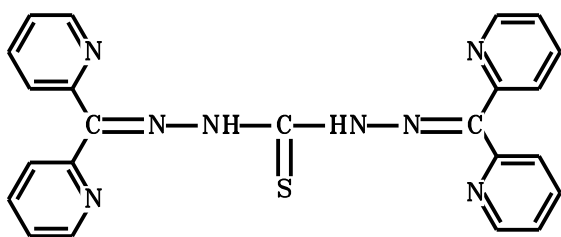


### DETERMINACIÓN DE TRAZAS Y ULTRATRAZAS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y MEDIOAMBIENTALES POR ESPECTROMETRÍA ATÓMICA CON PRECONCENTRACIÓN: VEINTICINCO AÑOS DE INVESTIGACIONES EN EL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

José Manuel Cano Pavón  
Profesor emérito de la Universidad de Málaga

Estas investigaciones se iniciaron a partir de 1991, cuando se dispuso paulatinamente de la instrumentación y de los recursos necesarios para llevarlas a cabo. La preconcentración como etapa previa en las determinaciones por espectrometría atómica se justifica por dos motivos: a) necesidad de aumentar la sensibilidad en numerosas ocasiones, b) eliminación de interferencias en matrices complejas. La preconcentración tiene en principio el inconveniente de que alarga los tiempos del análisis, pero esto puede solucionarse haciéndola en línea (on-line), y en esta dirección se orientaron las investigaciones del grupo. En este artículo se realiza un resumen no exhaustivo de las acciones más significativas desarrolladas a lo largo de los últimos veinticinco años. Independientemente de estos trabajos el grupo dedicó también su atención al desarrollo de métodos espectrofluorimétricos de análisis, al uso de ciclodextrinas para mejorar la sensibilidad en fluorescencia, al análisis de materiales complejos (especialmente de cerámicas biomórficas) y a la realización de estudios medioambientales, como la evaluación del contenido de trazas metálicas en el río Guadalhorce y en la bahía de Málaga, tanto en aguas como en sedimentos; en dicho estudio se emplearon los métodos desarrollados por el grupo previamente que aquí se citan.

En los primeros procedimientos desarrollados la preconcentración se llevaba a cabo de forma discontinua, usando la extracción en disolventes orgánicos por el sistema convencional. Como reactivo extractante se utilizó la 1,5 bis [1-(2-piridil) metilen] tiocarbhidracida, más conocida por las siglas DPTH:



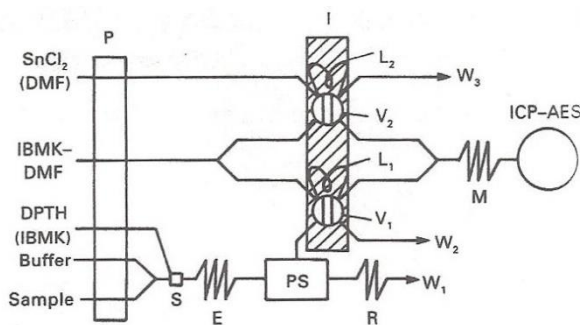
Este compuesto fue sintetizado por primera vez por A. García de Torres y J.M. Cano Pavón en 1980 en la Universidad de Sevilla, los cuales comprobaron sus excelentes cualidades como ligando de iones de elementos de transición, hasta el punto que puede ser utilizado como reactivo en espectrofotometría ultravioleta-visible. Pero sus mejores aplicaciones las presenta como reactivo extractante de iones metálicos y no metálicos, con una relación excelente entre el volumen de fase acuosa y del de fase orgánica, lo que abre interesantes posibilidades en la preconcentración. Además de la DPTH se han usado otras tiocarbhidrazonas relacionadas: la 1,5-bis[fenil-(2-piridil) metilén] tiocarbhidracida (BPTH) y 1,5-[bis(2-piridil)-3-sulfofenil metilén] tiocarbo-hidrácida (PSTH).

