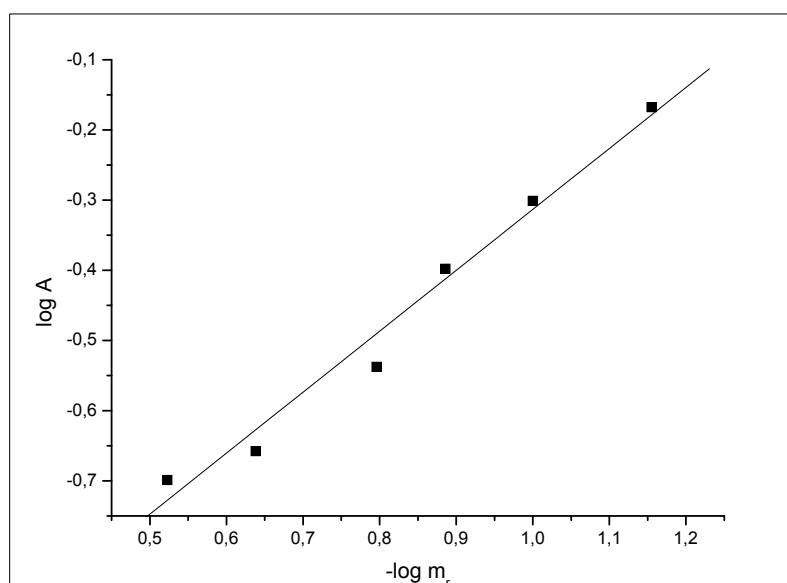


Figura 5.12. Influencia de la cantidad de resina

Se obtiene así la ecuación:

$$\log A = -1,175 - 0,8621 \log m_r$$

A : Absorbancia neta del compuesto

m_r : masa de resina expresada en gramos

A partir de esta ecuación es posible calcular el valor de la absorbancia para cualquier masa de resina a emplear, siempre que las condiciones de la experiencia sean las mismas y entre los límites de 70 y 300 mg.

De la ecuación logarítmica es posible obtener la ecuación de la hipérbola correspondiente a la figura 5.11.

$$A \times m_r^{0,8621} = 0,067$$

Se puede conocer los límites de confianza del exponente de m_r y del término independiente de esta ecuación si obtenemos el error estándar de la pendiente de la recta ajustada por mínimos cuadrados, S_b , y el error estándar de la ordenada al origen, S_a .

$$S_b = \sqrt{\frac{S_{y,x}^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}; S_a = S_b \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$$

Donde $S_{y,x}^2$ (varianza del error experimental total) vale:

$$S_{y,x}^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{n - 2}$$

Siendo:

a: ordenada en el origen de la recta de regresión

b: pendiente de la recta de regresión

n: número de parejas de datos

Los límites de confianza son respectivamente:

Para la pendiente: $b \pm tS_b$

Para la ordenada en el origen: $a \pm tS_a$

Siendo $t = t_{\text{student}}$ para $n-1$ grados de libertad a la probabilidad escogida ($P = 0,05$).

En este caso se obtiene:

$$b \pm tS_b = 0,8621 \pm 0,109$$

$$a \pm tS_a = -1,175 \pm 0,089$$

El primer resultado es también el límite de confianza para el exponente de la ecuación de la hipérbola. El segundo, convenientemente transformado pasando a antilogaritmos, es el límite de confianza para el término independiente, con lo que la ecuación de la hipérbola queda de la forma:

$$A \times m_r^{0,8683 \pm 0,109} = 0,067 \pm 0,014$$

Por lo que se puede afirmar que se trata de una rama de hipérbola equilátera.

Por otra parte, la relación entre el valor de la absorbancia, A , y la cantidad de resina, m_r , viene dada la ecuación:

$$A = \varepsilon_c I_R C_0 V / (m_r + V / D)$$

donde ε_c es la absortividad molar del compuesto en la fase resina ($\text{Kg mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), I_R es la longitud del paso de luz (cm), C_0 la concentración inicial de Cd(II) (mol L^{-1}), V el volumen de la disolución (L), D el coeficiente de distribución y m_r la masa de resina expresada en Kg. Dado que D , es muy alto, la fracción V/D puede ser despreciada frente a m_r cuando la cantidad de resina es suficientemente grande, se obtiene la ecuación aproximada que relaciona la absorbancia con la masa de resina, donde m_r viene expresada en g.

$$A = \varepsilon_c I_R C_0 V 1000 / m_r = K / m$$

Donde: $K = \varepsilon_c I_R C_0 V 1000$ es la pendiente de la representación gráfica de A frente a $1/m_r$.

El coeficiente de absortividad molar del compuesto en la fase resina, ε_c , puede ser calculado a partir del valor del coeficiente de absortividad molar aparente, ε , según la expresión:

$$\varepsilon_c = \frac{\varepsilon}{\frac{V}{(m_r + V/D)}}$$

Se obtuvo un valor medio de $22540 \text{ Kg mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (el cálculo del valor del coeficiente de distribución $D = 117600 \text{ L Kg}^{-1}$, se calcula en la sección siguiente). Suponiendo $I_R = 0,1 \text{ cm}$, el valor expresado para K, según la expresión anterior será:

$$K = 22540 \times 0,1 \times 4 \times 10^{-7} \times 0,05 \times 1000 = 0,045$$

Luego se representan los valores experimentales de A frente a $1/m_r$ (Figura 5.13.) se obtiene el valor de la pendiente para la ecuación empírica:

$$A = 0,0336 + 0,0454 / m_r$$

Resultado que concuerda muy con bien con el predicho teóricamente.

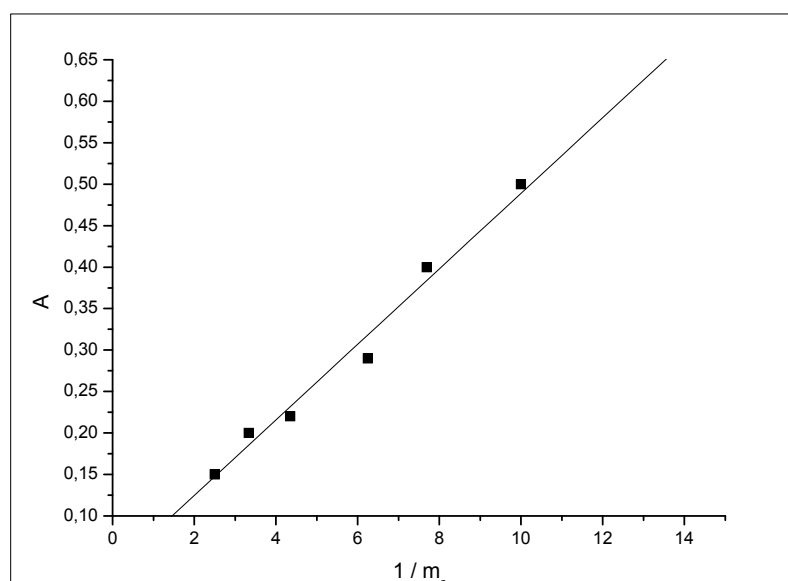


Figura 5.13.

5.4.10. Influencia del tiempo de agitación

Para determinar el tiempo mínimo a partir del cual se alcanza la señal máxima, se repite la determinación de Cd(II) en muestras de igual concentración pero sometidas a diferentes tiempos de agitación.

Para este estudio se colocó en tubos plásticos de centrifuga con tapa a rosca, volumen necesario de solución estándar de Cd(II) para alcanzar la masa de 2,5 μg de Cd(II), a cada uno de los tubos adicionó a continuación los siguientes reactivos: 0,5 mL Tritón X-100 5%, 0,4 mL solución de PAN $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ y 0,2 mL KI $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Finalmente se le agregó 1 mL de buffer $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ y se llevó a volumen final de 50 mL con agua destilada. Finalmente se añadió 70 mg de resina, y se agitó según los distintos tiempos ensayados, por último se midió la absorbancia frente al blanco respectivo, una vez empaquetada la resina. Los valores obtenidos se representan gráficamente en la figura 5.14.

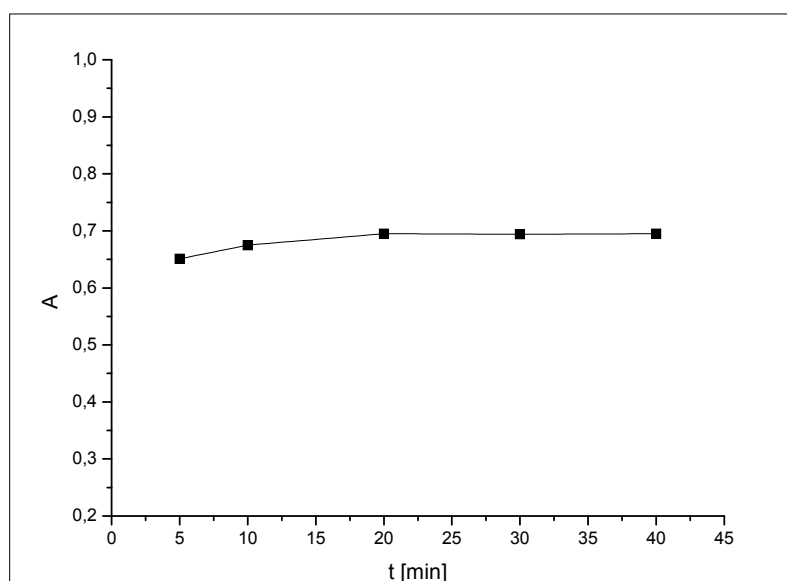


Figura 5.14. Influencia del tiempo de agitación

A partir de la misma se deduce que un tiempo de agitación de 20 minutos es suficiente para alcanzar el máximo de absorbancia. Este tiempo será utilizado sucesivamente para las demás experiencias.

5.4.11. Estabilidad del complejo fijado en la resina

Para conocer cual es la estabilidad del complejo Cd(II)-PAN una vez formado y fijado en la resina, en un tubo de plástico para centrifuga, se tomaron 50 mL de solución conteniendo 2.5 μg de Cd(II) y se le adicionaron en el orden siguiente: 0,5 mL Tritón X-100 5%, 0,4 mL solución de PAN $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ y 0,2 mL KI $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Finalmente se le agregó 1 mL de buffer $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. Seguidamente se añadieron 70 mg de resina, se agitó durante 20 minutos, luego se empaquetó en la celda la resina y se midió la absorbancia neta a distintos tiempos, frente al blanco, a las longitudes de onda seleccionadas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que el compuesto fijado en la fase sólida es sumamente estable (al menos durante 48 horas), lo cual representa una gran ventaja a la hora de realizar las mediciones de absorbancia neta.

5.4.12. Distribución del complejo entre la resina y la fase acuosa

El coeficiente de distribución D entre la resina sólida y la disolución acuosa equilibrada con ella viene dado para una especie química X por:

$$D = \frac{\text{milimoles}_{\text{sorbidos}}}{\text{milimoles}_{\text{solución}}}$$

Para calcular el valor del coeficiente de distribución de la especie objeto de estudio en las condiciones experimentales de trabajo, se prepararon cuatro disoluciones idénticas para un volumen final de 100 mL, conteniendo 50 μg de Cd(II), y luego se le agregaron Tritón X-100, solución de PAN $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, KI y solución buffer $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. Estas disoluciones se equilibraron durante 20 minutos con 100 mg de resina y a continuación se separó la resina por centrifugación y decantación bajo vacío, recogiendo la solución sobrenadante.

Para obtener la concentración del complejo Cd(II)-PAN que queda en la solución fue necesario establecer previamente la función de calibrado utilizando soluciones patrón de Cd(II).

Posteriormente se agregaron otros 100 mg de resina y se agitaron 20 minutos. Finalmente se interpoló la absorbancia del compuesto (obtenida en la forma habitual) en la recta de calibrado anteriormente citada, obteniéndose así la concentración c ($\mu\text{g L}^{-1}$) y de ella la cantidad de Cd(II)-PAN que queda en la solución. Con este dato se calculó la cantidad fijada a la resina. A partir de estos resultados se calcula el coeficiente de distribución.

