

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

POSGRADO EN QUÍMICA

Desarrollo de un procedimiento de determinación de arsénico inorgánico en tortilla mexicana mediante extracción en fase sólida seguida por generación de arsina y espectrometría de emisión atómica con plasma de nitrógeno sostenido por microondas (SPE - HG-MP-AES)

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO EN:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Presenta:

I.B.Q. MOISÉS GUERRERO ESPERANZA

Director: Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-director: Dra. Eunice Yáñez Barrientos

Co-director: Kazimierz Wrobel

Guanajuato, Gto. 29 de Julio del 2016

REALIZADA POR:
MOISÉS GUERRERO ESPERANZA

DIRIGIDA POR:
Director: **Dra. Katarzyna Dorota Wrobel**
Co-Director: **Dr. Eunice Yáñez Barrientos**
Co-Director: **Dra. Kazimierz Wrobel**

SINODALES

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa
Presidente

Dra. Armando Alcázar Mejía
Secretario

Dr. Armando Gómez Ojeda
Vocal

Dr. Gustavo Cruz Jiménez
Suplente

Guanajuato, Gto. Julio de 2016

Por medio de la presente me responsabilizo de la autenticidad y originalidad del presente trabajo titulado “**Desarrollo de un procedimiento de determinación de arsénico inorgánico en tortilla mexicana mediante extracción en fase sólida seguida por generación de arsina y espectrometría de emisión atómica con plasma de nitrógeno sostenido por microondas (SPE - HG-MP-AES)**”, realizado por el I.B.Q. Moisés Guerrero Esperanza, para obtener el título de **MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (M.C)**, en las Instalaciones del Campus Guanajuato en el Departamento de Química de la Universidad de Guanajuato.

Director:

Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-Director:

Dr. Kazimierz Wrobel

Co-Director:

Dra. Eunice Yáñez Barrientos

ÍNDICE

Capítulo I Introducción	xii
1.1. Arsénico.....	1
1.1.1. Contaminación de arsénico en el ambiente	1
1.1.2. Toxicidad	2
1.1.3. Normativa para el As.....	4
1.2. Métodos analíticos utilizados en la especiación de arsénico	6
1.2.1. Técnicas de separación cromatográfica	7
1.2.1.1. Intercambio iónico.....	8
1.2.1.2. Fase inversa con formación de pares iónicos	10
1.2.1.3. Electroforesis capilar	11
1.2.1.4. Cromatografía de gases	12
1.2.2. Detectores utilizados en separación de especies arsenicales por HPLC.....	12
1.2.2.1. Espectrometría atómica	12
1.2.2.2. Espectrometría de masas atómica	14
1.2.3. Sistemas no cromatográficos en la especiación de arsénico	16
1.2.3.1. Espectrofotometría UV-Vis.....	16
1.2.3.2. Espectroscopía de rayos X	17
1.3. Espectrómetro de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES).....	19
1.3.1. Requerimientos	19
1.3.2. Generación del plasma	20
1.3.3. Sistema óptico.....	21
1.3.4. Detector	22
1.4. Generación de hidruros como método de introducción de muestra.....	23
1.4.1. Generación de hidruros de las especies de arsénico	23
1.4.2. Acondicionamiento de las muestras	24
1.4.2.1. Estado de oxidación	24
1.4.2.2. Concentración del agente reductor	25
1.4.2.3. Acidificación de la muestra	27
1.4.3.4. Interferencias	29
1.5. Uso de estándar interno en procedimientos analíticos	30
1.6. Problemática del As en cereales.	32

Capítulo II Objetivos	34
2. Objetivo general	35
2.1. Objetivos específicos	35
Capítulo III Materiales y métodos	36
3.1. Instrumentación.....	37
3.2. Reactivos y materiales	37
3.3. Muestras reales	38
3.4. Programas utilizados	38
3.5. Procedimientos adoptados.....	39
3.5.1. Determinación de As total en tortillas mediante ICP-MS.....	39
3.5.2. Determinación de As(III), As(V), DMAs(V) y MMAs(V) mediante HPLC-ICP-MS. 40	40
3.6. Procedimiento de determinación de iAs desarrollado en este trabajo... 42	42
3.6.1. Extracción de tortilla	42
3.6.2. Separación de iAs mediante extracción en fase sólida.	42
3.6.3. Determinación de iAs mediante HG-MP-AES utilizando Te(IV) como estándar interno.....	43
Capítulo IV Resultados y discusión	45
4.1. Determinación del contenido total de As en tortillas.....	46
4.2. Determinación de As(III), As(V), MMAs(V) y DMAs(V) en tortillas mediante HPLC-ICP-MS.....	47
4.3. Estudio de las condiciones de generación de hidruros y de detección mediante MP-AES en el análisis de compuestos individuales y del Te(IV) como estándar interno.....	50
4.4. Estudio de la separación de los compuestos orgánicos e inorgánicos de As en una columna de intercambio aniónico modificada con cloruro de plata.	54
4.5. Evaluación de parámetros analíticos y pruebas de exactitud del procedimiento SPE-HG-MP-AES propuesto.....	62
4.6. Determinación de iAs en tortillas por el procedimiento propuesto y comparación de los resultados con los obtenidos mediante el método HPLC-ICP-MS. 68	68
Capítulo V Conclusiones.....	71
Bibliografía.....	75

Índice de figuras

Fig. 1.1: Especies de arsénico comúnmente detectadas en materiales medioambientales y en organismos vivos.....	(8)
Fig. 1.2: Diagrama de distribución de especies de: a) As(III) b) As(V) c) MMAs(V) d) DMAs(V).....	(15)
Fig. 1.3: Esquema interno de generación del plasma en el MP-AES Agilent 4100.....	(27)
Fig. 1.4: Esquema interno del sistema óptico del MP-AES Agilent 4100.....	(28)
Fig. 1.5: Mecanismo de reacción de la generación de hidruros para As.....	(30)
Fig. 3.1: Sistema de introducción de muestra para generación de hidruros (HG).....	(48)
Fig. 4.1: Típicos cromatogramas HPLC-ICP-MS obtenidos en el análisis de tortillas (-), con línea punteada se presentan cromatogramas de las mismas muestras con adición de estándar de $1 \mu\text{g As L}^{-1}$ de cada especie (---).....	(53)
Fig. 4.2: Señales de emisión adquiridos para las soluciones de calibración de Te(IV) obtenidos mediante HG-MP-AES a concentraciones de 0, 10, 30, 50, 100, 300, 500 y $1\ 000 \mu\text{g L}^{-1}$. a) Línea de emisión de 214.281 nm. b) Línea de emisión de 238.578 nm.....	(58)
Fig. 4.3: Conexión de la bomba del HPLC y columna SAX en una válvula de 6 canales para transportar el flujo a través de la columna.....	(60)
Fig. 4.4: Típicos perfiles de elución de As obtenidos para soluciones estándar de sus especies en la columna SAX-AgCl, monitoreando la longitud de onda del As de 228.812 nm en MP-AES.....	(63)

Fig. 4.5: Señales de emisión de As (228.812 nm). (-) Estándares de As(V) (0, 10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) que no fueron ingresados en cartuchos SAX-AgCl. (- - -) Mezcla de estándares de As(V) (0, 10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) con MMAs(V) y DMAs(V) (50 $\mu\text{g L}^{-1}$) ingresados en SAX-AgCl.....(69)

Fig. 4.6: Espectros de emisión de las muestras preconcentradas, comparadas con el espectro de emisión del estándar a 30 $\mu\text{g L}^{-1}$, concentración a la cual se calculó que sería la elución de las muestras.....(71)

Índice de Tablas

Tabla 1.1: Dosis letal media (DL ₅₀) en ratas de algunas especies arsenicales.....	(9)
Tabla 1.2: Regulación de arsénico inorgánico en productos alimenticios en China, Australia y Nueva Zelanda.....	(11)
Tabla 1.3: Constantes de acidez (pKa) de As(III), As(V), MMAs(V), DMAs(V) y AB.....	(14)
Tabla 1.4: Condiciones de concentración de NaBH ₄ para formar hidruros en diferentes trabajos revisados.....	(32)
Tabla 3.1: Parámetros utilizados para la cuantificación de As total mediante ICP-MS.....	(44)
Tabla 3.2: Parámetros utilizados para la especiación de As en tortillas mediante HPLC-ICP-MS.....	(46)
Tabla 3.3: Funciones de calibración obtenidos en el procedimiento HPLC-ICP-MS para As(III), DMAs(V), MMAs(V) y As(V).....	(46)
Tabla 3.4: Parámetros de operación de HG-MP-AES.....	(49)
Tabla 4.1: Concentraciones de As total en tortillas de maíz obtenidas mediante el análisis por e ICP-MS expresado como µg de As por kilogramo de tortilla liofilizada.....	(51)
Tabla 4.2: Resultados de la especiación de As en tortillas, obtenidos mediante el procedimiento HPLC – ICP-MS.....	(52)
Tabla 4.3: Porcentajes de recuperación de especies de As en las muestras de tortilla enriquecidas con una adición de estándar de 1 µg As L ⁻¹ para cada una de las especies.....	(54)

Tabla 4.4: Concentración de iAs (As(III)+As(V)) en muestras de tortilla y el porcentaje que esta forma representa de la cantidad de As total.....	(54)
Tabla 4.5: Funciones de regresión lineal obtenidas para As en el proceso de calibración de HG-MP-AES para As(V), As(III), DMAs(V) y MMAs(V).....	(57)
Tabla 4.6: Funciones de regresión lineal obtenidas para Te(IV) en el proceso de calibración utilizando el sistema HG-MP-AES. ([Te] – concentración de telurio, $\mu\text{g L}^{-1}$).....	(58)
Tabla 4.7: Parámetros de MP-AES utilizados para llevar a cabo el análisis del comportamiento de las especies de As en la columna SAX-AgCl.....	(64)
Tabla 4.8: Funciones de calibración obtenidos en el procedimiento MP-AES para As(III),DMAs(V) y MMAs(V).....	(65)
Tabla 4.9: Concentraciones de especies de As en las soluciones ingresadas a la columna SAX-AgCl, en fracciones recolectadas y, respectivos porcentajes de recuperación.....	(65)
Tabla 4.10: Parámetros de calibración en el método HG-MP-AES para As(V).....	(67)
Tabla 4.11: Porcentajes de recuperación de As(V) a partir de sus mezclas con DMAs(V) y MMAs(V) utilizando extracción en fase solida (SAX-AgCl) y determinación de As mediante HG-MP-AES con Te(IV) como estándar interno.....	(68)
Tabla 4.12: Volúmenes y concentraciones de As(V) introducidas en el cartucho SAX-AgCl, masa eluida y porcentajes de recuperación de As evaluados en el procedimiento SPE - HG-MP-AES.....	(70)
Tabla 4.13: Parámetros analíticos obtenidos para iAs en el procedimiento SPE - HG-MP-AES sin y con el uso de estándar interno (Te(IV)).....	(72)

Tabla 4.14: Arsénico inorgánico determinado en dos tortillas mediante el procedimiento propuesto (SPE - HG-MP-AES) y método HPLC - ICP-MS.....(73)

Índice de abreviaciones

Símbolo	Descripción
AB	Arsenobetaína
AC	Arsenocolina
AES	Espectrometría de emisión atómica
AFS	Espectrometría de fluorescencia atómica
AgDDTC	Dietil ditiocarbamato de plata
CE	Electroforesis capilar
CPs	Cuentas por segundo
CS	Estándares de calibración
CV	Coeficiente de varianza
DL ₅₀	Dosis letal media en ratas
DMAs(V)	Dimetilarsénico (V)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGCM	Módulo de control de gas externo
EOF	Flujo electroosmótico
ESI-MS	Espectrometría de masas por electronebulización
EXAFS	Absorción de rayos-X
FAAS	Espectrometría de absorción atómica por flama
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
FIAAS	Espectrometría de absorción atómica por inyección de flujo
GC	Cromatografía de gases
GFAAS	Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito
HG	Generación de hidruros
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
iAs	Arsénico inorgánico
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo
ICP-MS	Espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo
IR	Espectroscopía Infrarrojo
IS	Estándar interno
LOD	Límite de detección
MMAs(V)	Monometilarsénico (V)
MP-AES	Espectrometría de emisión atómica por plasma de microondas
MSIS	Cámara de nebulización con modo de introducción de muestras múltiple
Nd	No detectado
oAs	Arsénico orgánico
OES	Espectrometría de emisión óptica
pka	Logaritmo negativo de la constante de disociación de acidez
QTOF	Separador de masas tipo cuadrupolo con detector de tiempo de vuelo
SAX	Intercambio aniónico fuerte
SAX-AgCl	Resina de intercambio aniónico fuerte modificada con cloruro de plata
S _{CS}	Señal de estándares de calibración
SD	Desviación estándar

SFC	Cromatografía en fluido supercrítico
S _{IS}	Señal del estándar interno
SPE	Extracción en fase sólida
SRBR	Relación señal/raíz de fondo
TBA	Tetrabutil amonio
TMAO	Trimetilarsénico
TMA ^{s+}	Tetrametilarsénico
UV	Espectroscopía ultravioleta
XANES	Espectroscopía de absorción de rayos-X cercana a la banda de absorción
XAS	Espectroscopía de absorción de rayos-X
XRF	Fluorescencia de rayos-X

RESUMEN

La tortilla es un importante componente de la dieta mexicana y un producto cada vez más popular a nivel mundial. Los granos de maíz, pueden acumular arsénico, principalmente en forma de especies inorgánicas (iAs), pero los datos sobre especiación de As en tortilla son inexistentes. En este trabajo se adquirieron 7 muestras de tortillas y se llevó a cabo la cuantificación de As total mediante ICP-MS, obteniendo concentraciones de As de entre 21.8 y 192 $\mu\text{g As kg}^{-1}$ tortilla. Posteriormente se llevó a cabo la separación de As(III), As(V), DMAs(V), MMAs(V) por cromatografía de intercambio aniónico en el sistema ICP-MS (HPLC-ICP-MS), con lo cual se demostró que la cantidad de iAs (As(III) + As(V)) se encuentra entre el 72.2 y el 97.9 % del As total en las tortillas.

Una vez que se demostró la presencia de As(V) y As(III) el trabajo se enfocó en establecer un procedimiento de determinación de arsénico inorgánico (iAs = As(III) + As(V)), separando el iAs de las especies metiladas (oAs = MMAs(V) + DMAs(V)) mediante una columna empacada con resina de intercambio aniónico fuerte (Select Supelco SAX) modificada con AgCl. Para estudiar los patrones de elución se monitoreó el As utilizando la línea de emisión de 228.812 nm en la salida de la columna y conectándola al MP-AES. Para la retención de las especies se utilizó tris 10 mM pH 9.0, en donde sólo se observó la elución de DMAs(V). Posteriormente se utilizó ácido acético pH 2.6, periodo en el cual eluyó el estándar individual de MMAs(V). Finalmente, al utilizar HNO₃ 0.1 % se observó la elución de As(V), por lo que se demostró la factibilidad de llevar a cabo la separación de iAs del oAs.

Posteriormente se optó por analizar tubos de extracción en fase sólida de intercambio aniónico fuerte (Select Supelco SAX) con la finalidad de reducir el tiempo de procesamiento de muestras y un menor gasto de reactivos, y modificándolos de manera análoga a la columna con AgCl. En este estudio se utilizó MP-AES para detectar/cuantificar el As utilizando la línea de 228.812 nm, y utilizando como introducción de muestra generación de hidruros (HG), además, para compensar imprecisiones durante la HG, el transporte de los hidruros hacia el plasma y

fluctuaciones en el plasma del MP-AES se utilizó Te(IV) como estándar interno (IS) analizando la línea de emisión de 214.281 nm.

El análisis de elución en los cartuchos SAX modificados con AgCl se llevó a cabo de manera similar al estudio en la columna, en donde las especies se retenían en Tris 10 mM pH 9.0, las especies de oAs se eliminaron con ácido acético pH 2.6 y el iAs se recuperaba utilizando HNO₃ 0.1 %. Se comprobó la factibilidad de utilizar los cartuchos SAX-AgCl para llevar a cabo la separación de iAs del oAs, para lo cual se cargaron en el cartucho mezclas con concentraciones variables de As(V) y concentraciones constantes de DMAs(V) y MMAs(V), comparándose con estándares de As(V) que no fueron cargados en el cartucho obteniéndose porcentajes de recuperación de entre 92.0 a 109 % de recuperación lo que comprobó que la separación fue eficiente. También se analizó el volumen que podía ser preconcentrado utilizando soluciones que tuvieran la misma cantidad en ng de As(V) pero disueltos en diferentes volúmenes (hasta 50 mL), eluyéndose con la misma cantidad de HNO₃ 0.1 % y se compararon con un estándar de As(V) que no fue ingresado en el cartucho, obteniéndose porcentajes de recuperación de entre 89.9 a 111 %, lo cual conduce a que se pueden preconcentrar hasta 50 mL de As(V) utilizando los cartuchos SAX-AgCl.

Se llevó a cabo la cuantificación de iAs mediante la columna SAX-AgCl de dos muestras de tortilla obteniéndose $219 \pm 24 \mu\text{g iAs kg}^{-1}$ tortilla, y de la siguiente tortilla se cuantificó $87 \pm 11 \mu\text{g iAs kg}^{-1}$ tortilla, que comparados con la suma de As(III) + As(V) analizada mediante HPLC-ICP-MS se obtuvo un porcentaje de recuperación de 112 y 113 %, respectivamente.

La metodología desarrollada de SPE-HG-MP-AES es llamativa por sus bajos costos debido a que no requiere de métodos cromatográficos, y el MP-AES representa una ventaja sobre equipos que utilizan gases con altos costos para llevar a cabo los análisis. En un trabajo futuro se requiere afinar las condiciones de extracción para llevar a cabo el análisis de muestras reales mediante SPE.

Capítulo I

Marco teórico

1.1. Arsénico

1.1.1. Contaminación de arsénico en el ambiente

El arsénico (As) es un elemento que se encuentra distribuido en la atmósfera, en la hidrosfera y en la biosfera (conforma alrededor de 5×10^{-4} % de la corteza terrestre), es el 20° elemento más abundante en la corteza terrestre [1], el 14° en aguas marinas y el 12° en el cuerpo humano [2].

Las diversas formas y especies del As en el medio ambiente provienen de una gran cantidad de fuentes naturales como la meteorización, actividad biológica y emisiones volcánicas, pero además existe una importante cantidad que proviene de actividades antropogénicas, tal es el caso de minería e industria metalúrgica ya que el arsénico se encuentra asociado a minerales de cobre y su emisión al medio ambiente ocurre durante el proceso de fundición; otro ejemplo son los pesticidas con base en compuestos de arsénico (PbHAsO_4 , $\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$, Na_3AsO_4) y también el uso de arseniato de cobre cromatado para la preservación de madera [3]; el uso de arseniato de galio (GaAs) en la industria de semiconductores; o en la aplicación de fertilizantes fosforados [4].

Los niveles de As en el ambiente son variables y este elemento puede encontrarse en aire, agua, suelos, vegetales y animales. [5].

Entre los compuestos inorgánicos y orgánicos arsenicales, se han identificado más de 60 especies químicas [6], de los cuales destacan las formas inorgánicas As(III) y As(V), las especies metiladas monometil arsénico (V) (MMAs(V)), dimetil arsénico (V) (DMAs(V)), trimetil arsénico (V) (TMAO) y el ion tetrametil arsénico (TMA^+), arsenocolina (AC), arsenobetaína (AB) los arsenoazúcares y los arsenolípidos [7], cuyas estructuras se presentan en la Fig. 1.1.

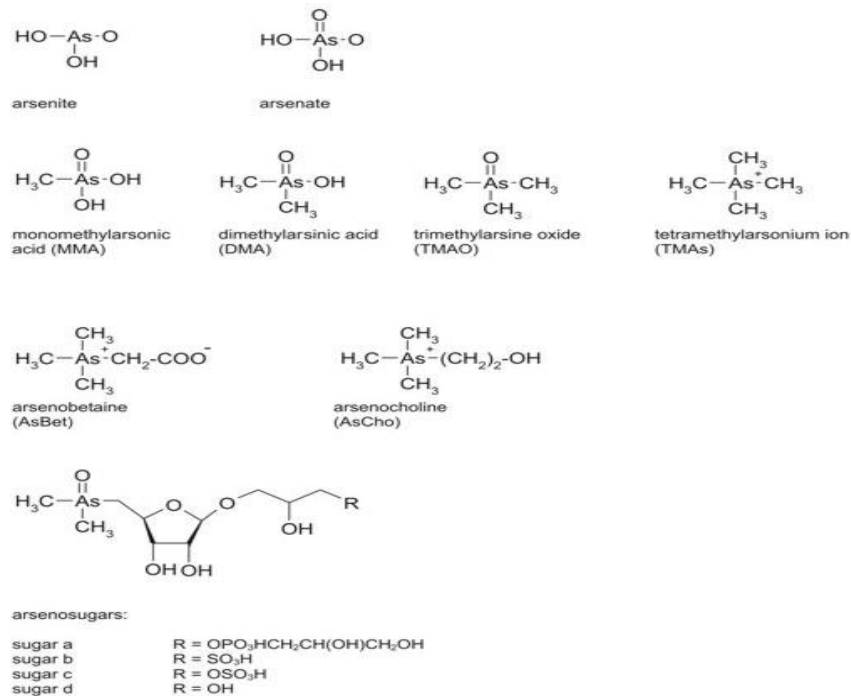


Fig. 1.1: Especies de arsénico comúnmente detectadas en materiales medioambientales y en organismos vivos [7].

1.1.2. Toxicidad

Dado que el As se acumula en el cuerpo humano, la exposición crónica puede resultar en su demostrado papel en la oncogénesis debido a que los compuestos con As presentan afinidad de grupos tiol y pueden sustituir el fósforo en reacciones biológicas inhibiendo la replicación del ADN y procesos metabólicos [8]. El arsénico ha sido asociado con cáncer de piel, pulmón y vejiga. Se han descrito también efectos adversos no carcinogénicos del arsénico como lesiones de la piel (hiperpigmentación e hiperqueratosis de las palmas de las manos y de las plantas de los pies), afección al sistema nervioso, irritación de órganos respiratorios y tracto gastrointestinal, anemia, desórdenes en el hígado, enfermedades vasculares y aún diabetes mellitus, además de afectar el desarrollo intelectual de los niños [3, 5, 9].

La ingesta excesiva a largo plazo (de 5 a 10 años) de As inorgánico a concentraciones de alrededor de 50 µg L⁻¹ en agua potable provoca arsenosis,

el cual es un término utilizado para relacionar los efectos tóxicos del As inorgánico a la salud [3].

