



Universidad Nacional
de la Pampa



FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

Tesis

para optar el grado académico de
LICENCIADO EN QUÍMICA

**“OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES PARA LA DETERMINACIÓN DE
ARSÉNICO POR GENERACIÓN DE HIDRUROS MEDIANTE
ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA POR PLASMA MICROONDAS
(MPAES)”**

AUTOR: AZCARATE, ROSANA VALERIA

DIRECTOR: CAMIÑA, JOSÉ MANUEL

SANTA ROSA (LA PAMPA)

ARGENTINA

2017

PREFACIO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, bajo la dirección del Dr. **CAMIÑA JOSÉ MANUEL**.

Azcarate, Rosana Valeria

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia, deseo expresar mi gratitud a la Universidad Nacional de La Pampa, institución que me brindó la posibilidad de formarme para obtener el título de Licenciado en Química.

Al Dr. José Manuel Camiña, mi Director, quien me brindó su ayuda para la realización y escritura de esta tesis y me abrió las puertas de su grupo de trabajo.

A la Dra. Marianela Savio y a la Lic. Florencia Cora Jofre, quienes colaboraron de forma desinteresada en esta tesis, compartiendo su tiempo, sus conocimientos y calidez humana.

A la Dra. Silvana Azcarate, mi hermana, por acompañarme en este largo camino y nunca dejar que baje los brazos, por estar siempre que la necesité y ser mi gran referente.

A José, mi compañero de la vida, por su amor y su apoyo incondicional en todos estos años juntos y por darme lo más hermoso de este mundo, mi niño Lorenzo.

A toda mi familia, especialmente a mis papás, hermana menor y sobrinos, quienes siempre estuvieron a mi lado para ayudarme a lograr mi objetivo.

RESUMEN

En el presente trabajo se utilizaron técnicas de diseño experimental para optimizar la determinación de arsénico en agua mediante espectrometría de emisión atómica por plasma generado por microondas mediante generación de hidruros (HG-MPAES). Se empleó una optimización multivariada para encontrar las condiciones experimentales con el propósito de obtener las mejores señales de la respuesta. Se estudiaron los efectos de varios factores: las concentraciones de NaBH_4 (RC), HCl (AC) y *L*-cisteína (CC), caudales de muestra (SFR) y NaBH_4 (RFR) junto con el tiempo de lectura (TL) para evaluar su influencia sobre la intensidad de la señal de As (193.695 nm).

Los procedimientos de optimización se llevaron a cabo mediante los factores más importantes e investigando la relación entre respuestas y factores mediante los denominados métodos de superficie de respuesta (MSR). Para este fin se utilizó un diseño central compuesto. A partir de la siguiente combinación de factores: 43 rpm para SFR; 2.40% para AC; 0.03% para CC y 1.70% para RC se logró una predicción del modelo que superó en más de 15.0% al valor máximo obtenido experimentalmente.

La metodología desarrollada se aplicó con éxito a la determinación de As en muestras de aguas provenientes de distintas fuentes.

SUMMARY

In this work, experimental desing techniques were used to optimize arsenic hydride generation by atomic emission spectrometry (HG-MPAES). A multivariate optimization was used to assess the experimental conditions that generate the best results signal. The effects of several factors: NaBH₄ (RC), HCl (AC), and *L*-cysteine (CC) concentrations; sample (SFR) and NaBH₄ (RFR) flows rates; and reading time, were studied to evaluate its influence on the signal intensity of As (193.695 nm).

In order to find the most important factors and the relationship between responses and factors by the so-called surface response methods (RSM) optimization procedures were carried out. A central composite design was used for this purpose. From the following combination of factors: SFR: 43 rpm; AC: 2.40%; CC: 0.03% and CR: 1.70%, a prediction model was obtained, exceeding by more than 15.0% the maximum value obtained experimentally.

The methodology developed was successfully applied to the determination of As in water samples from different sources.

ÍNDICE

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL ARSÉNICO.....	1
1.2. TÉCNICA PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO.....	3
1.2.1. Espectrometría de Emisión atómica.....	3
1.2.2. Generación de hidruros.....	5
1.2.3. Pre-reducción.....	6
1.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	7
1.3.1. Fundamento y etapas.....	7
1.3.2. Diseños factoriales.....	10
1.3.3. Optimización.....	12

CAPITULO II

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

2.1. HIPÓTESIS DEL TRABAJO.....	15
2.2. OBJETIVO DEL TRABAJO.....	15

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS.....	16
3.1.1. Recta de calibración.....	16
3.1.2. Muestras.....	16
3.2. REACCIÓN CON <i>L</i> -CISTEÍNA.....	16
3.3. GENERACIÓN DE HIDRUROS.....	17
3.4. SELECCIÓN DE FACTORES Y OPTIMIZACIÓN.....	17
3.5. INSTRUMENTAL.....	18

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DISEÑO FACTORIAL.....	19
4.1.1. Efecto de los factores.....	19
4.1.2. Selección de factores.....	23
4.2. OPTIMIZACIÓN.....	25
4.2.1. Creación del diseño.....	25
4.2.2. Evaluación del modelo.....	28

4.2.3. Optimización de la respuesta.....	30
4.3. APLICACIÓN ANALÍTICA.....	32
CAPITULO V	
5. CONCLUSIONES	
5.1. CONCLUSIONES.....	35
REFERENCIAS.....	36



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. El arsénico

El arsénico ocupa el puesto número 20 en abundancia en la corteza terrestre. Es un elemento omnipresente que puede contaminar el suelo, el agua, las plantas y el medio ambiente y, en última instancia, afecta la salud y el bienestar humano (Bundschuh *et al.*, 2012). Es un elemento metaloide anfótero que es clásicamente considerado como un metal blando y comparte muchos de sus efectos de toxicidad con otros metales pesados como el plomo y el mercurio (Wang *et al.*, 2004). Es uno de los elementos más tóxicos que se presenta tanto en formas inorgánicas como orgánicas (Altunay *et al.*, 2015). Aunque puede existir en cuatro estados de oxidación (-3, 0, +3 y +5), el arsenito [As (III)] y el arseniato [As (V)] son las formas de arsénico más comúnmente existentes en ambientes acuosos (Kim *et al.*, 2009).

La toxicidad, bioacumulación y transporte del arsénico dependen a menudo de sus especies en el sistema investigado. En los sistemas biológicos, las especies inorgánicas trivalentes (arsenito) son más tóxicas que las especies pentavalentes (arseniato) porque puede unirse a los grupos tio. La afinidad del arsénico por el azufre se revela en varios minerales de sulfuro que contienen arsénico natural. Esta afinidad también explica la toxicidad de los compuestos de arsenito a través de sus interacciones con los tioles proteicos en el cuerpo humano, los grupos que contienen azufre pueden reaccionar con As (III) para formar productos que causarán un mal funcionamiento biológico del cuerpo (Wang *et al.*, 2004).

Las fuentes de As en el ambiente son principalmente geogénicas, es decir, naturales (Bhattacharya *et al.*, 2006). Son predominantemente sedimentos derivados de rocas volcánicas eruptivas, cuerpos de minerales sulfurosos y cenizas volcánicas (Kim *et al.*, 2009). También se observa que el arsénico se asocia con óxidos metálicos como fases adsorbidas, especialmente en óxidos de hierro, partículas de arcilla, minerales de sulfuro y materiales orgánicos. La liberación de As en la hidrósfera, la pedósfera, la biósfera y la atmósfera se relaciona con la roca natural o con procesos minerales de intemperie (Bundschuh *et al.*, 2012). Las actividades antropogénicas como la minería, combustión de residuos sólidos, combustibles fósiles, fundición de metal y el uso directo de herbicidas en la agricultura que contienen arsénico, también son vías de contaminación (Liu *et al.*, 2008).

Los humanos pueden estar expuestos al arsénico por ingestión directa e indirecta, es decir, beber agua con arsénico y consumir cultivos procedentes de suelos contaminados, respectivamente (Xu *et al.*, 2008). Este metal ha recibido atención creciente en los últimos

años debido a sus propiedades carcinógenas y otras tóxicas, tales como enfermedades de la piel y daños en órganos internos: alteraciones pulmonares, cardiovasculares, gastrointestinal, hematológico, renal, neurológico, reproductivo e inmunológico, resultando ser genotóxico y mutagénico (Altunay *et al.*, 2015). El As reacciona muy rápidamente con los grupos sulfhidrilo de una gran variedad de enzimas y proteínas. Por esta alta afinidad el As que no se puede excretar del cuerpo humano se acumula en los tejidos con alto contenido de queratina, como la piel, el cabello y las uñas (Kim *et al.*, 2009). Actualmente esta patología con manifestaciones cardiovasculares y cutáneas es conocida como el Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico “HACRE”, principalmente debido a su fuente: la presencia de As en el agua.

La contaminación de las aguas subterráneas con arsénico es un problema ambiental mundial. Los recursos de agua dulce utilizados para el consumo humano o ganadero están naturalmente contaminados por arsénico por encima de los estándares permisibles en muchas partes del mundo (Bundschuh *et al.*, 2012). El valor provisional de la guía de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, que ha sido adaptado por un número creciente de países (Kim *et al.*, 2009).

La exposición al As ha sido probablemente un problema de larga data en América Latina: cuerpos momificados en Chile muestran signos de exposición hace 7000 años atrás (Arriaza *et al.*, 2010). En muchos países latinoamericanos, el suelo y las aguas subterráneas están altamente enriquecidos con As debido a la alta densidad en la región de volcanes, rocas y cenizas (McClintock *et al.*, 2012). Las características comunes de la geografía y la contaminación permiten que América Latina se clasifique en tres regiones distintas: la llanura Chaco-Pampeana, la Cordillera Andina y Centroamérica. Si bien cada una de estas áreas tiene sus propias características definitorias, comparten la carga común de haber sido afectadas por el transporte de As inorgánico en el agua potable. Se han encontrado altas concentraciones de As en todas las fuentes de agua potable en América Latina, incluyendo lagos y ríos (Castro de Esparza, 2009).

En Argentina, Chile, Bolivia, Perú y México, por lo menos 14 millones de personas dependen de agua potable y agua de riego con concentraciones tóxicas. En Argentina, se encontró la presencia de As en las aguas subterráneas de la llanura Chaco-Pampeana y otras regiones del país, y al menos 4 millones de personas (cerca del 10 % de la población del país) pueden estar expuestas a agua potable con concentraciones de As por encima de la guía de la OMS (Bundschuh *et al.*, 2012). En nuestro país, el CAA (Código Alimentario Argentino) fue modificado en sus artículos 982 y 983 por las resoluciones N° 68/2007 y N°

196/2007, entre la SPRyRS (Secretaría de Políticas, Regulación y Relaciones Sanitarias) y la SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos de la Nación), actualizando los valores tolerables de arsénico a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en el agua potable, dando un plazo de 5 años (que expiró en junio de 2012) para adaptarse al nuevo parámetro. En diciembre de 2011, la Comisión Nacional de Alimentos (CONAL), decidió en el Acta 93 “...que se prorrogue el plazo de cinco años previstos en los Artículos 982 y 983 del Código Alimentario Argentino para alcanzar el valor de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ en los términos previstos en dichos artículos, hasta contar con los resultados del estudio hidroarseniscismo y saneamiento básico en la República Argentina”. Esto está relacionado con que las provincias más afectadas son: Salta, La Pampa, Córdoba, San Luis, Santa Fe, Buenos Aires, Santiago del Estero, Chaco, Tucumán, donde la cifra de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ en el agua potable es superada ampliamente (Bundschuh *et al.*, 2012).

La presencia del As en los alimentos y bebidas es de interés en la química analítica. La cuantificación de As en muestras de agua es la mejor manera de evaluar la exposición a este contaminante (Altunay *et al.*, 2015). Existe una amplia gama de metodologías analíticas, como la espectrometría de absorción atómica (AA), la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICPOES/MPAES), la espectrometría de masas inorgánicas con plasma acoplado inductivamente (ICPMS), y la fluorescencia atómica (AFS) en menor medida.

1.2. Técnica para la determinación de Arsénico

1.2.1. Espectrometría de emisión atómica

Los métodos espectroscópicos atómicos se basan en la interacción entre la radiación electromagnética y la materia. Describen una serie de técnicas analíticas utilizadas para determinar la composición elemental de una muestra examinando su espectro electromagnético, o su espectro de masas. La espectrometría atómica se refiere entonces a la medición de la intensidad de la radiación para traducirlo en concentración, a través de un transductor fotoeléctrico u otro tipo de dispositivo electrónico (Butcher *et al.*, 1998).