Es necesario comprobar que en la segunda equilibración todo el compuesto ha quedado fijado en la resina, para lo cual la segunda disolución filtrada se equilibró de nuevo con 100 mg de resina observándose que en la resina no se desarrollaba color.

$$D = \frac{\text{milimoles}_{\text{sorbidos}} / \text{masa}_{\text{resina}}}{\text{milimoles}_{\text{solución}} / \text{volumen}_{\text{solución}}} = \frac{(50 - c \times 0,1) / 0,1}{c \times 10^{-3}}$$

La tabla 5.4. reúne los resultados obtenidos. Luego de realizar los cálculos estadísticos se obtiene un valor medio del coeficiente de distribución, $D = 117625 \text{ mL g}^{-1}$.

Tabla 5.4. Coeficiente de distribución del complejo Cd-PAN entre la disolución y la resina.

Disolución Nº	c Cd(II) [$\mu\text{g L}^{-1}$]	$\mu\text{g de Cd(II)}$ Disolución	$\mu\text{g de Cd(II)}$ Resina	D [mL g^{-1}]
1	4,21	0,421	49,58	117800
2	4,29	0,429	49,96	116500
3	3,99	0,399	49,96	125200
4	4,51	0,451	49,95	111000

5.4.13. Resumen de las condiciones seleccionadas para la medición de Cd(II)

A continuación se mencionan las condiciones óptimas para la determinación de Cd(II) por SPS.

<i>λ(nm) máximo</i>	550
<i>Volumen de muestra (mL)</i>	50
<i>Reactivo</i>	PAN
<i>Soporte sólido</i>	Dowex 1X8
<i>Masa de resina (g)</i>	0,070
<i>pH de trabajo</i>	9 – 11
<i>Buffer seleccionado</i>	$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$
<i>Tiempo de agitación (minutos)</i>	20

5.4.14. Parámetros analíticos para la determinación de Cd(II)

Con el objeto de evaluar la reproducibilidad del sensor para Cd(II), se realizaron 10 determinaciones en muestras que contienen igual concentración de analito, registrándose la respuesta a longitud de onda óptima.

Para el cálculo del límite de detección y cuantificación se realizaron 10 determinaciones de Cd(II) con agua bidestilada en lugar de solución patrón del analito. Se define al límite de detección como la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Se la expresa como concentración del analito. El límite de cuantificación es la mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable. Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para la determinación de concentración del analito. Se expresa como concentración del analito. Mediante el estudio estadístico de los resultados, se obtienen los valores de la desviación estándar relativa, límites de detección y cuantificación¹⁵.

El límite de detección para una magnitud, es el valor mínimo de la misma que puede afirmarse que es distinto de cero. En nuestro caso la magnitud medida es la absorbancia neta del analito, A . Denominaremos A_L al límite de detección de esta magnitud, al cual corresponda la incertidumbre sobre el valor de A cuando esta tiende a cero. Según el caso A_L es igual bien al límite de sensibilidad del aparato de medida, bien a la incertidumbre sobre los errores sistemáticos, o bien, a la incertidumbre sobre la precisión de los resultados.

Cuando A es igual a A_L , es decir cuando el error absoluto sobre la medida se iguala a la magnitud a determinar, entonces el valor obtenido cumple:

$$0 \leq A \leq A_b + 3\sigma$$

A_b : absorbancia media obtenida para el blanco

σ : desviación estándar para el blanco

Se admite entonces como límite de detección el valor:

$$A_L = A_b + 3\sigma$$

El límite de detección en términos de concentración, c_L , se obtendrá usando la función de calibrado:

$$c_L = (A_L - A_b) / m = 3\sigma / m$$

Donde m es la pendiente de la recta de calibrado.

Conforme la señal medida (en nuestro caso la absorbancia neta, A) crece por encima del límite de detección, crece la concentración aparente del analito. Como corolario, la región de cuantificación debe estar claramente por encima del límite de detección.

Se admite la siguiente definición:

$$A_Q = A_b + 10\sigma$$

A_Q : absorbancia correspondiente al límite de cuantificación

A_b : absorbancia del blanco

σ : desviación estándar para el blanco

El límite de cuantificación en términos de concentración, c_Q , se obtendrá a partir de la función de calibrado:

$$c_Q = (A_Q - A_b) / m = 10\sigma / m$$

Donde m es la pendiente de la recta de calibrado.

Los parámetros analíticos calculados se presentan en la tabla 5.5.

Tabla 5.5. Parámetros Analíticos para la determinación de Cd(II)

	Volumen de muestra
	50 mL
Pendiente ($\mu\text{g}^{-1} \text{L}$)	0,01444
Intersección	0,00864
Rango Lineal	5 – 100
Coefficiente de correlación (r)	0,9995
% R. S. D. (n = 10)	0,9
Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,22
Límite de cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,72

5.4.15. Estudio de las posibles interferencias

Una vez realizados los estudios necesarios para establecer las condiciones óptimas para la determinación del Cd(II), basados en la fijación y medición directa de la absorbancia en la fase sólida del complejo Cd(II)-PAN, se realiza el estudio de las posibles interferencias producidas por la presencia de distintas concentraciones de iones extraños. Se seleccionaron como posibles interferentes, aquellas especies que frecuentemente reaccionan con el reactivo cromogénico.

Para este estudio se tomaron 50 mL de solución estándar de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd(II) y luego se trabajó en las condiciones óptimas previamente determinadas en presencia de los iones extraños. Para ello, se añadieron cantidades variables de ion extraño cuyo efecto se quiere ensayar. La concentración máxima de especie interferente ensayada fue de 1000 mg L^{-1} . Se acepta como límite de tolerancia para la especie extraña, la concentración de ésta que origina un error relativo en la medida mayor al 5%. No se consideran por tanto interferentes, aquellas concentraciones de especies extrañas que producen un error relativo igual o menor al mencionado límite. Los límites de tolerancia del analito para las diferentes especies ensayadas aparecen en la tabla 5.6.

Tabla 5.6. Efecto de iones extraños en la determinación de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd(II)

Especie extraña	Nivel de tolerancia $\mu\text{g L}^{-1}$
Cl^- , NO_3^- , NO_2^- , SiO_3^- , PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , HCO_3^-	> 10000
Ca(II), Mg(II)	
SO_4^{2-}	5000
F^-	2000
Al(III)	1000
Cr(III), Pb(II), Fe(III)	100
Bi(III)	25
Hg(II)	20
Ni(II), Cu(II), Zn(II)	10
Co(II)	< 2

5.5. Plomo

5.5.1. Parámetros que afectan la formación del complejo Pb(II)-5-Br-PADAP

El Pb(II) a partir de sus soluciones acuosas, reacciona con el 5-Br-PADAP en presencia de un tensoactivo no-iónico (Tritón X-100), para formar un complejo de color rojo violáceo que se desarrolla completamente luego de 10 minutos de promovida la reacción.

Las soluciones de 5-Br-PADAP se realizaron utilizando etanol como disolvente, dada su insolubilidad

Al igual de lo que sucede en la reacción del Cd(II) con el PAN, en este caso también se hizo necesario la incorporación de un agente tensoactivo que permitiera mantener como un sistema homogéneo al quelato formado y al exceso de reactivo necesario, y que a la vez produjera un aumento en la sensibilidad. La concentración de tensoactivo es una de las variables de estudio en la optimización.

5.5.2. Influencia del pH

Se estudia la influencia del pH sobre la formación del complejo Pb(II)-5-Br-PADAP en solución, teniendo en cuenta que los complejos de analito con el ligando cromogénico se producen en el mismo rango de pH en la fase sólida (resina). La metodología para realizar este estudio es la misma que en el caso del Cd(II).

La gráfica obtenida de representar los diferentes valores de absorbancia versus los diferentes valores de pH medidos mediante el uso de un peachímetro, puede verse en la Fig. 5.15.

Se puede observar que la máxima absorbancia se mantiene constante en el rango que va desde 8,5 a 10,5 unidades de pH para la formación del complejo Pb(II)-5-Br-PADAP, al igual que en el caso anterior.

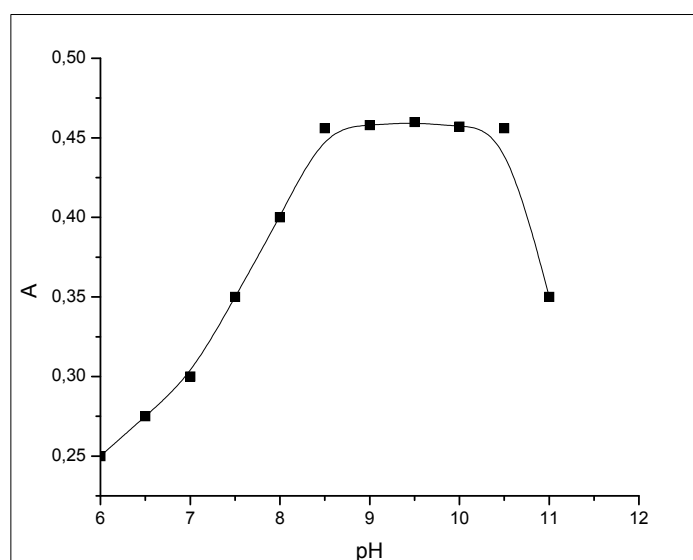


Figura 5.15. Dependencia del pH para la formación del complejo Pb(II)-5-Br-PADAP

5.5.3. Composición y concentración de la solución reguladora

En la evaluación de formación del complejo Pb(II)-5-Br-PADAP en función de la acidez se concluye que el intervalo óptimo se encuentra comprendido para valores de pH que van desde 9 hasta 11. Para satisfacer esta necesidad se evaluaron diferentes soluciones reguladoras que pudieran cubrir este ámbito de pH. La composición de las soluciones reguladoras que se evaluaron fueron las que permiten alcanzar el valor de pH mencionado.

Por otro lado, se encontró que cambios apreciables en la concentración analítica de la solución reguladora de amoníaco/cloruro de amonio, no experimenta modificaciones en los valores de absorbancia del complejo.

5.5.4. Selección de la resina

En la espectrofotometría en fase sólida el primer objetivo que se plantea es la elección del soporte adecuado sobre el que fijar el compuesto en estudio.

Se realizaron, en placa de toque, varios ensayos cualitativos de fijación del compuesto en los soportes aniónicos: Dowex 1X8 y de adsorción: Amberlite XAD 7 y Amberlite XAD 16, efectuando simultáneamente un ensayo en blanco para cada uno.

Se eligió el soporte aniónico Dowex 1X8, ya que en él la fijación fue rápida y completa, con el resto de las resinas la fijación no fue completa, esto se detectó dado

que la solución permanece coloreada luego de un tiempo de contacto prudencial, y además presentan la desventaja de una elevada opacidad al paso de la luz a las longitudes de onda de trabajo.

5.5.5. Influencia de la concentración de 5-Br-PADAP

Al realizar el estudio de la concentración óptima de reactivo, surge el problema del intenso color que posee el reactivo 5-Br-PADAP, aún en ausencia de analito. Dicho color es un inconveniente dado que al aumentar la concentración de reactivo en la solución, aumenta la masa fijada sobre la resina, esto provoca un fuerte incremento de la absorbancia de los blancos obtenidos, trayendo como consecuencia una fuerte disminución de la sensibilidad del método. En situaciones similares a ésta, es aconsejable fijar el reactivo en una etapa previa a la determinación del analito. La resina desarrolla luego el complejo coloreado sobre su superficie en presencia de vestigios de Pb(II), y dicho color puede utilizarse para la medición de la concentración de Pb(II) por EFS.

Para estudiar la concentración óptima de reactivo 5-Br-PADAP, una masa fija de resina (1 g) se puso en contacto con soluciones etanólicas (10% v/v) de concentraciones crecientes de reactivo 5-Br-PADAP, suficiente para mantener en solución al reactivo. Se dejó en contacto por al menos 2 horas y con agitación. Una vez seca la resina funcionalizada, se pesó 100 mg de ésta y se la puso en contacto con 50 mL de solución problema. Se realizó un blanco de reactivos y paralelamente en soluciones conteniendo 50 ppb de Pb(II), por último se midió las absorbancias netas correspondientes para cada caso. Los valores estudiados y las respuestas obtenidas pueden observarse en la tabla 5.7.