El arsénico puede ingresar al organismo humano por consumo directo de agua contaminada por As, por consumo de alimentos contaminados con As como mariscos y pescados provenientes de aguas marinas o de estanques con altas concentraciones de As [9] o por cultivos vegetales, especialmente aquellos que hayan sido regados con agua proveniente de mantos acuíferos expuestos a este tóxico [3].

Los alimentos se pueden contaminar por irrigación o lixiviación de sedimentos y suelos usados para el cultivo de plantas comestibles [9] cosechadas en suelos donde se utilizó arseniato de plomo (PbHAsO_4) o el arseniato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$) como pesticidas, ya que aunque su uso disminuyó casi por completo hacia 1970, estos son compuestos muy estables que permanecen afectando los cultivos que crecen en la zona afectada [10].

No todos los compuestos de As son igualmente tóxicos, y por consiguiente la medición de As total en los productos alimenticios no necesariamente refleja su potencial de riesgo [11]. La Tabla 1.1 muestra las dosis letales medias en ratones para algunas especies de arsénico, siendo el arsénico inorgánico (iAs = As (III) + As (V)) la forma más tóxica mientras que la arsenocolina y arsenobetaína no son tóxicas.

Tabla 1.1: Dosis letal media (DL_{50}) en ratas de algunas especies arsenicales

Especie	DL_{50} en ratas (mg/kg de peso corporal)
AsH_3	3
As (III)	14
As (V)	20
MMA(V)	700 – 1 800
DMA(V)	700 – 2 600
Arsenocolina	> 10 000
Arsenobetaína	> 10 000

[12]

1.1.3. Normativa para el As

Alrededor del mundo se han establecido distintas normas para los límites máximos a los cuales se permite la presencia de As en distintos productos, especialmente en agua y en alimentos. A pesar de que desde hace tiempo es bien conocido el distinto carácter tóxico de sus diferentes especies siendo el iAs (As(III) + As(V)) más tóxico que las demás especies, en la actualidad la mayoría de las normas establecidas hacen referencia únicamente a As total, que no representa el verdadero grado de riesgo que se tiene por exposición o por consumo.

Entre 1991 y 2008 la Organización Mundial de la Salud (OMS) redujo en varios países el valor máximo permitido de As total en agua potable que con anterioridad se encontraba en $50 \mu\text{g L}^{-1}$, a $10 \mu\text{g L}^{-1}$, resaltando países desarrollados como Japón, los pertenecientes a la Unión Europea, Estados Unidos, y por otro lado, países cuya problemática de contaminación por As ha existido desde hace mucho tiempo como Siria, Laos, Taiwán, Vietnam, etc [9]. La norma mexicana NOM-000-SSA1-2010 aún se encuentra en la fase de proyecto, y reducirá el límite actual permisible de As total para agua potable y de consumo humano de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ a $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Las normativas relacionadas con la presencia de As en alimentos son mucho más escasas, y la concerniente con iAs es aún menor. En Brasil, a través del ministerio de agricultura, ganadería y abastecimiento, se establece que los alimentos marinos no deben sobrepasar 1 mg kg^{-1} de As total. En China la norma de niveles de contaminantes en comidas (GB 2762-20012) vigente desde el 2014, establece que los límites de As total en granos, vegetales frescos, productos fúngicos, carnes, leche en polvo, aceites, condimentos, azúcar, almidón, cocoa, chocolates, dulces, no debe sobrepasar de $0.5 \text{ mg As kg}^{-1}$, en leche y aceites no debe sobrepasar de $0.1 \text{ mg As kg}^{-1}$ y en el caso de bebidas y agua embotellada no debe sobrepasar de $0.01 \text{ mg As kg}^{-1}$.

Tabla 1.2: Regulación de arsénico inorgánico en productos alimenticios en China, Australia y Nueva Zelanda [13, 14]

País	Alimento	Máximo aceptado de iAs	Regulación
Australia y Nueva Zelanda	<ul style="list-style-type: none"> • Peces y crustáceos • Moluscos y algas 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mg kg⁻¹ • 1 mg kg⁻¹ 	Australia New Zeland Food Authority, 2013. Food Standards Australia-New Zeland
China	<ul style="list-style-type: none"> • Suplementos alimenticios para niños a base de cereales • Productos de origen acuático (exceptuando pescado) • Pescado; productos enlatados para niños • Productos derivados de algas o derivados de hígado de animales marinos 	<ul style="list-style-type: none"> • 0.2 mg kg⁻¹ • 0.5 mg kg⁻¹ • 0.1 mg kg⁻¹ • 0.3 mg kg⁻¹ 	MHC, 2005. GB 2762-20012

En Europa, la agencia de estándares de alimentos del Reino Unido (Food Standards Agency) está llevando a cabo discusiones para establecer límites de iAs en productos de arroz y en alimentos para niños, siendo los límites

propuestos de 0.1 mg iAs kg⁻¹ y de 0.2 mg iAs kg⁻¹ respectivamente [13]. Hay que resaltar que a pesar de que en 2009 y 2014 la autoridad europea de seguridad en alimentos (European Food Safety Authority) publicó reportes acerca de la exposición por ingesta de As en los habitantes de dichos países y se enfatizó la necesidad de analizar el iAs en alimentos, no se ha establecido alguna norma para su regulación.

En Estados Unidos, la FDA no establece límites máximos de As en alimentos, sin embargo, destaca la importancia de cuantificar iAs en alimentos, y de hecho en 2011 presentó un estudio de iAs en jugos de pera, obteniendo rangos de entre 2 y 194 µg iAs kg⁻¹. Así mismo en 2012 se cuantificó la cantidad de iAs en distintos tipos de arroz, obteniendo cantidades en el rango de 26 a 72 µg iAs kg⁻¹.

En la Tabla 1.2 se resumen las normas aplicadas en productos alimenticios y los límites máximos de iAs en China, Australia y Nueva Zelanda.

1.2. Métodos analíticos utilizados en la especiación de arsénico

La IUPAC ha definido la especiación química elemental como el conjunto de actividades analíticas de identificación y/o medida de cantidades de una o más formas o especies químicas individuales en una muestra [14, 15]. Como ya se mencionó en la sección anterior, se requiere de este análisis puesto que no todas las especies de As son igualmente tóxicas, y la cantidad total de As cuantificada en una muestra no representa el verdadero riesgo asociado al consumo de alimentos u otras fuentes de exposición.

El análisis de especiación está compuesto esencialmente por tres etapas: la preparación de la muestra, la separación de las especies y la detección/cuantificación de As en cada una de éstas [15, 16]. El procedimiento de preparación de muestra depende principalmente de su estado físico (líquido, sólido, gas) y de la composición de matriz química. En todo caso, el reto es extraer eficazmente las especies de As sin alterar su distribución natural y, al ser posible, eliminar potenciales interferentes presentes en la muestra. En cuanto a la separación, ésta etapa puede llevarse a cabo utilizando técnicas cromatográficas o

electroforéticas o, mediante un procedimiento no-cromatográfico. En este último caso, la ventaja indiscutible es la simplicidad procedural, corto tiempo y bajo costo de análisis. Procedimientos no-cromatograficos tales como extracción liquido-liquido o extracción en fase solida han sido utilizados extensivamente en la especiación de arsénico, resaltando aplicaciones de diferentes modos de extracción en escala micro con buena eficacia, preconcentración de los analitos, bajo consumo de reactivos y solventes y aptos para ser adoptados en el análisis de largas series de muestras [17, 18]. Por otro lado, sin embargo, las herramientas más comunes para la especiación de arsénico son aquellas que combinan en-línea técnicas separativas con detectores específicos de elementos de alta sensibilidad, configuración denominada como técnicas acopladas o híbridas [14-16]. Las técnicas cromatográficas proveen alta resolución y buenas recuperaciones tanto de arsénico total como de sus especies y además, resulta fácil su acoplamiento con detectores específicos de elementos.

1.2.1. Técnicas de separación cromatográfica

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es la técnica de separación más utilizada en especiación de As, mientras que la cromatografía de gases (GC), la cromatografía en fluido supercrítico (SFC) y la electroforesis capilar (CE) han sido aplicadas de forma menos usual [15, 19].

La cromatografía de líquidos es adecuada para la separación de los solutos que no son volátiles, mientras que el análisis por cromatografía de gases (GC) de compuestos de baja volatilidad y aquellos no termoestables, requiere de una previa derivatización [16].

Las propiedades fisicoquímicas de los compuestos orgánicos e inorgánicos del As los hacen susceptibles a las separaciones por diferentes técnicas de cromatografía de líquidos. Dichas propiedades son importantes al momento de elegir el tipo de columna y la composición de las fases móviles, por ejemplo, las especies inorgánicas y sus formas metiladas son moléculas polares y ácidos débiles, (dependiendo del pH pueden presentar carga eléctrica), mientras que los arsenolípidos, AB y AC también son ácidos débiles, pero su

estructura contiene una parte orgánica que le confiere cierta hidrofobicidad. Esta variedad de propiedades conlleva a dificultades para definir con exactitud el mecanismo de separación. Por otro lado, la versatilidad de la cromatografía de líquidos, debido a la gran variedad de fases estacionarias y columnas, así como la posibilidad de seleccionar la composición de las fases móviles (pH, fuerza iónica, adición de un contra-ion, modificador orgánico, etc.) la hace muy atractiva para lograr la separación de especies de diferentes propiedades en una sola corrida. Cabe también mencionar que la HPLC es fácilmente acoplable con una gran cantidad de técnicas de detección.

A continuación, se mencionan y se describen brevemente algunas de las separaciones cromatográficas utilizadas para el análisis de especiación de As de acuerdo con las propiedades descritas anteriormente.

1.2.2. Intercambio iónico

Una de las técnicas de separación para el análisis de especiación de As más utilizada es la cromatografía por intercambio iónico, que a su vez se divide en intercambio catiónico y en intercambio aniónico. Cada una de éstas se caracteriza por la presencia de grupos funcionales iónicos en sus respectivas fases estacionarias, siendo cationes en el caso de intercambio aniónico, mientras que en intercambio catiónico la fase estacionaria presenta grupos funcionales aniónicos, que interaccionan con cationes presentes en la muestra reteniéndolos en la columna.

Se mencionó que las principales especies de arsénico son ácidos débiles y, por lo tanto, las diferencias de las constantes de acidez (pK_a) de estas especies, como se muestra en la Tabla 1.3, permiten emplear las columnas de intercambio iónico.

De esta forma, dependiendo de sus constantes de acidez las especies pueden encontrarse como especies neutras o como especies disociadas o protonadas. Por ejemplo, a un pH menor al pK_{a1} de As(III) (9.2), esta especie se encontrará en su forma neutra o totalmente protonada (H_3AsO_3), mientras que las demás especies, al poseer cada una un pK_{a1} menor al de As(III) (como

se muestra en la Tabla 1.2), se encontrarán en su forma disociada (Fig. 1.2b, 1.2c, 1.2d), con una determinada carga dependiendo si es un ácido triprótico como As(V), diprótico como MMAs(V) o monoprótico como DMAs(V).

Tabla 1.3: Constantes de acidez (pKa) de As(III), As(V), MMAs(V), DMAs(V) y AB [20, 21].

	As(III)	As(V)	MMAs(V)	DMAs(V)	AB
pKa1	9.2	2.3	4.1	6.2	2.2
pKa2	12.1	6.8	8.7	-	-
pKa3	12.7	11.6	-	-	-

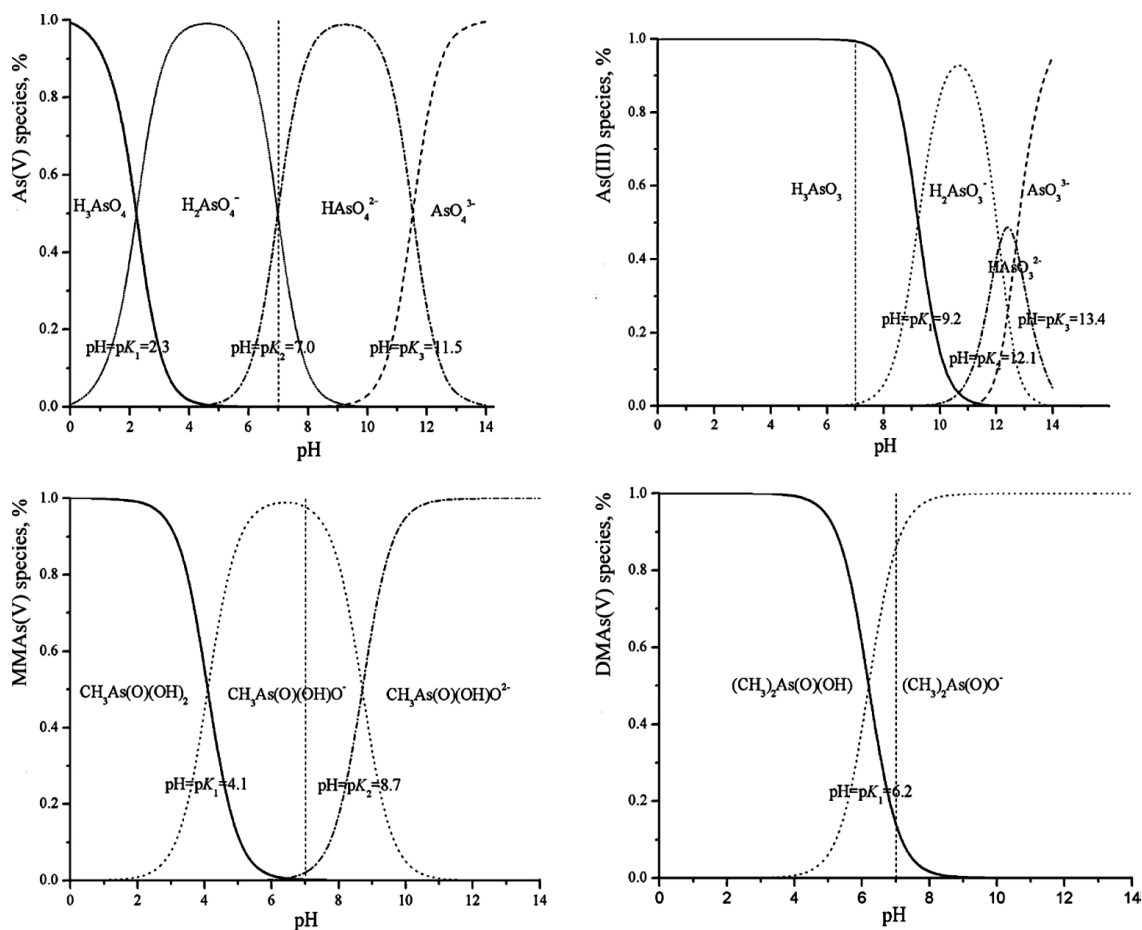


Fig. 1.2: Diagrama de distribución de especies de: a) As(III) b) As(V) c) MMAs(V) d) DMAs(V)

Como un ejemplo, el As(III) no presenta retención en una columna de intercambio aniónico a un pH menor a 9 y se eluye en el volumen muerto, mientras que las otras tres especies son separadas en función de la carga negativa que presentan. Para realizar cromatografía por intercambio aniónico predomina el uso de las columnas de intercambio aniónico PRP-X-100, utilizando típicamente tampón de fosfatos como la fase móvil [19].

En el caso del intercambio catiónico se pueden separar las especies AB, AC, TMAO y TMA^{s+}, típicamente utilizando piridina a un pH <4 como fase móvil, ya que a pH relativamente bajo estas especies se encuentran en forma catiónica (Fig. 1.1) e interaccionan con los grupos aniónicos de las fases estacionarias de este tipo de separación [16]. Al igual que en intercambio aniónico, el As(III) no interacciona en la fase estacionaria a pH entre 2 y 9 puesto que como ya se mencionó se encuentra en su forma neutra (Fig. 1.2a) y por lo tanto se eluye en el volumen muerto.

1.2.3. Fase inversa con formación de pares iónicos

La cromatografía por pares iónicos puede utilizarse en el análisis de especies arsenicales tanto neutras como iónicas en una sola corrida. Esta técnica se basa en la separación de iones en una columna de fase inversa al añadir a la muestra y a la fase móvil un reactivo iónico que tiene una parte de la molécula con cierta hidrofobicidad y que contenga al mismo tiempo una parte hidrofílica con carga opuesta al analito. De esta manera, los solutos forman con sus contra-iones pares iónicos robustos y de carácter apolar que pueden ser separados en una columna de fase inversa [22].

El ion tetrabutilamonio (TBA), tanto en su forma hidroxilada como fosfatada, es el agente más comúnmente utilizado como contra-ion de las especies aniónicas de MMAs(V), DMA^{s(V)} y As(V), ya que es un catión de amina cuaternaria. Al igual que en intercambio aniónico, en pares iónicos tanto As(III) como AB co-eluyen en el mismo tiempo a pH entre 2 y 7. Para lograr separar estas especies es posible utilizar un pH cercano a 9, ya que a estas condiciones, una fracción del As(III) se encontrará en su forma aniónica

disociada (H_2AsO_3^-) (Fig. 1.2a), y podrá ser retenida débilmente, obteniéndose su separación de la AB. Con respecto a la separación de las especies catiónicas del As, pueden separarse usando pentasulfonato, hexasulfonato, heptasulfonato o dodecilsulfonato como pares aniónicos.

La resolución de esta técnica depende de la concentración del reactivo para formar los pares iónicos, el flujo, fuerza iónica y el pH de la fase móvil. [19].

1.2.4. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (CE) se ha utilizado en especiación de As por su alta eficiencia de separación. Las especies As(III), As(V), DMAs(V), MMAs(V), AB y AC pueden separarse con electroforesis capilar en zona, aunque para el As(V) no puede analizarse a pH alcalinos, además de que a pH ácidos se requiere de largos tiempos de análisis.

En esta técnica, la separación es controlada por el flujo electroforético y el flujo electroosmótico. Cuando se utilizan modificadores en flujo electroosmótico (EOF) inverso, o cuando se utiliza un capilar recubierto para cambiar su polaridad, se puede aplicar separación en modo de voltaje negativo. En estos casos, el EOF y los aniones migran al final del capilar para su detección [19]. Se ha demostrado la separación de las 6 especies mencionadas de As utilizando voltaje negativo en la entrada del inyector, separando las especies en un tiempo de 20 min, pero este tiempo se puede reducir a 10 min aplicando una presión positiva al vial de entrada durante la electroforesis, a costa de una pérdida de resolución [23]. La electroforesis capilar ha sido utilizada exitosamente sólo en el análisis de estándares o para matrices simples. En aplicaciones para el análisis de muestras reales de matriz compleja, se observan desplazamientos en el tiempo de migración, además, los límites de detección alcanzados con CE son inferiores a HPLC cuando se utiliza el mismo sistema de detección [19].

1.2.5. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) se puede utilizar en la especiación de As cuando se aplica una derivatización pre-columna que convierte las especies de interés en compuestos volátiles termoestables. Típicamente mediante la técnica de generación de hidruros (HG) se forman arsinas volátiles que se hacen pasar por una trampa criogénica (un tubo en forma de U sumergido en nitrógeno líquido) para preconcentrarlas [24]. Una vez que se retienen las arsinas, el tubo se conecta con el cromatógrafo de gases, se remueve del nitrógeno líquido y el tubo es calentado a 200 °C [19, 25].

En un estudio de especiación de As en organismos marinos, Kaise et al [26] llevaron a cabo la separación de iAs, MMAs(V), DMAs(V) y TMAO mediante el sistema descrito anteriormente con GC-MS utilizando una columna de vidrio (3 m x 3 mm diámetro interno) empacada con 3% silicón OV-17 en Chromosorb W (SiO₂) y una temperatura de horno de 50 °C, obteniendo límites de detección de 0.1 µg kg⁻¹ en muestra biológica [26].

1.3. Detectores utilizados en separación de especies arsenicales por HPLC

1.3.1. Espectrometría atómica

La espectrometría de absorción atómica mide la cantidad de radiación electromagnética que es absorbida por los átomos del analito a la longitud de onda resonante (se utiliza la línea más intensa del elemento), que será proporcional a la concentración del analito en la solución estudiada. El haz incidente, es emitido por una lámpara de cátodo hueco (hollow-cathode lamp) o por una lámpara de descarga sin electrodo (electrodeless discharge lamp) y es absorbido por los átomos que se encuentran en el paso óptico en fase gaseosa y en su estado fundamental de energía.

En cuanto al sistema de atomización, se utiliza la llama (FAAS por sus siglas en inglés) y el horno de grafito (GFAAS). En GFAAS la atomización de la muestra ocurre en un tubo de grafito calentado de manera electrotérmica y la señal analítica se mide solamente en la etapa de atomización cuando la fase

gaseosa contiene principalmente átomos libres del analito. Una vez que la muestra se encuentra en el horno de grafito, se seca el solvente a una temperatura de aproximadamente 10 °C más alta que su punto de ebullición. Posteriormente, la muestra se piroliza para remover la mayor cantidad de materia orgánica sin la pérdida del analito a una temperatura que varía entre los 350 °C a los 1600 °C. Finalmente, el tubo es calentado rápidamente a temperaturas entre 1800 y 2800 °C para vaporizar y atomizar el analito de interés [14, 27]. De estos métodos (FAAS y GFAAS), FAAS ofrece resultados más rápidos, permite trabajar con cantidades de muestra mayores y las posibles interferencias son pocas. Su mayor limitación sin embargo es que la muestra es introducida de manera continua mediante el proceso de nebulización y que el transporte es ineficiente (únicamente el 2% de la muestra aspirada al nebulizador alcanza a entrar a la llama). Por su parte, GFAAS presenta una mayor sensibilidad, además se requieren cantidades menores de muestra y alcanza límites de detección suficientemente bajos para analizar muestras biológicas y medioambientales, aunque esta técnica tiene una menor precisión y mayor número de interferencias.

De las técnicas de espectrometría atómica se encuentra también la espectrometría de emisión atómica (AES), que se fundamenta en la producción y detección de espectros lineales emitidos durante el proceso de relajación radiactiva de los electrones valentes en un átomo excitado térmicamente. Los espectros de líneas son específicos de cada elemento y la adecuada selección de una línea y su aislamiento por medio de un monocromador permite verificar la presencia de un elemento en particular y medir su concentración [14, 28].

Las etapas en esta técnica son esencialmente la introducción de la muestra, atomización, excitación y un sistema para adquirir los espectros de emisión. Para la cuantificación se mide la intensidad de emisión en una línea, típicamente la más intensa en el espectro del elemento. La fuente de atomización y excitación es un plasma, es decir, un gas que se encuentra ionizado y debe presentar ciertas características como lo son, que sea en su totalidad eléctricamente neutro, que no forme compuestos estables con los

analitos y que posea altas energías de ionización, lo que significa que permite obtener espectros relativamente simples. La fuente de plasma más utilizada es el plasma de acoplamiento inductivamente (ICP), que es generado por argón que debe ser ionizado y sostenido en estado de plasma por un generador de alta frecuencia [27]. Sin embargo, existe también el plasma sostenido por microondas (MIP) que utiliza nitrógeno o helio en vez de argón.