La espectrometría de emisión atómica es un método instrumental de análisis químico, que se fundamenta en el estudio de la radiación emitida por átomos en todas las regiones del espectro. Cuando los átomos de un elemento específico absorben energía térmica, sus electrones son excitados, y en dicho estado permanecen un tiempo muy corto,

luego el electron vuelve a su estado fundamental emitiendo el sobrante de energía en forma de radiación en un patrón característico de longitudes de onda, un espectro de emisión (Skoog *et al.*, 2008).

Cada elemento tiene una diferente configuración electrónica y, consecuentemente su espectro de emisión es único. Bajo condiciones controladas, la intensidad de una línea particular es proporcional al número de átomos que están siendo excitados, por lo tanto, la espectroscopía de emisión es útil tanto para identificar los diferentes elementos presentes en una muestra (análisis cualitativo), como también para calcular su concentración (análisis cuantitativo).

La espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MPAES) tiene alta sensibilidad con límites de detección a niveles inferiores a mg L^{-1} . Mediante MPAES es posible determinar de forma cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica a niveles trazas partiendo de muestras en disolución acuosa.

En el proceso de emisión en el MPAES, la muestra es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador donde por efecto Venturi es convertida en aerosol por la acción del gas nitrógeno (Harris, 2003). El aerosol se introduce entonces en el centro del plasma caliente, donde se seca, se descompone y luego se atomiza.

El plasma es generado al someter un flujo de gas nitrógeno y pequeñas cantidades de argón, introducidos tangencialmente a través de la antorcha, a una zona donde se aplica radiación microondas y se genera un campo magnético oscilante. Una chispa produce algunos electrones libres en el argón, que son acelerados en el campo magnético, causando una mayor ionización y formación del plasma, haciendo que el plasma se autosostenga sólo con nitrógeno una vez generado. La muestra es convertida en átomos al estado gaseoso que son excitados por consecuencia de las temperaturas que alcanza el plasma. Los electrones de cada átomo de la muestra excitados por el plasma vuelven al estado fundamental, emitiendo radiaciones a una longitud de onda que es característica de cada elemento. Esta radiación pasa a través de un sistema óptico que separa la radiación según su longitud onda. A continuación un detector mide la intensidad de cada una de las radiaciones relacionando ésta con la concentración de cada elemento en la muestra. La información es procesada por el sistema informático (figura 1).

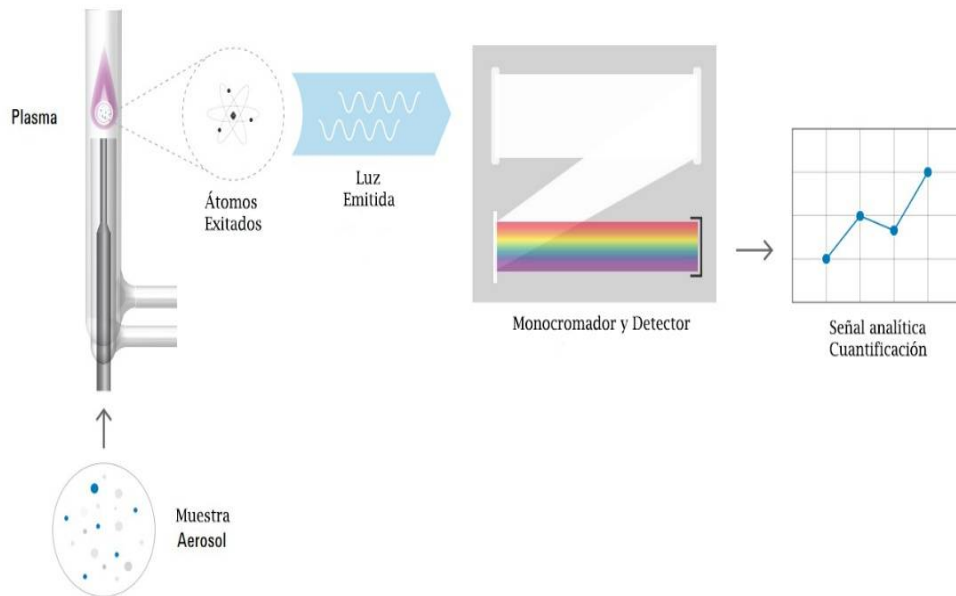


Figura 1. Diagrama del proceso de emisión y detección en un espectrómetro de emisión atómica con plasma inducido por microondas.

Existen varias características analíticas valiosas que hacen que MPAES sea la técnica de emisión atómica de mayor interés. El plasma de microondas alimentado con nitrógeno alcanza temperaturas cercanas a 5000 K. A estas temperaturas, la emisión atómica es fuerte, produciendo bajos límites de detección y extendido rango lineal para la mayoría de los elementos, además de precisión, sensibilidad, funcionamiento rápido y capacidad de determinación de multielemental. Debido a que el MPAES posee un generador de nitrógeno, se produce utilizando aire atmosférico, de esta forma se reduce enormemente el costo, eliminando la necesidad del suministro continuo de gases costosos (Agilent, 2016).

1.2.2. Generación de hidruros

Los metaloides tales como arsénico, antimonio, bismuto, selenio, estaño, etc., están presentes en concentraciones muy bajas en las muestras a analizar y son difíciles detectar o determinar por las técnicas convencionales de introducción directa de muestras (Hwang *et al.*, 1990). La sensibilidad puede mejorarse en uno o dos órdenes de magnitud aplicando sistemas de introducción de muestras de generación de hidruros (HG). Esta mejora se debe a la alta eficiencia del transporte de analitos bajo la forma de hidruro gaseoso para el atomizador (da Luz Lopes *et al.*, 2009).

La HG consiste en la transformación de elementos no volátiles a hidruros volátiles. Esta técnica presenta varias ventajas:

- aumento de la sensibilidad, se logra una eficiencia prácticamente del 100% en la introducción del analito en el atomizador,
- eliminación casi total de interferencias espectrales, puesto que solo llegan al atomizador los elementos formadores de hidruros,
- no existe limitaciones en cuanto al contenido salino.

La generación de los hidruros se produce por la reacción del elemento en cuestión con hidrógeno nascente. La reacción entre el Zn metálico y el ácido clorhídrico fue una de las más populares fuentes generadoras de hidrógeno. Sin embargo, actualmente la derivatización que se está utilizando es la generación de hidrógeno a partir del tetrahidroborato de sodio o borohidruro de sodio (NaBH_4) en medio ácido (Long *et al.*, 2012).

La muestra disuelta en ácido se mezcla con el agente reductor (NaBH_4), esta reacción produce hidrógeno que al entrar en contacto con el analito lo reduce formando la arsina. Después de la generación, la arsina gaseosa es transportada al plasma produciéndose la descomposición térmica.

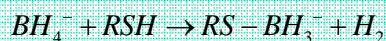


El sistema de reducción que utiliza borohidruro-ácido es superior al sistema que utiliza metal-ácido en relación a varios aspectos: mayor rendimiento de la reacción de reducción, menor tiempo de reacción, menor contaminación de los blancos y amplia aplicabilidad a los respectivos elementos formadores de hidruro. El ácido generalmente utilizado es el clorhídrico, aunque también pueden emplearse sulfúrico o nítrico.

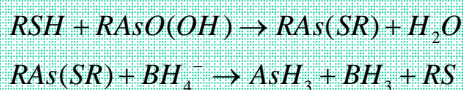
1.2.3. Pre-reducción

Un aspecto importante a tener en cuenta es el estado de oxidación del elemento considerado para formar el hidruro correspondiente. En general en el proceso de generación de hidruros, la máxima sensibilidad se obtiene cuando el elemento analito está en un estado de oxidación particular. Por eso la muestra, los estándares y el blanco deben ser tratados previamente de tal manera de llevar todo el analito al estado de oxidación apropiado, por ejemplo el As (V) a As (III). En caso de encontrarse en un estado de oxidación superior, es imprescindible llevar a cabo un proceso de reducción previa.

La pre-reducción se puede desarrollar utilizando diferentes reactivos, el yoduro de potasio (IK) en medio ácido clorhídrico es una de las alternativas. También la *L*-cisteína ácida es uno de los aditivos más comúnmente usados debido a su baja toxicidad y a las bajas concentraciones de ácido requeridas para el proceso de HG. Por lo general se utiliza para la pre-reducción de algunos elementos con un alto estado de oxidación, tales como As (V), Se (VI) y Sb (V), antes de que puedan reaccionar con NaBH₄ para HG. (Long *et al.*, 2012). Además su adición aumenta la señal del analito en gran medida. Tal mejora de señal puede deberse a que la *L*-cisteína puede acelerar la reducción del NaBH₄, aumentando así la sensibilidad. También se encontró que la *L*-cisteína reduce la interferencia de los metales de transición y actúa como un sistema ácido-base mejorando la estabilidad de los hidruros. Se demostró que existe un compuesto formado entre el NaBH₄ y el grupo SH de la *L*-cisteína, y que resulta ser un agente reductor más potente que el NaBH₄ solo (Ramesh Kumar *et al.*, 2005).



Por otra parte, la formación del complejo analito-cisteína también fue considerado, en donde el grupo -OH del oxiácido protonado del elemento formador de hidruros es sustituido por el grupo (-SR), que posteriormente reacciona con el NaBH₄ y genera los hidruros (Pitzalis *et al.*, 2007).



1.3. Diseño Experimental

1.3.1. Fundamento y etapas

La eficiencia de la generación de hidruros en MPAES depende de varios factores, como el caudal, concentración de los reactivos, presión del gas nebulizador, caudal de muestra, etc. Para obtener la máxima eficiencia mediante la técnica de generación de hidruros y garantizar mejores respuestas, es necesario optimizar todos estos factores antes de la determinación de los elementos de interés. Este proceso puede exigir tiempo, reactivos y mucho trabajo si se utiliza el método de optimización univariado. Otro inconveniente de la optimización por éste método es no considerar las interacciones entre

los diferentes factores que pueden afectar a los resultados. En las últimas décadas, la aplicación de técnicas multivariadas para la optimización de métodos en química analítica ha aumentado sustancialmente, debido a sus ventajas económicas y de eficiencia (da Luz Lopes *et al.*, 2009). Pero hoy en día el diseño experimental (DE) no es tan conocido y aplicado, y aún se siguen encontrando documentos en los que se realiza la "optimización" de un procedimiento con una variable a la vez (Leardi, 2009).

La experimentación juega un papel fundamental en todos los campos de la investigación y el desarrollo. El objetivo de la experimentación es obtener información de calidad. Obviamente, la experimentación se debe planificar (diseñar) cuidadosamente para que proporcione la información deseada. Dicha planificación debe considerar dos aspectos importantes relacionados con toda experimentación:

1. los costos de la experimentación,
2. la incertidumbre en el resultado esperado.

Por ello, la estadística, disciplina que proporciona las herramientas para trabajar en sistemas con incertidumbre, juega un papel fundamental en el DE y en la evaluación de los resultados experimentales. El análisis de los resultados experimentales permitirá obtener conclusiones sobre el sistema en estudio y decidir actuaciones futuras.

El DE consiste entonces en realizar un conjunto de pruebas con el objetivo de generar datos que al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias que permitan responder a los interrogantes planteados por el experimentador. Con el DE es posible obtener información útil, recursos mínimos, en menor tiempo y esfuerzo.

Las situaciones en las que se puede aplicar el DE son muy numerosas. De forma general, se aplica a sistemas como el mostrado en la figura 2, en los cuales se observan una o más variables experimentales dependientes o respuestas (y) cuyo valor depende de los valores de una o más variables independientes (x) controlables llamadas factores.

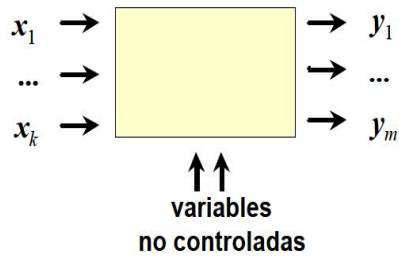


Figura 2. Representación de un sistema en estudio en un diseño de experimentos: factores (x), respuestas (y).

A diferencia del método univariado, el DE proporciona el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente, y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir, con la máxima eficiencia. El DE conduce a una planificación con menos experimentos para obtener un conocimiento equivalente (Ferré & Rius, 2002)

Para realizar un diseño experimental, se deben considerar cinco etapas.

1. *Definir el objetivo de los experimentos.* Cuanto más claramente se plantea el problema y se identifica el propósito o información que se desea conseguir con los experimentos, mayor puede ser la ayuda del DE. A continuación se debe definir (seleccionar) qué respuesta experimental (o características de interés o de calidad de un producto) se va a observar.