Tabla 5.7. Influencia de la concentración de 5-Br-PADAP

[5-Br-PADAP] 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	A _{Bco}			A _{Pb}			A _{NETA}
	λ ₅₆₀	λ ₈₀₀	λ ₅₆₀ - λ ₈₀₀	λ ₅₆₀	λ ₈₀₀	λ ₅₆₀ - λ ₈₀₀	
6	2,531	2,381	0,150	2,979	2,763	0,216	0,066
4	2,394	2,188	0,206	2,799	2,200	0,599	0,393
2	2,001	1,979	0,022	2,173	2,100	0,073	0,051

Como se ve en la tabla 5.7. los valores de absorbancia neta para 50 ppb de Pb(II) varían ampliamente frente a pequeños cambios de la concentración de reactivo. Esto es debido a que fuera del valor óptimo de concentración, la resina funcionalizada obtenida finalmente queda muy opalescente o muy clara, lo que se correlaciona con los valores de absorbancia obtenidos.

5.5.6. Fijación del reactivo complejante a la resina

Para fijar el reactivo complejante a la resina, una vez realizados los estudios de la concentración óptima de 5-Br-PADAP a utilizar, se tomaron 4 g de resina Dowex 1X8 se pusieron en contacto con una solución obtenida a partir de mezclar 1 mL de solución $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ 5-Br-PADAP con 0,5 mL de etanol absoluto en 45 mL de agua de elevada pureza. La mezcla se agitó en un agitador rotatorio durante 2 horas para lograr un buen contacto entre ambas fases, luego se separó la fase sólida por centrifugación y se la lavó con agua desionizada, varias veces. Por último se la dejó secar a temperatura ambiente y se la conservó en frascos de polietileno en ausencia de la luz a temperatura ambiente.

5.5.7. Influencia de la concentración de tensioactivo

La influencia de la concentración del tensioactivo se realizó siguiendo la metodología en batch, tomando 50 mL de solución estándar de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II), a la que se le agregaron diferentes concentraciones de Tritón X-100, seguidos de 1 mL de solución buffer y por último 70 mg de R-5-Br-PADAP. Todas las muestras se agitaron 20 minutos y luego se midió su absorbancia neta. Los resultados obtenidos se grafican en la figura 5.16.

Finalmente de la observación de la gráfica se eligió la concentración de 0,025% de Tritón X-100 como la óptima. Esta concentración se logró agregando 0,25 mL de solución de Tritón X-100 al 5% v/v a 50 mL de muestra.

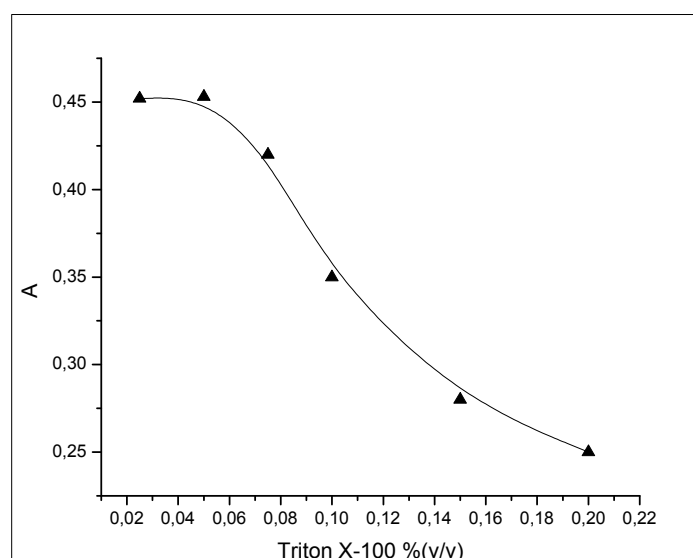


Figura 5.16. Influencia de la concentración de Tensioactivo Tritón X-100

5.5.8. Orden de adición de los reactivos

Se realizó el estudio del orden de agregado de reactivos sobre muestras con iguales concentraciones de 50 ppb Pb(II), a las que se les agregó volúmenes fijos de solución 5% de tensioactivo Tritón X-100 y 70 mg de resina funcionalizada (R-5-Br-PADAP), en diferentes ordenes de adición. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Las variaciones en la absorbancia observadas al alterar el orden de agregado de los reactivos fueron inferiores al 5% v/v, exceptuando el caso en el que se agregaba en primer orden a la solución buffer. Se eligió finalmente el siguiente orden de agregado de reactivos para el resto del trabajo:



5.5.9. Aumento de la sensibilidad en fase sólida

Se observó un gran aumento en la sensibilidad de la determinación de Pb(II), extraído de un gran volumen de solución (fase líquida) a la fase sólida o fase resina, al igual que en el caso anterior de la determinación de Cd(II). (Sección 5.4.6.)

5.5.10. Influencia de la cantidad de resina

Se siguió la misma metodología que en estudio del sensor de Cd(II) para determinar la masa óptima de resina y se cálculo de la ecuación que permitió calcular la

absorbancia según la masa de resina que se utilice para la determinación de Pb(II). (sección. 5.4.9.)

Se graficaron los resultados obtenidos para las diferentes masas de resina, en la figura 5.17

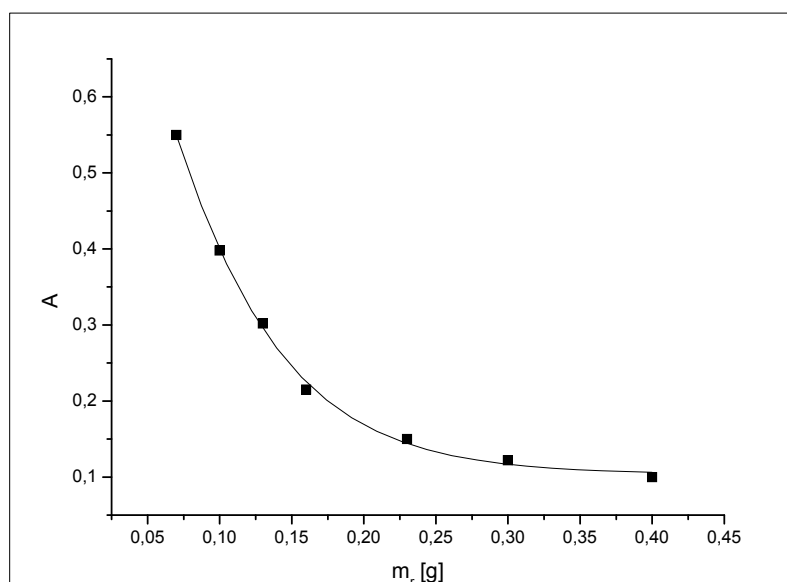


Figura 5.17. Variación de la absorbancia según la masa de resina

El aumento de la absorbancia al disminuir la masa de resina genera la curva de forma hipérbolica al ser graficada, cuya ecuación empírica, calculada a partir de los cálculos de regresión es la siguiente:

$$A \times m_r^{1,02} = 0,0362$$

Sin embargo si se representa la absorbancia en función de la inversa de la masa de resina, se obtiene una recta, cuya ecuación de regresión se puede ver a continuación:

$$A = 0,0113 + 0,0396 / m_r$$

Se puede calcular la concordancia de este valor empírico con el valor que le corresponde de la estimación práctica, teniendo en cuenta el coeficiente de absorptividad molar aparente en la resina ($\epsilon_c = 17388 \text{ Kg mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), tal como se explica en la sección anterior para el Cd(II).

El cálculo dio como resultado, para una concentración de Pb(II) de 50 ppb, un valor de 0,042 el cual representa una excelente concordancia con el valor de la pendiente obtenida en la práctica de 0,039.

5.5.11. Influencia del tiempo de agitación

Los resultados obtenidos son similares a los correspondientes a la determinación de Cd(II) con PAN (sección 5.4.10.), por lo que se puede afirmar que para que se forme correctamente el complejo del Pb(II) con 5-Br-PADAP fijado a la resina Dowex 1X8, se necesita agitar al menos por 20 minutos en agitador rotatorio.

5.5.12. Estabilidad del complejo en función del tiempo

Los resultados obtenidos son similares a los correspondientes a la determinación de Cd(II) con PAN (sección 5.4.11.), se midió la variación de la absorbancia del complejo al cabo de del tiempo comprobándose que no presentaba disminución significativa al menos por un lapso de 48 horas. El complejo del Pb(II) con 5-Br-PADAP es entonces razonablemente estable.

5.5.13. Resumen de las condiciones seleccionadas para la medición de Pb(II)

A continuación se describen las condiciones óptimas para la determinación de Pb(II)

<i>λ(nm) máximo</i>	550
<i>Volumen de muestra (mL)</i>	50
<i>Soporte sólido</i>	Dowex 1X8
<i>Masa de resina (g)</i>	0,070
<i>pH de trabajo</i>	9 – 11
<i>Buffer seleccionado</i>	$\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$
<i>Tiempo de agitación (minutos)</i>	20

5.5.14. Parámetros analíticos para la determinación de Pb(II)

Los parámetros analíticos calculados para la determinación de Pb(II) se agrupan en la tabla 5.8. Se evaluó la reproducibilidad haciendo 10 determinaciones en soluciones estándar con la misma concentración de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II). El estimador calculado fue la desviación estándar relativa para evaluar la precisión del método.

Mediante el análisis estadístico se calcularon también el límite de detección y de cuantificación, siguiendo los criterios explicados en la determinación de Cd(II). (Sección 5.4.14.)

Tabla 5.8. Parámetros analíticos para la determinación de Pb(II)

Parámetro	
Pendiente ($\mu\text{g}^{-1} \text{L}$)	0,012
Intersección	-0,104
Rango Lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5 – 100
Coefficiente de correlación	0,998
% R. S. D. (n = 10)	1,7
Límite de Detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,8
Límite de Cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,7

5.5.15. Estudio de posibles interferencias

Se realiza el estudio de las posibles especies interferentes siguiendo los mismos criterios utilizados para éste estudio en el caso del sensor de Cd(II). (Sección 5.4.15.)

De los resultados obtenidos, puede observarse que, algunos cationes como ser Cu(II), Hg(II), Ni(II) y Zn(II), producen interferencias a muy bajas concentraciones.

Sin embargo el agregado de 0,2 mL de una solución de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCN a 50 mL de muestra, aumenta notablemente la concentración tolerada de estos cationes, por formación de complejos inertes. Los resultados se muestran en la tabla 5.9.

Es importante destacar también que las especies citadas como interferentes se encuentran a niveles de vestigios en aguas naturales, por lo que el método resulta lo suficientemente selectivo para su aplicación en aguas del Río Paraná.

Tabla 5.9. Estudios de la influencia de iones extraños en la determinación de una muestra de 50 mL con 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb(II)

Interferente	Nivel de Tolerancia ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
		Con KCN
Cl(I), Nitrato	10000	
K(I)	10000	
Ca(II)	5000	
CO_3^{2-} , SO_4^{2-}	1000	
Mg(II)	1000	
Al(III)	1000	
Ba(II)	1000	
As(III)	30	
Oxalato, EDTA	2	
Zn(II)	2	10
Cu(II)	2	10
Ni(II)	2	10
Hg(II)	2	10

¹ D. Johnson y T. Florence; *Anal. Chim. Acta*, (1971) 53, 73² S. Shibata y M. Furukawa; *Bunseki Kagaku*, (1974) 23 (11), 1412³ E. Kiss; *Anal. Chim. Acta*, (1973) 66, 385⁴ J. Medina-Escriche, M. Loobat-Estelles and F. Bosch-Reig, *Talanta*, (1983) 30, 12, 915⁵ E. Bishop, *Indicators*, (1972) Pergamon Press, Oxford⁶ A. Lewandowski, *Chem. Anal.* (Warsaw), (1977) 22, 349⁷ Wu Taibai y You Qishen; *Fenxi Huaxe*, (1984) 12(8), 725⁸ Duan Qunzhng y Peng Guangbing; *Fenxi Huaxe*, (1985) 13, 928; C.A.105, 17425 b⁹ M. Krasiejko y Z. Marczenko; *Mikrochim. Acta*, (1986) 3, 89¹⁰ S.I. Gusev, E.M. Nikolaeva y E.A. Pirozhkova; *Zh. Anal. Khim.*, (1971) 26(9), 740, C.A. 76, 67654¹¹ Chen Anzi y Su Jianxiong; *Huanjing Huaxue*, (1988) 7 (2), 65-68; C. A. 109, 15575¹² Xi-Tian; *Fen Hsi Hua Hsueh*, (1981) 9 (2), 189; C. A. 95, 143462 z

¹³ I.M. Kolthoff, B. Sandell, E. Meehan y S. Bruckenstein; *“Análisis Químico Cuantitativo”*, (1986) 6ta. ed. Edit. Nigar, 832

¹⁴ Doehlert, D. H. “Uniform shell designs”. *Applied Statistics* (1979) 231

¹⁵ IUPAC, *“Nomenclature, Symbols, units and their usage in spectrometrical analysis”*, *Pure Appl. Chem.*(1976) 105, 45.

