



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Optimización de una metodología analítica para la
determinación de arsénico por espectroscopia de absorción
atómica con generador de hidruros**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

P R E S E N T A:

JUAN JOSÉ DURÁN ORTÍZ

**ASESOR: DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ
COASESOR: Q.F.B JOSÉ ARTURO MARTIN TERESO**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Optimización de una metodología analítica para la determinación de arsénico por espectroscopia de absorción atómica con generador de hidruros.

Que presenta el pasante: Juan José Durán Ortiz

Con número de cuenta: 411098115 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Octubre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	D.A.R. Juan José Díaz Esquivel	
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
1er. SUPLENTE	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
2do. SUPLENTE	Q.I. Griselda Ávila Enríquez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS

Gracias sinceras especialmente a mis padres Herminia Ortiz y Juan Durán, por darme la vida y enseñarme como vivirla, así también la educación y la oportunidad de llegar a terminar una carrera universitaria.

A mis hermanos y demás familia por su apoyo incondicional.

A mi asesora Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez por aceptarme en este proyecto de tesis y el apoyo brindado a lo largo de este tiempo. Sus conocimientos son la base fundamental en este trabajo y le he aprendido como resolver los problemas en los experimentos, con la visión de químico.

A mi coasesor Q.F.B José Arturo Martín Tereso por esa amabilidad y disposición en la enseñanza en el manejo adecuado del equipo de absorción atómica y en algunos problemas fuera del tema de esta tesis.

A la Dra. Guadalupe Pérez Caballero, es como una segunda asesora con el apoyo de sus conocimientos, consejos, anécdotas y valores.

A Miguel Cruz que me ayudo a realizar parte de la validación del método como segundo analista.

A la UNAM-FESC y toda la comunidad que la forma, en especial el Campo 1 por la tranquilidad y comodidad de sus instalaciones a lo largo de estos 7 años.

A los de mi carrera Pamela Olmos, Monserrat Zárate, Irene Garza, Rodrigo Gómez, Misael Fernández, Carlos Monter, Emanuel Salazar, Daniel Gutiérrez, Erick Pavón, Raúl Aguilar, Rigo Vargas, Ángel Flores y Sergio Benítez por tener la mismo objetivo de ser químicos y esos malos o buenos momentos que compartimos.

A el sistema de becas para estudiantes indígenas de la UNAM, el Programa Universitario Diversidad Cultural e Interculturalidad por el apoyo económico.

A mis tutores María José y Juan Pablo, por toda la amabilidad y disposición que me brindaron en mi estancia como becario.

A todos los maestros que me dieron clases, todos han aportado un poco de su conocimiento en mi formación. En especial a los más estrictos, que fueron los que me enviaron muchas veces a la biblioteca, hacían que saliera del salón de clases sin ninguna distracción en mente que no fuera aprender más.

A la UNAM DGAPA por el apoyo económico del Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME) y en especial al proyecto PE205416, dentro del cual se me otorgó una beca.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos.

A mi madre y mi padre, por darme la vida y esta oportunidad de terminar la universidad, estoy orgulloso de ustedes.

A mis hermanos que siempre están en las buenas y en las malas. Con ustedes aprendí a soñar en grande, y este sueño de estudiar no es la excepción.

“El dejo las preguntas del tiempo antes que yo, pero yo tenía las propias, ahora debo trabajar en solucionar ambas”

Juan José Durán Ortiz (marzo,2017)

El trabajo experimental se realizó en los laboratorios L-401 y L-112 de la sección de química analítica, ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 de la UNAM para obtener el título de Químico, bajo la tutoría de la Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez y del Q.F.B José Arturo Martin Tereso.