Las líneas de emisión utilizadas para el As son 193.695 nm, 234.894 nm, 228.812 nm, 197.198 nm, 188.979 nm, cada una de las cuales presentan interferencias con distintos elementos y ofrece distinta sensibilidad. La longitud de onda de 193.695 nm es la más utilizada al estudiar As, dada su intensidad y sus pocas interferencias [29, 30], aunque en este trabajo se propone la utilización de la longitud de onda de 228.812 nm por su alta sensibilidad e interferencias con elementos poco comunes en muestras medioambientales.

1.3.2. Espectrometría de masas atómica

La técnica de espectrometría de masas se basa en la atomización de la muestra, su posterior ionización, introducción a un separador de masas y su detección/conteo con base en la relación de su masa sobre su carga (m/z). La espectrometría de masas atómica presenta límites de detección que son para muchos elementos tres órdenes de magnitud mejores que en las técnicas de espectrometría ópticas. Tiene también la capacidad de medir relaciones isotópicas atómicas, pero suele tener un coste más elevado que los instrumentos ópticos atómicos [27].

El arsénico puede determinarse mediante espectrometría de masas con el plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) utilizando la señal de m/z 75 correspondiente al ion atómico del As con una carga positiva. La principal desventaja al utilizar esta técnica para analizar arsénico es la interferencia del ion poliatómico $^{35}\text{Cl}^{40}\text{Ar}^+$. Debido a que el As es monoisotópico, es necesario eliminar esta interferencia [14]. En el caso de espectrómetro de baja resolución (cuadrupolo como filtro de masa), para la eliminación de interferencias poliatómicas, se utiliza la tecnología de celda de colisión/reacción. Un tipo de

estas celdas utiliza gases inertes; en este caso se introduce un flujo de He perpendicular al movimiento de iones, produciéndose las colisiones de forma preferente con el ion poliatómico lo que disminuye su energía cinética o provoca su disociación, de esta manera se logra discriminar entre iones poliatómicos y atómicos dejando que solamente los últimos entren al cuadrupolo. Al igual que para la técnica ICP-AES, la técnica ICP-MS tiene altos costos de operación debido a que el plasma es generado con gas argón (además del requerimiento de alto vacío).

Además de espectrometría de masas atómica, se pueden utilizar diferentes tipos de detectores másicos con fuentes de ionización relativamente suaves, lo que permite no solamente cuantificación de compuestos conocidos, sino también la caracterización estructural de aquellos no identificados o no esperados en una muestra dada. Como ejemplo del análisis de especies desconocidas, se ha reportado el monitoreo de ion selectivo (SIM) en el análisis de especiación de As mediante HG-GC-MS estudiando los iones 76 y 78 m/z para AsH_3 , 90 para CH_3AsH_2 , 90 para $(CH_3)_2AsH$, y 103 y 120 para $(CH_3)_3As$ [26].

Una gran cantidad de compuestos organoarsenicales y productos de degradación del ácido fenilarsónico, y del ácido o-arsanílico han sido aislados e identificados en muestras de suelo utilizando un conjunto de técnicas, entre ellas HPLC-ICP-MS, y de manera complementaria, mediante espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS) sin y con previa separación cromatográfica y con diferentes sistemas de separación de iones, especialmente útiles para obtener los espectros de fragmentación de iones (por ejemplo combinando cuadrupolo con tiempo de vuelo, QTOF). Los complejos de As-(III)-tiol o As-fitoquelatinas (As-PC) y los mecanismos de tolerancia de As han sido estudiados ampliamente en plantas terrestres mediante HPLC-ICP-MS con ayuda de técnicas con potencial de caracterización estructural [31].

1.3.3. Sistemas no cromatográficos en la especiación de arsénico

1.3.3.1. Espectrofotometría UV-Vis

La mayoría de los métodos colorimétricos para la medición de As se basan en el método de Gutzeit, donde se genera arsina por adición de polvo de Zn en presencia de un ácido fuerte, y cuantificando la arsina por medio de la reacción con dietilditiocarbamato (AgDDTC) de plata, o en papel impregnado con bromuro de mercurio (HgBr_2). La arsina producida reacciona con el AgDDTC disuelto en eferina/cloroformo o piridina, y forma un complejo color rojo, que presenta banda de absorción con el máximo a 520 nm [14]. En el caso de bromuro de mercurio las arsinas forman halogenuros pardo-amarillos mixtos de arsénico y mercurio. Para eliminar las interferencias provocadas por los iones sulfuro, los cuales resultan en falsos positivos, en este método se agrega un agente oxidante.

Johnson y Pilson propusieron una modificación para el método estándar consistente en la adición de iones molibdato (utilizado para la medición de fosfatos en aguas naturales), debido a que los fosfatos y el As(V) forman un complejo con molibdato reducido que absorbe fuertemente en IR a 880 nm. La reacción es selectiva para As(V), mientras que el As(III) no forma complejo. Para obtener el compuesto absorbente se utiliza tartrato de antimonio ($\text{OCCOHCOHCOO}(\text{SbO})_2$) como catalizador y para oxidar As(III) se utiliza yoduro de potasio con ácido ascórbico. De esta manera el As disuelto puede ser cuantificado a partir de la diferencia entre las respuestas obtenidas para el As(V) y para los fosfatos. En concreto, en una alícuota de la muestra se oxida el As(III) para que la totalidad del arsénico se acompleje y la absorción medida en esta corrida corresponde a la suma de As(V) + P(V); en otra alícuota de la muestra se reduce el As(V) para obtener la señal pura de P(V), y mediante la resta de estas dos respuestas se calcula la absorbancia correspondiente a As total en la muestra [32, 33].

1.3.3.2. Espectroscopía de rayos X

En el caso de espectroscopia de rayos X se pueden emplear dos técnicas distintas, basadas en fluorescencia de rayos X (XRF) y en absorción de rayos X (XAS), cada una de las cuales se describen brevemente a continuación.

En XRF (fluorescencia con energías de excitación en el intervalo de 1 a 60 keV) es el resultado de un bombardeo de la muestra con un haz de electrones de elevada energía y la posterior expulsión de los electrones más internos de átomos contenidos en dicha muestra, con un subsecuente reacomodo de los electrones de las capas más externas para ocupar el espacio del electrón eyectado. Como resultado de estas transiciones y de la diferencia en las energías de enlace entre las dos capas se emite energía en forma de un fotón de rayos X característico del elemento analizado [27, 34]. La técnica de fluorescencia de rayos X de energía dispersiva es adecuada para el análisis de muestras sólidas como minerales, suelos o vegetales molidos. También existen pretratamientos como fusión de las muestras para eliminar el efecto de tamaño de partícula. El análisis de muestras líquidas requiere de un tratamiento de preconcentración por evaporación. La cuantificación de As total en la muestra mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X de energía dispersiva se realiza utilizando la línea K_{α} del As (10 543.4 eV) aunque el poder de detección es mucho inferior respecto a las técnicas presentadas antes. Típicamente se usa un tubo de rayos X de Rh y un filtro primario de Ni. La interferencia más importante de este método es la línea cercana L_{α} del Pb (10 551 eV), aunque es posible evitarse empleando la línea K_{β} del As (11 725.8 eV).

El principio de la espectroscopía de absorción de rayos X (XAS) consiste en la excitación de los electrones de los niveles atómicos K, L o M del átomo de analito por el haz de rayos X. Si la energía del fotón incidente es suficiente para arrancar los electrones localizados en los niveles internos, entonces se produce la absorción de energía, observándose un salto agudo en el espectro de absorción. Este aumento en el espectro se denomina borde de la banda de absorción (en inglés absorption edge) y la energía con la cual ocurre depende de la energía de unión de los electrones del átomo, siendo, por lo tanto

característica de cada elemento químico. De esta manera en XAS se obtiene un espectro del coeficiente de absorción de los rayos X en función de la energía de la radiación incidente. Tal como se ha dicho, en este espectro se distingue el borde de la banda de absorción (Edge), pero después de esta región aparece una segunda región de oscilación en el coeficiente de absorción. De esta manera, en el espectro XANES (X-ray Absorption Near Edge Structure) la señal de absorción es característica para un elemento y sus diferentes compuestos y en el espectro EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) las oscilaciones son características del número de coordinación y de la distancia interatómica entre el elemento de interés y sus átomos vecinos. Para realizar mediciones de XAS se necesita una fuente intensa de rayos X que puede ser encontrada en los laboratorios de luz sincrotrón. Para llevar a cabo la especiación de As mediante XAS se utiliza la región EXAFS del espectro, sometiendo compuestos “modelo”, es decir estándares de los compuestos que se esperan en las muestras (As(III), As(V), MMAs(V), DMAAs(V), etc) registrando espectros de la línea K_{α} del As (11.867 keV). Posteriormente las muestras reales, de ser líquidas deben absorberse en un tipo de pañuelo llamado Kimwipe, y en el caso de que sean sólidas son depositadas en pozos de Al, sostenidos con cinta Kapton y son sometidas a la radiación de rayos X en las mismas condiciones que los compuestos modelo. Se obtienen los espectros de los compuestos modelo y de las muestras analizadas, y mediante un programa adecuado para manipulación de espectros de rayos X se hace una comparación estadística de la parte oscilatoria y de la señal de borde de absorción (Edge) de los compuestos modelo contra las muestras analizadas. Finalmente, el programa utilizado lleva a cabo el cálculo del porcentaje de cada uno de los compuestos modelo que conforma el espectro de la muestra real. El uso de XAS presenta la ventaja de un mínimo requerimiento de tratamiento de muestra, lo que permite evitar cambios en la especiación nativa (debido a interconversión de especies, contaminación o pérdidas). Así mismo, la posibilidad de realizar los análisis directamente en la muestra (*in-situ*) abre la posibilidad de obtener imágenes de localización del As en estructuras vegetales [31, 34].

Aunque se ha vuelto un campo muy estudiado, la espectroscopía de rayos X presenta relativamente bajo poder de detección y baja sensibilidad en comparación con las técnicas descritas en secciones anteriores, además de que cuando se trata de técnicas aplicadas en sincrotrón, los costos de análisis son bastante elevados.

1.4. Espectrómetro de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES)

El espectrómetro de emisión atómica de plasma por microondas (Agilent MP-AES 4100) tiene distintas ventajas sobre equipos que emplean ICP (OES y MS) y sobre espectrómetros de absorción atómica. El plasma de microondas excitado magnéticamente proporciona mejor sensibilidad, rango dinámico lineal, límites de detección y velocidad de análisis que FAAS y además tiene la capacidad de realizar análisis multi-elemental y en este último aspecto, supera todas las técnicas de absorción o fluorescencia atómica. El MP-AES no requiere del uso de gases inflamables, tóxicos, u oxidantes como el oxígeno, utilizado para crear la flama en FAAS. Además, a diferencia de ICP que utiliza Ar para la generación del plasma, el MP-AES utiliza plasma sostenido por nitrógeno, disminuyendo drásticamente los costos de operación. Se han realizado estudios satisfactorios de este equipo en aplicaciones para la industria minera, de alimentos, en agricultura, química y petroquímica [35].

1.4.1. Requerimientos instrumentales

La introducción de la muestra en el MP-AES se lleva a través de cámaras de nebulización, las cuales varían en diseño dependiendo del tipo de análisis que se requiera hacer, por ejemplo, aquellas utilizadas para compuestos orgánicos, cuentan con un doble paso para purgar con aire el flujo y evitar depósitos que obstruyan y afecten el sistema, o las utilizadas para la introducción por generación de hidruros, donde se tienen dos entradas para muestra y agente reductor, y su respectiva salida de desechos. El software controla una bomba

peristáltica que forma parte del equipo, en la cual existen 5 posiciones para conectar las conexiones necesarias en el sistema utilizado.

Debido a que el plasma es sostenido por N_2 , uno de los principales accesorios utilizados para el MP-AES es un generador de nitrógeno. El generador de nitrógeno Agilent 4107 produce nitrógeno con $>99.5\%$ de pureza para lo cual se necesita aire comprimido limpio, seco y libre de aceites y polvo, a un flujo de 115 L min^{-1} a 620 kPa .

Los requerimientos eléctricos del equipo son de una corriente monofásica de corriente alterna 10 A , con alimentación de $200 - 240\text{ V} \pm 10\%$, y $50/60\text{ Hz}$.

1.4.2. Generación del plasma

El MP-AES funciona mediante un plasma estable que es sustentado por energía de microondas. Esto proporciona la posibilidad de procesar fácilmente matrices complejas, como sustancias con un alto contenido de sólidos, combustibles y compuestos orgánicos [36].

Para formar el plasma, el equipo cuenta con un alimentador de corriente de alto voltaje de estado sólido con una potencia fija de 1 kW , y de un magnetrón de 2.45 GHz que son utilizados para generar un campo magnético y un campo eléctrico. Una guía de microondas concentra este campo magnético axial y el campo eléctrico alrededor de la antorcha (Fig. 1.3), enfocando la energía de microondas en esta zona para la generación del plasma y su sostenimiento. Un generador de nitrógeno alimenta el plasma de microondas evitando el uso de fuentes adicionales de gas.

El efecto superficial del campo magnético producido por el magnetrón provoca que el plasma adopte una forma toroidal y se hace posible la introducción de muestras líquidas por el canal central directamente al interior del plasma, facilitando de esta manera los procesos de descomposición, atomización y excitación.

Para la ignición del plasma se utiliza un flujo momentáneo de Ar de 1.5 L min^{-1} a 210 kPa , sin embargo, cada ciclo de ignición utiliza únicamente $\sim 75\text{ mL}$

de argón pues una vez que el plasma está operando, automáticamente el flujo de argón cambia a nitrógeno para el sostenimiento del plasma [37].

El plasma de microondas de nitrógeno es considerablemente más caliente que una flama de acetileno, alcanzando una temperatura promedio cercana a los 5 000 K. A esta temperatura, la emisión atómica es intensa para la mayoría de los elementos, dando como resultado mejor capacidad de detección en comparación con FAAS para la mayoría de los elementos, dada la baja eficiencia de absorción de fotones por los átomos en flama [38-42].

El plasma está orientado verticalmente para mejorar el análisis de muestras complejas e incluye un sistema de visualización terminal o axial para lograr una sensibilidad óptima y mejores límites de detección, los cuales pueden ser optimizados para cada longitud de onda.

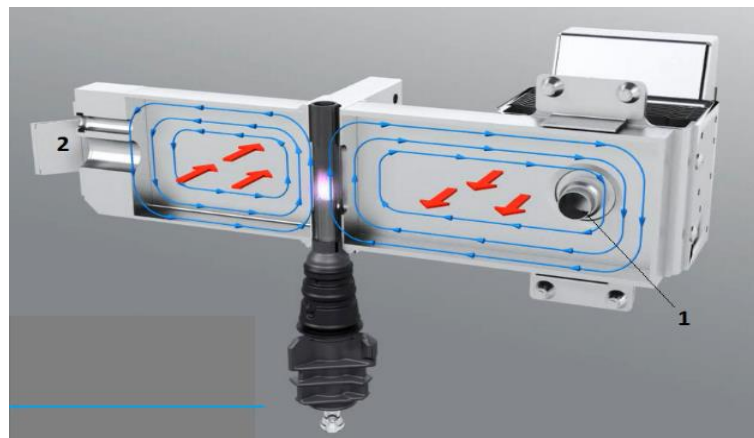


Fig. 1.3: Esquema interno de generación del plasma en el MP-AES Agilent 4100. Líneas azules: campo magnético. Líneas rojas: campo eléctrico. 1: Magnetron de 2.45 GHz. 2: Orientador de microondas.

1.4.3. Sistema óptico

El MP-AES posee un sistema pre-óptico que enfoca la radiación emitida por los átomos excitados del plasma, para permitir su observación axial [28] como muestran las flechas rojas en la Fig. 1.4, donde se muestra que el haz de luz

debe atravesar varios reflectores para posicionar su dirección en sentido horizontal.

El MP-AES cuenta con un monocromador (diseño Czerny-Turner) (Fig. 1.4), con 600 mm de longitud focal y una rendija de difracción holográfica con 2 400 líneas mm^{-1} . Las longitudes de onda a las que funciona el sistema óptico están en el rango de 178 - 780 nm. El sistema óptico puede ser purgado con N_2 (10 L min^{-1}) para protegerlo del polvo o ambientes corrosivos. Además, un flujo de aire comprimido (25 L min^{-1} a 500 kPa) esparce el calor generado por el plasma para proteger el sistema pre-óptico.

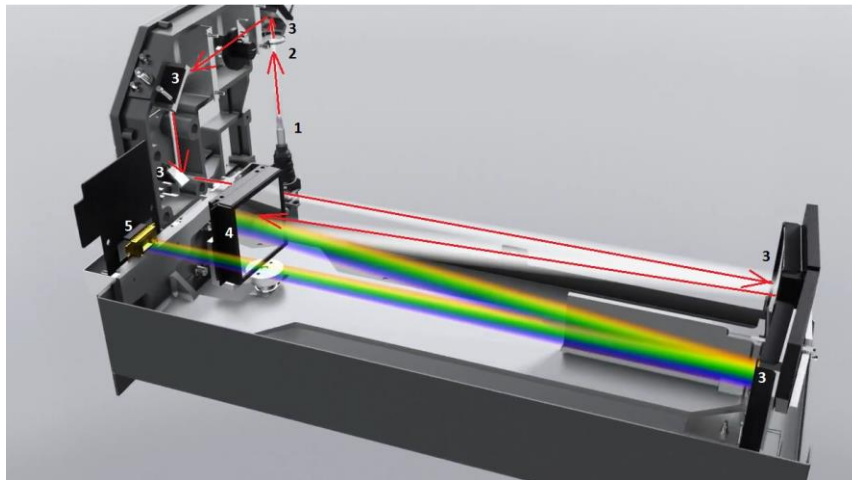


Fig. 1.4: Esquema interno del sistema óptico del MP-AES Agilent 4100. En flechas rojas se muestra la trayectoria de la luz a través del sistema óptico. 1. Antorcha. 2. Lente pre-óptica. 3. Reflectores. 4. Monocromador. 5. Detector.

1.4.4. Detector

El MP-AES cuenta con un detector de tipo dispositivo de acoplamiento de carga (por sus siglas del inglés Charge coupled device – CCD) en estado sólido (Fig. 1.4) sensible a longitudes en la región UV. Tiene una resolución de 532 x 128 pixeles, diseñado especialmente para detección de bajas intensidades de radiación con $>90 \%$ de eficiencia cuántica de sensibilidad de pico. El detector es enfriado a $0 \text{ }^\circ\text{C}$ mediante un dispositivo termoeléctrico Peltier para disminuir la corriente negra (corriente eléctrica relativamente pequeña que fluye a través

de dispositivos fotosensibles aun cuando no está recibiendo luz) y así reducir el ruido de la línea base.

El arreglo del detector CCD almacena el espectro del (los) analito(s) y el fondo espectral vecino, permitiendo una corrección simultánea del fondo para mejorar la estabilidad y precisión.

1.5. Generación de hidruros como método de introducción de muestra

La generación de hidruros (HG) es una técnica utilizada para el estudio de varios elementos de interés ambiental formadores de hidruros covalentes volátiles, como As, Hg, Sb, Se, Te, Ge, Sn, Pb, Bi, Cd, Sn y Th [43, 44]. La reacción se lleva a cabo en la solución de muestra agregando un reductor adecuado en presencia de un ácido, el vapor compuesto por hidruro(s) junto con el exceso de hidrógeno son separados de la matriz química de muestra y transportados en la fase gaseosa hacia el sistema de detección. La (HG) es usada comúnmente como una derivatización post-columna (o en la introducción directa de la muestra) para mejorar la eficacia de transporte de los analitos hacia la fuente de atomización/excitación/ionización eliminando al mismo tiempo potenciales interferentes. Como resultado, se obtiene más alto poder de detección y mejor selectividad respecto a la introducción convencional mediante el sistema de nebulización [44, 45].

Dependiendo del diseño, HG se puede llevar en un sistema tipo “batch” o en flujo, siempre pudiéndose realizar una etapa de preconcentración mediante atrapamiento de hidruro(s) en una trampa (globo, tubo-U sumergido en nitrógeno líquido, tubo de grafito, etc.). En esos sistemas de preconcentración los límites de detección pueden aumentar de 10 a 100 veces en comparación con los procesos de nebulización de muestras líquidas [14, 30, 44, 46].

1.5.1. Generación de hidruros de las especies de arsénico

La reacción de HG en el caso del As se lleva a cabo por la reacción de los diferentes compuestos de As con un agente reductor, generalmente NaBH_4 [30], KBH_4 [47], Zn o SnCl_2 en condiciones ácidas [14]. Durante la reacción del

borohidruro en medio ácido se produce el hidrógeno *in situ* que reacciona con especies de As para formar arsinas (Fig. 1.5), siendo el borohidruro de sodio el agente reductor más utilizado. Durante esta reacción las especies As(III) y As(V) forman arsina (AsH₃), MMAs(V) produce monometilarsina (CH₃AsH₂) y DMAs(V) produce dimetilarsina ((CH₃)₂AsH), cuyos puntos de ebullición son -55 °C; 2°C; y 35.6 °C, respectivamente [19]. Ya fue mencionado que la conversión de especies de As en respectivas arsinas volátiles permite mejorar la eficacia de transporte hacia el detector, eliminando al mismo tiempo potenciales interferencias relacionadas con la composición de la muestra matriz.

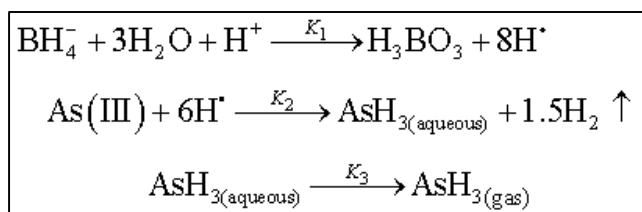


Fig. 1.5: Mecanismo de reacción de la generación de hidruros para As [48].

1.5.2. Acondicionamiento de las muestras

Al realizar la HG se deben considerar varias condiciones para obtener una alta eficacia de reacción como lo son la concentración de agente reductor utilizado, el tipo de ácido y su concentración, el pH de las muestras y los estados de oxidación del As presente en las muestras. A continuación, se describen los procesos por los cuales estas características son importantes al realizar esta reacción para el estudio de As.