2. *Detectar todos los factores que pueden tener un efecto sobre la respuesta.* Es muy importante identificar y listar todos los factores (las variables independientes) que se cree que pueden tener influencia en el proceso y en la respuesta, aun suponiendo que puedan tener poca importancia. Para cada factor se debe definir el intervalo de valores que puede tomar. Hay que notar que la elección de los factores y de su dominio experimental no suele ser fácil. Es el experimentador quien decide donde es interesante estudiar dichos factores. Esta decisión requiere un conocimiento previo del sistema, obtenido de referencias bibliográficas, experiencia previa en el laboratorio, etc.

3. *Planificar los experimentos.* Una vez que se han seleccionado los factores y se han definido sus rangos se elige el modelo a aplicar según los objetivos planteados.

4. *Realizar los experimentos.* Mientras que en la forma clásica de pensar esta es la parte más importante del proceso, en la filosofía del DE es algo que no se puede evitar, para obtener los resultados que serán utilizados para construir el modelo. Se realiza la experimentación en orden aleatorio respecto al orden en el cual están listados.

5. *Analizar los datos obtenidos por los experimentos.* Una vez que se dispone de los resultados experimentales, se pueden calcular los efectos de los factores, así como sus interacciones. Este paso transforma los datos en información y es la conclusión lógica de todo el proceso (Leardi, 2009).

1.3.2. Diseños factoriales

Si al planificar un DE las variables a evaluar son demasiadas y/o los tiempos de análisis para realizar los experimentos son muy largos, es necesario seleccionar aquellos factores que presenten influencia significativa en la respuesta. Ya que investigar todos los factores demandaría muchos experimentos, tiempo y sería muy costoso.

Los diseños factoriales se utilizan para estudiar el efecto conjunto de un número limitado de factores sobre la respuesta. Se le llama niveles de un factor a los diferentes valores que el factor puede tener y su notación puede expresarse de diferentes formas como se ilustra en la figura 3.

Experimento	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	bajo	bajo	A1	B1	A ⁻	B ⁻	-	-	0	0	-1	-1
2	alto	bajo	A2	B1	A ⁺	B ⁻	+	-	1	0	+1	-1
3	bajo	alto	A1	B2	A ⁻	B ⁺	-	+	0	1	-1	+1
4	alto	alto	A2	B2	A ⁺	B ⁺	+	+	1	1	+1	+1

Figura 3. Diferentes notaciones de los niveles de un factor.

Una vez que se han seleccionado los factores más importantes, el siguiente paso suele ser estudiar cuantitativamente su efecto sobre la respuesta y sus interacciones. Para este propósito se pueden utilizar los diseños factoriales completos a dos niveles 2^k y los factoriales fraccionados 2^{k-p} , entre otros. Éstos últimos contemplan un número menor de experimentos que los factoriales completos a costa de no obtener ciertas informaciones que *a priori* se consideran irrelevantes (Gutiérrez Pulido & De La Vara Salazar, 2015).

- *Diseño factorial completo*

En este diseño se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores. La cantidad de puntos experimentales a realizar va a ser igual a 2^k , donde k es el número de factores. De esta manera se puede estimar el efecto de todos los factores principales y todas sus interacciones.

Para construir un diseño factorial completo 2^k , la plantilla experimental se construye alternando los signos + y - en la primera columna, dos menos y dos más en la segunda, cuatro menos y cuatro más en la tercera, etc., como se observa en la figura 4.

	Experimento	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D	Factor E
2^2	1	-1	-1	-1	-1	-1
	2	+1	-1	-1	-1	-1
2^3	3	-1	+1	-1	-1	-1
	4	+1	+1	-1	-1	-1
	5	-1	-1	+1	-1	-1
	6	+1	-1	+1	-1	-1
	7	-1	+1	+1	-1	-1
	8	+1	+1	+1	-1	-1
2^4	9	-1	-1	-1	+1	-1
	10	+1	-1	-1	+1	-1
	11	-1	+1	-1	+1	-1
	12	+1	+1	-1	+1	-1

Figura 4. Plantilla experimental para un diseño factorial completo.

- *Diseño factorial fraccionado*

Cuando la cantidad de factores posible es alta, se deben realizar muchos experimentos utilizando un diseño factorial completo, lo cual puede generar en ciertos análisis una situación no deseable. Para salvar este inconveniente se puede aplicar un diseño factorial fraccionado donde se investigan algunas de todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores. La cantidad de experimentos a realizar está dado por 2^{k-p} donde p indica cuantas veces se fracciona o reduce el diseño completo a la mitad.

Esta acción se basa en que al incluir una elevada cantidad de factores en la fase inicial de un experimento, unos pocos son los responsables de la mayor variabilidad de la respuesta. Además, son más importantes los efectos principales, seguido por las interacciones dobles, triples, etc.

Para construir la plantilla experimental se escribe el diseño 2^{k-p} como si fuese el factorial completo para $k-p$ factores. A continuación, para construir las columnas de los demás factores se eligen p generadores iniciales que son las interacciones del más alto orden posible (Dejaegher *et al.*, 2011). Una vez que se realiza la planilla experimental, se llevan a cabo los experimentos de manera aleatoria. La aleatorización ayuda a cancelar el efecto de los factores extraños o desconocidos que pudieran estar presentes.

Obtenidos los resultados experimentales se pueden calcular los efectos de los factores, así como sus interacciones. Los test estadísticos (figura 5) permiten comprobar si los efectos calculados son significativos comparándolos con el error experimental

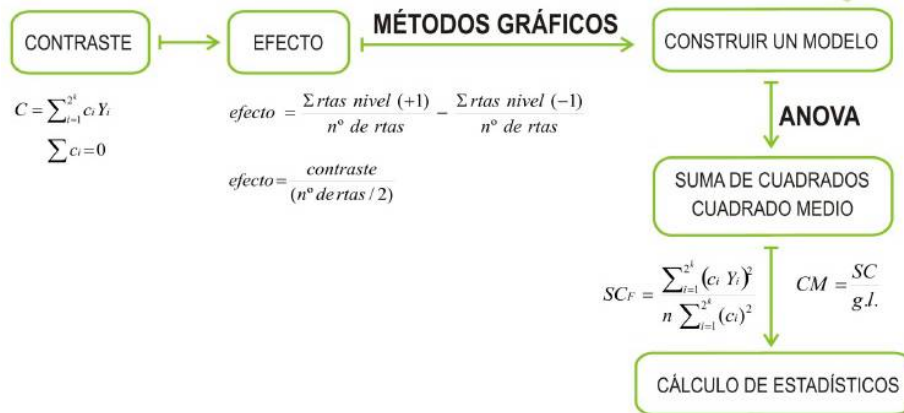


Figura 5. Pasos para realizar el análisis estadístico de los datos.

1.3.3. Optimización

El objetivo último de la investigación en DE suele ser conocer qué valores de los factores proporcionan respuestas (rendimiento, sabor, intensidad de señal, etc.) con la calidad deseada. Estos se pueden conocer calculando un modelo matemático denominado metodología superficie de respuesta (MSR) que relaciona los factores más relevantes con las respuestas. El propósito inicial de esta técnica es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta (Figuroa Preciado, 2003).

Cuando decimos que el valor real esperado, η , que toma la variable de interés considerada, está influenciado por los niveles de k factores cuantitativos, X_1, X_2, \dots, X_k , esto significa que existe alguna función de X_1, X_2, \dots, X_k que proporciona el correspondiente valor de η para alguna combinación dada de niveles:

$$\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$$

de tal forma que la variable respuesta puede expresarse como:

$$Y = \eta + \varepsilon = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon$$

donde ε es el error observado en la respuesta. El modelo contiene siempre un término de error que engloba a las fuentes de variabilidad que no se tuvieron en cuenta.

La relación existente entre η y los niveles de los k factores puede representarse a través de una hipersuperficie a la que llamaremos superficie de respuesta.

La forma de la función f que determina la relación entre los factores y la variable respuesta es, en general desconocida, por lo que el primer objetivo de la MSR consiste en establecer experimentalmente una aproximación apropiada de la función f . Para ello, se propone un modelo de ecuación, generalmente polinómico, en los k factores X_1, X_2, \dots, X_k . Los modelos matemáticos de la MSR deben:

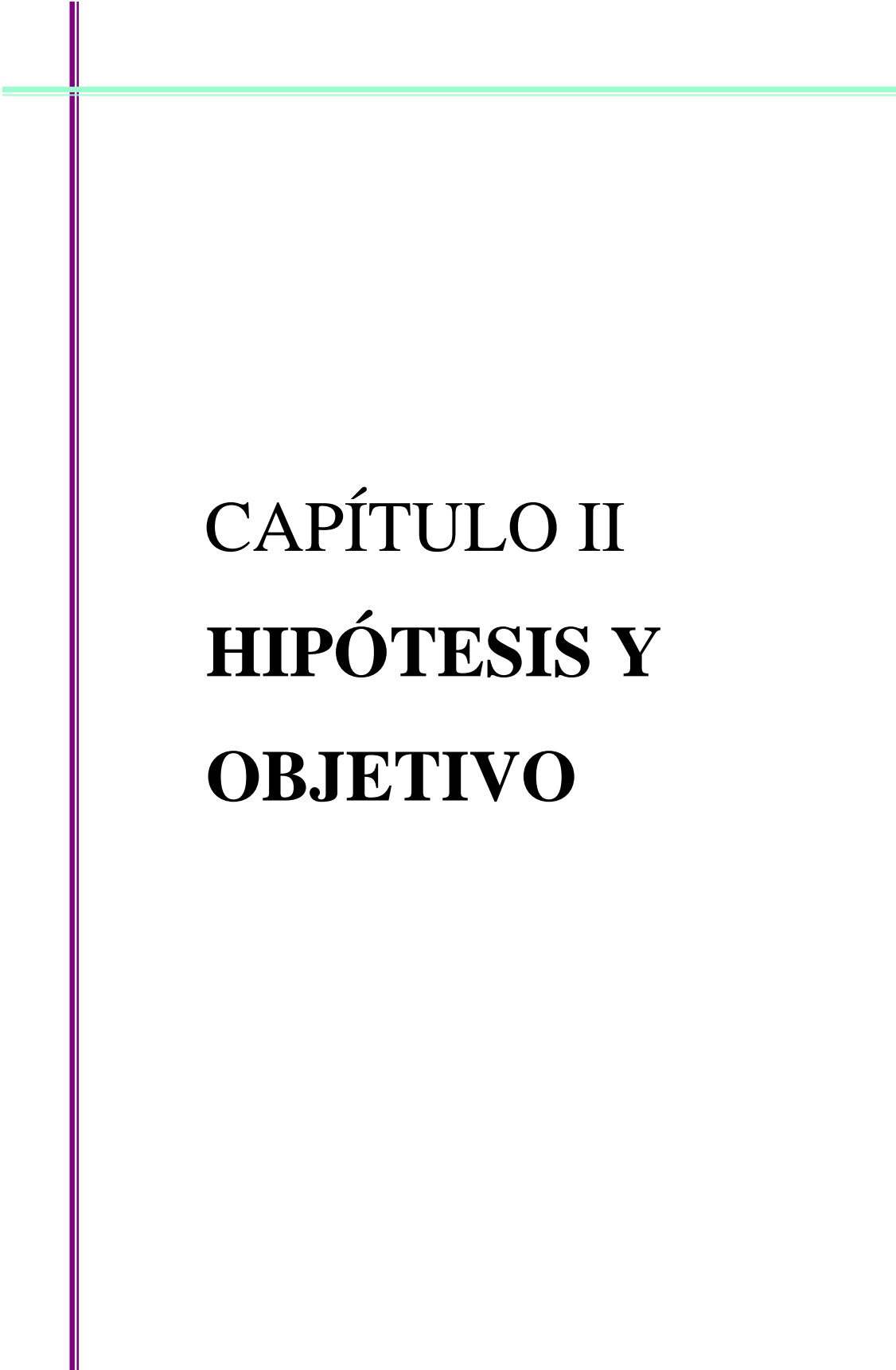
- construirse a partir de datos experimentales confiables,
- incluir los factores cuyos efectos resultan significativos en la respuesta,
- contemplar las interacciones que existen entre los factores y la curvatura del sistema,
- ajustarse para minimizar el error y evaluarse estadísticamente,
- predecir el valor de la respuesta en un punto no estudiado del sistema,
- utilizarse para localizar el valor óptimo de la respuesta.

Para obtener el mejor modelo a partir de los datos experimentales obtenidos con un diseño de experimentos, se debe ajustar los datos a los distintos tipos de modelos posibles (lineal, lineal con interacción o cuadrático). Para cada uno de los modelos se calcula la significancia de la regresión (idoneidad del modelo) y la falta de ajuste. Luego se selecciona el modelo con mayor idoneidad y menor falta de ajuste (Montgomery, 1991).