ÍNDICE

1	Introducción	1
2	Antecedentes	3
	2.1 Propiedades del arsénico	4
	2.1.1 Arsénico en consumo de agua y alimentos	4
	2.1.2 Procesos industriales con arsénico	5
	2.1.3 Efectos del arsénico sobre la salud	5
	2.1.3.1 Efectos agudos o de corto plazo	5
	2.1.3.2 Efectos a largo plazo	5
	2.1.4 Límites de arsénico establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS)	6
	2.1.5 Problemas causados por intoxicación con arsénico	7
	2.1.6 Prevención de la exposición y control de arsénico	8
	2.2 Generalidades del método de generador de hidruros	9
3	Marco teórico	11
	3.1 Espectroscopia de absorción atómica (EAA)	12
	3.1.1 Espectroscopia de absorción atómica en generador de hidruros (EAA-GH)	13
	3.1.2 Descripción y uso general del equipo empleado	13
	3.1.2.1 Sistema VGA 77 y bomba peristáltica	14
	3.1.2.2 Fuente de radiación	15
	3.1.2.3 Monocromador	16
	3.1.2.4 Detector	16
	3.1.3 Factores que afectan la determinación de arsénico con generador de hidruros	17
	3.1.3.1 Interferencias	17
	3.1.3.2 Contaminación	17
	3.1.4 Muestras analizadas	18
	3.2 Determinación de arsénico por la FEUM	19
	3.2.1 Descripción del método prueba límite de arsénico (Prueba MGA 0111)	19
	3.2.1.1 Preparación de la muestra	20
	3.2.1.2 Interferencias químicas	20
	3.2.1.3 Interpretación	20
	3.2.2 Muestras analizadas por la prueba MGA 0111	21
	3.2.2.1 Aditivos	21
	3.2.2.2 Fármacos	22
	3.2.2.3 Preparados farmacéuticos	23
4	Hipótesis	24
5	Objetivos	26
	5.1 Objetivo General	27
	5.2 Objetivos Específicos	27
6	Justificación	28
7	Desarrollo	30

7.1	Reactivos	31
7.2	Equipo	31
7.3	Material	32
7.4	Muestras problema	32
7.5	Metodología experimental	32
7.5.1	Estudio de la influencia de longitud de onda	32
7.5.2	Estudio de la influencia de concentración de ácido clorhídrico	33
7.5.3	Validación del sistema y método en GH	34
7.5.3.1	Validación del sistema GH	34
7.5.3.2	Validación del método con muestra variable en GH	35
7.5.3.3	Validación del método manteniendo la muestra constante en GH	36
7.5.4	Metodología digestión acida de la muestra	37
7.5.5	Modificaciones del tratamiento de la muestra	37
7.5.6	Metodología farmacopeica modificada (FEUM)	38
7.5.7	Propuesta de generador de hidruros(GH)	38
7.5.8	Medición en el EAA-GH	38
7.5.9	Procedimiento del método MGA 0111 Prueba Límite de Arsénico (FEUM)	39
7.5.9.1	Preparación solución de referencia	39
7.5.9.2	Método AII, compuestos orgánicos, preparación de las muestras	40
7.5.9.3	Procedimiento general.	41
7.5.9.4	Medición el espectrofotómetro ultravioleta-visible lambda 18	41
8	Resultados y análisis	42
8.1	Estudio de la influencia de longitud de onda	43
8.2	Estudio de la influencia de concentración de ácido clorhídrico	44
8.3	Evaluación de las condiciones óptimas	44
8.4	Digestión acida	46
8.5	Modificaciones del tratamiento de muestra	47
8.6	Método farmacopeico (FEUM) modificado	48
8.7	Propuesta de generador de hidruros (GH)	49
8.8	Validación del método AAGH-AA usando tabletas de cafeína- paracetamol	51
8.8.1	Precisión del sistema	51
8.8.2	Linealidad del sistema	52
8.8.3	Validación de los parámetros del método usando una muestra de cafeína-paracetamol	54
8.8.4	Exactitud y repetibilidad del método	55
8.8.5	Linealidad del método	56
8.8.5.1	Influencia del efecto de matriz	60
8.8.6	Precisión del método	62
8.8.7	Estabilidad analítica de la muestra	63
8.8.8	Límite detección	63
8.8.9	Límite de cuantificación	65
8.8.10	Robustez	67
8.8.11	Tolerancia	67
8.9	Método MGA 0111 de la FEUM	68
9	Conclusiones	73

10 Referencias	75
11 Anexos	79
Anexo 1	80
Anexo 2	81

1. INTRODUCCIÓN

“Quien oye la palabra *arsénico* sabe que se trata de un veneno, se ha vuelto célebre por los escritores de novelas, guionistas de cine y televisión narrando innumerables historias en las que este elemento puede matar sin dejar huella.” [1]

El arsénico es un elemento químico se encuentra en la naturaleza en el agua, suelos y el aire, diversas formas y compuestos, raramente se encuentra en estado sólido. Por su alta toxicidad se le asocia a la muerte, pero forma parte de la actividad biológica las plantas que crecen en suelos contaminados lo incorporan a su organismo, y a través de la ingesta de estas plantas contaminadas es introducido al metabolismo de los animales que las consumen. [2]

El presente trabajo tiene de finalidad desarrollar un método basado en espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros como alternativa instrumental a lo reportado en el método MGA 0111 prueba límite de arsénico, de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM undécima edición 2014) para la determinación de arsénico en aditivos, fármacos y preparados farmacéuticos.