1.5.2.1. Estado de oxidación

Aunque As(III) y As(V) forman arsina (AsH₃) en medios fuertemente ácidos, existen diferencias significativas en la eficacia entre los dos, debido a que As(III) produce AsH₃ de forma más eficiente que As(V) [29, 30, 43, 49, 50]. Es por ello que, para la determinación de As inorgánico total, es necesario reducir todas las especies en As(III), típicamente al reaccionar la muestra con NaI, KI o SnCl₂ [14, 30, 49-51].

En la mayoría de los trabajos revisados se utiliza 1% KI como reductor de As(V) en las soluciones para mejorar la formación de arsinas [14, 29, 45, 47, 49, 52-54]. Se debe agregar ácido ascórbico a las soluciones de KI para evitar la oxidación del yoduro a yodo libre por la presencia de oxígeno [14, 29, 45, 53, 54]. Se sabe que la L-cisteína también ha mostrado una reducción adecuada del As con condiciones menos ácidas y en una menor cantidad de reactivos [29].

1.5.2.2. Condiciones de pH

El pH al cual se preparan las soluciones es importante para la HG, puesto que, como se mencionó en la sección 2.1.1 las especies del arsénico presentan propiedades ácido-base (Tabla 1.3).

Cuando el pH de la reacción de generación de hidruros es minuciosamente controlado, es posible diferenciar entre As(III) y As(V) puesto que a un pH entre 5 y 6, únicamente los compuestos de As(III) pueden ser convertidos en arsina [19, 29]. Esto sugiere que para que se genere arsina, se necesita que la especie se encuentre en su forma neutra, pues a estas condiciones As(III) se encuentra en su forma totalmente protonada y neutra H_3AsO_3 , mientras que As(V) se encuentra en su forma aniónica disociada H_2AsO_4^- (Fig. 1.2a y 1.2b).

En una muestra acidificada a un pH menor a 2 las especies As(V), DMAs(V) y MMAs(V) forman arsinas volátiles, al encontrarse estas especies en sus formas neutras (Fig. 1.2b, 1.2c y 1.2d) [29, 46].

1.5.2.3. Concentración del agente reductor

La concentración utilizada de NaBH_4 es de suma importancia. Por ejemplo, a altas concentraciones de NaBH_4 la eficacia de generar arsina del As(V) aumenta y por ello aumenta la magnitud de señales analíticas obteniéndose buena linealidad de la curva de calibración, pero en el caso de As(III) este efecto no se observa y, al contrario, se pierde la linealidad entre la señal y la concentración de As(III).

Tabla 1.4: Condiciones de concentración de NaBH₄ para formar hidruros en diferentes trabajos revisados.

% NaBH ₄	% NaOH	Análisis	Detección	Referencia
0.2	0.5	Agua potable, superficial, subterránea y residual	FI-AAS	[14]
0.2	0.025	Estándares de As(III)	FI-AAS	[29]
0.5	0.05	Material estándar de referencia para agua (NIST1640; NIST1643e)	AAS	[45]
2	0.1	Agua subterránea y recolecciones de agua de lluvia	AAS	[47]
2		Agua de mar	GFAAS	[55]
1	0.4	Fracción dializable de algas marinas	AFS	[56]
0.5	0.5	Trucha, ostras, alimento para peces, materiales de referencia estándar TORT-2 (hepatopáncreas de langosta) y DORM-3 (músculo de tiburón)	AAS	[57]
1.5	0.1	Agua y tejidos de plantas	AFS	[58]
1	0.12	Levadura para pan	ICP-OES	[59]

En particular, Sigrist et al (2004) [29] propusieron un método de especiación de As basado en la distinta cinética de producción de AsH_3 mediante HG entre As(III) y As(V), puesto que como se ha mencionado en las secciones anteriores As(III) produce arsina de manera más eficiente que As(V), mientras que As(V) requiere de soluciones fuertemente ácidas para llevar a cabo la reacción.

Se estudió la HG de As(III) y As(V) por separado a concentraciones entre 0.0125 % y 0.5 % de NaBH_4 con HCl 2M en un sistema de análisis por inyección en flujo con detección por espectrometría de absorción atómica (FIAAS), utilizando la línea de As 193.7 nm; en este trabajo se observó que a altas concentraciones del borohidruro las funciones de calibración para As(III) dejan de seguir una tendencia lineal, mientras que la pendiente de las funciones de regresión lineal para As(V) aumenta conforme sea mayor la concentración de NaBH_4 . También se concluyó en estos estudios independientes que a concentraciones menores de 0.1 % de NaBH_4 en presencia de HCl 2M el As(V) no produce AsH_3 ya que las señales fueron muy bajas en comparación con la absorbancia obtenida para la misma cantidad de As(III). De ahí en el trabajo citado se llevó a cabo la determinación de estas dos especies seleccionando concentraciones menores de 0.05 % de NaBH_4 y realizando dos corridas de muestra. En una de ellas, el resultado correspondió a As(III) y en otra corrida, agregando sistema yoduro/ácido ascórbico para la reducción de As(V) a As(III), el resultado fue indicativo de As total [29].

Cuando la concentración de borohidruro de sodio utilizada es del 1 %, tanto As(V) como MMAs(V) y DMAs(V) producen arsinas [43]. En distintos trabajos se ha demostrado que las concentraciones de NaBH_4 más indicadas para la HG son entre 1 y 2% p/v (Tabla 1.4).

1.5.2.4. Acidificación de la muestra

La reacción de HG se requiere llevar a cabo en medio ácido como se muestra en la Fig. 1.5, y como se reporta en la bibliografía. Específicamente, se han encontrado estudios donde, mediante experimentos sistemáticos se hace

selección de las condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción, dependiendo del tipo de ácido (orgánico, inorgánico) y su concentración.

Nobbins [49] utilizó una solución $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) (como $\text{As}(\text{NO}_3)_3$) y el sistema HG-FAAS para estudiar el efecto de diferentes ácidos inorgánicos sobre la eficacia de generación de arsina, estos ácidos fueron: 25 % HCl, 12.5 % HCl + 12.5 % H_3PO_4 , 25 % H_3PO_4 , 12.5 % H_2SO_4 , 25 % HNO_3 . Los resultados mostraron la señal analítica más alta en presencia de 25 % HCl, mientras que la mezcla H_3PO_4 -HCl mostró la mejor reproducibilidad. El uso de H_2SO_4 y H_3PO_4 no fue recomendado debido a una baja respuesta, tanto en altura de pico como para área de pico. También se encontró que en soluciones con HNO_3 se forma un precipitado cuando se utiliza KI para reducir el As(V), lo que provoca una disminución en la altura de picos [49], aunque Welz y Melcher comprobaron una disminución de interferencias por metales de transición con la presencia de HNO_3 [60].

Anderson et al. realizaron un estudio sobre la reducción selectiva de As para la formación de hidruros en distintos tipos de ácidos, tanto orgánicos como inorgánicos. En este estudio se muestra que al formar hidruros en presencia de HCl la señal de absorción del As(III), MMAs(V) y DMAs(V) aumentan conforme aumenta la concentración del ácido, hasta llegar a un punto máximo, después de lo cual el aumento de la concentración del ácido empeora la señal, mientras que la señal de As(V) es muy baja comparada con las demás, con una ligera tendencia de incremento de la concentración de ácido. En presencia de HNO_3 o de H_2SO_4 los cambios de las señales siguen una tendencia similar a las obtenidas con HCl, y en presencia de H_3PO_4 se obtienen valores muy bajos de la relación señal-ruido (S/N). En el caso de los ácidos orgánicos, se analizaron los ácidos cítrico, oxálico y acético. En este caso se obtuvieron absorbancias similares e intensas para As(III) y DMAs(V) que además iban en aumento con creciente concentración del ácido, mientras que MMAs(V) y As(V) presentan absorbancias mucho más bajas. En presencia del ácido tartárico la absorbancia de As(V) aumentó rápidamente conforme aumentaba la concentración del ácido, por una probable reducción a As(III). Para el resto de los compuestos de

As los cambios de sus señales fueron similares a los observados en presencia de otros ácidos orgánicos. En el caso del ácido mercaptoacético, se obtuvo un sorprendente resultado, ya que las señales de las cuatro especies estudiadas fueron afectadas de manera muy similar, presentando un máximo a una concentración de 0.1 M. Finalmente se concluye que no es posible llevar a cabo la especiación mediante la selección del ácido y/o su concentración, aunque se puede determinar la cantidad de iAs utilizando HCl 5 M puesto que en estas condiciones no se forman hidruros de MMAs(V) y DMAs(V). Además, es posible separar DMAs(V) + As(III) de MMAs(V) + As(V) llevando a cabo la HG en presencia de ácido acético 0.16 M ya que a estas condiciones las señales del As(III) y del DMAs(V) son similares y son mucho mayores a las señales de MMAs(V) y que As(V). A estas mismas condiciones es posible separar DMAs(V) de las demás especies si se lleva a cabo la oxidación del As(III) [52, 61].

Varios estudios indican que las concentraciones óptimas de HCl a utilizar en la HG de As(III), As(V), MMAs(V) y DMAs(V) son de al menos 3 M, y se menciona que las interferencias causadas por presencia de especies metálicas son mucho menos pronunciadas incluso a mayores concentraciones del ácido [43, 49, 60], siendo éste el más utilizado para llevar a cabo esta técnica [14, 29, 43, 45, 47, 49, 55-60, 62-65].

1.5.3. Interferencias

Aunque las interferencias durante el transporte y detección de hidruros en gran parte son eliminadas respecto a la introducción directa de la muestra debido a que los hidruros son liberados desde la solución y transportados en fase gaseosa sin necesidad del proceso de nebulización, las interferencias en la fase líquida donde se genera el hidruro se pueden presentar dependiendo de la composición de la muestra [30, 47].

La HG de As puede suprimirse a causa de presencia de especies metálicas de Ag, Au, Pt y Pd en concentraciones mayores de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. A concentraciones mayores de 1 mg L^{-1} de Cu, Pb, Ni, Co, Fe [19, 30, 60] existen interferencias por la formación de sales de arsenito y/o arsenato [60] o por

descomposición de los hidruros generados. A concentraciones entre 0,1 y 1 mg L⁻¹ de elementos que forman hidruros (como el Bi, Sb, Sn, Te) se suprime la reacción, así como con la presencia de bajas concentraciones de gases nobles (100 mg L⁻¹) que pueden disminuir la concentración de la arsina [30, 47].

Una baja cantidad de radicales libres también provocará una disminución de la eficiencia de la HG, pues se piensa que éstos participan en la reacción. Asimismo, las especies químicas de reductor, al consumir los radicales, limitan la eficacia de formación de hidruros del (los) analito (s) [47]. Finalmente, la presencia de agentes oxidantes favorece la formación de As(V) con un efecto adverso en la reacción de HG.

Anderson et al. examinaron el efecto de agentes quelantes buscando evitar interferencias por metales de transición. Se concluyó que EDTA 20 mM permite prevenir interferencias de Cu, Ni, Zn y Fe en presencia de tiourea 20 mM, sin embargo, cuando se utilizó ácido cítrico como medio de acidez, aumentó la interferencia por Cu. También se analizó la tiosemicarbazida, siendo un buen agente enmascarante de los metales Cu, Ni, Zn y Fe a concentraciones entre 0.2 y 0.4 M, y también en presencia de EDTA 0.04 M. Se estudiaron también otros agentes como fenantrolina, ácido tartárico y yoduros, los cuales no evitaron las interferencias por metales de transición [52].

1.6. Uso de estándar interno en procedimientos analíticos

Un estándar interno (IS) es un compuesto muy similar, pero no idéntico al analito que debe proporcionar una señal separada a la del analito pero ambas tienen que ser producidas en las condiciones instrumentales muy parecidas. Las señales del analito y del IS deben ser adquiridas de manera individual, totalmente resueltas, en la misma corrida analítica y sin cambio de las condiciones de medición [66].

El IS se utiliza para corregir errores aleatorios debido al ruido instrumental e imprecisiones cometidas durante el manejo de la muestra. En el caso de la respuesta instrumental, existe siempre cierta fluctuación que origina ruido y provoca cambios de la respuesta durante la corrida y entre corridas. Por otro

lado, un IS adecuadamente seleccionado y agregado al inicio del procedimiento, puede corregir también algunos errores sistemáticos tales como las pérdidas del analito durante la preparación de la muestra o cuando no se controla bien la cantidad de la muestra introducida al sistema instrumental. Al sufrir el analito y el IS las mismas variaciones y pérdidas a lo largo de todo el análisis, la normalización de la señal del analito por el IS ha mostrado ser muy efectivo para mejorar la precisión y exactitud de las determinaciones [67].

Para llevar a cabo la calibración cuando se está utilizando un IS, se debe agregar una cantidad constante y conocida del IS tanto a todas las muestras que se analizarán como al blanco y a todos los estándares de calibración (CS). La concentración del IS debe ser seleccionada de tal manera que su señal analítica tenga la magnitud similar a la del analito con el objeto de minimizar el error al calcular los cocientes. Posteriormente se miden las señales del analito y del estándar interno en todas soluciones de calibración y se calcula la relación de estas señales (S_{CS}/S_{IS}). Con base en los valores obtenidos, se obtiene la función de regresión lineal que relaciona la señal (S_{CS}/S_{IS}) con la concentración del analito en cada uno de los estándares de calibración ([CS]). De esta forma si por ejemplo la señal del IS aumenta en un cierto porcentaje debido a variaciones instrumentales, la señal del analito también incrementará en ese mismo porcentaje, y puesto que la concentración del estándar interno es constante, la señal normalizada sigue siendo proporcional directamente a la concentración del analito, misma que puede ser hallada de la función de calibración [68].

El intento de este trabajo ha sido utilizar un estándar interno apropiado para contrarrestar imprecisiones cometidas durante la etapa de generación de hidruros, su transporte hacia el plasma y provocados por el ruido instrumental (inestabilidad del plasma, de la línea base, etc.). Es por ello que los criterios de selección del IS han sido: (i) un elemento que forme hidruro volátil en las condiciones similares que As(III), (ii) un elemento cuya línea de emisión más intensa sea cercana a la del As, pero es libre de interferencias, (iii) las intensidades de las líneas atómicas del analito y del IS sean parecidas, (iv) un

elemento que no esté presente en la muestra y que no reaccione con los componentes de la muestra.

1.7. Problemática del As en cereales.

Los productos a base de cereales constituyen una fuente importante de consumo de arsénico, sobre todo en lugares con altos niveles de este elemento o en áreas contaminadas [69]. Debido a esto, el consumo de As, su translocación, distribución y especiación tanto en raíces, tallo, hojas y granos en distintos cultivos como el arroz, el trigo y el maíz ha sido ampliamente estudiado [70-76]. Se han llevado a cabo numerosos estudios acerca de la biodisponibilidad de As, y su especiación analítica en arroz y en trigo [6, 17, 77-81], sin embargo la información correspondiente a especiación de As en alimentos a base de maíz es muy escasa [82, 83].

La preparación de la tortilla requiere del procesamiento de granos enteros de maíz mediante la nixtamalización, proceso en el cual se hierven los granos de maíz en una solución de cal durante aproximadamente una hora. Posteriormente se deja reposar, se separan los granos cocidos del resto de la solución y se lavan para después molerlos y obtener la masa de la tortilla [84]. Es ampliamente conocido que durante el proceso de nixtamalización la composición nutricional del grano de maíz es alterada [70, 85], por lo que las formas y distribución del As también podrían verse afectados a lo largo de este proceso de la elaboración de tortilla.

En este trabajo, se llevó a cabo la determinación de As(III), As(V), DMAs(V), MMAs(V) en tortillas de maíz mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas con ionización en plasma de acoplamiento inductivo (HPLC-ICP-MS). Una vez demostrado que las formas inorgánicas del elemento fueron predominantes, lo siguiente fue establecer un procedimiento relativamente simple, barato y factible para la determinación de iAs en series largas de muestras. Para esto se utilizó generación de hidruros en espectrometría de emisión atómica por plasma de microondas (HG-MP-AES). Como pretratamiento de las muestras se realizó la extracción de As con ácido

nítrico diluido, y posteriormente retenido en cartuchos de intercambio aniónico modificados con cloruro de plata. Después de elución selectiva de As(V), se utilizó Te(IV) como estándar interno para corregir posibles errores durante la generación de hidruros, su transporte al plasma y fluctuaciones en el plasma. Los resultados obtenidos en siete distintas muestras por dos procedimientos analíticos tuvieron concordancia confirmando la factibilidad de determinar iAs en tortilla mediante el método no-cromatográfico aquí propuesto.

Capítulo II

Objetivos

2. Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo ha sido diseñar y poner a punto un nuevo procedimiento de especiación de arsénico para su aplicación en el análisis de tortillas de maíz.

2.1. Objetivos específicos

- Adaptar el procedimiento HPLC-ICP-MS para su aplicación en la determinación de As(III), As(V), DMAs(V) y MMAs(V) en tortillas.
- Establecer cuáles son las especies mayoritarias en tortilla, mediante el análisis de una serie de muestras reales provenientes de la región de Guanajuato.
- Desarrollar un procedimiento de determinación de especies mayoritarias basado en la etapa de extracción en fase sólida (SPE), separación, generación de arsina y cuantificación de arsénico por MP-AES utilizando Te(IV) como estándar interno.
- Demostrar la exactitud del procedimiento propuesto mediante comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos (SPE - HG-MP-AES y HPLC-ICP-MS) en el análisis de las mismas muestras de tortillas.

Capítulo III

Materiales y métodos

3.1. Instrumentación

Para la determinación de iAs se utilizó un espectrómetro de emisión atómica por plasma de microondas Agilent 4100 MP-AES con una cámara de sistema de introducción de muestras múltiple (por sus siglas en inglés MSIS).

Para determinación total de arsénico se utilizó un espectrómetro de masas con ionización en plasma de acoplamiento inductivo, modelo 7500 ce (ICP-MS, Agilent Technologies, Tokyo, Japón) con un nebulizador Meinhard y una cámara de rocío Peltier enfriada a 2 °C. Se conectó además un automuestreador Agilent ASX-500 para la toma de muestras durante el análisis de As total.

Para el análisis de especiación se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent Series 1050, acoplado directamente al ICP-MS. La columna analítica fue Hamilton PRP-X100 (4.6 x 250 mm, 10 μm) con una precolumna de intercambio aniónico Phenomenex. El efluente del sistema HPLC fue introducido al ICP-MS mediante un tubo corto de teflón hacia un nebulizador MiraMist Teflon.

3.2. Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Se utilizó agua desionizada (18.2 M Ω cm, Labconco); metanol y cloroformo grado HPLC (Fisher Scientific).

Las soluciones estándar de cuatro especies de As: arseniato dibásico de sodio (As(V)), trióxido arsénico (As(III)), monometil arsenato disódico (MMAs(V)) y ácido dimetilarsínico (DMAs(V)) fueron preparados disolviendo las cantidades adecuadas en agua para tener una solución con una concentración de 1 000 $\mu\text{gAs mL}^{-1}$. También se preparó una solución de telurito de potasio (Te(IV)) a una concentración de 1 000 $\mu\text{g Te mL}^{-1}$.

Se utilizaron los siguientes reactivos marca Sigma: ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido acético, peróxido de hidrógeno, nitrato de amonio, fosfato de amonio dibásico, hidróxido de amonio, tris, nitrato de plata, yoduro de potasio,

cloruro de sodio. Se utilizó una solución de estándares internos Agilent Technologies: In, Y, Bi, Rh, 2 mg L⁻¹; Sc, 5 mg L⁻¹; Li, 10 mg L⁻¹).

Para extracción en fase sólida se utilizaron cartuchos Supelco-Select SAX de intercambio aniónico fuerte (200 mg/6 mL).

3.3. Muestras reales

Se compraron tortillas de maíz en 7 distintos lugares del estado de Guanajuato y adicionalmente, se analizó una muestra de arroz en polvo comercial. Las tortillas se adquirieron en una sola tortillería al azar de las ciudades de Irapuato, Silao y León. Además, se adquirieron tortillas en dos distintas colonias de la ciudad de Guanajuato (colonia pastita y colonia pueblito de Rocha), y también se adquirieron dos marcas comercializadas (Marca Don Pancho, y marca Santo Apetito). Previo al análisis se liofilizaron aproximadamente 15 g de cada muestra de tortilla, se molieron y fueron almacenadas en tubos falcon de 50 mL.

3.4. Programas de software utilizados

Se utilizó el programa Agilent MP Expert (actualizado del modelo MP-AES 4200) para controlar el MP-AES 4100, para llevar a cabo la optimización de parámetros experimentales (posición de vista y presión de nebulización), procesamiento de espectros de emisión y obtención de datos experimentales.

Se utilizó el programa Agilent ICP-ChemStation para controlar el ICP-MS 7500ce así como el automuestreador Agilent ASX-500 y para el procesamiento de datos (Offline Data Analysis).

Para el análisis de especiación, los cromatogramas obtenidos mediante HPLC-ICP-MS fueron exportados desde el programa ICP-ChemStation (Offline Data analysis) al programa Thermo Grams/AI 8.0 para el procesamiento y análisis de los cromatogramas.

3.5. Procedimientos adoptados

3.5.1. Determinación de As total en tortillas mediante ICP-MS

Se llevó a cabo una digestión ácida de las tortillas previamente a la cuantificación de As total en ICP-MS. Se pesaron por triplicado 100 mg de cada una de las muestras de tortilla liofilizada en tubos de vidrio y en paralelo se procesaron tubos vacíos como blanco; a cada muestra se le adicionó 1 mL de HNO₃ 69 % y 250 µL de una solución de estándares internos (In, Y, Bi, Rh a 2 mg L⁻¹, Li a 10 mg L⁻¹ y Sc a 5 mg L⁻¹). Los tubos se calentaron durante 5 min a 80 °C y posteriormente se a 120 °C durante 2 h, después de lo cual se dejaron enfriando durante 30 min. Finalmente, para completar la digestión se agregó a cada muestra 1 mL de H₂O₂ 30 %. Se tomaron 225 µL de cada muestra hidrolizada y se aforaron a 5 mL, de tal forma que la concentración final de los estándares internos fue In, Y, Bi, Rh 10 µg L⁻¹, Li 50 µg L⁻¹, y Sc 25 µg L⁻¹. Se centrifugaron las muestras a 10 000 g durante 15 min y posteriormente fueron ingresadas en ICP-MS. Las condiciones instrumentales utilizadas se muestran en la Tabla 3.1, habiéndose obtenido mediante un proceso de “tuning” de sensibilidad.

Tabla 3.1: Parámetros utilizados para la cuantificación de As total mediante ICP-MS.