Cuando no se tiene suficiente información acerca de la forma que presenta la superficie de respuesta, el primer intento de ajuste se hace, generalmente, aproximando a través de un modelo lineal. Cuando existe curvatura en la superficie de respuesta, el modelo de primer orden no es una aproximación adecuada y es necesario utilizar un modelo que ajuste mejor. Se emplea entonces un modelo cuadrático.

Dentro de los experimentos más adecuados para calcular dichos modelos se encuentra el diseño central compuesto (DCC). Este tipo de diseño es uno de los más utilizados debido a su flexibilidad: se puede construir a partir de un diseño factorial 2^k constituyendo la porción factorial del DCC, agregando puntos sobre los ejes en lo que se denominará porción axial y puntos al centro que se denominarán porción central. Resulta clave para las propiedades del diseño, la distancia entre el centro del diseño y la porción axial; generalmente ésta se define como α (Kuehl, 2001).

La elección de un diseño adecuado del experimento a realizar es fundamental para modelar y explorar la superficie de respuesta usada para ajustar un modelo polinómico al conjunto de datos recogidos en los puntos del diseño. Cuando se construye un MSR, se pueden calcular los coeficientes por el método de los mínimos cuadrados y se puede evaluar el modelo realizando réplicas de ciertos experimentos y aplicando el test ANOVA. El modelo se puede utilizar para buscar la zona óptima matemáticamente (Gutiérrez Pulido *et al.*, 2015).



CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y

OBJETIVO

2.1. Hipótesis del trabajo

El empleo de modelos de optimización multivariados permitirá determinar las condiciones experimentales óptimas con un mínimo de experimentos para la cuantificación de As en agua mediante espectrometría de emisión atómica por plasma microondas por generación de hidruros (HG-MPAES).

2.2. Objetivo del trabajo

Encontrar el conjunto óptimo de condiciones experimentales para implementar la metodología de generación de hidruros mediante espectrometría de emisión atómica (HG-MPAES) en la determinación de As en agua, aplicando técnicas de diseño experimental.



CAPÍTULO III
MATERIALES
Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Se prepararon las soluciones patrón de As (III) a partir de una solución madre de 10 mg L^{-1} de As_2O_3 (SCP SCIENCE $1001 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$). Se preparó la solución de NaBH_4 disolviendo tetrahidrobórato de sodio (Fluka) en solución de hidróxido de sodio al 0.1% al momento de ser utilizada para evitar la descomposición del borohidruro. La *L*-cisteína utilizada fue Merck. Se usó ácido clorhídrico concentrado (Cicarelli) que se purificó mediante destilación por sistema *sub-boiling* (Berghoff®). Se preparó una solución blanco para cada medición.

Para la preparación de todas las soluciones, se utilizó agua tridestilada, purificada mediante un Ultrapurificador de agua, Millipore® modelo ultrapure System (Mili-Q), con resistividad de $18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ a 25° C .

3.1.1. Recta de calibración

Se utilizó el estándar mencionado anteriormente para preparar los patrones de trabajo de 0,10, 25, 50,100 y $120 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de As (III). La recta de calibrado se obtuvo utilizando los reactivos a las concentraciones óptimas obtenidas en el diseño experimental. Se trabajó por triplicado.

3.1.2. Muestras

Se analizaron muestras de agua subterránea obtenidas con sistema de bombeo de la ciudad de Santa Rosa y Toay (La Pampa, Argentina); agua utilizada para riego proveniente de Guatraché (La Pampa, Argentina); agua envasada comercial y una de red de la ciudad de Santa Rosa. Las muestras se trataron de la misma forma que los patrones y se analizaron con las condiciones óptimas encontradas.

3.2. Reacción con *L*-cisteína

Se tomó una alícuota de muestra o solución patrón y se agregó el volumen correspondiente de HCl destilado, seguido a esto se adicionó *L*-cisteína en diferentes concentraciones y se llevó a volumen de 10 ml con agua tridestilada. Dada la propiedad reductora de la *L*-cisteína, se requiere 1 hora de reacción antes de la medición.

3.3. Generación de hidruro

Como muestra el diagrama de la figura 6, la solución de muestra acidificada que contiene *L*-cisteína y la solución de NaBH_4 se bombean continuamente hacia la cámara MSIS mediante dos bombas peristálticas a diferentes velocidades. La arsina generada se separa de la solución matriz y se introduce en el plasma para la determinación de arsénico (III). Se registró el pico de As a 193.695 nm.

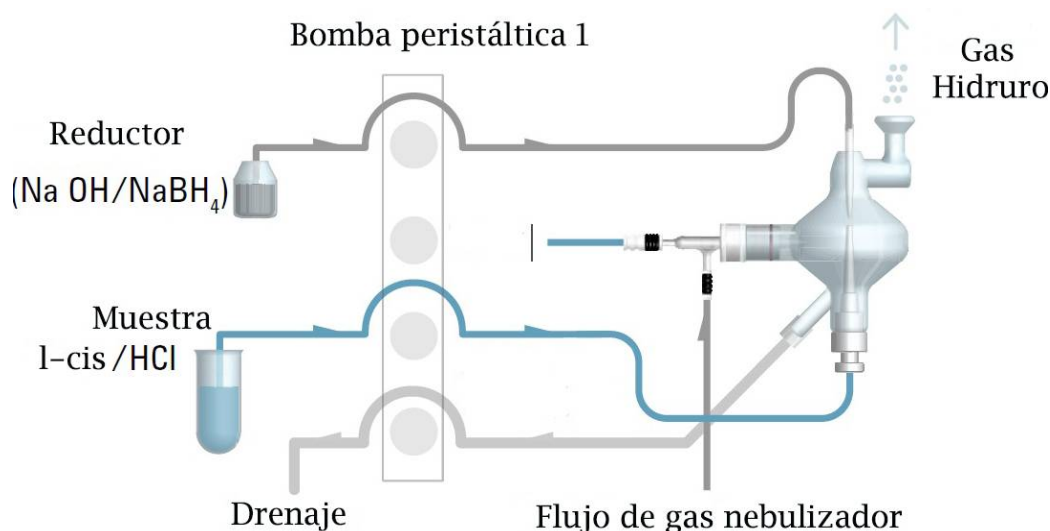


Figura 6. Esquema de formación de hidruros en la cámara MSIS del MPAES.

3.4. Selección de factores y optimización

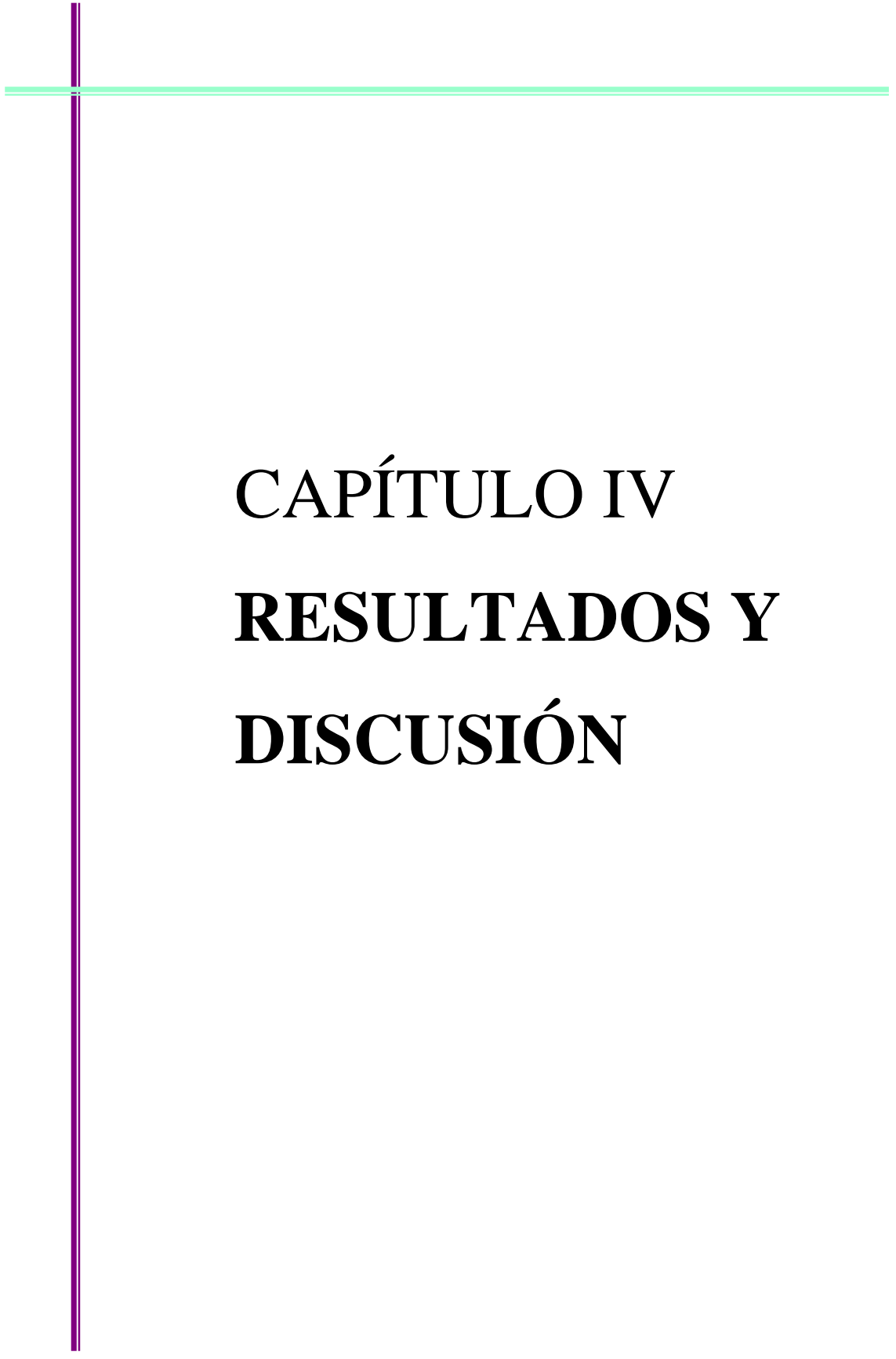
El proceso de optimización se llevó a cabo utilizando metodologías multivariadas. Para la evaluación preliminar de la importancia de los factores implicados en el sistema analítico se aplicó un diseño factorial fraccionado 2^{6-1} . Los factores considerados fueron las concentraciones de NaBH_4 (RC) de HCl (AC), y de *L*-cisteína (CC), caudales de muestra (SFR) y borohidruro (RFR) junto con el tiempo de lectura (TL). Los niveles máximo y mínimo de cada factor se establecieron considerando bibliografía y experimentos anteriores. La respuesta a observar es la intensidad de la señal.

Se realizó un diseño central compuesto con el fin de determinar las condiciones óptimas para realizar el análisis. Los datos experimentales se procesaron utilizando el software Design Expert 7.0.0. Todos los experimentos en este paso se llevaron a cabo en orden aleatorio utilizando soluciones de arsénico de $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.5. Instrumental

Las mediciones se realizaron con un Espectrómetro de Emisión Atómica marca Agilent, modelo MP 4100. La generación de hidruros se realizó mediante el sistema de introducción de muestras multimodo (MSIS), que utiliza una tecnología de formación del hidruro a través de la generación de vapor para un rendimiento significativamente mejor que la nebulización convencional. Las soluciones de las muestras y el NaBH_4 se suministraron a la cámara utilizando dos bombas peristálticas (Agilent y Gilson) por diferentes líneas de transmisión.

Se optimizó los parámetros instrumentales del MPAES, la alineación de la antorcha, posición de visualización (-20 nm), y la presión de nebulización (240 kPa).



CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

4.1. Diseño factorial

La eficiencia de la generación de hidruros en MPAES puede depender de varios factores, pero no todos ellos ser influyentes en la determinación de As. Con el fin de seleccionar aquellos factores que presenten influencia significativa sobre la respuesta, se realizó un diseño factorial fraccionado a dos niveles 2^{6-1} , y se registró la señal analítica relativa (SAR) como respuesta a cada uno de los experimentos planificados. Los seis factores seleccionados, los niveles mínimos y máximos y los puntos centrales de cada uno se detallan en la tabla 1.

Tabla 1. Factores y niveles máximos y mínimos usados en el diseño factorial fraccionado 2^{6-1} utilizado en la selección de factores.

Factor	Nombre	Unidades	Nivel mínimo	Punto central	Nivel máximo
A	TL	seg	10	20	30
B	SFR	rpm	10	29	48
C	RFR	rpm	10	29	48
D	RC	%	0.5	1.75	3.0
E	AC	%	0.5	5.25	10.0
F	CC	%	0.1	2.55	5.0

La tabla 2 muestra la planilla experimental del diseño con los valores codificados de los 35 experimentos realizados y sus respectivas SAR. A partir de cada una de las respuestas obtenidas se seleccionaron los factores que formarán parte del modelo de optimización.

