



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

 **FCEN**
FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES
Naturaleza - Ciencia - Humanismo

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO

**“DESARROLLO DE MÉTODOS SEPARATIVOS Y
DETERMINATIVOS PARA EL ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN
DE ARSÉNICO Y SELENIO EN ALIMENTOS Y BEBIDAS
ASISTIDOS POR LÍQUIDOS IÓNICOS Y TÉCNICAS
INSTRUMENTALES HÍBRIDAS”**

Presentado por:

EMILIANO FRANCO FIORENTINI

Para optar al título de:

LICENCIADO EN CIENCIAS BÁSICAS CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA

Director:

Dr. RODOLFO G. WUILLOUD

Co-Director:

Qco. ALEXANDER CASTRO GRIJALBA

Mendoza - 2017

PRÓLOGO

El conocimiento de las diferentes formas químicas, es decir, las especies, en las que un elemento se puede hallar en los alimentos, así como la estabilidad y cinética de disociación, son de importancia primaria debido a sus diferentes grados de toxicidad, biodisponibilidad, bioacumulación y movilidad. Por lo tanto, el análisis de especiación elemental es fundamental para evaluar de forma correcta el riesgo de exposición a elementos tóxicos, como el arsénico (As) ó establecer requerimientos nutricionales de elementos esenciales, como el selenio (Se). En dicho contexto, el desarrollo de nuevas metodologías analíticas resulta de gran relevancia para poder realizar los estudios de especiación elemental.

En las últimas décadas se ha observado un crecimiento en el desarrollo de métodos destinados al análisis de especiación elemental, basadas en técnicas instrumentales híbridas que involucran el acoplamiento de técnicas separativas instrumentales (Ej. cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de gases y electroforesis capilar) a detectores fundamentados en espectrometrías atómicas (Ej. generación de hidruros acoplada a espectrometría de fluorescencia atómica (HG-AFS)). Sin embargo, se presenta un importante desafío analítico cuando se trata de elementos traza o ultratrazas, que está dado por las bajas concentraciones en que algunos elementos tóxicos y/o esenciales se encuentran en los alimentos, requiriéndose métodos con alta capacidad de separación y sensibilidad, que a la vez permitan la determinación exacta de las numerosas especies químicas. De este modo, el análisis de especiación requiere de técnicas separativas de alto rendimiento que permitan obtener una alta capacidad resolutive de la mezcla de las especies químicas. En el caso de las especies de As y Se, las separaciones cromatográficas se han realizado mediante intercambio aniónico, mientras que la separación por cromatografía de fase reversa (RP) ha sido escasamente explorada. Una alternativa a considerar en RP-HPLC, es la separación de las especies mediante la adición de diferentes reactivos formadores de pares iónicos en las fases móviles, siendo los líquidos iónicos (ILs) una alternativa muy interesante por sus propiedades, pero que ha sido realmente poco explorada para dichas aplicaciones.

La presente tesis de grado tiene como propuesta central el desarrollo de metodologías analíticas de alto rendimiento de separación y sensibilidad, utilizando técnicas instrumentales híbridas (HPLC-HG-AFS) para la determinación de especies de As y Se en muestras con alta complejidad matricial, tales como las que plantean alimentos y bebidas. Se presenta la realización de un estudio comprensivo acerca del rol de diversos ILs como aditivos de fases móviles en HPLC para la separación de

especies de As y Se, seguido de la posterior detección mediante HG-AFS. Se demuestra también, la aplicación de los métodos desarrollados para el análisis de especiación de As y Se en muestras de gran relevancia para el desarrollo económico y productivo de la región de Mendoza, constituyéndose en tecnologías aliadas para favorecer la productividad de laboratorios analíticos de control de calidad.

El desarrollo de la presente tesina de investigación y desarrollo ha dado origen a la publicación de un trabajo de investigación en una revista de prestigio internacional y otro en vías de publicación:

- Alexander Castro Grijalba, Emiliano F. Fiorentini, Luis D. Martinez, Rodolfo G. Wuilloud, **“A comparative evaluation of different ionic liquids for arsenic species separation and determination in wine varieties by liquid chromatography – hydride generation atomic fluorescence spectrometry”**. *Journal of Chromatography A* 1462 (2016) 44-54. ISSN: 0021-9673.

- Alexander Castro Grijalba, Emiliano F. Fiorentini, Rodolfo G. Wuilloud, **“A comparative study of different ionic liquids for selenium speciation analysis in food samples by liquid chromatography coupled to hydride-generation atomic fluorescence spectrometry”**. *Journal of Chromatography A* (2016). ISSN: 0021-9673 (enviado).

Y la presentación inminente de dos trabajos en un congreso internacional:

- **“Ionic liquids as mobile phase modifiers for the separation of arsenic species in wine by liquid chromatography coupled to atomic fluorescence detection”**. **Congreso:** 5th Iberoamerican Meeting on Ionic Liquids (IMIL 2017). Santos, Sao Paulo, Brasil, 2017. **Autores:** Alexander Castro Grijalba, Emiliano F. Fiorentini, Rodolfo G. Wuilloud. **Modalidad:** Ponencia oral.

- **“Separation and determination of selenium species in food and beverages by ionic liquid-assisted reversed-phase liquid chromatography”**. **Congreso:** 5th Iberoamerican Meeting on Ionic Liquids (IMIL 2017). Santos, Sao Paulo, Brasil, 2017. **Autores:** Alexander Castro Grijalba, Emiliano F. Fiorentini, Rodolfo G. Wuilloud. **Modalidad:** Poster.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

	Pág.	
1.1	ARSÉNICO	1
1.1.1	Ocurrencia y obtención	1
1.1.2	Principales usos	1
1.1.3	Propiedades físicas y químicas	2
1.1.4	Especiación de Arsénico	3
1.1.5	Toxicología	4
1.1.5.1	Fase de exposición	4
1.1.5.2	Fase toxicocinética	5
1.1.5.3	Fase toxicodinámica	5
1.1.5.4	Efectos tóxicos	6
1.1.5.5	Tratamiento de la intoxicación	6
1.1.6	Especiación de Arsénico en vinos	6
1.1.7	Referencias bibliográficas	10
1.2	SELENIO	14
1.2.1	Ocurrencia y obtención	14
1.2.2	Principales usos	14
1.2.3	Propiedades físicas y químicas	15
1.2.4	Especies de Selenio	16
1.2.5	Toxicología	17
1.2.5.1	Fase de exposición	17
1.2.5.2	Fase toxicocinética	18
1.2.5.3	Fase toxicodinámica	18
1.2.5.4	Efectos tóxicos	19
1.2.5.5	Tratamiento de la intoxicación	20
1.2.6	Selenio en alimentos	20
1.2.7	Especiación de Selenio	21
1.2.8	Referencias bibliográficas	23

1.3	ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN ELEMENTAL	27
1.3.1	Introducción	27
1.3.2	Proceso analítico total en el análisis de especiación	28
1.3.2.1	Muestreo	28
1.3.2.2	Procesamiento y almacenamiento de las muestras	29
1.3.2.3	Técnicas de preparación de muestras	30
1.3.3	Metodologías para el análisis de especiación	31
1.3.3.1	Técnicas separativas	32
1.3.3.2	Detectores elementales específicos	33
1.3.4	Interfase de fotodisociación y digestión ultravioleta	35
1.3.5	Referencias bibliográficas	36
1.4	LÍQUIDOS IÓNICOS	38
1.4.1	Definición y composición química	38
1.4.2	Propiedades de los líquidos iónicos	39
1.4.3	Ventajas de los líquidos iónicos frente a solventes orgánicos convencionales	41
1.4.4	Síntesis	41
1.4.4.1	Reacciones de cuaternización	42
1.4.4.2	Reacciones de intercambio aniónico	43
1.4.5	Aplicación de líquidos iónicos a cromatografía líquida	44
1.4.6	Referencias bibliográficas	45
1.5	DISEÑO EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN DE MÚLTIPLES RESPUESTAS	47
1.5.1	Introducción	47
1.5.2	Metodología del diseño experimental	47
1.5.2.1	Planteamiento del problema	48
1.5.2.2	Selección de las variables de respuesta	48
1.5.2.3	Selección de los factores y sus niveles	49
1.5.2.4	Selección de un diseño experimental	49
1.5.3	Diseños	49

1.5.3.1	Diseños de screening	49
1.5.3.2	Diseños de optimización	51
1.5.4	Modelado	52
1.5.4.1	Construcción de modelos para el screening	52
1.5.4.2	Construcción de modelos de superficies de respuesta	52
1.5.4.3	Evaluación del modelo	53
1.5.4.4	Transformación de la respuesta	54
1.5.4.5	Evaluación de los coeficientes individuales en los modelos	55
1.5.4.6	Localización óptima	56
1.5.5	Optimización de múltiples respuestas	56
1.5.5.1	Optimización gráfica	57
1.5.5.2	Función de deseabilidad	57
1.5.6	Aplicación a separaciones analíticas	58
1.5.7	Referencias bibliográficas	59

CAPÍTULO 2 REACTIVOS, MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	REACTIVOS	61
2.1.1	Agua ultrapura	61
2.1.2	Preparación de soluciones patrón	61
2.1.3	Preparación de soluciones concentradas	63
2.1.4	Líquidos iónicos	64
2.1.5	Preparación de fases móviles	65
2.1.6	Reactivos generales	65
2.1.7	Referencias bibliográficas	66
2.2	INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES	66
2.2.1	Cromatógrafo de líquidos de alto rendimiento	66
2.2.2	Espectrómetro de fluorescencia atómica	67
2.2.3	pH-metro	68
2.2.4	Unidad de ultrasonido	68

2.2.5	Micropipetas	68
2.2.6	Material de vidrio	68
2.3	MÉTODOS	69
2.3.1	Recolección y pretratamiento de muestras	69
2.3.2	Determinación total de arsénico y selenio por espectrometría de fluorescencia atómica con generación de hidruros	69
2.3.3	Especiación de arsénico y selenio por cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por espectrometría de fluorescencia atómica	71

CAPÍTULO 3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1	Análisis de especiación de Arsénico en muestras de vino mediante cromatografía líquida de alto rendimiento asistida por líquidos iónicos y detección por espectrometría de fluorescencia atómica	74
3.1.1	Introducción	74
3.1.2	Efecto de diferentes líquidos iónicos sobre la detección de especies de Arsénico por HG-AFS	76
3.1.3	Optimización de los parámetros cromatográficos para la separación de las especies de As	79
3.1.3.1	Efecto del pH sobre la separación de especies de Arsénico	79
3.1.3.2	Evaluación de diferentes líquidos iónicos para la separación de especies de Arsénico	82
3.1.3.3	Influencia del tipo y concentración de buffer	86
3.1.3.4	Efecto del metanol y caudal de la fase móvil	91
3.1.4	Optimización multivariada de las condiciones de detección HG-AFS	93
3.1.5	Rendimiento analítico y parámetros cromatográficos	98
3.1.6	Determinación de especies de Arsénico en diferentes tipos	100

	de vinos	
3.1.7	Referencias bibliográficas	106
3.2	Análisis de especiación de Selenio en alimentos y bebidas mediante cromatografía líquida de alto rendimiento asistida por líquidos iónicos y detección por espectrometría de fluorescencia atómica	109
3.2.1	Introducción	109
3.2.2	Efecto de los líquidos iónicos sobre la detección de especies de Selenio por la técnica HG-AFS	111
3.2.3	Optimización de los parámetros cromatográficos para la separación de especies de Selenio	113
3.2.3.1	Efecto del pH sobre la separación de las especies de Selenio	113
3.2.3.2	Efecto de la concentración de buffer y caudal de la fase móvil	115
3.2.3.3	Evaluación de diferentes líquidos iónicos para la separación de las especies de Se	118
3.2.4	Optimización multivariada de las condiciones de detección de las especies de Se con la técnica HG-AFS	121
3.2.5	Rendimiento analítico del método desarrollado	126
3.2.6	Análisis de especiación de Se en muestras de alimentos y bebidas	127
3.2.7	Referencias bibliográficas	132
 CAPÍTULO 4		
	CONCLUSIONES	135

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 ARSÉNICO

1.1.1 Ocurrencia y obtención

El As está muy distribuido en el medio ambiente, su concentración promedio en la corteza terrestre es de aproximadamente $3,4 \text{ mg kg}^{-1}$. Se lo encuentra principalmente como arseniato, en asociación con sulfuros y en varios minerales [1].

El As puede obtenerse a partir de la arsenopirita. El procedimiento de obtención consiste en someter el mineral a calentamiento al vacío, permitiendo la sublimación del As y la deposición de residuo sólido de sulfuro ferroso. Sin embargo, la mayoría del As se comercializa bajo la forma de óxido. En el proceso de fusión de minerales de Cu, Pb, Au y Co se obtiene óxido arsenioso, el cual se volatiliza y es arrastrado por los gases de la chimenea, luego estos gases se refinan, mezclándolos con pequeñas cantidades de galena o pirita para evitar la formación de arsenito y por tostación se obtiene óxido arsenioso con una pureza de alrededor del 95%, mientras que por sublimaciones sucesivas puede llegar a alcanzar un valor del 99% [2].

1.1.2 Principales usos

El As inorgánico ha sido utilizado en la producción de insecticidas (arseniato de plomo) y herbicidas (arsenito de potasio), actualmente prohibidos por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). Los compuestos arsenicales orgánicos han reemplazado, en la mayoría de los casos, a los inorgánicos como agentes herbicidas, plaguicidas y para fines sanitarios o de uso domiciliario, los cuales son aplicados en menores proporciones, por lo que se disminuyen parcialmente los problemas de acumulación de As en suelos agrícolas [3]. Las formas orgánicas de As también se emplean en la producción avícola, a través del agregado de fenilderivados de As en piensos, por su acción antimicrobiana. Estos compuestos actúan también como promotores del crecimiento, aumentando la absorción de alimentos, mejorando el plumaje de las aves, la pigmentación e incrementando la producción de huevos.

El As inorgánico se utiliza como preservante de maderas (como arsenito de cobre y cromo), en aleaciones con Pb para la fabricación de perdigones, como semiconductor para circuitos integrados (arseniuro de galio) y en la construcción de diodos de láser y LED. Se aplica como pigmento para pinturas y fuegos artificiales (sulfuro de arsénico) y como decolorante en la fabricación del vidrio (óxido arsenioso) al eliminar el color verde que producen las impurezas de Fe. El As también ha encontrado aplicaciones con fines terapéuticos [4].

1.1.3 Propiedades físicas y químicas

El As es un elemento del Grupo 15 (VA) de la tabla periódica y su configuración electrónica es $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^3$. Cuando está formando compuestos, el As existe bajo los estados de oxidación -III, +III y +V. Se lo clasifica como un metaloide, debido a que presenta propiedades tanto metálicas como no metálicas. Frecuentemente se refiere al As como un metal pero en realidad es un metaloide. En la Tabla 1.1.1 se resumen algunas propiedades del elemento.

Tabla 1.1.1 Propiedades del Arsénico.

Propiedad	Valor
Número atómico	33
Masa atómica relativa ($^{12}\text{C}=12,000$)	74,92
Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	614
Punto de ebullición ($^{\circ}\text{C}$)	817
Densidad (g mL^{-1})	5,72
Radio iónico (\AA)	0,47
Radio atómico (\AA)	1,21
Radio covalente (\AA)	1,19
Conductividad eléctrica ($\text{m}^{-1} \Omega^{-1}$)	$3,45 \times 10^6$
Conductividad térmica ($\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$)	50

El As se presenta en tres estados alotrópicos. El As gris (forma α) es estable en condiciones normales, tiene estructura romboédrica, buen conductor del calor pero pobre conductor de la electricidad, es deleznable y pierde el lustre metálico expuesto al aire. El As amarillo (forma γ) es volátil, presenta fosforescencia a temperatura ambiente y expuesto a la luz o al calor se revierte a la forma α . El As negro (forma β) tiene estructura hexagonal y propiedades intermedias entre las formas α y γ [5].

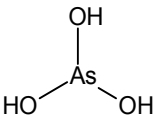
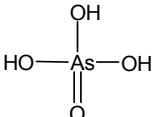
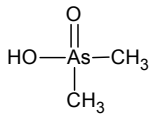
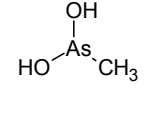
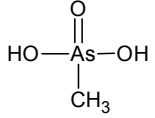
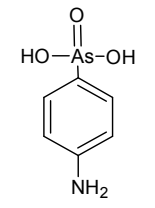
El As presenta un isótopo natural y estable (^{75}As) que se encuentra en un 100% de abundancia. Posee 32 isótopos inestables, cuyo tiempo de vida media oscila entre 0,09 segundos para el caso de ^{66}As y 80,3 días para ^{73}As . El ^{74}As es un radioisótopo utilizado en la localización de tumores cerebrales [6].

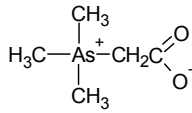
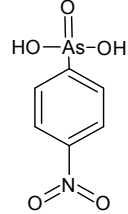
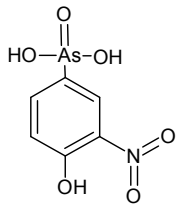
1.1.4 Especies de Arsénico

La relación carga/radio del catión pentavalente sería tan alta que no es posible su existencia como tal en un medio acuoso, es por ello que el As(V) se presenta como anión arseniato, protonado en mayor o menor medida, mientras que As(III) se presenta como ácido arsenioso (H_3AsO_3) y sus correspondientes derivados proteolíticos, dependiendo del pH. El estado de oxidación del As determina su movilidad en diferentes medios y está controlado fundamentalmente por las condiciones redox y el pH [7].

Los compuestos orgánicos arsenicales contienen As unido a un átomo de carbono por medio de uniones covalentes. El As puede estar en su forma trivalente o pentavalente. En la Tabla 1.1.2 se resumen las principales especies arsenicales y algunas de sus propiedades.

Tabla 1.1.2 Propiedades de las especies de As más comunes.

Compuesto	Composición elemental	Estructura	Peso molecular	Ref.
Ácido arsenioso	H_3AsO_3		125,94	[7]
Ácido arsénico	H_3AsO_4		141,94	[7]
Ácido dimetilarsónico (DMA)	$C_2H_7AsO_2$		137,99	[7]
Ácido monometilarsénico	CH_5AsO_2		123,97	[8]
Ácido monometilarsónico (MMA)	CH_5AsO_3		39,97	[8]
Ácido p-arsanílico	$C_6H_8NO_3As$		217,05	[9]

Arsenobetaina	$C_5H_{11}AsO_2$		178,06	[10]
Nitarsona	$C_6H_6NO_5As$		247,03	[11]
Roxarsona	$C_6H_6NO_6As$		263,03	[9]

1.1.5 Toxicología

La toxicidad relativa de los compuestos de As depende de su forma (orgánica o inorgánica), valencia, solubilidad, estado físico, pureza, tasas de absorción y de eliminación. El As inorgánico es más tóxico que el orgánico. Los arsenitos y arseniatos son altamente solubles en agua. Algunos derivados del As que contienen grupos metilo o fenilo, causan preocupación por efectos que producen sobre la salud de animales en experimentación [12].

1.1.5.1 Fase de exposición

El organismo humano puede estar expuesto al As a través del agua, aire y alimentos. En el caso del agua contaminada, puede producirse la exposición por consumo directo de la misma, por su uso en la preparación de comidas, en procesos de riego de cultivos y procesos industriales. Las concentraciones de As en el agua son usualmente menores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$, aunque en sitios cercanos a minas los niveles son de entre 200 y $1000 \mu\text{g L}^{-1}$. Las concentraciones de As en el aire en sitios alejados de las actividades antropogénicas son de 1×10^{-3} a $3 \times 10^{-3} \text{ ng L}^{-1}$ mientras que en zonas industriales pueden alcanzar valores hasta cien veces mayores [13].

El principal aporte de As a la dieta son alimentos de origen marino, peces y crustáceos, que poseen concentraciones elevadas de As, de hasta $90 \mu\text{g g}^{-1}$. Pero se presentan formas orgánicas de As que al ser menos tóxicas que las formas inorgánicas, disminuyen el riesgo de toxicidad. En otro tipo de alimentos (hierbas para infusiones, vegetales, semillas, carnes) las concentraciones generalmente son más bajas y las especies no siempre son conocidas. Las personas que fuman tabaco

pueden estar expuestas a As inorgánico, ya que las plantas de tabaco absorben el As presente de forma natural en el suelo [14].

1.1.5.2 Fase toxicocinética

La absorción de As puede producirse en el tracto gastrointestinal, por vía respiratoria y en menor proporción por vía dérmica. La absorción por vía respiratoria dependerá del tamaño de las partículas inhaladas, de su solubilidad y de la estructura química del compuesto.

El As se distribuye fácilmente por todo el cuerpo, a través de la formación del complejo α -globulina-As. Se acumula principalmente en el hígado, riñón, pulmón y bazo, y en menor proporción en tracto digestivo, huesos y piel. El As inorgánico insoluble inhalado es depositado y retenido en el tejido pulmonar durante un tiempo relativamente largo. Otros experimentos con animales indican la acumulación de arsenobetaina en cartílago, testículos, epidídimo y músculos [15].

El metabolismo del As se realiza predominantemente en el hígado, se propone que intervienen dos procesos. Un primer proceso relacionado con la reducción del As(V) a As(III) y segundo proceso asociado a reacciones de metilación oxidativa. En un primer paso de metilación se obtiene el ácido monometilarseniato (MMA) y con una segunda metilación, se produce el ácido dimetilarseniato (DMA). Se ha propuesto al glutatión reducido (GSH) como agente reductor y transportador del As, y a la S-adenosilmetionina como donante de grupos metilo. La capacidad de metilación del As puede estar influida por la dosis, el tiempo de exposición, una dieta rica en metionina y el probable polimorfismo genético de las enzimas involucradas en la metilación.

La principal ruta de excreción del As es a través del riñón, un 50-70% como DMA, un 10% como MMA y un 20% como As sin metilar. Estas proporciones pueden variar según la forma química, el tiempo de exposición, la dosis y la especie animal expuesta [16].

1.1.5.3 Fase toxicodinámica

Los compuestos arsenicales trivalentes tienen gran afinidad por los grupos sulfhidrilos de las proteínas. El As(III) es una especie tóxica protoplasmática que inhibe a varias enzimas, especialmente las del metabolismo y las de la respiración. Mientras que As(V) es capaz de sustituir al grupo fosfato en las reacciones que son catalizadas enzimáticamente, afectando procesos como la producción de adenosintrifosfato (ATP) y la síntesis de ADN [16].

1.1.5.4 Efectos tóxicos

Los síntomas que se presentan en una intoxicación aguda por As están asociados a alteraciones gastrointestinales, cardiovasculares, nerviosas, renales y hepáticas. Los síntomas incluyen vómitos, dolor abdominal, diarrea, entumecimiento u hormigueo en las manos y pies, calambres musculares y alteraciones del sistema circulatorio. Se producen alteraciones hematológicas caracterizadas por anemias y leucopenia. En casos extremos se da la muerte.

Los síntomas de la exposición prolongada a altos niveles de As inorgánico se observan primero en la piel, incluyen cambios de pigmentación, lesiones cutáneas, durezas y callosidades en las palmas de las manos y las plantas de los pies (hiperqueratosis). Aparecen también problemas relacionados con el desarrollo, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Además de cáncer de piel, la exposición prolongada al As puede causar cáncer de vejiga y de pulmón [16].

Se ha observado la enfermedad conocida como “Pie Negro” o HACRE (Hidroarsenismo Crónico Regional Endémico), cuando la ingesta diaria de As inorgánico se encuentra entre 10 y 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal. Se manifiesta a través de problemas vasculares, que derivan en algunos casos en necrosis y gangrena en manos y pies. La enfermedad se desarrolla progresivamente, comprometiendo diversos órganos y sistemas, principalmente la piel. Una de las complicaciones más importantes es el desarrollo de neoplasias, principalmente tumores cutáneos [14].

La teratogenicidad del As ha sido demostrada en ratas, causando malformaciones encefálicas, defectos oculares, agenesia renal y gonadal. La IARC ha clasificado al As y sus compuestos como cancerígenos para los seres humanos. El As inorgánico ha sido clasificado dentro del grupo A (con suficiente evidencia en humanos) [14].

1.1.5.5 Tratamiento por intoxicación

Según la gravedad de cada caso, se puede recurrir a estabilización hemodinámica del paciente, lavado gástrico utilizando carbón activado u optarse por el uso de quelantes, como ácido dimercaptosuccínico o D-penicilamina [14].

1.1.6 Especiación de Arsénico en vinos

El As puede estar presente en bebidas alcohólicas, como el vino, debido al uso de herbicidas o insecticidas que contaminan a las plantas de la vid. Otras fuentes potenciales de contaminación pueden ser el tipo de suelo, la calidad del agua utilizada

para el riego y los procedimientos aplicados durante la elaboración del vino, es decir, la recolección, trituración, prensado, fermentación, purificación y condiciones de conservación del producto final [17]. El vino es una bebida alcohólica de gran valor social y económico a nivel mundial. De hecho, la producción y el consumo de vino se ha estimado en más de 20.000 millones de litros al año según la OIV (Oficina Internacional de la Viña y el Vino), que señala la importancia de este producto.

Desde el punto de vista químico, el vino es una solución de agua-etanol que contiene una gran variedad de productos orgánicos y sustancias inorgánicas [18, 19]. Las sustancias orgánicas en el vino se pueden dividir en dos grupos: volátiles y no volátiles. Entre las volátiles, el etanol es el compuesto más abundante que oscila entre el 8% y el 19% (v/v), pero existen otros compuestos volátiles (por ejemplo, metanol, ésteres y terpenos) directamente responsables de los caracteres organolépticos del vino, aunque sus concentraciones son bastante más bajas que la del etanol. Los compuestos orgánicos no volátiles incluyen compuestos de baja volatilidad, alcoholes, azúcares y ácidos orgánicos, así como sus sales. Estos pueden estar presentes en concentraciones superiores a $1,0 \text{ g L}^{-1}$. El vino también contiene pequeñas cantidades de otras sustancias ($<1,0 \text{ g L}^{-1}$) como aminoácidos, polifenoles, flavonoides, etc. En cuanto a los ácidos inorgánicos, el vino es rico en Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} y sales.

Los constituyentes del vino están estrictamente regulados por organizaciones internacionales [20] o agencias gubernamentales [21] para evitar el fraude y los riesgos para la salud. Además, la composición elemental del vino proporciona información sobre la calidad o características del vino [22, 23]. Los elementos en el vino se pueden clasificar en dos grupos: endógenos y exógenos. Los elementos endógenos son los más abundantes, están relacionados con el tipo de suelo en el viñedo, la variedad y madurez de la uva y las condiciones climáticas. Los elementos exógenos están asociados con las impurezas externas que pueden llegar al vino durante el crecimiento de las uvas. Así, las diferencias en los valores de concentración de ciertos metales en diferentes vinos puede deberse al uso de fertilizantes para el cultivo. La aplicación de plaguicidas, fungicidas y fertilizantes durante las estaciones de cultivo de los vinos conducen a una mayor cantidad de Cd, Cu, Mn, Pb, Zn o As en el vino [24]. Asimismo, la contaminación ambiental de los viñedos puede aumentar la concentración de algunos elementos [25]. Los metales exógenos además están relacionados con la cosecha y embotellado, por el contacto prolongado del vino con materiales como Al, latón, vidrio, acero inoxidable, madera, etc., utilizados para la construcción de tuberías y barriles, y además por la adición de diferentes sustancias en diferentes etapas de la producción del vino [26].

El análisis de especiación elemental en los vinos está recibiendo cada vez más atención debido a la información adicional que proveen este tipo de estudios acerca de la identidad y concentración de las especies químicas, lo cual aporta información muy valiosa evaluar la toxicidad o naturaleza esencial de un elemento. La biodisponibilidad, movilidad y toxicidad dependen de la forma química específica de la especie. Los metales pueden existir en vinos como iones libres, como complejos con ácidos orgánicos o como moléculas grandes, como polisacáridos, péptidos, proteínas y polifenoles. Es importante señalar que las especies metálicas no deben transformarse a lo largo de las diferentes etapas del proceso analítico total, es decir, durante el muestreo, almacenamiento y análisis de los vinos, a los efectos de obtener resultados exactos respecto de la especiación de los elementos que puedan ser útiles y válidos para estudios toxicológicos, nutricionales y ambientales, entre otros posibles [27]. Hasta el momento, la mayoría de los estudios se han centrado en el análisis de especiación de Pb, As, Fe y Cu en vino, pero también Zn, Sn y Mn han recibido cierta atención.

La especiación incluye no solo la elucidación del estado de oxidación, sino que también incluye conocer las posibles asociaciones químicas que conducen a la formación de especies químicas inorgánicas y orgánicas. Así, cuando se debe evaluar la presencia de As en los vinos, no solo es suficiente conocer la concentración total de este elemento, sino que además es necesario un análisis de su especiación química que involucre la cuantificación de especies altamente tóxicas, tales como As(III) y As(V), pero también de especies moleculares de interés, como el ácido monometilarseniato (MMA) y ácido dimetilarseniato (DMA) [27]. La OIV regula la concentración total de As en los vinos de modo que su concentración total sea menor a un límite máximo residual (LMR) de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ [28]. Sin embargo, dicho LMR plantea algunos inconvenientes para los químicos analíticos debido a que técnicas de análisis altamente sensibles son necesarias para la determinación de As. Esta situación es más compleja cuando el análisis de especiación tiene que ser realizado, puesto que la concentración de las especies de As es una fracción del As total. De esta manera, normalmente se utilizan técnicas instrumentales híbridas para el análisis de especiación, ya que ofrecen la separación de las especies con alta sensibilidad de detección. Para el análisis de especiación elemental de muestras de vino, el acoplamiento de HPLC con ICPMS o ICP-OES constituyen las técnicas más atractivas, aunque otros métodos también han sido reportados. En dichos casos, es importante destacar que para la separación de las especies de interés frecuentemente se requiere una elución con soluciones que causan problemas en el funcionamiento

del plasma, especialmente cuando la elución en gradiente con un solvente es aplicada [29].

Procedimientos cromatográficos y no cromatográficos se han utilizado para la especiación de As en el vino. Diferentes métodos analíticos sensibles se han reportado utilizando técnicas acopladas entre ellas, por ejemplo, la cromatografía gaseosa con detección por emisión atómica (GC-AED), aunque en estos casos se requiere la formación de derivados con tioglicolato de metilo [30] y cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS) [31]. Asimismo, es importante mencionar que también se han utilizado técnicas no cromatográficas para la separación de especies de As en vinos, tales como la microextracción líquido-líquido dispersiva asociada a la detección elemental por espectrometría de absorción atómica electrotérmica (IL-DLLME-ETAAS) [17], aunque sólo es posible la determinación de especies inorgánicas de As además del total de As debido a limitaciones prácticas para separar un gran número de especies.

Por otro lado, se ha utilizado la detección HG-AFS en sistemas de análisis de flujo continuo para la determinación de As total, pudiéndose determinar selectivamente especies como As(III), As(V), MMA y DMA mediante el ajuste de las condiciones experimentales para la generación de arsina. Tasev y colaboradores, reportaron sobre la determinación de especies inorgánicas de As y As total en vinos empleando la técnica HG-AAS y encontraron que As(III) era la especie de As predominante en el vino. Las concentraciones halladas fueron relativamente bajas teniendo en cuenta la legislación internacional y la ingesta diaria estimada de As total para los consumidores [32]. Herce-Pagliai y colaboradores determinaron As total, As inorgánico y As orgánico en 45 muestras de vino por HG-AAS y cromatografía de intercambio iónico acoplada a HG-AAS. En este caso, los investigadores hallaron concentraciones que oscilaban entre 2 y 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, donde DMA fue la especie más abundante en la mayoría de las muestras [33]. Wangkarn y Pergantis desarrollaron un método para la separación por HPLC de fase reversa con formación de pares iónicos, acoplado en línea a ICP-MS y encontraron solamente As(III) a niveles ultratrazas en las muestras de vino [34].

Las principales especies de As que se han encontrado en vinos han sido As(III), As(V), MMA y DMA. Técnicas cromatográficas acopladas tales como HPLC-ICP-MS y HPLC-AFS han sido útiles para determinar todas estas especies de As en un solo procedimiento cromatográfico [33]. Sin embargo, debido a la alta concentración de etanol en el vino, la inyección de muestras de esta naturaleza en HPLC, junto al uso de fases móviles con concentraciones apreciables de solventes orgánicos, tales como las que se aplican con RP-HPLC, puede generar ciertos inconvenientes para el

análisis. De hecho, esta situación es especialmente de cuidado cuando se acopla HPLC a detectores como AFS o ICP-MS, ya que pueden presentarse problemas que incluyen el aumento de la señal de fondo y los efectos de pérdida de sensibilidad causados por disolventes orgánicos. Por lo tanto, la técnica cromatográfica más utilizada para la especiación de As ha sido la de intercambio aniónico (AEC), ya que los solventes orgánicos no son necesarios en la fase móvil [35]. Por otro lado, HPLC de fase reversa por apareamiento iónico (IP-RP-HPLC) ha tenido éxito para la separación de las especies de As con disolvente orgánico mínimo o sin añadir a la fase móvil [36]. En este caso, diferentes reactivos formadores de pares iónicos se han utilizado como aditivos de fase móvil en IP-RP-HPLC-HG-AFS para separar especies de As incluyendo, bromuro de dodecildimetilamonio (DDAB), hidróxido de tetrabutilamonio (TBA) o sulfonato de hexano [37]. Asimismo, en un estudio reciente, se utilizó HPLC-ICP-MS para el análisis de especiación de As en vinos blancos producidos en América del Sur y se encontraron concentraciones de las especies de As entre 3-10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As (III), 9-18 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As(V) y hasta 1,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DMA [30].

Los reactivos de pares iónicos de uso común para el análisis de especiación de As son ácido perfluorocarboxílico, hidróxido de tetraalquilamonio y sulfonato de alquilo. Sin embargo, son propensos a problemas relacionados con bajos tiempos de retención que afectan la resolución de los picos y baja sensibilidad. Así, la introducción de nuevos reactivos de pares iónicos en el sistema de separación por HPLC es deseable. Los ILs que comprenden cationes y aniones inorgánicos u orgánicos asimétricos y han atraído recientemente gran interés debido a sus propiedades únicas tales como estabilidad térmica, presiones de vapor despreciables, miscibilidad con agua y solventes orgánicos [38]. Ciertos ILs se han utilizado en el análisis de la especiación de As, permitiendo alcanzar una resolución cromatográfica superior [39].

1.1.7 Referencias bibliográficas

- [1] J. Emsley, *Nature's Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*, Oxford University Press, 2001.
- [2] M. Castillo, Alberto Magno: precursor de la ciencia renacentista, *Revista de Filosofía*, 17 (1996) 91-106.
- [3] K.H. Wedepohl, *Trace Elements in Coal: Dalway J. Swaine*. Butterworth & Co. Publ., 1990, 278p., (ISBN 0-408-03309-6), *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 55 (1991) 927-928.
- [4] N. Garg, P. Singla, Arsenic toxicity in crop plants: physiological effects and tolerance mechanisms, *Environmental Chemistry Letters*, 9 (2011) 303-321.

- [5] D. Loria, M.G. Abriata, S. Rosso, Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación, Atlas of cancer mortality trends. Argentina, 2001 (1980) 156.
- [6] W. Zhao, L. Zhao, Z. Shi, X. Xia, X. Li, X. Dong, Y. Chang, B. Zhang, G. Du, Electroluminescence of the p-ZnO: As/n-ZnO LEDs grown on ITO glass coated with GaAs interlayer, *Applied Surface Science*, 257 (2011) 4685-4688.
- [7] J. Jaafar, Z. Irwan, R. Ahamad, S. Terabe, T. Ikegami, N. Tanaka, Online preconcentration of arsenic compounds by dynamic pH capillary electrophoresis, *Journal of Separation Science*, 30 (2007) 391-398.
- [8] J. Sanz-Asensio, M.T. Martínez-Soria, M. Plaza-Medina, M.P. Clavijo, Determination of monomethylarsenous acid by hydride generation gas phase molecular absorption spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 381 (1999) 331-339.
- [9] A.R. Roerdink, J.H. Aldstadt, Sequential injection absorption spectrophotometry using a liquid-core waveguide: Determination of p-arsanilic acid in natural waters, *Analytica Chimica Acta*, 539 (2005) 181-187.
- [10] J. Gailer, K.J. Irgolic, Retention behavior of arsenobetaine, arsenocholine, trimethylarsine oxide and tetramethylarsonium iodide on a styrene-divinylbenzene column with benzenesulfonates as ion-pairing reagents, *Journal of Chromatography A*, 730 (1996) 219-229.
- [11] J. Moody, R. Williams, The fate of 4-nitrophenylarsonic acid in hens, *Food and Cosmetics Toxicology*, 2 (1964) 695-706.
- [12] A. Albores, B. Quintanilla, L. Del Razo, M. Cebrian, Arsénico, *Introducción a la Toxicología Ambiental*. OPS, OMS, CPEHSPA. Metepec, (1997) 247-261.
- [13] M. Montes-Bayán, J. Meija, D.L. LeDuc, N. Terry, J.A. Caruso, A. Sanz-Medel, HPLC-ICP-MS and ESI-Q-TOF analysis of biomolecules induced in *Brassica juncea* during arsenic accumulation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (2004) 153-158.
- [14] P.V. Vega, *Toxicología de alimentos*, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, 1986.
- [15] J.A. Offergelt, H. Roels, J.-P. Buchet, M. Boeckx, R. Lauwerys, Relation between airborne arsenic trioxide and urinary excretion of inorganic arsenic and its methylated metabolites, *British Journal of Industrial Medicine*, 49 (1992) 387-393.
- [16] G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, *Handbook on the Toxicology of Metals*, Academic Press, 2007.
- [17] I.B. Karadjova, L. Lampugnani, M. Onor, A. D'Ulivo, D.L. Tsalev, Continuous flow hydride generation-atomic fluorescence spectrometric determination and speciation of arsenic in wine, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60 (2005) 816-823.
- [18] R.S. Jackson, *Wine science: principles and applications*, Academic press, 2008.

- [19] A. Costantini, E. García-Moruno, M.V. Moreno-Arribas, Biochemical transformations produced by malolactic fermentation, in: Wine Chemistry and Biochemistry, Springer, 2009, pp. 27-57.
- [20] G. Grindlay, J. Mora, L. Gras, M.T.C. de Loos-Vollebregt, Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications, *Analytica Chimica Acta*, 691 (2010) 18-32.
- [21] H.A.T. Regulation, Commission Regulation (EEC) No. 2676/90 determining Community methods for the analysis of wines Official Journal L 272, 3 October 1990, pp. 1-192, Official Journal L, 272 (1990) 1-192.
- [22] Y. Yip, J.C. Lam, W. Tong, Applications of lead isotope ratio measurements, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27 (2008) 460-480.
- [23] J.G. Ibanez, A. Carreon-Alvarez, M. Barcena-Soto, N. Casillas, Metals in alcoholic beverages: a review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (2008) 672-683.
- [24] P. Pohl, What do metals tell us about wine?, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 941-949.
- [25] S.M. Rodrigues, M. Otero, A.A. Alves, J. Coimbra, M.A. Coimbra, E. Pereira, A.C. Duarte, Elemental analysis for categorization of wines and authentication of their certified brand of origin, *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (2010) 548-562.
- [26] M. Lambri, R. Dordoni, A. Silva, D.M. De Faveri, Comparing the impact of bentonite addition for both must clarification and wine fining on the chemical profile of wine from Chambave Muscat grapes, *International Journal of Food Science & Technology*, 47 (2010) 1-12.
- [27] J.A. Caruso, R.G. Wuilloud, J.C. Altamirano, W.R. Harris, Modeling and separation and detection methods to evaluate the speciation of metals for toxicity assessment, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 9 (2006) 41-61.
- [28] N. Campillo, R. Penalver, P. Vinas, I. Lopez-Garcia, M. Hernandez-Cordoba, Speciation of arsenic using capillary gas chromatography with atomic emission detection, *Talanta*, 77 (2008) 793-799.
- [29] J. Meija, S. Mounicou, J.A. Caruso, Plasma spectrometry for elemental speciation and characterization in beverages, *Journal of AOAC International*, 87 (2004) 205-224.
- [30] C.M. Moreira, F.A. Duarte, J. Leberherz, D. Pozebon, E.M.M. Flores, V.L. Dressler, Arsenic speciation in white wine by LC-ICPMS, *Food Chemistry*, 126 (2011) 1406-1411.
- [31] L.B. Escudero, E.M. Martinis, R.A. Olsina, R.G. Wuilloud, Arsenic speciation analysis in mono-varietal wines by on-line ionic liquid-based dispersive liquid liquid microextraction, *Food Chemistry*, 138 (2013) 484-490.

- [32] K. Tasev, I. Karadjova, T. Stafilov, Determination of inorganic and total arsenic in wines by hydride generation atomic absorption spectrometry, *Microchimica Acta*, 149 (2005) 55-60.
- [33] C. Herce-Pagliai, I. Moreno, G. Gonzalez, M. Repetto, A.M. Camean, Determination of total arsenic, inorganic and organic arsenic species in wine, *Food Additives & Contaminants*, 19 (2002) 542-546.
- [34] S. Wangkarn, S.A. Pergantis, High-speed separation of arsenic compounds using narrow-bore high-performance liquid chromatography on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15 (2000) 627-633.
- [35] B. Sadee, M.E. Foulkes, S.J. Hill, Coupled techniques for arsenic speciation in food and drinking water: a review, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30 (2015) 102-118.
- [36] R.P. Monasterio, J.A. Londonio, S.S. Farias, P. Smichowski, R.G. Wuilloud, Organic solvent-free reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry for organoarsenic species determination in several matrices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 3566-3574.
- [37] Y.W. Chen, 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*, 671 (2010) 9-26.
- [38] J.P. Pérez-Trujillo, Z. Hernández, F.J. López-Bellido, Characteristic phenolic composition of single-cultivar red wines of the Canary Islands (Spain), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2010) 6150-6164.
- [39] J.C.J. Da Silva, S. Cadore, J.A. Nobrega, N. Baccan, Dilute-and-shoot procedure for the determination of mineral constituents in vinegar samples by axially viewed inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES), *Food Additives and Contaminants*, 24 (2007) 130-139.

1.2 SELENIO

1.2.1 Ocurrencia y obtención

El Se es un elemento que se encuentra ampliamente distribuido en la corteza terrestre. En la mayoría de las rocas y suelos se halla en concentraciones entre 0,1 y 2 mg L⁻¹. Se encuentra en ciertos minerales de Cu y con S nativo. Raramente se encuentra en estado nativo, obteniéndose principalmente como subproducto de la refinación del Cu ya que aparece en los lodos de electrólisis junto al Te (5-25% Se, 2-10% Te) [1].

La producción comercial se realiza por tostación con cenizas de sosa o ácido sulfúrico de los lodos. Primero se añade un aglomerante de cenizas de sosa y agua a los lodos para formar una pasta dura que se extruye para proceder a su secado. La pasta se tuesta a 530-650°C y se sumerge en agua resultando Se hexavalente que se disuelve como selenato de sodio. Este se reduce a seleniuro de sodio calentándolo de forma controlada, obteniendo una solución de color rojo. Inyectando aire en la solución el seleniuro se oxida rápidamente obteniéndose el Se [2].

Otro método consiste en mezclar los lodos de cobre con ácido sulfúrico tostando la pasta resultante a 500-600°C para obtener dióxido de selenio que rápidamente se volatiliza a la temperatura del proceso. Este se reduce a selenio elemental durante el proceso de lavado con dióxido de azufre y agua, pudiendo refinarse posteriormente hasta alcanzar purezas de 99,5-99,7% de Se [2].

1.2.2 Principales usos

El Se se utiliza en células fotoeléctricas y solares, como rectificador en la radio y aparatos de televisión. También fue utilizado históricamente en los medidores de exposición en fotografía. Otras aplicaciones son como aditivo en el acero inoxidable, en baños de cromo galvánico para inducir microfisuras para el control de la corrosión, en la vulcanización del caucho, como catalizador, como insecticida y como agente a prueba de llama para cables eléctricos.

El sulfuro de selenio se utiliza como agente anticasca. La ⁷⁵Se-selenometionina se ha utilizado como agente de barrido para el páncreas. En algunos países, selenito o selenato se añaden a la cadena alimentaria o como aditivo para fertilizantes debido a que es un elemento esencial [3].

1.2.3 Propiedades físicas y químicas

El Se es un elemento del Grupo 16 (VI A) de la tabla periódica y su configuración electrónica es $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^4$. Cuando está formando compuestos, el Se existe bajo los estados de oxidación -II, +IV y +VI. Se lo clasifica como un metaloide, debido a que presenta propiedades tanto metálicas como no metálicas. En la Tabla 1.2.1 se resumen algunas propiedades del elemento.

Tabla 1.2.1 Algunas propiedades del Se.

Propiedad	Valor
Número atómico	34
Masa atómica relativa ($^{12}\text{C}=12,000$)	78,96
Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	221
Punto de ebullición ($^{\circ}\text{C}$)	685
Densidad (g mL^{-1})	4,79
Radio atómico (Å)	1,03
Radio covalente (Å)	1,16
Conductividad eléctrica ($\text{m}^{-1} \Omega^{-1}$)	1×10^{-4}
Conductividad térmica ($\text{W m}^{-2} \text{K}^{-1}$)	2,04

El Se existe en varias formas alotrópicas. Las formas amorfas se presentan como un polvo rojo de estructura cristalina hexagonal o como sólido vítreo. El Se amorfo funde a $60\text{-}80^{\circ}\text{C}$, es insoluble en agua, reacciona con agua a 50°C , mientras que el Se cristalino exhibe dos formas monoclinicas: una forma alfa que constituye cristales transparentes de color rojo oscuro y forma metaestable beta de estructura cristalina hexagonal. Las formas cristalinas son insolubles en agua, solubles en ácidos sulfúrico y nítrico. Se convierten en formas metálicas de color gris por calentamiento intenso. La forma metálica del Se es la más estable, constituida por cristales hexagonales. El Se tiene seis isótopos naturales, cinco de los cuales son estables: ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se y ^{80}Se [3].