Parámetro de ICP-MS	Valor
Potencia de radiofrecuencia	1 500 W
Temperatura de cámara de nebulización	2 °C
Flujo de gas acarreador (Ar)	0.7 L min ⁻¹
Flujo de gas “makeup”	0.1 L min ⁻¹
Flujo de He en celda de colisión	4.5 mL min ⁻¹
Tiempo de integración	0.1 s
Cono de muestreo y cono skimmer	Platino

Se utilizó una solución Agilent de estándares multielemental para ICP-MS con la que se preparará la calibración de As a concentraciones de 0, 0.4, 1, 5, 10, 50 y 100 µg L⁻¹ en HNO₃ 1 %. Se utilizó ¹⁰³Rh como estándar interno a una

concentración final de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. La calibración de As utilizando ^{103}Rh como estándar interno a una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dio como resultado la siguiente función de calibración: $\frac{C_{pS_{As}}}{C_{pS_{Rh}}} = 8.70 \cdot 10^{-3} \cdot [\text{As}] - 3.62 \cdot 10^{-5}$; con un factor de regresión r^2 de 1.000 y un límite de detección de $0.03 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.5.2. Determinación de As(III), As(V), DMAs(V) y MMAs(V) mediante HPLC-ICP-MS.

Para la extracción de As en tortilla se pesaron 0.2 g de cada muestra de tortilla liofilizada en tubos eppendorf, a cada uno se les agregó 1.5 mL de HNO_3 2.5 %, se agitó en vórtex y las muestras se calentaron a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1.5 h [81, 86, 87]. Se centrifugaron a 10 000 g durante 15 min, y se tomaron 500 μL de cada sobrenadante en un nuevo tubo, a cada muestra se agregaron 20 μL de NH_4OH 28 % y posteriormente las muestras se evaporaron en SpeedVac a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 100 min. El residuo fue resuspendido en 200 μL de fase móvil ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 10 mM y NH_4NO_3 10 mM, pH 5.7), 250 μL de agua desionizada, 500 μL de cloroformo, y 200 μL de metanol. Se centrifugaron las muestras a 10 000 g durante 15 min y 200 μL de la fase agua:metanol se mezclaron con la misma fase móvil descrita anteriormente. Para el análisis mediante HPLC-ICP-MS se inyectaron 100 μL de cada una de estas muestras. Además de este análisis se realizó un experimento de recuperación, para lo cual se prepararon muestras de manera alterna de la misma forma que se describe anteriormente, con una adición de soluciones estándar de cada especie de arsénico, agregando 30 μL de una mezcla de As(V), As(III), DMAs(V) y MMAs(V) cada especie a una concentración de $20 \mu\text{g As L}^{-1}$, antes de iniciar el proceso de extracción, teniendo una concentración final de $1 \mu\text{LAs L}^{-1}$ de cada especie en la solución que se introdujo al sistema cromatográfico.

Los parámetros utilizados para llevar a cabo este análisis se muestran en la Tabla 3.2, los cuales fueron establecidos previamente.

Tabla 3.2: Parámetros utilizados para la especiación de As en tortillas mediante HPLC-ICP-MS.

Parámetros de HPLC	Valor
Columna	Hamilton PRP-X100 (4.6 mm x 250 mm), 10 μ m
Fase móvil	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 10 mM y NH ₄ NO ₃ 10 mM, pH 5.7
Flujo	1.1 mL min ⁻¹
Volumen inyectado	100 μ L
Parámetros de ICP-MS	Valor
Potencia de radiofrecuencia	1 500 W
Temperatura de cámara de nebulización	2 °C
Flujo de gas acarreador (Ar)	0.8 L min ⁻¹
Flujo de gas “makeup”	0.4 L min ⁻¹
Flujo de He en celda de colisión	4.5 mL min ⁻¹
Tiempo de integración	0.2 s
Isótopos monitoreados	75, 103 <i>m/z</i>

Tabla 3.3: Funciones de calibración obtenidos en el procedimiento HPLC-ICP-MS para As(III), DMAs(V), MMAs(V) y As(V).

Especie	Función de calibración	r ²	LOD (μ g L ⁻¹)	T retención (s)
As(III)	A = 752·[As] + 96.1	0.9976	0.56	130
DMAs(V)	A = 686·[As] + 162	0.9962	0.39	170
MMAs(V)	A = 735·[As] - 1.00	0.9990	0.64	210
As(V)	A = 734·[As] - 17.4	0.9937	0.92	375

Se realizó una calibración externa con mezclas de soluciones de estándares de As(III), As(V), DMAs(V) y MMAs(V) a concentraciones de 0, 1, 3, 5, 7, 9 y 10 μ g L⁻¹ cada una, utilizando como señal analítica el área del pico para cada especie. Las

funciones de calibración de cada estándar, así como el factor de regresión y límites de detección se muestran en la Tabla 3.3.

3.6. Procedimiento de determinación de iAs desarrollado en este trabajo.

3.6.1. Extracción de arsénico de tortilla

El análisis de iAs se llevó a cabo en el extracto de tortilla. Para esto, en un tubo de vidrio se pesaron 2 g de muestra liofilizada y se le agregaron 25 mL de una solución HNO₃ 2.5 % y H₂O₂ 3 %. Se calentaron las muestras a 90 °C durante 1.5 h y una vez enfriadas, se centrifugaron 30 min a 3 000 g recuperando el sobrenadante. Posteriormente, se agregaron 2.2 mL de Tris 250 mM, se ajustó el pH 9.0 con NaOH 2 M y las muestras fueron filtradas con papel filtro.

3.6.2. Separación de iAs mediante extracción en fase sólida.

Para llevar a cabo la separación de iAs se utilizaron cartuchos Supelco-Select SAX (de intercambio aniónico fuerte), modificados con AgCl, como se reporta por Issa et al. [88] con algunas modificaciones. Para esto cada cartucho fue lavado con 20 mL HNO₃ 0.1 % y posteriormente con 20 mL de agua desionizada; cada cartucho fue tratado con 5 mL de una solución de NaCl 1 M y posteriormente con una solución de AgNO₃ 30 mM, repitiéndose este tratamiento 5 veces. Se activaron los cartuchos ingresando en cada uno 5 mL de HCl 2 M, después 5 mL de agua desionizada y finalmente se equilibró con 5 mL de una solución de Tris 10 mM pH 9.0.

Para la separación de iAs, 20 mL de los extractos de tortilla o de los estándares de calibración fueron cargados en un cartucho modificado (SAX-AgCl). Una vez hecho esto, se trataron los cartuchos con 5 mL de ácido acético pH 2.6. Finalmente se pasaron por el cartucho con 4 mL de HNO₃ 0.1 %, y se recuperó este efluente para ser analizado. Antes de volver a utilizar un cartucho para una nueva muestra, se preacondicionó con 5 mL de tris 10 mM.

3.6.3. Determinación de iAs mediante HG-MP-AES utilizando Te(IV) como estándar interno.

Previo al análisis mediante HG-MP-AES a cada muestra se le agregó 1 mL KI 1% m/v para asegurar que las especies de As se encontraran como As(III) y 150 μL de una solución de Te(IV) 5 mg L⁻¹ (obteniendo una concentración final de 150 μg L⁻¹) como estándar interno. La forma en que se introdujeron las muestras al plasma fue mediante generación de hidruros (HG), para lo cual se utilizó una cámara de nebulización (MSIS Marathon Scientific) (Fig 3.1).

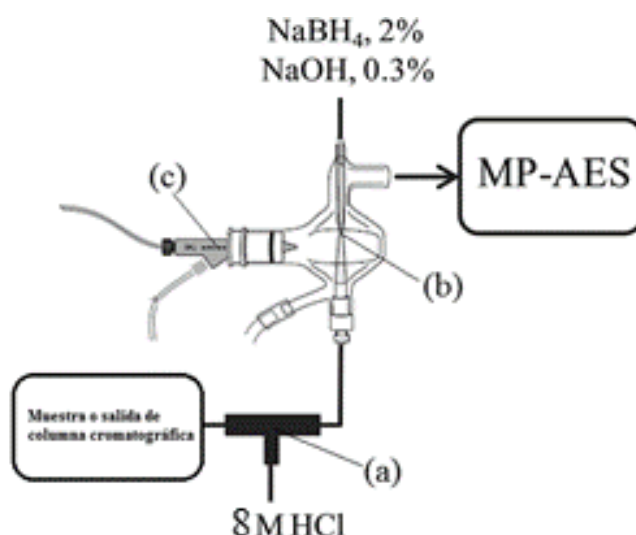


Fig. 3.1: Sistema de introducción de muestra para generación de hidruros (HG). (a) Conexión de la muestra o de la salida de la columna cromatográfica que une un flujo de HCl 8 M. (b) Área de contacto entre agente reductor (NaBH_4) y muestra acidificada, para llevar a cabo la reacción de HG. (c) Nebulizador Miramist.

Para transportar la muestra y las soluciones para llevar a cabo la generación de hidruros en la cámara MSIS, se conectaron mangueras en la bomba peristáltica que posee el equipo MP-AES. En la parte superior de la cámara se ingresó una solución de NaBH_4 2% m/v estabilizada en NaOH 0.3 % m/v; y en la parte inferior se ingresó la muestra o los estándares de calibración acidificando con HCl 8 M, para lo cual la manguera que transportaba la muestra (o los estándares de calibración) y la manguera que transportaba el HCl 8 M se unieron mediante una conexión “Y” la cual fue conectada en la parte inferior de la cámara (Fig 3.1a).

Se realizó la calibración con estándares de As(V) a concentraciones de 0, 6.0, 10, 30 y 50 $\mu\text{g As L}^{-1}$, ingresados en los cartuchos SAX-AgCl con el mismo procedimiento descrito anteriormente. A la fracción eluída con el ácido nítrico se agregó Te(IV) como estándar interno para obtener una concentración de 150 $\mu\text{g Te L}^{-1}$. La señal analítica se definió como el cociente entre la intensidad de la señal de emisión de As (228.812 nm) respecto la del telurio (214.281 nm).

Los parámetros utilizados para el análisis de separación de iAs mediante cartuchos SAX-AgCl se muestra en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Parámetros de operación de HG-MP-AES.

Parámetro MP-AES	Valor
Nitrógeno	189 kPa
Presión de nebulización	240 kPa
Posición de vista	-20
Tiempo de integración	3 s
Longitud de onda	228.812 nm (As); 214.281 nm (Te)
Corrección de fondo	“Off-peak left + right”
Número de pixeles	3

Capítulo IV

Resultados y discusión

4.1. Determinación del contenido total de As en tortillas

Los resultados de la cuantificación de As total en muestras de tortilla se muestran en la Tabla 4.1; estos se expresan como μg de As por kg de tortilla liofilizada, habiendo realizado el cálculo de la concentración de la dilución para ingresar en ICP-MS, la dilución realizada de haber realizado la hidrólisis y del peso exacto de muestra de tortilla analizada.

Tabla 4.1: Concentraciones de As total en tortillas de maíz obtenidas mediante el análisis por e ICP-MS expresado como μg de As por kilogramo de tortilla liofilizada.

Tortilla	$\mu\text{gAs kg}^{-1}$ de tortilla \pm SD
Silao	192 \pm 4
Arroz	120 \pm 7
León	85.4 \pm 0.8
Marca Santo Apetito	50.1 \pm 0.8
Guanajuato	52.0 \pm 0.4
Marca Don Pancho	44.1 \pm 4.2
Guanajuato (momias)	38.4 \pm 0.7
Irapuato	21.8 \pm 0.87

Como se mencionó, existe aún escasa normatividad en el mundo para la regulación de la presencia de As en alimentos, destacando que en Brasil se establece que los alimentos marinos no deben sobrepasar 1 mg kg^{-1} de As total, y en China la norma de niveles de contaminantes en comidas (GB 2762-20012) establece que el límites de As total en granos, vegetales frescos, productos fúngicos, carnes, leche en polvo, aceites, condimentos, azúcar, almidón, cocoa, chocolates, dulces, no debe sobrepasar de 0.5 mg As kg^{-1} , por lo que ninguna de las muestras de tortilla analizadas sobrepasan ninguna de estas dos normas.

Las fuentes que más destacan como posibles fuentes de contaminación de As en tortillas son el agua de riego del maíz utilizado para fabricar las tortillas, así como el agua utilizada en el procesamiento de la producción de la tortilla. Además, el maíz

podría acumular As del suelo, ya sea por su presencia ubicua de este metaloide en el suelo o por contaminación con herbicidas que contengan As como componente de la fórmula.

4.2. Determinación de As(III), As(V), MMAs(V) y DMAs(V) en tortillas mediante HPLC-ICP-MS

Los resultados de especiación de As en tortillas, se muestran en la Tabla 4.2 junto con la comparación de la suma de las especies encontradas en cada una de las muestras mediante el proceso de especiación con respecto al contenido de As total cuantificado directamente en la muestra digerida (recuperación de As en el proceso de especiación).

Tabla 4.2: Resultados de la especiación de As en tortillas, obtenidos mediante el procedimiento HPLC – ICP-MS.

Muestra	Concentración de As en forma de diferentes especies ($\mu\text{g As kg}^{-1}$)				Suma	As total (hidrólisis)	% Recuperación
	As(III)	DMAs(V)	MMAs(V)	As(V)			
Silao	154 \pm 9	4.28 \pm 0.2	nd	41.1 \pm 1.2	199	192 \pm 4	104
Arroz	15.6 \pm 0.3	90.7 \pm 1.5	nd	22.0 \pm 1.0	128	120 \pm 7	107
DonPancho	30.7 \pm 1.6	4.01 \pm 0.2	nd	4.64 \pm 0.3	39.3	44.1 \pm 4.2	89.1
Guanajuato	24.3 \pm 0.8	7.50 \pm 0.4	nd	19.7 \pm 0.8	51.5	52.0 \pm 0.4	99.0
Irapuato	8.06 \pm 0.5	7.24 \pm 0.2	nd	10.8 \pm 0.6	26.0	21.8 \pm 0.7	119
León	25.8 \pm 0.7	4.93 \pm 0.3	nd	51.3 \pm 1.1	82.0	85.4 \pm 0.8	96.0
Momias	23.3 \pm 0.7	7.17 \pm 0.4	nd	8.05 \pm 0.4	38.4	38.4 \pm 0.7	100
SantoApetito	32.6 \pm 0.8	7.04 \pm 0.5	nd	4.33 \pm 0.2	43.9	50.1 \pm 0.8	87.6

nd: no detectado, < LOD

Por su parte, en la Fig. 4.1 con línea continua se muestran los cromatogramas obtenidos para cada una de las muestras analizadas. En la misma figura, con línea punteada se muestran los cromatogramas obtenidos para las mismas muestras, después de adición de estándar mixto de cuatro especies ($1 \mu\text{g As L}^{-1}$ en forma de As(V), As(III), DMAs(V) y MMAs(V)). En la Tabla 4.3 se presentan los porcentajes de recuperación obtenidos en este experimento de adición de estándar para todas las muestras y todas las especies de As, encontrándose los valores en un intervalo

de entre el 76 % y el 129 %. Estos resultados son indicativos de una buena exactitud del procedimiento.

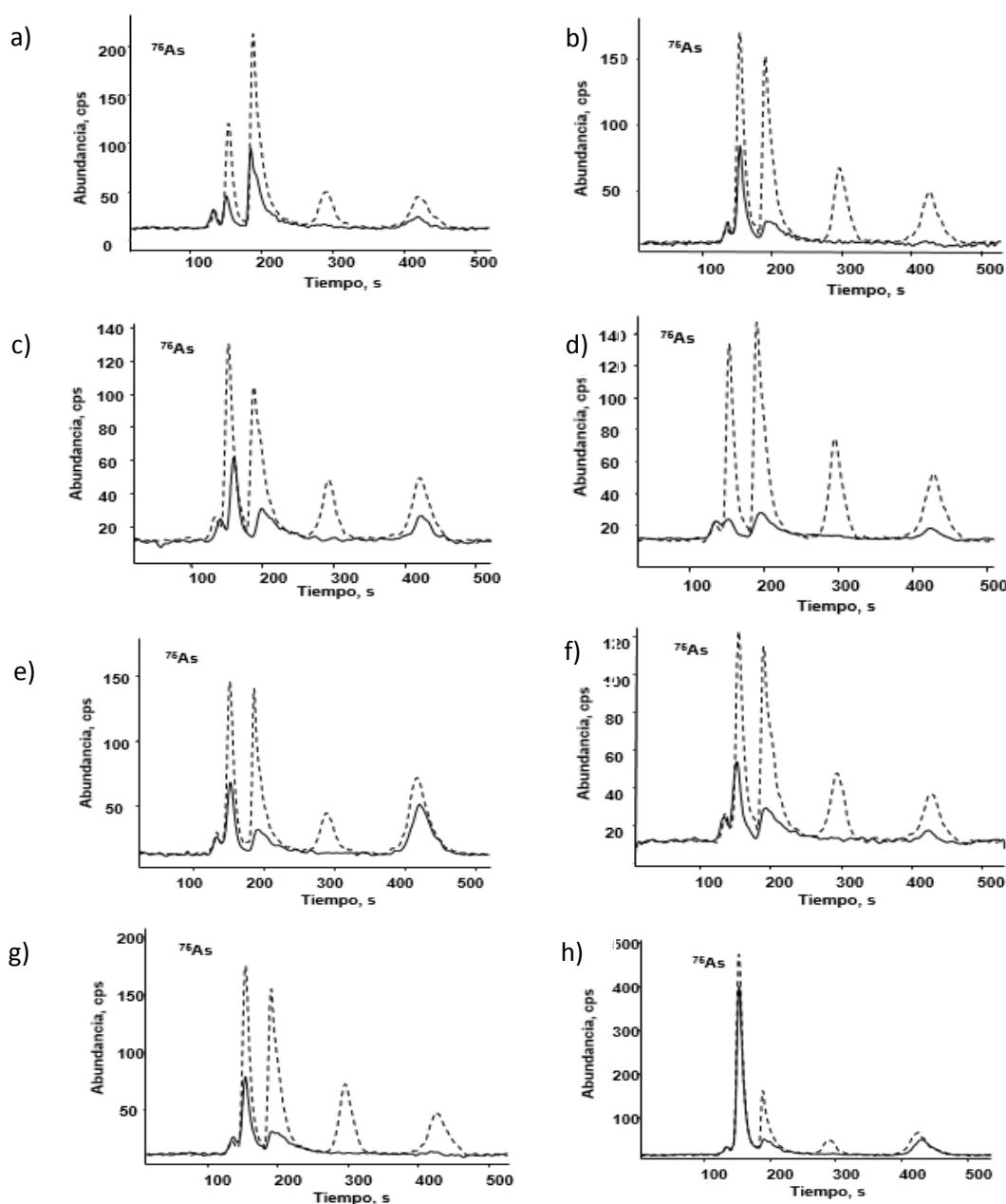


Fig. 4.1: Típicos cromatogramas HPLC-ICP-MS obtenidos en el análisis de tortillas (-), con línea punteada se presentan cromatogramas de las mismas muestras con adición de estándar de $1 \mu\text{g As L}^{-1}$ de cada especie (---). a) Muestra de arroz, b) Tortilla marca Don Pancho, c) Tortilla de Guanajuato, d) Tortilla de Irapuato, e) Tortilla de León, f) Tortilla comprada en colonia cerca del museo de las Momias, g) Tortilla marca Santo Apetito, h) Tortilla de Silao.

Tabla 4.3: Porcentajes de recuperación de especies de As en las muestras de tortilla enriquecidas con una adición de estándar de 1 $\mu\text{g As L}^{-1}$ para cada una de las especies.

Muestra	% de recuperación de cada especie			
	As(III)	DMAs(V)	MMAs(V)	As(V)
Silao	104	124	101	95.4
Arroz	82.9	101	100	81.4
Don Pancho	92.6	98.3	102	84.0
Guanajuato	97.3	129	89.0	93.0
Irapuato	84.4	97.5	91.9	85.0
León	108	136	108	90.4
Momias	107	127	89.7	89.5
Santo Apetito	91.1	95.9	90.8	76.0

Con base en los datos de la Tabla 4.2 se realizó el cálculo de la concentración de iAs (As(III) + As(V)) en cada tortilla, mostrando en la Tabla 4.4 los resultados obtenidos y el porcentaje del As total que corresponde iAs en estas muestras.

Tabla 4.4: Concentración de iAs (As(III)+As(V)) en muestras de tortilla y el porcentaje que esta forma representa de la cantidad de As total.

Muestra	iAs $\mu\text{g As L}^{-1}$	% iAs
Silao	195	97.9
Arroz	37.6	29.3
Don Pancho	35.3	89.8
Guanajuato	44.0	85.4
Irapuato	18.8	72.2
León	77.1	94.0
Momias	31.3	81.4
Santo Apetito	36.9	84.0

Como se muestra en la Tabla 4.4, en todas las tortillas de maíz analizadas el iAs fue la forma mayoritaria (entre el 72 y el 98 % del As total). Debido a esto el trabajo posterior se enfocó en el desarrollo de un procedimiento no-cromatográfico con detección por MP-AES para separar y cuantificar la fracción de iAs en las muestras de tortilla de maíz y establecer así una metodología de rutina, simple y de bajo costo que permita determinar la exposición del consumidor a la forma más tóxica de As (iAs) en alimentos.

4.3. Estudio de las condiciones de generación de hidruros y de detección mediante MP-AES en el análisis de compuestos individuales y del Te(IV) como estándar interno.

Se examinaron de manera sistemática las condiciones para realizar la generación de hidruros utilizando una solución de As(III) $25 \mu\text{g As L}^{-1}$ con la finalidad de obtener la mayor señal analítica posible de As. Para llevar a cabo la reacción se probaron dos distintos ácidos, HNO_3 2.5 % y HCl a diferentes concentraciones. Debido al carácter reductor que posee el HCl y, además, como se mencionó en la sección 1.5.2.1, sabiendo que el As(III) forma hidruros de forma más eficiente que otras especies, se utilizó HCl 8 M. Por su parte, se utilizaron distintas concentraciones de NaBH_4 de 1, 1.5 y 2% m/m, siendo la concentración de 2% con la que se observó buena magnitud de la señal analítica. Cabe mencionar que esta concentración del agente reductor resultó ser más alta respecto a otros estudios reportados en la bibliografía (Tabla 1.4) pero era necesaria utilizando el sistema de introducción de muestra MSIS. Por medio de ajuste de la bomba peristáltica se probaron diferentes flujos de la muestra acidificada y del agente reductor, seleccionando finalmente una velocidad de 1 mL min^{-1} al utilizar mangueras de un diámetro de 1 mm.