CAPITULO VI

6.1. Aplicaciones – Aspectos Generales

Como se mencionó en los capítulos anteriores los metales pesados presentes en aguas naturales, pueden existir bajo diferentes formas moleculares (especies químicas), entre las que se incluyen a los iones metálicos propiamente dichos, algunos oxicomplejos, complejos orgánicos (principalmente los provenientes de los ácidos húmicos y fúlvicos) e inorgánicos o también adsorbidos en partículas coloidales.

Según la diferente especie química que se encuentre formando en la matriz acuosa, será la biodisponibilidad y toxicidad para la biota. De allí la gran importancia de la especiación química, lo que la convierte en un tema de principal interés para las ciencias biológicas, ambientales, geoquímicas y otras relacionadas con el tratamiento de aguas para distintos fines.

El problema es que a pesar del gran progreso de los últimos años en la instrumentación analítica y el desarrollo de técnicas híbridas o acopladas basadas en procesos de separación como la HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) de las especies químicas y posterior detección por medio de diferentes métodos espectrofotométricos, la mayoría de ellas poseen elevados costos de instalación y operación¹. Esto constituye una gran desventaja para economías como la de nuestro país, convirtiendo los estudios de especiación en análisis reservados solo para algunos centros de elevada complejidad.

Sin embargo el estudio de la distribución de un elemento con respecto a las diferentes especies químicas capaz de formar puede realizarse como la determinación de fracciones (clases) clasificadas operacionalmente mediante el uso de técnicas de separación sencillas, tales como la filtración, centrifugación e intercambio iónico. En consecuencia se hace necesario definir al término “fraccionamiento químico” referido a la especiación, como el agrupamiento de las diferentes clases químicas que puede formar un analito en una muestra de acuerdo a sus propiedades físicas y/o químicas.

La aplicación de técnicas basadas en el intercambio iónico se ha vuelto muy popular en los esquemas de fraccionamiento químico, dado que permiten dividir operacionalmente la fracción soluble, entre fracción soluble de metal libre y fracción soluble que se encuentra formando complejos o combinado².

Las resinas de intercambio poseen gran capacidad para retener los metales pesados, resultante de su gran tendencia a reemplazar los iones móviles de los grupos funcionales, ya que estos son reemplazados por iones metálicos o iones complejos de carga similar. Los procedimientos basados en el intercambio iónico son asociados con la gran diversidad de resinas disponibles, estas varían de acuerdo con el grupo funcional o estructura de la cadena de polímero, lo que posibilita que cada tipo de resina sea capaz de retener solo cierto tipo de especies órgano-metálicas³.

El equipamiento necesario y el bajo costo requerido para su aplicación representan beneficios adicionales. Justifican también su popularidad los elevados valores obtenidos para los factores de enriquecimiento (que varían típicamente entre 10 a 200) que se obtienen para metales en concentraciones en el orden de vestigios, en varios procedimientos en columna, en línea o en batch (agitando la resina con la solución de la muestra que es analizada, juntos en un mismo recipiente). Esto hace a las resinas de intercambio iónico específicas, muy útiles en la etapa del pre-tratamiento de la muestra requerido para concentrar los iones del metal.

Son también únicas en la limpieza de las muestras o la separación de componentes de la muestra que interfieren antes de detectar los analitos.

Sin embargo la principal característica que interesa desde el punto de vista del fraccionamiento es la posibilidad de distinguir diversas formas del metal o agrupaciones que posean las mismas características químicas para aclarar sobre biodisponibilidad del metal en muestras de agua. Esto permite predecir efectos sobre los organismos vivos de un ecosistema, solamente filtrando la muestra y luego pasando por una columna que contiene la resina. Todo este sistema es accesible desde el punto de vista económico si se lo compara con métodos sofisticados y más costosos como la HPLC.

6.1.1. Fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II) en muestras de aguas superficiales

Si se tienen en cuenta las diferentes especies mayoritarias con las que interactúan los analitos Cd(II) y Pb(II) en aguas naturales, se puede diferenciar una fracción insoluble, que se separara por filtración a través de membrana de 0,45 μm , formada principalmente por arcillas insolubles, óxidos hidratados insolubles de elementos mayoritarios (Ej: Fe(III)) y algunos detritos orgánicos de composición amorfa. Luego por otro lado se encuentra la fracción soluble formada por los iones metálicos hidratados propiamente dichos y los complejos solubles de diferente

naturaleza. Entre los ligandos orgánicos disponibles para la formación de complejos se encuentran los ácidos húmicos y fúlvicos principalmente.

Estas sustancias orgánicas interactúan fuertemente con los analitos para formar complejos húmicos, afectando de esta manera el equilibrio de estos iones en la matriz acuosa. Si bien la estructuras moleculares de éstos complejos resultan complicadas, dada su naturaleza hidrofóbica, estas especies químicas pueden ser retenidas en columnas rellenas con resinas poliméricas de adsorción, por ejemplo.

Entre las resinas poliméricas de adsorción más utilizadas se encuentran las tipo Amberlite XAD (XAD-2, -4, -7, -8 y -16), sobre todo para la preconcentración de elementos provenientes de diferentes matrices; entre sus principales ventajas se pueden nombrar su elevada pureza y estabilidad química. La resina Amberlite XAD-16 es la más ampliamente utilizada para retener complejos húmicos, dada sus propiedades físico químicas⁴. (Tabla 6.1.)

Tabla 6.1. Comparación de las propiedades físico químicas de las resinas Amberlite XAD-16 y Silica C-18

Resina	Matriz/Grupo Funcional	Tamaño Partícula	Área Superficial m ² g ⁻¹	Promedio Poro nm	Densidad g cm ³
Amberlite XAD-16	STY-DVB (hidrofóbica)	100-200	800	10	0,65
Silica C-18	Silica C18	100	50,5	6	0,7

Otro tipo de resina muy utilizada es la Silica C-18, cuyas propiedades físico químicas pueden verse en la tabla 6.1.

En ambas resinas la retención de la fracción soluble unida a complejos, se produce por un fenómeno de partición entre la fase móvil acuosa y la fase estacionaria no polar de la resina.

La principal diferencia entre la resina tipo Amberlite XAD-16 y la Silica C-18, es que la primera es capaz de adsorber iones de metal divalentes libres, lo que complica el esquema de fraccionamiento haciendo necesario el uso de precolumnas con resinas

quelantes para extraer los iones metálicos libres, que acarrea un aumento de costo económico-tiempo⁵. Las sílices funcionalizadas con un hidrocarburo de cadena larga de 18 carbonos (octadecano), poseen gran aplicación para la extracción de la fracción de complejos húmicos y dadas sus propiedades químicas posibilita su uso en forma aislada, sin necesidad del agregado de pre-columnas. Esta ventaja se debe principalmente a que la interacción entre el analito y la resina tenga un carácter débil, provoca además que las especies complejas previamente formadas tengan una escasa posibilidad de desnaturalizarse y facilita la posterior elución mediante el uso de solventes orgánicos. Finalmente la cantidad de materia orgánica disuelta que es capaz de retener la resina depende solamente de dos factores, la hidrofobicidad de los ligandos y el pH de la muestra.

6.1.2. Esquema propuesto para el fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II)

Para el fraccionamiento de las muestras de agua del Río Paraná se realizaron las siguientes operaciones en forma sucesiva (Figura 6.1.):

1. Extracción de la muestra de agua de río con muestreador de teflón.
2. Conservación de la muestra por congelamiento a -10 °C.
3. Filtración de la muestra a través de membrana de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro.
4. Se pasa el filtrado por columna conteniendo resina Sílica C-18 (Extracción en Fase Sólida)
5. Elusión de la fracción retenida con metanol.
6. Todas las fracciones obtenidas fueron digeridas con mezcla HNO₃-H₂O₂, excepto al eluato acuoso de la columna correspondiente a la concentración de metal libre.
7. Determinación de los analitos en cada una de las fracciones obtenidas.
8. Cálculos para la presentación de resultados.

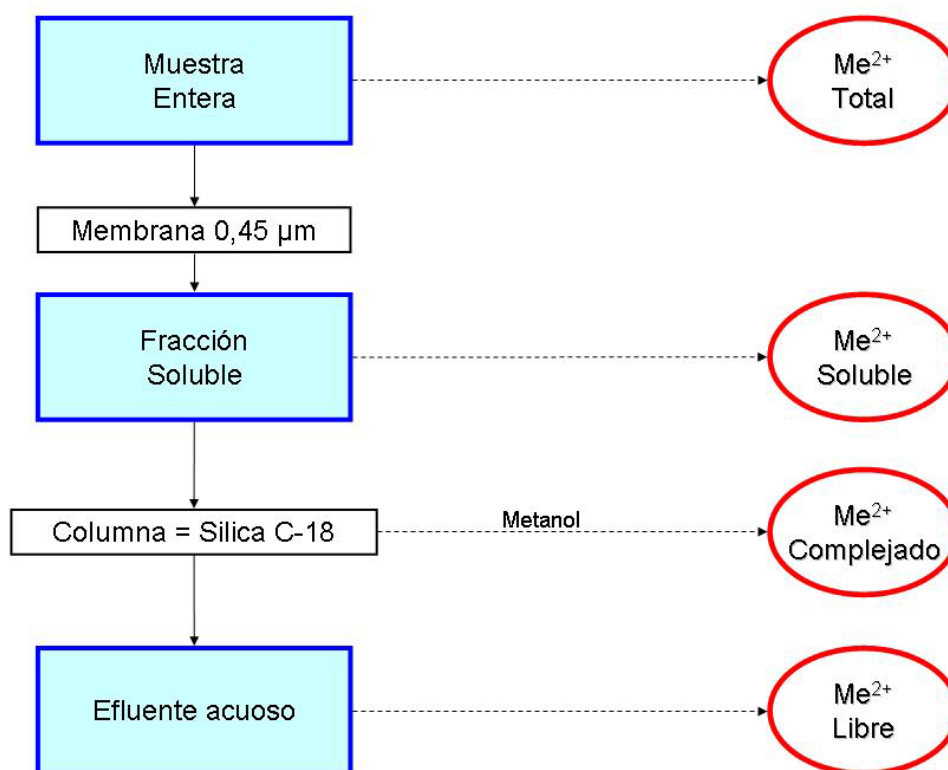


Figura 6.1. Esquema aplicado para el fraccionamiento de las muestras de agua

Una vez realizadas las mediciones de absorbancias, se calculan las concentraciones de analito correspondientes a cada fracción de la siguiente manera:

6.1.2.1. Fracción particulada.

Las muestras de agua se filtraran para investigar la fracción de metal unida a partículas insolubles o material particulado con membranas de celulosa de 0,45 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro.

La concentración de metal correspondiente a ésta fracción se calcula por diferencia entre la concentración total en la muestra digerida completamente y la concentración correspondiente al filtrado y se denomina concentración de metal soluble total.

$$[Me^{n+}]_{Particulado} = [Me^{n+}]_{Total} - [Me^{n+}]_{Filtrado}$$

6.1.2.2. Fracción complejada.

El filtrado de la etapa anterior se pasa por una columna que contiene 0,50 g de Sílica C-18, para retener los complejos húmicos hidrofóbicos. El efluente acuoso de la columna se reserva para posteriores determinaciones de otras fracciones.