Las primeras determinaciones establecidas fueron las de níquel, realizando la extracción en discontinuo en metil isobutil cetona (MIBK) y en ocasiones en n-butanol, con límites de detección entre 0,2 y 2.0 ng/ml, y factores de preconcentración de hasta 30. Las determinaciones se hacían con ETA-AAS e ICP-OES, y los procedimientos puestos a punto se aplicaron a la determinación de este elemento en diversos tipos de muestras medioambientales (en aguas naturales y residuales principalmente) y en materiales biológicos (tejidos, suero, sangre orina). Las muestras de sangre, suero y orina apenas necesitaron tratamiento químico, tan solo acidificación y centrifugación. Para los tejidos biológicos se siguió el protocolo de mineralizarlos con HNO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una bomba Parr y horno casero de microondas. Resultados similares se encontraron cuando se empleaba la BPTH y la DPTH. Posteriormente se pusieron a punto procedimientos para la determinación de otros elementos como Cu(II), Co(II), Zn(II), etc.

La demanda de altas velocidades de muestreo y la necesidad de emplear volúmenes cada vez menores de muestra y reactivo nos llevó a ensayar procedimientos en línea, usando la DPTH (o BPTH) disuelta en MIBK, que confluye dentro de un dispositivo FIA con la disolución que contiene los iones metálicos; una vez

extraídos se separan ambos disolventes con un separador de fases, y en la fracción orgánica se determinan los cationes inorgánicos por absorción atómica de llama o bien por ICP-OES. Diversos iones de elementos de transición han podido ser determinados por este procedimiento, que es rápido y reproducible.

Para el caso del mercurio se diseñó una variante utilizando la generación de vapor de mercurio que se introduce en la antorcha del equipo de ICP-OES. Para ello, una vez extraído en MIBK el quelato Hg(II)-DPTH y separadas las fases orgánica y acuosa, se pone en contacto con SnCl<sub>2</sub> disuelto en dimetilformamida. El límite de detección es 2 ng/ml, y las interferencias son escasas. El dispositivo utilizado se expone en la Figura 1. El procedimiento se ha aplicado en la determinación de trazas de mercurio en una amplia variedad de muestras biológicas y mediambientales con muy buenos resultados

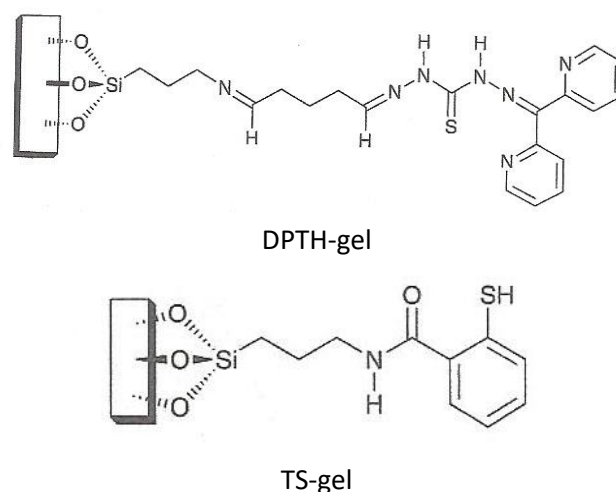


**Fig. 1** Schematic diagram of FI manifold for the determination of mercury: P, peristaltic pump; S, segmentor; E, extraction coil; PS, phase separator; R, restrictor (length 50 cm, i.d. 0.5 mm); I, injector; L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub>, injection loops; V<sub>1</sub> and V<sub>2</sub>, injection valves; M, mixing coil; W<sub>1</sub>, aqueous phase waste; W<sub>2</sub>, organic phase waste; and W<sub>3</sub>, reductant waste. See text for other details