Los parámetros del MP-AES que se estudiaron para lograr la mejor señal analítica posible (intensidad de emisión del As) fueron: tiempo de lectura, posición de vista y presión de nebulización. El tiempo de lectura es el tiempo con el que se adquiere la señal de intensidad del haz de fotones emitidos a una longitud de onda

del elemento de interés para su integración. Por su parte, la posición de vista se refiere a la distancia entre la antorcha (visto de la parte superior en posición vertical) respecto al detector. La presión de nebulización es directamente proporcional al flujo de nitrógeno que envía el MP-AES hacia el nebulizador y es el parámetro que decide sobre tamaño y distribución del tamaño de las gotas de aerosol. Para establecer los parámetros del MP-AES se utilizó la opción que contiene el programa “MP expert”: “optimización de presión de nebulización” y “optimización de posición de vista”. Para esto se preparó una solución de As(III) a una concentración de $50 \mu\text{g As L}^{-1}$ o de Te(IV) $50 \mu\text{g Te L}^{-1}$ (como estándar interno) que fue ingresada con el sistema de generación de hidruros en la cámara MSIS como se describió en la sección 3.6.3 (Fig. 3.1) y esperando 1 min para que el plasma lograra estabilidad. Al aplicar las dos opciones de optimización antes mencionadas, con base en el monitoreo de un parámetro denominado SRBR (Signal-to-Root-Background Ratio), el software indica los valores de los parámetros a utilizar. El parámetro SRBR corresponde a la relación de la señal con respecto a la señal del ruido (S/N), de tal manera que variando los valores de posición de vista (desde -120 hasta +120) o variando la presión de nebulización (80 a 240 kPa), el programa elige aquel valor en el cual el monitoreo haya arrojado el valor más alto del parámetro SRBR. Debido a que ambas opciones de optimización no se pueden realizar simultáneamente, se realizaron de manera individual y consecutiva tres veces. Esta optimización se requiere llevar a cabo para cada una de las distintas longitudes de onda que se van a estudiar, habiéndose realizado este proceso para las líneas de 193.695 nm, 228.812 nm para As y 214.281 nm, 238.578 nm para Te, las cuales son las longitudes de onda de emisión más intensas y con menos interferencias para As y Te respectivamente, elegidas mediante un proceso de comparación de intensidades y de sus respectivos espectros de emisión para las diferentes longitudes de onda.

Utilizando las condiciones establecidas, se llevó a cabo el proceso de calibración para cada una de las especies, en una primera instancia sin hacer uso del estándar interno. En la Tabla 4.5 se muestran los parámetros de las curvas de calibración de las cuatro especies con base en sus señales adquiridas a 193.695nm y a 228.812 nm. Como fue de esperar, la mayor sensibilidad se obtuvo para As(III), mientras que

las pendientes de las funciones de regresión lineal de las otras tres especies fueron más bajas. Es importante hacer notar que, la detección en 193.695 nm ofrece mayor magnitud de las señales analíticas, pero la linealidad (r^2) y los límites de detección fueron mejores para As(III) y As(V) a 228.812 nm debido a más bajo ruido (relación señal/ruido más alto). Es por esto que, para estudios posteriores, se escogió la longitud de onda de 228.812 nm para la detección/cuantificación de As. Asimismo queda claro que, al utilizar la técnica de generación de hidruros después de la etapa de separación, es recomendable convertir cada una de las formas/especies separadas al As(III) para lograr igual y el mejor posible poder de detección para cada una de ellas.

Tabla 4.5: Funciones de regresión lineal obtenidas para As en el proceso de calibración de HG-MP-AES para As(V), As(III), DMAs(V) y MMAs(V).

λ (As)	193.695 nm			228.812 nm			
	Especie	Función de calibración	r^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Función de calibración	r^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
As(III)		$I = 34.5 \cdot [C] + 66.6$	0.9819	2.9	$I = 29.1 \cdot [C] - 117$	0.9933	2.8
As(V)		$I = 13.7 \cdot [C] - 68.3$	0.9736	9.7	$I = 9.50 \cdot [C] - 48.7$	0.9812	4.0
MMAs(V)		$I = 8.50 \cdot [C] + 43.9$	0.9713	7.7	$I = 14.9 \cdot [C] + 90.9$	0.9669	7.4
DMAs(V)		$I = 8.10 \cdot [C] + 35.0$	0.9886	9.2	$I = 17.0 \cdot [C] + 140$	0.9775	20

^aI = Intensidad de emisión; [C] = Concentración de la especie, mg L^{-1} ; r^2 = coeficiente de regresión; LOD = límite de detección instrumental

En cuanto al telurio, este elemento tiene la capacidad para formar hidruro volátil, se presenta de manera escasa en la corteza terrestre, y se presenta en muy bajas concentraciones en distintos cultivos agrícolas ($0.75 - 2.4 \mu\text{g Te kg}^{-1}$) [89] además de presentar la línea de emisión intensa relativamente cerca de la del As. De esta manera el Te(IV) parece cumplir con los requisitos de un IS para corregir errores aleatorios durante generación de hidruros, su transporte y medición de As por MP-AES; en este trabajo se examinó entonces el telurito de potasio, Te(IV), como posible estándar interno en el proceso de determinación de As por HG-MP-AES.

Se llevó un proceso de calibración de Te(IV) para comprobar el límite de detección y su factibilidad para detectarse mediante HG-MP-AES a concentraciones de 0, 10, 30, 50, 100, 300, 500 y 1 000 $\mu\text{g Te L}^{-1}$ para las líneas de emisión de

214.281 nm y 238.578 nm. Los parámetros de las funciones de calibración obtenidos se muestran en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6: Funciones de regresión lineal para Te(IV) en el proceso de calibración utilizando el sistema HG-MP-AES. ([Te]: concentración de telurio en $\mu\text{g L}^{-1}$).

λ (Te)	Función de calibración	R^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)
214.281 nm	$I = 4.57[\text{Te}] - 4.22$	0.9993	8.00
238.578 nm	$I = 4.65[\text{Te}] + 31.1$	0.9975	25.4

En la Fig. 4.2 se muestran señales de emisión registradas en las dos líneas estudiadas para las soluciones de calibración de Te(IV) mediante HG-MP-AES. Debido a que la línea de emisión de 214.281 nm (Fig. 4.2a) presenta menos interferencias que la línea de emisión de 238.578 nm, y puesto que se obtiene un límite de detección más bajo para la longitud de emisión de 214.281 nm, ésta fue la que se seleccionó para adquirir la señal de Te como estándar interno.

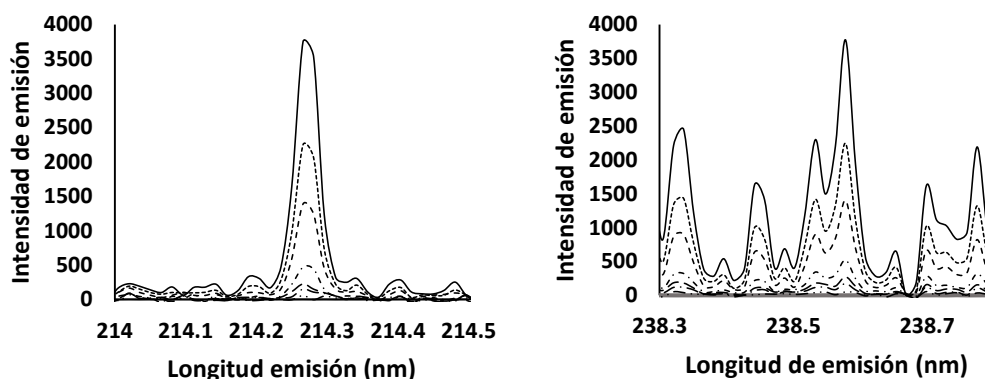


Fig. 4.2: Señales de emisión adquiridos para las soluciones de calibración de Te(IV) obtenidos mediante HG-MP-AES a concentraciones de 0, 10, 30, 50, 100, 300, 500 y 1 000 $\mu\text{g L}^{-1}$. a) Línea de emisión de 214.281 nm. b) Línea de emisión de 238.578 nm.

Una vez elegidos los parámetros para la adquisición de la señal de Te y As mediante HG-MP-AES, se llevó a cabo una calibración para arsénico (partiendo de

la solución de As(V), agregando a cada una de las soluciones como estándar interno Te(IV) a una concentración final de 150 µg L⁻¹.

Utilizando los parámetros de HG-MP-AES descritos en la sección 3.6.3 (Tabla 3.4) para la cuantificación de As utilizando Te(IV) como estándar interno se obtuvo la siguiente función de calibración con los parámetros mostrados en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7: Función de calibración de [As] utilizando Te a una concentración de 300 µg L⁻¹ como estándar interno.

Función de calibración	R ²	LOD (µg L ⁻¹)
$\frac{\text{Int As}_{228.812\text{nm}}}{\text{Int Te}_{214.281\text{nm}}} = 1.52 \cdot 10^{-2}[\text{As}] - 3.54 \cdot 10^{-2}$	0.9994	9.33

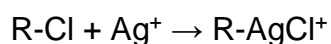
Con esto se demuestra la factibilidad de utilizar Te(IV) como estándar interno con la finalidad de compensar imprecisiones durante la reacción de generación de hidruros, el transporte de los hidruros hacia el plasma y fluctuaciones en el plasma del MP-AES. Aunque el límite de detección para As(V) no mejoró en estas pruebas (9.5 µg As L⁻¹ con IS y 4.0 µg As L⁻¹ sin IS), se obtuvo más alto coeficiente de regresión lineal (0.9994 respecto a 0.9812) y, además, la repetitividad de las señales IntAs/IntTe fue mejor respecto aquellas sin normalización por IS: coeficiente de varianza para 5 repeticiones del estándar As(V) 20 µg As L⁻¹ fue de 4.55 % sin IS y 3.12 % con IS.

4.4. Estudio de la separación de los compuestos orgánicos e inorgánicos de As en una columna de intercambio aniónico modificada con AgCl.

Debido a que los resultados HPLC-ICP-MS demostraron la presencia de As(III) y As(V) como principales especies del elemento en tortillas y sabiendo que estas dos especies no solamente son las más tóxicas, sino que además pueden sufrir inter-conversiones durante el manejo de las muestras, el trabajo se enfocó en establecer un procedimiento de determinación de arsénico inorgánico (iAs = As(III))

+ As(V)). Para ello, fue necesario lograr la separación del As orgánico (oAs) y de iAs, previo a la reducción de As(V) a As(III) e introducción de las muestras al sistema HG-MP-AES establecido.

En la etapa de separación se optó por la extracción en fase sólida, modificando ligeramente el procedimiento reportado en bibliografía [90]. En el primer intento, para estudiar las condiciones de retención de las especies As(III), As(V), DMAs(V) y MMAs(V), se utilizó una columna rellena con un intercambiador aniónico fuerte y modificada con AgCl. Para esto una columna cromatográfica (8 x 125 mm) fue empacada con el material contenido en tubos de extracción de fase sólida (Supelco SAX SPE tube). Posteriormente, se llevó a cabo una modificación de la fase SAX con AgCl como describe Issa et al [90] con algunos cambios. En concreto, la columna fue conectada a la bomba del cromatógrafo HP 1050 (Figura 4.3) para pasar a través de ella una solución de NaCl 1 M con un flujo de 1 mL min⁻¹ durante 20 min. Posterior a esto se drenaron todos los canales del HPLC, y se utilizó AgNO₃ 4.8 g L⁻¹; esta solución se pasó a través de la columna durante 40 min a un flujo de 0.5 mL min⁻¹. Finalmente, se activó la columna pasando 5 mL del ácido clorhídrico 2M. Como resultado de este procedimiento, la resina se modifica de la siguiente manera:



Una vez que la columna fue modificada, por medio del loop de 500 µL se inyectaban a la columna por separado las soluciones estándar de As(V), As(III), DMAs(V) y MMAs(V) a una concentración de 20 mg As L⁻¹ utilizando Tris 10 mM pH 9.0 con un flujo de 3.5 mL min⁻¹ durante 5 min para lograr su retención. Para observar el comportamiento de elución, siguiendo el trabajo citado, se utilizó ácido acético a un pH 2.6 a un flujo de 3.5 mL min⁻¹ durante 2.5 min, y finalmente se utilizó HNO₃ 0.1 % a un flujo de 1 mL min⁻¹. Además de los estándares individuales, se ingresó también una mezcla de las cuatro especies mencionadas a una concentración de 20 mg As L⁻¹ cada una, siguiendo el mismo procedimiento de retención/elución. El resultado esperado fue la retención de todas especies en la

columna, la elución de especies orgánicas con el ácido acético y de las especies inorgánicas en la fracción del ácido nítrico [90].

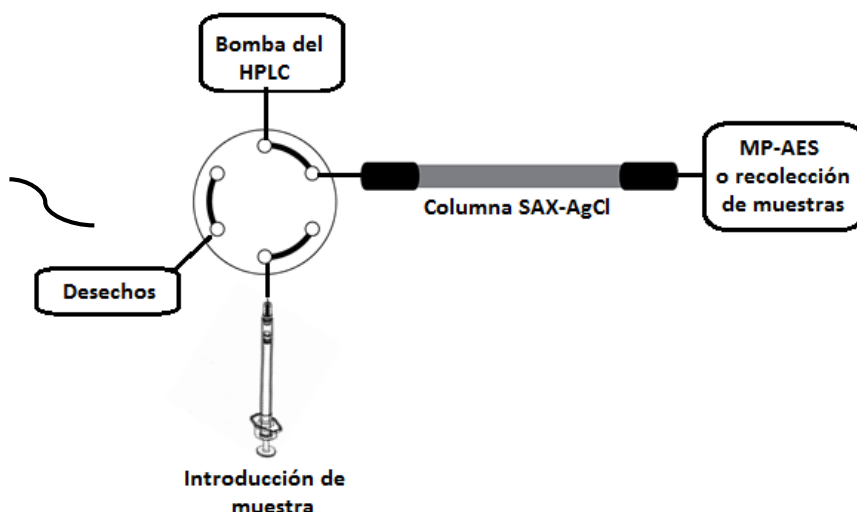
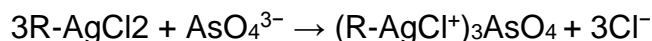
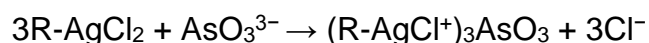


Fig. 4.3: Conexión de la bomba del HPLC y columna SAX en una válvula de 6 canales para transportar el flujo a través de la columna.

En particular, la retención de las especies de As ha sido descrita como el proceso mixto de intercambio aniónico y de quimio-sorción sobre las partículas de la resina modificada, de acuerdo con las siguientes ecuaciones [90]:



Para llevar a cabo el monitoreo de las especies de As mediante MP-AES en modo continuo, la salida de la columna fue conectada directamente al nebulizador MiraMist instalado antes de la cámara de niebla (Fig. 4.3). En este experimento no se realizó la etapa de HG (por ello las concentraciones de estándares fueron altas, de 20mg As L^{-1}). Se optimizaron los parámetros MP-AES para MMAAs(V), DMAAs(V) en ácido acético y para As(III), As(V) en HNO_3 0.1% v/v, obteniéndose resultados muy parecidos en ambos casos. Se optó entonces por utilizar únicamente los parámetros optimizados para las especies inorgánicas y estos fueron: Tiempo de

integración 3 s, Posición de vista -20, Presión de nebulización 220 kPa; asimismo se activó el módulo de control de gas externo (EGCM) del MP-AES en nivel “medio”. Al agregar un flujo adicional de aire, se evitó la formación de depósitos de carbono en la antorcha, esperados debido a la presencia de Tris 10 mM y de ácido acético pH 2.6 en el eluyente de la columna.

En la Fig. 4.4 se muestran los perfiles de elución obtenidos para cada especie de As y para una mezcla de los cuatro estándares de As estudiados. Tal como ya se mencionó antes, para cargar/retener las especies en la columna se utilizó tris 10 mM, pH 9, ya que a este pH todas las especies de As analizadas se encuentran en forma de aniones (Fig. 1.2) e interaccionan fuertemente con el empaque de la columna SAX-AgCl lo que resulta en su retención.

Para eluir arsénico orgánico se utilizó ácido acético pH 2.6, puesto que a este pH ambas especies metiladas están presentes como moléculas neutras (Fig. 1.2), con lo cual se rompen las interacciones con el empaque de la columna, y de esta manera se obtiene elución de las especies oAs (Fig. 4.4c, 4.4d, 4.4e). Es necesario mencionar sin embargo que para DMAs(V) no se obtuvo su retención en la columna. A este efecto no se dio importancia por dos razones: (i) DMAs(V) fue detectado como especie minoritaria en las muestras de tortilla por HPLC-ICP-MS, (ii) el objetivo de trabajo ha sido determinar iAs. Lo que sí es importante de resaltar es que en el caso de las especies de oAs, al cambiar la fase móvil a HNO₃ 0.1 % v/v ya no se observó ninguna señal de As lo que confirma la eficacia del ácido acético como eluyente de As orgánico, o en caso de DMAs(V) falta de su retención en la columna (Fig. 4.4 c, d).

Finalmente, se utilizó HNO₃ 0.1 % v/v, que posee un pH aproximado de 1.6, con lo cual As(III) y As(V) son protonados o se presentan como especies neutras (Fig. 1.2), eluyéndose completamente de la columna (Fig. 4.4a, 4.4b, 4.4e). Además, es importante mencionar que las especies de iAs no son eliminados de la columna con ácido acético, sino que se eluyen únicamente en la fracción del HNO₃ 0.1% v/v.

Los resultados que se acaban de presentar demuestran la factibilidad de llevar a cabo la separación de iAs del oAs mediante extracción en fase sólida utilizando la fase de intercambiador aniónico fuerte modificado con AgCl (Fig. 4.4e), y haciendo énfasis en que el iAs es la forma más tóxica del As (Tabla 1.1).

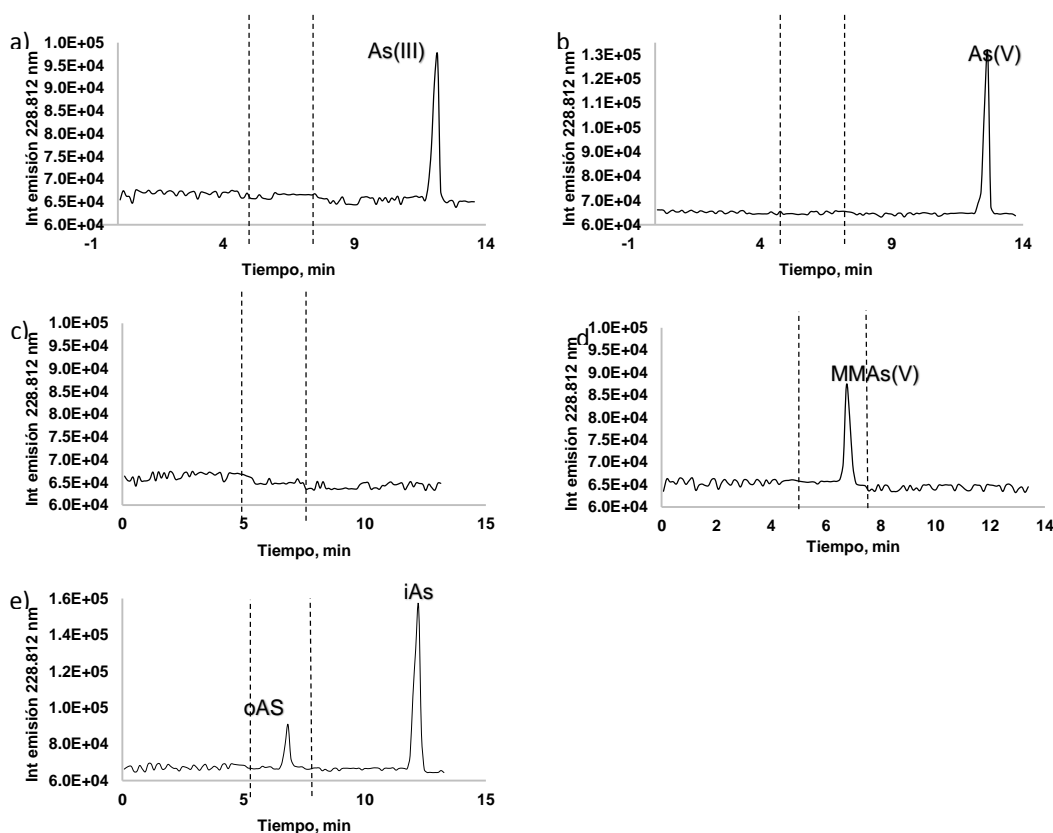


Fig. 4.4: Típicos perfiles de elución de As obtenidos para soluciones estándar de sus especies en la columna SAX-AgCl, monitoreando la longitud de onda del As de 228.812 nm en MP-AES. Las líneas punteadas representan el cambio de los flujos de las fases móviles en el siguiente orden: Flujo Tris 10 mM 3.5 mL min⁻¹, flujo de ácido acético pH 2.6 3.5 mL min⁻¹, flujo de HNO₃ 0.1 % 3.5 mL min⁻¹. a) As(III) 20 mg L⁻¹. b) As(V) 20 mg L⁻¹. c) DMAs(V) 20 mg L⁻¹. d) MMAs(V) 20 mg L⁻¹. e) Mezcla de As(III), As(V), DMAs(V) y MMAs(V) cada uno a 20 mg L⁻¹.

Se llevaron a cabo los experimentos de recuperación de compuestos individuales de As retenidos y eluidos de la columna. Para ello, se ingresaron alícuotas de 500 μL de cada uno de los estándares de As(V), As(III), DMAs(V) y MMAs(V) por separado, a una concentración de 10 mg As L^{-1} . Cada solución contenía Tris 10 mM, pH 9.0 y fue ingresada mediante el sistema que se muestra en la Fig. 4.3 utilizando el flujo de 0.8 mL min^{-1} durante 8 minutos. Después de este tiempo, se pasó por la columna ácido acético pH 2.6 a un flujo de 1 mL min^{-1} . En el caso de los estándares de MMAs(V) y DMAs(V) se cronometraron 4 minutos después de este cambio, y a partir de este tiempo se recolectó la fracción correspondiente a oAs durante exactamente 3 min. En el caso de As(III) y As(V) el flujo de ácido acético pH 2.6 fue 1 mL min^{-1} durante 8 minutos, después de lo cual la fase móvil se cambió a HNO_3 0.1 % a un flujo de 1 mL min^{-1} . Después de este cambio se cronometró el tiempo y a partir del minuto 4 se recolectó la fracción de iAs durante exactamente 3 min. Además, se prepararon 500 μL de cada uno de los estándares por separado, a una concentración de 50 mg L^{-1} y se diluyeron en 2.5 mL del eluyente respectivo, con la finalidad de simular la concentración final correspondiente a su recuperación completa de la columna SAX-AgCl, lo que facilitó calcular porcentajes de recuperación obtenidos en el proceso de separación.