4.1.1. Efecto de los factores

El efecto de un factor es el cambio observado en la respuesta debido a un cambio en el nivel del factor (Montgomery *et al.*, 1991). A partir de los gráficos del efecto de los factores (figura 7) se puede observar la variabilidad en la respuesta para cada nivel del factor. Tanto SFR como para RC muestran un efecto significativo positivo en la respuesta.

Tabla 2. Planilla experimental y señal analítica relativa (SAR) del diseño factorial fraccionado 2^{6-1} (32 corridas y 3 puntos centrales); nivel inferior (-); punto central (0); nivel superior (+). Los niveles de los factores (-, 0 y +) corresponden a los presentados en la tabla 1.

Experimento	A:TL seg	B:SFR rpm	C:RFR rpm	D:RC %	E:AC %	F:CC %	SAR %
1	-	-	-	-	-	-	14.17
2	+	-	-	-	-	+	15.08
3	-	+	-	-	-	+	6.64
4	+	+	-	-	-	-	19.48
5	-	-	+	-	-	+	28.39
6	+	-	+	-	-	-	5.20
7	-	+	+	-	-	-	44.40
8	+	+	+	-	-	+	47.98
9	-	-	-	+	-	+	19.64
10	+	-	-	+	-	-	23.33
11	-	+	-	+	-	-	64.58
12	+	+	-	+	-	+	95.75
13	-	-	+	+	-	-	12.96
14	+	-	+	+	-	+	35.95
15	-	+	+	+	-	+	100.00
16	+	+	+	+	-	-	44.29
17	-	-	-	-	+	+	1.31
18	+	-	-	-	+	-	13.30
19	-	+	-	-	+	-	14.92
20	+	+	-	-	+	+	1.21
21	-	-	+	-	+	-	12.88
22	+	-	+	-	+	+	33.81
23	-	+	+	-	+	+	5.77
24	+	+	+	-	+	-	51.68
25	-	-	-	+	+	-	30.25
26	+	-	-	+	+	+	20.14
27	-	+	-	+	+	+	17.68
28	+	+	-	+	+	-	83.46
29	-	-	+	+	+	+	22.14
30	+	-	+	+	+	-	24.79
31	-	+	+	+	+	-	46.72
32	+	+	+	+	+	+	51.94
33	0	0	0	0	0	0	70.89
34	0	0	0	0	0	0	73.37
35	0	0	0	0	0	0	72.91

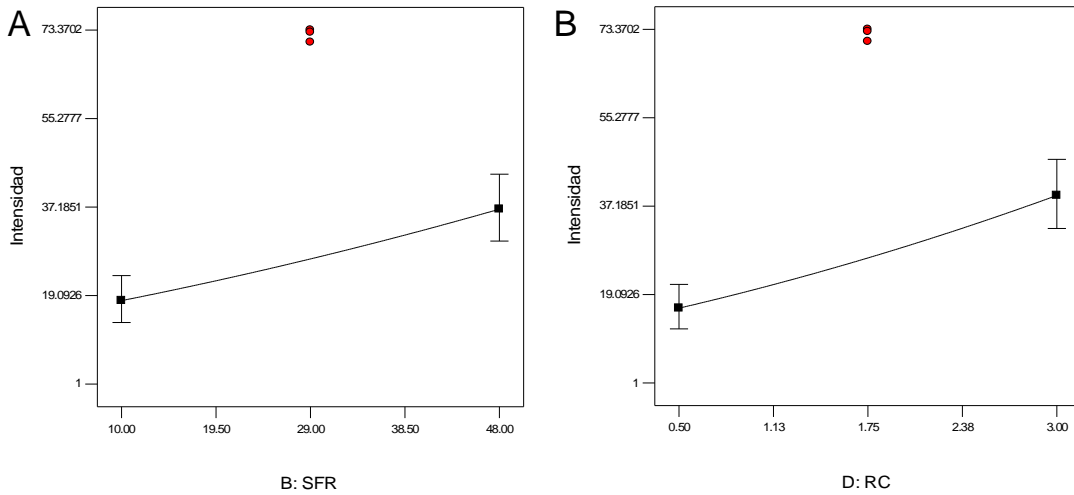


Figura 7. Gráficos de efectos de los factores para (A) SFR y (B) RC.

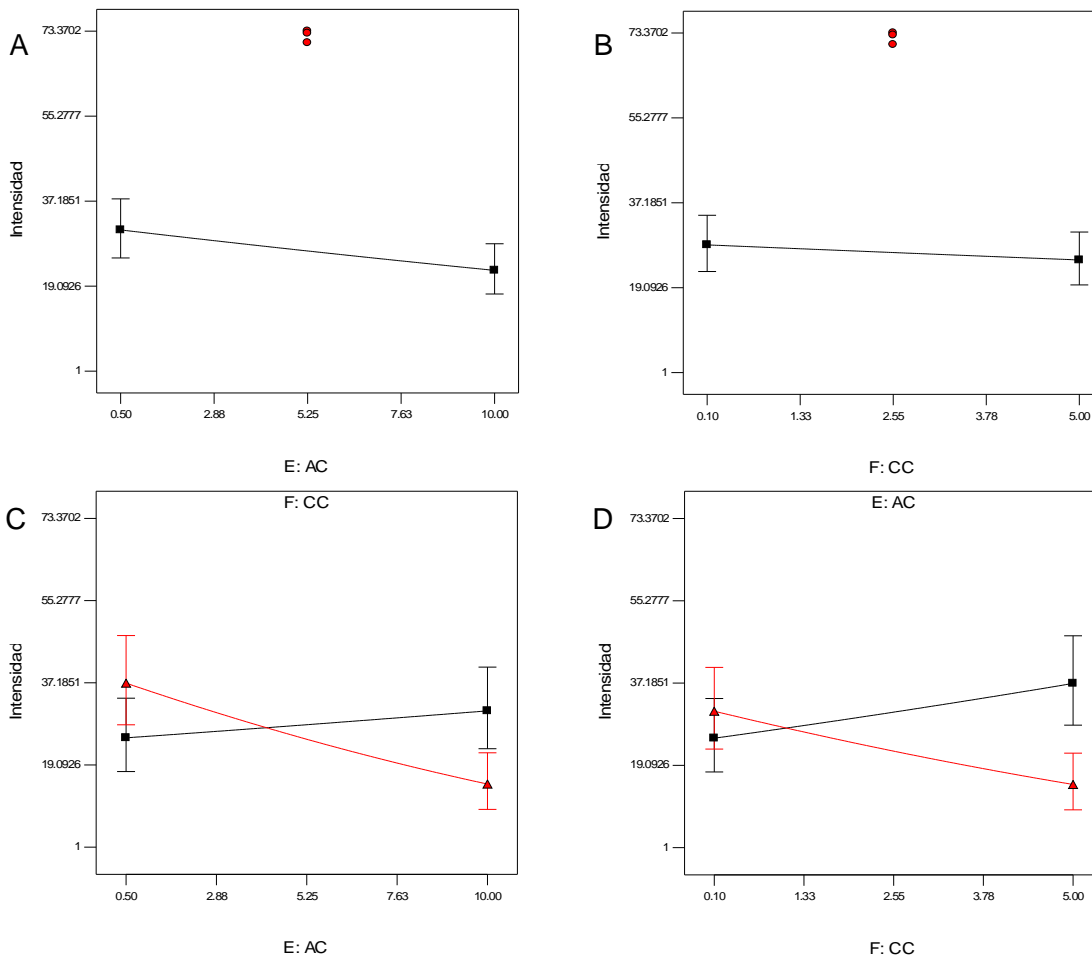


Figura 8. Gráficos de efecto de los factores para (A) AC y (B) CC. (C) Interacción AC al nivel inferior de CC (■) y al nivel superior (▲). (D) Interacción CC al nivel inferior de AC (■) y al nivel superior (▲).

Los gráficos de la figura 8 (A y B) muestran que AC y CC no presentan un efecto significativo en la respuesta. Sin embargo la interacción entre ambos factores es significativa: en el gráfico C se observa que al nivel inferior de CC, la AC tiene un efecto positivo en la respuesta y al nivel superior de CC, la AC tiene un efecto negativo. De la misma forma en el gráfico D, al nivel inferior de AC la CC tiene un efecto positivo en la respuesta, mientras que al nivel superior de AC, la CC tiene un efecto negativo en la respuesta.

La interacción conjunta entre estos dos factores puede ser visualizada más claramente en un gráfico 3D (figura 9).

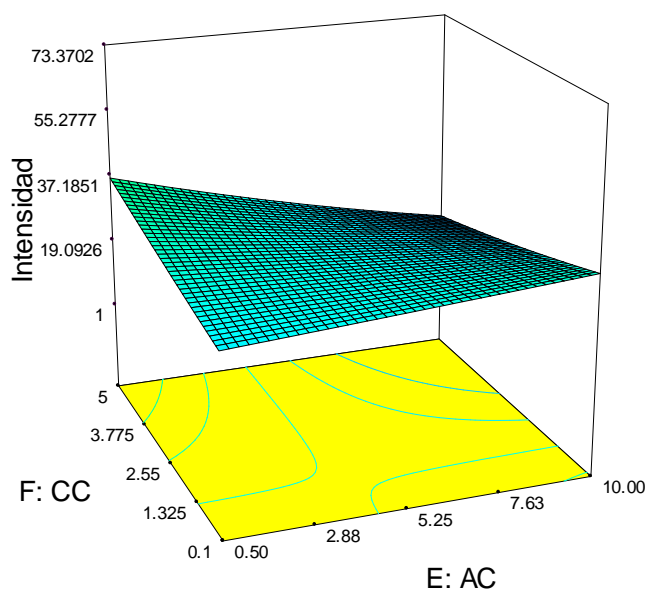


Figura 9. Gráfico 3D de la interacción existente entre los factores AC y CC.

Con respecto a esta interacción, algunos autores encontraron que la presencia de *L*-cisteína afecta la concentración óptima del ácido, la cual se desplaza a un nivel mucho más bajo para la determinación de As. El efecto de la interacción de la *L*-cisteína y HCl se debe probablemente a la presencia del grupo tiol (-SH) en la cisteína. Inicialmente las especies de arsénico reaccionan con los tioles para formar complejos As-(SR). Estos derivados orgánicos de azufre del As requieren probablemente una condición óptima de HCl para reaccionar con el NaBH₄ y producir arsinas (Le *et al.*, 1994). Además, la *L*-cisteína puede reaccionar también con las especies que se derivan de la hidrólisis del borohidruro. En conclusión, existe un pH en el que el complejo As-(SR) es más reactivo en la reacción con NaBH₄ (Pitzalis *et al.*, 2007). Esto explica la interacción de los dos factores que se estudió en el diseño.

El punto central en un diseño, es el valor medio entre los niveles de los factores, y este permite evaluar la curvatura del sistema. En los gráficos de la figura 8, también podemos observar que la curvatura es altamente significativa. Por este motivo, se deberá estudiar un modelo de superficie de respuesta (MSR) cuadrático.

4.1.2. Selección de factores

Para la selección criteriosa de los factores se trabajó con las opciones gráficas que propone el programa: gráfica de Pareto y gráfica de Probabilidad Media Normal, a partir de las cuales se seleccionaron los factores significativamente influyentes para cada una de las respuestas.

El gráfico de Pareto se construye a partir de los efectos de los factores y permite tener una impresión visual rápida de qué factor es más influyente, pero no aporta información acerca de su significancia. Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas se establece un valor t -crítico de Student que se compara con un valor t -calculado para cada efecto. Además, para asegurar la significancia de los factores se establece otro límite (límite t de Bonferroni) a partir de un método de comparaciones múltiples entre medias muestrales. Ambos límites crean un umbral, por encima del cual, la diferencia entre los valores t o entre las dos medias será significativa y por debajo del cual esa diferencia no lo será (figura 10). El límite t de Bonferroni siempre será mayor que el límite t -crítico de Student, por lo cual los factores que lo superen serán considerados altamente significativos para la respuesta (Gutiérrez Pulido *et al.*, 2015).