Para determinar la concentración de metal que quedó retenida en la columna, una vez que se pasó toda la muestra, se eluyen los complejos con metanol. El eluato se digiere luego con una mezcla de $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$ y luego se lleva a volumen con agua de elevada pureza. La concentración de metal correspondiente a ésta fracción se determina directamente sobre los digeridos.

6.1.2.3. Fracción libre

Para determinar la concentración de metal libre, se realiza la medición sobre el eluato acuoso obtenido de la columna en la etapa anterior, no siendo necesaria la aplicación de la digestión de la materia orgánica.

6.2. Experimental

6.2.1. Determinación de la concentración total de analito

Es necesario eliminar la materia orgánica para encontrar la concentración total de los analitos seleccionados en las muestras de aguas naturales y luego en cada una de las fracciones separadas.

Existen diferentes metodologías para la oxidación de la materia orgánica con ácidos, la selección de una de ellas depende de la composición de la muestra en particular que se desea digerir. En este trabajo se ensayaron diversas posibilidades para establecer un método rápido, eficaz y sencillo de aplicar y que digiera la materia orgánica en forma completa sin introducir contaminación en la muestra.

Los métodos ensayados, ajustando los volúmenes finales con agua bidestilada a los volúmenes de muestra utilizados son los siguientes:

Método N° 1: Digestión con $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$: 50 mL de muestra se acidifican con HNO_3 , se adicionan 5 mL de HNO_3 y se evapora sobre plancha calefactora, no a sequedad. Se deja enfriar la mezcla y se le adiciona a continuación 10 mL de mezcla nítrico perclórica (2+1). Se evapora hasta la aparición de humos blancos. Si la solución

permanece turbia, se agregan 10 mL de HNO₃ más, siempre evaporando luego hasta la aparición de humos blancos. Finalmente se deja enfriar la solución. Se filtra si es necesario, y se lleva a volumen con agua de elevada pureza.

Método N° 2: Digestión con HNO₃ + H₂SO₄: 50 mL de muestra se acidifican con H₂SO₄, se le adicionan 5 mL de HNO₃, y se evapora sobre plancha calefactora, no a sequedad. Se agrega luego 10 mL de mezcla (1+1) de HNO₃ + H₂SO₄ y se evapora hasta la obtención de humos blancos. Si la solución permanece turbia, se pueden agregar pequeñas porciones de HNO₃, siempre evaporando luego hasta la aparición de humos blancos. Finalmente se deja enfriar la solución, se filtra si es necesario, y se lleva a volumen con agua de elevada pureza.

Método N° 3: Digestión con HNO₃ + H₂O₂: 50 mL de muestra se acidifican con HNO₃, se le adicionan 5 mL de HNO₃, y se evapora sobre plancha calefactora, no a sequedad. Se deja enfriar la mezcla y se le adiciona a continuación 1 mL de H₂O₂ (100 vol). Se evapora la muestra hasta casi seco. Si la solución permanece turbia, se pueden agregar pequeñas porciones de HNO₃, se evapora luego hasta la aparición de humos blancos. Finalmente se deja enfriar la solución, se filtra si es necesario, y se lleva a volumen con agua de elevada pureza.

El final de la digestión se establece cuando se obtengan muestras transparentes e incoloras.

Se seleccionó el método N° 3 porque se consiguió una digestión completa en forma rápida y sencilla, en muestras de aguas del Río Paraná.

6.2.2. Selección de la resina

En función de la revisión bibliográfica realizada y teniendo en cuenta las propiedades físico químicas de los diferentes tipos de resinas para retener las especies organometálicas presentes en aguas naturales (principalmente formadas por complejos con sustancias húmicas), se seleccionaron dos tipos de resinas para el relleno de la columna para la extracción en fase sólida de los complejos húmicos^{6,7}.

Estas fueron: Amberlita XAD-16 y Silica C-18.

6.2.2.1. Preparación de las columnas

Para preparar las columnas de retención de la fracción de metal soluble formando complejos se procedió de la siguiente manera:

Se suspendió 0,5000 g de resina en metanol, y se cargó la columna con la suspensión.

Se realizó luego una serie de lavados sucesivos de la columna, primero con una porción de 10 mL de metanol, y luego con 30 mL de agua de elevada pureza subdividida en alícuotas de 10 mL, la solución de lavado se acondicionó con buffer de pH 7,0, correspondiente aproximadamente al pH de las muestras que se querían extraer en la etapa de fraccionamiento.

Entre cada experiencia se lavó la columna siguiendo el procedimiento anterior, reduciendo los volúmenes a la mitad.

6.2.2.2. Estudios de retención de metal libre por la resina

Se disponen dos columnas por separado rellenas con Amberlita XAD-16 y Silica C-18. En ambos casos las columnas son preparadas siguiendo el mismo procedimiento.

Con el objeto de dilucidar la posible retención de Cd(II) y Pb(II) en la resina, se realizó el siguiente ensayo. Se prepararon soluciones de concentración conocida del analito en estudio con agua de elevada pureza a pH = 6,85. Se hizo pasar la solución por la columna y se midió luego la concentración de analito en el efluente acuoso. A posteriori se hizo pasar por la columna 1 mL de metanol donde se evaluó la concentración de metal retenido, por último se calculó el porcentaje de recuperación para el metal libre obtenido. Los resultados se presentan en la tabla 6.2.

De los resultados surge que al utilizar Silica C-18 como columna de adsorción no se observa adsorción en cantidades significativas de metal libre, tanto en el caso del Cd(II) como el Pb(II).

En consecuencia se eligió a la resina Silica C-18 como relleno de la columna para el fraccionamiento de los analitos en muestras del Río Paraná.

Tabla 6.2. Adsorción de cationes metálicos libres en agua destilada

Elemento	Agregado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Medido [$\mu\text{g mL}^{-1}$]			Recuperación [%]
		Sorbido y después desorbido	Efluente	Total	
Cd(II) _{Silica C-18}	0,1	< 0,0005	0,098	0,098	98,0
Pb(II) _{Silica C-18}	0,1	< 0,0005	0,099	0,099	99,0
Cd(II) _{XAD-16}	0,1	0,01	0,085	0,095	95,0
Pb(II) _{XAD-16}	0,1	0,005	0,088	0,093	93,0

6.2.3. Recolección y conservación de muestras

Durante la pesquisa de metales pesados en el ambiente, y para evitar contaminaciones y errores de matriz en el proceso de la toma de muestra se requieren precauciones especiales para que la muestra mantenga las mismas características que tenía en su lugar de procedencia. Se deben emplear recipientes de polietileno y procedimientos adecuados para la extracción de muestras evitando toda contaminación accidental desde la obtención y el posterior transporte al laboratorio, siguiendo procedimientos de extracción y conservación estandarizadas.

Se monitorea en la zona de máxima corriente del agua⁸. La extracción del agua se realiza en recipientes de polietileno de alta densidad, lavados previamente en el laboratorio con ácido nítrico p.a. diluido y tres veces con el agua de río objeto a muestrear^{9,10}.

El punto para monitoreo elegido se encuentra ubicado en la rivera correspondiente a la ciudad de Corrientes (27° 46' S, 58° 83' O) del Río Paraná, la ubicación de este punto de muestreo puede considerarse privilegiada por encontrarse en el corazón de la cuenca del Plata. La frecuencia de monitoreo establecida fue bimestral entre el transcurso del año 2005 y hasta comienzos del año 2006. El punto geográfico elegido fue el muelle de descarga de combustible de la Usina de la Ciudad de Corrientes (Figura 6.2.), a 100 m de la costa sobre la margen izquierda, a 2 m de profundidad.

Una vez obtenidas las muestras se trasladan al laboratorio en conservadoras a temperatura ambiente¹¹, con objeto de evitar posibles alteraciones químicas durante el tiempo que transcurre entre la extracción y su análisis. Una vez en el laboratorio se procesan inmediatamente¹², aplicando el proceso de fraccionamiento.

Luego del fraccionamiento se acidifica cada una de las fracciones a pH 2 con ácido nítrico con el objeto de evitar el intercambio de iones y la precipitación de hidróxidos.¹³ Las muestras se conservan por congelamiento en freezer común a -10 °C.



Figura 6.2. Situación geográfica de la ciudad de Corrientes en el trayecto del Río Paraná

6.3. Fraccionamiento Químico de Cd(II) en Aguas Superficiales del Río Paraná

6.3.1. Determinación del contenido total de Cd(II)

Para la determinación de la concentración total de Cd(II) en la muestra proveniente del Río Paraná, se tomaron diferentes alícuotas de muestra (entera, sin filtrar), se las sometió al proceso de digestión con $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, y se midió la concentración de cada uno de los analitos aplicando el proceso de SPS, según el procedimiento descrito en el capítulo 5 sección 5.4. para Cd(II) por SPS. El proceso se

repitió por sextuplicado en cada muestra. Los resultados obtenidos pueden visualizarse en la tabla 6.3.

Tabla 6.3. Concentración de Cd(II) total medidas en muestras provenientes del Río Paraná (intervalo de confianza 95%, n = 6)

Procedencia	Fecha [mm-aaaa]	Concentración Total [$\mu\text{g L}^{-1}$]	
		SPS	ICP-OES
Río Paraná	Mar-2005	$2,7 \pm 0,2$	$2,55 \pm 0,13$
	May-2005	$1,3 \pm 0,2$	$1,40 \pm 0,15$
	Ago-2005	$< 0,7$	$0,55 \pm 0,10$
	Oct-2005	$< 0,7$	$0,45 \pm 0,13$
	Dic-2005	$3,6 \pm 0,2$	$3,88 \pm 0,12$
	Feb-2006	$3,3 \pm 0,2$	$3,42 \pm 0,03$

Con el objeto de validar los resultados obtenidos, se realizó en paralelo la determinación de la concentración del Cd(II) aplicando una técnica estandarizada por el grupo de trabajo de química analítica de la Universidad de San Luis¹⁴. Se utilizó un espectrómetro de emisión atómica asociada al plasma con acoplamiento óptico (ICP-OES) marca Baird ICP2070 provisto con nebulizador ultrasónico marca U 5000 AT (CETAC Technologies) con preconcentración en columna rellena con Amberlite XAD-16 y 5-Br-PADAP como reactivo complejante para la preconcentración en columna.

Se observó que las concentraciones totales de Cd(II) en las muestras provenientes del Río Paraná en todos los casos presentaban valores de concentración muy próximos al límite de cuantificación. Esto representa un problema ya que en los pasos sucesivos del fraccionamiento se deberán determinar valores mas bajos de concentración, por lo que se decidió procesar 300 mL de muestra (en lugar de 50 mL) con el esquema de fraccionamiento propuesto. Luego cada fracción obtenida se digirió con mezcla $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ y finalmente se llevó a volumen de 50 mL para aplicar el proceso de determinación de Cd(II) por SPS.

Como resultado se logró aumento en la sensibilidad del método propuesto, el factor de enriquecimiento obtenido es igual a 6. El límite de cuantificación de la técnica disminuyó al valor de $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$. Los valores de concentración de Cd(II) total obtenidos

al digerir 300 mL de muestra y porcentajes de recuperación pueden visualizarse en la tabla 6.4.

Tabla 6.4. Concentración total de Cd(II) medidas en muestras provenientes del Río Paraná – 300 mL de muestra con el método propuesto (intervalo de confianza 95%, n = 6)

Procedencia	Fecha [mm-aaaa]	SPS [$\mu\text{g L}^{-1}$]	ICP-OES [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Recuperación [%]
Río Paraná	Mar-2005	2,6 ± 0,2	2,55 ± 0,13	101,9
	May-2005	1,4 ± 0,2	1,45 ± 0,15	96,5
	Ago-2005	0,5 ± 0,2	0,55 ± 0,10	90,9
	Oct-2005	0,4 ± 0,2	0,45 ± 0,13	88,8
	Dic-2005	3,9 ± 0,2	3,90 ± 0,12	100,0
	Feb-2006	3,4 ± 0,2	3,45 ± 0,03	98,5

6.3.2. Fraccionamiento químico experimental de Cd(II)

6.3.2.1. Determinación de la fracción soluble y particulada

La fracción particulada o fracción de analito unida a material insoluble en suspensión en la muestra, se determina por diferencia entre la concentración de metal total menos la concentración de metal soluble.