Primeramente, se evaluaron las condiciones óptimas de análisis usando un estándar de arsénico, y posteriormente se demuestra su aplicación evaluando productos comerciales, fármacos que fueron fortificados con As, después se eligió una muestra “modelo” para evaluar los principales criterios establecidos para la validación de métodos analíticos y confirmar si la metodología planteada cumple con los criterios de aceptación.

A fin de comparar el método farmacopeico con el desarrollado, se realizó la determinación de arsénico en diferentes muestras de la industria farmacéutica (cafeína-paracetamol, sulfato ferroso y vitaminas) empleando ambas metodologías.

2. ANTECEDENTES

2.1 Propiedades del arsénico

“El arsénico es un elemento natural, ocupa el vigésimo lugar entre los elementos en abundancia en la corteza terrestre, ampliamente distribuido en todo el medio ambiente; está presente en el aire, el agua y la tierra. Es relativamente escaso. Sin embargo, forma 245 especies minerales distintas. Se encuentra en depósitos de sulfuro, presente como elemento o aleaciones nativas (cuatro minerales), arseniuros (27 minerales), sulfuros (13 minerales), sulfosales (sulfuros de arsénico con metales como Pb, Cu, Ag y Tl formando 65 minerales) y los productos de oxidación de los anteriores (dos óxidos, once arsenitos, 116 arseniatos y siete silicatos).” [3]

2.1.1 Arsénico en consumo de agua y alimentos

En las diferentes corrientes de agua reportan diferentes concentraciones de arsénico, las aguas termales muestran un alto contenido de arsénico, se han registrado hasta 0.7 ppm, las aguas subterráneas de áreas de actividad térmica son las más altas en contenido de arsénico. Las otras fuentes como son ríos y lagos, con valores altos de concentración de este elemento se debe a la contaminación industrial. La forma inorgánica de arsénico es toxica, se encuentra presente en altos niveles en las aguas subterráneas de diversos países, entre ellos Argentina, Brasil, Bangladesh, Chile, Hungría, China(Taiwán), la India, México, Tailandia y los Estados Unidos de América en los estados occidentales, donde se dan las principales fuentes de contaminación. Los problemas de salud ocurren cuando dicha agua se emplea al consumo humano, riego de cultivos y en la preparación de alimentos. [3-4]

Las plantas que son regadas con agua contaminada o suelos ricos en arsénico lo absorben en cierta cantidad dependiendo de cada especie, pero dicha planta es dañada cuando hay concentraciones toxicas. El arsénico está presente en todos los animales, los peces marinos contienen hasta 10 ppm; algunos moluscos y crustáceos concentraciones más altas. En Estados Unidos la Administración de Alimentos y medicamentos (FDA) aprueba el empleo la roxarsona (*ácido (4-hidroxi-3-nitrofenil)arsónico*), un compuesto organoarsénico promotor del crecimiento en aves de corral y cerdos. [3]

2.1.2 Procesos industriales con arsénico.

El arsénico de la naturaleza es extraído por la minería, en la industria es un subproducto de proceso de fundición (separación metal y la roca) de diversos minerales metálicos como el cobalto, níquel, oro, plomo y zinc. Se usa en los procesos de fabricación de vidrio, pigmentos, textiles, papel, adhesivos metálicos, pinturas, municiones, pirotecnia, en la fabricación de plaguicidas y productos farmacéuticos. [5-7]

2.1.3 Efectos del arsénico sobre salud

Las principales vías de entrada de arsénico al cuerpo son por ingesta y la inhalación. La absorción dérmica ocurre en menor cantidad. En el hígado el arsénico sufre una biometilación, se excreta en la orina, la mayor parte de los tejidos lo desecha, excepto la piel, el pelo y uñas, otra parte es absorbido en el tracto digestivo y respiratorio, posteriormente se distribuye en el torrente sanguíneo y se incorpora en los glóbulos blancos y rojos. La molécula se introduce en las células, provocando daños y la muerte por múltiples mecanismos, el principal interfiere en la respiración celular, la forma en que se encuentre determina su toxicidad, en general el arsénico inorgánico es más tóxico que el orgánico. Produciendo efectos a corto y largo plazo, dependiendo de la cantidad a la cual es expuesto un organismo. [7-8]

2.1.3.1 Efectos agudos o de corto plazo

Los efectos inmediatos de intoxicación aguda por arsénico incluyen fiebre, arritmia cardíaca, vómitos, dolor abdominal y diarrea. Seguidamente, aparecen otros efectos, como entumecimiento u hormigueo en las manos o los pies, calambres musculares, confusión mental, alucinaciones, convulsiones, coma y en casos extremos la muerte. [6]