Para calcular las recuperaciones en estos experimentos, fue necesaria la cuantificación de As en cada una de las fracciones eluidas, para lo cual se llevó a cabo el proceso de calibración adquiriendo señal del As a la longitud de onda de 228.812 nm. Las soluciones de calibración se prepararon en HNO_3 0.1 % v/v para As(III) y As(V), y en ácido acético pH 2.6 para MMAs(V) y DMAs(V)), siempre en el intervalo de concentraciones de 0, 1, 5, 10, 15 y 20 mg As L^{-1} . Las condiciones instrumentales de MP-AES para cada una de las especies (excluyendo As(V)) fueron elegidas mediante el programa "MP expert"; los parámetros finalmente seleccionados se enlistan en Tabla 4.8. Puesto que estos experimentos se realizaron sin etapa de generación de hidruros, el sistema de introducción de muestra consistió del nebulizador OneNeb y la cámara de cuarzo de un solo paso.

Tabla 4.8: Parámetros de MP-AES utilizados para llevar a cabo el análisis del comportamiento de las especies de As en la columna SAX-AgCl.

Especie	Presión de nebulización (kPa)	Posición de vista	T de integración (s)	λ de emisión	EGCM*
As(III)	120	0	3	228.812 nm	Medio
DMAs(V)	200	0	3	228.812 nm	Medio
MMAAs(V)	200	0	3	228.812 nm	Medio

*Módulo de control de gas externo, con el cual se añade un flujo de aire en la antorcha para evitar depósitos de carbono

Las funciones de calibración obtenidas en este proceso (sin la etapa de HG) se muestran en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9: Funciones de calibración obtenidos en el procedimiento MP-AES para As(III),DMAs(V) y MMAAs(V).

Especie	Función de calibración	r^2	LOD (mg L ⁻¹)
As(III)/As(V)	$I = 212 \cdot [C] + 66.5$	0.9919	0.53
DMAs(V)	$I = 292 \cdot [C] + 38.1$	0.9999	0.69
MMAAs(V)	$I = 191 \cdot [C] + 51.8$	0.9967	0.43

Las funciones de calibración de la Tabla 4.8 fueron utilizadas para cuantificar As en soluciones antes de su introducción a la columna y en fracciones recolectadas de la columna; para As(III) y As(V) se utilizó la misma función de calibración. Las concentraciones de especies y los porcentajes de recuperación obtenidos se presentan en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10: Concentraciones de especies de As en las soluciones ingresadas a la columna SAX-AgCl, en fracciones recolectadas y, respectivos porcentajes de recuperación.

Especie	Concentración en la fracción recolectada de la columna SAX-AgCl (mg L ⁻¹)	Concentración de estándares no ingresadas a la columna (mg L ⁻¹)	% Recuperación
As(V)	8.23	8.96	91.8 %
As(III)	1.88	8.70	21.6 %
DMAs(V)	1.02	8.94	11.4 %
MMAs(V)	8.57	9.06	94.6 %

Como era de esperarse el porcentaje de recuperación de DMAs(V) fue muy bajo (11%), debido a que esta especie prácticamente no se retiene en la columna. Tanto As(V) como MMAs(V) presentaron porcentajes de recuperación mayores al 90%, lo que indica la efectividad del esquema de retención/elución propuesto. Aunque en las primeras corridas la recuperación de As(III) fue casi de 100% (Fig. 4.4.a), el comportamiento de retención/elución de esta especie en particular empeoró gradualmente hasta encontrar los porcentajes de recuperación del orden de 20%. Es por ello que se ha decidido ajustar las condiciones de extracción de la muestra con el fin de tener iAs en su totalidad en la forma As(V). A este respecto, para la extracción de As de tortilla se utilizó la mezcla del ácido nítrico diluido y agua oxigenada de acuerdo con los reportes recientes de estudios en arroz y otros cereales [6, 17, 86, 91, 92]. Cabe mencionar que la baja y cambiante recuperación del As(III) se debió probablemente a una incompleta modificación de la resina con AgCl y/o a la pérdida gradual de dicha modificación en ciclos sucesivos. Sin presencia de plata, a pH 2.6, el As(III) se encuentra como especie neutra y se eluye de SAX junto con oAs (pKa1 de As(III) es de 9.2). Efectivamente, la recuperación de As(III) fue muy buena en la columna recién modificada, pero después de aproximadamente 20 ciclos, la retención/elución de As(III) empeoraba gradualmente. Al monitorear elución de Ag de la columna (328.068 nm) quedó

confirmado que su concentración va en aumento conforme crece el número de corridas realizadas. Esta pérdida de plata puede ocurrir en forma de AgCl o como Ag⁰ por la posible foto-descomposición de AgCl en Ag⁰ + Cl₂, ambos procesos favorecidos por las soluciones de ácido acético o nítrico.

El resultado más relevante de esta parte de trabajo ha sido lograr la separación efectiva de As(V) de las especies metiladas MMAs(V) y DMAs(V), pudiéndose emplear la resina SAX-AgCl para la determinación selectiva de iAs siempre y cuando el As(III) sea previamente oxidado a As(V).

4.5. Evaluación de parámetros analíticos y pruebas de exactitud del procedimiento SPE-HG-MP-AES.

En el apartado anterior, se utilizó una columna cromatográfica y los flujos fueron controlados mediante la bomba del HPLC, de esta manera se demostró la factibilidad de retención y elución selectiva del As(V) y también se ajustaron las condiciones necesarias para lograr dicha selectividad. Como siguiente paso, se propuso llevar a cabo la separación mediante extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Select-Supelco SAX modificándolos con AgCl y empleando detección/cuantificación de iAs mediante HG-MP-AES. Este diseño final es atractivo debido a más cortos tiempos de procesamiento de muestra, posibilidad de llevar a cabo el procesamiento de varias muestras de manera simultánea, menor gasto de reactivos y residuos de laboratorio, más fácil regeneración de la resina y sin perder la capacidad de preconcentración, respecto al uso de la columna.

El procedimiento de modificación de cartuchos con AgCl fue muy similar al utilizado para la columna y se describe detalladamente en la parte experimental. Los cartuchos modificados tenían que ser envueltos en papel aluminio para protección de luz solar, al hacerlo, podrían ser utilizados por hasta 40 ciclos y luego fue necesario el proceso de su regeneración. Inicialmente, se comprobó que MMAs(V) y As(V) pueden ser retenidas completamente en cartuchos SAX-AgCl y que eluyeran en fracciones separadas, utilizando como eluyentes el ácido acético y

el ácido nítrico, respectivamente. Para ello, se analizaron distintas mezclas de estándares de As ingresando al cartucho concentraciones de As(V) de 0, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$; a estas soluciones se les agregó MMAs(V) y DMAs(V) de tal forma que la concentración final de cada una de especies metiladas correspondió a 50 $\mu\text{g As L}^{-1}$. Además, se analizaron estándares de As(V) sin adición de estas dos especies orgánicas y sin pasarlas por el cartucho SAX-AgCl, comparándose ambos resultados. Cabe mencionar que en estos experimentos no se llevó a cabo la preconcentración ya que el volumen inicial introducido al cartucho fue de 5 mL y el volumen final de la fracción recolectada más la solución del reductor (KI) y IS fue también de 5 mL; este diseño permitió comparar directamente los parámetros analíticos para iAs (como As(V)) obtenidos sin y con cartucho, en ausencia y en presencia de las especies orgánicas.

Tabla 4.11: Parámetros de calibración en el método HG-MP-AES para As(V).

Parámetro	Estándares no ingresados en SPE (SAX-AgCl)	Estándares ingresados en SPE (SAX-AgCl)
Función de regresión	$\frac{\text{Int As}_{228.812\text{nm}}}{\text{Int Te}_{214.218\text{nm}}} = 2.93 \cdot 10^{-2} [\text{As}] + 4.30 \cdot 10^{-2}$	$\frac{\text{Int As}_{228.812\text{nm}}}{\text{Int Te}_{214.218\text{nm}}} = 3.23 \cdot 10^{-2} [\text{As}] + 4.51 \cdot 10^{-3}$
r^2	1.0000	0.9984
S.D. _m	3.71×10^{-5}	1.09×10^{-3}
S.D. _b	6.43×10^{-4}	1.95×10^{-2}
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5.14	6.12
C.V. (%)	1.48	2.75

S.D._m, error típico de la pendiente; S.D._b, error típico del intercepto; LOD, límite de detección calculado como $3.3\sigma/m$; C.V.(%), coeficiente de varianza de 5 réplicas de estándares $20 \mu\text{g L}^{-1}$.

Los parámetros de la calibración para As(V) no ingresado al cartucho y en ausencia de oAs, así como para As(V) después de la extracción en fase sólida en presencia de oAs se muestran en la Tabla 4.11; en este caso ya se integró Te(IV) como estándar interno.

Se puede observar que la sensibilidad (pendiente de la función de regresión lineal) fue muy similar para ambos procedimientos y se obtuvo un límite de detección ligeramente inferior en presencia de oAs y realizando etapa SPE respecto a la introducción directa de estándar de As(V) al sistema HG-MP-AES. También es

importante que la repetitividad evaluada como CV para cinco repeticiones del estándar As(V) 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ fue muy buena en ambos procedimientos ($\text{CV} < 2.8\%$), lo que confirma que el uso de cartucho permite determinar de manera selectiva As(V). Cabe resaltar que estos resultados fueron obtenidos mediante HG-MP-AES y utilizando Te(IV) 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ como estándar interno.

Finalmente, se llevó a cabo la cuantificación y el cálculo de porcentajes de recuperación de soluciones a distintas concentraciones de As(V) en presencia de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ tanto de MMAs(V) como de DMAs(V) en la etapa de extracción en fase sólida (SAX-AgCl), comparándose con las señales de As(V) en ausencia de especies orgánicas, para comprobar que únicamente se estuviera eluyendo el As(V) (Tabla 4.12).

Tabla 4.12: Porcentajes de recuperación de As(V) a partir de sus mezclas con DMAs(V) y MMAs(V) utilizando extracción en fase sólida (SAX-AgCl) y determinación de As mediante HG-MP-AES con Te(IV) como estándar interno. (*Solución inicial: As(V); DMAs(V); MMAs(V), $\mu\text{g L}^{-1}$.)

Composición de la solución*	Int Emisión a 228.812 nm (As)	Int Emisión a 214.281 nm (Te)	Int As/Int Te	[As], $\mu\text{g L}^{-1}$	Recuperación, %
0; 50; 50	9.11	376	0.02	nd	-
10, 50, 50	121	386	0.31	9.20	92.0
20, 50, 50	237	384	0.62	19.6	98.0
30, 50, 50	356	359	0.99	32.3	108
40, 50, 50	477	361	1.32	43.7	109
50, 50, 50	556	347	1.60	53.3	107

En la Fig. 4.5 se muestra una superposición de las señales de emisión de As (228.812 nm) registradas en dos diferentes experimentos, es decir soluciones de mezclas de As(V), MMAs(V) y DMAs(V) ingresados en cartuchos SAX-AgCl; comparados con de estándares sin haber sido ingresados en los cartuchos SAX-

AgCl y en ausencia de las especies DMAs(V) y MMAs(V) en tres diferentes concentraciones de estándares de As(V) (0, 10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$).

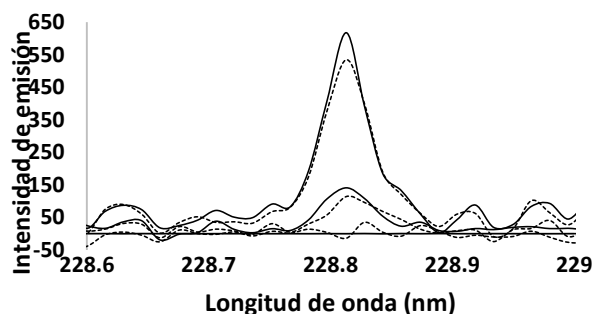


Fig. 4.5: Señales de emisión de As (228.812 nm). (-) Estándares de As(V) (0, 10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) que no fueron ingresados en cartuchos SAX-AgCl. (- - -) Mezcla de estándares de As(V) (0, 10 y 50 $\mu\text{g L}^{-1}$) con MMAs(V) y DMAs(V) (50 $\mu\text{g L}^{-1}$) ingresados en SAX-AgCl.

Resumiendo, los resultados obtenidos en esta parte de trabajo, hay que resaltar que la pendiente de la función de regresión lineal para As(V) con Te(IV) como estándar interno se mantuvo prácticamente sin cambio cuando las soluciones de calibración contenían oAs y se pasaban por el cartucho SAX-AgCl, además de presentar muy buena linealidad con $r^2 = 1.0000$ y límites de detección por debajo de los 7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabla 4.11). Por su parte, de la Tabla 4.12 es evidente que ninguna de las especies metiladas co-eluyeron con el As(V), puesto que en el blanco se obtuvieron cantidades por debajo del límite de detección, y en las demás mezclas se obtuvieron muy buenos porcentajes de recuperación de As(V) (entre 92 y 109 %). Finalmente, en la Fig. 4.5 se comprueba que las señales de emisión de As en ambos casos; tanto para estándares que contenían DMAs(V) y MMAs(V), como los que no los contenían, fueron prácticamente idénticos.

Con esto es demostrada la factibilidad de realizar la separación de iAs en cartuchos de intercambio aniónico modificados con cloruro de plata (SAX-AgCl) y cuantificando el iAs mediante el método HG-MP-AES utilizando Te(IV) como estándar interno.

El siguiente paso en el desarrollo del procedimiento SPE-HG-MP-AES fue examinar la posibilidad de preconcentración de iAs (en forma de As(V)) en el

cartucho SAX-AgCl. Para ello, se preparó una serie de soluciones de As(V) que contenían la misma masa de As, pero en volúmenes diferentes. Se analizaron cuatro soluciones de As(V) a distintos volúmenes (8, 15, 25 y 50 mL) todas con 150 ng As como As(V), comparándose con un estándar de As(V) no ingresado en SAX-AgCl a $30 \mu\text{g L}^{-1}$, concentración calculada con base en el volumen final de 5 mL que se obtuvo eluyendo la fracción de As(V) y agregando reductor (KI) y el IS.

En la Tabla 4.13 se muestran los volúmenes y masas de As en este experimento, así como porcentajes de recuperación de iAs obtenidos en el procedimiento SPE-HG-MP-AES. Como se muestra en esta Tabla 4.13, la concentración determinada para cada una de las diluciones es muy cercana a la esperada, con porcentajes de recuperación de 90 a 111%.

Tabla 4.13: Volúmenes y concentraciones de As(V) introducidas en el cartucho SAX-AgCl, masa eluida y porcentajes de recuperación de As evaluados en el procedimiento SPE - HG-MP-AES.

Muestra (volumen)	Concentración inicial de As(V), $\mu\text{g As L}^{-1}$	ng de As iniciales	ng de As eluidos	Recuperación, %
8 mL	18.75	150	135	89.8
15 mL	10.00	150	160	107
25 mL	6.00	150	167	111
50 mL	3.00	150	146	97.4

En la Fig. 4.6 se muestran las señales de emisión de As adquiridas en el análisis HG-MP-AES de las fracciones del cartucho correspondientes a la elución de As(V) comparadas con la señal del estándar de As(V) que no fue ingresado en cartuchos SAX-AgCl. Como ya se mencionó antes, la concentración del estándar fue de $30 \mu\text{g As L}^{-1}$ y correspondió a la concentración esperada después de retención/elución del cartucho suponiendo recuperación completa de As(V) (Tabla 4.13).

Con este experimento se comprobó la factibilidad de la preconcentración de As(V) en el cartucho SAX-AgCl utilizando el volumen de muestra introducido hasta por lo menos 50 mL sin observar pérdida del analito. Esto representa una gran

ventaja en especial en muestras con bajas concentraciones de iAs, puesto que se puede ingresar un volumen grande y recuperar la totalidad del As(V) en las muestras. En este sentido, los extractos de As de tortillas, al tener concentraciones relativamente bajas de As podrán ser estudiadas de manera eficiente mediante el método SPE-HG-MP-AES, pudiéndose llevar a cabo extracciones con soluciones de hasta 50 mL para posteriormente preconcentrar el As y analizar mediante HG-MP-AES en una forma fácil y poco costosa en comparación con otros métodos.

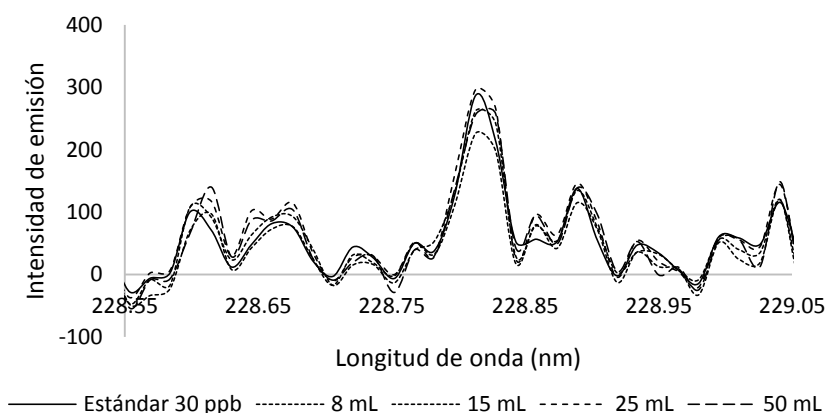


Fig. 4.6: Espectros de emisión de las muestras preconcentradas, comparadas con el espectro de emisión del estándar a $30 \mu\text{g L}^{-1}$, concentración a la cual se calculó que sería la elución de las muestras.

Para evaluar los alcances del procedimiento SPE - HG-MP-AES con Te(IV) como IS, se llevó a cabo el proceso de calibración de As(V) ingresando al cartucho 20 mL de cada solución. Las soluciones de calibración contenían 0; 6.0; 10; 30; 50 $\mu\text{g As L}^{-1}$ en forma de As(V) además de 5 $\mu\text{g As L}^{-1}$ en forma de DMAs(V) y MMAs(V). Se utilizaron bajas concentraciones de oAs ya que estas son especies minoritarias o inexistentes en extractos de tortilla. Los parámetros analíticos para iAs evaluados con base en este proceso de calibración se presentan en la Tabla 4.14, donde se observa muy buena linealidad, repetibilidad y el límite de cuantificación de $1.6 \mu\text{g As L}^{-1}$, totalmente adecuado para la cuantificación de iAs en tortillas (ver Tabla 4.2).

Tabla 4.14: Parámetros analíticos obtenidos para iAs en el procedimiento SPE - HG-MP-AES sin y con el uso de estándar interno (Te(IV)).

Parametro	Sin IS	Con IS
Intervalo de calibración	0; 6.0; 10; 30; 50 $\mu\text{g As L}^{-1}$ como As(V)	
Function de regression lineal	$\text{Int As}_{228.812\text{ nm}} = 7.60[\text{As}] - 3.38$	$\frac{\text{Int As}_{228.812\text{nm}}}{\text{Int Te}_{214.281\text{nm}}} = 1.52 \cdot 10^{-2}[\text{As}] - 3.54 \cdot 10^{-2}$
R ²	0.9952	0.9994
Error estándar pendiente	0.31	2.15×10^{-4}
Error estándar intercepto	16.5	1.16×10^{-2}
LOD, $\mu\text{g As L}^{-1}$	11.9	1.6
LOQ, $\mu\text{g As L}^{-1}$	39.3	5.1
CV, % (10 $\mu\text{g As L}^{-1}$, n=5)	5.94	2.56

4.6. Determinación de iAs en tortillas por el procedimiento propuesto y comparación de los resultados con los obtenidos mediante el método HPLC-ICP-MS.

Para verificar el funcionamiento del procedimiento en el análisis de muestras reales, se obtuvo el extracto de 2 g de material liofilizado correspondiente a las dos tortillas más contaminadas (Silao y León). La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en la parte experimental. En este análisis, se utilizó la columna rellena con SAX-AgCl y los resultados de determinación se presentan en la Tabla 4.15 junto con los obtenidos por HPLC - ICP-MS en las mismas muestras. Como se puede observar, la concordancia entre los valores obtenidos en dos procedimientos fue aceptable con resultados aproximadamente 10% más altos en el procedimiento propuesto respecto al método de referencia.

Tabla 4.15: Arsénico inorgánico determinado en dos tortillas mediante el procedimiento propuesto (SPE - HG-MP-AES) y método HPLC - ICP-MS. (se presentan concentraciones promedio \pm DE como $\mu\text{gAs kg}^{-1}$ de masa liofilizada, $n=3$; la recuperación se calculó comparándose con respecto a los resultados obtenidos mediante HPLC-ICP-MS).

Tortilla	SPE-HG-MP-AES		HPLC - ICP-MS		R, %
	iAs \pm SD	As(III) \pm SD	As(V) \pm SD	iAs	
Silao	219 \pm 24	154 \pm 9	41.1 \pm 1.2	195	112
León	87 \pm 11	25.8 \pm 0.7	51.3 \pm 1.1	77.1	113

En la siguiente etapa de trabajo, se intentó analizar los mismos extractos de tortilla en cartuchos SAX-AgCl, siguiendo el procedimiento establecido. En este caso, sin embargo, al ingresar la muestra se observó la coloración oscura de la resina y, además, la presencia de un precipitado negro en la solución saliente del cartucho. Este efecto fue atribuido a la presencia de agua oxigenada lo que provocó la formación del óxido de plata perdiéndose la modificación de resina. En el caso de la columna, la cantidad de la resina fue aproximadamente 8 veces mayor respecto al cartucho, por lo que la columna presentaba relativamente alta capacidad de retención de tal manera que una pérdida parcial de su modificación con AgCl no impidió la retención de arsénico y los resultados obtenidos en las seis primeras corridas fueron alentadores (Tabla 4.15). Tal como se esperaba, al abrir la columna de acero inoxidable se vio cerca de la entrada la coloración oscura de la resina debido a la formación del óxido de plata.

El uso de agua oxigenada ha sido reportado en los procedimientos de extracción de As con el fin de obtener iAs exclusivamente en forma de As(V) [93, 94]. Este mismo requerimiento aplica también al procedimiento SPE - MP-AES desarrollado en este trabajo, por lo que se realizaron varias pruebas tratando de eliminar el exceso de

H₂O₂ antes del ingreso de la muestra al cartucho. Los experimentos fueron los siguientes:

1. Aumentar tiempo de calentamiento de muestra en la etapa de extracción
2. Calentar el extracto (80 °C, 30 min) agregando trazas de Fe(III)
3. Irradiar el extracto con luz UV en presencia de trazas de Fe(III)
4. Agregar sulfito de plata al extracto antes del ajuste de pH (sin y con calentamiento, diferentes tiempos para completar la reacción)
5. Agregar sulfito de plata al extracto después de ajustar el pH 9 (sin y con calentamiento, diferentes tiempos para completar la reacción)
6. Todas las pruebas anteriores, utilizando 1% H₂O₂ en lugar de 3%.