El Se tiene muchos usos industriales, debido a sus propiedades únicas:

- 1) Convierte la luz directamente en electricidad (acción fotovoltaica).
- 2) Su resistencia eléctrica disminuye con el aumento de la iluminación (fotoconductividad).
- 3) Es capaz de convertir la corriente alterna en corriente continua.

El Se reacciona con el oxígeno de manera similar al azufre, formando dos óxidos, SeO_2 y SeO_3 , los cuales reaccionan con agua para formar ácido selenioso y selénico, respectivamente. Se combina con halógenos formando sus haluros. Con los no metales forma compuestos binarios exhibiendo los números de oxidación +IV y +VI. El Se reacciona con metales electropositivos y el hidrógeno formando seleniuros, donde su estado de oxidación es -II.

No es atacado por ácido clorhídrico, ni reacciona con ácidos nítrico y sulfúrico diluidos. El Se de alta pureza reacciona lentamente con ácido nítrico concentrado. En bruto se disuelve en ácido nítrico concentrado frío.

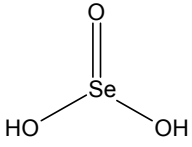
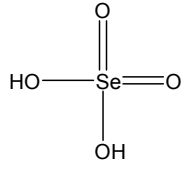
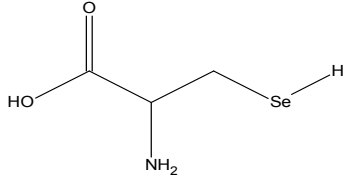
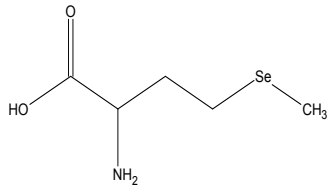
La forma reducida de selenio (seleniuro) puede ser formado a partir de compuestos de Se en condiciones ácidas o en sistemas biológicos. Se puede encontrar en lugar del azufre en aminoácidos (como, selenometionina y selenocisteína). Seleniuro puede formar complejos metálicos pesados, que son prácticamente insolubles en agua [4].

1.2.4 Especies de Selenio

El Se inorgánico puede encontrarse fundamentalmente con los estados de oxidación +IV y +VI. El Se(VI) se presenta como anión selenato, protonado en mayor o menor medida, mientras que Se(IV) se presenta como anión selenito y sus correspondientes derivados proteolíticos, dependiendo del pH. El estado de oxidación del Se determina su movilidad en diferentes medios, siendo regulado principalmente por las condiciones redox y el pH [5].

Los compuestos orgánicos que contienen Se, presentan dicho elemento unido a átomos de carbono por medio de uniones covalentes, de forma similar a como lo hace el S. El Se puede encontrarse en su forma divalente, tetravalente o hexavalente. En la Tabla 1.2.2 se resumen las principales especies inorgánicas y orgánicas de Se con algunas de sus propiedades.

Tabla 1.2.2 Propiedades de las especies de Se más comunes.

Compuesto	Composición elemental	Estructura	Peso molecular	Ref.
Ácido selenioso	H ₂ SO ₃		128,97	[5]
Ácido selénico	H ₂ SO ₄		144,97	[5]
Selenocisteína (SeCys)	C ₃ H ₇ O ₂ NSe		168	[5]
Selenometionina (SeMet)	C ₅ H ₁₁ O ₂ NSe		196	[6]

1.2.5 Toxicología

1.2.5.1 Fase de exposición

El Se está presente en el medio ambiente en distintas formas químicas. El organismo humano puede estar expuesto al mismo a través del agua, aire, alimentos, plantas, rocas y suelo. La concentración de Se en la atmósfera de regiones urbanas se encuentra en el rango de 0,1-10 ng m⁻³. Hasta el 90% del Se presente en el aire es emitido durante la combustión de combustibles fósiles como SeO₂. El agua superficial recibe el Se de la atmósfera por deposición, escorrentía superficial y drenaje subterráneo. Los niveles de Se en el agua de mar están en el rango de 0,06-0,12 pg L⁻¹. Los niveles varían ampliamente en aguas superficiales y subterráneas, de 0,06-400 µg L⁻¹ [7].

El Se se encuentra en la corteza terrestre en concentraciones a partir de 0,05-0,09 µg g⁻¹. El Se se presenta principalmente como selenito y seleniuro en asociación con minerales sulfurados [8]. El contenido de Se de los suelos varía enormemente de

0,005-1200 $\mu\text{g g}^{-1}$ y más comúnmente entre 0,1 y 10 $\mu\text{g g}^{-1}$. El Se en el suelo, varía en disponibilidad para las plantas, ya que se encuentra en muchas formas (como selenitos, selenatos, Se elemental y como Se en asociación con minerales), lo cual determina su mayor o menor grado de captación. El contenido de Se total y las formas químicas son fundamentales para la producción de la vegetación [9].

1.2.5.2 Fase toxicocinética

La mayoría de los compuestos de Se solubles en agua son efectivamente absorbidos en el tracto gastrointestinal. Más del 90% del selenito administrado por vía oral o más del 80% de selenometionina o selenocisteína es absorbido por las ratas. Selenito y selenometionina se absorben principalmente en el duodeno [10].

En animales de laboratorio, hay una distribución rápida de compuestos de Se solubles en agua en la mayoría de los órganos. Las ratas criadas con una dieta baja de Se lo acumulan en los órganos reproductores, cerebro y timo. En sangre, músculo, hígado, bazo, riñón y pulmón, la acumulación es más transitoria [11]. Los resultados de los estudios en humanos tienden a sugerir que la disposición de Se en el hombre es similar al de ratas y otros animales de laboratorio. Sin embargo, hay indicios de que la distribución de Se entre los componentes de la sangre es diferente. Sólo un 10-15% de Se de eritrocitos en el hombre se asocia con la actividad de GSH-Px, mientras que el correspondiente valor en ratas es de 75 a 85% [12].

La orina es la principal vía de excreción. Sin embargo, la excreción fecal puede dominar en los casos de deficiencia. Trimetilselenonio es un metabolito urinario excretado en dosis altas ($1,5 \text{ mg kg}^{-1}$). En niveles altos o tóxicos de dosis, la excreción a través del aire espirado se vuelve importante e incluso predominante. El único metabolito identificado en el aliento es el dimetilselenio [13].

1.2.5.3 Fase toxicodinámica

El Se es un oligoelemento esencial para muchas especies incluido el hombre. El Se es una parte integral de la glutatión peroxidasa (GSH-px1-5) y enzimas (todas contienen SeCys). Las selenoproteínas bacterianas participan en los procesos catabólicos, mientras que en los mamíferos las selenoproteínas participan como antioxidantes en procesos anabólicos. Otras selenoproteínas catalizan la reducción de proteínas celulares que pueden desempeñar un papel en la regulación redox, resistencia al estrés oxidativo y apoptosis [14].

Reemplaza el azufre formando selenocisteína y selenometionina en ciertas proteínas esenciales, inhibe la actividad de determinadas enzimas respiratorias de tipo succinato-deshidrogenasa lo que genera un descenso de la síntesis de ATP. Se cree

que el Se ejerce su efecto tóxico mediante inhibición enzimática de los sistemas de oxidoreducción del organismo. Cuando el organismo no puede reducir el selenito por deficiencia de glucosa o exceso de selenito, se produce la destrucción celular.

El exceso en la disponibilidad de Se de los suelos, determinaría en los vegetales, un incremento en la producción de selenometionina. El consumo de estos forrajes por el animal, promuevan la incorporación de selenometionina en las proteínas contra la forma azufrada del aminoácido, generando alteraciones en la estructuración de los puentes disulfuro y así en la estructura de la proteína. De ser así, se explicarían los cambios producidos en la intoxicación crónica por Se en las estructuras cutáneas de queratina, una proteína estructural con alta densidad de puentes disulfuro [15].

1.2.5.4 Efectos tóxicos

Muchos compuestos de Se son muy tóxicos y matan animales de laboratorio en dosis únicas tan pequeñas como 1,5 a 6 mg kg⁻¹ de peso corporal. Dosis letales de selenito en ratas son de 3,25 a 3,5 mg kg⁻¹, para selenato son de 5,5 a 5,75 mg kg⁻¹ y para selenocisteína de 4 mg kg⁻¹ [16]. Los animales que recibieron dosis letales adquieren olor a ajo en la respiración, signos de nerviosismo y miedo, seguido de somnolencia, disnea y espasmos. El órgano crítico en estas condiciones es el sistema nervioso central, mientras que cambios morfológicos están dominados por el hígado.

Un síndrome crónico que se describe en el ganado y caballos es "la enfermedad alcalina." Esta enfermedad se ha asociado con el consumo de granos o plantas que contienen 5-25 mg kg⁻¹ de Se. La enfermedad se caracteriza por falta de vitalidad, pérdida de apetito, adelgazamiento, deformaciones, pérdida de pelo y erosiones en las articulaciones de los huesos. En casos más avanzados, se puede desarrollar cirrosis. El síndrome de "tambalea ciegos" en el ganado está también asociado con el consumo de Se en plantas acumuladoras. Características del síndrome son problemas de visión, disminución del apetito y una tendencia a "vagar" en círculos [15].

Estudios de toxicidad de Se endémico en seres humanos muestran que el mínimo diario de ingesta en la dieta suficiente para causar síntomas de selenosis es de aproximadamente 1200 µg de Se.

Enfermedades por deficiencia se han descrito en muchos animales de granja y de laboratorio, e incluyen la disfunción de varios órganos, retraso del crecimiento, fallos en la reproducción, miocardiopatía, necrosis hepática, hemólisis, degeneración del riñón, diátesis exudativa y fibrosis de páncreas [16]. La deficiencia de Se juega un papel en enfermedades virales. Por ejemplo, en pacientes estudiados con tuberculosis pulmonar con y sin co-infección por el VIH en Malawi, se observó un escaso nivel de

Se entre los infectados con VIH. La progresión del VIH se redujo con la administración de suplementos de Se [17].

En resumen, los pocos casos conocidos de intoxicación aguda en los seres humanos han demostrado síntomas neurológicos poco habituales y síntomas gastrointestinales. En exposición a largo plazo, se da olor a ajo en la respiración, uñas, cabello y cambios en la piel.

Varios compuestos de Se como selenato, selenito, selenocisteína y en particular selenometionina, son teratógenos en especies de aves y de peces. Ambas formas inorgánicas y orgánicas de Se pasan a la placenta en humanos y animales experimentales [18].

En general, la mayoría de las especies de Se muestran algún efecto inhibitor sobre diferentes tipos de cáncer en la piel, hígado, colon y mama. En la mayoría de los experimentos se han utilizado formas inorgánicas u orgánicas de Se a partir de levadura o ajo (como metilselenocisteína). El Se funciona mejor en las primeras fases de la carcinogénesis, los mecanismos no son conocidos. Los mecanismos sugeridos incluyen efectos en la muerte celular programada, efectos sobre la reparación del ADN, papel de selenoenzimas (como el efecto antioxidante de GSH-Px), efectos sobre el metabolismo carcinógeno, efectos en el sistema inmunológico, efectos antiangiogénicos e inhibición específica del crecimiento del tumor [19].

1.2.5.5 Tratamiento de la intoxicación

No existe tratamiento específico para la selenosis, de hecho, se comienza con la eliminación de la fuente de Se, seguido de la administración de un preparado salino que contenga unos $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de As para acelerar la excreción. El As puede aumentar la excreción biliar y fecal de Se hasta 10 veces, debido a la inhibición efectiva de la metilación. Se puede incrementar el azufre de la dieta para prevenir la acumulación de Se. Para la selenosis aguda la inclusión de vitamina E ayuda ya que forma radicales libres con el Se [20].

1.2.6 Selenio en alimentos

Una amplia variación de concentraciones de Se se encuentra en productos alimenticios. El nivel depende de la clase de alimento, de la concentración y disponibilidad de Se en el suelo donde se cultivan las plantas. Verduras y frutas tienen bajo contenido de Se ($<0,01 \mu\text{g g}^{-1}$). Sin embargo, algunos productos como el ajo y setas contienen $0,25$ y $0,12 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente [21].

Aproximadamente el 80% del Se se absorbe de los alimentos. Numerosas especies de Se orgánico han sido identificadas en los alimentos vegetales, tales como ajo y levadura. Cereales, carne y peces son las principales fuentes dietéticas de Se. La ingesta dietética de referencia (DRI) para el Se se establece en 55 µg/día para los adultos. El Comité científico-metódico de la UE sobre la alimentación, establece un nivel máximo de consumo tolerable de 300 µg/día [22].

1.2.7 Especiación de Selenio

Los estudios relacionados con la cuantificación de especies de Se en los alimentos suelen centrarse principalmente en las especies más abundantes y fácilmente medibles. Para una mejor comprensión y exploración de la biodisponibilidad de Se en los organismos vivos, es necesario conocer la especiación de Se y la concentración de sus especies, más allá de la concentración total del elemento [23]. El análisis de especiación elemental se logra usualmente mediante una técnica de separación para separar las diferentes especies del elemento de interés, junto con una técnica de detección sensible. Técnicas híbridas para la especiación de Se han sido bien documentadas en revisiones bibliográficas recientes [24, 25].

Decenas de diferentes selenocompuestos pueden encontrarse en los tejidos biológicos, siendo las especies más conocidas dos oxoaniones, selenito (SeO_3^{2-}) y selenato (SeO_4^{2-}), y algunas especies orgánicas, selenometionina (SeMet), selenocisteína (SeCys) y la forma metilada la metilselenocisteína (MeSeCys) [26].

La escasez de los datos sobre el contenido de las especies de Se en los alimentos puede explicarse por la complejidad de los métodos que permiten su detección y cuantificación, sobre todo cuando se buscan bajas concentraciones (a menudo en el rango de los ng g⁻¹). En los últimos años, dispositivos de análisis de gran alcance se han desarrollado para hacer la especiación de Se posible. Sin embargo, este tipo de análisis sigue siendo difícil para ser llevado a cabo en forma rutinaria. Una dificultad a superar es la extracción total de Se de la matriz alimentaria, sin afectar a su especiación original. Procedimientos de extracción enzimática suelen ser elegidos para extraer Se de matrices alimentarias. Gracias a las condiciones suaves de las reacciones enzimáticas (37°C; pH 7,5), este método minimiza el riesgo de transformación de especies al tiempo que permite altas eficiencias de extracción. Como la mayoría de las veces el Se está atrapado en proteínas la extracción se hace típicamente con enzimas proteolíticas, a veces combinadas con ultrasonidos o la energía de microondas para acortar el tiempo de extracción [27]. Para selenocompuestos que no estén incorporados en proteínas, se utiliza extracción

acuosa (con eventual adición de un ácido o un agente tensioactivo). Después de la extracción, las especies de Se deben ser separadas de forma inequívoca, y luego deben ser identificadas y cuantificadas correctamente. El proceso de separación es típicamente realizado por cromatografía, lo que permite la separación de compuestos según la diferente afinidad de los mismos por la fase móvil y estacionaria. Debido al hecho de que la mayoría de los selenocompuestos de interés son no volátiles, se usa principalmente HPLC. Sin embargo, GC se ha utilizado para la determinación de algunas de especies de Se no volátiles previa reacción de derivatización o en sin tratamiento previo para los pocos selenocompuestos volátiles (metilselenol, dimetilseleniuro, etc.) [28]. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) separa moléculas de acuerdo con su tamaño y su forma. La resolución de SEC es generalmente insuficiente para permitir la discriminación de especies de Se con un peso molecular inferior a 10 kDa, lo que hace a esta técnica más adecuada como una etapa de purificación antes de una complementaria separación cromatográfica en un esquema multidimensional [29]. La cromatografía de intercambio iónico (IEC) se basa en las interacciones de las especies cargadas con una fase estacionaria de carga opuesta. Es especialmente eficiente para la separación de especies inorgánicas que a menudo se cargan o son fácilmente ionizables [30], pero también es habitualmente utilizada para el análisis de algunos compuestos organoselénicos, como aminoácidos con Se que, dependiendo del pH de la fase móvil, pueden estar presentes como cationes, aniones o iones híbridos [31]. La cromatografía de fase reversa (RPC) permite la separación de los compuestos de acuerdo con su polaridad y su afinidad correspondiente con una fase estacionaria no polar (C_8 y C_{18}) generalmente recubierto con un agente de apareamiento iónico añadido a la fase móvil polar. Este método es apropiado para la separación de muchos compuestos orgánicos, pero presenta el inconveniente de requerir cantidades considerables de solvente orgánico en la fase móvil, las cuales pueden desestabilizar y alterar la capacidad de ionización del plasma de argón del ICP-MS [32].

La HPLC en fase reversa con reactivos formadores de pares iónicos añadidos en la fase móvil ha sido adecuada para la separación simultánea de moléculas aniónicas, catiónicas y neutras [30, 33-39]. En este sentido, existe una gran variedad de reactivos de formación de pares iónicos que se han aplicado para la separación de especies elementales. Sin embargo, la aplicación de los ILs a este tipo de cromatografías continua siendo limitada. Revisiones recientes sobre líquidos iónicos en diferentes técnicas de separación han sido publicados [40]. Los IL tienen una doble naturaleza, se disocian como cationes y aniones en la fase móvil, ambas especies pueden participar en el mecanismo de retención e influir en los resultados

cromatográficos. El efecto de estos iones pueden ser sinérgicos o antagonistas [41-43]. Así, los ILs como aditivos de fase móvil en HPLC han demostrado ser claramente superiores a los clásicos aditivos en términos de eficiencia [44, 45] y mejora en la forma de los picos [46].

1.2.8 Referencias bibliográficas

- [1] A. Garritz, L. Gasque, A. Martínez, Naturaleza de la Ciencia e indagación en un texto de Química Universitaria, Enseñanza de las Ciencias, (2005) 0001-0005.
- [2] R.W. Parry, Química: fundamentos experimentales. Guía del profesor, 1974.
- [3] A. Aro, G. Alfthan, P. Varo, Effects of supplementation of fertilizers on human selenium status in Finland, Analyst, 120 (1995) 841-843.
- [4] P. Patnaik, Handbook of Inorganic Chemicals, McGraw-Hill New York, 2003.
- [5] T.C. Stadtman, Selenocysteine, Annual Review of Biochemistry, 65 (1996) 83-100.
- [6] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G.r. Danielsson, H. Muntau, H.P. van Leeuwen, R. Lobinski, Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), Pure and Applied Chemistry, 72 (2000) 1453-1470.
- [7] D. Kut, Y. Sarikaya, Determination of selenium in atmospheric particulate material of Ankara and its possible sources, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 62 (1981) 161-170.
- [8] R.J. Shamberger, Selenium in the environment, Science of the Total Environment, 17 (1981) 59-74.
- [9] L. Fishbein, Environmental selenium and its significance, Toxicological Sciences, 3 (1983) 411-419.
- [10] B.A. Bopp, R.C. Bonders, J.W. Kesterson, Metabolic fate of selected selenium compounds in laboratory animals and man, Drug Metabolism Reviews, 13 (1982) 271-318.
- [11] R.F. Burk, K.E. Hill, Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis, Annu. Rev. Nutr., 25 (2005) 215-235.
- [12] P.D. Whanger, Selenium and its relationship to cancer: an update, British Journal of Nutrition, 91 (2004) 11-28.
- [13] K.A. Francesconi, F. Pannier, Selenium metabolites in urine: a critical overview of past work and current status, Clinical Chemistry, 50 (2004) 2240-2253.

- [14] D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev, How selenium has altered our understanding of the genetic code, *Molecular and Cellular Biology*, 22 (2002) 3565-3576.
- [15] D.K. Smart, K.L. Ortiz, D. Mattson, C.M. Bradbury, K.S. Bisht, L.K. Sieck, M.W. Brechbiel, D. Gius, Thioredoxin reductase as a potential molecular target for anticancer agents that induce oxidative stress, *Cancer Research*, 64 (2004) 6716-6724.
- [16] C.G. Wilber, Toxicology of selenium: a review, *Clinical Toxicology*, 17 (1980) 171-230.
- [17] M.A. Beck, O.A. Levander, J. Handy, Selenium deficiency and viral infection, *The Journal of Nutrition*, 133 (2003) 1463S-1467S.
- [18] W.J. Birge, O.W. Roberts, Toxicity of metals to chick embryos, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 16 (1976) 319-324.
- [19] J. Venhorst, M. Rooseboom, N.P.E. Vermeulen, J.N.M. Commandeur, Studies on the inhibition of human cytochromes P450 by selenocysteine Se-conjugates, *xenobiotica*, 33 (2003) 57-72.
- [20] L.R. Ferguson, N. Karunasinghe, M. Philpott, Epigenetic events and protection from colon cancer in New Zealand, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44 (2004) 36-43.
- [21] J. Alexander, J. Aaseth, Hepatobiliary transport and organ distribution of silver in the rat as influenced by selenite, *Toxicology*, 21 (1981) 179-186.
- [22] J.E. Hardoy, D.E. Satterthwaite, Las ciudades del Tercer Mundo y el medio ambiente de pobreza, *Foro Mundial de la Salud (OMS)*, 8 (1987) 87-96.
- [23] C.I. Measures, J.D. Burton, Behaviour and speciation of dissolved selenium in estuarine waters, (1978).
- [24] C. B'hymer, J.A. Caruso, Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1114 (2006) 1-20.
- [25] A. Polatajko, N. Jakubowski, J. Szpunar, State of the art report of selenium speciation in biological samples, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21 (2006) 639-654.
- [26] M. Kotrebai, M. Birringer, J.F. Tyson, E. Block, P.C. Uden, Selenium speciation in enriched and natural samples by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS with perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents. Presented at SAC 99, Dublin, Ireland, July, 1999, *Analyst*, 125 (2000) 71-78.
- [27] R.J. Reeder, M.A.A. Schoonen, A. Lanzirotti, Metal speciation and its role in bioaccessibility and bioavailability, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64 (2006) 59-113.
- [28] Z. Pedrero, Y. Madrid, Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: a review, *Analytica Chimica Acta*, 634 (2009) 135-152.

- [29] C. Bahymer, J.A. Caruso, Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1114 (2006) 1-20.
- [30] K. Bierla, M. Dernovics, V.r. Vacchina, J. Szpunar, G.r. Bertin, R. Lobinski, Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390 (2008) 1789-1798.
- [31] M. Stadlober, M. Sager, K.J. Irgolic, Effects of selenate supplemented fertilisation on the selenium level of cereals identification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICPMS, *Food Chemistry*, 73 (2001) 357-366.
- [32] J. Szpunar, Trace element speciation analysis of biomaterials by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2000) 127-137.
- [33] J.K. Kirby, G.H. Lyons, M.P. Karkkainen, Selenium speciation and bioavailability in biofortified products using species-unspecific isotope dilution and reverse phase ion pairing inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of agricultural and food chemistry*, 56 (2008) 1772-1779.
- [34] K. Bierla, V. Vacchina, J. Szpunar, G. Bertin, Simultaneous derivatization of selenocysteine and selenomethionine in animal blood prior to their specific determination by 2D size-exclusion ion-pairing reversed-phase HPLC-ICP MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (2008) 508-513.
- [35] F.N. Tsopelas, M.T. Ochsenkahn-Petropoulou, I.G. Mergias, L.V. Tsakanika, Comparison of ultra-violet and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry for the on-line quantification of selenium species after their separation by reversed-phase liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 539 (2005) 327-333.
- [36] H.G. Infante, G. O'Connor, M. Rayman, R. Wahlen, J. Entwisle, P. Norris, R. Hearn, T. Catterick, Selenium speciation analysis of selenium-enriched supplements by HPLC with ultrasonic nebulisation ICP-MS and electrospray MS/MS detection, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (2004) 1529-1538.
- [37] M. Kotrebai, J.F. Tyson, E. Block, P.C. Uden, High-performance liquid chromatography of selenium compounds utilizing perfluorinated carboxylic acid ion-pairing agents and inductively coupled plasma and electrospray ionization mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A*, 866 (2000) 51-63.
- [38] E. Kapolna, M. Shah, J.A. Caruso, P. Fodor, Selenium speciation studies in Selenium-enriched chives (*Allium schoenoprasum*) by HPLC-ICPMS, *Food Chemistry*, 101 (2007) 1398-1406.

- [39] F. Pan, J.F. Tyson, P.C. Uden, Simultaneous speciation of arsenic and selenium in human urine by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 22 (2007) 931-937.
- [40] L. He, W. Zhang, L. Zhao, X. Liu, S. Jiang, Effect of 1-alkyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids as the eluent on the separation of ephedrines by liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1007 (2003) 39-45.
- [41] M.P. Marszall, T. Baczek, R. Kaliszan, Reduction of silanophilic interactions in liquid chromatography with the use of ionic liquids, *Analytica Chimica Acta*, 547 (2005) 172-178.
- [42] A. Berthod, M.J. Ruiz-Angel, S. Huguet, Nonmolecular solvents in separation methods: dual nature of room temperature ionic liquids, *Analytical Chemistry*, 77 (2005) 4071-4080.
- [43] A. Berthod, M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, Ionic liquids in separation techniques, *Journal of Chromatography A*, 1184 (2008) 6-18.
- [44] B. Buszewski, S. Studziska, A review of ionic liquids in chromatographic and electromigration techniques, *Chromatographia*, 68 (2008) 1-10.
- [45] M.J. Ruiz-Angel, S. Carda-Broch, A. Berthod, Ionic liquids versus triethylamine as mobile phase additives in the analysis of blockers, *Journal of Chromatography A*, 1119 (2006) 202-208.
- [46] F. Tang, L. Tao, X. Luo, L. Ding, M. Guo, L. Nie, S. Yao, Determination of octopamine, synephrine and tyramine in Citrus herbs by ionic liquid improved green chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1125 (2006) 182-188.

1.3 ANÁLISIS DE ESPECIACIÓN ELEMENTAL

1.3.1 Introducción

Hasta hace algunas décadas, la Química Analítica tenía como único objetivo la determinación total de elementos trazas y ultratrazas, enfocando las investigaciones y desarrollos hacia el incremento de la sensibilidad de las metodologías analíticas debido a que se reconocía que la presencia de ciertos elementos, aún en muy bajos niveles, en las diversas matrices de estudio, podían tener efectos tanto beneficiosos como perjudiciales hacia los seres vivos y el ambiente. Entonces, en los años '60, las investigaciones empezaron a considerar la posibilidad de que los elementos traza podían tener diferentes características dependiendo de sus especies químicas, surgiendo así la necesidad de identificarlas y cuantificarlas. Esto ha dado origen a una rama de la Química Analítica, que se encuentra en creciente expansión, a la que se denomina "Análisis de Especiación" [1].

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) ha definido el análisis de especiación elemental como el conjunto de actividades analíticas de identificación y/o medida de concentración de una o más especies químicas individuales en una muestra. La definición de especies está basada en varios niveles diferentes de estructuras atómicas y moleculares donde las formas químicas de un mismo elemento son manifiestas. Las diferencias pueden ser consideradas a nivel de: (1) composición isotópica, (2) estado electrónico o de oxidación, (3) compuestos inorgánicos, orgánicos y sus complejos, (4) especies organometálicas y (5) compuestos y complejos macromoleculares [2].

De este modo, si bien la determinación de la concentración total de elementos traza es todavía importante, el conocimiento de la especiación brinda información relevante para la realización de estudios de bioaccesibilidad, biodisponibilidad, toxicidad, movilidad y bioacumulación. Sin embargo, este tipo de estudios es complejo y requiere de especiales cuidados, siendo la mayor dificultad práctica la preservación de la integridad de la muestra y las especies de interés durante el muestreo, conservación y pretratamiento, en particular, deben evitarse procesos que puedan hacer variar el pH o el estado de oxidorreducción de la muestra, que podrían producir la transformación de las diferentes especies [1].

El desarrollo del análisis de especiación está supeditado a la existencia de técnicas analíticas de alta sensibilidad validadas, la disponibilidad de materiales de referencia certificados y/o ensayos interlaboratorios que permitan evaluar las bondades de las metodologías desarrolladas. Una vez superados estos

inconvenientes se transformará en la metodología de excelencia para estudios medioambientales, biológicos, alimentarios, y relacionados con contaminación metálica y organometálica [2].

1.3.2 Proceso analítico total en el análisis de especiación

Antes de llevar a cabo un análisis de especiación, el químico analítico debe tener claro qué especies se desean determinar, cómo se debe muestrear el material a ensayar y aislar las especies sin producir cambios cualitativos y cuantitativos, si se pueden detectar las pequeñas cantidades de las especies aisladas y si se dispone de materiales de referencia para llevar a cabo las calibraciones para cada especie y poder realizar una adecuada validación de las metodologías desarrolladas [1].

A continuación, es necesario planear estrategias de análisis que incluyan la evaluación de la estabilidad de las especies a evaluar, que son dependientes de la matriz y las condiciones fisicoquímicas tales como temperatura, humedad, luz ultravioleta o materia orgánica presente. Seguidamente, se deben aislar y purificar las especies, evaluar las posibilidades de transformación que pudieran haber sufrido a través del procedimiento, sus características e interacciones. Los procedimientos deben incluir metodologías de cuantificación y calibración apropiadas. Asimismo, mientras que la concentración total se mantiene en el tiempo, la de sus especies puede ser dinámica y variar con los cambios en su entorno, debido principalmente a variaciones de pH, concentración de ligandos con los que podría formar complejos y presencia de concomitantes con los que interactúan. Es por eso que deben considerarse tanto la estabilidad cinética como termodinámica de las especies elementales en su medio ambiente [3].

1.3.2.1 Muestreo

El requerimiento clave para la especiación es la preservación de la información de las especies presentes en la muestra durante todo el proceso analítico. Esto se logra a través de dos estrategias principales: 1) se debe mantener la especie de interés sin cambios durante todos los procesos críticos del ensayo y 2) las especies deben ser cuantitativamente transformadas en estadios tempranos del ensayo en derivados adecuados para los métodos posteriores de separación, acumulación y cuantificación. La estabilidad química y la volatilidad de los analitos es de gran importancia en los procesos de muestreo [2].

Como los análisis de especiación en muestras ambientales son a niveles de trazas y ultratrazas, se debe ser muy cuidadoso con la pérdida de analito y la posible

contaminación externa a lo largo de todo el proceso de muestreo hasta llegar a la determinación analítica [3].

1.3.2.2 Procesamiento y almacenamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras sólidas implica la realización de operaciones físicas, entre ellas molido y secado, antes de cualquier pretratamiento analítico. La influencia de tales manipulaciones es muchas veces subestimada y, sin embargo, debe ser cuidadosamente controlada por el analista con respecto a la contaminación, pérdida o transformación del analito y las modificaciones relevantes de la matriz. Debe tenerse en cuenta que, durante el proceso de molienda, las muestras deberían ser refrigeradas, para evitar la transformación de especies e inclusive su pérdida. El proceso de secado podría llevar a cambios capaces de influenciar significativamente el análisis de especiación. El secado podría remover algo más que moléculas de agua de la muestra fresca y alterar la composición química general del material [4].

Generalmente, se deben minimizar los pasos de manipulación de la muestra, se debe analizar de preferencia material fresco y sin tamizar y se debe evaluar el procesamiento de toda la muestra debido a su influencia sobre los cambios en la composición química original.

La preservación de la integridad química de la muestra debe ser el principal objetivo de su almacenamiento, lo que está relacionado con evitar la pérdida y la contaminación de las especies de interés, así como también cambios en la masa o en las propiedades relevantes de la matriz. El parámetro clave de un correcto almacenamiento es la temperatura, que en la mayoría de los casos puede ser fácilmente controlada. El almacenamiento en congeladores a muy baja temperatura parece ser el enfoque más seguro para la conservación de muestras ambientales y analitos. Las muestras deben guardarse a oscuras, o en recipientes color caramelo, tratando de minimizar el ingreso de oxígeno al medio de almacenamiento, para evitar reacciones de oxidación.

Las muestras líquidas se conservan comúnmente a 4°C, por un período limitado, pero las reacciones de intercambio, la actividad bacteriana o la adsorción/desorción sobre las paredes de los recipientes, pueden ser significativas. Las especies organometálicas podrían descomponerse bajo influencia de la luz, los microorganismos o partículas suspendidas [5].

1.3.2.3 Técnicas de preparación de muestras

Las técnicas instrumentales acopladas basadas en la combinación de técnicas separativas con espectrometría atómica se han convertido en la metodología de preferencia en el análisis de especiación por su capacidad para la discriminación de las diferentes formas en que puede estar presente el elemento. Estas técnicas presentan usualmente un extraordinario desempeño para soluciones de patrones, pero habitualmente fallan cuando se aplican directamente a muestras reales sin un mayor pretratamiento o adecuación de las mismas. Un análisis de especiación exitoso en muestras que presentan matrices complejas, tales como las de origen ambiental y biológicas depende de manera crítica de la preparación de la muestra, cuyo objetivo fundamental es aislar las especies (analitos) de la matriz, preconcentrarlas si es necesario para poder alcanzar bajos límites de detección que permitan la determinación de las especies a niveles traza o ultratrazas, eliminar posibles interferentes o derivatizarlas para posibilitar la separación y detección de las mismas [3].

Las bajas concentraciones de los analitos involucrados, la fragilidad de los compuestos y los estrictos requerimientos impuestos por los sistemas acoplados en lo referente a volumen de muestra, polaridad y aceptación de la matriz por los equipos, hacen de la preparación de muestra un punto esencial en el análisis de especiación. El procedimiento para la preparación de la muestra depende de la técnica analítica a utilizar y el tipo de muestra a ser analizada. La polaridad y volatilidad del analito determina la técnica cromatográfica a elegir para la separación de las especies previamente a su detección. La técnica separativa, a su vez, impone requerimientos para la solución del analito resultante del proceso de preparación de la muestra. Para el caso de HPLC, se requerirán soluciones acuosas de especies termodinámicamente estables y cinéticamente inertes libres de partículas suspendidas [4]. El procedimiento de preparación de muestras para el análisis de especiación usualmente requiere de los siguientes pasos:

- 1) Filtración: para separar partículas en muestras de gases y acuosas. Usualmente se utiliza un filtro de 0,45 μm , pero cuando se trabaja con HPLC es necesario usar un filtro de 0,2 μm .
- 2) Solubilización: para llevar el material a solución. Se puede lograr por hidrólisis alcalina, ácida o enzimática. Es necesario remarcar que después de la solubilización, se obtiene una solución acuosa de las especies, pero aún no se ha eliminado la matriz.
- 3) Lixiviado o extracción sólido-líquido: para extraer las especies del analito de muestras sólidas.

4) Preconcentración: para incrementar la concentración de las especies analizadas en la solución introducida en la columna cromatográfica, con respecto a la concentración en la que están presentes en la muestra analizada original. La preconcentración puede lograrse por extracción con solventes y por evaporación del lixiviado o extracto.

5) Limpieza: para remover componentes de la matriz que, de ser cointroducidos en una columna cromatográfica, podrían llevar a la destrucción de la columna o a la degradación de sus propiedades separativas. La limpieza se realiza generalmente por separación cromatográfica de baja resolución previa, con un mecanismo diferente al empleado para la separación analítica.

6) Derivatización: Es el proceso de conversión controlado de las especies originalmente presentes en una muestra en formas que proporcionen un rendimiento cromatográfico mejorado o que conlleven a una mejora en los coeficientes de separación.

1.3.3 Metodologías para el análisis de especiación

El desarrollo creciente que han experimentado las técnicas de análisis de especiación se puede atribuir a la evolución exponencial que ha tenido la instrumentación analítica, con la que se logran límites de detección impensables hasta hace unas pocas décadas. En este contexto, se pueden describir como las herramientas más comunes para la especiación, aquellas que combinan técnicas separativas acopladas a detectores de alta sensibilidad (técnicas híbridas), tales como AAS, AFS, espectrometría de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) y espectrometría masas atómicas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS); combinadas con técnicas cromatográficas, tales como GC, HPLC y electroforesis capilar (CE), que han dado origen a técnicas de elevado poder de detección, adecuada precisión, alto nivel de automatización y tiempos de respuesta relativamente cortos, convirtiéndolas en la principal elección para el análisis de especiación elemental [2].

Se debe mencionar también la existencia de métodos no cromatográficos que, aunque menos difundidos, resultan también útiles para el análisis de especiación. Dichas metodologías aportan principalmente información cuantitativa acerca de las formas químicas específicas de ciertos elementos. Así, pueden determinarse las especies más tóxicas, o un grupo de ellas, conjuntamente con la concentración total del analito, o distinguir entre compuestos orgánicos o inorgánicos para tener información sobre una dada muestra. De esta manera, las técnicas separativas cromatográficas podrían reemplazarse por extracciones selectivas, o procesos de

volatilización que utilizan instrumentación más simple y económica, aunque pueden resultar tediosos debido a las numerosas etapas experimentales y ser más propensos a errores sistemáticos introducidos por contaminaciones de las muestras durante el análisis. Entre los principios de diferenciación de especies químicas que involucran técnicas no cromatográficas se pueden mencionar: a) retención selectiva en fase sólida (SPE), b) diferenciación basada en la cinética de reacciones, c) separación por puntos de ebullición y d) volatilización selectiva de un analito respecto de otras especies presentes en la muestra [2].

En la presente tesina de grado se ha utilizado la técnica instrumental híbrida HPLC-HG-AFS, la cual aporta ventajas superlativas para la determinación de especies de As y Se, entre otros elementos, resultando una opción atractiva debido al costo más reducido de la instrumentación y mayor simplicidad con respecto a HPLC-ICP-MS. Es por ello que en las secciones subsiguientes se mencionarán algunos detalles fundamentales de las técnicas instrumentales que constituyen la hibridación HPLC-HG-AFS, es decir, la componente separativa aportada por la técnica HPLC, la detección elemental con HG-AFS y las particularidades de su acoplamiento instrumental.

1.3.3.1 Técnicas separativas

Las técnicas separativas son el componente clave del análisis elemental de especiación. Existen muchos detectores que pueden dar rápida información sobre la composición elemental total, pero la determinación de las distintas especies en que ese elemento se encuentre presente, solamente se puede llevar a cabo cuando se acopla una técnica separativa con el detector específico.

En las separaciones por HPLC las especies presentes en la muestra interactúan tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil en su paso a través de la columna, el grado en que cada uno de los analitos interaccione con esas fases determinará el tiempo de residencia de cada analito en la columna. De esta manera, la separación se logra cuando cada uno de los analitos, que tiene un grado de interacción diferente con las fases, salga de la columna a tiempos también diferentes capaces de ser detectados individualmente por el equipo [6]. La técnica HPLC presenta un número de ventajas que la convierten en una herramienta única para el análisis de especiación, ya que a diferencia de GC, posee la capacidad de separar compuestos no volátiles y también aquellos que se descomponen a elevadas temperaturas. Así, HPLC es extremadamente versátil ya que tanto la fase estacionaria como la móvil pueden modificarse, e inclusive pueden agregarse aditivos para lograr

una separación efectiva. Además, puede acoplarse de manera simple a detectores específicos, como espectrómetros de absorción y fluorescencia atómica acoplados a generación de hidruros (HG-AAS y HG-AFS), entre otros [1].

Para llevar a cabo una adecuada separación cromatográfica de las especies, se deben ajustar una serie de parámetros y variables. Es necesario conocer las estructuras de los analitos, ya que las separaciones de las especies entre la fase estacionaria y la fase móvil están basadas en interacciones dipolo-dipolo, interacciones electrostáticas y fuerzas de dispersión. La selección de la fase móvil a utilizar está íntimamente relacionada con las características de los analitos a separar. Asimismo, la naturaleza de las especies a ser separadas podría ser modificada antes de la separación mediante una derivatización para facilitar la separación o detección. La fase móvil constituye otro factor crítico al optimizar una separación. Generalmente, se trata de soluciones acuosas a un dado pH, como soluciones buffer, en las que las especies sean solubles. El control del pH es esencial para obtener una separación efectiva de las especies. Otro punto a tener en cuenta es el caudal de la fase móvil, ya que aumentándolo pueden disminuirse los tiempos de corrida, pero esto puede generar detrimento de la eficiencia de la separación y además ocasionar la pérdida de la correlación entre los volúmenes aportados por el sistema cromatográfico y los aceptados por el sistema al que está asociado el detector específico.

El uso de generación de hidruros en el análisis de especies no sólo contribuye a una notable mejora en la sensibilidad y a la reducción de interferencias, al separar de la muestra las especies, sino que, al introducirse una especie gaseosa, se maximiza la eficiencia de introducción de la muestra, con el consecuente incremento en la señal obtenida. Sin embargo, no todas las especies forman hidruros volátiles. Por ese motivo, las especies separadas cromatográficamente deben ser descompuestas en línea antes de la generación de hidruros y, luego los hidruros volátiles formados se detectan por cualquiera de las técnicas espectroscópicas mencionadas [6].

1.3.3.2 Detectores elementales específicos

El principal desafío analítico para el análisis de las especies a nivel de trazas está relacionado con las bajas concentraciones en las que están presentes y los requerimientos para la identificación de las formas químicas en las que se encuentre el analito. Ambos requerimientos están lejos de ser alcanzados satisfactoriamente por la mayoría de la instrumentación comercial disponible para el análisis orgánico e inorgánico.

El análisis elemental ha apuntado tradicionalmente a la completa recuperación del analito y a la alta sensibilidad, con el propósito de medir la concentración total del

elemento en una muestra. La metodología desarrollada para la determinación elemental apunta a la disolución completa de la matriz para optimizar la atomización y la cuantificación. Con estas técnicas, sin embargo, se ha conseguido poca información con respecto a las formas y estructuras de los compuestos en los cuales se encuentra el elemento. Además de requerir la detección de cantidades muy bajas del elemento, las mediciones deben proporcionar información acerca de las formas o estructuras químicas en las que está presente. A causa de su baja sensibilidad, muchas técnicas populares (UV, IR, MS) que han sido extensa y exitosamente usadas para la identificación de formas y estructuras en análisis orgánico, no son usualmente adecuadas para la especiación elemental. Las herramientas más poderosas con alta sensibilidad para la mayoría de los metales fallan al momento de proporcionar información acerca de las formas en las que el elemento se encuentra [7].

En los laboratorios, este problema se ha solucionado combinando varias técnicas analíticas. Las combinaciones más exitosas resultan del acoplamiento de técnicas separativas y detectores selectivos. En general, los límites de detección de estos sistemas acoplados son fuertemente dependientes de los detectores seleccionados, aunque los límites de detección son inferiores a las de los detectores atómicos espectrométricos solos. Esto puede deberse a los pequeños volúmenes de muestra que deben ser introducidos en los sistemas cromatográficos y al ensanchamiento de los picos que ocurre durante la separación.

Las técnicas ICP-MS y AFS son las más empleadas para la detección de especies elementales debido a su elevada sensibilidad, versatilidad y alta frecuencia analítica. Estas técnicas han sido exitosamente acopladas a HPLC, GC e incluso CE. Como el eluato proveniente de cromatografía líquida y gaseosa puede ser fácilmente introducido en el plasma o la llama, dependiendo el detector, la interfase es simple [8].

La absorción y fluorescencia atómica con generación de hidruros pueden usar una simple bomba isocrática de HPLC, asociada a una válvula de inyección manual y un gabinete para los solventes, en conjunción con una columna. Para la determinación de especies no reducibles, se utiliza sistema de oxidación. Esta conformación instrumental se aplica para el análisis de aguas, bebidas, orina y cualquier matriz que pueda ser puesta en solución adecuadamente. Los límites de detección son del orden de $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$, con una excelente precisión. El mayor mérito de estas técnicas acopladas es su alta sensibilidad. Adicionalmente, el efecto matriz puede ser removido efectivamente antes de que la muestra entre en el detector de AAS o de AFS. En comparación con AAS y AFS, la fuente de plasma ofrece las ventajas de la operación multielemental. Es muy fácil de acoplar a la cromatografía y acepta el flujo continuo

proveniente del eluato de cromatografía líquida. Las desventajas más importantes están asociadas con la sensibilidad del plasma a solventes orgánicos y la ineficiencia del sistema de nebulización [7].

1.3.4 Interfase de fotodisociación y digestión ultravioleta

Una técnica híbrida HPLC-HG-AFS requiere de una interfase que permita transportar los analitos desde la columna hasta el detector. De acuerdo al analito de interés, esta interfase puede o no involucrar una fotodisociación con radiación ultravioleta. La interfase entre la columna y el detector es más compleja en HPLC-HG-AFS con respecto a HPLC-ICP-MS, debido a la necesidad de transformar las especies químicas en formas volátiles (hidruros) que puedan inyectarse en AFS. Por lo tanto, la cinética y la integridad de las reacciones químicas involucradas son los factores principales que controlan la sensibilidad y el rendimiento analítico alcanzado con dicho acoplamiento instrumental. De este modo, para obtener una alta sensibilidad, todas las especies de interés deben ser convertidas rápidamente para que posean una valencia química que permita la formación eficiente del hidruro y/o especies volátiles, tales como AsH_3 , SeH_2 , SbH_3 y Hg^0 . Para lograr esto, una serie de reacciones químicas están involucradas [9]. Los investigadores se enfrentan a problemas difíciles cuando se trabaja con estas técnicas para determinar cómo estas reacciones pueden ser llevadas a cabo de una manera oportuna. Sin embargo, no sólo la cinética de formación de hidruros es ampliamente diferente de un elemento a otro sino también las tasas de descomposición de los compuestos orgánicos son inmensamente diversas. Por ejemplo, la irradiación UV podría ser rápida para la oxidación de ciertos compuestos orgánicos pero lenta o incluso imposible para algunos otros [7].