2.1.3.2 Efectos a largo plazo

El contacto frecuente con arsénico tiene varios efectos en distintos órganos, se observan generalmente en la piel (hiperqueratosis, lesiones cutáneas, ulceraciones y cáncer de piel), pero igual es asociado en tumores de hígado, pulmón, próstata, riñón y vejiga. Puede provocar lesiones en mucosas y sistema nervioso, o alteraciones hematológicas, hepáticas, cardiovasculares, efectos carcinogénicos, teratogénicos y genéticos. [6-7]

La exposición prolongada al arsénico además de cáncer de piel también puede causar cáncer de vejiga y de pulmón, el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) ubicado en Francia, unidad que pertenece a la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha clasificado al arsénico y sus compuestos como cancerígenos para los seres humanos. [10]

Otros efectos perjudiciales para la salud que se pueden asociar en la ingesta prolongada de arsénico destacan: problemas relacionados con el crecimiento, neurotoxicidad, diabetes y enfermedades pulmonares y cardiovasculares. Los infartos de miocardio inducidos por el arsénico son una importante causa en el aumento de fallecimientos. En Taiwán provincia de China, el contacto con arsénico se ha vinculado que provoca una afección grave de los vasos sanguíneos que causa gangrena (enfermedad del pie negro), sin embargo, casos semejantes no se ha observado en otras partes del mundo; es posible que la malnutrición contribuya a su desarrollo. [10]

En otro estudio al arsénico también se le atribuyen desenlaces adversos del embarazo y mortalidad infantil. En casos comprobables tiene influencia negativa en el desarrollo cognitivo de los niños. [9]

2.1.4 Límites de arsénico establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS)

La OMS considera al arsénico entre las principales diez sustancias químicas que más amenazan la salud pública. Sus esfuerzos han sido reducir la exposición al arsénico, incluye el establecimiento de valores guía, el examen de los datos científicos disponibles y la formulación de recomendaciones para la gestión de los riesgos. También ha definido un valor guía para el arsénico en sus *Guías para la calidad del agua potable* cuya finalidad es servir en el mundo entero de base para las tareas de reglamentación y normalización. [10]

Por el momento, el límite recomendado para la concentración de arsénico en el agua potable es de 10 µg/l, un valor de referencia provisional dadas las dificultades de medición y las dificultades prácticas relacionadas con la eliminación del arsénico del agua potable. En algunos casos, los estados miembros pueden establecer límites más elevados teniendo en cuenta las circunstancias locales, los recursos disponibles y los riesgos asociados a fuentes con bajos niveles de arsénico contaminadas microbiológicamente. [10]

El Programa Conjunto OMS/UNICEF de Monitoreo del Abastecimiento de Agua y del Saneamiento sigue los progresos realizados en el agua potable, para lograr las metas mundiales. En el contexto de la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible se propone el acceso a la población de agua para el consumo sin contaminación fecal, ni contaminantes químicos prioritarios y entre ellos el arsénico. [10]

2.1.5. Problemas causados por intoxicación con arsénico.

En el mundo la contaminación por arsénico de las aguas subterráneas es un problema muy extendido que ha cobrado miles de vidas humanas. Los síntomas y signos asociados por exposición prolongada de arsénico inorgánico cambian según las personas, los grupos de población y las zonas geográficas. No existe pues una definición universal de las enfermedades causadas por el arsénico. Tampoco existe un método para distinguir los casos de cáncer causados por arsénico de los inducidos por otros factores, por lo que se carece de una estimación fiable de la magnitud del problema a nivel mundial. [10]

En México se ha detectado la presencia de arsénico en agua para consumo humano y los primeros antecedentes de contaminación datan de 1962, con 40 casos graves y un fallecimiento en Torreón, Coahuila. Además, los estados Durango, Zacatecas, Morelos, Aguascalientes, Chihuahua, Puebla, Nuevo León, Guanajuato, San Luis Potosí y Sonora alcanzaron concentraciones superiores a lo señalado por la NOM. 127-SSA1 (0.05 mg/L) y se estima que 500, 000 habitantes de comunidades rurales ingieren agua con concentración superior a dicho límite. [11-12]

Los primeros estudios en México iniciaron en la región Lagunera, entre los estados de Durango y Coahuila, en la zona se encontró envenenamiento crónico con arsénico de carácter endémico y brotes extremos que afectaron a humanos y animales. [12]

Las más altas concentraciones de arsénico se han encontrado en Zimapán, Hidalgo en un rango de 14 a 1000 ppb, a pesar de los estudios falta por evaluar una gran cantidad de pozos del territorio nacional. [13]