El agua de río, en primer lugar es filtrada a través de membrana de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro, que es capaz de retener las partículas insolubles con diámetro mayor al tamaño de poro.

La fracción soluble se determinó midiendo la concentración de metal en el filtrado siguiendo los pasos descritos en el capítulo anterior en las secciones 5.4.13 para Cd(II). La concentración de Cd(II) en la fracción total, soluble y particulada puede observarse en la tabla 6.5.

Para el cálculo de los intervalos de confianza de la fracción particulada se aplicó el método de propagación de errores para la sustracción entre $\text{Cd(II)}_{\text{Total}} - \text{Cd(II)}_{\text{soluble}}$.

Tabla 6.5. Concentración de Cd(II) correspondiente a la fracciones total, soluble y particulada.

Fecha [mm-aaaa]	Fracciones de Cd(II) [$\mu\text{g L}^{-1}$]		
	Total	Soluble	Particulada
Mar-2005	$2,6 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,4$
May-2005	$1,4 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,2$
Ago-2005	$0,5 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,2$
Oct-2005	$0,4 \pm 0,2$	$< 0,1$	$0,4 \pm 0,2$
Dic-2005	$3,9 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$
Feb-2006	$3,4 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,3$

6.3.2.2. Determinación de la fracción complejada

Para la determinación de la fracción complejada, se hizo pasar al filtrado obtenido en la etapa anterior a través de una columna conteniendo la resina quelante Silica C-18. La resina retiene la fracción de metal unida a sustancias no polares (ácidos húmicos) que luego son eluidos con metanol.

El extracto metanólico se mineralizó siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo 6 sección 6.2.1., y se mide la concentración de Cd(II) en forma directa. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.6.

Tabla 6.6. Separación de la fracción soluble de Cd(II) en dos sub-grupos: Fracción complejada y fracción libre

Muestra	Fecha [mmm-aaaa]	Cd(II) soluble [$\mu\text{g L}^{-1}$]	
		Cd(II) complejo	Cd(II) libre
Río Paraná	Mar-2005	$0,8 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
	May-2005	$0,2 \pm 0,1$	$< 0,1$
	Ago-2005	$0,2 \pm 0,1$	$< 0,1$
	Oct-2005	$< 0,1$	$< 0,1$
	Dic-2005	$1,1 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
	Feb-2006	$0,9 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$

6.3.2.3. Determinación de la fracción metal libre

El eluyente acuoso de la columna que contiene la Silica C-18, se concentró por evaporación hasta lograr un volumen de 50 mL, posteriormente se determinó en forma directa (sin digestión) la concentración de Cd(II), esto representa la fracción de metal libre presente en la muestra. Los resultados obtenidos se visualizan en la tabla 6.6.

6.3.3. Patrón de distribución del Cd(II) en aguas del Río Paraná

La figura 6.3. muestra los diferentes valores de concentración total de Cd(II) expresada en $\mu\text{g L}^{-1}$ en aguas del Río Paraná como gráfico de barras obtenidas durante el año 2005 - 2006.

En la figura 6.4. se exhibe el patrón de distribución del Cd(II) como gráfico de barras indicando el porcentaje de Cd(II) asociado a cada fracción definida por el esquema de fraccionamiento. Este gráfico permite comparar las distribuciones obtenidas a lo largo del año. Los resultados expresados como concentraciones en $\mu\text{g L}^{-1}$ se expusieron en las tablas 6.5 y 6.6.

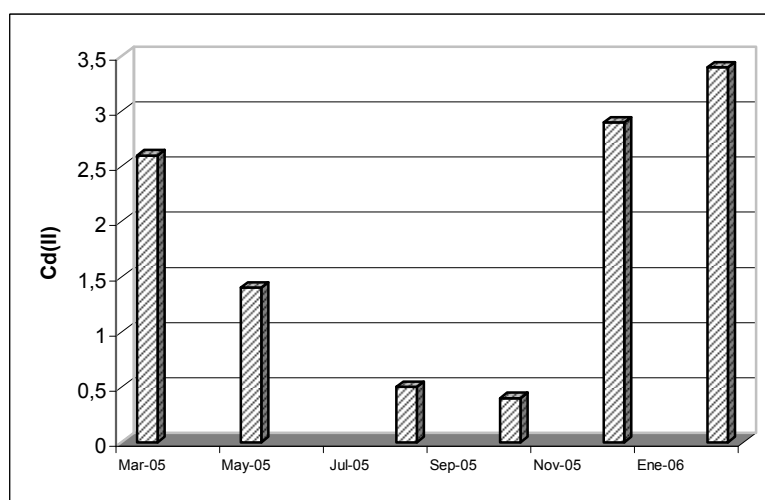


Figura 6.3. Gráfico de concentraciones totales de Cd(II) [$\mu\text{g L}^{-1}$]

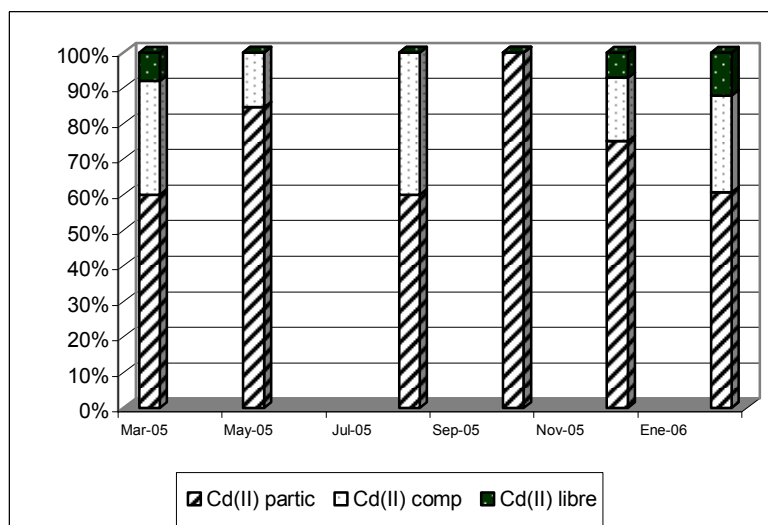


Figura 6.4. Gráfico de distribución de Cd(II) entre las diferentes fracciones obtenidas.

6.3.4. Validación del método aplicado para Cd(II)

Se utilizó el método de la adición de estándar para validar la determinación de la concentración total de Cd(II)¹⁵

Para ello se tomaron 500 mL de muestra y se la dividió a continuación en 10 porciones iguales de 50 mL cada una. El método propuesto se aplicó a 6 alícuotas y la concentración promedio de Cd(II) obtenida se tomó como valor base. Luego cantidades crecientes de Cd(II) fueron adicionadas a las otras alícuotas de la muestra y sus concentraciones determinadas por el mismo método. Los resultados pueden visualizarse en la tabla 6.7.

Tabla 6.7. Validación del método para determinación de Cd(II) aguas naturales

Alícuota	Valor Base [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Cd(II) adicionado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Cd(II) encontrado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	% recuperación*
1	--	0,00	$3,4 \pm 0,1$	--
2	3,4	1,00	4,3	97,0
3	3,4	2,00	5,3	98,0
4	3,4	4,00	7,2	97,0
5	3,4	8,00	11,4	100,0

* $100 \times [(\text{Cd(II) encontrado} - \text{Cd(II) base}) / \text{Cd(II)adicionado}]$

La comparación entre las concentraciones totales halladas por procedimientos independientes y la suma de las concentraciones individuales de las fracciones ofrecen una vía alternativa para verificar los posibles errores sistemáticos que se originan en pérdidas de elementos, contaminación u otras causas indeterminadas durante las manipulaciones llevadas a cabo en el transcurso del fraccionamiento químico. Los valores de las concentraciones obtenidas se incluyen en la tabla 6.8.

Tabla 6.8. Comparación entre las concentraciones de Cd(II) totales determinadas con ICP-OES y la sumatoria de las concentraciones obtenidas en cada fracción por SPS.

Muestra		Cd(II)
Mar-2005	Conc. Total	2,60 ± 0,2
	\sum fracciones	2,5 ± 0,6
	% recuperacion	96,2
May-2005	Conc. Total	1,45 ± 0,2
	\sum fracciones	1,3 ± 0,3
	% recuperacion	89,6
Ago-2005	Conc. Total	0,55 ± 0,2
	\sum fracciones	0,5 ± 0,3
	% recuperacion	90,9
Oct-2005	Conc. Total	0,45 ± 0,2
	\sum fracciones	0,4 ± 0,2
	% recuperacion	88,8
Dic-2005	Conc. Total	3,90 ± 0,2
	\sum fracciones	3,6 ± 0,4
	% recuperacion	92,3
Feb-2006	Conc. Total	3,45 ± 0,2
	\sum fracciones	3,3 ± 0,5
	% recuperacion	97,0

En todos los casos, las incertidumbres que acompañan a las sumas de fracciones son calculadas a partir de la propagación de errores aleatorios. La recuperación se define como $(\sum \text{fracciones} / \text{concentracion}_{\text{Total}}) \times 100$.

Xian¹⁶ propone que si la diferencia entre la suma de las fracciones y la concentración total determinada de forma independiente, varía dentro de un ámbito de $\pm 10\%$, los errores del procedimiento de extracción secuencial son despreciables y por lo tanto tales resultados indican la distribución de los analitos.

6.4. Fraccionamiento Químico de Pb(II) en Aguas Superficiales del Río Paraná

6.4.1. Determinación del contenido total de Pb(II)

Para la determinación de la concentración total de Pb(II) en la muestra proveniente del Río Paraná, se tomaron diferentes alícuotas de muestra (entera, sin filtrar), se las sometió al proceso de digestión (Capítulo 6, sección 6.2.1.), y se midió la concentración de Pb(II) según el procedimiento descrito en el capítulo 5 en la sección 5.5. para Pb(II) por SPS. El proceso se repitió por sextuplicado en cada muestra.

Tabla 6.9. Concentración de Pb(II) total medidas en aguas del Río Paraná – (intervalo de confianza 95%, n = 6)

Muestra	Fecha [mm-aaaa]	Concentración Total [$\mu\text{g L}^{-1}$]		Recuperación [%]
		SPS	ICP-OES	
Río Paraná	Mar-2005	42,0 \pm 0,1	41,95 \pm 0,30	100,1
	May-2005	51,5 \pm 0,2	51,88 \pm 0,42	99,2
	Ago-2005	10,2 \pm 0,1	10,20 \pm 0,12	100,0
	Oct-2005	8,2 \pm 0,1	8,22 \pm 0,14	99,7
	Dic-2005	48,0 \pm 0,3	48,32 \pm 0,35	99,3
	Feb-2006	55,8 \pm 0,5	56,00 \pm 0,42	99,6

Una vez medida de la concentración total se determinó la concentración del Pb(II) usando un espectrómetro de emisión atómica asociada al plasma con acoplamiento óptico (ICP-OES) marca Baird ICP2070 provisto con nebulizador ultrasónico marca U 5000 AT (CETAC Technologies) según técnica previamente

estandarizada por el grupo de trabajos de Química Analítica de la Universidad de San Luis¹⁷. Los resultados obtenidos y porcentajes de recuperación, pueden visualizarse en la tabla 6.9.

6.4.2. Fraccionamiento químico experimental de Pb(II)

6.4.2.1. Determinación de Pb(II) en la fracción soluble y particulada

Los resultados obtenidos a partir de la etapa de filtración permiten diferenciar dos fracciones, mayores o principales de la muestra, la fracción particulada (insolubles) y la fracción soluble del Pb(II).

La fracción particulada o fracción de analito unida a material insoluble en suspensión en la muestra, se determinó por diferencia entre la concentración de Pb(II) total y la concentración de Pb(II) soluble.