Con HPLC-HG-AFS, los compuestos orgánicos que se eluyen a partir de una columna no pueden formar directa y eficazmente los compuestos volátiles o los hidruros al reaccionar con NaBH_4 u otros reactivos similares. Por tanto, la descomposición de compuestos orgánicos en formas inorgánicas es a menudo el primer paso. El siguiente paso es pasar esas formas inorgánicas a la forma ideal para la formación de los hidruros, los cuales son detectados por AFS [9]. En la Figura 1.3.1a se puede observar una interfase de disociación UV acoplada al espectrómetro de fluorescencia atómica. En el esquema se puede observar como los componentes que salen de la separación cromatográfica entran a un sistema de válvulas donde son mezclados con un reactivo oxidante que junto con la radiación UV son llevados a la forma más oxidada del elemento. Por lo general, no se realizan reducciones posteriores y esto genera problemas con la sensibilidad del analito, el cual aunque

puede formar especies volátiles no está en el estado de oxidación óptimo para hacerlo [10]. Es útil cuando las especies a analizar no alcanzan a formar especies volátiles que generen hidruros detectables por el sistema de atomización del AFS, como en el caso de las especies orgánicas de Se. En la Figura 1.3.1b se puede observar una interfase acoplada al espectrómetro de fluorescencia atómica pero que no utiliza disociación UV. Este sistema es útil cuando las especies a analizar forman especies volátiles que generan hidruros detectables por el sistema de atomización del AFS como en el caso de As(III), As(V), MMA(V) y DMA(V). La sensibilidad no es la misma para todas las especies pero se puede realizar la especiación sin reactivos oxidantes o reductores adicionales. En este caso, los analitos que salen de la columna cromatográfica se mezclan solamente con el carrier transportador ácido que prepara el medio para la reacción con el agente reductor que generará las especies volátiles [11].

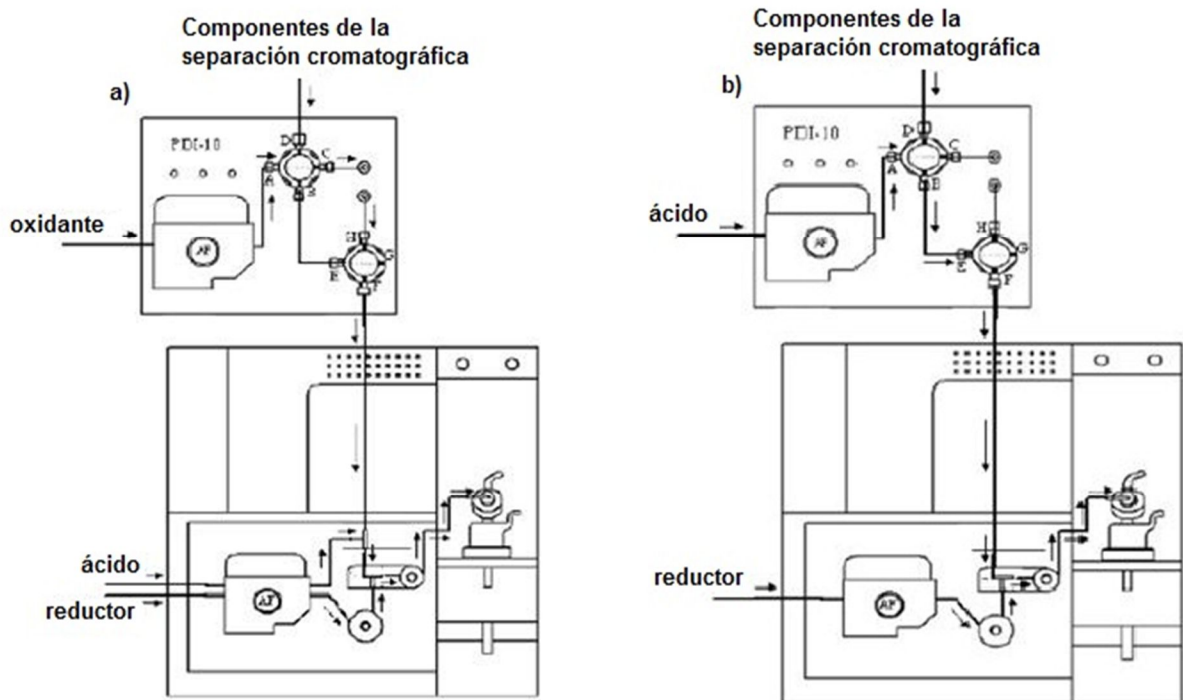


Figura 1.3.1 Sistema acoplado de HPLC: a) con interfase de fotodisociación UV y b) sin interfase de fotodisociación UV

1.3.5 Referencias bibliográficas

[1] R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews, K. Heumann, Handbook of elemental speciation: techniques and methodology, Wiley Online Library, 2003.

- [2] A. Gonzalez, M.L. Cervera, S. Armenta, M. De la Guardia, A review of non-chromatographic methods for speciation analysis, *Analytica Chimica Acta*, 636 (2009) 129-157.
- [3] D.R.E. Helmers, Sampling of sea and fresh water for the analysis of trace elements, in: *Sampling and Sample Preparation*, Springer, 1997, pp. 26-42.
- [4] H. Emons, Challenges from speciation analysis for the development of biological reference materials, *Journal of Analytical Chemistry*, 370 (2001) 115-119.
- [5] Z. Jókai, J. Hegoczki, P. Fodor, Stability and optimization of extraction of four arsenic species, *Microchemical Journal*, 59 (1998) 117-124.
- [6] J. Wang, M.J. Tomlinson, J.A. Caruso, Extraction of trace elements in coal fly ash and subsequent speciation by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry. Plenary lecture, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 10 (1995) 601-607.
- [7] E.A. Crecelius, Modification of the arsenic speciation technique using hydride generation, *Analytical Chemistry*, 50 (1978) 826-827.
- [8] A. Hernández-Zavala, T. Matouek, Z. Drobna, D.S. Paul, F. Walton, B.M. Adair, D.J. Thomas, Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (2008) 342-351.
- [9] Y.W. Chen, 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*, 671 (2010) 9-26.
- [10] S. Simon, A. Barats, F. Pannier, M. Potin-Gautier, Development of an on-line UV decomposition system for direct coupling of liquid chromatography to atomic-fluorescence spectrometry for selenium speciation analysis, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383 (2005) 562-569.
- [11] W.A. Maher, M.J. Ellwood, F. Krikowa, G. Raber, S. Foster, Measurement of arsenic species in environmental, biological fluids and food samples by HPLC-ICPMS and HPLC-HG-AFS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30 (2015) 2129-2183.

1.4 LÍQUIDOS IÓNICOS

1.4.1 Definición y composición química

Los ILs se definen como sales conformadas enteramente por iones, cuya temperatura de fusión es menor o igual a 100°C. A diferencia de otras sales, que se funden a temperaturas más elevadas, los ILs pueden ser líquidos desde temperaturas tan bajas como -96°C [1]. Están constituidos por un catión orgánico voluminoso, combinado con aniones inorgánicos. La mayoría de los cationes tienen heterociclos nitrogenados de naturaleza aromática, mientras que los aniones están constituidos por diferentes elementos químicos. La Figura 1.4.1 muestra algunos de los cationes y aniones más comúnmente utilizados para la formación de estas sales.

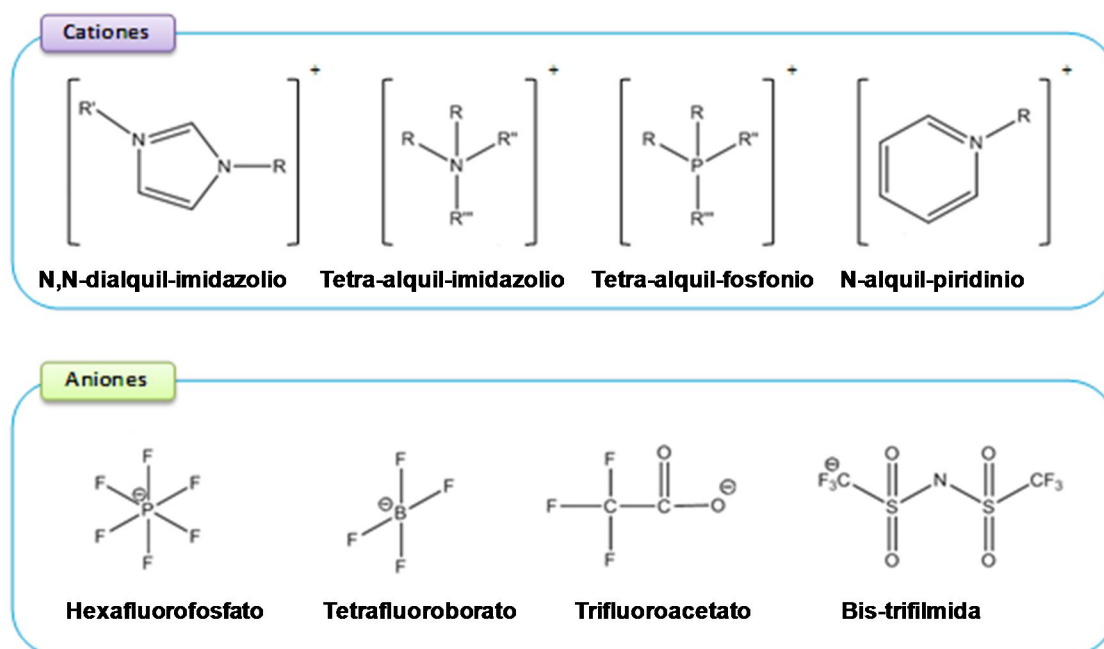


Figura 1.4.1 Cationes y aniones más comunes que componen los IL. R son cadenas orgánicas lineales

Las diferentes combinaciones entre cationes y aniones pueden generar un gran número de ILs. Esta gran diversidad permite diseñar solventes para optimizar el rendimiento, selectividad, solubilidad, separación de productos, etc. El catión del IL es el principal responsable del comportamiento químico, mientras que el anión contribuye con la mayor parte de las propiedades físicas [2]. Los ILs son sales formadas por iones muy asimétricos, el catión usualmente es de gran tamaño con respecto al anión, por lo que las fuerzas atractivas catión-anión son más débiles que las fuerzas que intervienen en las sales iónicas convencionales (sales fundidas), determinando que sean líquidos a temperatura ambiente o que posean puntos de fusión en dicho rango.

Mientras que en las sales convencionales se produce un elevado empaquetamiento para formar una estructura cristalina, en los ILs, a partir de dos iones poco uniformes y con el catión orgánico muy asimétrico, no puede lograrse un empaquetamiento que dé lugar a un arreglo cristalino. Con pequeño aporte de energía se separan los aniones y cationes que configuran el sólido y se transforma en un líquido. Este pequeño aporte se logra cuando se expone a temperaturas próximas a las del ambiente [1].

1.4.2 Propiedades de los ILs

Una de las propiedades más singulares de los ILs es su baja presión de vapor, son considerados solventes no volátiles. Estas propiedades son detalladas a continuación y son sensibles a la pureza del IL.

- **Baja presión de vapor:** la débil interacción coulombica que presentan los ILs entre sus iones limita la formación de pares iónicos, necesarios para que se produzca la volatilización, por lo que tienen presión de vapor muy baja o indetectable. Eso los hace fácilmente manipulables al no evaporarse y permite la utilización de la destilación para recuperar los productos o sustratos disueltos en ellos.
- **Densidad:** la densidad de los ILs imidazolio puede modificarse cambiando la longitud de la cadena del sustituyente del anillo imidazolio. A medida que se incrementa el número de carbonos de la cadena aumenta la densidad.
- **Viscosidad:** afecta a la difusión de los solutos y a parámetros prácticos, como la agitación de mezclas y bombeo de fluidos. Son, por su propia naturaleza iónica, mucho más viscosos que los solventes convencionales (entre 10-500 cP). Para un mismo catión, el cambio del anión afecta significativamente a la viscosidad. Los parámetros determinantes de la viscosidad son el tamaño del anión y la basicidad del mismo. La disminución en el tamaño del anión disminuye las interacciones de tipo van der Waals, incrementando la interacción electrostática a través de puentes de hidrógeno. La influencia del catión en la viscosidad es menor, aunque se ha observado que un aumento en la longitud de la cadena del sustituyente alquílico del catión imidazolio supone un aumento en los valores de viscosidad [3].
- **Punto de fusión:** condiciona el límite inferior del intervalo de temperatura en el que puede utilizarse el IL como solvente. Depende principalmente del tamaño del IL, de su carga y de la distribución de la misma. Disminuye al aumentar el tamaño del anión y del catión. Un incremento en la simetría de los iones supone un aumento del punto de fusión, ya que permite un mayor empaquetamiento. En cationes imidazolio, un incremento en la longitud de la cadena alquílica supone una disminución en el punto

de fusión por cuestiones de empaquetamiento. La existencia de puentes de hidrógeno y la deslocalización de la carga conducen a un aumento del punto de fusión.

- **Polaridad:** las medidas de polaridad en ILs pueden realizarse por estudios solvatocrómicos. En ILs basados en el catión 1-alkil-3-metilimidazolio, la polaridad está determinada por el anión si contienen grupos alquílicos de cadena corta y por el catión con grupos alquílicos de cadena larga [4].
- **Solubilidad:** debido a su naturaleza iónica y a su composición orgánica, los ILs son capaces de disolver compuestos orgánicos, inorgánicos e incluso materiales poliméricos.
- **Hidrofilicidad/hidrofobicidad:** todos los ILs descritos hasta la fecha son higroscópicos. Algunos son miscibles con agua en todas las proporciones, como [C₄mim]Cl, y otros como [C₄mim][PF₆] y [C₄mim][NTf₂], se saturan con agua formando sistemas bifásicos. La solubilidad de los ILs depende de la naturaleza del anión, por la fuerte interacción de puentes de hidrógeno entre anión y moléculas de agua, mientras que el catión tiene un efecto secundario. La lipofilia de las sales de dialquilimidazolio, puede ser incrementada mediante el aumento en la longitud de la cadena de los grupos alquílicos [4].
- **Estabilidad térmica:** el intervalo de temperaturas en que los ILs se encuentran en estado líquido es mayor al de los solventes moleculares convencionales. Su temperatura de descomposición térmica se encuentra normalmente entre 350 y 400°C. La naturaleza del catión y anión que conforman cada IL condiciona su temperatura de descomposición. Los ILs que contienen aniones más débilmente coordinados son más estables a la descomposición térmica.
- **Estabilidad química:** los ILs basados en el catión 1,3-dialquilimidazolio son compuestos no inflamables y químicamente inertes [5].
- **Propiedades electroquímicas:** los ILs son solventes adecuados en procesos electroquímicos, por su gran estabilidad a la oxidoreducción, resistiendo un amplio rango de potenciales y presentan relativamente buena conductividad eléctrica [6].
- **Toxicidad:** la volatilidad prácticamente nula de los ILs reduce las potenciales vías de exposición, siendo el contacto directo con la piel y la ingestión las únicas vías posibles. Algunos pueden ser tóxicos y otros pueden ser relativamente inofensivos y biodegradables. La mayoría de los ILs presentan una toxicidad menor que la de los solventes orgánicos convencionales. La toxicidad es directamente proporcional a la longitud de la cadena alquílica (lo que incrementa su lipofilia).

- **Peligrosidad:** algunos ILs son reactivos y corrosivos, entre ellos los obtenidos a partir de AlCl_3 , pero la mayoría son mucho más seguros que los solventes orgánicos. Su naturaleza no inflamable por su baja presión de vapor hace que disminuya el riesgo de fuegos e incendios que presentan los solventes orgánicos convencionales, lo que resulta de interés para su aplicación en la industria química [7].

1.4.3 Ventajas de los líquidos iónicos frente a solventes orgánicos convencionales

La industria química está sometida a presión social para que aporte soluciones a problemas ambientales que ocasionan los solventes orgánicos tradicionales, caracterizados por su volatilidad, toxicidad e inflamabilidad. La presión de vapor despreciable de los ILs y la variedad de compuestos que pueden obtenerse combinando aniones y cationes diferentes, justifican el interés de la “Química Verde” por encontrar en la familia de ILs, solventes que puedan sustituir a los solventes orgánicos tradicionales y desarrollar procesos químicos más limpios y sustentables. Es posible diseñar los ILs de manera que reúnan las propiedades más adecuadas para una aplicación particular. Propiedades como punto de fusión, densidad, viscosidad, capacidad de solvatación o acidez, pueden seleccionarse alterando el anión y catión. A pesar de su naturaleza iónica, estos solventes no reaccionan con las especies químicas presentes en el medio de reacción, por lo tanto es posible utilizar un IL como medio de reacción y alcanzar resultados similares a los que se obtienen con solventes convencionales, pero operando en condiciones más suaves, lo que disminuye el consumo de energía, descende la carga ambiental y hay ahorro económico [8].

Es posible separar productos formados en la reacción del resto de los compuestos de la fase reactiva. La densidad superior a la unidad hace que el IL sea la fase más densa. Por la baja presión de vapor, los productos de reacción pueden ser eliminados por destilación sin recurrir a complejas y costosas técnicas de purificación para eliminar restos de solventes. El aprovechamiento de estas ventajas potenciales en procesos químicos a escala industrial está sujeto a la obtención de rendimientos comparables a aquellos obtenidos al utilizar solventes convencionales, el costo y la protección ambiental. Se hace imprescindible el reciclado del IL [1].

1.4.4 Síntesis

La síntesis de ILs supone dos etapas: (1) la formación del catión que constituirá el IL (reacciones de cuaternización) y (2) la reacción de intercambio iónico que

generará el producto deseado. En la presente Tesis de Grado se han utilizado varios ILs basados en el catión 1,3-dialquilimidazolio y un IL con catión del tipo fosfonio.

1.4.4.1 Reacciones de cuaternización

Las reacciones de cuaternización consisten en la polisustitución de una amina o fosfina hasta convertirla en cuaternaria, mediante una reacción con un haluro de alquilo. Como ventaja transcurren a temperaturas relativamente suaves. Las sales formadas pueden ser transformadas en sales de otros aniones. La reacción puede ser llevada a cabo mediante cloroalcanos, bromoalcanos e iodoalcanos. Las condiciones de reacción son más suaves siguiendo el orden $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$, como es de esperar en reacciones de sustitución nucleofílica. Las reacciones de cuaternización son muy simples de llevar a cabo, la amina o fosfina se mezcla con un determinado haloalcano y la mezcla de reacción se agita y calienta (Figura 1.4.2).



Figura 1.4.2 Síntesis de alquilimidazoles.

Los compuestos tipo 1-alquilimidazoles empleados en las reacciones de cuaternización son los productos de partida más utilizados en la síntesis de los ILs. La temperatura de reacción y el tiempo dependen del haloalcano empleado, los cloroalcanos son los menos reactivos y los iodoalcanos los más reactivos. La reactividad de los haloalcanos decrece con el incremento de la longitud de la cadena. Para la reacción del 1-metilimidazolio con cloroalcanos es necesario calentar la mezcla a 80°C durante dos o tres días para asegurarse de que la reacción se ha completado, con bromoalcanos se completa a las 24 hs a temperaturas más bajas (entre 50 y 60°C) y con iodoalcanos se puede realizar a temperatura ambiente, protegiendo el recipiente de reacción de la luz. La reacción debería llevarse a cabo bajo atmósfera de nitrógeno o algún otro gas inerte para evitar trazas de agua y oxígeno durante la reacción de cuaternización [9].

La sal del haluro es normalmente inmiscible con los materiales de partida, facilitando su separación. La sal de haluro se puede separar por decantación, eliminando los productos que puedan permanecer en la misma por calentamiento en vacío. En el proceso de calentamiento no se deben sobrepasar los 80°C , ya que un calentamiento excesivo puede producir una inversión de la reacción de cuaternización.

Las sales de haluro sintetizadas son generalmente sólidas a temperatura ambiente, aunque algunas permanecen como aceites viscosos. Si las reacciones se realizan a gran escala, se pueden aislar los productos con un rendimiento superior al 90%.

Los productos deben almacenarse en el interior de un desecador, porque las sales formadas tienden a ser higroscópicas, especialmente cuando los sustituyentes alquílicos son de cadena corta. Las posibles impurezas presentes en las sales obtenidas pueden ser productos de partida y solvente. Las sales de haluro, usadas generalmente como fuente del catión, deben ser eliminadas, por lo que se ha de asegurar mediante RMN que el IL final está libre de estos compuestos [9].

1.4.4.2 Reacciones de intercambio aniónico

Algunas consisten en el tratamiento directo de las sales del haluro con ácidos de lewis y otras son reacciones de metátesis aniónica.

- **Tratamiento con ácidos de Lewis:** el tratamiento de haluros de sales cuaternarias Q^+X^- con ácidos de Lewis MX_n , conduce a la formación de más de una especie aniónica, dependiendo de las proporciones relativas de Q^+X^- y MX_n . Esta reacción es generalmente exotérmica, y con este exceso de calor se puede descomponer al IL. Por la sensibilidad al agua de los reactivos y del IL, la reacción debe llevarse a cabo en ausencia de trazas de agua. Es conveniente que después de su síntesis, los ILs sean almacenados en un desecador al vacío. Además de los cloroaluminatos, se pueden emplear otros ácidos de Lewis, como, BCl_3 , $CuCl$, y $SnCl_2$.

- **Reacciones de metátesis:** fue la primera preparación de ILs basados en cationes tipo 1,3-dialquil-metilimidazolio, relativamente estables al agua y al aire. Se realizó mediante reacciones de metátesis entre $[C_2mim]I$ y sales de plata ($AgNO_3$, $AgNO_2$, $AgBF_4$, $Ag[CO_2CH_3]$, y Ag_2SO_4), utilizando como solvente metanol o soluciones acuosas de metanol. La baja solubilidad del AgI en estos solventes permite su separación por filtración, con síntesis de alto rendimiento y pureza. Es el método más eficiente para la síntesis de ILs miscibles con agua, aunque está limitado por el alto costo de las sales de plata y las grandes cantidades de subproducto sólido formado [9].

La forma más común para preparar ILs inmiscibles en agua se basa en preparar una solución acuosa de la sal de haluro del catión, se añade el anión en su forma ácida o como sal alcalina, y se presenta la reacción de intercambio aniónico. Cuando se utiliza como fuente del anión la forma ácida del mismo, la reacción se ve favorecida, liberándose al medio HCl , HBr , o HI que puede ser eliminado mediante lavados con agua. Si la presencia de trazas de ácido puede causar problemas, se sustituye por

metal alcalino o sal de amonio. Cuando se utiliza la forma ácida como fuente del anión, el lavado de los ILs sintetizados debe continuar hasta la neutralización del agua de lavado, porque con el tiempo las trazas de ácido pueden causar la descomposición de los ILs. La elevada viscosidad de los ILs dificulta la purificación mediante lavado, se recomienda la disolución de los ILs en CHCl_3 para disminuir la viscosidad de los mismos [9].

1.4.5 Aplicación de líquidos iónicos en cromatografía líquida

Por la alta viscosidad de la mayoría de los ILs, es necesario trabajar a una temperatura elevada o adicionar un co-solvente para reducirla a un nivel aceptable que permita la inyección reproducible de la fase de IL en HPLC. Se ha observado una rápida degradación de las columnas al utilizar ILs como modificadores de la fase móvil. Los cationes que contienen la sal de amonio cuaternaria son capaces de degradar los silanoles residuales de las fases estacionarias con base de sílica. Si se utilizan ILs en bajas concentraciones, se observa una mejora en la forma de los picos de los compuestos básicos, pero no hay una diferencia clara entre estos resultados y los obtenidos con aminas clásicas (trietilamina o ciclohexilamina) [10].

Se ha encontrado que los ILs aumentan la microfase heterogénea que se presenta entre la fase estacionaria y la fase móvil a través de la formación de clatratos. Esta función se encontró entre hidrocarburos aromáticos y sales de imidazolio [11]. Tales interacciones crean una estructura extendida que podría jugar un papel importante en los procesos de separación cuando se usan ILs como aditivos de la fase móvil.

En el caso de la cromatografía líquida de fase reversa, se cree que los líquidos iónicos actúan dinámicamente cubriendo el soporte estacionario enmascarando los silanoles residuales [12]. Esta actividad supresora se ve reflejada en mejores formas de los picos, colas reducidas y una resolución mejorada. El catión y anión que constituyen el IL, en la fase móvil, pueden servir como un agente formador de pares iónicos para analitos ionizados [13].

Otra alternativa consiste en fijar el IL a la fase estacionaria por medio de un enlace covalente. Esto genera como principales ventajas, picos más simétricos, incremento en la resolución y disminución de la concentración de solventes orgánicos en la fase móvil [14]. A modo de ejemplo, se utilizó butilimidazolio unido al soporte de sílica mediante uniones metil y propil. La retención para los ácidos carboxílicos analizados en esta columna fue ligeramente mayor con respecto a la columna sin

modificar, principalmente debido a diferencias de hidrofobicidad generadas por el líquido iónico [15].

Una de las fases más estudiadas es la modificada con ILs del tipo metilimidazol [16-18]. En estos trabajos se resaltó la importancia del pH en el proceso de separación indicando que un factor importante de la retención de los analitos en la columna era el componente electrostático.

1.4.6 Referencias bibliográficas

- [1] R.D. Rogers, K.R. Seddon, Ionic liquids--solvents of the future?, *Science*, 302 (2003) 792-793.
- [2] S.T. Handy, Room temperature ionic liquids: different classes and physical properties, *Current Organic Chemistry*, 9 (2005) 959-988.
- [3] M. Koel, Ionic liquids in chemical analysis, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 35 (2005) 177-192.
- [4] H. Zhao, Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81 (2006) 877-891.
- [5] H.L. Ngo, K. LeCompte, L. Hargens, A.B. McEwen, Thermal properties of imidazolium ionic liquids, *Thermochimica Acta*, 357 (2000) 97-102.
- [6] C.M. Gordon, New developments in catalysis using ionic liquids, *Applied Catalysis A: General*, 222 (2001) 101-117.
- [7] K.M. Docherty, C.F. Kulpa Jr, Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids, *Green Chemistry*, 7 (2005) 185-189.
- [8] E.M. Martinis, P. Berton, R.P. Monasterio, R.G. Wuilloud, Emerging ionic liquid-based techniques for total-metal and metal-speciation analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29 (2010) 1184-1201.
- [9] J. Fuller, R.T. Carlin, R.A. Osteryoung, The Room Temperature Ionic Liquid 1-Ethyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate: Electrochemical Couples and Physical Properties, *Journal of the Electrochemical Society*, 144 (1997) 3881-3886.
- [10] P. Bonhote, A.P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts, *Inorganic chemistry*, 35 (1996) 1168-1178.
- [11] J.D. Holbrey, W.M. Reichert, R.G. Reddy, R.D. Rogers, Ionic liquids as green solvents: progress and prospects, in: *ACS Symposium Series*, American Chemical Society Washington, DC, 2003, pp. 121-133.

- [12] M.P. Marszall, T. Baczek, R. Kaliszan, Reduction of silanophilic interactions in liquid chromatography with the use of ionic liquids, *Analytica Chimica Acta*, 547 (2005) 172-178.
- [13] X. Xiaohua, Z. Liang, L. Xia, J. Shengxiang, Ionic liquids as additives in high performance liquid chromatography: Analysis of amines and the interaction mechanism of ionic liquids, *Analytica Chimica Acta*, 519 (2004) 207-211.
- [14] S.J. Liu, F. Zhou, L. Zhao, X.H. Xiao, X. Liu, S.X. Jiang, Immobilized 1, 3-dialkylimidazolium salts as new interface in HPLC separation, *Chemistry Letters*, 33 (2004) 496-497.
- [15] Q. Wang, G.A. Baker, S.N. Baker, L.A. Colen, Surface confined ionic liquid as a stationary phase for HPLC, *Analyst*, 131 (2006) 1000-1005.
- [16] M. Turowski, R. Kaliszan, C. Lallmann, H.G. Genieser, B. Jastorff, New stationary phases for the high-performance liquid chromatographic separation of nucleosides and cyclic nucleotides synthesis and chemometric analysis of retention data, *Journal of Chromatography A*, 728 (1996) 201-211.
- [17] H. Qiu, S. Jiang, X. Liu, N-Methylimidazolium anion-exchange stationary phase for high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1103 (2006) 265-270.
- [18] H. Qiu, S. Jiang, X. Liu, L. Zhao, Novel imidazolium stationary phase for high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1116 (2006) 46-50.

1.5 DISEÑO EXPERIMENTAL Y OPTIMIZACIÓN DE MÚLTIPLES RESPUESTAS

1.5.1 Introducción

El término "optimización" se refiere a la mejora del rendimiento del proceso analítico, es decir, el descubrimiento de las condiciones en las que se obtiene la mejor respuesta [1]. En química analítica, la optimización es una etapa crítica para encontrar el valor que cada factor debe tener para producir la mejor respuesta posible. El diseño multivariado de experimentos (DOE) es una cuestión importante, ya que toma menos tiempo, esfuerzo y recursos con respecto a los procedimientos univariados, facilita la recolección de grandes cantidades de información y reduce al mínimo el número de experimentos [2].

La metodología DOE y la metodología de superficie de respuesta (RSM) han demostrado ser útiles para el desarrollo, mejora y optimización de procesos [3]. La RSM ha sido ampliamente utilizada en aplicaciones analíticas [4-6], el mundo industrial [7, 8] y en bioprocesos [9-11]. DOE y RSM se aplican a las separaciones analíticas y procedimientos de extracción.

La superficie de respuesta del diseño proporciona datos que deben ser en general modelados a través de los mínimos cuadrados apropiados. Cuando un gran número de respuestas deben ser optimizadas (siguiendo los criterios apropiados), la función deseabilidad es la herramienta más popular para ser aplicada [12].

1.5.2 Metodología del diseño experimental

Dos etapas pueden ser consideradas en la optimización del método: (a) una etapa de screening, donde muchos factores son estudiados para identificar aquellos con los efectos significativos sobre las variables críticas, y (b) la optimización, donde los factores son más examinados con el fin de determinar las mejores condiciones analíticas.

Además, el diseño experimental también se utiliza en química analítica para evaluar la robustez del método (para examinar los efectos que pequeños cambios en las condiciones del método de análisis tienen en las respuestas), y la construcción de conjuntos de calibración y validación [13].

Dos estrategias de optimización se pueden distinguir: el univariado y el multivariado. En el primero, sólo un factor varía a la vez, mientras que los demás factores se mantienen constantes. Este procedimiento clásicamente aplicado no tiene

en cuenta interacciones entre los factores. Por otra parte, el número de experimentos es importante cuando el número de factores aumenta, y por lo general, el dominio experimental explorado es más pequeño en comparación con el enfoque multivariado. Por otro lado, en la estrategia multivariada, varios factores se estudian simultáneamente en un número predefinido de experimentos, variando juntos los niveles de todos los factores que intervienen en el proceso [14].

El procedimiento multivariado tiene las siguientes ventajas en relación con la estrategia univariada:

- a) Es posible conocer a fondo el sistema estudiado, se obtiene un conocimiento global del mismo en todo el dominio experimental. De los resultados obtenidos, un modelo matemático puede ser construido para relacionar la respuesta con las condiciones experimentales. La respuesta para cualquier punto del dominio experimental se puede predecir después de una estimación de los coeficientes del modelo.
- b) El número de experimentos es más pequeño que el número de experimentos requeridos en el enfoque univariado, reduciendo costo, esfuerzo y tiempo.
- c) Es posible estudiar las interacciones entre los factores y las relaciones no lineales con las respuestas.
- d) En general, es posible encontrar el óptimo absoluto en el dominio estudiado, mientras que en el enfoque univariado pueden encontrarse máximos locales que dependen de las condiciones iniciales del análisis.
- e) La calidad de la información recopilada en cada punto experimental puede ser conocida. Con el fin de realizar un diseño experimental correcto, la mayor parte de los autores recomiendan considerar los siguientes pasos [3, 15]:

1.5.2.1 Planteamiento del problema

Es necesario tener una idea clara sobre el tema y sobre los objetivos de optimización. El diseño experimental es una herramienta que permite la búsqueda de soluciones a los problemas analíticos adecuadamente definidos. El objetivo del estudio debe estar claramente identificado y especificado, así como debe ser evaluado el tiempo y el costo de la experimentación [3].

1.5.2.2 Selección de las variables de respuesta

Una variable que pueda proporcionar la información necesaria en la evaluación del rendimiento analítico del método debe ser seleccionada para ser sometida al procedimiento de optimización. Esta variable se llama respuesta y, de acuerdo con el objetivo, puede ser necesario observar más de una respuesta [3].

1.5.2.3 Selección de los factores y sus niveles

Todos los factores (variables) que pueden afectar el proceso deben ser cuidadosamente detectados y examinados. El dominio experimental debe ser definido para cada factor, y también una forma de control y medición debe ser establecida. Los factores se pueden dividir en cuantitativos, cualitativos y relacionados a la mezcla. Dado que el número de factores a considerar puede ser importante, es necesario determinar las variables experimentales y las interacciones que tienen una influencia significativa en una o varias respuestas. En los diseños de detección, los factores se examinan por lo general en dos niveles (-1, +1). El rango entre los niveles es el intervalo más amplio que el factor se puede variar para el sistema en estudio y es elegido sobre la base de la información de la literatura o conocimiento anterior [3].

1.5.2.4 Selección de un diseño experimental

Las cuestiones a considerar para la selección del mejor diseño experimental para cada etapa son: (a) objetivo: tipo de problema y la información conocida, (b) número de factores e interacciones que se estudian, (c) validez estadística y eficacia de cada diseño, (d) funcionamiento, costo y restricciones de tiempo, y (e) la facilidad de comprensión y aplicación de la complejidad de cada diseño [3].

1.5.3 Diseños

1.5.3.1 Diseños de screening

Los más ampliamente utilizados en la etapa de selección de factores son factorial completo, factorial fraccional y Plackett-Burman, ya que son económicos y eficientes. El diseño factorial fraccional es uno de los más utilizados para fines de selección, permite la evaluación de un gran número de factores en un pequeño número de experimentos. Diferentes diseños fraccionales se pueden crear para un gran número de factores. Sin embargo, los diseños fraccionales no permiten la estimación de todos los efectos principales y de las interacciones por separado porque algunos de ellos se estiman juntos, es decir, que se confunden. Las principales características se presentan en la tabla 1.5.1.

Tabla 1.5.1. Diseños empleados para la etapa de screening

Diseño	Factor		Res ³	N° de experimentos	Efectos estimados	O ⁴	R ⁵
	Tipo	Número					
Factorial completo de 2 niveles	Numérico	$2 \leq k^1 \leq 5$		2^k	$2^k - 1$		
	Catagórico			2^{k+1}	Efectos principales	Si	Si
Factorial fraccional de 2 niveles	Numérico	> 4	III o $>$	2^{k-p}	R III (efectos principales confundidos con 2 factores)		
	Catagórico				R IV (efectos principales confundidos con 3 factores) R V (efectos principales confundidos con 4 factores)	Si	Si
Plackett–Burman	Numérico	$N - 1$	III	N (múltiplo 4)	Efectos principales confundidos con interacciones de orden superior	Si	Si
	Catagórico						

¹k= número de factores

²p= número de generadores independientes.

³Res = resolución

⁴O = ortogonalidad

⁵R = rotabilidad

El diagrama de Pareto es una gráfica en donde se organizan diversas clasificaciones de datos por orden descendente, de izquierda a derecha por medio de barras sencillas después de haber reunido los datos para calificar los factores en estudio, de modo que se pueda asignar un orden de prioridades y de esta manera clasificar los factores [16]. Pareto es una herramienta de análisis de datos ampliamente utilizada, es útil en la determinación de variables significativas de un modelo, permite seleccionar los factores que afectan de modo significativo la respuesta analítica que se busca medir y poder desestimar aquellos factores que no afectan la respuesta analítica de modo significativo.

1.5.3.2 Diseños de optimización

Los diseños más utilizados en este paso son: factorial completo en tres niveles, central compuesto, Box-Behnken, D-óptimo y diseños Doehlert. Permiten obtener datos experimentales que luego se montan en un modelo polinomial de múltiple regresión lineal con el fin de caracterizar una superficie de respuesta [17, 18]. Las características principales de los diseños más utilizados se presentan en la tabla 1.5.2.

Tabla 1.5.2. Diseños de superficie de respuesta más utilizados para el paso de optimización.

Diseño	Tipo de factores	Nivel factorial	Nº experimentos	O	R
Central compuesto	Numérico	5	$2^k + 2k + C_p^1$	Si-	Si-
	Categórico			No	No
Box-Behnken	Numérico	3	$2k(k-1) + C_p$		
	Categórico			Si	Si
Factorial completo de 3 niveles	Numérico	3	3^k		
	Categórico			Si	No
Doehlert Matrix	Numérico	Diferente para cada factor	$k^2 + k + C_p$		
	Categórico			No	No
D-Optimal	Numérico	Diferente para cada modelo	Subconjunto seleccionado de todos los posibles combinaciones		
	Categórico			No	Si

¹C_p es el número de puntos centrales

1.5.4 Modelado

1.5.4.1 Construcción de modelos para el screening

El enfoque general para el análisis estadístico del diseño de screening para cada respuesta que se analiza incluye: (1) la estimación de los efectos de los factores y el examen de sus signos y magnitudes, (2) la construcción de un modelo inicial para la respuesta, (3) realizar pruebas estadísticas, (4) refinar el modelo con la eliminación de cualquier variable no significativa desde el modelo inicial, y (5) el análisis de residuos con el fin de comprobar la adecuación del modelo y las hipótesis [17].

El efecto de cada factor sobre cada respuesta se estima como la diferencia entre la respuesta media de los experimentos con signos positivos y la respuesta promedio de los experimentos con signos negativos. Una alternativa es determinar el efecto de los factores en la estimación de los coeficientes del modelo. Las observaciones o las respuestas pueden ser descritas por un modelo estadístico lineal.

Una de las maneras para evaluar la importancia de los efectos y decidir cuál de ellos debe ser considerado en el modelo final y cuáles deberían incluirse en el error es utilizando parcelas normales y medias normales de probabilidad. Las variables seleccionadas a partir de cualquier análisis gráfico deben examinarse por análisis de varianza (ANOVA) y, si es necesario, el modelo debe reducirse mediante la eliminación de las variables no significativas del modelo inicial.

ANOVA es una colección de modelos estadísticos utilizados para analizar las diferencias entre medias de grupos y sus procedimientos asociados. Por último, el analista debe seleccionar todos los factores que afectarán significativamente a cada respuesta. Cuando el número de factores es demasiado grande, el analista debe recurrir a la experiencia y el conocimiento para elegir cada factor correctamente y juzgar sus efectos [17].

1.5.4.2 Construcción de modelos de superficies de respuesta

Una vez que los datos correspondientes a las respuestas evaluadas en la etapa de optimización se han recogido, un modelo matemático puede construirse con una función polinomial de segundo orden para cada respuesta. En general, sólo las interacciones de segundo orden se tienen en cuenta porque las interacciones de órdenes más altos no son significativas.

La ecuación del modelo es generalmente provista por la metodología de los mínimos cuadrados (LS), es una técnica de regresión múltiple que se ajusta a un modelo para establecer los datos experimentales y encontrar valores de coeficientes que minimicen los residuos. En todos los casos, el modelo ajustado debe ser capaz de

describir correctamente el rendimiento de los datos con el fin de hacer predicciones estadísticas.

En el caso en el que sólo dos factores están optimizados, RSM genera una vista gráfica del sistema, ya que la respuesta puede ser representada como una superficie sólida en un espacio tridimensional. Cuando más de dos factores se optimizan, la representación gráfica se hace para dos de ellos, manteniendo las otras en valores constantes. Además, los mapas de contorno pueden ser representados como otra forma de visualización. Este gráfico de contorno se compone de líneas de respuesta constante, que corresponden a una altura específica de la respuesta [19].

En la figura 1.5.1 se puede observar a modo de ejemplo las superficies de respuesta obtenidas por Ferreira y Col. [6] en el estudio de la determinación de antioxidantes fenólicos en muestras de té.

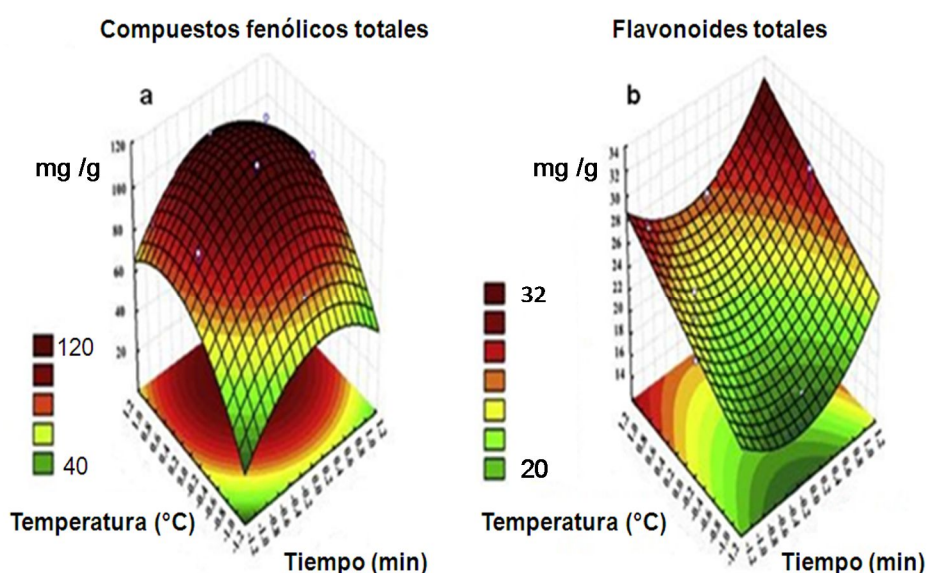


Figura 1.5.1 Ejemplo de superficies de respuesta. Estudio de optimización multivariada de compuestos antioxidantes fenólicos en muestras de té blanco y efecto de las variables significativas (temperatura y tiempo) en la concentración (mg g^{-1}) de: a) Compuestos fenólicos totales y b) Flavonoides totales.

1.5.4.3 Evaluación del modelo

Cuando se aplica regresión LS, es habitual asumir que los valores esperados de los errores son cercanos a cero, independientes de la varianza constante y, al menos, una distribución aproximadamente normal. Sin embargo, la respuesta se mide siempre con cierto error [18].

Para determinar si el ajuste de regresión múltiple es importante para el modelo de segundo orden, una prueba de análisis de ANOVA debe ser aplicado. El modelo se considera satisfactorio cuando la regresión es significativa y se obtiene una no

significativa falta de ajuste para el nivel de confianza seleccionado. Sin embargo, la obtención de un modelo significativo no necesariamente significa que explique correctamente la variación en los datos. Por consiguiente, es necesario evaluar los gráficos de residuos, el coeficiente de regresión (R^2) y el coeficiente de regresión ajustado (R^2_{adj}), que representan la varianza explicada por el modelo.

La gráfica de probabilidad normal indica si los residuos siguen una distribución normal, una de las condiciones básicas para la validez de ANOVA. La homogeneidad de la varianza (otro requisito para la validez ANOVA) se puede evaluar por la trama residual frente a los valores predichos de respuesta. Dos diagnósticos adicionales también son importantes: (a) los residuos frente al orden de ensayo experimental, que permite detectar variables incontroladas que pueden haber influido en la respuesta durante el experimento, y (b) los residuos frente a los niveles de factor de cada diagnóstico, que comprueba si la varianza explicada por el modelo es diferente en los diversos niveles de un factor [18].

Además, la evaluación de los residuos “estudentizados” externamente son útiles para detectar puntos de datos que no están bien equipados por el modelo seleccionado (valores extremos). El “Leverage” es un parámetro que indica la posibilidad de que un punto de diseño influya en el ajuste del modelo. Altos niveles de leverage no son deseables porque llevan a errores inesperados, que podrían influir fuertemente en el modelo. Otras formas de evaluar los puntos influyentes anormales son los diagnósticos DFFITs (Diferencia entre valores predichos) y DFBETAs (Diferencia entre coeficientes de regresión) que determinan las diferencias en el ajuste del modelo cuando se suprime el valor de una respuesta. El DFFITS mide el cambio en valores predichos, mientras que DFBETAS evalúa la diferencia en cada coeficiente de regresión. Por último, la distancia de Cook, calculada como el cuadrado de la distancia euclídea entre la estimación de mínimos cuadrados basado en todos los puntos del vector y la estimación obtenida por suprimir el punto i -ésimo, es una medida de la cantidad de cambios en la regresión si no se toma en cuenta este punto [18].

1.5.4.4 Transformación de la respuesta

Después de una evaluación general del modelo propuesto, puede ocurrir que la aplicación de la transformación de datos permita un mejor ajuste del sistema. Esta condición se encuentra generalmente en dos casos: (a) la respuesta es bastante grande, o (b) en el modelo supuesto, normalidad y homocedasticidad no se cumplen. En la práctica, algunas variables de respuesta siguen distribuciones de Poisson, binomial o gamma, en el que la varianza de la respuesta no es constante, sino que

está relacionada de alguna manera a la media [18, 20]. Una distribución anormal del "tipo cuerno" o "en forma de s" se produce en el gráfico de los residuos.

Las transformaciones aplican una función matemática a todos los datos de respuesta, lo que genera un nuevo conjunto de datos que cumplen los supuestos que hacen que ANOVA sea válida. A continuación, un nuevo modelo puede ser construido para explicar mejor el comportamiento de los datos.

Un método general y ampliamente utilizado para la transformación de los datos en modelos lineales fue desarrollado por Box y Cox [21]. Esta familia de herramientas de transformación se utiliza ampliamente para lograr una transformación normalizadora. La elección apropiada de una transformación se basa en consideraciones estadísticas de acuerdo con el tipo de distribución derivada de los residuos. En general, el mejor valor λ se encuentra en el punto mínimo de la curva generada por el logaritmo natural de la suma de cuadrados de los residuos, es decir, el valor λ que genera el conjunto de datos con los residuos inferiores [22]. Es importante tener en cuenta que, el ajuste de un modelo a una respuesta transformada, debe someterse a una transformación posterior (usando la operación matemática inversa de la transformación empleada) para hacer una interpretación adecuada.

1.5.4.5 Evaluación de coeficientes individuales en los modelos

En cada modelo, el significado de los términos debe ser evaluado por ANOVA, que realiza una comparación de la variación en la respuesta con la variación debida a errores aleatorios. En general, los términos que no son significativos en el modelo se eliminan para obtener el modelo más simple que describa al sistema.