La mayor contaminación con arsénico de la historia ocurrió en Bangladesh. En los años noventa, se descubrió que el arsénico está presente en el agua de los pozos. Desde entonces, se han logrado notables progresos, y el número de personas expuestas al arsénico en niveles superiores a los permitidos por las normas nacionales de calidad del agua potable ha disminuido en alrededor de un 40%. Pese a estos esfuerzos, se estima que el número de personas con riesgo de exposición a concentraciones de arsénico superiores a la norma nacional de 50 µg/litro y al valor guía de la OMS de 10 µg/litro ronda en Bangladesh los 20 millones y los 45 millones de personas, respectivamente.” [14]

2.1.6. Prevención de la exposición y control de arsénico

En las comunidades afectadas consiste en prevenir que se prolongue la exposición al arsénico implantando un sistema seguro de abastecimiento de agua potable destinada al consumo, preparación de alimentos y al riego de los cultivos alimentarios. Existen diversas opciones para reducir los niveles de arsénico en el agua potable.

- Cambiar las fuentes de abastecimiento de agua con elevados niveles de arsénico, como aguas subterráneas, por fuentes de abastecimiento con bajos niveles de arsénico y microbiológicamente seguras, como el agua de lluvia o aguas superficiales debidamente tratadas.
- Otra opción es reservar el agua con bajos niveles de arsénico para beber, cocinar y regar plantas comestibles, para utilizar el agua de alta concentración para otros fines, por ejemplo, para bañarse o lavar la ropa.

- Detectar entre las fuentes de abastecimiento con altos niveles de arsénico y las fuentes con bajos niveles de arsénico, posteriormente pintar los pozos canalizados o las bombas de mano de diferentes colores.
- Mezclar agua con bajos niveles de arsénico con agua de concentración más elevada a fin de diluir y tener un agua con nivel de concentración aceptable.
- Implantar sistemas de eliminación del arsénico en agua, de manera centralizada o a nivel doméstico y someter el arsénico eliminado a un tratamiento de residuos adecuado. Algunas tecnologías que permiten eliminar el arsénico destacan la oxidación, la coagulación-precipitación, la absorción, el intercambio de iones y diversas técnicas de membranas. Hay un número creciente de opciones eficaces y baratas para eliminar el arsénico de los suministros pequeños y domésticos, aunque las pruebas sobre el uso eficaz de esos sistemas a largo plazo todavía son escasas.

Asimismo, intervenciones para reducir la exposición ocupacional asociada a diversos procesos industriales. [10]

La educación y la participación de la comunidad son factores fundamentales para asegurar un buen resultado. Es necesario que los miembros de cada comunidad comprendan los riesgos asociados a la exposición a altos niveles de arsénico y las fuentes conexas. También someter a las poblaciones de alto riesgo a un seguimiento continuo para detectar los signos tempranos de la intoxicación por arsénico, que suelen presentarse en forma de problemas dermatológicos. [10]

2.2 Generalidades del método de generador de hidruros.

Para detectar el arsénico se empleará el sistema de atomización por generador de hidruros (GH), método que funciona en concentraciones muy bajas como son ppb, sigue el mismo principio que las otras técnicas de absorción atómica, sólo varía la forma de atomizar los metales. En este caso, en lugar de aplicar calor se añade un reactivo a la muestra a temperatura ambiente que reacciona con los elementos y genera hidruros gaseosos del elemento. Estos hidruros se conducen a una celda de vidrio que puede calentarse para inducir la absorción del haz de luz que pasa a través.

- **Especificaciones del equipo, espectrofotómetro de absorción atómica, modelo SpectrAA-800.**

El arsénico de la muestra debe estar en forma inorgánica, la digestión será necesaria. Si la digestión es necesaria, se usa digestión ácida, para asegurar que no haya residuos, los oxidantes se seleccionan de acuerdo con el tipo de metal analizar debe evitarse el uso de ácidos muy oxidantes (por ejemplo, H_2SO_4 , HClO_4).