El uso de la preconcentración en línea basada en la extracción líquido-líquido en otros trabajos que siguieron tenía una dificultad importante: la baja eficacia de los separadores de las fases orgánica y acuosa, que limitaban el método; normalmente era difícil conseguir relaciones de  $V_{org}/V_{agua}$  superiores a 5. Por ello se pensó en la posibilidad de cambiar el sistema de preconcentración y utilizar la microextracción en fase sólida, técnica que ha experimentado un importante auge en los últimos años. La miniaturización y simplificación en la preparación de la muestra para análisis, junto con la reducción del consumo de reactivo, disolventes y muestra, y la automatización, son los principales méritos que justifican la aceptación de estas técnicas de microextracción. En el primer trabajo realizado se utilizó el reactivo PSTH previamente retenido en una resina cambiadora aniónica Dowex. Esta resina se introducía en un sistema FIA y en ella se fijaba el Hg(II), que posteriormente era eluido en forma de vapor de

mercurio elemental con una disolución nítrica de SnCl<sub>2</sub> y determinado por ICP-OES, con un límite de detección de 4 ng/ml, y unas interferencias casi insignificantes.

Para conseguir procedimientos mejores y sistemas de retención más resistentes, el grupo abordó la síntesis de nuevas resinas quelatantes muy selectivas y estables mediante la unión química de distintos agentes coordinantes (tiocarbohidrazonas, tiosemicarbazonas, tiosalicilato, etc.) a una matriz de gel de sílice, vidrio de poro controlado o sílice mesoporosa. Las estructuras de dos de las resinas sintetizadas basadas en la funcionalización de sílica gel con DPTH y metiltiosalicilato, denominadas respectivamente DPTH-gel y TS-gel, son las siguientes:



Ambas resinas se utilizaron primero para la determinación de Hg(II), el cual es eluido como Hg(0) utilizando borohidruro sódico en medio básico. Los límites de detección hallados fueron de 1 y 5 ng/ml respectivamente y las interferencias fueron poco significativas. La elección del agente quelatante es muy importante ya que la selectividad en SPE depende de la estructura del compuesto orgánico inmovilizado, la naturaleza de los átomos donadores incorporados (O, N, P y S), la posición de los grupos funcionales a lo largo de la superficie del soporte sólido y de los requerimientos estéricos del complejo formado después de la retención del ión metálico seleccionado. Las bases de Schiff, con posiciones multidentadas de coordinación, como se comprobó en trabajos anteriores, forman fácilmente complejos con iones metálicos, mostrando afinidad y selectividad hacia estos dependiendo del pH. Nuestro grupo de investigación tiene una amplia y reconocida experiencia en el anclaje de superficies inorgánicas a

través de la formación de bases de Schiff y en la aplicación de estos materiales en procesos de microextracción. El grupo ha publicado más de 50 artículos en revistas de reconocido prestigio, la mayoría en *Talanta* y en *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. Con estos procedimientos se ha abordado con éxito la determinación y en algunos casos la especiación de trazas y ultratrazas de especies iónicas tóxicas como mercurio y metilmercurio, cromo(III) y cromo(VI), Sb(III) y Sb(V), Cd, Ni, Pb, Sn, elementos del grupo del platino, etc. En muestras biológicas y medioambientales (tejidos biológicos, aguas naturales incluyendo agua del mar, sedimentos, suelos, etc). Las técnicas utilizadas para la determinación de los analitos anteriormente citados fueron AAS, ICP-AOS, ICP-MS y ET-AAS.

Es conocida la naturaleza cerrada y discreta de la técnica ET-AAS, donde es necesario un paso de secado, mineralización y atomización antes de la introducción de una nueva muestra, y donde el volumen permitido a la misma está limitado a unas decenas de microlitros, por lo que nos resultó más difícil la automatización de operaciones previas de preconcentración y separación de la matriz en línea con el horno de grafito que con otras técnicas. En un primer intento por automatizar estas operaciones se diseñó un dispositivo original que consistía en colocar una pequeña microcolumna de tipo capilar, rellena con resina quelatante previamente sintetizada por nosotros, en el brazo móvil del automuestreador sustituyendo la punta de inyección del mismo (como se observa en la Figura 2). El procedimiento, al principio semiautomático, se logró automatizar completamente mediante la colocación de dos interruptores en la bandeja del automuestreador que eran accionados por el propio brazo automuestreador cada vez que bajaba, accionando una válvula de selección y una bomba peristáltica externa. De esta forma, la disolución conteniendo el ion a analizar (inicialmente Ni(II)) y otras especies se hacía pasar por la microcolumna, que retenía selectivamente al ion metálico; después una válvula modificaba la circulación de líquidos por el dispositivo y hacía pasar a través de la columna la disolución eluyente (habitualmente ácido nítrico diluido) y a continuación el ion era introducido en el interior del horno de grafito (J.Anal.At.Spectrom, 1999, 14, 1033-1037). Este dispositivo se ha usado para una amplia variedad de elementos metálicos: cadmio, platino, paladio, rodio, iridio, antimonio, plomo, etc, desarrollándose en ocasiones esquemas de especiación.