Más de una posible estrategia puede ser seguida en esta evaluación. En la estrategia de eliminación hacia atrás, un modelo completo está construido en un principio, a continuación, cada término se evalúa mediante ANOVA, los términos menos significativos se retiran del modelo. Esta iteración se detiene cuando todos los términos restantes satisfacen el criterio especificado [3].

Al hacer la selección hacia adelante, todos los bloques y los términos son forzados a un ajuste de los datos. Los términos restantes son considerados, a partir de un modelo de regresión simple y usando el único término que tiene la mayor correlación con la respuesta. Se añaden los términos con el más bajo valor de probabilidad parcial al modelo. Para diseños con factores categóricos, se añaden los términos jerárquicamente. Este algoritmo puede no ser tan robusto debido a que algunos términos no pueden tener la oportunidad de ser incluidos en el modelo.

La regresión por etapas es una combinación de hacia adelante y hacia atrás. En primer lugar, todos los bloques y las condiciones forzadas están equipados a los

datos. Luego, se utiliza un simple modelo de regresión, con el término único con la mayor correlación con la respuesta. Después de esto, se añaden términos, se eliminan o cambian, y el procedimiento es detenido cuando no hay una mejora adicional [14].

La falta de ajuste del modelo resultante, incluyendo términos significativos y los que quedan para mantener la jerarquía, se evalúan de nuevo por ANOVA. Finalmente, el modelo ajustado puede ser evaluado en forma lineal, lineal con interacción, cuadrática o cúbica [14].

1.5.4.6 Localización óptima

Una forma adecuada para encontrar la ubicación óptima es a través de la representación gráfica del modelo. Dos tipos de gráficos pueden resultar útiles: (a) la superficie de respuesta en tres dimensiones y (b) la gráfica de curvas de nivel que es la proyección de la superficie en un plano, representada como líneas de respuesta constante. Cada contorno corresponde a una altura específica de la superficie. En estos gráficos la respuesta se representa como una función de dos factores.

De acuerdo con el criterio de optimización establecido, el valor óptimo buscado puede corresponder a un máximo, un mínimo o un valor específico, que se puede encontrar por simple inspección visual del gráfico. Cuando se estudian más de dos factores, los que no son trazados deben establecerse en un valor constante, por lo que una parte limitada del dominio experimental se muestra y el óptimo no necesariamente es visto en el gráfico. Por esta razón, el valor de la variable fija se debe seleccionar con mucho cuidado. La superposición de gráficos de contorno construidos con combinación de tres factores permite buscar visualmente la respuesta satisfactoria. Sin embargo, si están siendo más de tres factores analizados, la superposición de gráficos de contorno se vuelve difícil. Por lo tanto, a veces un enfoque analítico más formal a la superficie de segundo orden es necesario cuando se genera en k dimensiones [23].

Hay que notar que una región de confianza para el punto estacionario debe ser calculada. Esta región es útil porque puede proporcionar una idea acerca de la calidad de la estimación del punto estacionario. El tamaño y la dirección permite considerar niveles de los factores que producen una respuesta significativamente igual a la producida por el punto estacionario, y esto puede proporcionar la ventaja para cambiar el nivel de los factores sin afectar la calidad de la respuesta [23].

1.5.5 Optimización de múltiples respuestas

Cuando el procedimiento de optimización implica más de una respuesta, no es posible optimizar cada respuesta por separado. En la optimización de un proceso o un

método de análisis, la solución global debe ser incluida en una región óptima, dando lugar a un cierto grado de cumplimiento de los criterios propuestos para cada variable del sistema, es decir, una solución de compromiso debe ser encontrada [4].

1.5.5.1 Optimización gráfica

La superposición de los trazados de contorno de cada respuesta individual, permite estimar la solución conjunta siempre que el número de respuestas y factores no sea demasiado grande [3]. Si los valores óptimos para cada respuesta se localizan en diferentes regiones, será difícil encontrar gráficamente las condiciones que a la vez satisfagan todas las respuestas. El nivel de dificultad aumenta a medida que estas regiones óptimas se vuelven más distantes unas de otras y no se cortan a sí mismas. Una alternativa es transformar una respuesta múltiple en una sola respuesta [4].

1.5.5.2 Función deseabilidad

Es una de las soluciones para optimizar múltiples respuestas. Se basa en la idea de que la calidad de un producto o proceso que tiene muchas características es completamente inaceptable si una de ellas está fuera de un límite "deseable". Su objetivo es encontrar condiciones operativas que garanticen el cumplimiento de los criterios de todas las respuestas involucradas y, al mismo tiempo, proporcionen el mejor valor de compromiso en la respuesta conjunta. Esto es logrado mediante la conversión de las múltiples respuestas en una sola, es decir la combinación de las respuestas individuales en una función compuesta [3].

La función deseabilidad de Derringer (D) permite al analista encontrar las condiciones experimentales (niveles de factor) para alcanzar el valor óptimo para todas las variables evaluadas, incluyendo las prioritarias del investigador durante el procedimiento de optimización.

Los niveles de factor también se pueden incluir en el procedimiento de optimización, con el fin de dar prioridad a la utilización de determinadas condiciones adecuadas dentro de la región experimental. Se debe tener en cuenta que el objetivo de un procedimiento de optimización es encontrar un buen conjunto de condiciones que se adapten a todos los objetivos [18].

La función deseabilidad global puede ser representada gráficamente para el espacio experimental. La función normalmente encuentra más de una combinación de los niveles de factor donde las respuestas son aceptables y representadas como una parte superior plana en la superficie. En estos casos, se puede decir que la optimización ha generado una solución sólida.

El paso final en la optimización de respuestas múltiples es predecir los valores de las diferentes respuestas que llevan a la óptima combinación de factores utilizando los modelos ajustados. Se deben llevar a cabo análisis para verificar las predicciones. Hay que notar que el éxito de la función deseabilidad depende totalmente de la calidad de los modelos empleados en el proceso de optimización [24].

Aspectos de interés que deben tenerse en cuenta son: (a) el enfoque de conveniencia, que consiste en una optimización unidimensional lo que no significa que siempre sea fácil de buscar los máximos de D, y (b) D no es diferenciable, por lo que la variante de algoritmos tiene que ser utilizada. En este contexto, los valores críticos para la aceptabilidad, así como la forma de la función y el peso relativo de las diferentes respuestas, son todos (más o menos) definidos arbitrariamente "a priori" por el usuario. Por otra parte, D se obtiene por el producto de deseabilidades individuales, donde cada una tiene su propio error [24].

1.5.6 Aplicación a separaciones analíticas

El DOE se ha aplicado ampliamente a una variedad de técnicas analíticas. La mayor parte de las aplicaciones han estado dirigidas a resolver inconvenientes en técnicas de separación [7].

En el desarrollo de métodos analíticos basados en técnicas tales como HPLC, GC y CE, el analista por lo general tiene que apelar a la optimización de respuestas múltiples. Esto se debe a que varias respuestas son con frecuencia de interés, teniendo en cuenta las características analíticas del método, como separación entre picos de analitos, tiempo de análisis y características del pico (como el ancho y la simetría). Sin embargo, la maximización de la resolución mínima puede ser a veces un inconveniente [25]. Este hecho puede deberse a dos razones:

- a) Normalmente, cuando hay dos picos (A y B), eluyendo una vez como AB y una vez como BA, cuando la separación es la misma, la resolución (R) es la misma. Sin embargo, para el modelado es perjudicial, porque dos situaciones diferentes conducen a la misma respuesta.
- b) En la optimización se crean situaciones y se evalúan las condiciones donde se producen cambios de selectividad. La separación óptima está en las condiciones en que la resolución mínima se convierte en máxima, es decir, donde se separan mejor el par de picos menos separados. Sin embargo, diferentes pares de picos pueden ser responsables de la resolución crítica.

1.5.7 Referencias bibliográficas

- [1] P.W. Araujo, R.G. Brereton, Experimental design II. optimization, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15 (1996) 63-70.
- [2] R.G. Brereton, *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant*, John Wiley & Sons, 2003.
- [3] R.H. Myers, D.C. Montgomery, C.M. Anderson-Cook, *Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments*, John Wiley & Sons, 2009.
- [4] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76 (2008) 965-977.
- [5] G. Hanrahan, R. Montes, F.A. Gomez, Chemometric experimental design based optimization techniques in capillary electrophoresis: a critical review of modern applications, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390 (2008) 169-179.
- [6] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandao, E.G.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. Dos Reis, A.S. Souza, Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods, *Analytica chimica acta*, 597 (2007) 179-186.
- [7] N. Ortega, S.M. Albillos, M.D. Busto, Application of factorial design and response surface methodology to the analysis of bovine caseins by capillary zone electrophoresis, *Food Control*, 14 (2003) 307-315.
- [8] J.V. Nardi, W. Acchar, D. Hotza, Enhancing the properties of ceramic products through mixture design and response surface analysis, *Journal of the European Ceramic Society*, 24 (2004) 375-379.
- [9] Z.K. Awad, T. Aravinthan, Y. Zhuge, F. Gonzalez, A review of optimization techniques used in the design of fibre composite structures for civil engineering applications, *Materials & Design*, 33 (2012) 534-544.
- [10] K.M. Lee, D.F. Gilmore, Formulation and process modeling of biopolymer (polyhydroxyalkanoates: PHAs) production from industrial wastes by novel crossed experimental design, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 229-246.
- [11] K. Adinarayana, P. Ellaiah, B. Srinivasulu, R.B. Devi, G. Adinarayana, Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation, *Process Biochemistry*, 38 (2003) 1565-1572.
- [12] W. Zhi, J. Song, F. Ouyang, J. Bi, Application of response surface methodology to the modeling of L-amylase purification by aqueous two-phase systems, *Journal of biotechnology*, 118 (2005) 157-165.

- [13] E. Kristo, C.G. Biliaderis, N. Tzanetakis, Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology, *Food Chemistry*, 83 (2003) 437-446.
- [14] G. Derringer, R. Suich, Simultaneous optimization of several response variables, *Journal of quality technology*, 12 (1980) 214-219.
- [15] R.G. Brereton, Multilevel multifactor designs for multivariate calibration, *Analyst*, 122 (1997) 1521-1529.
- [16] B.C. Sales, A.S. Sefat, M.A. McGuire, R.Y. Jin, D. Mandrus, Y. Mozharivskyj, Bulk superconductivity at 14 K in single crystals *Physical Review B*, 79 (2009) 094521.
- [17] R. Leardi, *Experimental design in chemistry: Analytica chimica acta*, 652 (2009).
- [18] D.L. Massart, B.G. Vandeginste, L.M.C. Buydens, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*, Elsevier Science Inc., 1997.
- [19] R.E. Bruns, I.S. Scarminio, B.d.B. Neto, *Statistical Design Chemometrics, Volume 25 (Data Handling in Science and Technology)*, in, Elsevier, Amsterdam, 2006.
- [20] K.M. Desai, S.A. Survase, P.S. Saudagar, S.S. Lele, R.S. Singhal, Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: case study of fermentative production of scleroglucan, *Biochemical Engineering Journal*, 41 (2008) 266-273.
- [21] W.J. Conover, R.L. Iman, Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics, *The American Statistician*, 35 (1981) 124-129.
- [22] G.E.P. Box, D.R. Cox, An analysis of transformations, *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, (1964) 211-252.
- [23] M.M. De Zan, C.M. Teglia, J.C. Robles, H.c.C. Goicoechea, A novel ion-pairing chromatographic method for the simultaneous determination of both nicarbazin components in feed additives: Chemometric tools for improving the optimization and validation, *Talanta*, 85 (2011) 142-150.
- [24] A.E. Karatapanis, Y.C. Fiamegos, V.A. Sakkas, C.D. Stalikas, Effect of chromatographic parameters and detector settings on the response of evaporative light-scattering detection system using experimental design approach and multicriteria optimization methodology, *Talanta*, 83 (2011) 1126-1133.
- [25] M.r.C. Breitzkreitz, I.M. Raimundo Jr, J.J.R. Rohwedder, C. Pasquini, H.A. Dantas Filho, G.E. José, M.r.C.U. Araujo, Determination of total sulfur in diesel fuel employing NIR spectroscopy and multivariate calibration, *Analyst*, 128 (2003) 1204-1207.

Capítulo 2

REACTIVOS, MATERIALES Y

MÉTODOS

2.1 REACTIVOS

2.1.1 Agua ultrapura

Se utilizó agua ultrapura obtenida mediante un equipo de purificación de agua Milli-Q A-10 Millipore Water Purification System (Billerica, MA, USA). Se utilizó agua bidestilada para la carga del purificador, lo cual aseguró la calidad del agua ultrapura obtenida con un valor de resistividad de 18 MΩcm.

2.1.2 Preparación de soluciones patrón

- Solución patrón de As(III) (1000 mg As L⁻¹)

Se preparó mediante la disolución de 1,75 g de (meta)arsenito de sodio (AsNaO₂) (99%, Fluka, Buchs, Suiza) en agua ultrapura, llevándose a volumen final de 1000 mL en matraz aforado. La solución tuvo una concentración final de HCl de 0,1 mol L⁻¹. Las soluciones de menor concentración fueron preparadas mediante la dilución de la solución patrón de As(III) (1000 mg As L⁻¹) con agua ultrapura y manteniendo la concentración de HCl a un valor constante de 0,1 mol L⁻¹.

- Solución patrón de As(V) (1000 mg As L⁻¹)

Se preparó mediante la disolución de 4,16 g de arseniato ácido de sodio heptahidratado (Na₂HAsO₄·7H₂O) (99,99%, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos) en agua ultrapura, llevándose a volumen final de 1000 mL en matraz aforado. La solución tuvo una concentración final de HCl de 0,1 mol L⁻¹. Las soluciones de menor concentración fueron preparadas mediante la dilución de la solución patrón de As(V) (1000 mg As L⁻¹) con agua ultrapura y manteniendo la concentración de HCl a un valor constante de 0,1 mol L⁻¹.

- Solución patrón de metilarseniato de sodio (1000 mg As L⁻¹)

Se preparó mediante la disolución de 0,397 g de metilarseniato de sodio (CH₃AsNa₂O₃·6 H₂O) (98%, Fluka, Buchs, Suiza) en agua ultrapura, llevándose a volumen final de 100 mL en matraz aforado para finalmente conservarse en frasco color ámbar a 4°C. Las soluciones de menor concentración fueron preparadas mediante la dilución de la solución patrón de MMA (1000 mg As L⁻¹) con agua ultrapura.

- Solución patrón de ácido dimetilarseniato (1000 mg As L⁻¹)

Se preparó mediante la disolución de 0,186 g de ácido dimetilarseniato (C₂H₇AsO₂) (98,6%, Fluka, Buchs, Suiza) en agua ultrapura, llevándose a volumen final de 100 mL en matraz aforado para finalmente conservarse en frasco color ámbar a 4°C. Las soluciones de menor concentración fueron preparadas mediante la dilución de la solución patrón de DMA (1000 mg As L⁻¹) con agua ultrapura.

- Solución patrón de Se(IV) (1000 mg Se L⁻¹)

Se preparó mediante la disolución de 0,219 g de selenito de sodio (Na₂SeO₃) (99%, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos) en agua ultrapura, llevándose a volumen final de 100 mL en matraz aforado. La solución tuvo una concentración final de HCl de 0,1 mol L⁻¹. Las soluciones de menor concentración fueron preparadas mediante la dilución de la solución patrón de Se(IV) (1000 mg Se L⁻¹) con agua ultrapura.

- Solución patrón de Se(VI) (1000 mg Se L⁻¹)

Se preparó mediante la disolución de 0,239 g de selenato de sodio (Na₂SeO₄) (99%, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos) en agua ultrapura, llevándose a volumen final de 100 mL en matraz aforado. La solución tuvo una concentración final de HCl de 0,1 mol L⁻¹. Las soluciones de menor concentración fueron preparadas mediante la dilución de la solución patrón de Se(VI) (1000 mg Se L⁻¹) con agua ultrapura.

- Solución patrón de Se-metionina (1000 mg Se L⁻¹)

Se preparó mediante la disolución de 0,248 g de seleno-L-metionina [CH₃SeCH₂CH₂CH(NH₂)CO₂H] (98%, Sigma, Milwaukee, Estados Unidos) en agua ultrapura llevándose a volumen final de 100 mL en matraz aforado para finalmente conservarse en frasco color ámbar a 4°C. Las soluciones de menor concentración fueron preparadas mediante la dilución de la solución patrón de SeMet (1000 mg Se L⁻¹) con agua ultrapura.

- Solución patrón de selenometilselenocisteína (1000 mg Se L⁻¹)

Se preparó mediante la disolución de 0,276 g de clorhidrato de selenometilselenocisteína (C₄H₉NO₂Se.HCl) (95%, Sigma, Milwaukee, Estados Unidos) en agua ultrapura llevándose a volumen final de 100 mL en matraz aforado para finalmente conservarse en frasco color ámbar a 4°C. Las soluciones de menor

concentración fueron preparadas mediante la dilución de la solución patrón de SeMeSeCys (1000 mg Se L⁻¹) con agua ultrapura.

2.1.3 Preparación de soluciones concentradas

- Preparación de solución de borohidruro de sodio (diversas concentraciones)

Se preparó a partir de NaBH₄ (98% Sigma-Aldrich) disolviendo la cantidad pesada previamente en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) (98% Sigma-Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos) al 0,05% (p/v) y llevando posteriormente a aforo. Las soluciones se preparaban en el momento de realizar las mediciones por AFS.

- Preparación de solución de yoduro de potasio (diversas concentraciones)

Las soluciones de yoduro de potasio KI (99%, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos) para las determinaciones totales de As por HG-AFS se prepararon al 10% (p/v) en agua ultrapura y de allí se tomaba una alícuota para llevar al 1% (p/v) en matraz aforado donde se encontraba el analito con el medio de digestión. Las soluciones de KI para especiación de Se como medio reductor en la fotodisociación UV se prepararon en una solución de hidróxido de potasio al 0,2% (p/v).

- Preparación de soluciones reguladoras

a) Solución reguladora de pH ácido acético-acetato (2 mol L⁻¹): Fue preparada a partir de una solución 2 mol L⁻¹ de ácido acético 99,7% (p/p), Merck, Darmstadt, Alemania) y ajustada a pH 4 con solución 0,1 mol L⁻¹ de NaOH.

b) Solución reguladora de pH ácido cítrico-citrato (2 mol L⁻¹): Fue preparada a partir de una solución 2 mol L⁻¹ de ácido cítrico (99,5% (p/p), Sigma-Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos), y ajustada a pH 2,5; 3,5 y 5 con 0,1 mol L⁻¹ de NaOH.

c) Solución reguladora de pH fosfato diácido-fosfato ácido (2 mol L⁻¹): Fue preparada a partir de una solución 2 mol L⁻¹ de fosfato diácido de amonio (99,99% (p/p), Merck, Darmstadt, Alemania), y ajustada a pH 6 con 0,1 mol L⁻¹ de HCl.

d) Solución reguladora de pH fosfato dibásico-fosfato básico (2 mol L⁻¹): Fue preparada a partir de una solución 2 mol L⁻¹ de fosfato dibásico de sodio (99% (p/p), J.T. Baker, New Jersey, Estados Unidos), y ajustada a pH 8,5 con 0,1 mol L⁻¹ de NaOH.

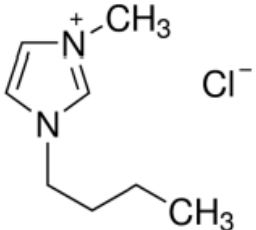
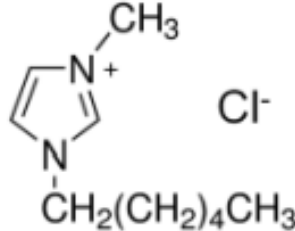
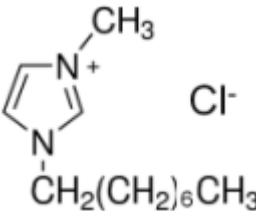
e) Solución reguladora de pH amoniaco-cloruro de amonio (2 mol L⁻¹): Fue preparada a partir de una solución 2 mol L⁻¹ de cloruro de amonio (30% (p/p), J.T. Baker, New Jersey, Estados Unidos), y ajustada a pH 8,5 con 0,1 mol L⁻¹ de HCl.

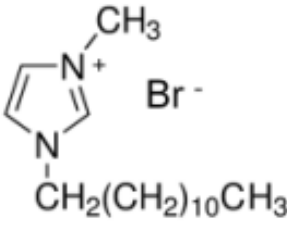
f) Solución reguladora de pH Tris (2 mol L^{-1}): Fue preparada a partir de una solución 2 mol L^{-1} de tris-hidroximetilamonio metano (99,8% (p/p), J.T. Baker, New Jersey, Estados Unidos), y ajustada a pH 8,5 con $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH.

2.1.4 Líquidos iónicos

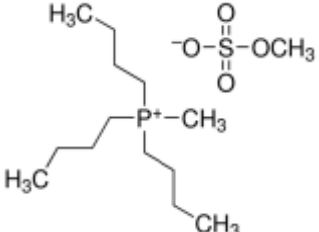
Los ILs utilizados durante el desarrollo experimental de la presente tesis se resumen en la tabla 2.1.1, junto con algunas propiedades relevantes para los procesos de separación cromatográfica. Los ILs fueron adquiridos a Sigma-Aldrich (Milwaukee, Estados Unidos) y en el caso particular de $[\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Br}$ y $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Br}$, éstos fueron sintetizados en nuestro laboratorio según metodología reportada en la literatura [1]. Los IL sintetizados fueron caracterizados por FTIR y RMN para confirmar sus estructuras químicas. Todos los ILs utilizados fueron solubles en agua a una proporción de 5% (p/v).

Tabla 2.1.1 Estructura química y propiedades de los ILs utilizados.

Nombre y fórmula química	Estructura química	Propiedades (25°C) [2, 3]		
		Densidad (g mL^{-1})	Solubilidad en agua	Viscosidad ($\text{mPa}\cdot\text{s}$)
TIPO IMIDAZOLIO				
$[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ Cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio		1,08	Soluble	147
$[\text{C}_6\text{mim}]\text{Cl}$ Cloruro de 1-hexil-3-metilimidazolio		1,03	Soluble	716
$[\text{C}_8\text{mim}]\text{Cl}$ Cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio		1,01	Soluble	337

[C₁₂mim]Br Bromuro de 1- dodecil-3- metilimidazolio		N.R	Soluble	N.R
[C₁₆mim]Br Bromuro de 1- hexadecil-3- metilimidazolio		N.R	Soluble	N.R

TIPO FOSFONIO

[P_{4,4,4,1}]CH₃SO₄ Metilsulfato de tributil(metil) fosfonio		1,067	Soluble	409
--	---	-------	---------	-----

2.1.5 Preparación de fases móviles

Las fases móviles utilizadas en el desarrollo experimental de la presente tesis fueron preparadas con 3 componentes, metanol (99,9% (p/v), J.T. Baker, New Jersey, Estados Unidos), solución madre de IL y solución buffer. En el desarrollo experimental se varió la concentración de metanol, así como la concentración y tipo de IL y buffer. Las mismas fueron llevadas a aforo con agua ultrapura, sonicadas en baño ultrasónico y filtradas con filtros de membrana de poliamida de 0,45 µm de diámetro de poro, mientras que las muestras fueron filtradas con filtros de 0,22 µm de diámetro de poro.

2.1.6 Reactivos generales

- . Ácido nítrico (65% (p/p), Merck, Darmstadt, Alemania)
- . Ácido clorhídrico (37% (p/p), Merck, Darmstadt, Alemania)
- . Ácido sulfúrico (97% (p/p), Merck, Darmstadt, Alemania)
- . Metanol (99% (v/v), Merck, Darmstadt, Alemania)
- . Peróxido de hidrógeno (30% (p/v), Merck, Darmstadt, Alemania)
- . Hidróxido de sodio (98%, Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos)
- . Persulfato de potasio (99%, Sigma-Aldrich, Milwaukee, Estados Unidos).

Todos los reactivos que se utilizaron para el desarrollo experimental de la presente tesis de grado fueron de calidad "reactivo analítico" o superior. La presencia de trazas de As o Se fue indetectable en todos los blancos de reactivos preparados.

2.1.7 Referencias bibliográficas

- [1] Q.Q. Baltazar, J. Chandawalla, K. Sawyer, J.L. Anderson, Interfacial and micellar properties of imidazolium-based monocationic and dicationic ionic liquids, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 302 (2007) 150-156.
- [2] K.J. Fraser, D.R. MacFarlane, Phosphonium-based ionic liquids: An overview, *Australian journal of chemistry*, 62 (2009) 309-321.
- [3] S. Zhang, N. Sun, X. He, X. Lu, X. Zhang, Physical properties of ionic liquids: database and evaluation, *Journal of physical and chemical reference data*, 35 (2006) 1475-1517.

2.2 INSTRUMENTACIÓN Y MATERIALES

2.2.1 Cromatógrafo de líquidos de alta rendimiento

La separación cromatográfica de las especies de As y Se se realizó con un sistema cromatográfico compuesto por un desgasificador de vacío YL9101, una bomba cuaternaria YL9110 (YL Instrument Co., Ltd., Seúl, Corea del Sur) y una válvula Rheodyne con un inyector de bucle de 100 μ L (Cotati, CA, EE.UU.).



Figura 2.2.1 Acoplamiento instrumental HPLC-HG-AFS.



Figura 2.2.2 Bomba de HPLC y desgasificador.

2.2.2 Espectrómetro de fluorescencia atómica

La detección de especies de As y Se se realizó con un sistema de digestión Rayleigh PDI-10 UV (con interfase) (Beijing Rayleigh analítica Instrument Corp., Beijing, China) y un espectrómetro de fluorescencia atómica Rayleigh AF-640A. En la Figura 2.2.1 se puede observar el equipo utilizado y en la Figura 2.2.2 la interfase utilizada.

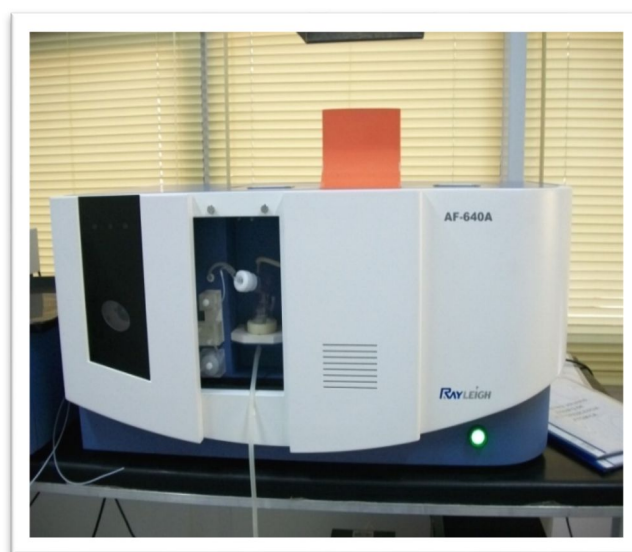


Figura 2.2.3 Equipo de espectrometría de fluorescencia atómica.

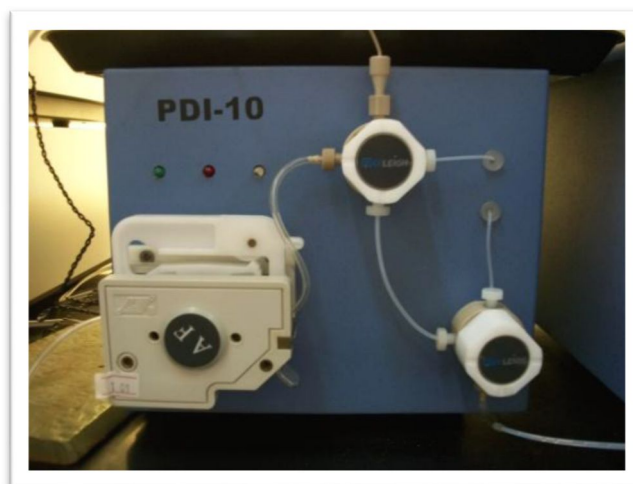


Figura 2.2.4 Interfase de disociación UV para especiación por HPLC-HG-AFS.

2.2.3 pH-metro

Para las mediciones de pH en las diferentes soluciones, se utilizó un pH-metro marca Horiba Ltd. (Kyoto, Japón), modelo "F-51", provisto de electrodo combinado de vidrio modelo 9611-10D, con solución interna 3 mol L^{-1} de KCl. Para su calibración diaria se utilizaron soluciones estándar Merck de pH 4 (ácido cítrico/hidróxido de sodio/ácido clorhídrico), pH 7 (fosfato ácido de sodio/fosfato diácido de potasio) y pH 10 (ácido bórico/cloruro de potasio/hidróxido de sodio).

2.2.4 Unidad de ultrasonido

Se utilizó un baño ultrasónico (40 kHz y 600 W) con control de temperatura (Test Lab, Buenos Aires, Argentina).

2.2.5 Micropipetas

Las mediciones de microvolúmenes para la preparación de soluciones se realizaron con micropipetas automáticas de succión (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

2.2.6 Material de Vidrio

Se dispuso del material de vidrio tanto volumétrico como de uso general. En todos los casos los materiales fueron lavados previamente a su uso mediante su inmersión durante 24 hs en una solución 10% (v/v) de HNO_3 seguido de agua destilada y finalmente agua ultrapura.

2.3 MÉTODOS

2.3.1 Recolección y pretratamiento de muestras

- Muestras de vino para análisis de As

Las muestras de vino embotellado se adquirieron en varias tiendas de vino locales de la ciudad de Mendoza (Argentina), de diferentes varietales de vinos que normalmente se consumen en los mercados locales e internacionales. Los vinos se muestrearon mediante la eliminación del corcho, desechando aproximadamente los primeros 100 mL de líquido. Todas las muestras de vino fueron diluidas en un factor de 10 antes del análisis y el pH se ajustó a 8,5 con una solución buffer de $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$. Finalmente, todas las muestras de vino se filtraron a través de filtros de membrana de poliamida de 0,22 μ de poro y después se inyectaron en la columna de HPLC.

- Muestras de vino, cerveza, levadura y ajo para análisis de Se

Diferentes muestras de cerveza, vino y levaduras fueron adquiridas de los supermercados locales (Mendoza, Argentina). El ajo enriquecido con Se se produjo en la Estación Experimental de San Carlos (Mendoza, Argentina) del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) durante la temporada de cultivo de abril de 2014 hasta diciembre de 2014. El clon de ajo "Rubí INTA" fue el utilizado en este trabajo y fue fortificado con una solución de Se (169 g Se L^{-1}). Se aplicaron cuatro dosis: 0, 5, 10 y 15 kg Se ha^{-1} , con un diseño de parcelas al azar y tres repeticiones. El muestreo se hizo al final del desarrollo de la planta (diciembre). Para la plantación, se utilizaron macetas de 10 L llenas de turba (90%) y suelo (10%). Las plantas se regaron diariamente y se fertilizaron con fertilizante 15N:30P:15K disponible en el mercado cuando era necesario. Una vez realizada la recolección, los bulbos se secaron hasta humedad comercial, se aislaron de las hojas y las raíces, para su posterior almacenamiento a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ después de un proceso de liofilización, molienda y homogeneización.

2.3.2 Determinación total de arsénico y selenio por espectrometría de fluorescencia atómica con generación de hidruros

- Determinación total de As en muestras de vino

Un volumen de 2,0 mL de muestra de vino se mezcló con 5 mL de HNO_3 65% (p/v) en un vaso de precipitados para la digestión. La mezcla se sometió a etapas de

calentamiento secuenciales (15 min a 50°C, 30 min a 100°C y 15 min a temperatura de ebullición). Antes de la determinación total, el As(V) se redujo a As(III) mediante la adición de 2,5 mL de HCl 37% (p/v) y 2,5 mL de KI 10% (p/v). Finalmente, la muestra se diluyó a 25 mL en un matraz volumétrico y la mezcla se dejó reposar durante 1 hora. El As se determinó por HG-AFS bajo las siguientes condiciones: 0,7% (p/v) NaBH₄, 5% (v/v) HCl, tasas de flujo de reductor y portador a 12 ml min⁻¹, velocidad de flujo de argón a 800 ml min⁻¹ y temperatura de atomización a 300°C. Otras condiciones se muestran en la Tabla 2.1.2

Tabla 2.1.2 Condiciones instrumentales para la determinación total de As en muestras de vino.

HG-AFS	
Lámpara	Lámpara de cátodo hueco de alta intensidad de As
Longitud de onda	193,3 nm
Corriente principal	40 mA
Corriente auxiliar	0 mA
Voltaje del fotomultiplicador	-270 V
Agente reductor	NaBH ₄ 0,7% (p/v) en NaOH 0,05% (p/v)
Agente transportador	HCl 5% (v/v)
Flujo de reductor y transportador	12,0 mL min ⁻¹
Flujo de argón	800 mL min ⁻¹
Temperatura de atomización	300°C

• **Determinación total de Se en muestras de alimentos y bebidas**

Para la determinación total de Se por HG-AFS, cerveza (5,0 mL), vino (5,0 mL), levadura (1,0 g) y ajo (1,0 g), las muestras se digirieron con HNO₃, H₂O₂ o HCl en diferentes cantidades de acuerdo a la muestra. Antes de la determinación, una reducción de Se(VI) a Se(IV) se realizó con 3 mL de HCl 6,0 mol L⁻¹ a 100°C por 7 min. Luego, las muestras se filtraron, se ajustó a 20% (v/v) de HCl y se diluyó a 50 mL en un matraz aforado. El Se total se determinó con las siguientes condiciones en AFS: 0,7% (p/v) de NaBH₄ en 0,05% (p/v) de NaOH, caudal de reactivos de 12 mL min⁻¹ de 5% (v/v) de HCl, caudal de argón de 800 mL min⁻¹ y temperatura de atomización de 300°C. Otros parámetros instrumentales se enumeran en la Tabla 2.1.3.

Tabla 2.1.3 Parámetros instrumentales para la determinación total de Se en muestras de alimentos y bebidas.

HG-AFS	
Lámpara	Lámpara de cátodo hueco de alta intensidad de Se
Longitud de onda	196 nm
Corriente principal	40 mA
Corriente auxiliar	0 mA
Voltaje del fotomultiplicador	-270 V
Agente reductor	NaBH ₄ 0,7% (p/v) en NaOH 0,05% (p/v)
Agente transportador	HCl 5% (v/v)
Flujo de reductor y transportador	12,0 mL min ⁻¹
Flujo de argón	800 mL min ⁻¹
Temperatura de atomización	300°C

2.3.3 Especiación de arsénico y selenio por cromatografía líquida de alto rendimiento con detección por fluorescencia atómica

- Especiación de As en muestras de vino

Una fase móvil compuesta de 0,5% (v/v) de [C₈mim] Cl, 5% (v/v) de MeOH y 0,02 mol L⁻¹ de buffer NH₄Cl/NH₃ se preparó con agua ultrapura. Las muestras fueron inyectadas directamente en el sistema HPLC después de un preacondicionamiento de la columna C₁₈ con la fase móvil durante 15 min a un caudal de 0,2 mL min⁻¹. La separación de especies de As se realizó en condiciones isocráticas a 0,5 mL min⁻¹. Las diferentes especies de As separadas por HPLC se detectaron por HG-AFS en línea en las condiciones que se detallan en la Tabla 2.1.4. El área del pico fue empleada para la cuantificación.

- Especiación de Se en muestras de alimentos y bebidas

Para el estudio de especiación en vino y cerveza se empleó una dilución de 5 veces. Luego, se llevaron a cabo ajustes del pH a 6,0 con NaOH diluido y una adición de buffer H₂PO₄⁻ / HPO₄²⁻ a una concentración final de 5,0 x 10⁻³ mol L⁻¹. Especies de Se se extrajeron de 0,2 g de muestras de ajo y de levadura añadiendo 5 mL de solución de buffer Tris (0,05 mol L⁻¹ a pH 7,5) y 0,02 g de proteinasa K para la hidrólisis enzimática. La solución se mantuvo a una temperatura constante de 50°C y

se agitó constantemente durante 24 h. Las soluciones finales de todas las muestras se filtraron con un filtro de celulosa regenerada de 0,22 μ .

Tabla 2.1.4 Parámetros instrumentales para el análisis de especiación de As en muestras de vino.

HG-AFS	
Lámpara	Lámpara de cátodo hueco de alta intensidad de As
Longitud de onda	193,3 nm
Corriente principal	40 mA
Corriente auxiliar	0 mA
Voltaje del fotomultiplicador	-270 V
Agente reductor	NaBH ₄ 1,4% (p/v) en NaOH 0,05% (p/v)
Agente transportador	HCl 8,5% (v/v)
Flujo de reductor y transportador	6,0 mL min ⁻¹
Flujo de argón	900 mL min ⁻¹
Temperatura de atomización	300°C
HPLC	
Columna	Kinetex C ₁₈ (4,6 mm i.d x 100 mm x 2,6 μ m)
Guardacolumna	HPLC Krudkatcher porosidad 0,5 μ m x 0,01 μ g
Fase móvil	0,02 mol L ⁻¹ NH ₄ ⁺ /NH ₃ - 0,5% (v/v) [C ₈ mim] Cl – 5%(v/v) metanol – pH 8,5
Flujo de la fase móvil	0,5 mL min ⁻¹
Volumen de inyección	100 μ L
Temperatura de la columna	25°C
Modo cromatográfico	Isocrático

Las fases móviles A y B se emplearon para la separación cromatográfica. A estaba compuesta de 0,1% (v/v) de [C₆mim] Cl, 5% (v/v) de MeOH y solución buffer 5,0.10⁻³ mol L⁻¹ de H₂PO₄⁻ / HPO₄²⁻. B estaba compuesta de 0,1% (v/v) de [C₈mim]Cl, 5% (v/v) de MeOH y solución buffer 0,05 mol L⁻¹ de H₂PO₄⁻ / HPO₄²⁻. Un volumen de 100 μ L de las muestras filtradas se inyectaron directamente en el sistema de HPLC después del preacondicionamiento de la columna C₈ con la fase móvil A durante 15 minutos a un caudal de 0,2 mL min⁻¹. La separación de especies de Se se llevó a cabo en el modo de gradiente con cambio de las velocidades de flujo de la fase móvil y la concentración de buffer. El área del pico obtenida por RP-HPLC-HG-AFS se empleó para la cuantificación. Otras condiciones experimentales se enumeran en la Tabla 2.1.5.

Tabla 2.1.5 Parámetros instrumentales para el análisis de especiación de Se en muestras de alimentos y bebidas.

HG-AFS	
Lámpara	Lámpara de cátodo hueco de alta intensidad de Se
Longitud de onda	196 nm
Corriente principal	40 mA
Corriente auxiliar	0 mA
Voltaje del fotomultiplicador	-270 V
Agente reductor	NaBH ₄ 1,5% (p/v) en NaOH 0,05% (p/v)
Agente transportador	HCl 12% (v/v)
Tratamiento de reducción post-columna	0,5% (p/v) KI en NaOH 0,2% (p/v)
Flujo de reductor y transportador	6,0 mL min ⁻¹
Flujo del reductor post-columna	1,5 mL min ⁻¹
Flujo de argón	800 mL min ⁻¹
Temperatura de atomización	400°C
HPLC	
Columna	Agilent Zorbax SB-C ₈ (4,6 mm i.d x 150 mm)
Guardacolumna	HPLC Krudkatcher porosidad 0,5 µm x 0,01 plg
Fase móvil	A: 5,0.10 ⁻³ mol L ⁻¹ buffer fosfato - 0,1% (v/v) [C ₆ mim] Cl – 5%(v/v) metanol – pH 6,0 B: 0,05 mol L ⁻¹ buffer fosfato - 0,1% (v/v) [C ₆ mim] Cl – 5%(v/v) metanol – pH 6,0
Flujo de la fase móvil	0-7 min fase móvil A: 0,5 mL min ⁻¹ 7-8 min fase móvil B: 0,5 – 1 mL min ⁻¹
Volumen de inyección	100 µL
Temperatura de la columna	25°C
Modo cromatográfico	Gradiente

Capítulo 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis de especiación de Arsénico en muestras de vino mediante cromatografía líquida de alto rendimiento asistida por líquidos iónicos y detección por espectrometría de fluorescencia atómica

3.1.1 Introducción

El As es un metaloide tóxico que está presente en la corteza terrestre a niveles tan altos como $3,4 \text{ mg kg}^{-1}$ y que se puede encontrar en diferentes valores de concentración en el agua, el suelo, el aire, alimentos, plantas y animales [1]. La toxicidad del As depende fuertemente de su asociación química y la especiación, siendo las especies inorgánicas más tóxicas que las orgánicas [2]. Es por ello que la concentración total de As no proporciona información completa sobre los riesgos toxicológicos reales vinculados a este elemento. En consecuencia, el desarrollo de metodologías modernas para el análisis de especiación de As es sumamente necesario, especialmente para evaluar la calidad de los alimentos incluidos normalmente en la dieta humana.

El As puede estar presente en bebidas alcohólicas, como el vino, debido al uso de herbicidas o insecticidas que contaminan a las plantas de vid. Otras fuentes potenciales de contaminación de As para los vinos incluyen, el tipo de suelo, la calidad del agua utilizada para el riego y los numerosos procedimientos aplicados durante la elaboración del vino, es decir, la recolección, trituración y prensado, fermentación, purificación y condiciones de conservación del producto final [3]. La Oficina Internacional de la Viña y el Vino (OIV) regula la concentración total de As en los vinos a un límite máximo de residuos (LMR) de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ [4]. Este LMR plantea algunos inconvenientes para los químicos analíticos debido a que se requieren técnicas de análisis altamente sensibles para la determinación de As. Por otra parte, esta situación es más compleja cuando el análisis de especiación tiene que ser realizado, ya que la concentración de cada especie de As representa solo una fracción del total de As. Diferentes métodos analíticos sensibles se han reportado para el análisis de especiación de As en vinos utilizando técnicas instrumentales híbridas o acopladas, entre ellas, la cromatografía gaseosa con detección por emisión atómica (GC-AED) [5] y la cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS) [6]. Del mismo modo, se han utilizado técnicas no cromatográficas tales como microextracción líquido-líquido dispersiva

asociada a espectrometría de absorción atómica electrotrémica (IL-DLLME-ETAAS) [7] o espectrometría de fluorescencia atómica por generación de hidruros [8]. Normalmente, los métodos basados en cromatografía utilizan detectores caros, como ICP-MS, mientras que las no cromatográficas requieren mucho tiempo debido a varias etapas experimentales implicadas y tienen limitaciones para separar un gran número de especies. Por otro lado, HPLC acoplada a detectores menos costosos y altamente sensibles, como AFS, es una alternativa valiosa para el análisis de especiación de As, con un tiempo de funcionamiento razonable que permite a los laboratorios de análisis de rutina lograr una frecuencia analítica aceptable.

Las principales especies de As que se han encontrado en vinos han sido As(III), As(V), MMA y DMA [9-11]. Técnicas cromatográficas acopladas tales como HPLC-ICP-MS y HPLC-AFS han sido útiles para la determinación de todas estas especies de As en un solo procedimiento cromatográfico [12]. Sin embargo, la alta concentración de etanol en muestras de bebidas complejas, como el vino, debe tenerse en cuenta especialmente cuando los detectores AFS o ICP-MS se utilizan debido al aumento en la señal de fondo y los efectos de pérdida de sensibilidad causados por disolventes orgánicos [9-12]. Por lo tanto, la técnica cromatográfica más solicitada para la especiación de As ha sido la de intercambio aniónico (AEC), ya que los disolventes orgánicos no son necesarios en la fase móvil. Por otro lado, HPLC de fase reversa por formación de pares iónicos (IP-RP-HPLC) ha tenido éxito para la separación de especies de As [13]. Por otra parte, diferentes reactivos formadores de pares iónicos se han utilizado como aditivos de fase móvil en IP-RP-HPLC-HG-AFS para separar especies de As incluyendo, bromuro de dodecildimetilamonio (DDAB), hidróxido de tetrabutilamonio (TBA) o sulfonato de hexano [14].

Los ILs tienen propiedades únicas, tales como presión de vapor insignificante, buena estabilidad térmica y diferentes comportamientos de solubilidad en función de los aniones y cationes que los constituyen [15]. Dado que algunos ILs tienen la capacidad de formar pares de iones con diferentes especies [16], esta propiedad se ha aprovechado para desarrollar metodologías de IP-RP-HPLC empleándolos como aditivos en la fase móvil [17]. Por lo tanto, los ILs tendrían un comportamiento dual: 1) anión o catión de ILs podrían interactuar con la fase estacionaria y modificar sus propiedades y 2) podrían interactuar con los analitos cambiando su coeficiente de distribución y de retención en la fase estacionaria. Sin embargo, los mecanismos exactos por los que los ILs producen la separación de los analitos no han sido completamente explicados y demostrados. Las ventajas de usar ILs en separaciones por HPLC se pueden resumir en la mejora de la forma de los picos, mejor resolución, la supresión de los silanoles y cambios favorables en el comportamiento de retención

de los analitos [18]. Por otro lado, ILs han sido escasamente explorados como modificadores de la fase móvil en el análisis de especiación elemental por RP-HPLC-ICP-MS [14] y su aplicación en la RP-HPLC-AFS no se ha estudiado.

En el presente trabajo de tesina, se llevó a cabo un estudio completo de los efectos de varios ILs sobre la separación y determinación de diferentes especies de As mediante la técnica híbrida RP-HPLC-HG-AFS. Los mecanismos implicados en la separación de As(III), As(V), MMA y DMA se evaluaron críticamente para comprender cómo los ILs mejoran las condiciones de separación. Se estudió el efecto de los ILs de tipo metilimidazolio de C₄-C₁₆ y metilsulfato de tributil(metil)fosfonio utilizados como aditivos de fase móvil. Asimismo, las condiciones de generación de hidruros se optimizaron por una metodología multivariada considerando los posibles efectos de cada IL. Finalmente, se demuestra la aplicación de la metodología para realizar el análisis de especiación de As en diferentes variedades de vinos de la provincia de Mendoza.