Se debe asegurar de que cualquier analito presente como As^{5+} se reduzca a As^{3+} por la acción de yoduro de potasio a una concentración de 1% p / v, la reducción tardará unos 50 minutos a temperatura ambiente. La reducción también se puede llevar a cabo a 70°C en aproximadamente cuatro minutos; sin embargo, debe enfriar las muestras y los estándares a la habitación antes del análisis dado que la tasa de bombeo puede variar con la temperatura de la solución, la bomba VGA 77 no funcionará correctamente con soluciones calientes. Si se omite la etapa de reducción y se retiene el analito como As^{5+} , la sensibilidad analítica es aproximadamente 20-30% de la obtenida para As^{3+} . Si la solución original contiene As^{3+} , la reducción por el yoduro de potasio es no requerida. Las condiciones siguientes se especifican en el manual del equipo. [15-16]

- Contenedor reductor: NaBH_4 0,6% p / v
- NaOH al 0,5% p / v
- Contenedor de ácido: HCl 5 a 10 M
- Preparar las muestras en al menos 1 M de ácido clorhídrico.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Espectroscopia de absorción atómica (EAA)

La *espectroscopia* es un término general para la ciencia que trata con las interacciones de varios tipos de radiación con la materia. Desde siempre, el interés se ha centrado en las interacciones entre la radiación electromagnética y la materia, pero ahora la espectroscopia se ha ampliado para incluir las interacciones entre la materia y otras formas de energía. Entre los ejemplos están las ondas acústicas y los haces de partículas como iones o electrones. La *espectrometría* y los *métodos espectrometricos* se refieren a la medición de la intensidad de la radiación con un transductor fotoeléctrico u otro tipo de dispositivo electrónico. [17]

Los elementos presentes en una muestra se convierten en átomos gaseosos o iones elementales mediante un proceso llamado atomización, se mide entonces la absorción del ultravioleta-visible, la emisión o la fluorescencia de las especies atómicas presentes en el vapor. En un medio gaseoso caliente, los átomos son capaces de absorber radiación de longitudes de onda características que dan lugar a las transiciones electrónicas de un nivel inferior a estados excitados superiores.

La determinación espectroscópica de especies atómicas sólo puede efectuarse en medio gaseoso, por lo que el primer paso es la atomización proceso por el cual la muestra se volatiliza. Existen varios métodos de atomización, este proceso determina la precisión y la exactitud de los métodos atómicos, los más comunes se expresan en la tabla 1.

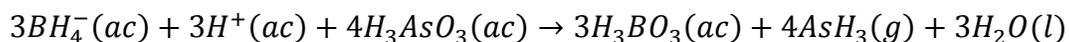
Tabla1.Tipos de atomizador más utilizados.

Tipo de atomizador	Temperatura de atomización típica, ° C
Llama	1700-3150
Evaporación electrotérmica	1200-3000
Plasma de argón de corriente directa	4000-3000
Plasma de argón inducido por microondas	2000-3000
Plasma de descarga luminiscente	No térmico
Arco eléctrico	4000-5000
Chispa eléctrica	más de 4000

3.1.1 Espectroscopia de absorción atómica con generador de hidruros (EAA-GH)

Las técnicas de generación de hidruros representan un método para introducir como un gas muestras que contienen arsénico, antimonio, estaño, selenio, bismuto y plomo en un atomizador. Tal procedimiento incrementa los límites de detección para estos elementos por un factor de 10 a 100. Debido a que varias de estas especies son muy tóxicas, es muy importante determinarlas en niveles de concentración bajos. Esta toxicidad dicta también que los gases de la atomización deben ser eliminados de modo seguro y eficiente.

Los hidruros volátiles se generan al añadir una solución acuosa acidificada de la muestra a un pequeño volumen de una disolución acuosa al 1% de borohidruro de sodio contenida en un recipiente de vidrio. Una reacción característica es



El hidruro volátil —en este caso, arsina (AsH_3)— se barre hacia la cámara de atomización mediante un gas inerte (nitrógeno). La cámara es por lo regular un tubo de sílice calentado a varios cientos de grados en un horno de tubo o en una flama donde tiene lugar la descomposición del hidruro, lo que da lugar a la formación de átomos del analito. La concentración del analito se mide entonces por absorción o emisión. La señal tiene una forma de pico similar a la que se obtiene con la atomización electrotérmica. [18]

3.1.2 Descripción y uso general del equipo empleado.

El instrumento utilizado para medir la absorbancia de átomos libre se le conoce como espectrofotómetro de absorción atómica. Este equipo consta de las siguientes unidades fundamentales, fuente de radiación, atomizador, monocromador, detector y registrador. [19]



Figura 1. Fotografía del espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros, modelo SpectrAA-800, Varian, Australia 1995 utilizado.

3.1.2.1 Sistema VGA 77 y bomba peristáltica

La bomba peristáltica mantiene un flujo constante de soluciones en el accesorio VGA 77 (figura 2), en dicho accesorio se genera de vapor. El capilar de muestra está en la solución a medir y el VGA 77 bombea la muestra a través de una bobina de reacción donde se acidifica automáticamente y es mezclado con un reductor adecuado en este caso yoduro de potasio (KI). El vapor resultante se transfiere a una celda de atomización la cual consta de una flama de aire-acetileno, por acción de un gas de arrastre nitrógeno para la determinación por el espectrómetro de absorción atómica.