En todos estos experimentos, ocurrió la pérdida de la modificación del cartucho impidiendo aplicación del procedimiento al análisis de iAs en tortillas. Cabe recordar que inicialmente se optó por utilizar la resina modificada debido a alta afinidad de compuestos de plata al iAs, esperando obtener un sistema estable y eficiente para la preconcentración selectiva de esta forma del elemento. En un trabajo futuro, se planea estudiar la retención/separación de especies de As en un cartucho de intercambio aniónico no modificado, adoptando el sistema reportado anteriormente [93, 94].

Capítulo V

Conclusiones

El presente trabajo de tesis ha sido enfocado en el desarrollo de un procedimiento analítico para la determinación de especies de arsénico en tortilla. La tortilla es un importante componente de la dieta mexicana y también es un producto cada vez más popular a nivel mundial. Los granos de maíz, de manera similar como otros cereales (arroz, trigo), acumulan arsénico principalmente en forma de especies inorgánicas (iAs), pero los datos sobre especiación de As en productos alimenticios derivados de maíz son escasos y en el caso de tortilla, inexistentes. Es por ello que en la primera parte de trabajo se adoptó un procedimiento analítico consistente de la separación de As(III), As(V), DMAs(V), MMAs(V) por cromatografía de intercambio aniónico y el sistema ICP-MS, con el fin de conocer la distribución y concentración de especies en una serie de tortillas adquiridas en los mercados locales. Los resultados obtenidos mostraron la presencia del arsénico total en el intervalo de concentraciones 21.8 - 192 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (masa liofilizada), de los cuales 72.3 - 98.0% correspondieron a As(III) + As(V).

Con base en los resultados del método HPLC - ICP-MS, quedó clara la necesidad de analizar arsénico inorgánico en tortillas, especialmente aquellas provenientes de regiones de México caracterizadas por altos niveles de As en el medio ambiente. Para cumplir con esta tarea, se ha propuesto un nuevo procedimiento analítico basado en la separación/preconcentración selectiva de iAs mediante extracción en fase sólida y determinación de As por el sistema de generación de hidruros con MP-AES. En este procedimiento, la extracción de As de tortilla y la parte de extracción en fase sólida se realizaron adoptando y refinando las condiciones reportadas anteriormente para otros tipos de muestras. La aportación novedosa consistió de:

1. Uso de la técnica MP-AES para la especiación de arsénico.
2. Generación de arsina para introducir la muestra después de SPE al sistema MP-AES para la cuantificación de As a nivel de ultra-trazas.
3. Uso de Te(IV) como estándar interno para reducir imprecisiones cometidas durante generación de arsina, su transporte al plasma, fluctuación del plasma y ruido instrumental.

4. Validación del procedimiento mediante comparación de los resultados con los obtenidos por HPLC – ICP-MS en las mismas muestras.

El procedimiento se realizó utilizando en la etapa de SPE, la resina SAX-AgCl empacada en una columna o en un cartucho. En la columna cabe aproximadamente 8 veces mayor cantidad de resina, por lo que se gastaban cantidades más grandes de las soluciones en la etapa de modificación, activación y regeneración respecto al cartucho; además fue necesario el uso de la bomba HPLC para mantener el flujo adecuado (3.5 mL/min). Por otra parte, con el cartucho, se podían procesar varias muestras de manera simultánea sin requerimiento del sistema HPLC y con un menor gasto en reactivos. Para ambos sistemas se demostró su factibilidad de separar/preconcentrar As(V) de manera selectiva. La introducción del eluato (con IS) a un sistema continuo, donde se realizó la reducción de As(V) a As(III), generación de arsina, su transporte al plasma y detección de As por MP-AES permitió la determinación de iAs a nivel de ultra-trazas. Se ha demostrado que el uso de Te(IV) como estándar interno resultó en una mejor linealidad de la función de calibración y mejor precisión de los resultados. El límite de detección instrumental del procedimiento es $0.9 \mu\text{g As L}^{-1}$, lo que correspondería a $2.25 \mu\text{g As kg}^{-1}$ de masa liofilizada de tortilla permitiendo cuantificación de iAs en todas muestras reales incluidas en estudio.

En el análisis de muestras reales, se presentó un problema provocado por la presencia del exceso de peróxido de hidrogeno, utilizado en la extracción de As de tortilla. Igual que en algunos trabajos reportados en literatura reciente, el agua oxigenada fue agregada para asegurar que todo iAs se extraiga en forma de As(V). A pesar de diferentes pruebas de eliminar dicho exceso, no se logró resolver el problema y, al poner en contacto el extracto de la muestra con la resina, la modificación con AgCl se perdía formando un precipitado oscuro del óxido de plata. Obviamente, el efecto fue mucho más pronunciado al utilizar cartuchos respecto a la columna, ya que la mayor cantidad de la resina en la columna le confería una mayor resistencia a la destrucción y mayor capacidad de retención en presencia de H_2O_2 como interferente. El mejor comportamiento de la columna respecto cartucho

quedo demostrado mediante el análisis de iAs en dos tortillas, obteniéndose relativamente buena concordancia de los resultados entre SPE(columna) - HG-MP-AES y HPLC - ICP-MS.

En un trabajo futuro es necesario afinar las condiciones de la extracción en fase sólida para evitar o eliminar deterioro de la resina modificada por el agua oxigenada.

Bibliografía

1. Gong, Z., et al., *Arsenic speciation analysis*. Elsevier. Talanta, 2002: p. 77-96.
2. Singh, R., et al., *Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015. **112**(0): p. 247-270.
3. Litter, M.I., M.A. Armienta, and S.S. Farías, *Iberoarsen. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*. 2009, Argentina: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).
4. Singh, R., et al., *Arsenic contamination, consequences ad remediation techniques: A review*. ELSEVIER. Ecotoxicology environmental safety, 2014: p. 247-270.
5. Bundschuh, J., A. Pérez Carrera, and M.I. Litter, *Iberoarsen. Distribución del arsénico en las regiones ibéricas e iberoamericana*. 2008, Argentina: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).
6. Tyson, J., *The determination of arsenic compounds: A critical review*. ISRN Anal Chem, 2013: p. Article ID 835371.
7. Goessler, W. and D. Kuehnelt, *Analytical methods for the determination of arsenic and arsenic compounds in the environment*, in *Environmental chemistry of arsenic*, W.T.J. Frankenberger, Editor. 2002, Marcel Dekker: New York, USA. p. 27-50.
8. Wilson, S.C., et al., *The chemistry and behaviour of antimony in the soil environment with comparisons to arsenic: A critical review*. ELSEVIER. Environmental pollution, 2009: p. 1169-1181.
9. Litter, M.I. and J. Bundschuh, *Iberoarsen. Situación del arsénico en la región de iberoamérica e iberoamericana. Posibles acciones articuladas e integradas para el abatimiento del arsénico en zonas aisladas*. 2010, Argentina: Ciencia y tecnología para el Desarrollo. (CYTED).
10. Tanoshima, M., T. Sakai, and E. McCurdy, *Arsenic speciation analysis in apple juice using HPLC-ICP-MS with the Agilent 8800 ICP-QQQ*. Agilent Technologies, 2012: p. 1-8.
11. Tyson, J., *The determination of arsenic compounds: A critical review*. Hindawi Publishing Corporation, 2013: p. 1-24.
12. Mañay N., R.M.M., *Toxicología ambiental y ocupacional*. Universidad de Carabobo, 2011: p. 279-298.
13. FSA. *European Commission proposed maximum limits for arsenic in foods for infants and young children*. 2015 [cited 2015 4/06]; Available from: <https://www.food.gov.uk/enforcement/regulation/europeleg/euupdates/january-update-maximum-limits-for-arsenic>.
14. Litter, M.I.A., M.A.; Farías, S.S., *Iberoarsen. Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos*. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), 2009.
15. Kannamkumarath, S.S., et al., *Speciation of Arsenic in Different Types of Nuts by Ion Chromatography–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. **52**(6): p. 1458-1463.
16. Benramdane, L., F. Bressolle, and J.J. Vallon, *Arsenic speciation in humans and food products: a review*. Journal of chromatographic science, 1999. **37**(9): p. 330-344.
17. Wrobel, K. and K. Wrobel, *Methodological aspects of speciation analysis in food products*, in *Handbook of Mineral Elements in food*, M. De la Guardia and S. Garrigues, Editors. 2015, John Wiley & Sons, Ltd.: Chichester, UK. p. 391-453.

18. Gonzalez, A., et al., *Non-chromatographic speciation*. *Trend Anal Chem*, 2010. **29**: p. 260-268.
19. Gong, Z., et al., *Arsenic speciation analysis*. *Talanta*, 2002. **58**(1): p. 77-96.
20. Leermakers, M., et al., *Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2006. **25**(1): p. 1-10.
21. Sharma, V.K. and M. Sohn, *Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation*. *Environment International*, 2009. **35**(4): p. 743-759.
22. Fritz, J.S.G., Douglas T., *Ion chromatography*. Fourth ed. Wiley-VCH. 2009. 377.
23. Costa-Fernández, J.M., et al., *Rapid simultaneous multielemental speciation by capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry Presented at the Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Fort Lauderdale, FL, USA, January 10–15, 2000*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000. **15**(9): p. 1063-1067.
24. Holak, W., *Gas-sampling technique for arsenic determination by atomic absorption spectrophotometry*. *Analytical chemistry*, 1969. **41**(12): p. 1712-1713.
25. Bouyssiere, B., J. Szpunar, and R. Lobinski, *Gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection in speciation analysis*. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2002. **57**(5): p. 805-828.
26. Kaise, T., et al., *Determination of inorganic arsenic and organic arsenic compounds in marine organisms by hydride generation/cold trap/gas chromatography—mass spectrometry*. *Applied Organometallic Chemistry*, 1988. **2**(4): p. 339-347.
27. Skoog, D.A.H., James F.; Nieman, Timothy A., *Principios de análisis instrumental*. Quinta edición ed. 1992.
28. Wall, S., *Lower operating costs, safer operation, Agilent 4100 MP-AES*. Agilent technologies. Application note, 2012.
29. Sigrist, M.E. and H.R. Beldoménico, *Determination of inorganic arsenic species by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry with variable sodium tetrahydroborate concentrations*. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2004. **59**(7): p. 1041-1045.
30. Csuros, M.C., Csaba, *Sampling and analysis for metals*. Lewis publishers, 2002.
31. Amaral, C.D.B., J.A. Nóbrega, and A.R.A. Nogueira, *Sample preparation for arsenic speciation in terrestrial plants—A review*. *Talanta*, 2013. **115**: p. 291-299.
32. Johnson, D.L., *Simultaneous determination of arsenate and phosphate in natural waters*. *Environmental Science & Technology*, 1971. **5**(5): p. 411-414.
33. Johnson, D.L. and M.E.Q. Pilon, *Spectrophotometric determination of arsenite, arsenate, and phosphate in natural waters*. *Analytica Chimica Acta*, 1972. **58**(2): p. 289-299.
34. Foster, A.L., et al., *Quantitative arsenic speciation in mine tailings using X-ray absorption spectroscopy*. *American Mineralogist*, 1998. **83**(5): p. 553-568.
35. Agilent, t., *MP-AES 4100 product description*. 2011: <http://www.chem.agilent.com/en-US/products-services/Instruments-Systems/Atomic-Spectroscopy/4100-MP-AES/Pages/default.aspx>.
36. Agilent, t., *Espectrómetro de emisión atómica de plasma por microondas Agilent 4100*. 2011.
37. Yoshida, Y., *Analysis of aluminium in beverages using the Agilent 4100 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer (MP-AES)*. 2013.
38. Hettipathirana, T., *Determination of metals in industrial wastewaters by microwave plasma-atomic emission spectrometer*, in *Agilent Technologies*. 2013.

39. Guerin, A., *Determination of exchangeable cations in soil extracts using the Agilent 4100 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer*. Agilent technologies. Application note, 2013.
40. Amais, R.S.D., George L.; Schiavo, Daniela; Nóbrega, Joaquim A., *Determination of silicon in diesel and biodiesel by Microwave Plasma -Atomic Emission Spectrometry*. Agilent technologies. Application note, 2012.
41. Wu, C.C., Yuhong; Ouyang, Kun; Zhang, Zhixu, *Analysis of Chinese herbal medicines by microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES)*. Agilent technologies. Application note, 2012.
42. Wu, C.C., Yuhong; Ouyang, Kun; Zhang, Zhixu, *Determination of chromium in pharmaceutical gelatin capsules using the Agilent 4100 MP-AES*. Agilent technologies. Application note, 2012.
43. Chen, Y.-W. and N. Belzile, *High performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry for the speciation of the hydride and chemical vapour-forming elements As, Se, Sb and Hg: A critical review*. Analytica Chimica Acta, 2010. **671**(1–2): p. 9-26.
44. Sanchez-Rodas, D., et al., *Atomic fluorescence spectrometry: a suitable detection technique in speciation studies for arsenic, selenium, antimony and mercury*. Journal of analytical atomic spectrometry, 2010. **25**(7): p. 933-946.
45. Hineman, A., *Determination of As, Se and Hg waters by hydride generation/cold vapor atomic absorption spectroscopy*. Perkin Elmer Inc. Application note, 2011.
46. Frankenberger, W.T.J., *Environmental chemistry of Arsenic*. Marcel Dekker Inc., 2002.
47. Carlsson, S., *Installation of a hydride generation system coupled to atomic absorption spectrometry in Vie teine, Laos PDR*. UMEA University, 2011.
48. Abdul-Majeed, W.S. and W.B. Zimmerman, *Computational Modelling of the Hydride Generation Reaction in a Tubular Reactor and Atomization in a Quartz Cell Atomizer*. 2012.
49. Nobbins, W.B., *Arsenic determination by hydride generation*. Agilent technologies. Application note, 2010.
50. Gao, Y., R. Liu, and L. Yang, *Application of chemical vapor generation in ICP-MS: A review*. Chinese Science Bulletin, 2013. **58**(17): p. 1980-1991.
51. Chen, M.-L., L.-Y. Ma, and X.-W. Chen, *New procedures for arsenic speciation: A review*. Talanta, 2014. **125**(0): p. 78-86.
52. Anderson, R.K., M. Thompson, and E. Culbard, *Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. Part I. Reaction media*. Analyst, 1986. **111**(10): p. 1143-1152.
53. García-Salgado, S., M.A. Quijano, and M.M. Bonilla, *Arsenic speciation in edible alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2012. **714**(0): p. 38-46.
54. Tuzen, M., et al., *Selective speciation and determination of inorganic arsenic in water, food and biological samples*. Food and Chemical Toxicology, 2010. **48**(1): p. 41-46.
55. Cabon, J.Y. and N. Cabon, *Determination of arsenic species in seawater by flow injection hydride generation in situ collection followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry: Stability of As(III)*. Analytica Chimica Acta, 2000. **418**(1): p. 19-31.
56. García Sartal, C., M.d.C. Barciela-Alonso, and P. Bermejo-Barrera, *Effect of the cooking procedure on the arsenic speciation in the bioavailable (dialyzable) fraction from seaweed*. Microchemical Journal, 2012. **105**(0): p. 65-71.
57. Rasmussen, R.R., et al., *Development and validation of an SPE HG-AAS method for determination of inorganic arsenic in samples of marine origin*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2012. **403**(10): p. 2825-2834.

58. ŠLEJKOVEC, Z.S.V.F., I; TUŠEK-ŽNIDARIČ, M; MAZEJ, D.; JAČIMOVIĆ, R.O; ŠČANČAR, J.,; VAN ELTEREN, J.T.,; FARINHA, MANUEL; WORONIECKA, U.D.; WOLTERBEEK, H.T.H., *ARSENIC SPECIATION USING HPLC-HGAFS OR SELECTIVE COPRECIPITATION COMBINED WITH FI-HGAFS OR INAA*. International Atomic Energy Agency, 2004.
59. Tyburska, A., K. Jankowski, and A. Rodzik, *Determination of arsenic and selenium by hydride generation and headspace solid phase microextraction coupled with optical emission spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2011. **66**(7): p. 517-521.
60. Campbell, A.D., *A critical survey of hydride generation techniques in atomic spectroscopy (Technical Report)*. Pure and applied chemistry, 1992. **64**(2): p. 227-244.
61. Anderson, R.K., M. Thompson, and E. Culbard, *Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. Part II. Validation of methods for application to natural waters*. Analyst, 1986. **111**(10): p. 1153-1158.
62. Cui, J., et al., *Speciation of Organoarsenic Species in Food of Animal Origin Using Accelerated Solvent Extraction (ASE) with Determination by HPLC-Hydride Generation-Atomic Fluorescence Spectrometry (HG-AFS)*. Food Analytical Methods, 2013. **6**(2): p. 370-379.
63. Pohl, P., et al., *Chemical-vapor generation of transition metals through the reaction with tetrahydroborate in recent achievements in analytical atomic spectrometry*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **59**(0): p. 144-155.
64. Ramesh Kumar, A. and P. Riyazuddin, *Non-chromatographic hydride generation atomic spectrometric techniques for the speciation analysis of arsenic, antimony, selenium, and tellurium in water samples—a review*. International Journal of Environmental and Analytical Chemistry, 2007. **87**(7): p. 469-500.
65. Zhang, Y., et al., *Liquid chromatography–hydride generation–atomic fluorescence spectrometry determination of arsenic species in dog plasma and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Realgar and Niu Huang Jie Du Pian*. Journal of Chromatography B, 2013. **917–918**(0): p. 93-99.
66. Hernández-Hernández, L.G.-P., Claudio, *Introducción al análisis instrumental*, ed. A. Ciencia. 2002.
67. Harris, D.C., *Quantitative chemical analysis*. Eighth ed, ed. W.H.F.a. Company. 2010.
68. Skoog, D.A.W., Donald M.; Holler, F. James; Crouch, Stanley R., *Fundamentals of analytical chemistry*. Ninth ed, ed. B.C.C. Learning. 2014.
69. Authority, E.F.S., *Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population*. EFSA Journal, 2014. **12**(3): p. 1-68.
70. Nuss, E.T. and S.A. Tanumihardjo, *Maize: A paramount staple crop in the context of global nutrition*. Comp Rev Food ScinFood Safe, 2010. **9**: p. 417-436.
71. Carey, A.M., et al., *A review of recent developments in the speciation and location of arsenic and selenium in rice grain*. Anal Bioanal Chem, 2012. **402**(10): p. 3275-86.
72. Rosas-Castor, J.M., et al., *Evaluation of the transfer of soil arsenic to maize crops in suburban areas of San Luis Potosí, Mexico*. Sci Tot Environ, 2014. **497–498**: p. 153-162.
73. Rosas-Castor, J.M., et al., *Arsenic accumulation in maize crop (Zea mays): A review*. Sci Tot Environ, 2014. **488–489**: p. 176-187.
74. Williams, P.N., et al., *Increase in rice grain arsenic for regions of Bangladesh irrigating paddies with elevated arsenic in groundwaters*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(16): p. 4903-4908.
75. Ma, J.F., et al., *Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 9931-9935.
76. Zhao, F.J., et al., *Accumulation, distribution, and speciation of arsenic in wheat grain*. Environ Sci Technol, 2010. **44**(14): p. 5464-5468.

77. Horner, N.S. and D. Beauchemin, *The effect of cooking and washing rice on the bioaccessibility of As, Cu, Fe, V and Zn using an on-line continuous leaching method*. Anal Chim Acta, 2013. **758**: p. 28-35.
78. Signes-Pastor, A.J., et al., *Arsenic bioaccessibility in cooked rice as affected by arsenic in cooking water*. J Food Sci, 2012. **77**: p. T201-T206.
79. Raber, G., et al., *An improved HPLC–ICPMS method for determining inorganic arsenic in food: Application to rice, wheat and tuna fish*. Food Chem, 2012. **134**: p. 524-532.
80. de la Calle, M.B., et al., *Is it possible to agree on a value for inorganic arsenic in food? The outcome of IMEP-112*. Anal Bioanal Chem, 2012. **404**(8): p. 2475-88.
81. D’Amato, M., et al., *Arsenic speciation in wheat and wheat products using ultrasound- and microwave-assisted extraction and anion exchange chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. J Anal At Spectrom, 2011. **26**: p. 207-213.
82. Diaz, O.P., et al., *Contribution of water, bread, and vegetables (raw and cooked) to dietary intake of inorganic arsenic in a rural village of Northern Chile*. J Agric Food Chem, 2004. **52**: p. 1773-1779.
83. Garcia-Rico, L., et al., *Content of selenium, total and inorganic arsenic and bioaccessibility of arsenic in children diets of Mexico*. J Sci Food Agric, 2012. **92**(8): p. 1725-1731.
84. Rooney, L.W. and S.O. Serna-Saldivar, *Food uses of whole corn and dry milled fractions, in Corn: chemistry and technology*, S.A. Watson and P.E. Ramsted, Editors. 1987, Am Assoc Cereal Chem: St. Paul, Minn. p. 399-429.
85. Wrobel, K., G.R. Valtierra Marquez, and M.L. Rodriguez Almanza, *Studies on bioavailability of some bulk and trace elements in Mexican tortilla using an in vitro model*. Biol Trace Elem Res, 1999. **68**(2): p. 97-106.
86. Maher, W., et al., *Measurement of inorganic arsenic species in rice after nitric acid extraction by HPLC-ICPMS: Verification using XANES*. Environ Sci Technol, 2013. **47**: p. 5821–5827.
87. Huang, J.H., G. Ilgen, and P. Fecher, *Quantitative chemical extraction for arsenic speciation in rice grains*. J Anal At Spectrom, 2010. **25**: p. 800-802.
88. Issa, N.B., et al., *Separation and determination of arsenic species in water by selective exchange and hybrid resins*. Anal Chim Acta, 2011. **706**: p. 191– 198.
89. Yang, G., et al., *Soil-to-crop transfer factors of tellurium*. Chemosphere, 2014. **111**: p. 554-559.
90. Issa, N.B., et al., *Separation and determination of arsenic species in water by selective exchange and hybrid resins*. Analytica chimica acta, 2011. **706**(1): p. 191-198.
91. Amaral, C.D.B., J.A. Nóbrega, and A.R.A. Nogueira, *Sample preparation for arsenic speciation in terrestrial plants - A review*. Talanta, 2013. **115**: p. 291-299.
92. Narukawa, T., A. Hioki, and K. Chiba, *Speciation and monitoring test for inorganic arsenic in white rice flour*. J Agric Food Chem, 2012. **60**: p. 1122-1127.
93. Rasmussen, R.R., et al., *Development and validation of an SPE HG-AAS method for determination of inorganic arsenic in samples of marine origin*. Anal Bioanal Chem, 2012. **403**: p. 2825-2834.
94. Rasmussen, R.R., Y. Qian, and J.J. Sloth, *SPE HG-AAS method for the determination of inorganic arsenic in rice—results from method validation studies and a survey on rice products*. Anal Bioanal Chem, 2013. **405**: p. 7851–7857.