Las aguas naturales provenientes del Río Paraná, se filtraron a través de membrana de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro bajo presión de vacío.

La membrana es capaz de retener las partículas insolubles con diámetro mayor al tamaño de poro, diferenciando de esta manera ambas fracciones. La fracción soluble se determinó luego midiendo la concentración de Pb(II) en el filtrado siguiendo los pasos descritos en el capítulo anterior en la sección 5.5.14. para Pb(II), previa digestión con mezcla $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$. Ver tabla 6.10.

Tabla 6.10. Concentración de Pb(II) correspondiente a las fracciones total, soluble y particulada.

Fecha [mmm-aaaa]	Fracciones [$\mu\text{g L}^{-1}$]		
	Total	Soluble	Particulada
Mar-2005	42,0 \pm 0,1	6,0 \pm 0,1	36,0 \pm 0,2
May-2005	51,5 \pm 0,2	10,2 \pm 0,1	41,3 \pm 0,3
Ago-2005	10,2 \pm 0,2	< 2,7	10,2 \pm 0,2
Oct-2005	8,2 \pm 0,1	< 2,7	8,2 \pm 0,1
Dic-2005	48,0 \pm 0,3	16,4 \pm 0,1	31,6 \pm 0,4
Feb-2006	55,8 \pm 0,5	11,2 \pm 0,2	44,6 \pm 0,7

6.4.2.2. Determinación de Pb(II) en la fracción complejada

Para la determinación de la fracción complejada, se hizo pasar al filtrado obtenido en la etapa anterior a través de una columna conteniendo la resina Silica C-18. La resina retiene la fracción de metal unida a sustancias no polares (ácidos húmicos) que luego son eluidos con metanol.

El extracto metanólico se digiere siguiendo el procedimiento para el método del $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, y se midió la concentración de metal correspondiente directamente. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.11.

Tabla 6.11. Separación de la fracción soluble de Pb(II) en dos sub-grupos: Fracción complejada y fracción libre

Muestra	Fecha [mmm-aaaa]	Pb(II) soluble [$\mu\text{g L}^{-1}$]	
		Pb(II) complejado	Pb(II) libre
Río Paraná	Mar-2005	$5,4 \pm 0,1$	$< 2,7$
	May-2005	$11,3 \pm 0,1$	$< 2,7$
	Ago-2005	$< 2,7$	$< 2,7$
	Oct-2005	$< 2,7$	$< 2,7$
	Dic-2005	$13,0 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,1$
	Feb-2006	$10,2 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,2$

6.4.2.3. Determinación de Pb(II) en la fracción metal libre

En el eluido de la columna que contiene la Silica C-18 se midió directamente (sin digerir) la concentración de Pb(II), que corresponde a la fracción de metal libre presente en la muestra. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.11.

6.4.3. Patrón de distribución del Pb(II)

La figura 6.5. muestra los diferentes valores de concentración total de Pb(II) expresada en $\mu\text{g L}^{-1}$ en aguas del Río Paraná como gráfico de barras obtenidas durante las campañas de monitoreo realizadas durante el período 2005 - 2006.

En la figura 6.6. se exhibe el patrón de distribución del Pb(II) como gráfico de barras indicando el porcentaje de Pb(II) asociado a cada fracción definida por el esquema de fraccionamiento. Este gráfico permite comparar las distribuciones obtenidas

a lo largo del año. Los resultados expresados como concentraciones en $\mu\text{g L}^{-1}$ se expusieron en las tablas 6.10. y 6.11.

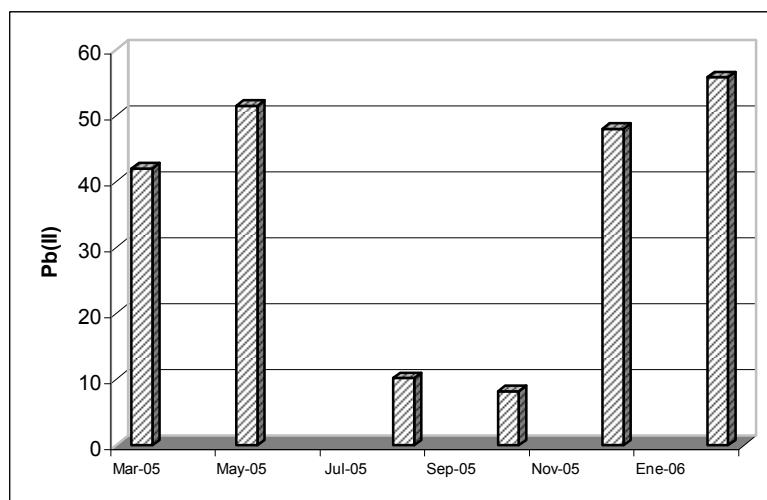


Figura 6.5. Gráfico de concentraciones totales de Pb(II) [$\mu\text{g L}^{-1}$]

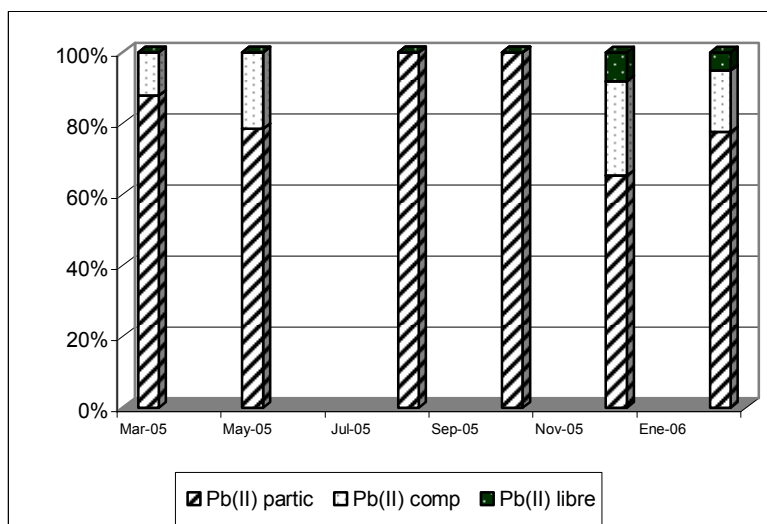


Figura 6.6. Gráfico de distribución de Pb(II) entre las diferentes fracciones obtenidas.

6.4.4. Validación del método aplicado para Pb(II)

Se tomaron 500 mL de muestra y se la dividió en 10 porciones iguales de 50 mL cada una. El método propuesto se aplicó a 6 alícuotas y la concentración de Pb(II) obtenida como promedio, se tomó como valor base. Luego cantidades crecientes de

Pb(II) fueron adicionadas a las otras alícuotas de la muestra y sus concentraciones determinadas por el mismo método.

Los resultados obtenidos pueden visualizarse en la tabla 6.12.

Tabla 6.12. Validación del método para determinación de Pb(II) aguas naturales

Alícuotas	Valor Base [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Pb(II) adicionado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Pb(II) encontrado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	% recuperación*
1	--	0,0	10,2 \pm 0,3	--
2	10,2	3,0	13,1	99,2
3	10,2	6,0	16,1	99,4
4	10,2	10,0	20,2	100,0
5	10,2	20,0	30,3	100,3

* $100 \times [(\text{Pb(II) encontrado} - \text{Pb(II) base}) / \text{Pb(II) adicionado}]$

Finalmente se realizó la comparación entre las concentraciones totales obtenidas por procedimientos independientes y la suma de las concentraciones individuales de las fracciones, dado que al igual que en el caso anterior ofrecen una vía alternativa para verificar los posibles errores sistemáticos que se traducen en pérdidas de elementos, contaminación u otras causas indeterminadas durante las manipulaciones en el transcurso del fraccionamiento químico. En este caso se comparó la suma de concentraciones medidas en cada fracción con respecto a la concentración total medida por el método de referencia. Los valores de las concentraciones obtenidas e informadas para Pb(II), se incluyen en la tabla 6.13.

Tabla 6.13. Comparación entre las concentraciones de Pb(II) totales determinadas con ICP-OES y la sumatoria de las concentraciones obtenidas en cada fracción por SPS.

Muestra		Pb(II) [$\mu\text{g L}^{-1}$]
Mar-2005	Conc. Total	41,95 \pm 0,30
	\sum fracciones	41,4 \pm 0,3
	% recuperacion	98,6
May-2005	Conc. Total	51,88 \pm 0,42
	\sum fracciones	52,6 \pm 0,4
	% recuperacion	101,4
Ago-2005	Conc. Total	10,20 \pm 0,12
	\sum fracciones	10,2 \pm 0,2
	% recuperacion	100,0
Oct-2005	Conc. Total	8,22 \pm 0,14
	\sum fracciones	8,2 \pm 0,1
	% recuperacion	99,7
Dic-2005	Conc. Total	48,32 \pm 0,35
	\sum fracciones	49,2 \pm 0,7
	% recuperacion	101,8
Feb-2006	Conc. Total	56,00 \pm 0,42
	\sum fracciones	58,5 \pm 1,0
	% recuperacion	104,5

¹ Pohl, P., *Trends in Analytical Chemistry* (2006) 25, 1

² Troccoli, O.E., *Heavy metals in seawater and brines in: R.A.* (2000), Meyers Ed., *Encyclopaedia of Analytical Chemistry, Applications, theory and instrumentation*, vol. 3, Jhon Wiley & sons.

- ³ Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J. & Robert, D., “*Environmental Chemistry*”, (2005), Springer-science, Berlin, 119
- ⁴ Tokalioglu, S., Kartal, S. and Elci, L., *Anal. Sci.* (2000) 16, 1169
- ⁵ Fernandez, F., Tudino, M.B. and Troccoli, O., *J. Anal. At. Spectrom.* (2000) 15, 687
- ⁶ E. M. Thurman, M. S. Mills. “*Solid Phase Extraction. Principles and Practice*” (1998) Wiley-VCH, New York.
- ⁷ J. S. Fritz, “*Analytical Solid-Phase Extraction*” (1999) Willey-VCH, New York
- ⁸ Griffith, L. M.; Ward, R. C.; McBride, G. B.; Loftis, J. C., “Data analysis considerations in producing 'comparable' information for water quality management purposes. National Water Quality Monitoring Council, United States Geological Survey” (2001) Technical Report 01-01
- ⁹ Suess, M.J., “*Examination of water for pollution control: a reference handbook*” (1982) 3, Pergamon Press.
- ¹⁰ Bubb, J.M. and Lester, J.N., “*Anthropogenic heavy metal inputs to lowland river system, a case study: The River Stour, U.K.*”, *Water Air Soil Pollut.* (1994) 78, 279
- ¹¹ Kebbekus, B. B. & Mitra, S., “*Environmental Chemical Analysis*”, (1998) London : Blackie.
- ¹² Schalscha B. E. and Ahumada T. I., “*Heavy metals in rivers and soils of central Chile*”, (1998) 37, 251
- ¹³ APHA (American Public Health Association). “*Standard methods for the examination of water and wastewater*” (1998) 20th Edition.
- ¹⁴ Acevedo, H.A., Vazquez, F.A., Wuilloud, R.G., Olsina, R.A. and Martinez, L.D. *Chemia Analityczna* (Warsaw), (2001) 46(1), 59
- ¹⁵ Prichard, E. , Mackay, G. M., Points, J., *Trace Analysis: a structures approach to obtaining reliable results.* (1996), The Royal Society of Chemistry, U. K. 38.
- ¹⁶ Xian, X., *Plant and Soil*, (1989), 113, 257
- ¹⁷ Wuilloud, R., Acevedo, H.A., Vazquez, F.A. & Martinez, L.D., *Anal. Letters*, (2002), 35(10), 1649

CAPITULO VII

7.1. Propósitos

En general los métodos analíticos utilizados en estudios de especiación o fraccionamiento incluyen técnicas espectroscópicas y separativas. Las técnicas más habitualmente empleadas para la determinación de concentraciones de metales a nivel de vestigios de metales pesados están basadas en la espectrometría atómica. Sin embargo las técnicas de espectrometría atómica presentan como principal desventaja el elevado costo, desde el punto de vista no solo de la operación sino también de la instalación de los instrumentos necesarios. Esto justifica la necesidad de desarrollar métodos espectrométricos, aptos para la determinación de éstos elementos que asocien a la reconocida sensibilidad que es dable alcanzar en la reacción cromática, un grado de selectividad suficiente, tal que permita obviar el efecto interferente de los concomitantes más comunes en las muestras habitualmente de interés y el bajo costo. En este trabajo se logra el objetivo de realizar fraccionamiento químico de Cd(II) y Pb(II) en aguas del Río Paraná en inmediaciones del puerto de la ciudad de Corrientes, con determinación de éstos metales por espectrofotometría en fase sólida (SPS) a nivel de vestigios. La metodología desarrollada ha demostrado ser adecuada y confiable para la determinación de la concentración de estos metales en las diferentes fracciones, presentando como principales ventajas la sencillez y el bajo costo de aplicación, simultáneamente se utilizó como método de contraste el ICP-OES.