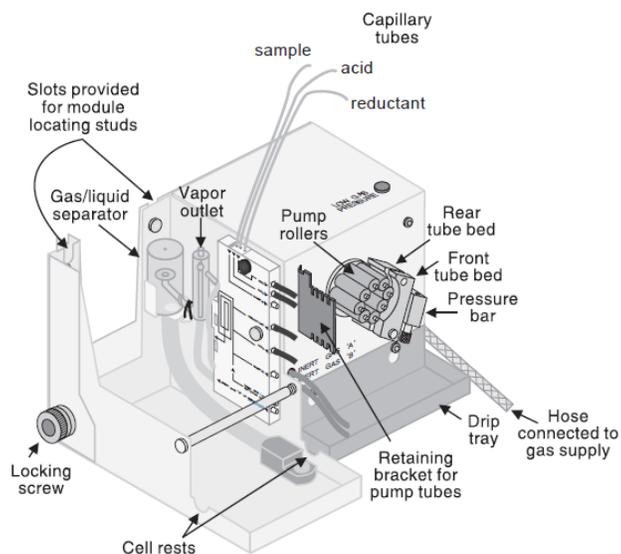


Figura 2. Esquema del generador de hidruros (VGA 77). [29]

Para una mejor visualización de lo que ocurre en el módulo VGA 77, se presenta un esquema (Figura 3) donde inicia con la introducción de las soluciones muestra, ácido y reductor, por la presión de la bomba peristáltica que son conducidos a la celda de reacción, posteriormente arrastrados por un gas argón o nitrógeno, se da la separación de gas-liquido, el gas es el hidruro volátil de interés de análisis, el cual sigue siendo conducido por el gas hasta llegar a la celda de atomización en el espectrofotómetro, para su detección y el líquido es conducido al drenaje el frasco contenedor de residuos.

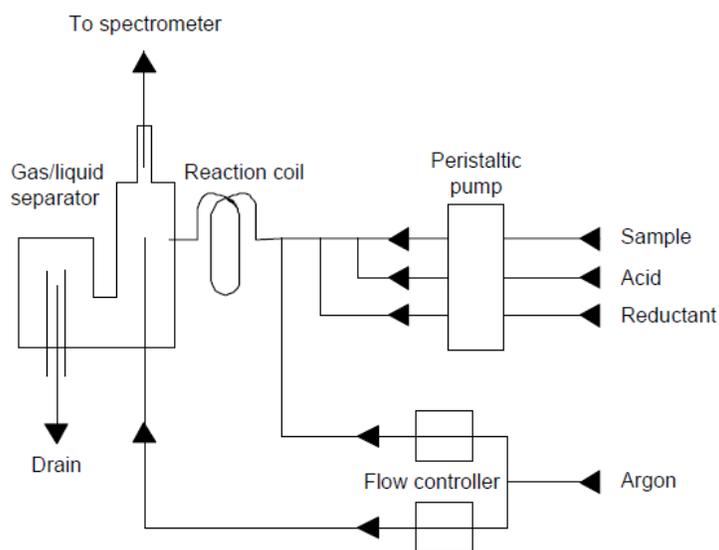


Figura 3. Esquema detallado del VGA 77. [29]

3.1.2.2 Fuente de radiación

La espectroscopia analítica se utilizan dos tipos de fuentes de radiación: continua y de línea. En fuentes de radiación continua por ejemplo las lámparas de tungsteno, deuterio y el arco de xenón, y como fuentes de línea las lámparas de cátodo hueco, lámparas de descarga sin electrodos, vapor de sodio y láser.

Las lámparas de cátodo hueco son más utilizadas ya que son específicas para cada elemento, requieren poco mantenimiento, son estables, simples, durables y relativamente económicas.

La lámpara de cátodo hueco consiste en un ánodo de wolframio y un cátodo cilíndrico cerrado herméticamente en un tubo de vidrio lleno con neón o argón a una presión de 1 a 5 torr.

Cuando se aplica un potencial del orden de 300 V entre los electrodos se produce la ionización del gas inerte, lo que da lugar a una corriente de aproximadamente 5 a 15 mA al tiempo que los iones y electrones migran hacia los electrodos produciendo la ionización del gas (Figura 4).