Estos procedimientos de preconcentración se han usado también con la técnica ICP-masas, no con el objetivo de aumentar la sensibilidad, algo que es prácticamente innecesario en esta técnica, sino para disminuir el efecto matriz que sí es importante, especialmente cuando se trata de muestras medioambientales y se desea hacer un análisis de varios elementos .

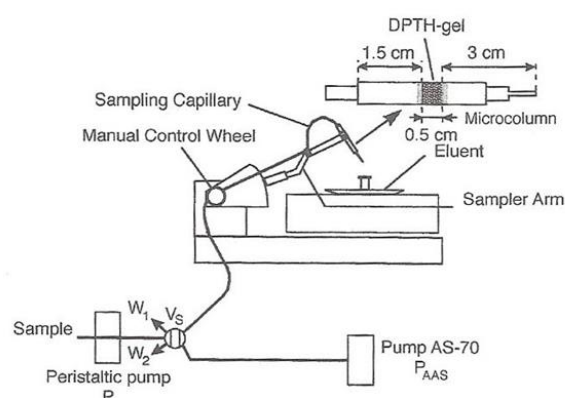


Fig. 2 Schematic diagram of FI-ETAAS system: P, peristaltic pump; P<sub>AAS</sub>, AS-70 autosampler pumps; V<sub>s</sub>, switching valve.

La última innovación utilizada es el empleo de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con tiocarbohidrazonas u otros quelatantes como sistemas de microextracción en fase sólida. Las nanopartículas magnéticas (MNPs) presentan como ventaja frente a los adsorbentes tradicionales el poseer un área superficial activa mucho mayor, lo que aumenta la capacidad de extracción y ofrece por tanto una dinámica rápida con altas eficiencias de extracción; además, los metales fijados en las nanopartículas se pueden recoger fácilmente mediante el uso de un campo magnético externo, evitando la centrifugación o filtración de las muestras. Las aplicaciones de las MNPs como nuevos adsorbentes están relacionadas mayoritariamente a su aplicación en la eliminación de altas concentraciones de contaminantes orgánicos e inorgánicos de muestras acuosas, sin la posterior elución de estos contaminantes desde la superficie de la MNPs. Entre las MNPs existentes las de óxidos de hierro han sido las que han recibido una mayor atención, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, estabilidad fisiológica y química, baja toxicidad y fuerte respuesta magnética.

Se ha realizado con éxito la síntesis de las MNPs y su encapsulamiento con sílice mesoporosa, según los procedimientos descritos en la bibliografía. A continuación estas MNPs se funcionalizaron con dos ligandos del tipo base de Schiff: DPTH y PSTH según los procedimientos empleados por el grupo para la

obtención de otros materiales similares. Con los dos nuevos adsorbentes DPTH-MNPs y PSTH-MNPs se realizaron estudios sobre la capacidad de carga o retención de estos materiales hacia diversas especies iónicas. Se observó que el material PSTH-MNPs retiene a mayor número de iones metálicos mientras que el adsorbente DPTH-MNPs muestra afinidad hacia los elementos As, Sb, Hg y metales nobles como Pt, Ag y Au. A la vista de estos resultados, se han puesto a punto métodos automatizados para la determinación de estos metales; así, con DPTH-MNPs se optimizaron métodos muy sensibles y selectivos para la determinación de Hg; para la determinación y especiación de As(III) y As(V) y para la determinación simultánea de metales nobles. Así mismo, utilizando PSTH-MNPs y su acoplamiento on-line a un ICP-AOS se optimizó un método para la determinación simultánea tanto de elementos formadores de hidruros (As, Bi, Sb, Se, Sn, Cd, Pt, Pd, Hg) como de otros que no lo forman empleando una cámara de nebulización ciclónica con un sistema de introducción de muestra multimodo (MSIS) diseñada para ICP.