Valor t del efecto:

$$t_o = \frac{\tau - \mu}{s / \sqrt{n}}$$

τ = efecto

μ = 0

Límite de Bonferroni:

$$BSD = t_{(N-k)} \left(\frac{\alpha}{2M} \right) \sqrt{CM_E \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

N : número total de observaciones

k : número total de factores

M : número total de comparaciones

CM_E : cuadrado medio del error

n_i y n_j : tamaños muestrales de los niveles i y j

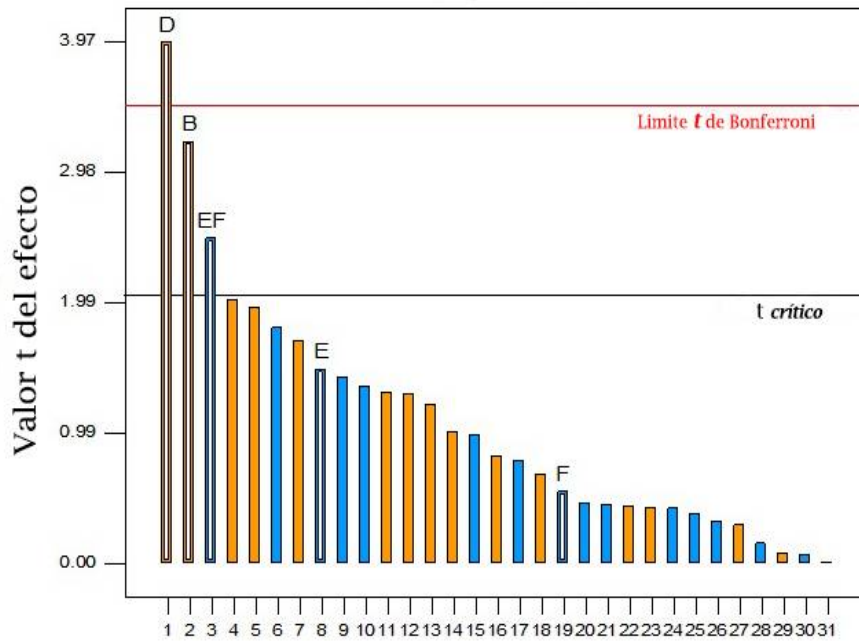


Figura 10. Gráfico de Pareto obtenido a partir del diseño factorial fraccionado 2^{6-1} evaluando los efectos significativos a través de los límites t -crítico de Student y t de Bonferroni. Factor D: RC, B: SFR, E: AC Y F: CC.

A partir de esta gráfica se determinó que las variables RC y SFR y la interacción CC y AC están afectando al sistema. Con el fin de obtener información acerca de la significancia de cada factor seleccionado se procedió a la realización de un ANOVA y se utilizó el valor probabilidad (p) para evaluar la importancia de los efectos principales y sus interacciones (tabla 3).

Tabla 3. Resultado del ANOVA aplicado a los factores significativos del diseño.

Parámetro	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Prueba F	Valor p
Modelo	88.34	5	17.67	6.97	0.0002
SFR	26.30	1	26.30	10.37	0.0032
RC	40.06	1	40.06	15.80	0.0004
AC	5.58	1	5.58	2.20	0.1490
CC	0.78	1	0.78	0.31	0.5842
AC-CC	15.62	1	15.62	6.16	0.0193
Curvatura	30.83	1	30.83	12.16	0.0016
<i>Total</i>	190.173934	34			

Como se puede observar, a través del valor p , los factores SFR y RC son significativos ($p \leq 0.05$) mientras que AC y CC no son significativos, sin embargo si lo es su interacción. Teniendo en cuenta el análisis de estos factores, es importante resaltar que existen tres categorías de modelos de optimización: los modelos completos que contienen todos los factores y todas sus interacciones incluyendo los términos cuadráticos sean o no significativos; los modelos reducidos que están compuestos solo por los factores que son significativos; y los modelos jerárquicos que contiene todos los términos más simples que componen los términos de mayor orden (términos cuadráticos y/o interacciones) que están en el modelo, sean o no significativos (Gutiérrez Pulido & De La Vara Salazar, 2015). Los modelos jerárquicos tienen un comportamiento más estable que los no jerárquicos, por este motivo han sido seleccionados los factores AC y CC para el paso de optimización, a pesar de no ser significativos.

4.2. Optimización

4.2.1. Creación del diseño

A partir de la evaluación del diseño factorial por el gráfico de Pareto y ANOVA se demostró que SFR, RC, CC y AC son las variables que controlan el sistema y que además, la curvatura es significativa. Por lo tanto, será necesario evaluar un diseño de segundo orden. Para ello, es necesario proporcionar una distribución razonable de puntos de datos en el entorno experimental generando datos que permitan tener una cantidad de puntos para poder estimar todos los términos del modelo cuadrático. El número mínimo de experimentos necesarios para construir un modelo cuadrático está dado por la siguiente ecuación:

$$N_{\min} = 1 + 2k + k(k - 1)/2$$

Siendo $k = 4$, se establece que es necesario un mínimo de 15 experimentos para la construcción del modelo cuadrático a partir de un diseño con 4 factores.

Se realizó un diseño central compuesto (DCC) para seleccionar el conjunto de variables que permita optimizar la SAR. En este diseño se evaluaron 24 experimentos con 6 réplicas en el punto central, mediante las que se evaluó la falta de ajuste del modelo (tabla 4). Los valores máximos y mínimos de los factores fueron: SFR: 20-40 rpm, AC: 1.40-3.80%, CC: 0.19-0,53% y RC: 1.20-2.40%, siendo los puntos centrales: 30 rpm, 2.6%, 0.36% y 1.8% respectivamente. El valor de α para este DCC es igual a 2. Se fijaron

los niveles para los factores que resultaron no significativos: 15 rpm para el caudal de la solución NaBH₄ (RFR) y 10 segundos el TL.

Cabe destacar que los niveles de los factores utilizados en la optimización para la AC y CC no son los mismos que los evaluados en la selección de factores. Esta selección se realizó a través de una optimización previa por medio de la cual se pudo observar que el valor óptimo para la respuesta, no fue alcanzado dentro de los rangos evaluados. En estos casos se sigue experimentando en el sentido del óptimo cambiando el entorno experimental, siempre que lo permitan las condiciones de operación del sistema (Gutiérrez Pulido & De La Vara Salazar, 2015).

Tabla 4. Plantilla experimental del diseño central compuesto para la optimización ($-\alpha$ y $+\alpha$ son los puntos axiales del diseño).

Experimento	A:AC %	B:SFR rpm	C:CC %	D:CR %	SAR %
1	-	-	-	-	54.64
2	+	-	-	-	51.85
3	-	+	-	-	100
4	+	+	-	-	68.43
5	-	-	+	-	67.00
6	+	-	+	-	45.19
7	-	+	+	-	97.17
8	+	+	+	-	28.39
9	-	-	-	+	28.87
10	+	-	-	+	21.88
11	-	+	-	+	27.15
12	+	+	-	+	24.64
13	-	-	+	+	25.53
14	+	-	+	+	6.21
15	-	+	+	+	15.58
16	+	+	+	+	5.26
17	$-\alpha$	0	0	0	64.25
18	$+\alpha$	0	0	0	46.46
19	0	$-\alpha$	0	0	33.16
20	0	$+\alpha$	0	0	74.97
21	0	0	$-\alpha$	0	38.28
22	0	0	$+\alpha$	0	86.89
23	0	0	0	$-\alpha$	28.31
24	0	0	0	$+\alpha$	12.80
25	0	0	0	0	86.84
26	0	0	0	0	85.23
27	0	0	0	0	84.52
28	0	0	0	0	84.41
29	0	0	0	0	82.48
30	0	0	0	0	83.32

Una propiedad que cumple el diseño es la rotabilidad (figura 12). La varianza es función únicamente de la distancia del punto al centro del diseño, lo que significa que es la misma en todos los puntos equidistantes del centro del diseño. Teniendo en cuenta que el objetivo de la RSM es la optimización de la respuesta y que se desconoce la localización del óptimo antes de ejecutar el experimento, esta propiedad resulta muy interesante, puesto que garantiza que el diseño proporciona estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones (Almeida Bezerra *et al.*, 2008).

Esta propiedad puede evaluarse a través de la función información del diseño, que puede representarse gráficamente como el error estándar del modelo, asociado a la leva de los puntos experimentales del diseño (figura 11). En el gráfico A se observan valores bajos de leva, lo cual indica un buen diseño si se tiene en cuenta que dichos valores se trasladan al error estándar de la predicción de la respuesta. La variabilidad del diseño puede observarse a través de su correspondiente gráfica de contorno. Para el diseño estudiado, la gráfica B presenta círculos concéntricos alrededor del centro del diseño, lo cual indica que el mismo es rotable, es decir que la varianza de la respuesta estimada sobre un punto depende de la distancia de este al centro del diseño y no de la dirección en la que se encuentra. La rotabilidad tiene como beneficio poder predecir cualquier respuesta con el mismo error y con un mismo nivel de confianza en cualquier punto experimental.

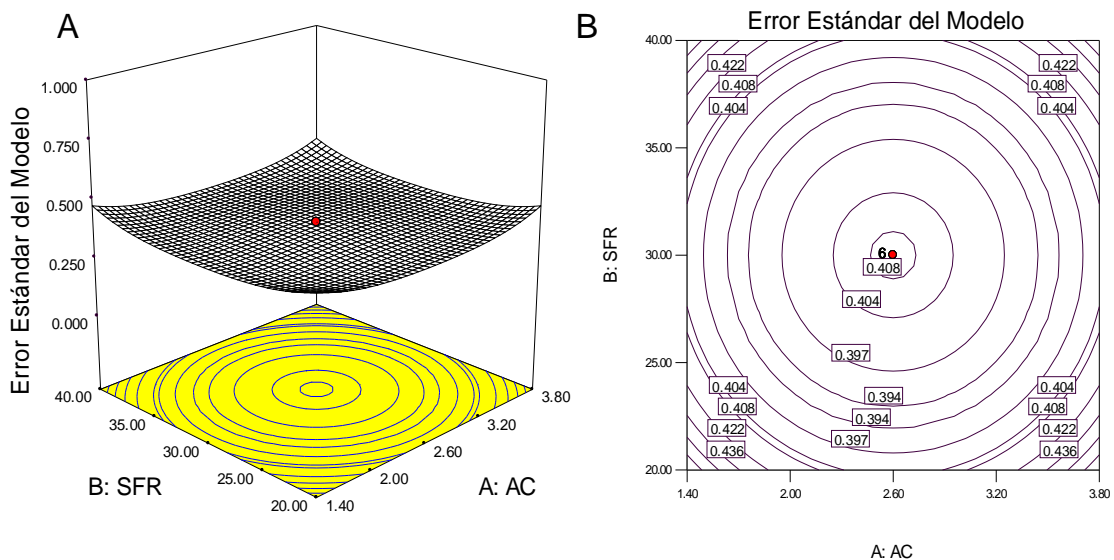


Figura 11. (A) Gráfica de la función información del diseño central compuesto y (B) su correspondiente gráfica de contorno.

4.2.2. Evaluación del modelo

La variación de la respuesta por causa de la variación de los factores se explica a través del siguiente modelo matemático:

$$y = -300.9 + 23.3 AC + 8.7 SFR + 14.9 CC + 286.9 RC + 0.1 AC SFR - 15.4 AC CC - 1.3 SFR CC - 1.8 SFR RC - 23.8 CC RC - 4.8 AC^2 - 0.1 SFR^2 + 113.6 CC^2 - 75.2 RC^2$$

Se realizó un test ANOVA al conjunto de datos a partir del cual se pudo observar que, para la respuesta estudiada, el modelo polinómico que mejor se ajustó a los datos fue un modelo cuadrático con interacciones. Para dicho modelo se evaluó la significancia de la regresión y la falta de ajuste para un nivel de significancia de 0.050, siendo significativa la regresión ($R^2_{aj} = 0.99$) y no significativa la falta de ajuste (tabla 5).

Tabla 5. Resultados del ANOVA para un modelo cuadrático con interacciones

Parámetro	Suma de cuadrados	gl	Cuadrados		
			medios	Prueba F	Valor P
Modelo	22709.2	13	1746.9	293.4	0.0001
A-AC	456.8	1	456.8	76.7	0.0001
B-SFR	1876.3	1	1876.3	315.1	0.0001
C-CC	231.1	1	231.1	38.8	0.0001
D-RC	10239.8	1	10239.8	1719.6	0.0001
AC-SFR	23.4	1	23.4	3.9	0.0709
AC-CC	126.9	1	126.9	21.3	0.0006
SFR-CC	59.5	1	59.5	9.9	0.0082
SFR-RC	1365.8	1	1365.8	229.4	0.0001
CC-RC	75.6	1	75.6	12.7	0.0039
AC ²	1253.1	1	1253.1	210.4	0.0001
SFR ²	1371.9	1	1371.9	230.4	0.0001
CC ²	148.5	1	148.5	24.9	0.0003
RC ²	10900.9	1	10900.9	1830.6	0.0001
Residual	71.5	12	5.9		
Falta de Ajuste	59.9	7	8.6	3.7	0.0832

La aplicación del ANOVA se realiza teniendo en cuenta tres supuestos: que las muestras provienen de una población en la que las variables tienen distribución normal, que las variables consideradas son independientes entre sí y que hay homocedasticidad (homogeneidad de varianzas). Antes de la optimización final debe realizarse la verificación de estos supuestos, que se evalúan a través de gráficas de residuos (generados por la diferencia entre la respuesta observada y la predicha por el modelo) y pruebas estadísticas (figura 12).