3.1.2 Efecto de diferentes líquidos iónicos sobre la detección de las especies de Arsénico por HG-AFS

Se realizaron estudios iniciales con el fin de evaluar un posible efecto de los ILs propuestos como aditivos de fase móvil sobre la intensidad de fluorescencia de las especies de As en estudio. Como es conocido, los solventes orgánicos volátiles como el etanol pueden tener una profunda influencia en las señales de AFS para As y podrían afectar su sensibilidad [8]. Sin embargo, no existen informes sobre la influencia de los ILs en la señal de fluorescencia y en la generación de arsina. Anteriormente, algunos autores han informado que la mejora de la sensibilidad causada por algunos ILs sobre la señal de AFS, muy probablemente, es debido a una mejora de la generación de vapores de Au, Cu, Ni y Ag [18-20]. Este efecto fue explicado en base a la propiedad de los ILs para inhibir la coalescencia de las nanopartículas posiblemente formadas durante la generación de vapores de metales, y por lo tanto, un número mayor de especies de metales volátiles alcanzan el atomizador. Este mecanismo no se puede aplicar a As ya que este metaloide no forma nanopartículas. Por otra parte, los ILs tienen una estructura con alta carga orgánica, lo que plantea algunas preguntas sobre una posible influencia en la formación de arsina. Teniendo en cuenta todas las razones antes mencionadas, se ensayó el efecto de los diferentes ILs utilizados para el estudio de la sensibilidad cromatográfica.

Para evaluar la influencia de los ILs en la señal de fluorescencia de As, cada especie de As se midió en presencia de fase móvil con IL a concentraciones de 0%,

0,2% y 0,8% (v/v). Para este estudio, las condiciones de generación de hidruros se adoptaron a partir de un trabajo previo realizado en nuestro grupo (QUIANID) [10]. Las concentraciones de los reactivos empleados en esta evaluación fueron: 12,5% (v/v) de HCl, 1,1% (p/v) de NaBH₄ en 0,05% (p/v) de NaOH. La velocidad de flujo de estas soluciones fue de 5,6 mL min⁻¹ y el caudal de argón de 600 mL min⁻¹. El pH se ajustó a 2,0 con un sistema buffer cítrico/citrato a 0,02 mol L⁻¹. Otras condiciones están mencionadas en la Tabla 2.1.4 Las fases móviles conteniendo los IL a diferentes concentraciones se inyectaron en el detector AFS mediante la bomba de HPLC a un caudal de 1,0 mL min⁻¹.

Es importante mencionar que el As(III) es la especie con el estado de oxidación más favorable para generar arsina. Otras especies de As también forman compuestos volátiles que se pueden atomizar, pero lo hacen a rendimientos más bajos [21]. El comportamiento de la señal de fluorescencia de la especie de As, según los diferentes ILs empleados se muestra en la Figura 3.1.1. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la señal de fluorescencia atómica para As(III) se vio afectada por todos los ILs en el intervalo de concentración evaluado, disminuyendo en algunos casos hasta el 50% el área del pico. As(V), MMA y DMA disminuyeron su señal de fluorescencia un 50%, 30% y 60% en promedio, respectivamente, con respecto a las condiciones ideales de generación de hidruros de As(III). No hubieron diferencias significativas cuando la concentración de IL aumentó de 0,2% (v/v) (Figura 3.1.1 a) a 0,8% (v/v) (Figura 3.1.1 b) con ILs C₄-C₈ y tipo fosfonio. En el caso de [C₁₂mim]Br a 0,2%, se observó un aumento de la señal de As(V), MMA y DMA. Se necesitan más estudios para comprender este comportamiento. [C₁₂mim]Br a 0,8% (v/v) no pudo ser evaluada debido a la formación de espuma en el separador gas-líquido de la unidad de detección. [C₁₆mim]Cl mostró el mismo comportamiento con concentraciones incluso tan bajas como 0,05% (v/v). La formación de espuma en varios tensioactivo es un comportamiento común y la longitud de la cadena alquilo del IL aumenta el efecto tensioactivo. De acuerdo con estos resultados, se puede afirmar que los ILs interfirieron en la generación de AsH₃ cuando As(III) fue el sustrato inicial. Basándose en estos resultados, el efecto de los ILs en la separación de especies de As en los experimentos por HPLC se ensayó a concentraciones de 0,2% y 0,5% (v/v), mientras que 0,8% (v/v) no se incluyó debido a que con [C₁₂mim] Br no fue posible realizar la detección de los analitos.

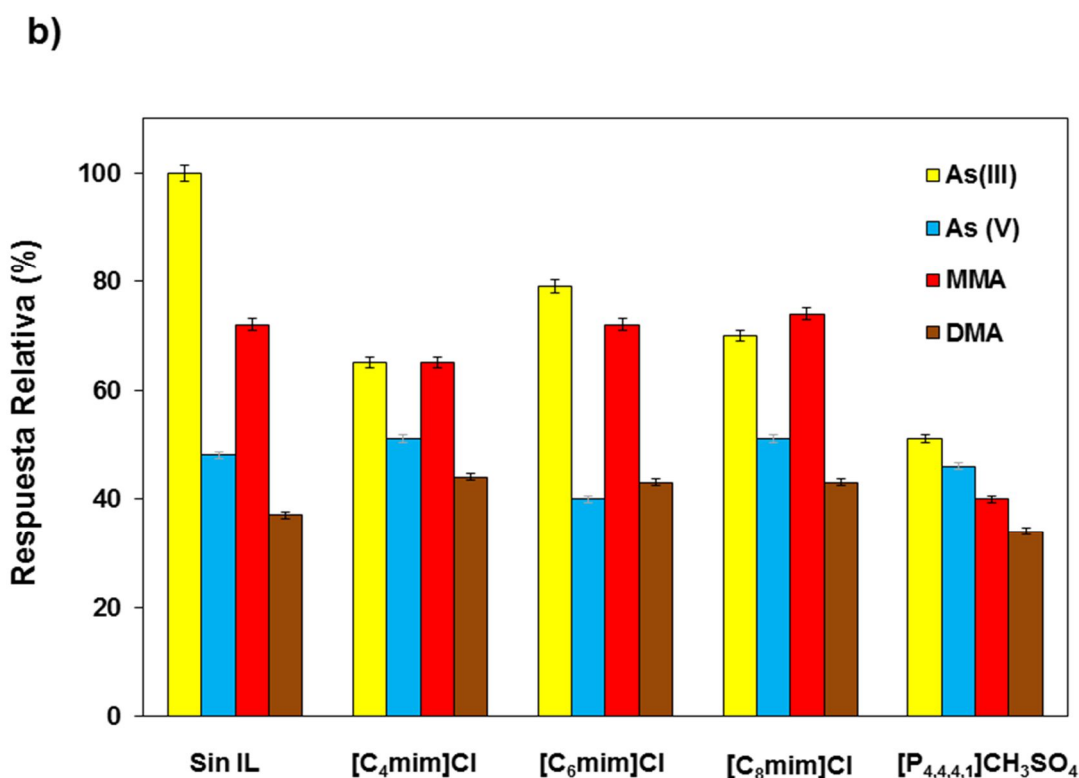
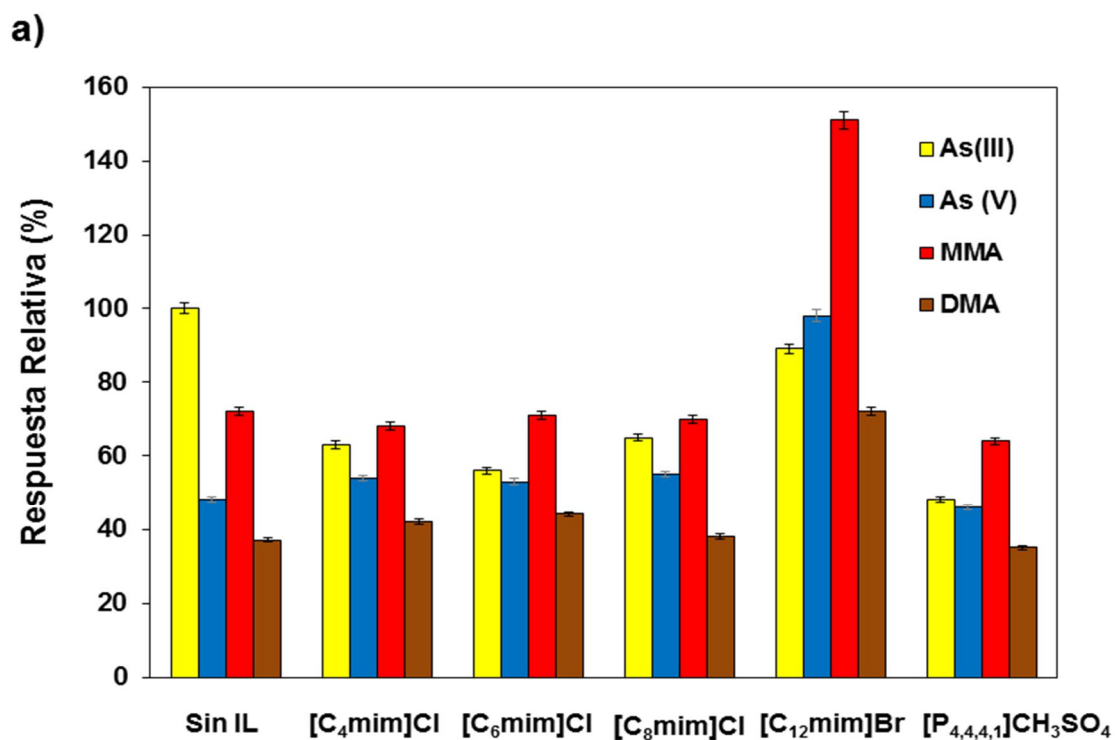


Figura 3.1.1 Respuesta relativa de cada especie de As con respecto a la de As(III) en presencia de los diferentes ILs estudiados en este trabajo. a) 0,2% (v/v) IL b) 0,8% (v/v) IL. La concentración de cada especie fue de 200 $\mu\text{g As L}^{-1}$.

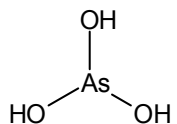
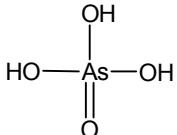
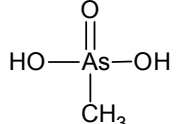
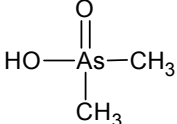
3.1.3 Optimización de los parámetros cromatográficos para la separación de las especies de As

Las especies estudiadas más comunes en el análisis de especiación son aniónicas y altamente polares. Por lo tanto, la cromatografía de intercambio aniónico ha sido una técnica aplicada de forma rutinaria para la separación de especies de As. Sin embargo, la RP-HPLC también se ha empleado con buenos resultados, principalmente mediante el uso de varios reactivos de formación de pares iónicos, que permiten una gran variedad de posibles separaciones [11]. En esta parte del trabajo de tesina, se estudió la aplicación de diferentes ILs y mecanismos de separación de RP-HPLC con el objetivo de realizar el análisis de especiación de As en una muestra compleja como es el vino.

3.1.3.1 Efecto del pH sobre la separación de especies de Arsénico

El equilibrio de disociación de las especies de As depende en gran medida del pH de las soluciones y los valores de pKa (ver Tabla 3.1.1) [1]. Del mismo modo, la formación de pares iónicos queda condicionada por el pH, puesto que los reactivos de formación de pares iónicos son normalmente ácidos o bases débiles [10].

Tabla 3.1.1 Nombres y propiedades de especies de As incluidas en este trabajo.

Compuesto	Abreviación	Fórmula	Estructura	pKa
Arsenito	As(III)	As(OH) ₃		pKa ₁ = 9,23 pKa ₂ = 12,1 pKa ₃ = 13,4
Arseniato	As(V)	AsO(OH) ₃		pKa ₁ = 2,25 pKa ₂ = 7,25 pKa ₃ = 12,3
Monometilarseniato	MMA	CH ₅ O ₃ As		pKa ₁ = 4,26 pKa ₂ = 8,25
Dimetilarseniato	DMA	C ₂ H ₇ O ₂ As		pKa = 6,25

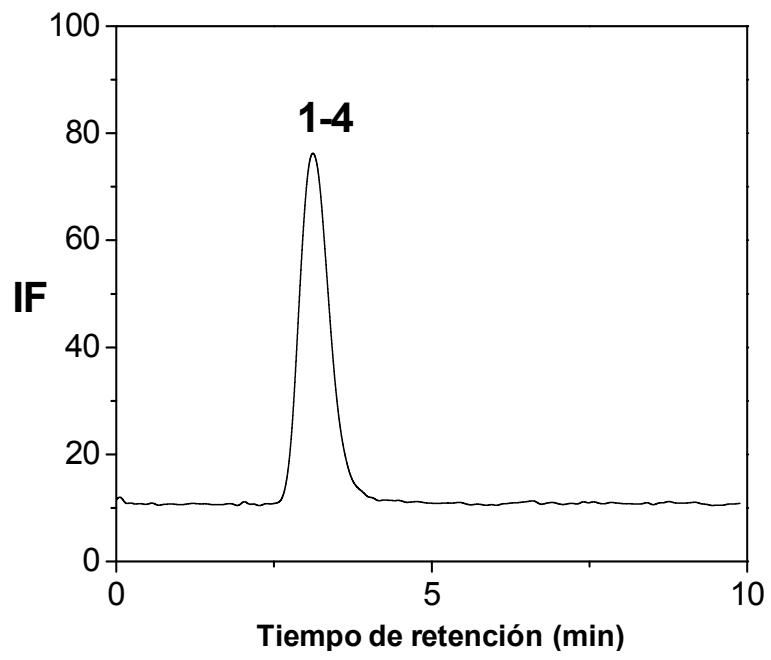
Por lo tanto, en un método de separación por RP-HPLC, el pH debe ser evaluado cuidadosamente para lograr la separación de las especies de As. Como los

ILs son sales líquidas, se puede suponer que los iones están disponibles para la formación de pares iónicos en todos los valores de pH [12].

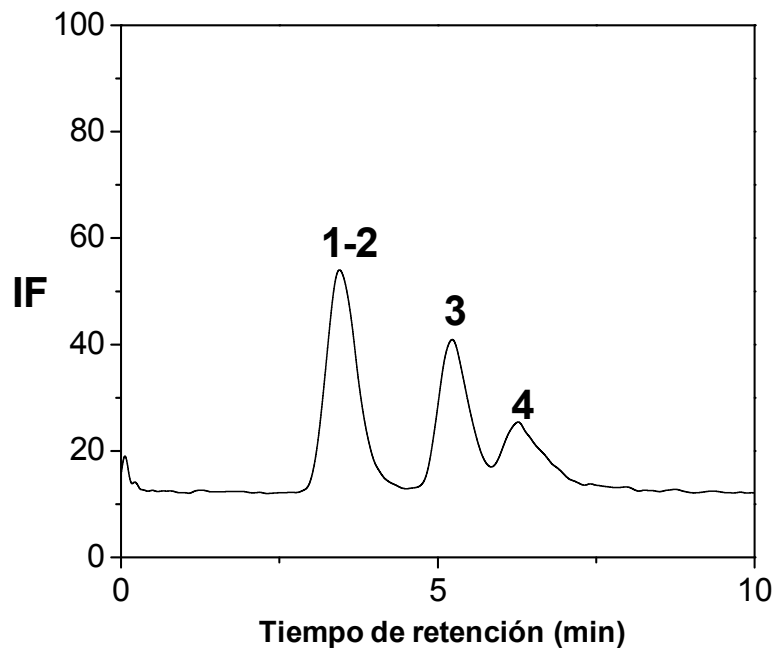
Por lo tanto, teniendo en cuenta los valores de pKa de las especies de As estudiadas en este trabajo, se evaluó el efecto del pH en el intervalo de 2,0 a 9,0 con sistemas buffer a 0,015 mol L⁻¹. El IL [C₈mim]Cl fue elegido para este estudio, ya que se consideró que poseía una cadena alquílica de longitud media entre todos los ILs de tipo imidazolio incluidos en este trabajo. Las diferencias en la resolución cromatográfica de las especies de As puede observarse en la Figura 3.1.2. A pH 2,0 no fue posible la separación (Figura 3.1.2 a), debido a la protonación de las especies de As a bajo pH y la dificultad para formar pares de iones con los ILs. A medida que aumentaba el pH, la disociación de las especies de As fue mayor, mejorando de este modo su separación hasta que se obtuvo la resolución completa en el intervalo de pH de 8,0 a 9,0. Por otra parte, en estas condiciones, As(V) fue altamente retenido en la columna y sólo se eluyó a tiempos de retención de hasta 40 minutos. Finalmente, el pH para una mejor separación cromatográfica fue a 8,5 (Figura 3.1.2 c) y la corrida total estaba dentro de 27 min con una excelente resolución. Con el fin de identificar los tiempos de retención de cada especie de As en el cromatograma, se inyectaron patrones individuales, obteniendo de este modo el siguiente orden de elución: As(III) (3,88 min), DMA (5,30 min), MMA (9,09 min) y As(V) (26,33 min). Según la Tabla 3.1.1, el As(III) no está completamente desionizado hasta pH 9,23; por lo tanto, esta especie no mostró interacción con el IL y no se retiene en la fase estacionaria C₁₈ en el pH seleccionado en este trabajo. Por otra parte, ya que las otras especies de As están ionizadas a pH 8,5; fueron retenidas en la columna.

Basándose en estos hallazgos, se puede suponer que la retención de las especies de As en la columna se produce con la formación de pares iónicos con los ILs, seguido de la interacción del par iónico formado con la fase estacionaria. Sin embargo, el orden en que las especies de As fueron eluidas desde la columna fue similar a la observada para la cromatografía de intercambio aniónico [22]. Esta observación plantea la posibilidad de que las especies de As también podrían ser retenidas a través de un proceso de intercambio aniónico con moléculas de IL ya retenidas en la fase estacionaria C₁₈. Por lo tanto, el posible mecanismo de retención de especies de As en IL-RP-HPLC podría incluir, de hecho, una combinación de diferentes fenómenos, es decir, formación de pares iónicos, intercambio aniónico y partición hidrofóbica [16].

a)



b)



c)

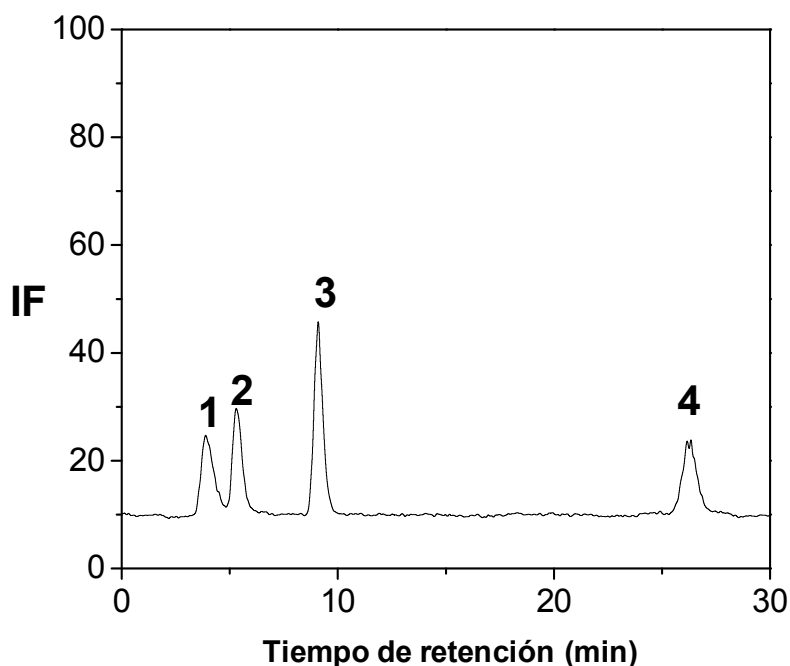


Figura 3.1.2 Efecto del pH sobre la separación de las especies de As. a) pH = 2,0, b) pH = 5,0 y c) pH = 8,5. IF: Intensidad de la señal de fluorescencia atómica. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V). La concentración de cada especie fue de $200 \mu\text{g As L}^{-1}$.

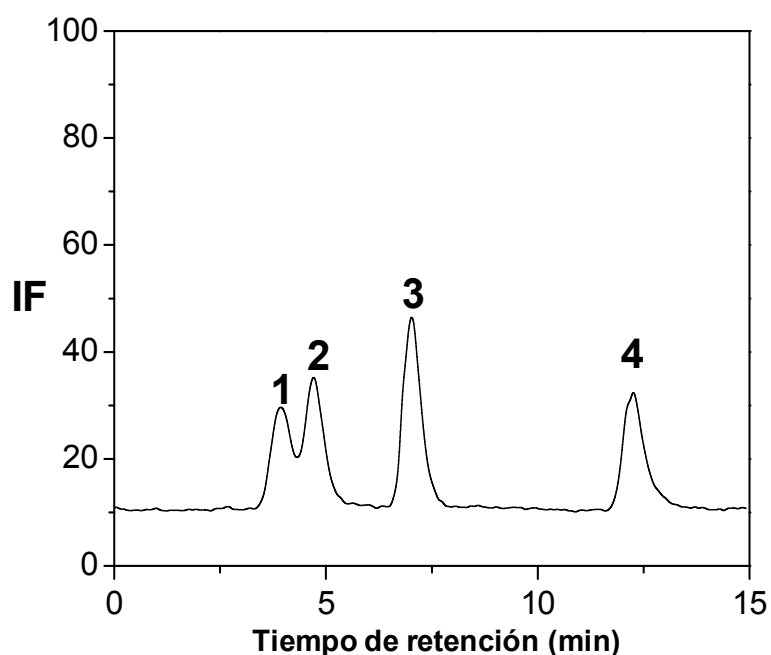
3.1.3.2 Evaluación de diferentes líquidos iónicos para la separación de especies de Arsénico

Los ILs utilizados comúnmente como aditivos de fase móvil son miscibles en agua, tienen una baja viscosidad y se utilizan en concentraciones de 0,1 a 1,5% (v/v) para evitar un aumento significativo de la viscosidad en la fase móvil. En fases móviles acuosas, tanto aniones como cationes de los ILs pueden determinar el comportamiento cromatográfico de los analitos [14]. Los ILs se han ensayado como aditivos para la fase móvil en HPLC. El efecto de varios ILs de tipo imidazolio con diferentes longitudes de cadena de alquilo se evaluó en este trabajo. Además, se ensayó un IL tipo fosfonio miscible con agua. Fang y col. [23] han explorado el efecto de ILs de imidazolio que contienen el anión $[\text{BF}_4]^-$ y grupos alquilo con longitudes de cadena C_4 , C_6 y C_8 en la separación de especies de As, pero las cadenas de alquilo más largas no se evaluaron. De hecho, no hay trabajos que informaran el efecto de los ILs que contienen un anión diferente de Cl^- y con cadenas alquílicas más largas que C_{12} y C_{16} .

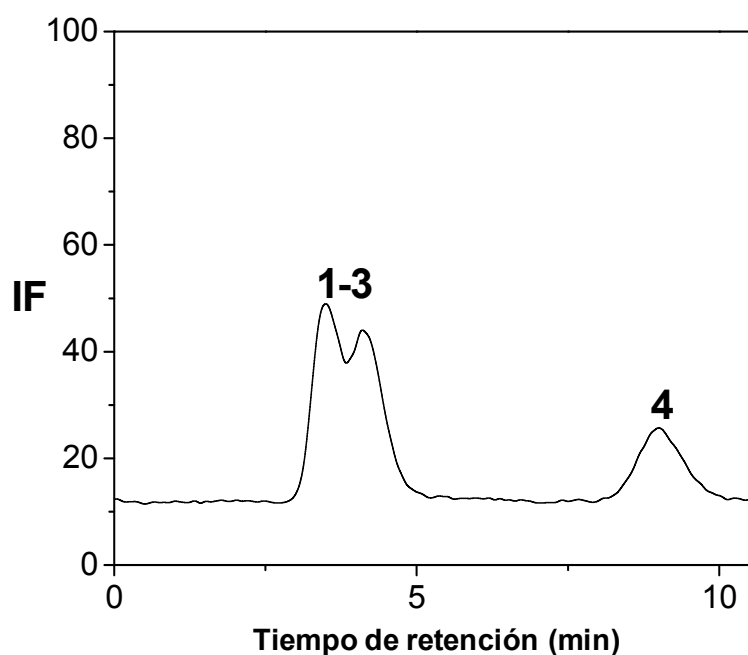
La separación de especies de As por RP-HPLC se estudió para todos los ILs, es decir, $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$, $[\text{C}_6\text{mim}]\text{Cl}$, $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Cl}$, $[\text{C}_{12}\text{mim}]\text{Br}$ y $[\text{P}_{4,4,4,1}]\text{CH}_3\text{SO}_4$ a 0,2 y 0,8% (v/v). El IL $[\text{C}_{16}\text{mim}]\text{Cl}$ se ensayó también, pero se observó formación de espuma

significativa en el interior del separador gas-líquido del detector AFS por lo que no fue posible su aplicación. Para la concentración 0,2% (v/v) de cada IL, la resolución completa de las cuatro especies de As no fue posible. El mejor rendimiento cromatográfico se obtuvo con [C₈mim]Cl con los dos primeros picos [As (III) y DMA] separados. Por otro lado, para [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl y [P_{4,4,4,1}]CH₃SO₄ los primeros dos picos [As(III) y DMA] no fueron resueltos, mientras que en el caso de [C₁₂mim]Br los tres primeros picos [As(III), DMA y MMA] fueron co-eluidos. Las Figuras 3.1.3 a-c muestran los cromatogramas resultantes al utilizar cada IL a una concentración de 0,2% (v/v).

a)



b)



c)

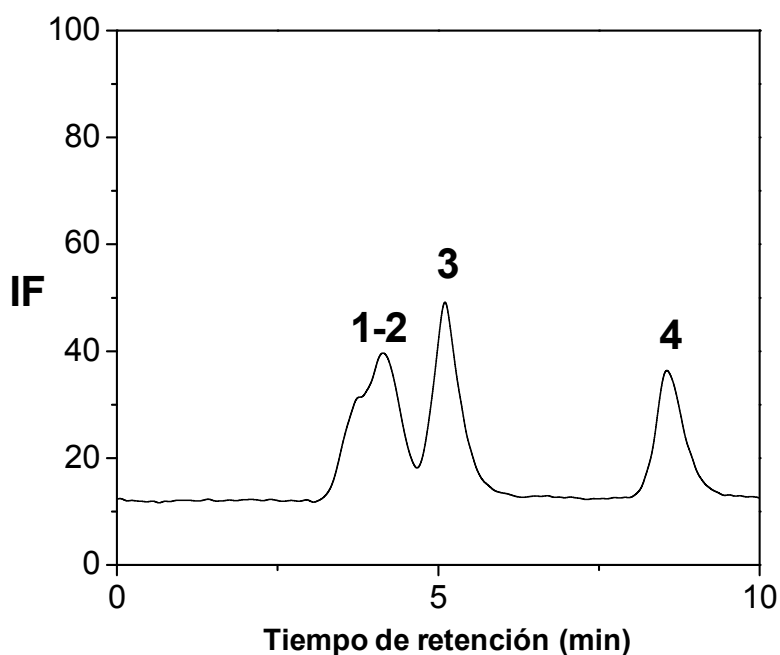
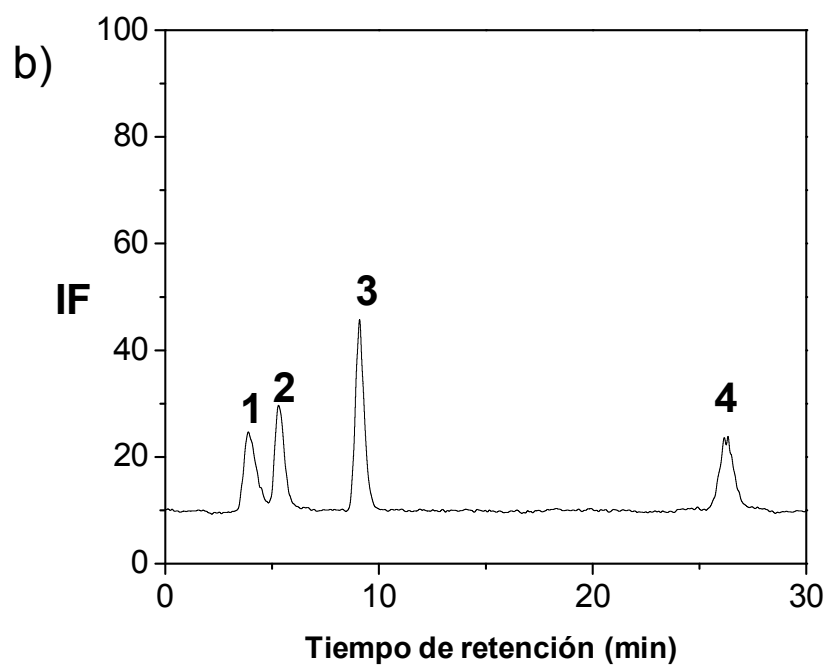
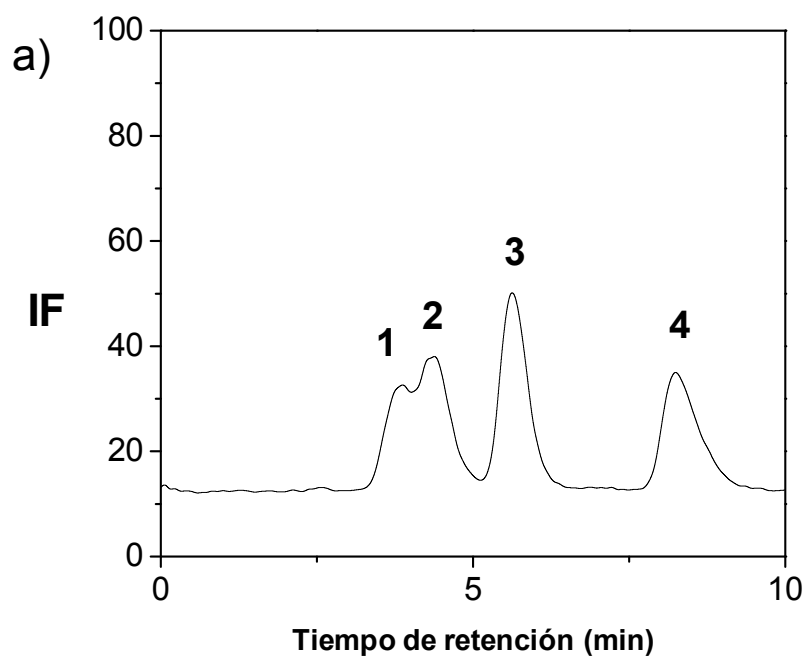


Figura 3.1.3 Efecto del tipo de IL en la separación de las especies de As. a) $[C_6\text{mim}]\text{Cl}$, b) $[C_{12}\text{mim}]\text{Br}$, c) $[P_{4,4,4,1}]\text{CH}_3\text{SO}_4$. Patrón acuoso constituido por la mezcla de las especies de As a $200 \mu\text{g As L}^{-1}$. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V). La concentración de cada IL fue de 0,2% (v/v).

La siguiente evaluación se realizó a 0,5% (v/v) de cada IL. En el caso de $[C_4\text{mim}]\text{Cl}$, $[C_6\text{mim}]\text{Cl}$ y $[P_{4,4,4,1}]\text{CH}_3\text{SO}_4$ la separación de los dos primeros picos [As (III) y DMA] fue menor que la observada con 0,2% (v/v). Por otro lado, cuando se utilizó $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$, se obtuvo la completa separación de los dos primeros picos [As(III) y DMA]. Por último, en el caso de $[C_{12}\text{mim}]\text{Br}$ se logró una mejor separación a una concentración de 0,5% con respecto a 0,2% (v/v), pero la resolución completa de As(III), DMA y MMA no fue factible. Por consiguiente, solución 0,5% (v/v) de $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$ fue elegida para la separación óptima de las especies y se aplicó para experimentos adicionales. Las Figuras 3.1.4 a-d muestran los cromatogramas resultantes al utilizar cada IL a una concentración de 0,5% (v/v). Se puede afirmar que los tiempos de retención y la resolución están relacionados con la interacción que se produjo entre el par iónico formado y la fase estacionaria C_{18} . Por lo tanto, con ILs que contienen cadenas alquílicas cortas (C_4 y C_6) la interacción fue muy fuerte y los analitos no fueron tan retenidos. Por otro lado, el IL con cadena alquílica C_8 ofreció una interacción apropiada e hizo factible la resolución completa para todas las especies. Para el IL de cadena alquílica C_{12} , los tiempos de retención fueron menores y las especies no se separaron. Una posible explicación en este caso, podría ser que la

interacción entre el catión de IL y las especies aniónicas de As fue más baja, lo que lleva a una disminución en la formación de los pares iónicos. En consecuencia, los tiempos de retención para las especies de As se redujeron en comparación con otros ILs estudiados en este trabajo que contienen cadenas alquílicas más cortas.



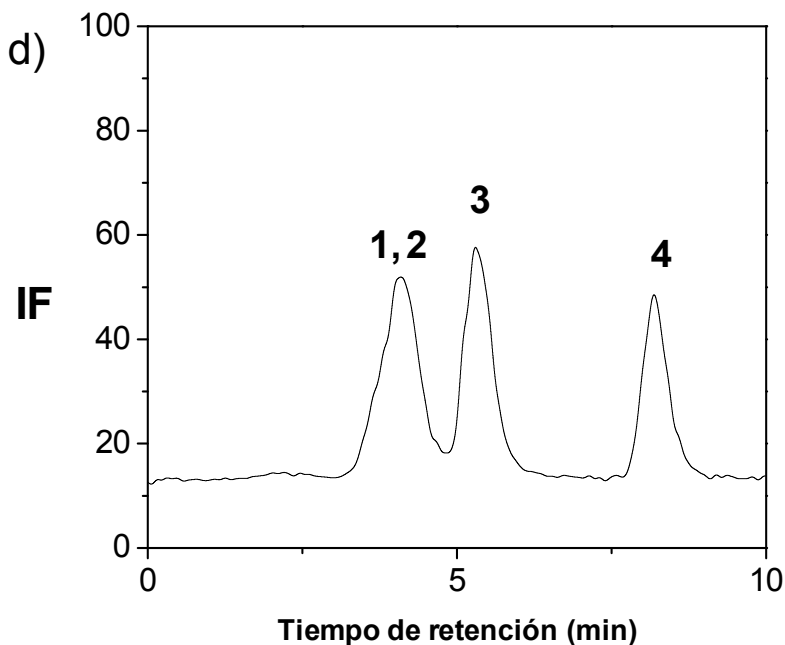
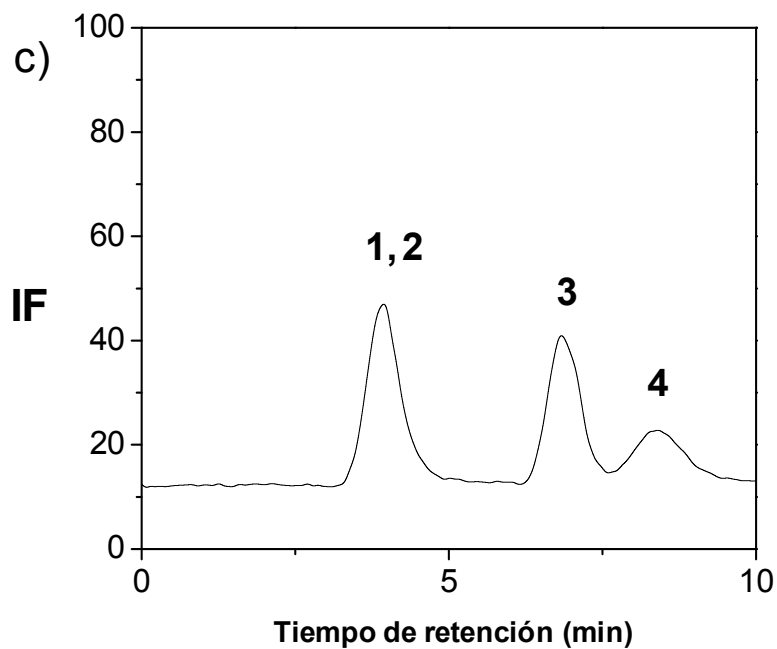


Figura 3.1.4 Efecto del tipo de IL en la separación de las especies de As. a) $[C_6mim]Cl$, b) $[C_8mim]Br$, c) $[C_{12}mim]Br$ d) $[P_{4,4,4,1}]CH_3SO_4$. Patrón acuoso constituido por la mezcla de las especies de As a $200 \mu g As L^{-1}$. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V). La concentración de cada IL fue de 0,5% (v/v).

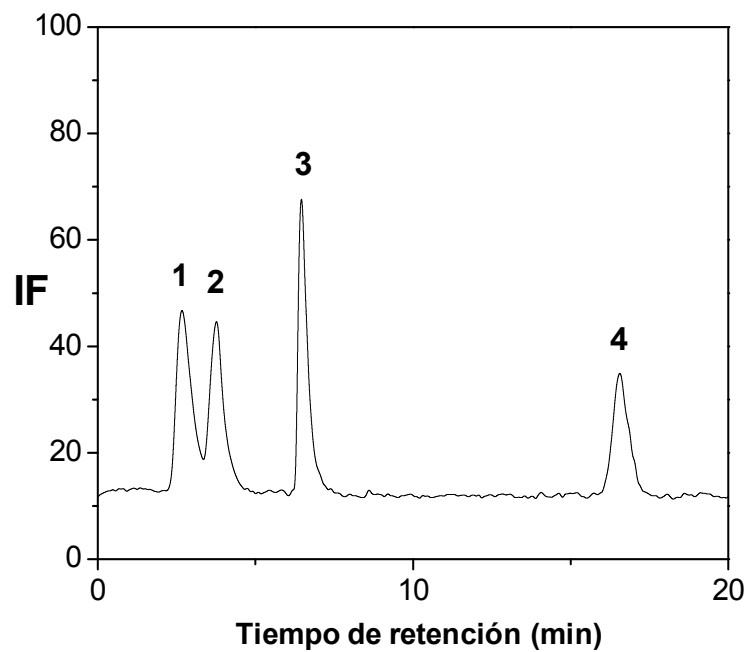
3.1.3.3 Influencia del tipo y concentración de buffer

Se necesita un sistema buffer en cromatografía cuando el analito se ioniza a un valor de pH específico y su separación depende de su forma neutra o ionizada. Debido a la importancia de la solución reguladora en RP-HPLC, la concentración y el tipo fueron estudiados en este trabajo. Aunque varios buffer podrían generar un valor de

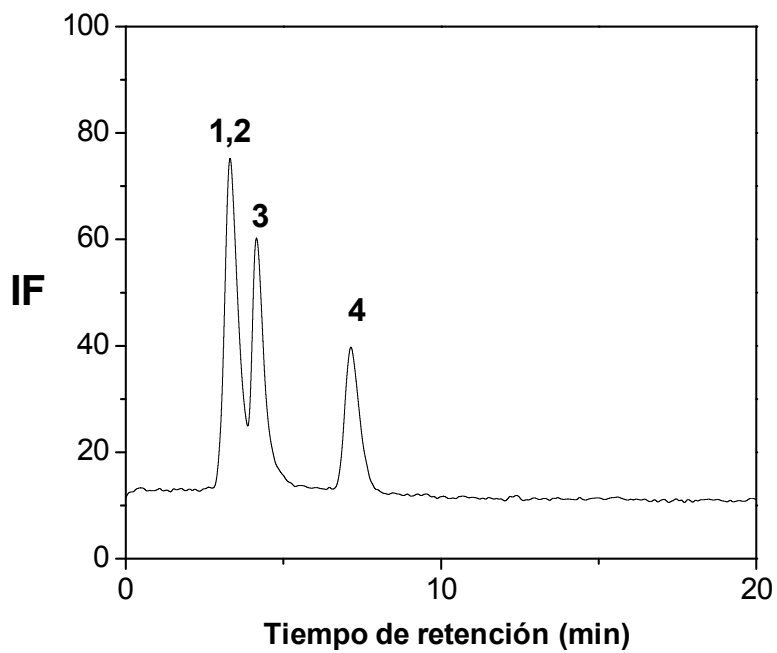
pH similar, los componentes tienen diferentes polaridades y podrían afectar a la retención de los analitos en la columna [24]. Además, la presencia de buffer modifica la fuerza iónica de la fase móvil y afecta a la separación cromatográfica de los analitos [25]. En cuanto a la detección por AFS, el tipo de buffer puede afectar a la hidrólisis de $[\text{BH}_4]^-$ y la generación de especies volátiles [21]. Por lo tanto, el tipo de buffer y su concentración fueron estudiados en este trabajo.

Para la evaluación del tipo de buffer se seleccionaron tres sistemas para ajustar el pH a 8,5: $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ y Tris. El uso de Tris resolvió las especies de As(III) y DMA, incluso mejor que con buffer de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, sin embargo As(V) no se eluyó. Por otra parte, todas las especies se eluyeron dentro de 8 min cuando se utilizó el sistema buffer de fosfato, pero la resolución de As(III), DMA y MMA se perdió, ya que se eluyeron al comienzo del cromatograma. Por lo tanto, la separación completa de todas las especies de As en estudio sólo se logró cuando se utilizó buffer de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$. Por lo tanto, este último buffer fue elegido para los siguientes experimentos. Además, es bien reconocido que los buffer no generan la misma fuerza iónica a un pH y concentración particular. Por lo tanto, entre todos los buffer estudiados en este trabajo, el sistema $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ dio la fuerza iónica más alta y provocó la elución de especies de As en los tiempos más bajos de retención. Este efecto se ha observado con los buffer fosfato cuando se comparó con buffer acético/acetato para la separación de bases protonadas por RP-HPLC [26]. Por el contrario, el buffer Tris dio la fuerza iónica más baja de todas, que conduce a la elución incompleta de las especies de As incluso para tiempos de retención de 40 min. Estos hallazgos refuerzan la idea de que un proceso de intercambio de aniones participa en la separación de las especies de As por RP-HPLC asistido por IL y no sólo fenómenos de formación de pares iónicos exclusivamente. En las Figuras 3.1.5 a-c, se puede observar el efecto que tiene el tipo de buffer en la separación de las especies de As.

a)



b)



c)

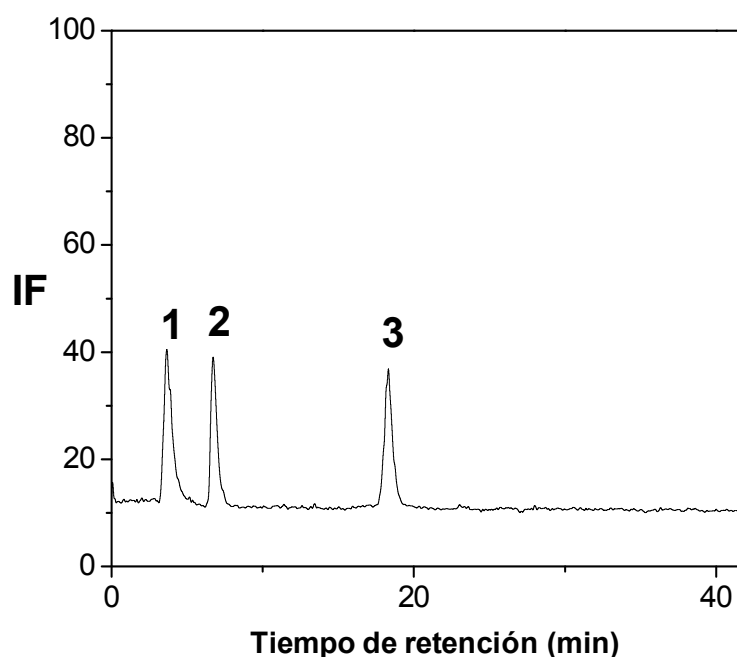
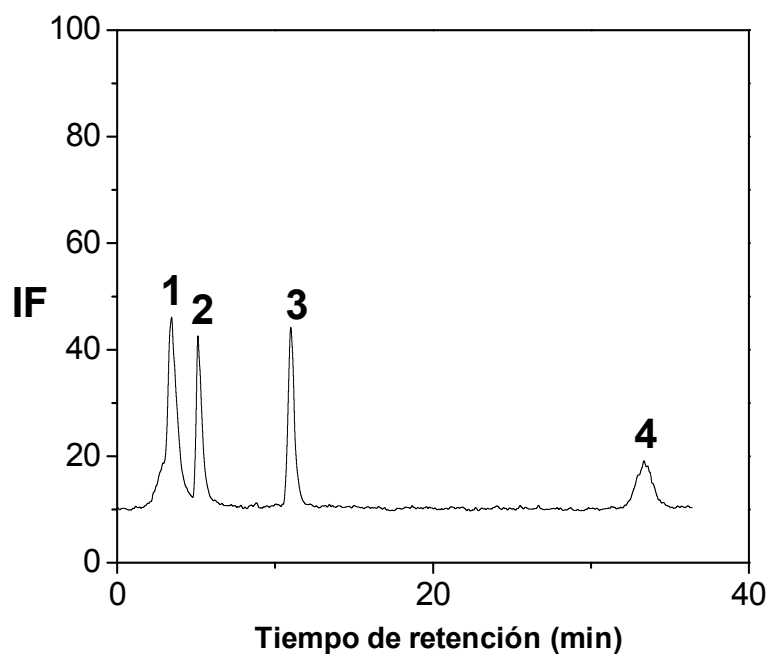


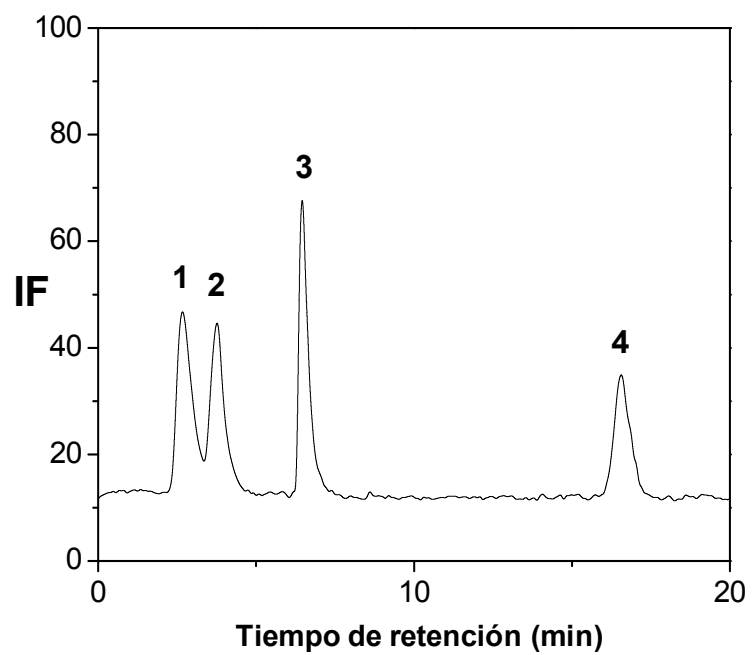
Figura 3.1.5 Efecto del tipo de buffer en la separación de las especies de As. Concentración del buffer: $0,02 \text{ mol L}^{-1}$. a) $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, b) $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$, c) Tris. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).