Se ha observado que los rendimientos de la síntesis y encapsulamiento de las MNPs utilizando los métodos descritos en la bibliografía son bajos. Por ello, se ha optimizado (mediante estrategias de diseño de experimentos) la síntesis de dichas partículas para obtener por un lado, un aumento en el porcentaje de magnetita y al mismo tiempo un tamaño de partícula lo más pequeño posible, ya que como es sabido las excelentes propiedades de las MNPs están fuertemente influenciadas por el tamaño de partícula. Así en el caso de las aplicaciones en el campo de la medicina, el tamaño de partícula afecta a su farmacocinética y a los patrones de biodistribución, para aplicaciones de hipertermia (nueva estrategia atractiva para el tratamiento contra el cáncer basada en la generación de calor en el mismo tumor por las MNPs al someterlas a un campo magnético) las propiedades caloríficas en el campo magnético dependen fuertemente del tamaño de partícula; tamaños de entre 20 y 30 nm parecen ser los más adecuados.

Otro factor importante que influye en la calidad de las MNPs es la cantidad de Fe presente, para ser apropiadamente atraídas por un campo magnético. La cantidad de Fe de las mismas se determina normalmente, por AAS o ICP-AOS. Ambas técnicas son incapaces de distinguir entre hierro iónico y nanopartículas y fallan en la detección de nanopartículas a dosis bajas. Se han descrito dos técnicas que permiten la distinción entre NPs y

especies iónicas ICP-MS operando en modo "single particle" y ET-AAS donde se observa un incremento en la temperatura de atomización cuando el tamaño de la NPs de plata aumenta. . Ambas técnicas requieren la transformación de la muestra a estado líquido y además para distinguir entre formas solubles y particuladas es necesario desarrollar un método apropiado de separación y/o técnicas de evaluación de datos.

Nuestro grupo de investigación posee un instrumento de espectrometría de absorción atómica de horno de grafito, fuente continua y alta resolución (HR C ET-AAS) que ha demostrado potencial para el análisis directo de sub-mg de muestras mediante calibración directa con patrones líquidos; la alta resolución y su fuente continua (R CS), entre otras ventajas, ofrece capacidades mejoradas para la detección y corrección de interferencias espectrales, pudiéndose además expandir el rango lineal de la técnica, aspecto significativo cuando se realiza análisis directo de sólidos debido a que no es posible diluir la muestra si el contenido de analito excede el límite superior del rango lineal de calibración. Basándonos en estos hechos, se ha puesto a punto un nuevo método para la determinación directa de la concentración de hierro y el tamaño de partícula de MNPs sólidas mediante HR CS ET-AAS. Se desarrolló una nueva estrategia mediante la evaluación del área y de la pendiente en el primer punto de inflexión de la señal de absorbancia obtenida para una línea de Fe con baja sensibilidad. Con estos datos área y pendiente es posible determinar tanto la concentración de Fe como el tamaño medio de partícula. Este método, una vez puesto a punto, es el que se ha utilizado para la optimización de la síntesis de MNPs; con el método optimizado se han conseguido obtener MNPs con un 67% de Fe y un tamaño de partícula de  $13 \pm 2$  nm. Este método podría utilizarse en la optimización de otros procedimientos de síntesis.

Por último comentar que actualmente se está optimizando la síntesis de nuevos nanomateriales extractantes basados en MNPs y óxido de grafeno reducido. La funcionalización de estos materiales logrará MSPSE más selectiva hacia materiales tóxicos como Hg, As, Se, etc. Hasta la fecha hay poca investigación en este terreno.