Es importante destacar también que no se encontraron antecedentes bibliográficos hasta el presente que se refieran al fraccionamiento químico con aplicación de la espectrofotometría en fase sólida y tampoco se encuentran antecedentes de estudios de fraccionamiento químico de Cd(II) y Pb(II) en aguas de este río.

El fraccionamiento químico de Cd(II) y Pb(II) es importante en virtud de la influencia que, vestigios de estos elementos y sus asociaciones en el ambiente, pueden ejercer en el equilibrio ambiental. Si bien el empleo de técnicas de extracción química para predecir la bio-disponibilidad de metales pesados siempre estará sujeto a críticas. Los métodos varían de laboratorio a laboratorio y hay escasez de materiales de

referencia certificados apropiados. Sin embargo estas técnicas dan información empírica relativa sobre las posibles asociaciones de los metales pesados.

7.2. Conclusiones

Del análisis de las metodologías desarrolladas en este trabajo de tesis, es posible llegar a una serie de conclusiones, muchas de las cuales ya han sido adelantadas. A modo de corolario para brindar una imagen global del trabajo realizado, las consideraciones finales se reúnen aquí:

7.2.1. Determinación de Cd(II) por SPS

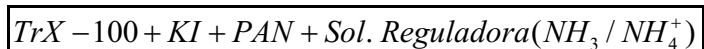
El reactivo seleccionado para la determinación de Cd(II) por SPS fue el 1-(2-piridilazo)-2-naftol, atendiendo a la sensibilidad que se logra, su fácil disponibilidad y la marcada estabilidad del complejo Cd(II)-PAN.

Por ser el PAN y su complejo con Cd(II), escasamente solubles en agua, se incorpora un agente tensoactivo. Los mejores resultados se alcanzaron cuando se utilizó un tensoactivo no iónico, Tritón X-100, en una concentración del orden de 0,05% v/v.

Las óptimas condiciones de acidez, se observan en el intervalo comprendido para valores de pH entre 8,5 y 10,5.

Se evaluaron diferentes soluciones reguladoras que permitieron alcanzar el valor de pH mencionado. Los resultados más apropiados se obtuvieron con mezclas amoníaco/cloruro de amonio.

El orden de adición de reactivos debe guardar la siguiente secuencia:



En la espectrofotometría en fase sólida el primer objetivo que se plantea es la elección del soporte adecuado sobre el que se fija el compuesto en estudio. Luego de ensayar diferentes soportes sólidos, se eligió la resina aniónica Dowex 1X8, dado que se alcanzaron fijaciones rápidas y completas, del complejo Cd-PAN previamente formado.

Se optimizaron en forma simultánea, mediante la aplicación del método de Doehlert la concentración de reactivo complejante y reactivo enmascarante (KI). Los

valores de concentración óptima calculados son los siguientes: $[PAN] = 7,12 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ y $[KI] = 1,94 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

La cantidad de resina que proporciona una máxima absorbancia en este sensor es 0,0700 g, que es una cantidad fácilmente transferible con gotero. Se estableció que un tiempo de agitación de 20 minutos es suficiente para alcanzar el máximo de absorbancia. La intensidad de la coloración de los complejos fijados a la resina no manifiesta modificaciones al menos durante 48 horas.

Luego se realiza la curva de calibración. La gráfica de calibración fue lineal, con un coeficiente de correlación de 0,9995, la linealidad se mantuvo desde valores cercanos al límite de detección y hasta al menos $100 \mu\text{g L}^{-1}$ el valor del límite de detección obtenido para 50 mL de muestra de una solución de Cd(II) en las condiciones anteriormente especificadas fue de $0,22 \mu\text{g L}^{-1}$. Pueden obtenerse mejores límites de detección trabajando con mayores volúmenes de muestra.

Finalmente se realizó el estudio de posibles interferencias, donde se pudo observar que la selectividad del método alcanzada para el Cd(II) es adecuada para su aplicación en aguas provenientes del Río Paraná, teniendo en cuenta la composición habitual de las mismas.

7.2.2. Determinación de Pb(II) por SPS

El reactivo seleccionado para la determinación de Pb(II) por SPS fue un derivado bromado del 2-(2-piridilazo)-5-dietilaminofenol (PADAP), atendiendo a la sensibilidad que se logra, su fácil accesibilidad y que tanto sus soluciones como los complejos que forma presentan una marcada estabilidad.

Por ser el 5-Br-PADAP y su complejo con el Pb(II), escasamente solubles en agua, se incorporó un agente tensoactivo. Los mejores resultados se alcanzaron cuando se utilizó un tensoactivo no iónico, Tritón X-100, en una concentración del orden de 0,025% v/v.

La acidez óptima, se observa en el intervalo comprendido para valores de pH entre 8,5 y 10,5.

Se evaluaron diferentes soluciones reguladoras que permitieron alcanzar el valor de pH mencionado. Los resultados más apropiados se obtuvieron con mezclas amoníaco/cloruro de amonio.

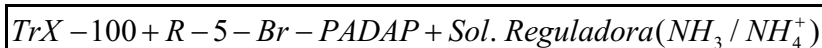
Como en el caso del Cd(II), luego de ensayar diferentes soportes sólidos, se eligió el soporte aniónico Dowex 1X8, dado que se alcanzaron fijaciones rápidas y completas, del complejo Pb-5-Br-PADAP.

Dado el intenso color de las soluciones de 5-Br-PADAP, se hizo necesario modificar el proceso para la realización de la SPS. Se decidió fijar el reactivo a la resina (funcionalización de la resina) para luego ponerla en contacto con soluciones que contengan el analito en una etapa subsiguiente. Para la funcionalización de la resina se siguieron los pasos detallados en el capítulo 5, sección 5.5.6.

Para mejorar el contacto de las soluciones problemas con la resina funcionalizada se hizo necesario agregar una solución de tensoactivo. El tensoactivo seleccionado fue el Triton X-100 y la concentración optimizada fue 0,025% v/v.

La cantidad de resina a empaquetarse que proporciona una máxima absorbancia en este sensor es 0,0700 g, que es una cantidad fácilmente transferible con gotero. Se estableció que un tiempo de agitación de 20 minutos es suficiente para alcanzar el máximo de absorbancia. La intensidad de la coloración de los complejos fijados a la resina no manifiesta modificaciones al menos durante 48 horas, como en el caso estudiado del Cd(II).

El orden de adición de reactivos para la determinación de Pb(II) debe guardar la siguiente secuencia:



Luego se realizó la curva de calibración. La gráfica de calibración fue lineal, con un coeficiente de correlación de 0,998; la linealidad se mantuvo desde valores cercanos al límite de detección y hasta al menos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. El valor del límite de detección obtenido para 50 mL de muestra de una solución de Pb(II) en las condiciones anteriormente especificadas fue de 0,8 $\mu\text{g L}^{-1}$. Pueden obtenerse mejores límites de detección trabajando con mayores volúmenes de muestra.

Finalmente se realizó el estudio de posibles interferencias, se concluyó que la selectividad es adecuada para su aplicación en aguas provenientes del Río Paraná, cuando se agregó 0,2 mL de KCN 0,1 mol L⁻¹ como agente enmascarante.

7.2.3. Fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II) en aguas del Río Paraná

Se realizó el fraccionamiento químico de Cd(II) y Pb(II) en aguas provenientes del Río Paraná, altura Corrientes, teniendo en cuenta a las diferentes especies mayoritarias con las que interactúan los analitos en aguas naturales, pudiéndose diferenciar una fracción insoluble (particulada), que se separó por filtración a través de membrana de 0,45 μm . La fracción es formada principalmente por arcillas insolubles, óxidos hidratados insolubles de elementos mayoritarios (Ej: Fe(III)) y algunos detritos orgánicos de composición amorfa, capaces de adsorber iones metálicos. Por otro lado se encuentra la fracción soluble formada por los iones metálicos hidratados propiamente dichos y los complejos solubles de diferente naturaleza. Entre los ligandos orgánicos disponibles para la formación de complejos se encuentran los ácidos húmicos y fúlvicos principalmente en aguas de río. Estas sustancias orgánicas interactúan fuertemente con los analitos para formar complejos húmicos, afectando de esta manera el equilibrio de estos iones en la matriz acuosa. Si bien la estructuras moleculares de éstos complejos resulta complicada, dada su naturaleza hidrofóbica, estas especies químicas pueden ser retenidas en columnas rellenas con resinas de adsorción por ejemplo, las resinas tipo Amberlite o la Silica funcionalizada con hidrocarburos de cadena larga (Silica C-18).

Para la diferenciación de las diferentes fracciones solubles se desarrollaron estudios sobre las posibles resinas para retener la fracción de metal complejado.

Se realizó un estudio sobre la retención de metal libre por la resina, resultando con mejor desempeño la Silica C-18, por lo que resultó seleccionada.

Previa a la determinación de la concentración de analito en cada fracción se hizo necesario digerir o mineralizar de las muestras, para ello se compararon algunos métodos de mineralización mediante el agregado de ácidos. De los resultados obtenidos se seleccionó el método de mineralización que utiliza una mezcla de $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$.

Finalmente se aplicó el esquema de fraccionamiento propuesto a muestras del Río Paraná, altura Corrientes, recolectadas en el período 2005 – 2006. De los resultados obtenidos, se pudo observar grandes variaciones en las concentraciones totales de Cd(II) y Pb(II) a lo largo de las diferentes estaciones climáticas, correlacionadas con los períodos de creciente y bajante del río. También se observaron grandes cambios en la distribución porcentual de cada analito entre las diferentes fracciones a lo largo del año.

7.2.4. De la validación del método propuesto

Con el objeto de validar la metodología analítica propuesta y al no contar con patrones internacionales, se contrastaron los resultados obtenidos para la concentración total de los analitos en los mineralizados con otras determinaciones realizadas en forma independiente por ICP-OES. Se encontró una excelente concordancia entre los valores obtenidos tanto para Cd(II) como para Pb(II).

Se realizaron también estudios de recuperación, con sobreagregado de estándar, obteniéndose excelentes resultados para ambos analitos.

Finalmente los valores de concentración obtenidos para cada fracción se sumaron y compararon con los valores de concentración total de analito presente en la muestra determinado utilizando ICP-OES como método de contraste. En todos los casos el porcentaje de recuperación alcanzó valores superiores al 90%, exceptuando las muestras correspondiente al mes de mayo y octubre de 2005, en el fraccionamiento de Cd(II) que alcanzaron valores de 89,6% y 88,8% respectivamente. Dichos valores de recuperación pueden considerarse como aceptables teniendo en cuenta los bajos valores de concentración total de Cd(II) encontrados en las muestras de Río Paraná correspondientes a dichos meses.

7.2.5. Conclusiones generales

Los resultados obtenidos para las diferentes muestras confirman que la metodología diseñada es apropiada para el fraccionamiento de Cd(II) y Pb(II) a nivel de vestigios en muestras de agua del Río Paraná, altura Corrientes, en las diferentes épocas del año.

Entre las principales ventajas de la metodología propuesta se encuentran la sencillez y el bajo costo de los equipos y reactivos requeridos (además de la adecuada sensibilidad), esto permite que sea de fácil aplicación para el control y distribución de elementos vestigios de interés ambiental.