El efecto de la concentración de buffer se evaluó a $0,01$; $0,02$ y $0,03 \text{ mol L}^{-1}$. Se pudo observar que cuando la concentración de $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ aumentó, los tiempos de retención para todas las especies de As se redujeron significativamente. Del mismo modo, el tiempo de retención de especies de As(V), el último eluido de la columna, se acortó de 40 min a menos de 15 min cuando la concentración de buffer se incrementó de $0,01$ a $0,03 \text{ mol L}^{-1}$. Sin embargo, la resolución se perdió para As(III) y DMA en la concentración más alta ensayada. Este comportamiento podría estar relacionado con el aumento de la fuerza iónica ya que la fase móvil se convierte en un eluyente fuerte. Por lo tanto, la concentración de buffer óptimo fue de $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ e hizo posible la separación de todas las especies de As en menos de 18 min . En las Figuras 3.1.6 a-c, se puede observar el efecto que tiene la concentración del sistema buffer $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ en la separación de las especies de As.

a)



b)



c)

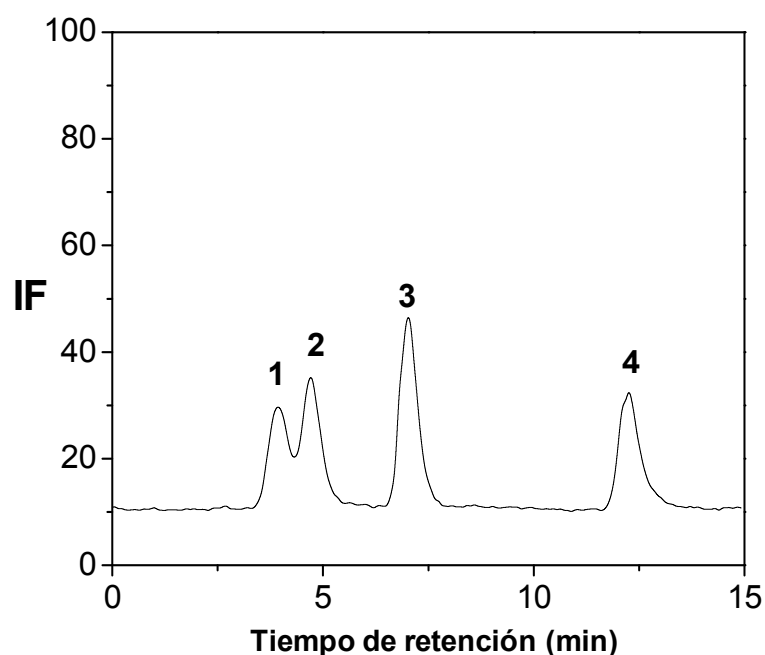


Figura 3.1.6 Efecto de la concentración del sistema buffer $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ en la separación de las especies de As. a) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, b) $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, c) $0,03 \text{ mol L}^{-1}$. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).

3.1.3.4 Efecto del metanol y caudal de la fase móvil

Los disolventes orgánicos son constituyentes comunes de las fases móviles en RP-HPLC y pueden modificar notablemente la separación de las especies. Con el fin de estudiar el efecto del metanol en la separación de las especies de As, se ensayaron tres concentraciones diferentes: 5, 10 y 15% (v/v). Las concentraciones más bajas no se evaluaron ya que 5% (v/v) es el límite más bajo de disolvente orgánico tolerado por la columna utilizada en este trabajo. Se observó que cuando la concentración de metanol se incrementó en la fase móvil, todos los picos se eluyeron a tiempos de retención más cortos, haciendo que especies de As(III) y DMA no se resolvieran. Esta pérdida de resolución cromatográfica es un efecto normal observado en RP-HPLC debido a la disminución de la polaridad de la fase móvil que eluye pares de iones más rápidamente de la columna.

Del mismo modo, se estudió el efecto del metanol en la detección por AFS de especies de As. Los resultados mostraron que un aumento de la concentración de metanol causa una pérdida significativa de sensibilidad (30%). En consecuencia, la concentración óptima de metanol en la fase móvil fue 5% (v/v) [5]. El efecto de metanol en la sensibilidad AFS se puede atribuir a la formación de subproductos formados después de la pirolisis de disolventes orgánicos en una llama de argón-hidrógeno. Por

lo tanto, los radicales de carbono y partículas de carbono podrían interferir durante la atomización de las especies de As volátiles [27]. En las Figuras 3.1.7 a-b, se puede observar el efecto que tiene la concentración de metanol en la separación de las especies de As.

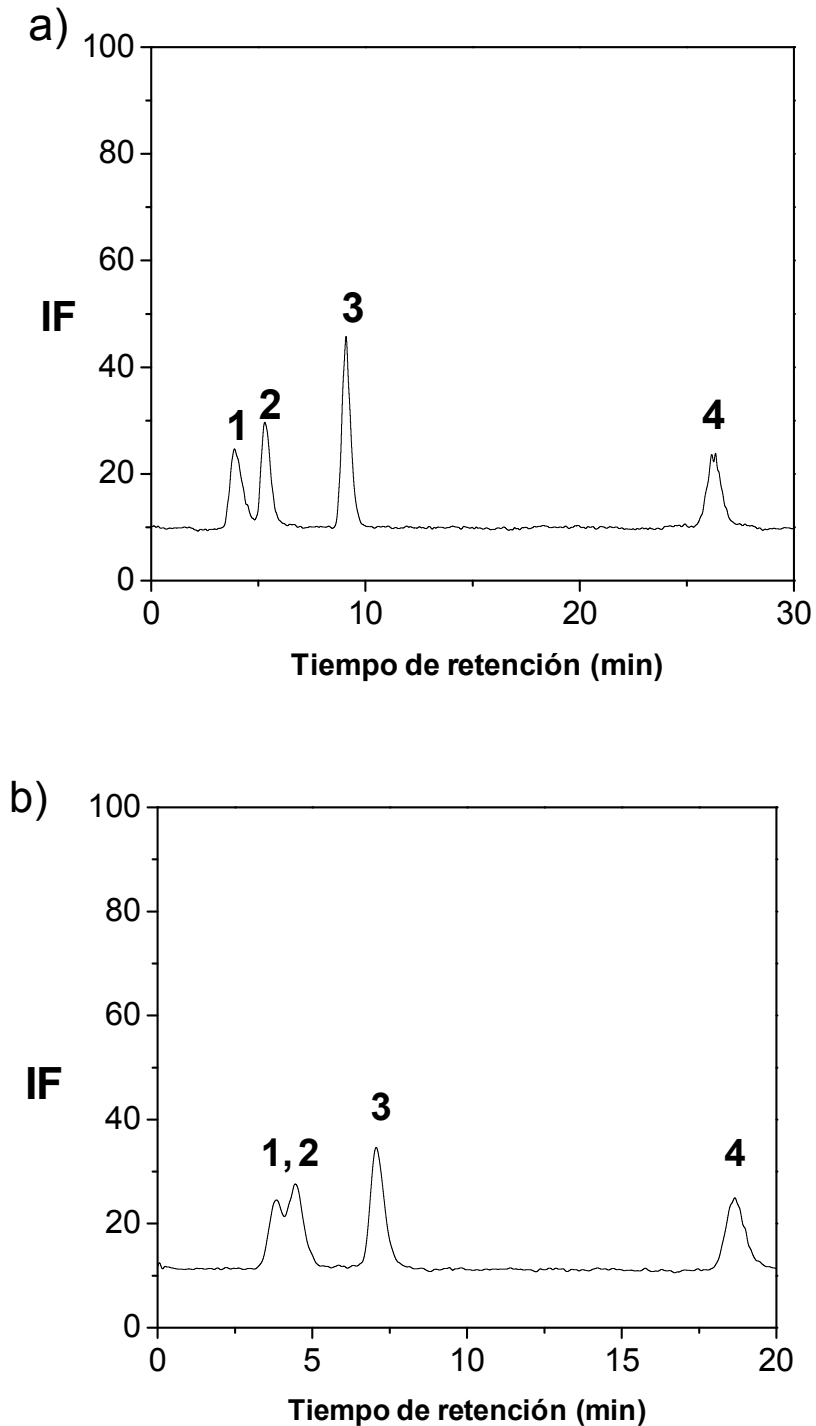


Figura 3.1.7 Efecto de la concentración de metanol en la separación de las especies de As. a) 5% (v/v), b) 10% (v/v). 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).

El efecto del caudal de la fase móvil en la separación de especies, también se estudió en este trabajo. En este caso, los experimentos se llevaron a cabo a valores de velocidad de cuatro flujos: 0,3; 0,4; 0,5 y 0,6 mL min⁻¹. Los resultados mostraron que un caudal de 0,5 ml min⁻¹ permitió obtener una resolución óptima de la mezcla de especies de As. Velocidades de flujo inferiores no cambiaron de manera significativa la separación de As(III) y DMA, mientras que As(V) se eluyó a tiempos de retención significativamente más altos. Por otro lado, cuando el caudal de la fase móvil fue tan elevado como 0,6 mL min⁻¹, la resolución de As(III) y DMA se perdió.

3.1.4 Optimización multivariada de las condiciones de detección HG-AFS

La mayor parte de los trabajos desarrollados en el análisis de especiación de As utilizando la técnica HPLC-HG-AFS no reportan una optimización completa que incluya todos los factores que afectan a la señal AFS [28]. En el presente trabajo, se llevó a cabo una optimización multivariada de todas las variables que intervienen en la detección de AFS de especies de As. La fase móvil utilizada para esta evaluación se preparó de acuerdo a la información detallada en la Tabla 2.1.4. Las variables implicadas en la detección de AFS fueron optimizadas para maximizar la sensibilidad y obtener límites de detección para las diferentes especies lo más bajos posibles. Una metodología de superficie de respuesta se utilizó para la optimización y se aplicó un diseño central compuesto centrado en las caras fraccionado con seis puntos centrales. Los factores evaluados fueron: concentración de NaBH₄, concentración de HCl, velocidad de flujo de NaBH₄ y HCl, tasa de flujo de argón y temperatura de atomización. Los niveles mínimos y máximos de estos factores fueron los siguientes: concentración de NaBH₄ entre 0,7-1,4% (p/v), concentración de HCl entre 5-15% (v/v), caudal de reactivos entre 1,4-6,0 mL min⁻¹, caudal de argón entre 700-900 mL min⁻¹ y temperatura de atomización entre 300-450 °C. Otros factores como la corriente de la lámpara y el voltaje del fotodetector se establecieron a un valor constante. Se necesitó un número total de 34 experimentos para el diseño central compuesto. La respuesta fue el área de pico (PA) para cada una de las especies evaluadas. El programa Design Expert® 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE.UU.) se utilizó para procesar todos los resultados obtenidos en este trabajo. Según los resultados obtenidos, se obtuvieron varios modelos cuadráticos con interacciones, tal como se expresa por las siguientes ecuaciones:

$$\log PA [As(III)] = 3,09 + 0,97A + 0,08B + 0,09C - 0,05D + 0,05E + 0,07AC - 0,04AD - 0,03AE + 0,06BC - 0,01BD - 0,02BE + 0,01CD + 0,01CE - 0,07 DE - 0,74A^2 - 0,11B^2 + 0,07C^2 - 0,12E^2 \quad (1)$$

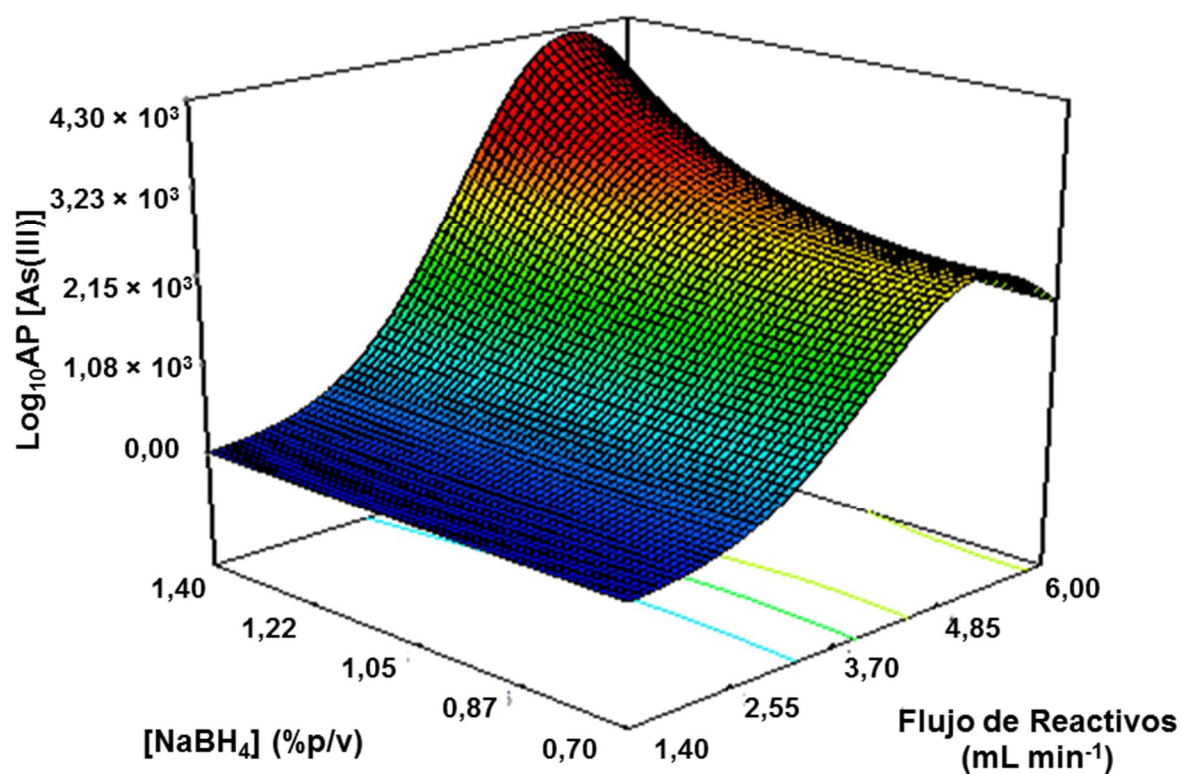
$$\log PA [As(V)] = 2,83 + 0,92 + 0,10B + 0,12C - 0,04D + 0,05E + 0,11AC - 0,04AD - 0,03AE + 0,06BC - 0,01BE - 0,07DE - 0,73A^2 - 0,05B^2 + 0,07C^2 - 0,07D^2 - 0,05E^2 \quad (2)$$

$$[PA (MMAA(V))]^{1/2} = 29,80 + 16,30A - 0,45B + 3,92C - 1,64D + 0,16E + 3,22AC - 1,05AD + 0,49AE - 0,51CE - 8,54A^2 + 2,62C^2 - 1,69D^2 - 1,50E^2 \quad (3)$$

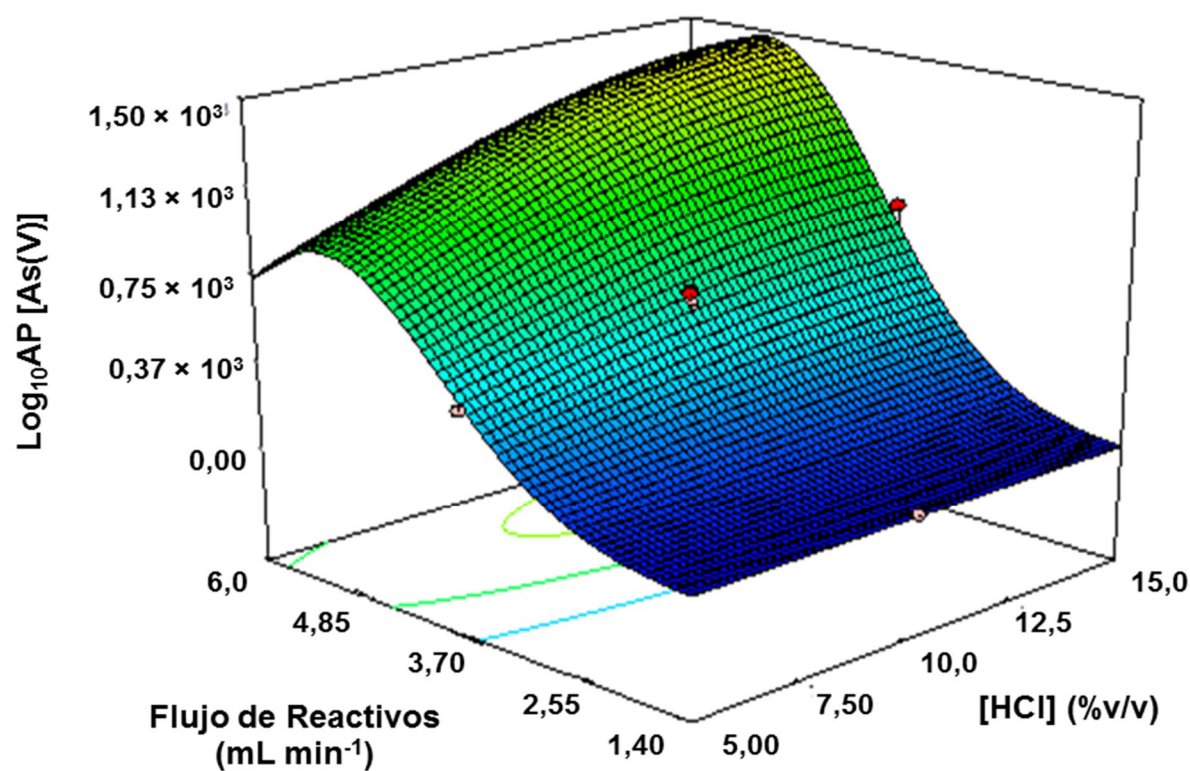
$$[PA (DMAA(V))]^{1/2} = 25,40 + 14,2A - 2,96B + 4,26C - 1,46D + 0,70E - 2,20AB + 4,03AC - 1,13AD + 1,28AE + 0,77BD - 8,31A^2 + 1,95C^2 - 1,44D^2 \quad (4)$$

donde A = tasa de flujo de reactivos, B = concentración de HCl, C = concentración de NaBH₄, D = temperatura de atomización y E = caudal de argón. El modelo consistió en efectos principales y de dos factores. R² estuvo entre 0,993 y 0,999, y R² ajustado estuvo entre 0,973 y 0,997. Estos valores mostraron una buena calidad de ajuste con las ecuaciones del modelo. Todas las respuestas tenían que ser transformadas con el fin de obtener gráficas de diagnóstico no significativas y el modelo apropiado de probabilidad normal [29]. Por lo tanto, los resultados se ajustaron a los modelos obtenidos. Observando las ecuaciones 1-4, se puede verificar cómo los factores y sus interacciones afectan a las respuestas. El coeficiente de variación (CV) estuvo entre 0,94% y 5,12%, indicando que la simulación se puede considerar como reproducible, y que la precisión y los valores experimentales eran exactos. El análisis ANOVA mostró que todos los modelos de las respuestas estudiadas fueron altamente significativos (p < 0,0001). En la Figura 3.1.8 se pueden observar las superficies de respuesta para las cuatro especies en estudio y el efecto que provocan los parámetros significativos en la detección por AFS.

a)



b)



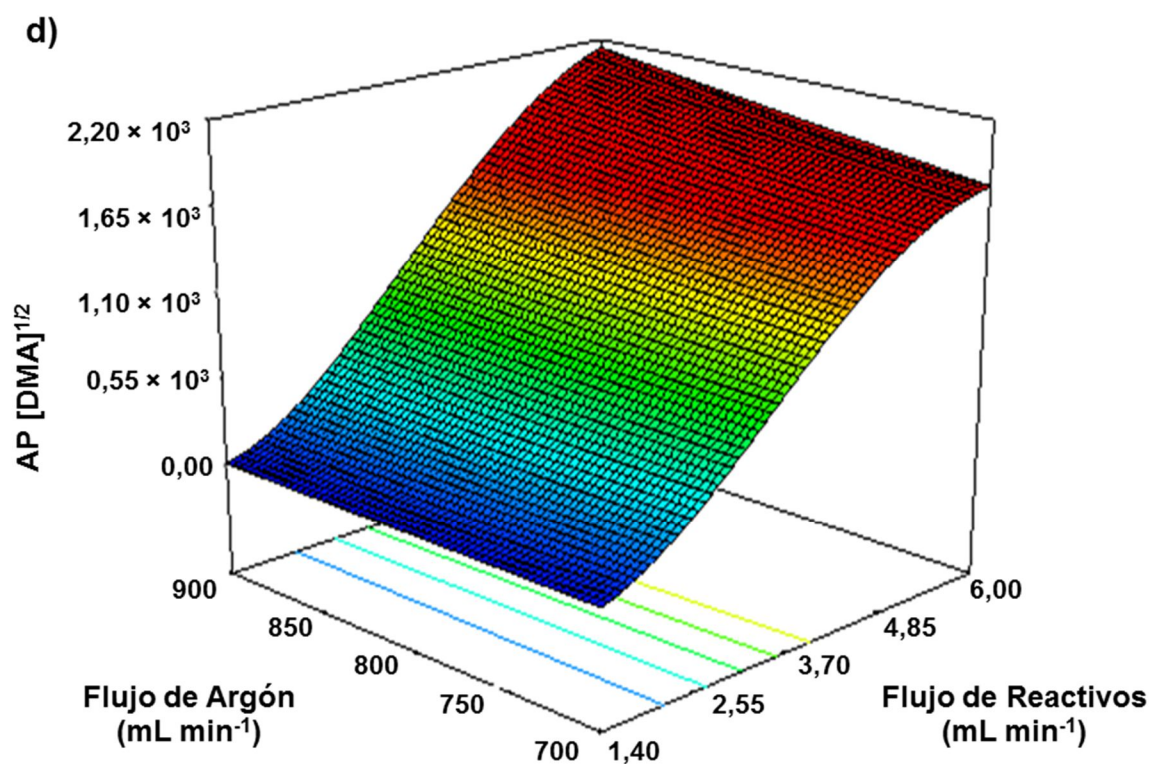
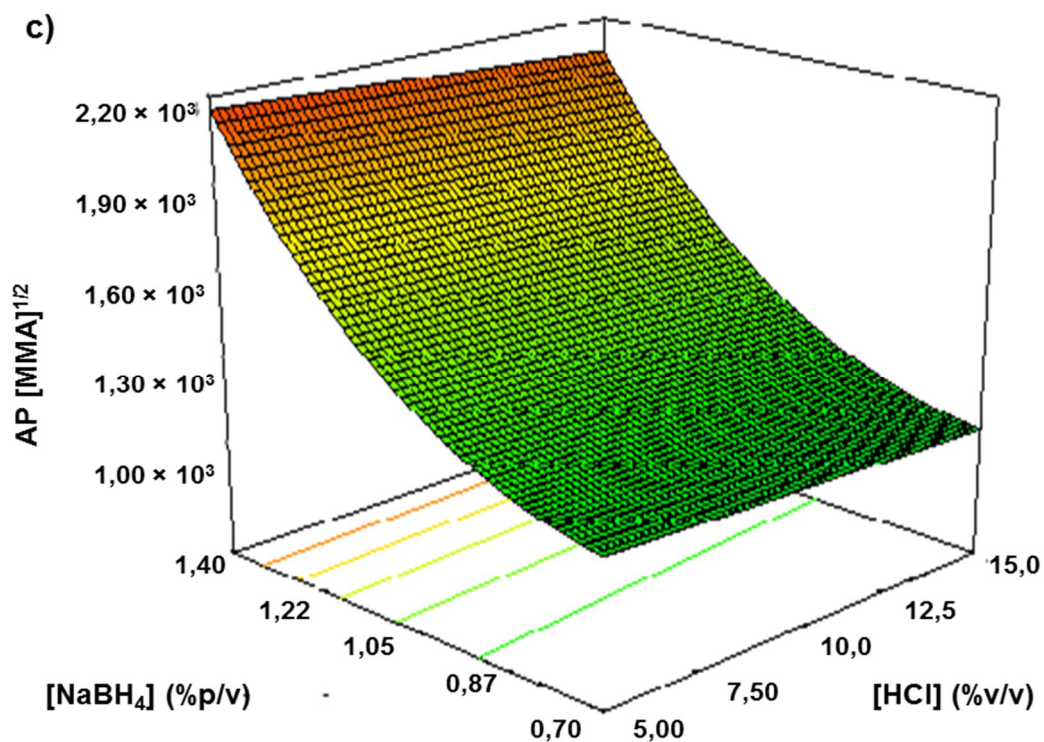


Figura 3.1.8 Superficies de respuesta de especies de As en estudio y efecto de las variables operativas sobre el área de pico de la señal IF vs tiempo. a) Concentración de NaBH₄ (% p/v) y flujo de reactivos (mL min⁻¹) para As(III), b) Flujo o caudal de reactivos (mL min⁻¹) y concentración de HCl (% v/v) para As(V), c) concentración de NaBH₄ (% p/v) y concentración de HCl (% v/v) para MMA, d) Flujo de argón (mL min⁻¹) y flujo de reactivos (mL min) para DMA.

Una función de deseabilidad de Derringers's (ver Figura 3.1.9) se empleó para optimizar las cuatro respuestas al mismo tiempo. Las condiciones óptimas ajustadas dadas por el modelo fueron las siguientes: caudal o velocidad de flujo de reactivos de $6,0 \text{ mL min}^{-1}$, concentración de HCl de 8,5% (v/v), concentración de NaBH_4 de 1,4% (p/v), caudal o velocidad de flujo de argón de 900 mL min^{-1} y temperatura de atomización de 300°C . Se realizó una confirmación experimental de estas condiciones óptimas. Las áreas de los picos obtenidos para todas las respuestas estaban dentro de un margen de error aceptable según lo representado por el error relativo (ER%). Los valores de ER se encontraron entre 0,84% y 2,06%. Esto confirmó que el modelo predijo con exactitud la respuesta para todas las especies.

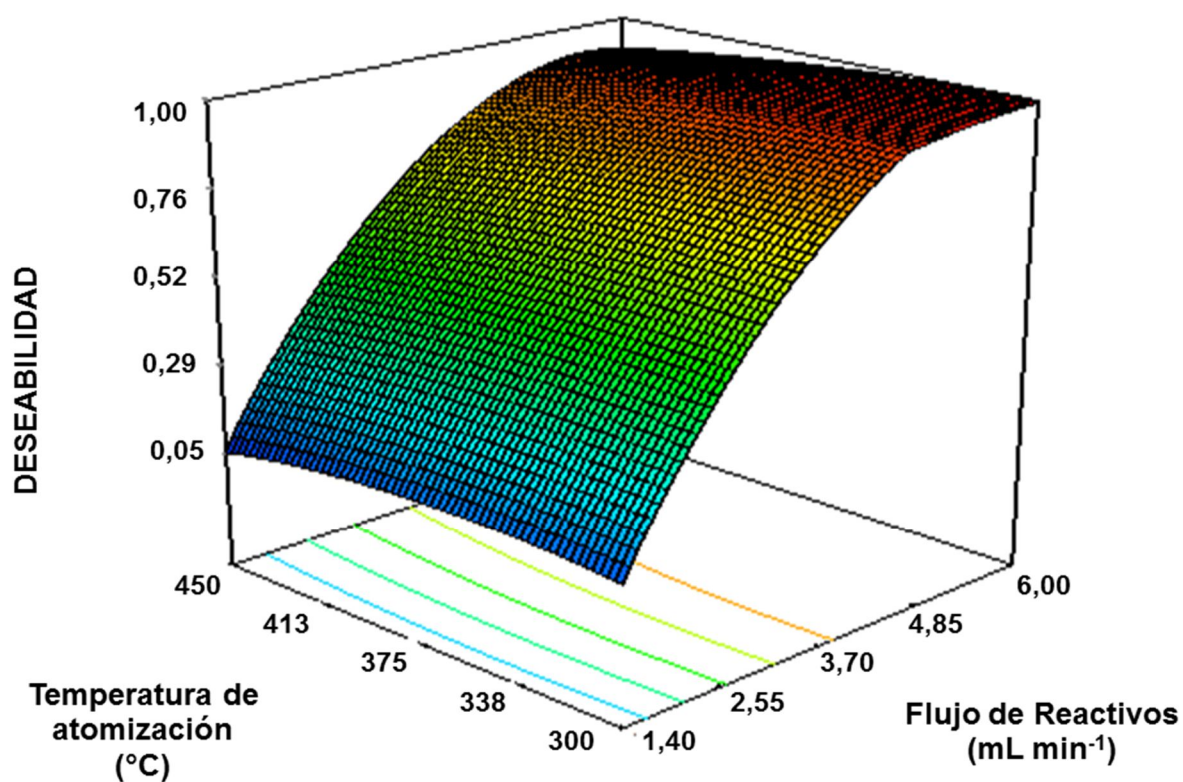


Figura 3.1.9 Función deseabilidad para la optimización de las variables evaluadas que se encuentran involucradas en la detección de las especies de As por HG-AFS.

Un cromatograma de una mezcla estándar que contiene las especies de As en las condiciones optimizadas se muestra en la Figura 3.1.10. Después de la optimización multivariada, una mejora de 3 veces en la sensibilidad AFS se logró con respecto a las condiciones de medición iniciales.

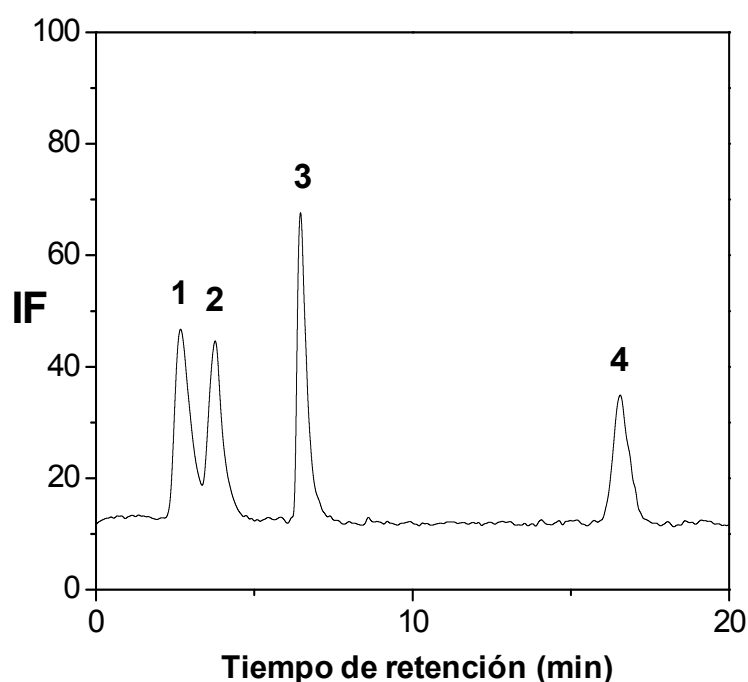


Figura 3.1.10 Cromatograma IL-RP-HPLC-HG-AFS de un patrón acuoso resultante de la mezcla de especies de As a 50 g L^{-1} . 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).

3.1.5 Rendimiento analítico y parámetros cromatográficos

En la Tabla 3.1.2 se reportan las cifras analíticas de mérito obtenidas con la metodología desarrollada y bajo las condiciones óptimas de separación y detección de las especies de As. El LOD fue calculado a partir de la señal en la intersección y tres veces la desviación estándar sobre la regresión de la curva de calibración, para las especies de As estuvo en el rango de $0,62\text{-}1,00 \text{ mg L}^{-1}$. Las curvas de calibración mostraron una linealidad satisfactoria para cada especie de As hasta al menos el límite superior evaluado en este trabajo, es decir, $2000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Los coeficientes de correlación fueron entre 0,9919 y 0,9996. La Tabla 3.1.2 muestra diferentes parámetros que caracterizan la separación cromatográfica en las condiciones óptimas. Se observaron tiempos de retención reproducibles a través de 12 horas. Las desviaciones estándar relativas (RSD) se calcularon para seis mediciones repetidas de una mezcla patrón conteniendo todas las especies de As estudiadas en este trabajo a una concentración de $50 \text{ } \mu\text{g As L}^{-1}$ cada una. Los resultados estuvieron en el intervalo de 1,6% y 2,4%.

Tabla 3.1.2 Parámetros cromatográficos y rendimiento analítico para la determinación de especies de As obtenidos con el método propuesto.

Parámetros	As(III)	DMA	MMA	As(V)
Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,0-2000	1,0-2000	1,0-2000	1,0-2000
r^2	0,9954	0,9919	0,9996	0,9932
RSD (%)	1,98	1,84	1,56	2,36
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,81	1,00	0,62	0,89
R^a	-	0,83	1,84	5,54
k^b	0,15	0,62	1,78	6,13
N^c	64	136	248	1097
α^d	-	4,13	2,87	3,44

$$^a\text{Resolución: } R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

$$^b\text{Factor de capacidad: } k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

c Número de platos teóricos:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

$$^d\text{Selectividad: } \alpha = \frac{k_n}{k_{n-1}}$$

Pocas metodologías han sido desarrolladas para el análisis de especiación de As utilizando reactivos de formación de pares iónicos por HPLC-HG-AFS, en comparación con intercambio aniónico. Lo más probable es porque los disolventes orgánicos necesarios para las separaciones cromatográficas pueden afectar la sensibilidad del detector AFS. Por lo tanto, la cromatografía de intercambio aniónico en ausencia de disolventes orgánicos volátiles ha sido la opción más utilizada para la especiación de As por HPLC-HG-AFS [30]. Entre los varios trabajos utilizando RP-HPLC-HG-AFS para análisis de especiación de As, se han desarrollado dos tipos de métodos, los primeros usando por ejemplo bromuro de dodecilmetilamonio (DDAB) [31] y los segundos cloruro de tetrabutilamonio (TBA) [32]. El hexanosulfonato de sodio también se ha aplicado, para la separación de As(III) y As(V) [10]. La metodología utilizando DDAB muestra como desventaja principal el elevado tiempo requerido para el acondicionamiento de la columna C_{18} (500 mL de solución 0,01 mol L^{-1} DDAB). Por otra parte, la metodología usando TBA se aplicó al análisis de muestras de agua y de orina con buenos límites de detección y separación de todas las especies de As en 12 min. Sin embargo, un factor que puede limitar la aplicación generalizada de estos métodos se puede atribuir a la necesidad de calentar la fase móvil y la columna a temperaturas que son significativamente más altas (70°C) que las condiciones de la sala donde se encuentra la instrumentación.

En el método propuesto en el presente trabajo de tesina, la selección de condiciones tales como, 0,5% (v/v) de $[C_8\text{mim}]\text{Cl}$ en la fase móvil y una elución

isocrática a temperatura ambiente, aportó una buena separación de todas las especies de As dentro de un tiempo de 18 min que resulta bastante aceptable. Se puede observar que el método propuesto no requiere condiciones especiales de operación, lo que lo convierte en un método simple y fácil de operar que podría encontrar utilidad extendida en los laboratorios analíticos de rutina. Los límites de detección obtenidos en este trabajo fueron comparables con los obtenidos por otros métodos, aunque es importante destacar que el presente trabajo demuestra la posibilidad de utilizar el método propuesto para realizar el análisis de especiación de As en muestras de matrices altamente complejas, tales como el vino.

3.1.7 Determinación de especies de Arsénico en diferentes vinos

La concentración total de As en las diferentes muestras de vinos, correspondientes a distintos varietales de uvas, se evaluó mediante la técnica HG-AFS. Los resultados se muestran en la Tabla 3.1.3. La concentración más alta encontrada fue de $26,4 \pm 0,9 \mu\text{g As L}^{-1}$, que es significativamente menor que el LMR de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la OIV [33]. Por otro lado, es importante mencionar que debido que no existe material de referencia con matrices de vinos en los que se certifique la concentración de As, se realizó un estudio de recuperación del analito. Para ello, antes del procedimiento de digestión, se realizaron adiciones a $20 \mu\text{g As L}^{-1}$ sobre las muestras de vino desde una solución patrón. Los valores de recuperación obtenidos luego del análisis se encontraron en el rango de 95-105%, lo cual muestra una exactitud satisfactoria para la determinación total de As en presencia de las matrices de vinos tratadas de acuerdo al procedimiento de digestión.

Por último, la metodología propuesta se aplicó para el análisis de especiación de As en diversos vinos comerciales producidos en Argentina. Sin embargo, es importante mencionar que debido a que la resolución cromatográfica de las especies de As fue parcialmente deteriorada cuando las muestras de vino se inyectaron sin mayor dilución, se debieron inyectar en la columna de HPLC muestras diluidas con agua ultrapura a relaciones 1:4 y 1:9, a los efectos de sobrellevar posibles efectos de la matriz. Mediante la dilución 1:4 la separación de especies fue completa, sin embargo, se observó una pérdida parcial de la sensibilidad debido a la dilución aplicada. Por otra parte, una dilución 1:9 arrojó picos simétricos y resolución óptima, que resultó comparable a los obtenidos para los patrones acuosos de As. Por lo tanto, una dilución de 1:9 fue aplicada a todas las muestras de vino antes de su inyección en HPLC.

Un típico cromatograma mostrando la separación de las especies As(III), As(V), MMA y DMA en muestras de vino se expone en la Figura 3.1.7. No se observaron efectos de matriz cuando las muestras de vino se inyectaron en HPLC, evidenciado por los tiempos de retención similares y formas de los picos obtenidos con respecto a los patrones acuosos de especies de As (Figura 3.1.6). Un estudio de recuperación se llevó a cabo en las muestras con adiciones de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada una de las especies de As. Se obtuvieron valores de recuperación aceptables en las diferentes variedades de vinos (94-108%). Las concentraciones de especies de As en las muestras de vino estaban en el intervalo de $<\text{LOD}-12,3 \pm 0,7 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) y de $<\text{LOD}-17,2 \pm 1,1 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(V). Las únicas especies de As que se encontraron en las muestras fueron As(III) y As(V), a pesar de que MMA y DMA son especies probables de encontrar en los vinos [34]. Por lo tanto, nuevos métodos como el propuesto en este trabajo son necesarios para llevar a cabo la determinación precisa de ambas especies inorgánicas y orgánicas de As en muestras de vino como parte de la garantía de calidad de los alimentos.

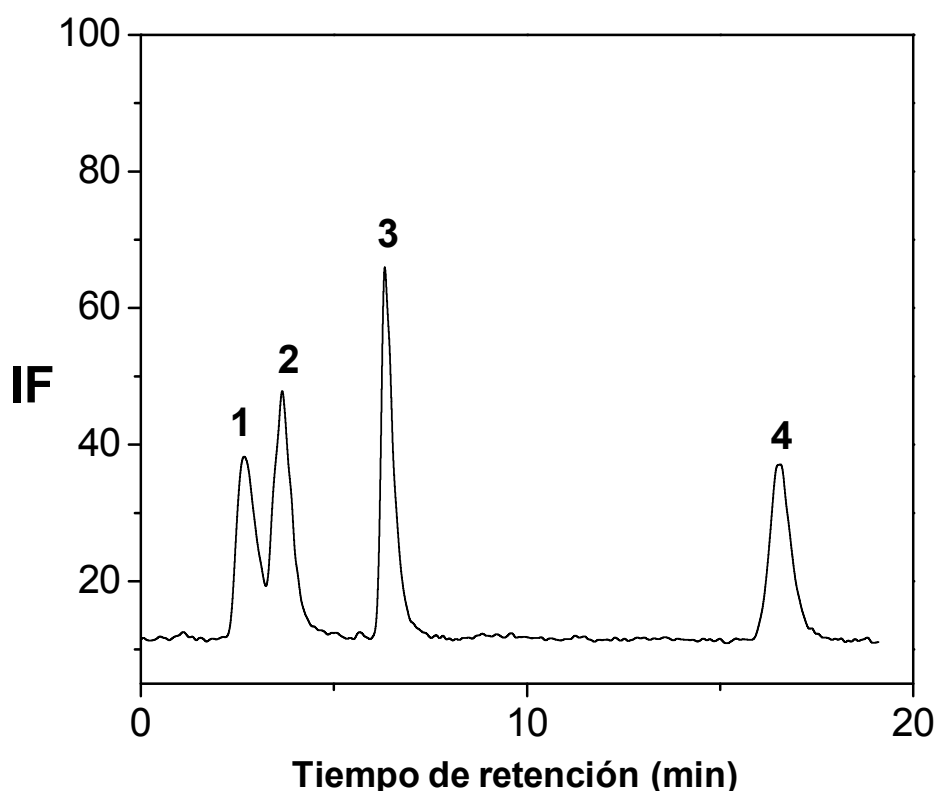


Figura 3.1.7 Cromatograma IL-RP-HPLC-HG-AFS de muestra diluida en un factor de 10 de vino adicionado a $50 \mu\text{g As L}^{-1}$ de cada especie de As. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).

Tabla 3.1.3 Análisis de especiación de As en diferentes muestras de vino (nivel de confianza del 95%, n = 3).

Muestra	Total As ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperado (%)	As (III)			As(V)		
			Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperado (%)	Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Blend Blanco	14,7 ± 1,6	101	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	49,5 ± 3,5	99	50	48,4 ± 2,1	96,8
Blend Tinto	26,4 ± 0,9	95	0	12,1 ± 0,5	-	0	16,8 ± 1,0	-
			50	61,1 ± 3,5	98,2	50	66,8 ± 3,1	100
Bonarda	25,8 ± 0,9	105	0	12,3 ± 0,7	-	0	13,0 ± 0,7	-
			50	59,4 ± 2,5	95,4	50	63,6 ± 3,7	101
Cabernet Franc	19,8 ± 0,9	94	0	<LOD	-	0	14,5 ± 0,5	--
			50	48,3 ± 1,7	96,6	50	63,1 ± 2,5	97,2
Cavernet Sauvignon	<LOD	105	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	51,4 ± 1,8	103	50	47,8 ± 1,4	95,6
Chardonnay	16,5 ± 0,7	96	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	50,8 ± 3,2	102	50	48,0 ± 2,8	96
Chenin	15,7 ± 1,5	102	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	50,5 ± 2,8	101	50	51,5 ± 1,8	103
Malbec 1	<LOD	103	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	51,4 ± 1,1	103	50	48,1 ± 1,2	96,2
Malbec 2	<LOD	93	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	48,3 ± 2,9	96,6	50	51,1 ± 1,9	102
Malbec 3	<LOD	98	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	49,6 ± 2,4	99,2	50	52,4 ± 2,7	105

Petit	14,7 ± 0,7	101	0	<LOD	-	0	12,8 ± 0,4	-
			50	51,4 ± 2,0	103	50	64,2 ± 1,7	103
Pinot	17,4 ± 1,3	96	0	<LOD	-	0	15,6 ± 0,9	-
			50	48,9 ± 1,7	97,8	50	63,3 ± 3,5	95,4
Sauvignon Blanc	16,6 ± 0,8	101	0	<LOD	-	0	17,2 ± 1,1	-
			50	50,6 ± 0,9	101	50	64,2 ± 3,7	95,6
Syrah	12,4 ± 0,6	96	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	50,1 ± 3,0	100	50	48,7 ± 3,5	97,4
Tempranillo	<LOD	105	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	47,8 ± 1,4	95,6	50	51,3 ± 1,5	103
Torrontes	<LOD	94	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	48,6 ± 1,2	97,2	50	47,7 ± 1,6	95,4
Viognier	<LOD	97	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	48,0 ± 1,4	99	50	49,7 ± 2,1	99,4

Tabla 3.1.3 Análisis de especiación de As en diferentes muestras de vino (nivel de confianza del 95%, n = 3) (continuación)

Muestra	MMA			DMA		
	Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperado (%)	Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Blend Blanco	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	52,0 \pm 1,8	104	50	52,5 \pm 2,2	105
Blend Tinto	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	49,8 \pm 1,3	100	50	50,7 \pm 1,9	101
Bonarda	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	49,8 \pm 1,9	96,6	50	47,6 \pm 1,2	95,2
Cabernet Franc	0	<LOD	-	0	<LOD	--
	50	49,7 \pm 1,8	96,4	50	50,4 \pm 1,9	101
Cavernet Sauvignon	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	52,6 \pm 2,1	105	50	49,2 \pm 1,2	98,4
Chardonnay	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	52,3 \pm 1,5	105	50	49,8 \pm 2,5	99,6
Chenin	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	49,8 \pm 1,8	99,6	50	54,0 \pm 1,4	108
Malbec 1	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	51,8 \pm 2,0	104	50	49,7 \pm 0,9	99,4
Malbec 2	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	52,1 \pm 1,4	104	50	50,6 \pm 1,9	101
Malbec 3	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	48,7 \pm 1,6	97,4	50	52,3 \pm 2,1	105

Petit	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	49,5 ± 1,4	99	50	51,4 ± 1,8	103
Pinot	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	51,4 ± 2,7	103	50	48,6 ± 1,5	97,2
Sauvignon Blanc	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	51,2 ± 3,1	102	50	52,1 ± 1,3	104
Syrah	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	52,7 ± 1,4	105	50	48,8 ± 2,4	97,6
Tempranillo	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	47,8 ± 1,4	97,8	50	51,3 ± 1,5	103
Torrontes	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	48,6 ± 1,2	105	50	47,7 ± 1,6	103
Viognier	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	48,0 ± 1,4	97,8	50	49,7 ± 2,1	105

3.1.8 Referencias bibliográficas

- [1] G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, Handbook on the Toxicology of Metals, Academic Press, 2010.
- [2] R. Cornelis, J. Caruso, H. Crews, K. Heumann, Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine and occupational health, Wiley Online Library, 2005.
- [3] V.R. Preedy, Processing and impact on active components in food, in, Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2015.
- [4] S.G. Tangolar, Tangolar, A. Torun, Evaluation of fatty acid profiles and mineral content of grape seed oil of some grape genotypes, International journal of food sciences and nutrition, 60 (2009) 32-39.
- [5] N. Campillo, R. Penalver, P. Vinas, I. Lopez-Garcia, M. Hernandez-Cordoba, Speciation of arsenic using capillary gas chromatography with atomic emission detection, Talanta, 77 (2008) 793-799.
- [6] C.M. Moreira, F.A. Duarte, J. Leberherz, D. Pozebon, E.M. Flores, V.L. Dressler, Arsenic speciation in white wine by LC-ICP-MS, Food chemistry, 126 (2011) 1406-1411.
- [7] L.B. Escudero, E.M. Martinis, R.A. Olsina, R.G. Wuilloud, Arsenic speciation analysis in mono-varietal wines by on-line ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction, Food chemistry, 138 (2013) 484-490.
- [8] I.B. Karadjova, L. Lampugnani, M. Onor, A. D'Ulivo, D.L. Tsalev, Continuous flow hydride generation-atomic fluorescence spectrometric determination and speciation of arsenic in wine, Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 60 (2005) 816-823.
- [9] B. Sadee, M. Foulkes, S. Hill, Coupled techniques for arsenic speciation in food and drinking water: a review, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 30 (2015) 102-118.
- [10] R.P. Monasterio, J.A. Londonio, S.S. Farias, P. Smichowski, R.G. Wuilloud, Organic solvent-free reversed-phase ion-pairing liquid chromatography coupled to atomic fluorescence spectrometry for organoarsenic species determination in several matrices, Journal of agricultural and food chemistry, 59 (2011) 3566-3574.
- [11] Y.W. Chen, 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, 671 (2010) 9-26.
- [12] M. Koel, Ionic liquids in chemical analysis, CRC press, 2008.
- [13] A.C. Grijalba, L.B. Escudero, R.G. Wuilloud, Capabilities of several phosphonium ionic liquids for arsenic species determination in water by liquid-liquid microextraction

and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytical Methods*, 7 (2015) 490-499.