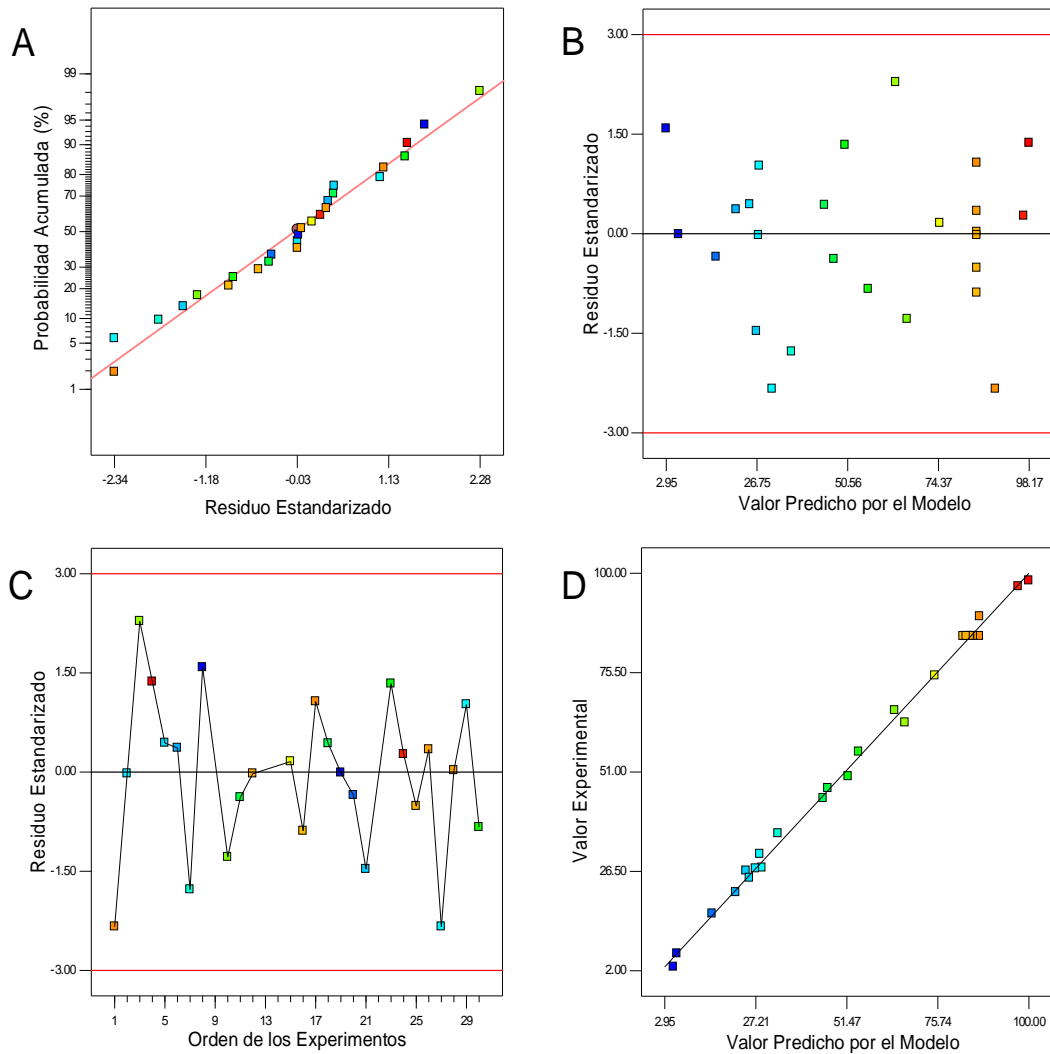


Figura 12. Gráficos de residuos evaluando: A) normalidad, B) homocedasticidad y C) independencia. D) Bondad de ajuste del modelo.

En la gráfica de normalidad de los residuos, como todos los datos se ajustan a la recta, los residuos y por ende los datos provienen de una población con distribución normal (figura 12 A).

Para comprobar si los datos son homocedásticos se construye una gráfica del valor predicho vs. el error (figura 12 B). Esta gráfica tiene límites establecidos para las fluctuaciones de los residuos, que permiten evaluar también datos atípicos. Se observa que los residuos están distribuidos de manera aleatoria alrededor del cero, sin ningún patrón de comportamiento, por lo tanto son datos homocedásticos y que todos los valores fluctúan entre los límites permitidos.

No se detectó ninguna tendencia ni correlación entre los residuos mostrando la existencia de independencia en las observaciones. Tampoco se observan datos que superen los límites de fluctuaciones (figura 12 C).

Para evaluar la bondad de ajuste del modelo se grafican el valor experimental en función del valor predicho por el modelo (figura 12 D). Cuanto más se aproximen los datos a la diagonal mejor es el modelo y se observa un buen ajuste de todas las respuestas analizadas.

Se pudo determinar a través de este análisis gráfico que se cumplen los supuestos de ANOVA, por lo tanto el modelo elegido resulta ser correcto para la optimización.

4.2.3. Optimización de la respuesta

Una de las ventajas más importantes que tiene la realización de un diseño de experimentos es la posibilidad de obtener un valor de la respuesta que no ha sido evaluado experimentalmente y que a su vez puede superar al valor máximo de la respuesta experimental encontrada, es decir que tiene la capacidad de predecir un valor óptimo para cierta combinación de variables, utilizando un modelo matemático.

En base a los objetivos propuestos para la optimización de este método, no se consideraron restricciones para las variables de la optimización de la respuesta y se evaluaron las predicciones que maximizaran la respuesta.

Como resultado de la optimización a partir del DCC se obtuvieron las gráficas de superficie de respuesta en función de los factores evaluados de a dos (figura 13). A partir de dichas gráficas se puede observar el punto óptimo de la respuesta (zonas rojas) para la siguiente combinación de factores: 43 rpm para SFR; 2.40% para AC; 0.03% para CC y 1.70% para CR. La mejor predicción de la SAR predicha por el modelo fue de $115.75 \pm 8.50\%$. Por último se corroboró experimentalmente la predicción del modelo obteniendo un valor de SAR de 109.78%. Este valor se incluye dentro de intervalo de confianza de la predicción, por lo cual se pudo verificar exitosamente la predicción del modelo, confirmando de esta manera que los valores seleccionados de este conjunto de variables es el correcto para obtener la mayor intensidad de la señal de As.

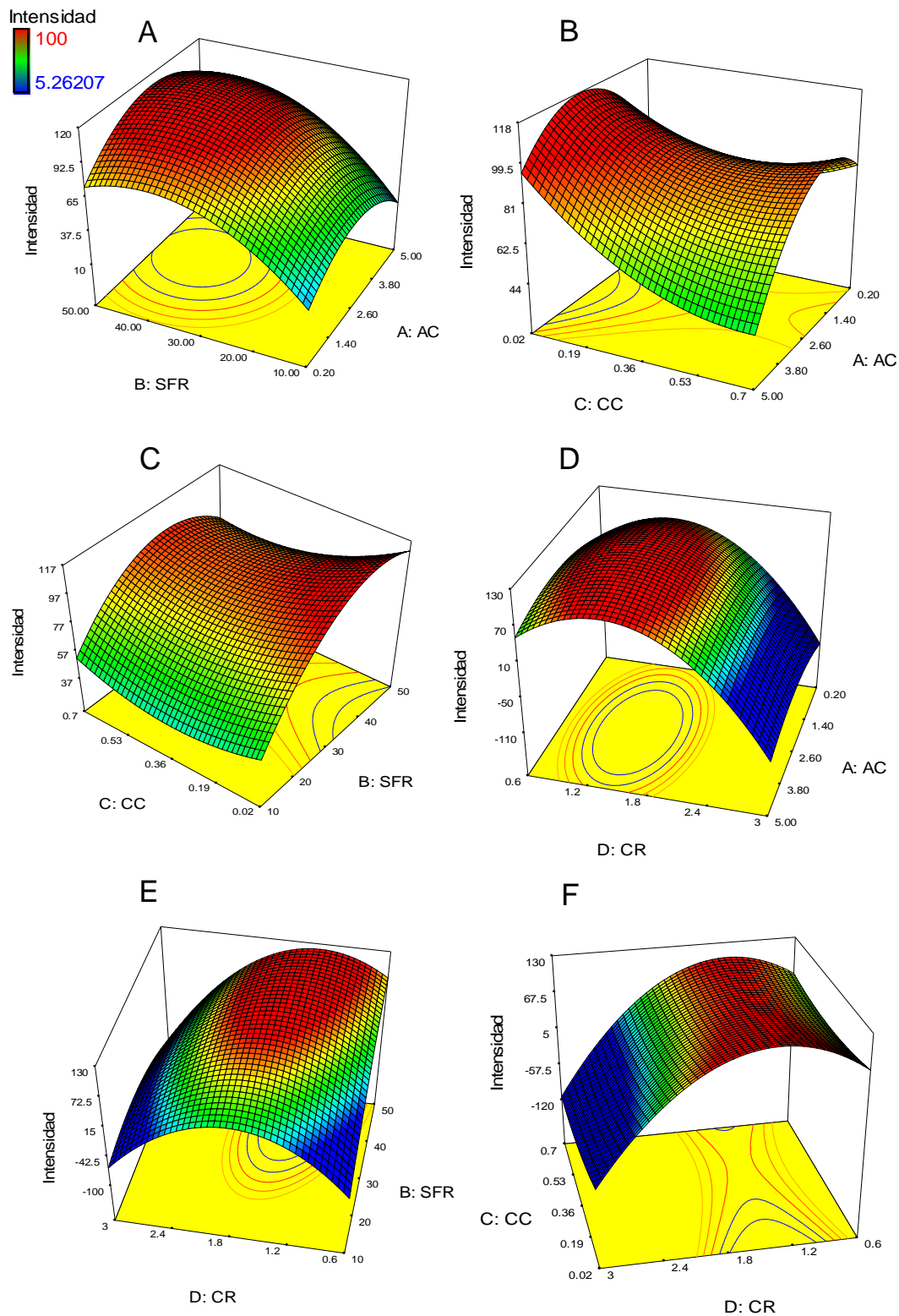


Figura 13. Superficies de respuesta obtenidas a partir de un DCC mostrando el conjunto de condiciones que optimizan la intensidad de la señal analítica para la determinación de As. (A) AC vs. SFR con CC: 0.03% y RC: 1.70%. (B) CC vs. AC con SFR: 43 rpm y RC: 1.70%. (C) CC vs. AFR con AC: 2.40% y RC: 1.70%. (D) AC vs. RC con SFR: 43rpm y CC: 0.03%. (E) SFR vs. RC con CC: 0.03% y AC: 2.40%. (F) CC vs. RC con SFR: 43 rpm y AC: 2.40%

Las gráficas de la figura 13 muestran que se corrobora lo obtenido en el diseño factorial, tanto la variación de CC y AC no producen un cambio apreciable cuando interaccionan con las demás variables, pero si varían cuando interaccionan entre sí. Yin y col. indican que la concentración de *L*-cisteína afecta la señal analítica y dan como óptima una concentración del 2%, asegurándose de esta manera que todo el As presente en la muestra se encuentre en estado de oxidación (III) (Yin *et al.*, 1996). Esta diferencia puede surgir porque todo el proceso de optimización se llevó a cabo utilizando un patrón de As (III). De esta forma la acción reductora de la *L*-cisteína no puede ser apreciada, ya que no existe en el medio de reacción la presencia de As (V) o se encuentra en mínima cantidad. Por lo tanto, la optimización que se realizó resulta válida para la determinación de As (III).

En próximos estudios sería conveniente tener en cuenta esta observación y realizar la optimización con un patrón que contengan ambas especies de As, de este modo se obtendrá un modelo para la determinación total del elemento en cuestión.