[14] M.C. García-Alvarez-Coque, M.J. Ruiz-Angel, A. Berthod, S. Carda-Broch, On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review, *Analytica chimica acta*, 883 (2015) 1-21.

[15] G. Fang, Q. L., C. Liu, M. Huo, S. Wang, An ionic liquid improved HPLC-ICP-MS method for simultaneous determination of arsenic and selenium species in animal/plant-derived foodstuffs, *Analytical Methods*, 7 (2015) 8617-8625.

[16] B. Chen, M. He, X. Mao, R. Cui, D. Pang, B. Hu, Ionic liquids improved reversed-phase HPLC on-line coupled with ICP-MS for selenium speciation, *Talanta*, 83 (2011) 724-731.

[17] Q.Q. Baltazar, J. Chandawalla, K. Sawyer, J.L. Anderson, Interfacial and micellar properties of imidazolium-based monocationic and dicationic ionic liquids, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 302 (2007) 150-156.

[18] C. Zhang, Y. Li, X.Y. Cui, Y. Jiang, X.P. Yan, Room temperature ionic liquids enhanced chemical vapor generation of copper, silver and gold following reduction in acidified aqueous solution with KBH₄ for atomic fluorescence spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (2008) 1372-1377.

[19] C. Zhang, Y. Li, P. Wu, Y. Jiang, Q. Liu, X.P. Yan, Effects of room-temperature ionic liquids on the chemical vapor generation of gold: Mechanism and analytical application, *Analytica chimica acta*, 650 (2009) 59-64.

[20] C. Zhang, Y. Li, P. Wu, X.P. Yan, Synergetic enhancement effect of ionic liquid and diethyldithiocarbamate on the chemical vapor generation of nickel for its atomic fluorescence spectrometric determination in biological samples, *Analytica chimica acta*, 652 (2009) 143-147.

[21] A. D'Ulivo, Z. Mester, R.E. Sturgeon, Q. Wang, B. Welz, Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report), *Pure and Applied Chemistry*, 83 (2011) 1283-1340.

[22] C. Wei, J. Liu, A new hydride generation system applied in determination of arsenic species with ion chromatography hydride generation-atomic fluorescence spectrometry (HG-AFS), *Talanta*, 73 (2007) 540-545.

[23] G. Fang, Q. L., C. Liu, M. Huo, S. Wang, An ionic liquid improved HPLC-ICP-MS method for simultaneous determination of arsenic and selenium species in animal/plant-derived foodstuffs, *Analytical Methods*, 7 (2010) 8617-8625.

[24] V.S. Mannur, D. Patel, V.S. Mastiholimath, G. Shah, Selection of buffers in LC-MS/MS: an overview, *International Journal of Pharmaceutical Science s Review and Research*, 6 (2011) 34.

- [25] X. Subirats, M. Rosés, E. Bosch, On the Effect of Organic Solvent Composition on the pH of Buffered HPLC Mobile Phases and the pKa of Analyt A Review, *Separation & Purification Reviews*, 36 (2007) 231-255.
- [26] D.V. McCalley, Selection of suitable stationary phases and optimum conditions for their application in the separation of basic compounds by reversed phase HPLC, *Journal of separation science*, 26 (2003) 187-200.
- [27] I.B. Karadjova, L. Lampugnani, J. Dédina, A. D'Ulivo, M. Onor, D.L. Tsalev, Organic solvents as interferences in arsenic determination by hydride generation atomic absorption spectrometry with flame atomization, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61 (2006) 525-531.
- [28] W.A. Maher, M.J. Ellwood, F. Krikowa, G. Raber, S. Foster, Measurement of arsenic species in environmental, biological fluids and food samples by HPLC-ICPMS and HPLC-HG-AFS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30 (2015) 2129-2183.
- [29] M.M. Nearing, I. Koch, K.J. Reimer, Complementary arsenic speciation methods: A review, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 99 (2014) 150-162.
- [30] Z. Mester, A. Woller, P. Fodor, Determination of Arsenic Species by High-Performance Liquid Chromatography Hydride Generation "(Ultrasonic Nebulizer) "Atomic Fluorescence Spectrometry, *Microchemical Journal*, 54 (1996) 184-194.
- [31] X.C. Le, X. Lu, M. Ma, W.R. Cullen, H.V. Aposhian, B. Zheng, Speciation of key arsenic metabolic intermediates in human urine, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 5172-5177.
- [32] I. Ipolyi, P. Fodor, Development of analytical systems for the simultaneous determination of the speciation of arsenic [As (III), methylarsonic acid, dimethylarsinic acid, As (V)] and selenium [Se (IV), Se (VI)], *Analytica chimica acta*, 413 (2000) 13-23.
- [33] J.L. Gómez-Ariza, F. Lorenzo, T. García-Barrera, Simultaneous determination of mercury and arsenic species in natural freshwater by liquid chromatography with on-line UV irradiation, generation of hydrides and cold vapor and tandem atomic fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 1056 (2004) 139-144.
- [34] C.M. Moreira, F.A. Duarte, J. Leberherz, D. Pozebon, E.M.M. Flores, V.L. Dressler, Arsenic speciation in white wine by HPLC-ICPMS, *Food chemistry*, 126 (2011) 1406-1411.

3.2 Análisis de especiación de Selenio en alimentos y bebidas mediante cromatografía líquida de alto rendimiento asistida por líquidos iónicos y detección por espectrometría de fluorescencia atómica

3.2.1 Introducción

El Se es un elemento esencial que es beneficioso para los humanos en bajas concentraciones, pero en altas concentraciones puede ser muy perjudicial [1]. Está presente en 25 proteínas en los seres humanos que actúan como enzimas que permiten que importantes funciones biológicas sean posibles [2]. Se asocia a cisteína en selenoproteínas y como selenometionina puede ser intercambiado con metionina en varias proteínas [3]. El intervalo de concentración que determina su naturaleza como un elemento esencial o tóxico es muy estrecho [1]. En los últimos años, los suplementos nutricionales a base de Se han surgido en el mercado debido a las propiedades beneficiosas del Se para la salud. Sin embargo, aunque se provee la concentración total de Se en la etiqueta de este tipo de productos, no se indica información con respecto a la especie de Se [4]. Esto es muy importante, puesto que por ejemplo, Se inorgánico [Se (IV) y Se (VI)] y Se orgánico (principalmente selenoaminoácidos) tienen diferentes niveles de toxicidad, siendo las formas inorgánicas más tóxicas que las orgánicas. Este comportamiento depende del metabolismo de estas sustancias en el cuerpo y la biodisponibilidad de las fuentes donde están presentes [5].

Debido a los aspectos mencionados, el análisis de especiación de Se se está exigiendo cada vez más, a los efectos de estimar los verdaderos beneficios o riesgos del consumo de alimentos enriquecidos con Se para el ser humano. Desde el punto de vista del análisis de especiación, se deben considerar dos factores importantes: que la extracción de especies de Se desde las matrices de los alimentos se realice sin transformaciones o modificaciones y que se disponga de una técnica analítica de alta sensibilidad para la detección de las especies a niveles trazas. En el caso de la etapa de extracción, varias metodologías se han desarrollado [6]. Una de las más utilizadas para matrices complejas de alimentos ha sido la extracción enzimática en condiciones suaves a 37 °C de temperatura y un valor de pH de 7,5, lo cual permite alcanzar una alta eficiencia de extracción y evita el riesgo de transformaciones de las especies de Se [7]. Con respecto a la etapa de análisis de especiación de Se, se ha utilizado ampliamente la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y la cromatografía de

gases (GC) [5] acopladas normalmente a detectores sensibles, tales como la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) [8] o la generación de hidruros asociada a la espectrometría de fluorescencia atómica (HG-AFS) [9]. Los principios cromatográficos más aplicados para la separación de especies de Se han sido la fase reversa (RP) y el intercambio aniónico [9].

Cuando la cromatografía se fundamenta en la RP, la separación de las especies de Se se realiza en base a la polaridad y su interacción con una fase estacionaria apolar (C_{18} o C_8) que emplea un agente de formación de pares iónicos, el cual es añadido a la fase móvil. Por otro lado, intercambio aniónico permite la separación de especies de Se si éstas se encuentran a un pH apropiado y con columna con fase estacionaria de carga opuesta. Los agentes de formación de pares iónicos más empleados son los ácidos perfluorocarboxílicos, tales como el ácido trifluoroacético (TFA) [10] y el ácido heptafluorobutanóico (HFBA) [11]. También se han empleado sales de tetraalquilamonio [12] y sales alquilsulfónicas [13]. Sin embargo, una desventaja de todos estos agentes de formación de pares iónicos es que cuando se aplican como el único aditivo de la fase móvil, no permiten la separación de las especies inorgánicas de Se. En esos casos, es necesario emplear una mezcla de varios agentes formadores de pares iónicos para lograr una resolución aceptable para las especies inorgánicas de Se [14]. Por lo tanto, la posibilidad de utilizar un único agente de formación de pares iónicos para poder separar tanto las especies inorgánicas como las orgánicas de Se, sería una ventaja importante en RP-HPLC. Para ello, es fundamental continuar investigando nuevos reactivos que pudieran aportar ventajas notorias para la separación de especies de Se.

Los ILs son sales líquidas a temperatura ambiente que han encontrado múltiples aplicaciones en química analítica [15]. Una de estas aplicaciones ha sido como agentes formadores de pares iónicos o en general como modificadores de la fase móvil en un proceso cromatográfico [16]. Dependiendo de la naturaleza del catión y el anión del IL, es posible esperar una interacción particular con la fase estacionaria o las especies. Algunas de las ventajas del uso de los ILs en RP-HPLC han sido la mejora de la forma de los picos, incremento de la resolución, la supresión del efecto silanol y cambios favorables en el comportamiento de retención de los analitos [16]. Así, los ILs han sido utilizados en el análisis de especiación de Se con RP-HPLC [17, 18]. De hecho, ILs con cationes tipo imidazolio y aniones como el cloruro o tetrafluoroborato han sido los más utilizados en este tipo de evaluaciones. Sin embargo, estos trabajos han requerido la aplicación combinada de mezclas de varios ILs agregados a las fases móviles para lograr la separación completa de todas las especies de Se. Además, en estos trabajos se ha empleado la técnica híbrida HPLC-ICP-MS, la cual aún plantea

limitaciones para muchos laboratorios debido a su elevado costo de adquisición. Por otro lado, hasta el momento no hay estudios como los descritos en donde se haya utilizado la técnica HPLC-HG-AFS y la evaluación del efecto de los ILs sobre la detección HG-AFS permanece desconocida.

En este trabajo, se llevó a cabo un estudio completo de los efectos de varios ILs con cationes del tipo imidazolio y tipo fosfonio sobre la separación y determinación de diferentes especies de Se por RP-HPLC-HG-AFS. Los mecanismos implicados en la separación de Se(IV), Se(VI), SeMet y MeSeCys se evaluaron para entender cómo los ILs pueden mejorar la separación. De este modo, se estudió el efecto de ILs con cationes del tipo alquil-metilimidazolio con cadenas alquílicas de C₄-C₁₆ átomos de carbono y del IL metilsulfatotributil(metil)fosfonio como aditivos de la fase móvil. Las condiciones de generación de hidruros se optimizaron por una metodología multivariada teniendo en cuenta los posibles efectos de cada IL sobre la reacción de generación. El método desarrollado en este trabajo de tesina ha permitido la separación de las dos especies de Se inorgánicas y orgánicas dentro de la misma serie cromatográfica. La aplicación de la metodología se ensayó mediante el análisis de especiación de Se en muestras de alimentos de gran importancia para la provincia de Mendoza y que usualmente plantean alternativas naturales de suplementación del elemento para la dieta.

3.2.2 Efecto de los líquidos iónicos sobre la detección de especies de Selenio por la técnica HG-AFS

Inicialmente en este trabajo, se evaluó el posible efecto de los ILs sobre la detección de las especies de Se por la técnica HG-AFS. Para este estudio, se inyectaron de manera individual las cuatro especies de Se en el sistema de HPLC pero sin utilizar la columna, de modo de propulsar la mezcla patrón mediante las fases móviles compuestas por una solución buffer (pH = 2,0; 0,02 mol L⁻¹ cítrico/citrato), 5% (v/v) de metanol y cada IL a dos niveles de concentración [0,1% (v/v) y 0,5% (v/v)]. El caudal de la fase móvil fue de 1,0 mL min⁻¹. La detección HG-AFS empleó un sistema de digestión UV para la descomposición en línea de las especies de Se y 0,1% (p/v) de KI (en 0,2% (p/v) de NaOH) como agente reductor. Se evaluaron ILs tipo metilimidazolios con cadenas alquílicas entre C₄-C₁₆ y un IL tipo fosfonio ([P_{4,4,4,1}]CH₃SO₄). Cabe mencionar, que los ILs con cadenas de C₁₂ y C₁₆, a una concentración de 0,5% (v/v), no pudieron ser considerados debido al alto nivel de espuma formado en el separador de gas-líquido en la unidad de detección. El comportamiento observado para cada especie fue diferente según la longitud de la

cadena alquílica, naturaleza del IL empleado y la concentración utilizada. Los resultados se pueden observar en la Figura 3.2.1.

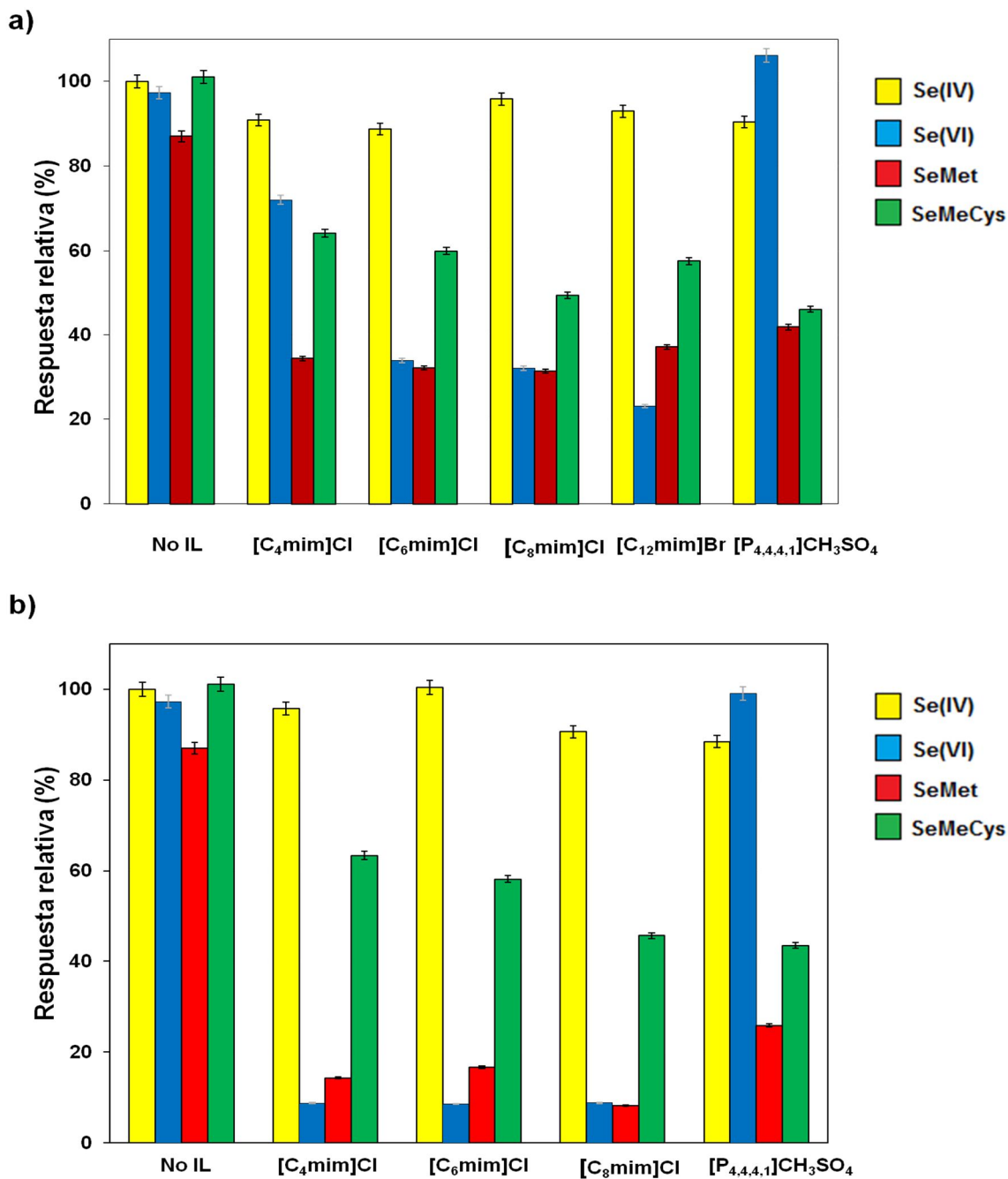


Figura 3.2.1 Respuesta relativa de cada especie de Se con respecto a la de Se(IV) en presencia de los diferentes ILs estudiados en este trabajo. a) 0,1% (v/v) IL b) 0,5% (v/v) IL. Concentración de cada especie de Se fue de 200 $\mu\text{g Se L}^{-1}$. Se(IV): selenito, Se(VI): selenato, SeMet: selenometionina y SeMeCys: selenometilselenocisteína.

Para los ILs con cationes del tipo alquil-imidazolio, Se(IV) no mostró diferencias significativas con una disminución en la respuesta relativa no superior al 12% para todas las longitudes de cadena alquílica y concentraciones. En el caso de Se(VI), la

señal disminuyó para todos los ILs de tipo imidazolio y niveles de concentración. A 0,1% (v/v) de IL, los porcentajes decrecientes fueron entre 26% y 76%. Al 0,5% (v/v) de IL, la disminución fue casi constante para todos los ILs alcanzando un valor medio del 91%. Para SeMet a 0,1% (v/v) de IL, el porcentaje medio decreciente fue de 60% y al 0,5% (v/v) de IL, fue de entre 83% y 93%. La especie SeMeCys evidenció disminuciones entre 40% y 60% para cualquiera de los ILs y concentraciones evaluadas. Por otro lado, en el caso del IL con catión alqui-fosfonio ($[P_{4,4,4,1}]CH_3SO_4$), la especie Se(IV) no mostro disminuciones mayores que 10%, mientras que Se(VI) no tuvo cambios significativos, como si ocurrió en caso de los ILs tipo imidazolio. Las señales de las especies SeMet y SeMeCys disminuyeron en casi un 60% en su respuesta relativa.

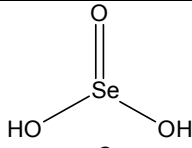
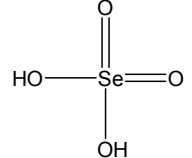
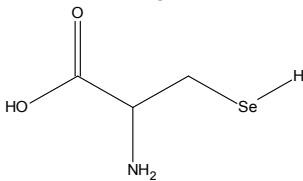
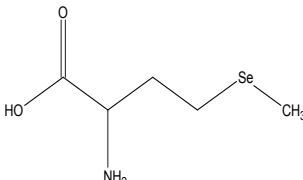
Los resultados observados indican que para ILs de tipo imidazolio, la concentración de IL fue un factor clave en la sensibilidad de la señal IF mientras que para IL tipo fosfonio no fue significativa. En los valores más elevados de concentración de ILs tipo imidazolio, la señal IF se redujo significativamente.

3.2.3 Optimización de los parámetros cromatográficos para la separación de especies de Selenio

3.2.3.1 Efecto del pH sobre la separación de las especies de Selenio

Tanto en la separación de las especies de Se por intercambio aniónico como a través de la formación de pares iónicos con un agente adecuado, el pH juega un papel importante ya que todas las especies de Se deben encontrarse como aniones. Las especies de Se en este estudio tienen varios grupos ionizables con diferentes valores de pKa que se pueden observar en la Tabla 3.2.1. Por esta razón, se llevó a cabo una evaluación del pH entre un rango definido entre 2,0 y 7,5. Estos valores se eligieron teniendo en cuenta la estabilidad de la fase estacionaria de la columna utilizada para la separación. De este modo, se emplearon varios sistemas buffer a 0,02 mol L⁻¹ para ajustar el valor de pH a 2,0 y 3,5 con sistema buffer ácido cítrico/citrato, y a pH 6 y 7,5 con sistema buffer fosfato ácido/fosfato diácido. Para esta evaluación, $[C_8mim]Cl$ fue el IL elegido, ya que se consideró que posee una cadena alquílica de longitud media entre todos los ILs de tipo imidazolio que se estudiaron. La evaluación se realizó en modo isocrático con un caudal de fase móvil de 1 mL min⁻¹.

Tabla 3.2.1 Nombres y propiedades de las especies de Se evaluadas en este trabajo [19].

Especie	Abreviación	Fórmula	Estructura	pKa
Selenito	Se(IV)	H ₂ SeO ₃		pKa = 1,92
Selenato	Se(VI)	H ₂ SeO ₄		pKa ₁ = 2,46 pKa ₂ = 7,31
Se-metionina	SeMet	C ₅ H ₁₁ NO ₂ Se		pKa (ácido) = 4,26 pKa (amino) = 8,25
Se-metil-Se-cisteína	SeMeCys	C ₄ H ₉ NO ₂ Se		pKa (ácido) = 2,0 pKa (amino) = 8,4

Los resultados para dos de los valores de pH (3,5 y 6,0) se pueden observar en la Figura 3.2.2. De esta manera, se observó que el pH no afectó la separación cromatográfica, aunque la sensibilidad de la técnica HG-AFS se vio modificada. Bajo estas condiciones cromatográficas, las cuatro especies de Se no se resolvieron. Además, ante la inyección individual de cada especie, se encontró que las especies orgánicas fueron co-eluidas primero, mientras que Se(IV) se eluyó luego de unos segundos y Se(VI) no se eluyó, incluso con una corrida cromatográfica de 30 minutos. En base a dichas observaciones se seleccionó un pH de 6,0 para continuar con experimentos posteriores, puesto que esta condición favorecía la sensibilidad de HG-AFS para la detección de las especies de Se.

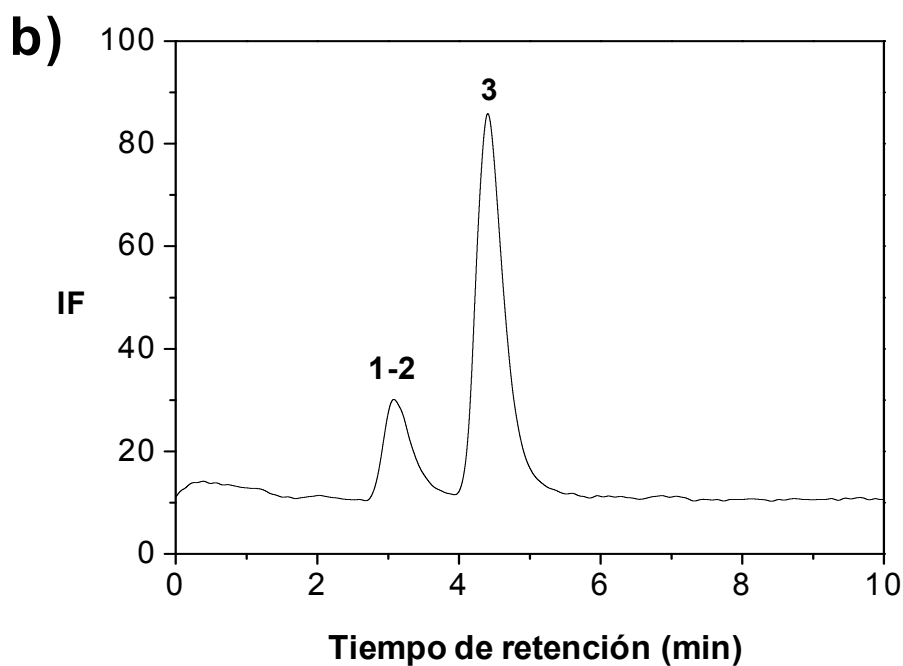
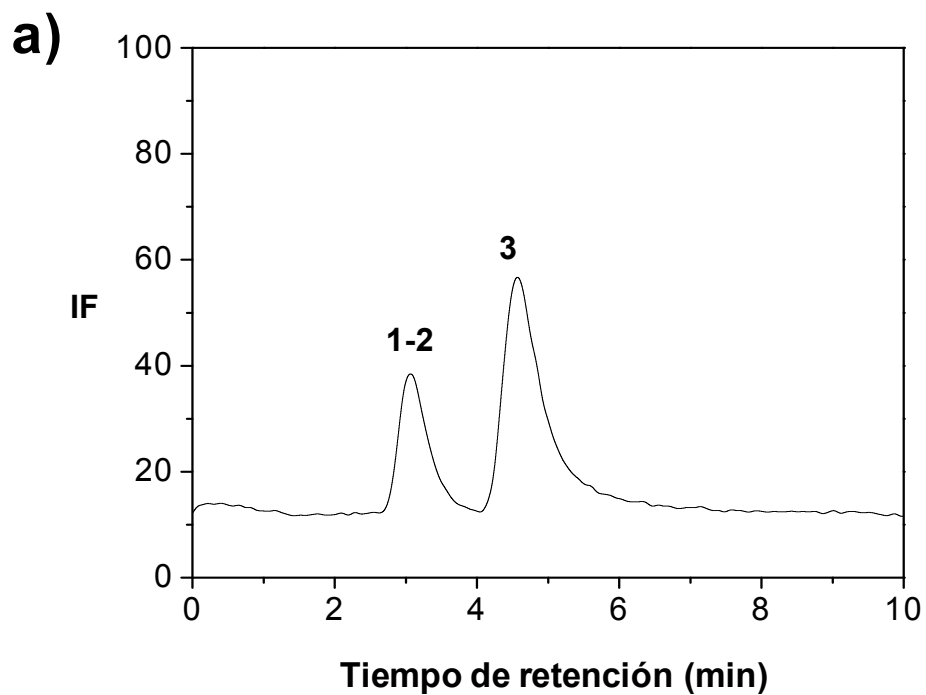


Figura 3.2.2 Efecto del pH sobre la separación de las especies de Se. a) pH = 3,5 b) pH = 6,0. IF: intensidad de la señal de fluorescencia. 1) SeMeCys, 2) SeMet, 3) Se(IV), 4) Se(VI). La concentración de cada especie fue de $200 \mu\text{g Se L}^{-1}$.

3.2.3.2 Efecto de la concentración de buffer y caudal de la fase móvil

En las separaciones cromatográficas de intercambio aniónico, la concentración del buffer utilizado es muy importante ya que condiciona el comportamiento de las

especies a ser separadas con la fase estacionaria de la columna de HPLC. En este trabajo se evaluó la concentración del buffer (fosfato ácido/fosfato diácido) en la fase móvil a dos valores: $5,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ y $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Los resultados mostraron que a la concentración más baja, las dos primeras especies eluidas (SeMet y SeMeCys) comenzaron a resolverse, Se(IV) se resolvió pero con un tiempo de retención muy largo y Se(VI) no fue eluida incluso con un tiempo de ejecución de 45 minutos. Por otro lado, a $0,05 \text{ mol L}^{-1}$, SeMet, SeMeCys y Se(IV) coeluyeron, mientras Se(VI) se eluyó a un tiempo de retención más razonable dentro de los 9 minutos de corrida cromatográfica. Estos resultados llevaron a formular un gradiente de concentración del buffer y caudal de la fase móvil, a los efectos de separar completamente las cuatro especies de Se dentro de un tiempo de análisis razonable (Tabla 2.1.5).

Se desarrolló entonces una separación cromatográfica con un gradiente que consistió en mantener constante en $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ la concentración del buffer durante 6 min y a una velocidad de flujo de la fase móvil de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$. Este paso inicial mejoró la separación de SeMeSeCys y SeMet (Figura 3.2.3). El gradiente (Figura 3.2.4) continuó con un segundo paso en el que la concentración del buffer se incrementó linealmente hasta $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ en 1 min y se mantuvo constante hasta el final de la corrida cromatográfica. Además, el caudal de la fase móvil se incrementó hasta $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ durante este segundo paso para acelerar la elución de Se(VI). La aplicación de este programa de gradiente mejoró la resolución de los picos y permitió la elución de Se(VI) en tiempos significativamente más cortos. Sin embargo, no se logró completamente la resolución de la línea de base de las especies orgánicas de Se. Se establecieron éstas condiciones de gradiente para la siguiente evaluación con diferentes tipos de ILs.

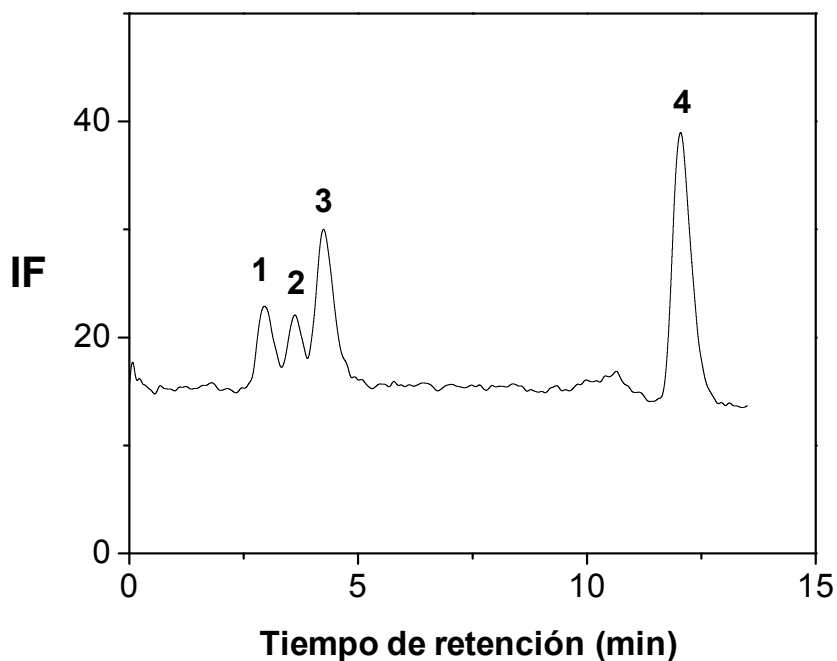


Figura 3.2.3 Cromatograma con el gradiente desarrollado para la separación de las especies de Se a una concentración de $200 \mu\text{g Se L}^{-1}$. 1) SeMeSeCys, 2) SeMet, 3) Se(IV), 4) Se(VI). Otras condiciones experimentales son mencionadas en el Tabla 2.1.5

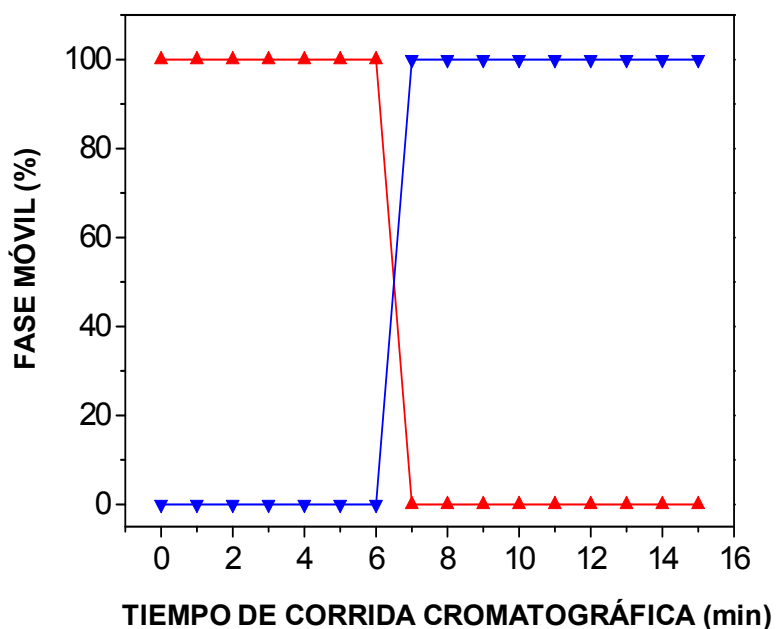
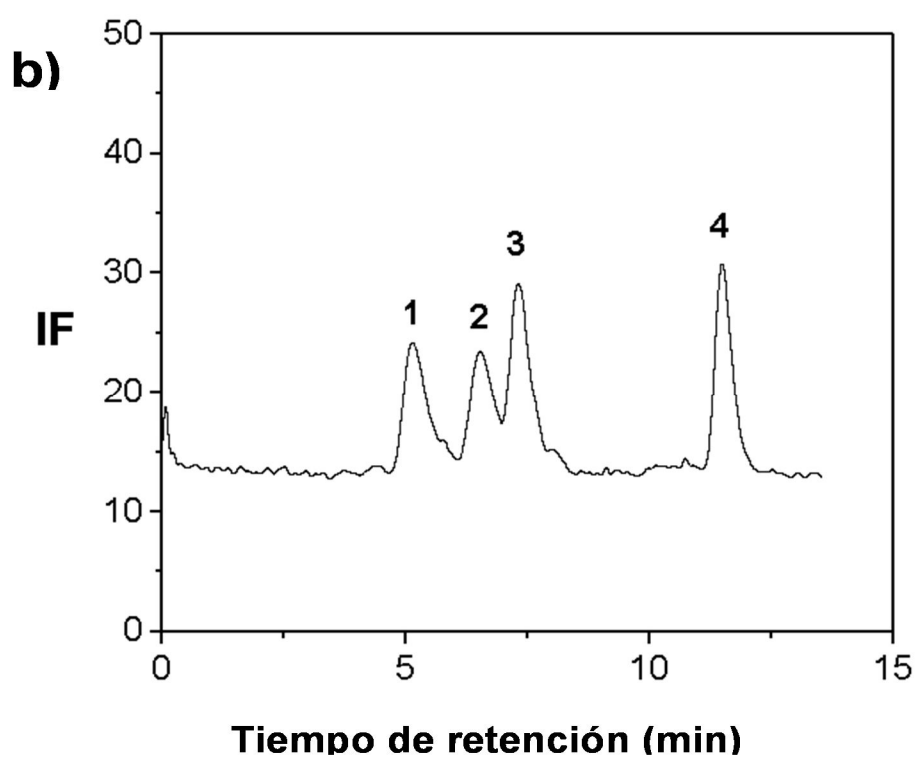
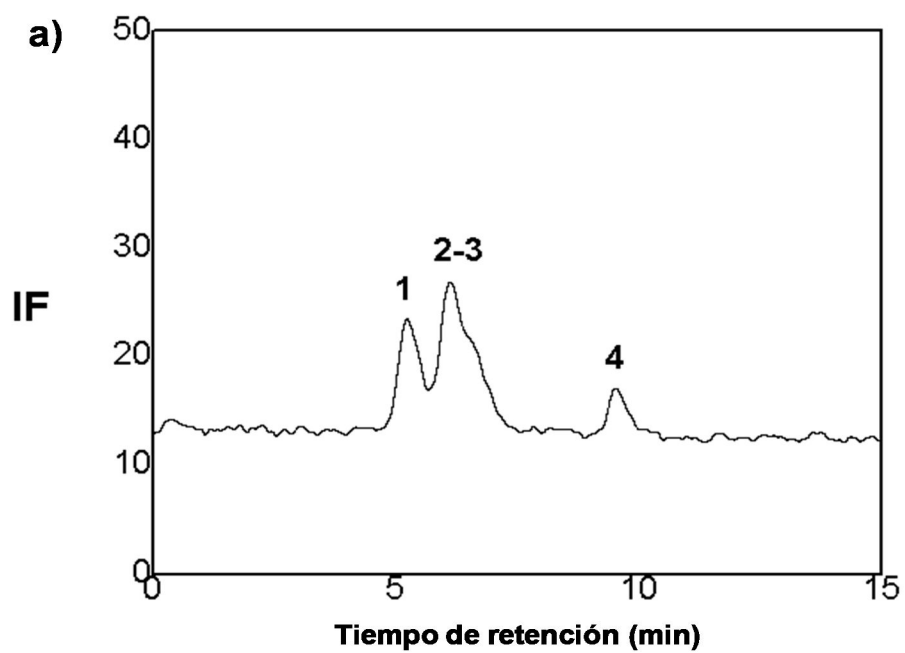


Figura 3.2.4 Esquema de cambio de proporciones de la fase móvil A y fase móvil B durante el gradiente inicial para la separación de especies de Se. ▲ Fase móvil A, ▼ Fase móvil B. Otras condiciones experimentales son mencionadas en el Tabla 2.1.5

3.2.3.3 Evaluación de diferentes líquidos iónicos para la separación de las especies de Selenio

Una vez establecidas algunas condiciones de separación de acuerdo a los estudios previos, se procedió a evaluar la influencia que tenía la naturaleza del IL. En este caso, la concentración de cada IL se fijó en 0,1% (v/v). En la Figura 3.2.5 (a-d), se pueden observar cromatogramas para [C₄mim]Cl, [C₆mim]Cl, [C₁₂mim]Br y [P_{4,4,4,1}]CH₃SO₄. Es importante mencionar que el IL [C₁₆mim]Cl no se pudo evaluar, debido a la formación de espuma en el separador gas-líquido, dificultando la separación del hidruro gaseoso formado y su transporte hacía el atomizador del equipo AFS. Los resultados arrojaron evidencias de que el aumento en la longitud de la cadena alquílica de los ILs tipo imidazolio (Figura 3.2.5 a-c) generó algunos cambios en el comportamiento de retención de las especies de Se. La primera especie en eluirse, SeMeCyst, no se retuvo en la columna y se eluyó al mismo tiempo (5 minutos) para todos los ILs evaluados. Por otra parte, cuando la cadena alquílica se incrementó, la retención de la última especie, Se(VI), fue más fuerte y esto condujo a tiempos de retención mayores. Este tiempo fue de 14 minutos en el caso de [C₁₂mim]Br y de 10 minutos con [C₄mim]Cl. Así, cuanto más grande es el catión del IL, se observó una asociación más fuerte con la fase estacionaria C₈. Esta interacción es responsable de que la fase estacionaria pueda modificarse de tal forma que Se(VI) pueda ser retenido de un modo más fuerte. Con respecto a la resolución de las especies, el mejor sistema en estas condiciones fue [C₆mim]Cl, con SeMeCys totalmente separada, y SeMet y Se(IV) casi resueltos. Para [C₈mim]Cl, la resolución de SeMeCys y SeMet no se logró. Para los ILs [C₁₂mim]Br y [C₄mim]Cl, dos de las cuatro especies de Se bajo estudio no se resolvieron. Estos sistemas se descartaron como ideales para la especiación de Se. Para [P_{4,4,4,1}]CH₃SO₄, (Figura 3.2.5 d), las especies de Se fueron eluidas dentro de 12 minutos de corrida cromatográfica y se observó que SeMeCys y SeMet coeluyeron sin ser separadas. Por lo tanto, este sistema tampoco fue apropiado para el análisis de especiación.



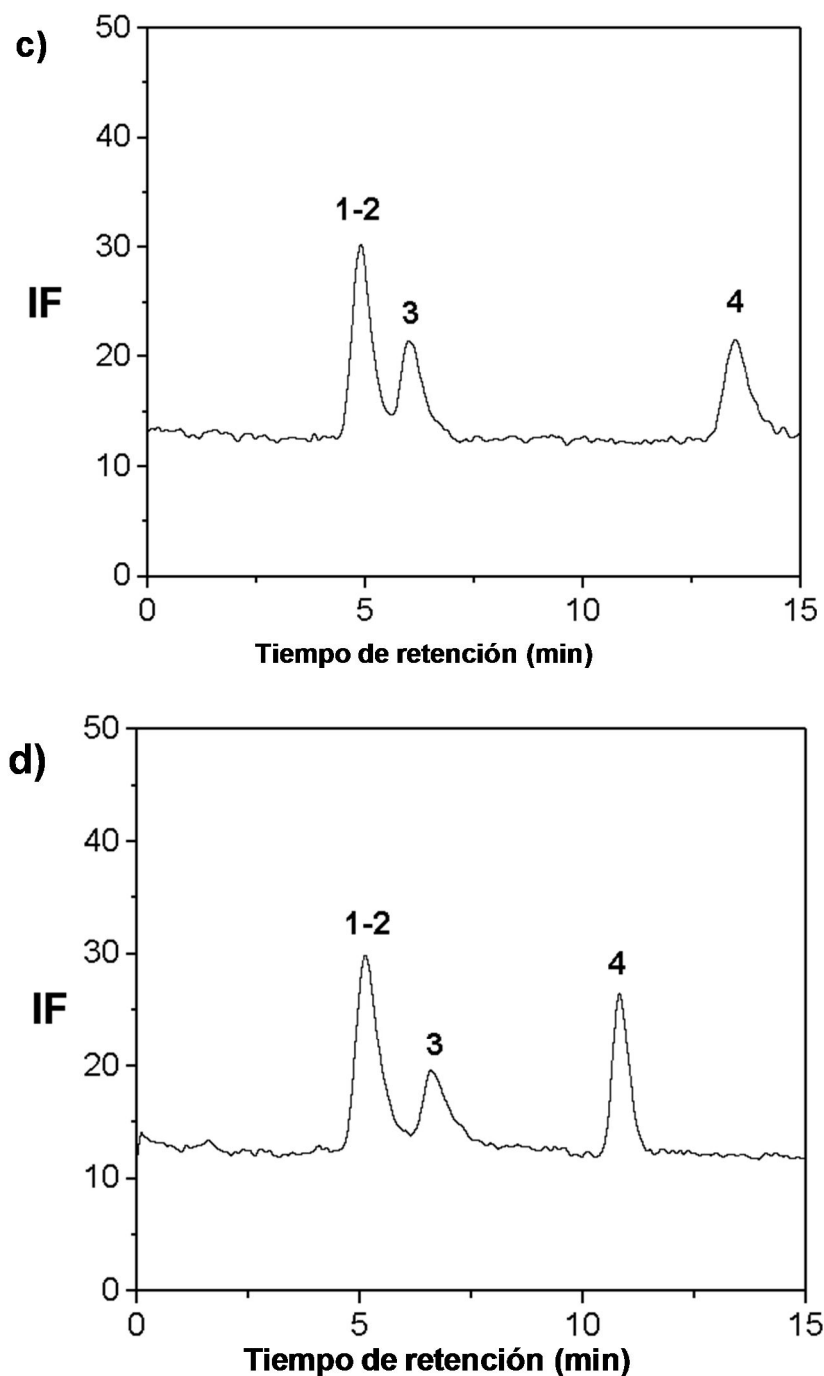


Figura 3.2.5 Efecto del tipo de IL en la separación de especies de Se. a) $[C_4mim]Cl$ b) $[C_6mim]Cl$, c) $[C_{12}mim]Br$, d) $[P_{4,4,4,1}]CH_3SO_4$. 1) SeMeCys, 2) SeMet, 3) Se(IV), 4) Se(VI). Especies de Se = $200 \mu g L^{-1}$.

El comportamiento cromatográfico de los ILs ha sido discutido por otros autores [17, 20]. Los ILs pueden interactuar con la fase estacionaria y los otros componentes de la fase móvil para formar una nueva fase pseudo-estacionaria. El catión del IL puede interactuar electrostáticamente con los grupos silanol de la columna C_8 y puede interactuar a través del grupo imidazolio con la cadena alquílica apolar de la fase

estacionaria. Así, debido a que los ILs son entidades complejas, los mecanismos de interacción en los sistemas cromatográficos pueden ser diversos y por lo tanto, su acción puede ser atribuida a una mezcla de fenómenos que incluirían, partición hidrofóbica, intercambio iónico y formación de pares iónicos. La extensión de estas interacciones depende del IL elegido y la concentración de IL.

Finalmente, con el fin de optimizar la concentración de IL en la fase móvil para la evaluación cromatográfica, se ensayaron dos niveles adicionales: 0,05% (v/v) y 0,2% (v/v). No se evaluaron concentraciones más altas de IL ya que la sensibilidad de las especies podía disminuir la sensibilidad de la detección por HG-AFS. En el caso de 0,05% (v/v) la resolución se perdió para SeMet y Se(IV). Al 0,2% la sensibilidad de las especies orgánicas se redujo en 30% y para las especies inorgánicas en 20%. De acuerdo con estos resultados, la concentración óptima de IL en la fase móvil fue de 0,1% (v/v) (Figura 3.2.5 b).

3.2.4 Optimización multivariada de las condiciones de detección de las especies de Selenio con la técnica HG-AFS

Una vez que la separación cromatográfica se optimizó mediante un método univariado, se propuso un método multivariado para lograr la mejor sensibilidad para todas las especies de Se detectadas por la técnica HG-AFS. La respuesta en este caso fue el área del pico (PA) de cada una de las especies evaluadas. El programa Design Expert® 7.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, EE.UU.) se utilizó para procesar todos los resultados obtenidos en este trabajo.

Un diseño experimental Plackett Burman fue aplicado para la determinación de las principales variables que podían influir sobre la sensibilidad de las especies de Se detectadas por la técnica HG-AFS. Las variables analizadas y sus rangos fueron: concentración de NaBH_4 (1,0-2,0% p/v), concentración de HCl (8,0-16,0% v/v), concentración de KI (0,1-0,5% p/v), velocidad de flujo de KI ($1,5\text{-}3,0\text{ mL min}^{-1}$), flujo de agente reductor (flujo de $5,0\text{-}7,0\text{ mL min}^{-1}$), temperatura de atomización ($300\text{-}450^\circ\text{C}$) y caudal de argón ($700\text{-}900\text{ mL min}^{-1}$). Los intervalos seleccionados para cada factor se eligieron de acuerdo con los experimentos previos. La evaluación consistió en medir el área del pico para cada especie de Se a $200\text{ }\mu\text{g Se L}^{-1}$, inyectándose de forma individual en el sistema de HPLC pero en este caso sin columna y con la mejor fase móvil para la separación cromatográfica a una velocidad de flujo de $0,5\text{ mL min}^{-1}$ para las especies orgánicas y de $1,0\text{ mL min}^{-1}$ para las especies inorgánicas. Se realizaron 12 experimentos.

Se empleó un gráfico de Pareto (Figura 3.2.6) para elegir los parámetros significativos. De acuerdo con este gráfico, los factores con efectos significativos fueron la concentración de HCl, concentración de KI, caudal de KI y temperatura de atomización. Con estos cuatro factores, se siguió una etapa de optimización con una superficie de respuesta.

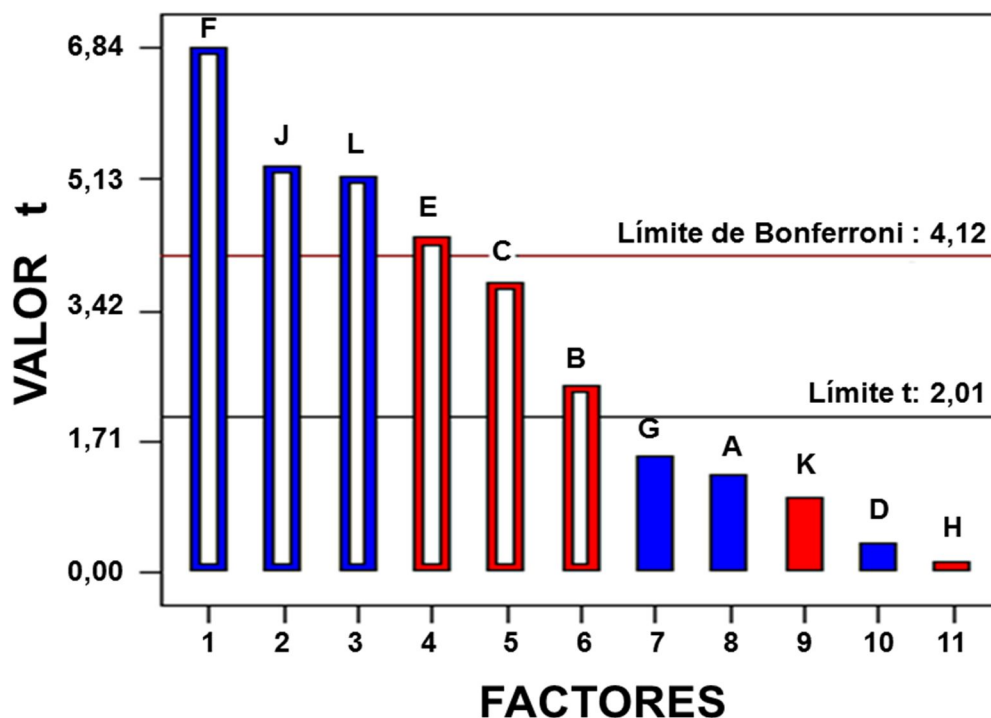
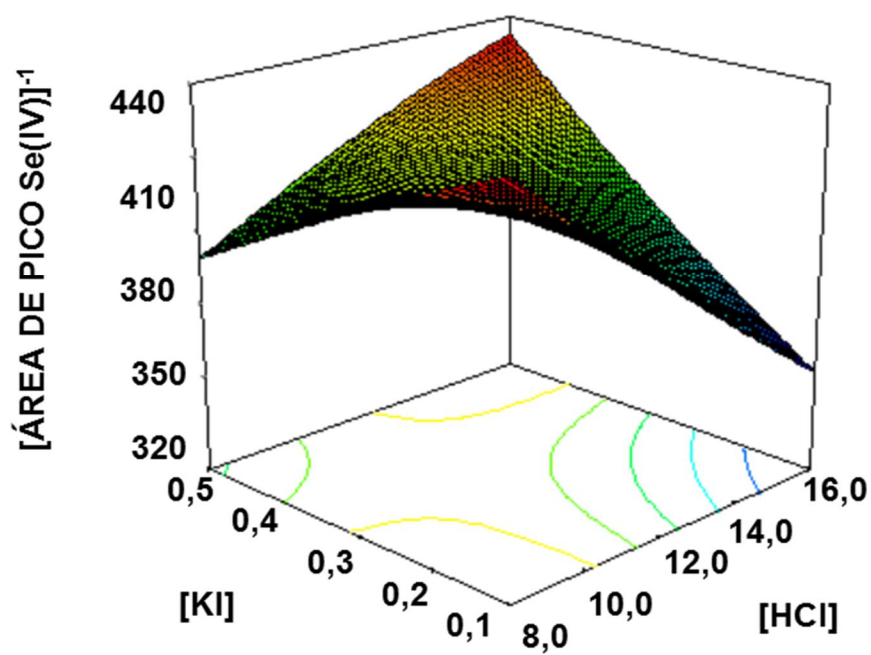


Figura 3.2.6 Gráfico de Pareto para SeMeCys para la determinación de los parámetros significativos. El gráfico es similar para las otras especies de Se. Efecto significativo positivo (azul). Efecto significativo negativo (rojo). F: temperatura de atomización, J: dummy 2, L: dummy 4, E: tasa de flujo de KI, C: concentración de KI, B: concentración de HCl. Dummy 2 y 4 son variables no utilizadas.

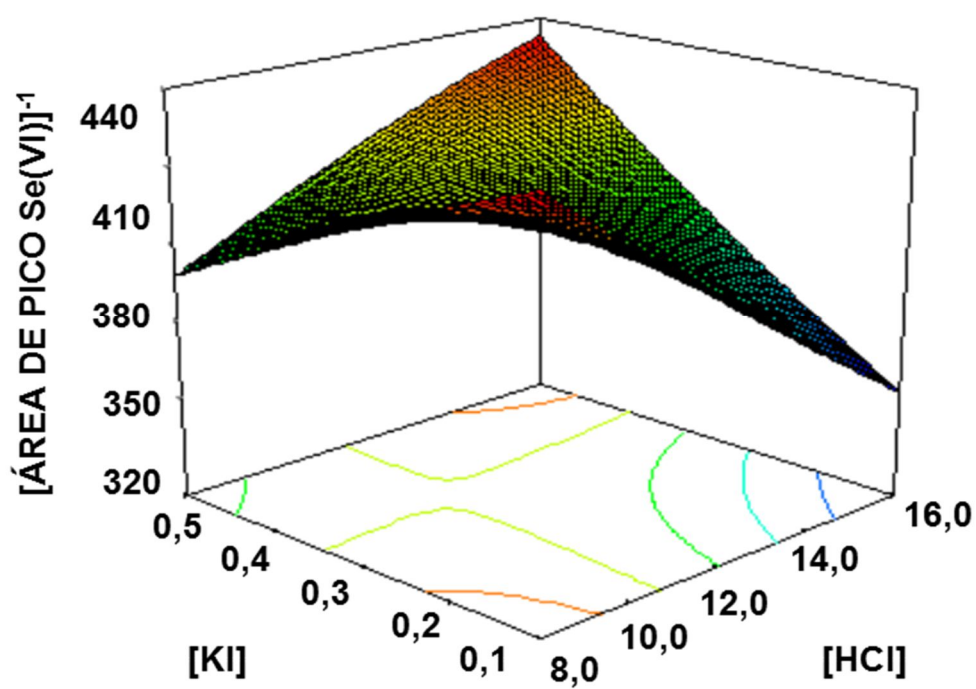
Un diseño de Box-Behnken se empleó para determinar a cuáles valores la sensibilidad de las especies de Se era superior. Se realizaron 27 experimentos, incluyendo 3 puntos centrales. Los rangos experimentales para los factores significativos fueron los mismos que en la etapa de clasificación y los factores fijos (no significativos) se establecieron como sigue: concentración de NaBH_4 (1,5% p/v), flujo del agente reductor ($6,0 \text{ mL min}^{-1}$) y caudal de argón (800 mL min^{-1}).

En la Figura 3.2.7 se pueden observar las superficies de respuesta para las cuatro especies en estudio y el efecto que provocan los parámetros significativos en la detección por HG-AFS.

a)



b)



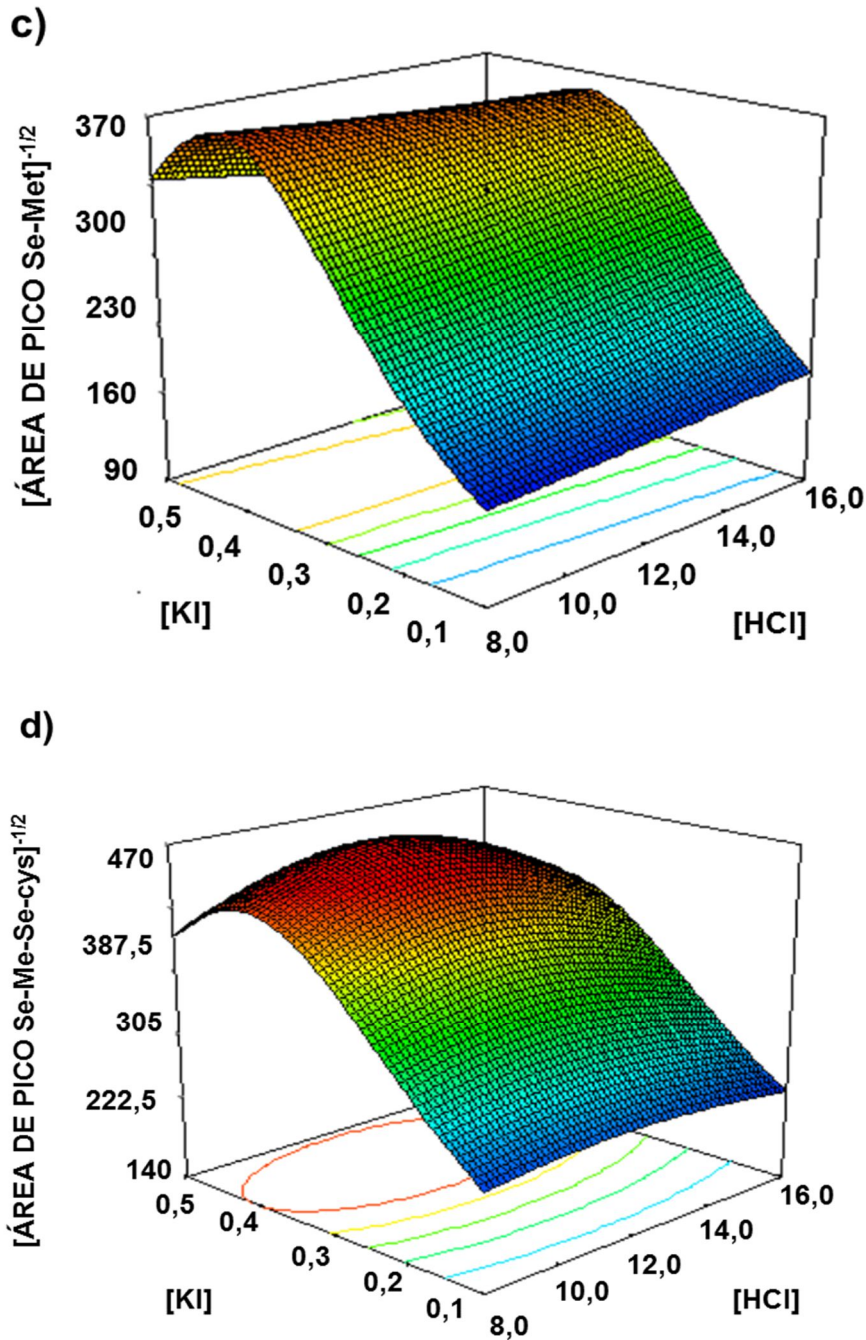


Figura 3.2.7 Superficies de respuesta de especies de Se en estudio y efecto de las variables significativas en el área de pico de la señal IF. Concentración de KI (% p/v) y concentración de HCl (% v/v) para a) Se(IV), b) Se(VI), c) SeMet, d) SeMeCys.

Una vez elegido el modelo que fue evaluado por una prueba de ANOVA, una función de deseabilidad se utilizó para optimizar las variables. Las mejores condiciones fueron: concentración de HCl [12% (v/v)], concentración de KI [0,5% (p/v)], velocidad de flujo de KI ($1,5 \text{ mL min}^{-1}$) y temperatura de atomización (400°C).

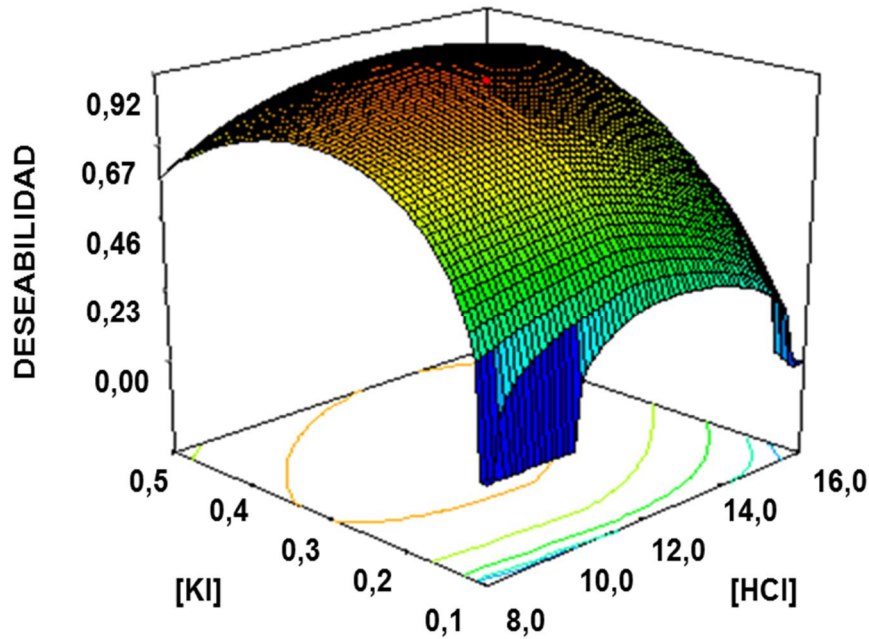


Figura 3.2.8 Función deseabilidad para la optimización de las condiciones multivariadas en HG-AFS para la detección de especies de Se.

Finalmente, el cromatograma obtenido luego del estudio de optimización multivariada se expone en la Figura 3.2.9. Como es posible observar la sensibilidad aumentó en un factor de 4 para las especies orgánicas de Se y de 1,5 para las especies inorgánicas, con respecto a las condiciones experimentales iniciales y sin la optimización.

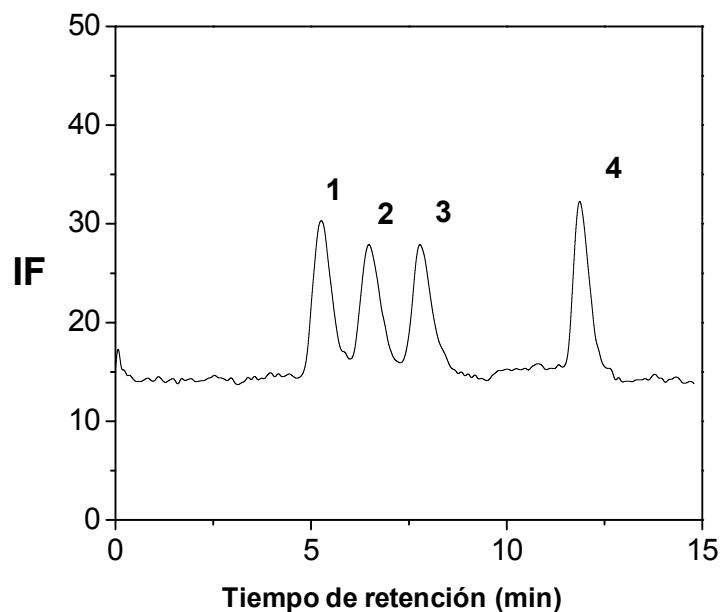


Figura 3.2.9 Cromatograma IL-RP-HPLC-HG-AFS para el análisis de especiación de Se bajo las condiciones experimentales óptimas. La concentración de las especies de Se fue de $200 \mu\text{g Se L}^{-1}$. 1) SeMeCys, 2) SeMet, 3) Se(IV), 4) Se(VI).

3.2.5 Rendimiento analítico del método desarrollado

Las cifras de mérito analítico se presentan en la Tabla 3.2.2. El LOD, estimado a partir de la señal en la intersección y tres veces la desviación estándar sobre la regresión de la curva de calibración, obtenida para las especies de Se, estaban en el rango de 0,86-1,41 $\mu\text{g L}^{-1}$. Las curvas de calibración mostraron una linealidad satisfactoria para cada especie de Se hasta al menos el límite superior evaluado en este trabajo, es decir, 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los coeficientes de correlación fueron de entre 0,9944 y 0,9995. La Tabla 3.2.2 también muestra diferentes parámetros que caracterizan la separación cromatográfica en las condiciones óptimas. Se observaron tiempos de retención reproducibles a través de 12 horas. Desviaciones estándar relativas (RSD) para áreas de los picos se calcularon para seis mediciones repetidas de una mezcla estándar que contiene las especies de Se estudiadas en este trabajo a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ cada una. Los resultados estuvieron en el intervalo de 1,22% y 1,41%.

Tabla 3.2.2 Parámetros cromatográficos y rendimiento analítico para la determinación de especies Se obtenidas con el método propuesto.

Parámetros	MeSeCys	SeMet	Se(IV)	Se(VI)
Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,0-2000	2,0-2000	1,0-2000	1,0-2000
r^2	0,9985	0,9995	0,9992	0,9944
RSD (%)	1,32	1,41	1,22	1,26
LOD ($\mu\text{g Se L}^{-1}$)	1,19	1,41	0,92	0,86
R^a	-	0,98	1,00	2,93
k^b	0,11	0,37	0,65	1,5
N^c	253	481	473	1235
α^d	-	3,36	1,75	2,31

$$^a\text{Resolución: } R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2}$$

$$^b\text{Factor de capacidad: } k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

c Número de platos teóricos:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{w} \right)^2$$

$$^d\text{Selectividad: } \alpha = \frac{k_n}{k_{n-1}}$$

La separación de todas las especies de Se no ha sido una tarea fácil por RP-HPLC con agentes formadores de pares iónicos. En general, se consigue la separación de las especies orgánicas, pero las especies inorgánicas no pueden ser separadas cuando se utiliza un solo agente de formación de pares iónicos [21].

Thosaikman y col. [19] lograron la separación de todas las especies de Se pero únicamente con una mezcla de dos agentes formadores de pares iónicos: ácido 1-butanosulfónico (BA) y ácido trifluoroacético (TFA). Otra desventaja de algunos agentes de formación de pares iónicos es su bajo pH de trabajo (pH = 2,0-2,5), lo cual compromete la estabilidad de las fases estacionarias de muchas columnas de HPLC. Los ILs han mostrado una buena resolución de todas las especies de Se a un pH apropiado de trabajo, que asegura el buen mantenimiento de las columnas de fase reversa [17, 18, 21]. Así, los ILs como agentes de formación de pares iónicos, se emplean en concentraciones bajas (10^{-3} mol L⁻¹).

Con el método propuesto en este trabajo se alcanzó una excelente separación de todas las especies de Se dentro de 12 minutos de análisis cromatográfico, con condiciones tales como 0,1% (v/v) de [C₆mim]Cl en la fase móvil y realizándose la separación a temperatura ambiente. De esta manera, es posible afirmar que el método propuesto no requiere condiciones especiales de funcionamiento, lo que lo convierte en un simple y fácil método para operar, que podría encontrar utilidad extendida en muchos laboratorios analíticos de rutina. Los LODs obtenidos en este trabajo fueron comparables a los obtenidos por otros métodos y detectores sensibles, tales como ICP-MS. Se ha demostrado la posibilidad de utilizar el método propuesto para el análisis de especiación de Se en muestras con matrices altamente complejas y diversas, tales como vino, levadura, cerveza y ajo. Además, el método propuesto presenta la ventaja de que requiere de un sólo IL y en baja concentración, lo cual es destacable frente a otros trabajos previos en donde las separaciones se realizaron con una mezcla de dos ILs y en concentraciones muy elevadas [17, 18]. Asimismo, el método desarrollado en la presente tesina, utiliza un detector más económico como es AFS, con límites de detección comparables o incluso mejores que otras técnicas instrumentales de detección altamente costosas como es el caso de ICP-MS.

3.2.6 Análisis de especiación de Selenio en muestras de alimentos y bebidas

La concentración total de Se en diversas muestras de alimentos y bebidas fueron evaluados mediante la técnica HG-AFS y los resultados se exponen en la Tabla 3.2.3. Debido a la falta de disponibilidad de un material de referencia certificado que tuviera matrices similares a las de las muestras bajo estudio, se evaluó la exactitud de la metodología propuesta mediante la realización de un estudio de recuperación del analito. En este caso, previo al procedimiento de digestión, se realizaron adiciones a 20 µg Se L⁻¹ desde una solución patrón de Se sobre las muestras de alimentos y

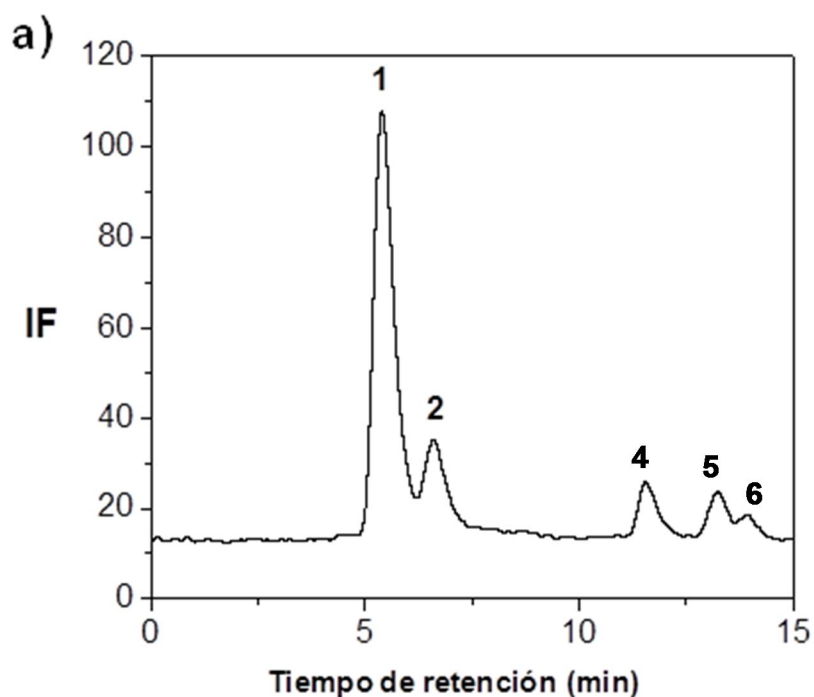
bebidas. Los valores de recuperación hallados estuvieron en el rango de 94,7-103%, lo cual indica una determinación satisfactoria de Se en presencia de las matrices resultantes del proceso de digestión de las muestras y la ausencia de efectos de matriz.

Por último, la metodología propuesta se aplicó para el análisis de especiación de Se en varias muestras de alimentos y bebidas que fueron adquiridas en comercios locales de la ciudad de Mendoza. En este punto es importante mencionar que se observó un deterioro parcial de la separación cromatográfica de las especies de Se cuando las muestras de vino y cerveza se inyectaron sin dilución en la columna de HPLC. Por lo tanto, se evaluaron diluciones 1:4 y 1:9 con agua ultrapura de dichas muestras para superar posibles efectos de la matriz. Con una dilución 1:4, se obtuvieron picos simétricos y resolución óptima, que fueron comparables a lo obtenido con la inyección de una mezcla patrón de las especies de Se. De esta manera, se adoptó una dilución 1:4 para todas las muestras de vino y cerveza antes de la inyección en HPLC. De otro modo, en el caso de las muestras de ajo y levadura, se realizó una extracción enzimática para obtener las especies de Se desde las matrices sólidas, para luego llevar a cabo el análisis de especiación con la inyección en HPLC-HG-AFS. Es importante destacar que para estas situaciones no se requirió dilución o acondicionado del pH de los extractos previo al análisis cromatográfico, siendo muy aceptable la separación y sensibilidad alcanzadas para todas las especies de Se.

Un cromatograma típico que muestra la separación de Se(IV), Se(VI), SeMet y SeMeCys en muestras de ajo se muestra en la Figura 3.2.10 a. Se observaron dos picos adicionales entre los 12 y 15 minutos. Estos picos no fueron identificados ya que no existían patrones para las especies de Se adicionales. A pesar de que no pudieron ser identificados, se demostró que la separación de estos picos era casi completa haciendo a este método capaz de separar más de las cuatro especies de Se evaluadas. Selenito no estaba presente en las muestras de ajo evaluadas. Tiene que ser mencionado que no se observaron efectos de matriz cuando las muestras de ajo se inyectaron en HPLC, evidenciado por los tiempos de retención similares y formas de los picos obtenidos con respecto a los patrones acuosos de especies de Se (Figura 3.2.9). Un estudio de recuperación se llevó a cabo en las muestras con adiciones a $50 \mu\text{g Se L}^{-1}$ o $500 \mu\text{g Se L}^{-1}$ de cada especie de Se. La Figura 3.2.10 b muestra el cromatograma de una muestra de ajo con la adición de especies de Se (para todas las especies en $50 \mu\text{g L}^{-1}$). Valores de recuperación aceptables se obtuvieron en las diferentes muestras de alimentos (92,7 - 105%). La concentración de especies de Se en las muestras de alimentos varió según el alimento analizado [22]. Para el ajo enriquecido, la distribución de las especies fue similar para todas las muestras

analizadas. Esto podría atribuirse al hecho de que estas muestras fueron enriquecidas siguiendo el mismo patrón. Anteriormente se ha demostrado que las especies que se encuentran en el ajo enriquecido dependen de diferentes factores, como los medios de agregación de Se empleados para el tratamiento de las plantas. SeMeCys fue la especie principal que se encontró en las muestras con porcentajes superiores a 60%. Esto está de acuerdo con estudios previos de las plantas *Allium* enriquecidas con diferentes tratamientos, como suelos enriquecidos con Se o cultivos hidropónicos [23].

Para las muestras de vinos, cervezas y levaduras no enriquecidas las concentraciones de Se total fueron bajas y por debajo de $22,4 \mu\text{g Se L}^{-1}$. Sólo se encontraron especies inorgánicas de Se [Se(IV) y Se(VI)]. Las concentraciones halladas estuvieron en relación a lo obtenido por otros autores para el análisis de especiación de Se en muestras similares [24-26]. Por lo tanto, nuevos métodos como el propuesto en ésta tesina son necesarios para llevar a cabo la determinación precisa de ambas especies inorgánicas y orgánicas de Se en muestras de alimentos como parte del control de calidad de los alimentos.



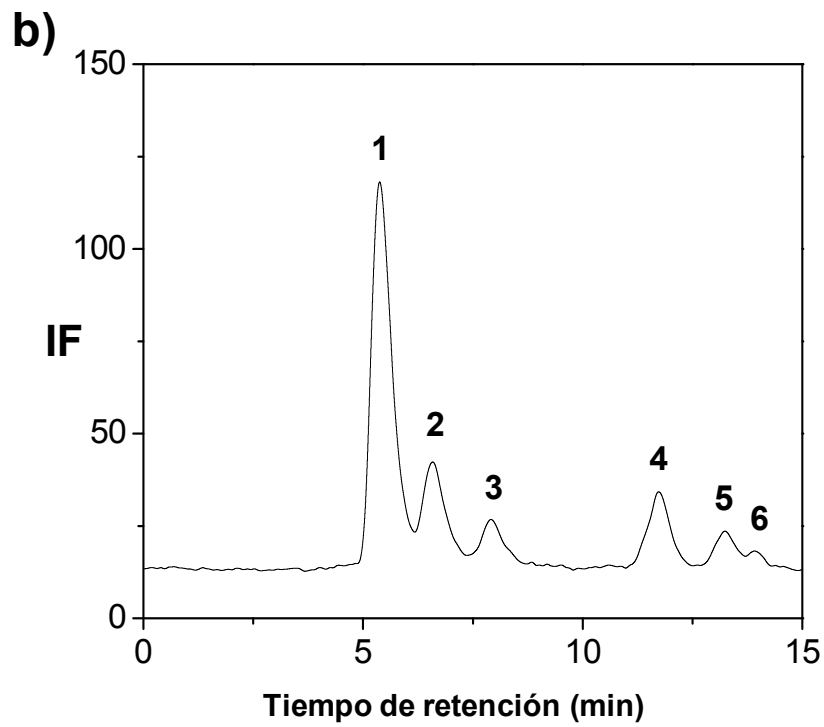


Figura 3.2.10 Cromatograma IL-RP-HPLC-HG-AFS para la especiación de las diferentes especies de Se en las condiciones optimizadas. a) Muestra de ajo sin adición de Se. b) Adición de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ en el extracto de ajo enriquecido. 1) SeMeCys, 2) SeMet, 3) Se(IV), 4) Se(VI), 5) y 6) especies no identificadas.

Tabla 3.2.3 Análisis de especiación de Se en diferentes muestras de alimentos y bebidas (nivel de confianza del 95%, n = 3).

Muestra	Total Se ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperado (%)	Se(IV)			Se(VI)		
			Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperado (%)	Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Ajo 1	71,4 \pm 2,7	96,4	0	<LOD	-	0	121,3 \pm 2,4	-
			50	51,5 \pm 1,0	103	50	168,7 \pm 4,3	94,8
Ajo 2	37,8 \pm 0,9	95,8	0	<LOD	-	0	107,7 \pm 2,1	-
			50	47,5 \pm 0,9	95,0	50	155,6 \pm 6,0	95,8
Ajo 3	47,9 \pm 0,9	99,6	0	<LOD	-	0	112,0 \pm 1,4	-
			50	52,5 \pm 0,8	105	50	160,8 \pm 0,4	97,8
Levadura 1	0,17 \pm 0,03	96,7	0	9,6 \pm 0,2	-	0	<LOD	--
			50	60,2 \pm 1,3	101	50	49,6 \pm 0,9	99,2
Levadura 2	0,39 \pm 0,07	103	0	11,5 \pm 0,3	-	0	10,9 \pm 0,2	-
			50	63,1 \pm 1,1	103	50	62,3 \pm 1,5	103
Vino 1	15,9 \pm 0,4	98,7	0	8,0 \pm 0,1	-	0	6,9 \pm 0,1	-
			50	57,6 \pm 1,1	99,2	50	57,8 \pm 1,1	102
Vino 2	8,9 \pm 0,2	94,7	0	<LOD	-	0	<LOD	-
			50	51,2 \pm 1,0	102	50	49,9 \pm 0,9	99,8
Cerveza 1	9,8 \pm 0,4	101	0	8,4 \pm 0,1	-	0	<LOD	-
			50	57,1 \pm 1,1	97,4	50	51,6 \pm 0,8	103
Cerveza 2	12,6 \pm 0,6	96,8	0	11,6 \pm 0,2	-	0	<LOD	-
			50	60,8 \pm 1,1	98,4	50	49,4 \pm 0,9	98,8

Tabla 3.2.3 Análisis de especiación de Se en diferentes muestras de alimentos y bebidas (nivel de confianza del 95%, n = 3) (continuación)

Muestra	SeMet			SeMeCys		
	Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperado (%)	Añadido ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Ajo 1	0	1017 \pm 30	-	0	3585 \pm 71	-
	50	1507 \pm 45	98,0	50	4060 \pm 95	94,9
Ajo 2	0	646,4 \pm 19	-	0	1400 \pm 35	-
	50	1130 \pm 45	96,9	50	1880 \pm 49	96,0
Ajo 3	0	700 \pm 9,8	-	0	1988 \pm 41	-
	50	1169 \pm 28	93,9	50	2491 \pm 48	101
Levadura 1	0	<LOD	-	0	1552 \pm 44	--
	50	51,2 \pm 0,8	102	50	50,4 \pm 1,9	98,8
Levadura 2	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	47,8 \pm 0,9	95,6	50	49,4 \pm 0,9	104
Vino 1	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	51,9 \pm 0,7	104	50	51,8 \pm 0,9	95,8
Vino 2	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	49,6 \pm 0,7	99,2	50	52,5 \pm 1,0	105
Cerveza 1	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	48,4 \pm 1,2	96,8	50	49,0 \pm 1,0	98,0
Cerveza 2	0	<LOD	-	0	<LOD	-
	50	51,2 \pm 1,5	102	50	48,6 \pm 0,9	97,2

3.2.7 Referencias bibliográficas

- [1] L. Nordberg, Handbook on the Toxicology of Metals, in, NewYork: AP Press Co, 2005.
- [2] S. Gromer, J. Eubel, B. Lee, J. Jacob, Human selenoproteins at a glance, Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 62 (2005) 2414-2437.
- [3] L. Schomburg, U. Schweizer, J. Köhrle, Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic, Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 61 (2004) 1988-1995.
- [4] M.P. Rayman, H.G. Infante, M. Sargent, Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation, British Journal of Nutrition, 100 (2008) 238-253.
- [5] C. Thiry, A. Ruttens, L. De Temmerman, Y.J. Schneider, L. Pussemier, Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food, Food Chemistry, 130 (2012) 767-784.
- [6] M. Montes-Bayón, M.J.D. Molet, E.B. González, A. Sanz-Medel, Evaluation of different sample extraction strategies for selenium determination in selenium-enriched plants (*Allium sativum* and *Brassica juncea*) and Se speciation by HPLC-ICP-MS, Talanta, 68 (2006) 1287-1293.
- [7] S. Mounicou, M. Dernovics, K. Bierla, J. Szpunar, A sequential extraction procedure for an insight into selenium speciation in garlic, Talanta, 77 (2009) 1877-1882.
- [8] C. B'Hymer, J. Caruso, Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1114 (2006) 1-20.
- [9] Y.W. Chen, 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, 671 (2010) 9-26.
- [10] H.G. Infante, G. O'Connor, M. Rayman, R. Wahlen, J. Entwisle, P. Norris, R. Hearn, T. Catterick, Selenium speciation analysis of selenium-enriched supplements by HPLC with ultrasonic nebulisation ICP-MS and electrospray MS/MS detection, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 19 (2004) 1529-1538.
- [11] K. Bierla, M. Dernovics, V. Vacchina, J. Szpunar, G. Bertin, R. Lobinski, Determination of selenocysteine and selenomethionine in edible animal tissues by 2D size-exclusion reversed-phase HPLC-ICP MS following carbamidomethylation and proteolytic extraction, Analytical and bioanalytical chemistry, 390 (2008) 1789-1798.
- [12] F. Pan, J.F. Tyson, P.C. Uden, Simultaneous speciation of arsenic and selenium in human urine by high-performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 22 (2007) 931-937.

- [13] Y.J. Hsieh, S.J. Jiang, Determination of selenium compounds in food supplements using reversed-phase liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchemical Journal*, 110 (2013) 1-7.
- [14] W. Thosaikham, K. Jitmanee, R. Sittipout, S. Maneetong, A. Chantiratikul, P. Chantiratikul, Evaluation of selenium species in selenium-enriched pakchoi (*Brassica chinensis* Just var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) using mixed ion-pair reversed phase HPLC–ICP-MS, *Food chemistry*, 145 (2014) 736-742.
- [15] E.M. Martinis, P. Berton, R.G. Wuilloud, Ionic liquid-based microextraction techniques for trace-element analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 60 (2014) 54-70.
- [16] M. García-Alvarez-Coque, M.J. Ruiz-Angel, A. Berthod, S. Carda-Broch, On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review, *Analytica chimica acta*, 883 (2015) 1-21.
- [17] B. Chen, M. He, X. Mao, R. Cui, D. Pang, B. Hu, Ionic liquids improved reversed-phase HPLC on-line coupled with ICP-MS for selenium speciation, *Talanta*, 83 (2011) 724-731.
- [18] G. Fang, C. Liu, M. Huo, S. Wang, An ionic liquid improved HPLC-ICP-MS method for simultaneous determination of arsenic and selenium species in animal/plant-derived foodstuffs, *Analytical Methods*, 7 (2015) 8617-8625.
- [19] W. Thosaikham, K. Jitmanee, R. Sittipout, S. Maneetong, A. Chantiratikul, P. Chantiratikul, Evaluation of selenium species in selenium-enriched pakchoi (*Brassica chinensis* Just var *parachinensis* (Bailey) Tsen & Lee) using mixed ion-pair reversed phase HPLC-ICPMS, *Food chemistry*, 145 (2014) 736-742.
- [20] M.C. García-Alvarez-Coque, M.J. Ruiz-Angel, A. Berthod, S. Carda-Broch, On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review, *Analytica chimica acta*, 883 (2015) 1-21.
- [21] H.G. Infante, G. O'Connor, M. Rayman, R. Wahlen, J. Entwisle, P. Norris, R. Hearn, T. Catterick, Selenium speciation analysis of selenium-enriched supplements by HPLC with ultrasonic nebulisation ICP-MS and electrospray MS/MS detection, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 19 (2004) 1529-1538.
- [22] Y.J. Hsieh, S.J. Jiang, Determination of selenium compounds in food supplements using reversed-phase liquid chromatography “inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchemical Journal*, 110 (2013) 1-7.
- [23] K. Pyrzynska, Selenium speciation in enriched vegetables, *Food chemistry*, 114 (2009) 1183-1191.

- [24] L.A. Escudero, P.H. Pacheco, J.A. Gasquez, J.A. Salonia, Development of a FI-HG-ICP-OES solid phase preconcentration system for inorganic selenium speciation in Argentinean beverages, *Food chemistry*, 169 (2015) 73-79.
- [25] H. Ulusoy, A. Yilmaz, R. Gurkan, A micellar improved method for trace levels selenium quantification in food samples, alcoholic and nonalcoholic beverages through CPE/FAAS, *Food chemistry*, 139 (2013) 1008-1014.
- [26] S. Rodrigo, S.D. Young, D. Cook, S. Wilkinson, S. Clegg, E.H. Bailey, A.W. Mathers, M.R. Broadley, Selenium in commercial beer and losses in the brewing process from wheat to beer, *Food chemistry*, 182 (2015) 9-13.

Capítulo 4

CONCLUSIONES

En la presente tesina de grado se han desarrollado nuevas metodologías para el análisis de especiación de As y Se en muestras de alimentos y bebidas que poseen beneficios importantes gracias al uso de los ILs como agentes de formación de pares iónicos en separaciones cromatográficas por HPLC. Se realizó un estudio exhaustivo de los efectos de diferentes ILs utilizados como aditivos para la fase móvil sobre la separación de las especies de As y Se, en base a la determinación con la técnica instrumental híbrida HPLC-HG-AFS. Asimismo, se realizaron investigaciones tendientes a identificar los posibles mecanismos de separación que tienen lugar cuando los ILs se utilizan en RP-HPLC. De esta manera, los mecanismos podrían incluir no sólo la formación de pares iónicos entre los ILs y las especies aniónicas de As y Se, seguido de la partición de los pares iónicos formados, sino también la posible modificación de la fase estacionaria de las columnas C_8 y C_{18} de HPLC para constituirse como intercambiadores iónicos, siendo la principal justificación para esta hipótesis el hecho de que el orden de elución observado para las diferentes especies se corresponde con la separación obtenida con columnas clásicas de separación por intercambio aniónico.

Por otro lado, la elección del tipo y concentración del IL más apropiados fue crítica para obtener una separación completa de las especies de As y Se. De hecho, se observaron diferentes tiempos de retención para cada una de las especies y resoluciones dependiendo de la longitud de la cadena alquílica de los ILs de tipo imidazolio. Esto se podría explicar por el hecho de que la interacción entre el par iónico formado y la fase estacionaria sería más débil cuanto más corta es la cadena alquílica del IL, mientras que ILs de cadena demasiado larga causaron dificultades en la detección por HG-AFS. Por lo tanto, ILs con cadenas alquílicas intermedias mostraron separaciones cromatográficas completas en tiempos de corrida aceptables desde el punto de vista práctico que promueven una alta productividad en aquellos laboratorios que adopten los métodos desarrollados.

También, la elección de un pH de trabajo adecuado resultó primordial para este tipo de separaciones. En este trabajo se observó que las especies de As, cuyos pK_a son relativamente altos, no podían separarse cuando se trabajaba con pHs bajos, ya que la protonación de las especies podría dificultar la formación de pares iónicos o su intercambio aniónico. Por el contrario, cuando el pH se incrementó, la separación de las especies resultó más favorable debido a que la disociación de las especies fue mayor y por ende, mejor la formación de pares iónicos entre las especies aniónicas de As y el catión del IL. Por otro lado, las especies de Se presentaron bajos valores de pK_a , por lo que el rango de pH en estudio no resultó significativo en la separación

debido a que inclusive a bajos pH las especies de Se ya estaban deprotonadas, lo que no interfería con la formación de pares iónicos.

La influencia del tipo y concentración de buffer también fue de crucial importancia durante el desarrollo de los métodos de separación propuestas en la presente tesis. Se observó que el buffer puede tener un efecto significativo sobre la separación, en especial a altas concentraciones, lo cual puede deberse a un incremento importante de la fuerza iónica de la fase móvil que en general ocasionó la elución de las especies en tiempos de retención más cortos, aunque simultáneamente también produjo el deterioro en la calidad de la separación. Para el caso del análisis de especiación de As, se pudo observar que el sistema buffer con baja fuerza iónica permitió alcanzar una buena resolución de las especies pero altos tiempos de retención, mientras que el sistema buffer con alta fuerza iónica provocó bajos tiempos de retención pero un deterioro de la resolución. Así, se seleccionó un buffer con fuerza iónica intermedia ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$) como óptimo, puesto que fue posible alcanzar la separación a la línea de base de todas las especies y en tiempos de retención aceptables. De otro modo, para la separación de especies de Se, se requirió un buffer que aportó alta fuerza iónica ($\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$) y cuya concentración se modificó a lo largo de la separación cromatográfica mediante un programa de gradientes convenientemente optimizado.

Cabe mencionar también, que en este trabajo también se evaluó el efecto de los diferentes ILs sobre la señal de fluorescencia atómica, encontrando que altas concentraciones (0,5% v/v o mayores) de IL afectaron significativamente la señal de fluorescencia, mientras que bajas concentraciones (menores a 0,5% v/v) no causaron un efecto importante sobre la sensibilidad analítica. Los resultados y conclusiones indicadas en el presente trabajo fueron muy enriquecedores debido a que no existen hasta el momento demasiados estudios que profundicen en el efecto de los ILs sobre la generación de hidruros y otras especies volátiles.

Los métodos desarrollados en este trabajo mostraron límites de detección comparables o incluso mejores que los reportados en la literatura utilizando RP-HPLC-AFS. La separación de las especies de As y Se se alcanzó bajo condiciones usuales y sin requerimientos especiales de operación. De hecho, para el caso del As la separación óptima se obtuvo con una elución isocrática, mientras que para Se la misma se alcanzó con una gradiente relativamente sencillo. Además, un estudio de optimización multivariada permitió un incremento significativo de la sensibilidad de la técnica HG-AFS para cada especie de As y Se, por lo que puede ser considerado como un importante aliado para el desarrollo de metodologías analíticas destinadas al estudio de la especiación elemental.

Por último, es importante destacar que el trabajo realizado permitió arribar a metodologías analíticas suficientemente validadas y muy innovadoras con la aplicación de los ILs, que involucraron estudios de recuperación analítica sobre cada especie y en donde se realizaron consideraciones prácticas respecto a los efectos de las matrices, así como se dio solución a los inconvenientes presentados que afectaban las óptimas separaciones cromatográficas. De esta forma, se arribó a metodologías analíticas muy útiles y robustas, las cuales fueron realmente exitosas al permitir el análisis de especiación elemental en muestras con matrices muy complejas, tales como vino, cerveza, levadura y ajo selenizado. Estos beneficios son muy importantes y demuestran el alto potencial que poseen las metodologías analíticas desarrolladas, para convertirse en verdaderos aliados de laboratorios analíticos enfocados en el estudio de la especiación de As y Se en alimentos y bebidas consumidos ampliamente en todo el mundo, los cuales además son de particular interés para la provincia de Mendoza ya que son producidos en la región.