4.3. Aplicación Analítica

El método HG-MPAES se utilizó para determinar As en las muestras agua, empleando las condiciones óptimas de las variables determinadas en el diseño de experimentos. Se construyó una recta de calibración con patrones de As en concentraciones desde 0 a 125 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todos los patrones y muestras fueron preparados y medidos por triplicado. Los valores de la pendiente y la ordenada obtenidas de la regresión fueron 13.63 y 0.43 respectivamente. Se aplicó una prueba *F* para la evaluación de la linealidad, verificando a través de la misma que la linealidad se cumple para el intervalo de concentraciones estudiado. El límite de detección (LOD) se calculó como 3.3 veces la desviación estándar del blanco dividido la pendiente de la recta de calibración. Así mismo, el límite de cuantificación (LOQ) se obtuvo a partir del producto de 10 veces desviación del blanco dividido la pendiente. El LOD y LOQ alcanzados por esta metodología fueron muy satisfactorios alcanzándose valores de 2.58 y 8.59 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, valores inferiores al límite establecido por la OMS (10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

En la figura 14 se observan los espectros de emisión mostrando la señal de intensidad neta de As para los patrones de calibrado y para las muestras de agua estudiadas, información extraída del software del MPAES. Se observa que la señal de intensidad del As es bien definida en el espectro de emisión de los patrones de calibración. Además, los picos de intensidad de la señal obtenidos a partir del análisis de las muestras

son de similar aspecto a los picos de los patrones. Esto indica y confirma que la técnica de HG bajo las condiciones óptimas halladas, minimizan los efectos de matriz de las muestras que podrían interferir espectralmente en la determinación del As.

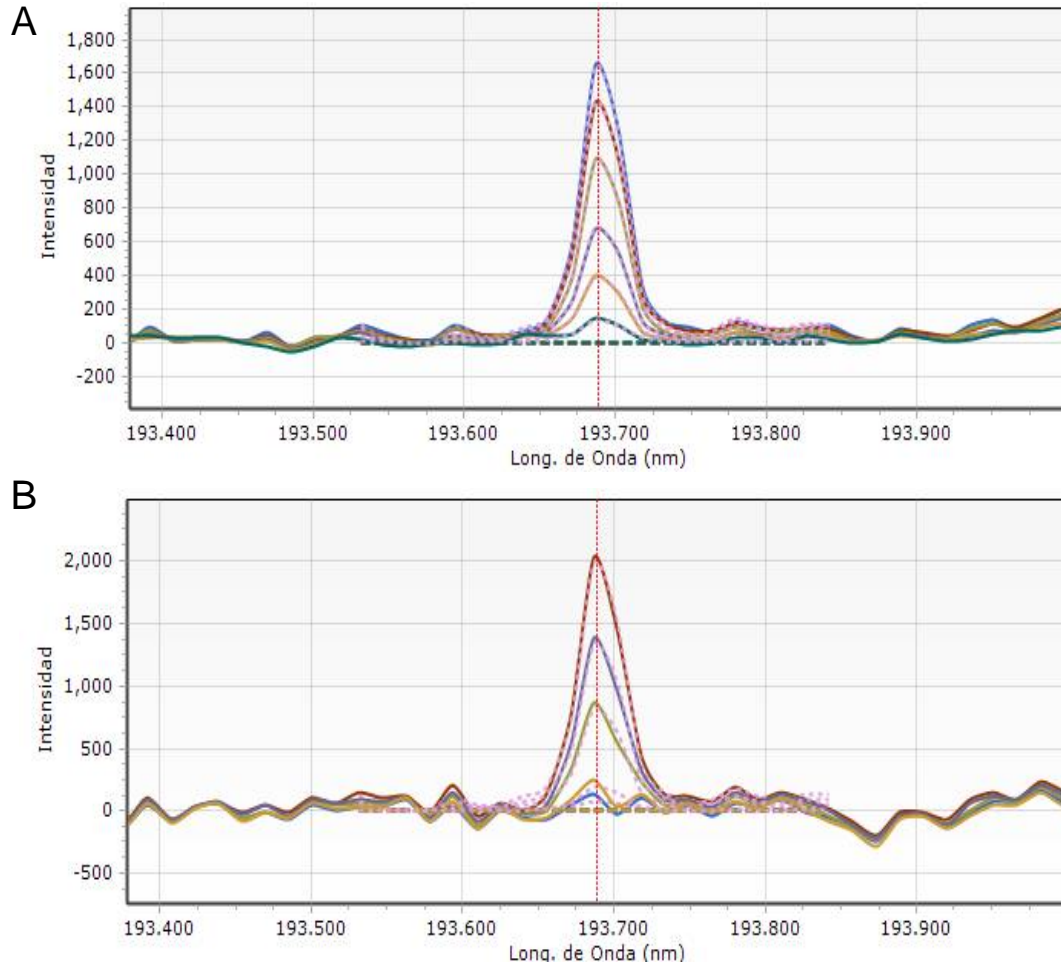


Figura 14. Espectros de emisión. La señal de intensidad neta de As a 193.695 nm en A) patrones de calibración con 0, 10, 25, 50, 75, 100 y 120 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As; B) muestras de agua estudiadas.

Las concentraciones de As presente en cada muestra se muestran en la tabla 6, encontrándose que 3 de las 5 muestras analizadas exceden ampliamente el límite establecido por la OMS ($10 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla 6. Intensidad de señal, concentración de As e intervalo de confianza para las diferentes muestras analizadas. Muestra 1: Agua de riego de Guatraché; 2: Agua purificada comercial; 3: Agua subterránea de Santa Rosa; 4: Agua subterránea de Toay; 5: Agua de red de Santa Rosa.

Muestras	Intensidad	$\mu\text{g L}^{-1}$ As
1	1953.31	143.3 ± 4.5
2	90.75	6.6 ± 1.1
3	822.08	60.3 ± 1.8
4	1377.74	101.1 ± 2.7
5	192.59	14.1 ± 0.7

Con la finalidad de validar el método propuesto se analizó por triplicado un material de referencia, NIST 1643e, que se preparó de la misma manera que los patrones y las muestras. Los resultados se compararon a través de un test t (n: 3, nivel de significancia: 0.05) a través del cual no se observaron diferencias significativas entre la concentración de As que contiene el material de referencia ($60.45 \mu\text{g L}^{-1}$) y la concentración encontrada por el método estudiado ($58.65 \pm 2.52 \mu\text{g L}^{-1}$).



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

5.1. Conclusiones

La aplicación de un adecuado modelo de diseño experimental a la determinación de As mediante el sistema de generación de hidruros, utilizando MPAES permitió:

- establecer el conjunto de condiciones experimentales que maximizaron la señal del analito,
- minimizar el tiempo de análisis,
- minimizar el gasto de reactivos,
- obtener la máxima sensibilidad,
- minimizar los efectos de interferencia.

Ventajas obtenidas respecto al método univariado.

Por otra parte, se alcanzó un límite de cuantificación de As menor que el establecido por la OMS para el agua de consumo humano, por lo que resulta un método válido para tal fin.

Las concentraciones halladas en las muestras de agua estudiadas fueron: 143,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ riego Guatraché; 60.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ subterránea Santa Rosa; 101.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ subterránea Toay; y 14.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ red Santa Rosa. Estos resultados deberían ser una fuerte advertencia en relación a la eventual cantidad de As que podría ser consumida por los habitantes de Santa Rosa-Toay, habida cuenta que los valores encontrados en todas las muestras de agua (incluida el agua de red domiciliaria) superan el máximo permitido por la OMS.

Como conclusión final, se puede afirmar que una adecuada combinación entre optimización multivariada y análisis instrumental, permitieron obtener un sistema robusto de gran aplicabilidad e interés para el análisis de As en muestras de agua potable, superficiales y subterráneas.

REFERENCIAS

- Agilent.http://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/2.Nuevo_Plasma_de_Microondas_Agilent_4100_MP-AES.pdf. Septiembre **2016**.
- Almeida Bezerra M., Erthal Santelli R., Padua Oliveira E., Silveira Villar L., Escalera L. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. **2008**, 76,965-977.
- Altunay N., Gurkan R., Kir U. Ultrasound assisted-cloud point extraction combined with flame atomic absorption spectrometry for selective preconcentration and determination of As(V) in selected water and beverage samples. *Analytical Methods*, **2015**,7, 6629-6639.
- Arriaza B., Amarasiriwardenad D., Cornejo L., Standenc V., Byrne S., *et al.* Exploring chronic arsenic poisoning in pre-Columbian Chilean mummies. *Journal of Archaeological Science*. **2010**, 37 (6), 1274-8.
- Bhattacharya P., Claesson M., Bundschuh J., Sracek O., Fagerberg J., *et al.* Distribution and mobility of arsenic in the Río Dulce Alluvial aquifers in Santiago del Estero Province, Argentina. *Science Total Environment*. **2006**, 358(1-3), 97-120.
- Bundschuh J., Nath B, Bhattacharya P., Chen-Wuing L., Armienta M.,Moreno López M., *et al.* Arsenic in the human food chain: the Latin American perspective. *Science of the Total Environment*. **2012**, 429, 92-106.
- Bundschuh J., Litter M., Parvez F., Román-Ross G., Nicolli H., *et al.* One century of arsenic exposure in Latin America: A review of history and occurrence from 14 countries. *Science of The Total Environment*. **2012**, 429, 2-35.
- Butcher D. j., Sneddon J. A practical Guide to Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Wiley-Interscience. **1998**.
- Castro de Esparza M. The presence of arsenic in drinking water in Latin America and its effect on public health. *Arsenic in the environment*. **2009**, 17-29.
- da Luz Lopes W., Erthal Santelli R., OliveiraE., Batista de Carvalho M., Almeida Bezerra M. Application of multivariate techniques in the optimization of a procedure for the determination of bioavailable concentrations of Se and As in estuarine sediments by ICP OES using a concomitant metals analyzer as a hydride generator. *Talanta*. **2009**, 79, 1276-1282.
- Dejaegher B. & Vander Heyden Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2011**, 56, 141-158.

- Ferré, J. & Rius, X. Introducción al diseño estadístico de experimentos. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. *Técnicas de Laboratorio*. **2002**, 274, 648-653.
- Figuroa Preciado G. Optimización de una superficie de respuesta utilizando JMP IN. *Mosaicos Matemáticos* N°11. **2003**.
- Gutiérrez Pulido H. & De La Vara Salazar R. Análisis y Diseño de Experimentos. McGraw-Hill. **2015**.
- Harris D. C., Analisis químico cuantitativo. Reverté. **2003**.
- Hwang J. D., Huxley H., Dioguardi J., Vaughn W. The Determination of Arsenic in Environmental Samples by Inductively Coupled Plasma-Atomic. *Society for Applied Spectroscopy*. **1990**, 44 (3), 491-496.
- Jankowski, K. J. & Reszke E. Microwave Induced Plasma Analytical Spectrometry. *Royal Society of Chemistry, Analytical Spectroscopy Monographs*. **2011**.
- Kim M., Um H., Bang S., Lee S., Oh S., *et al.* Arsenic removal from vietnamese groundwater using the arsenic-binding DNA aptamer. *Environment Science Technology*. **2009**, 43, 9335-9340.
- Kuehl, R. O. Diseño de Experimentos. International Thomson. **2001**.
- Leardi Riccardo. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*. **2009**, 652, 161-172.
- Le X., Cullen W., Reimer K. Effect of cysteine on the speciation of arsenic by using hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. **1994**, 285, 277-285.
- Liu Q., Hu C., Tan Q., Sun X., Su J., Liang Y. Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under hydroponic conditions. *Journal of Environmental Sciences*. **2008**, 20, 326-331.
- Long Z. , Luo Y., Zheng C. , Deng P., Hou X. Recent Advance of Hydride Generation-Analytical Atomic Spectrometry: Part I-Technique Development. *Applied Spectroscopy Reviews*. **2012**, 47, 382-413.
- McClintock T. R., Chen Y., Bundschuh J., Oliver J., Navoni J., *et al.* Arsenic exposure in Latin America: Biomarkers, risk assessments and related health effects. *Science of the Total Environment*. **2012**, 429, 76-91.
- Montgomery D. Diseño y Análisis de Experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. **1991**.

- Pitzalis E., Ajala D., Onor M., Zamboni R., D'Ulivo A. Chemical Vapor Generation of Arsane in the Presence of L-Cysteine. Mechanistic Studies and Their Analytical Feedback. *Analytical Chemistry*. **2007**, 79 (16), 6324-6333 .
- Ramesh Kumar A., Riyazuddin P. Mechanism of volatile hydride formation and their atomization in hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytical Science*. **2005**, 21 (12), 1401-1410.
- Skoog A., Holler F., Crouch S. R., Principios de análisis instrumental. Cengage Learning Editores. **2008**.
- Wang S., Wai C. Arsenic in drinking water: a global environmental problem. *Journal of Chemical Education*. **2004**, 81 (2), 207-213.
- Xu X., McGrath S., Meharg A., Zhao F. Growing rice aerobically markedly decreases arsenic accumulation. *Environment Science Technology*. **2008**, 42 (15), 5574-5579.