Las lámparas de metales volátiles tales como el arsénico, selenio y mercurio, duran menos que otras de metales no volátiles. [20-21]

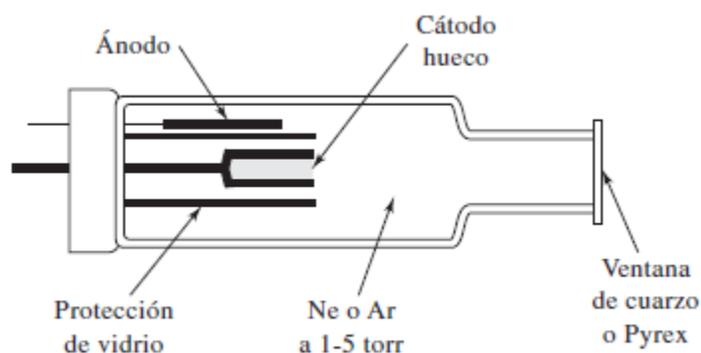


Figura 4. Sección transversal de una lámpara de cátodo hueco. [22]

3.1.2.3 Monocromador

Está diseñado para realizar barridos espectrales proporcionando una mejor separación de las longitudes de onda para un mismo tamaño del elemento, también se utiliza para aislar las líneas deseadas de otras líneas de emisión y deduce notablemente el flujo total de luz que llega al detector.

3.1.2.4 Detector

Es un dispositivo mecánico, eléctrico o químico que identifica, registra o indica un cambio e alguna de las variables de su entorno, tal como la presión, temperatura, la carga eléctrica, la radiación electromagnética o nuclear, las partículas o las moléculas. Su función es convertir la radiación en una señal medible. La señal eléctrica es entonces amplificada y usada para dar una medida cuantitativa de absorción. El detector recibe 3 tipos de señal luminosa: señal de la lámpara de cátodo hueco, de la flama y obscura. [22]

3.1.3 Factores que afectan la determinación de arsénico en generador de hidruros

3.1.3.1 Interferencias

Los principales metales que afectan la determinación de As son Au, Ge, Ni, Pt, Pd, Rh y Ru en un 50 % de la señal, y al igual también tener especial cuidado con Ag, Bi, Co Cu, Sb, Se, Sn y Te que disminuyen del 50 al 10 % la señal (tabla 2) y otros con menor disminución apenas del 10 %.

Tabla 2. Porcentaje de pérdida de señal sobre analito debido a interferencias de otros elementos. [29]

Analyte	>50%	10–50%	10%
As	Au, Ge, Ni, Pt, Pd, Rh, Ru	Ag, Bi, Co, Cu, Sb, Se, Sn, Te	Al, B, Ba, Be, Ca, Cd, Cr, Cs, Fe, Ga, Hf, Hg, In, Ir, K, La, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Rb, Re, Si, Sr, Ti, Tl, V, W, Y, Zn, Zr
Bi	Ag, Au, Co, Cu, Ni, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Te	As, Cd, Cr, Fe, Ge, Ir, Mo, Sb, Sn	Al, B, Ba, Be, Ca, Cs, Ga, Hf, Hg, In, K, La, Li, Mg, Mn, Na, Pb, Rb, Re, Si, Sr, Ti, Tl, V, W, Y, Zn, Zr
Ge	As, Au, Cd, Co, Fe, Ni, Pd, Pt, Rh, Ru, Sb, Se, Sn	Bi, Cu, Ir, Te	Ag, Al, B, Ba, Be, Ca, Cr, Cs, Ga, Hf, Hg, In, K, La, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Rb, Re, Si, Sr, Ti, Tl, V, W, Y, Zn, Zr
Sb	Au, Co, Ge, Ni, Pt, Pd, Rh, Ru	As, As, Cr, Cu, Re, Se, Sn	Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Cs, Fe, Be, Ga, Hf, Hg, In, Ir, K, La, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Pb, Rb, Si, Sr, Te, Ti, Tl, V, W, Y, Zn, Zr
Se	Ag, Cu, Ni, Pd, Pt, Rh, Ru, Sn	Au, As, Cd, Co, Fe, Ge, Pb, Sb, Zn	Al, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cr, Cs, Ga, Hf, Hg, In, Ir, K, La, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Rb, Re, Si, Sr, (Te), Ti, Tl, V, W, Y, Zr
Te	Ag, Au, Cd, Co, Cu, Fe, Ge, In, Ni, Pb, Pd, Pt, Re, Rh, Ru, Se, Sn	As, Bi, Ir, Mo, Sb, Si, W	Al, B, Ba, Be, Ca, Cr, Cs, Ga, Hf, Hg, K, La, Li, Mg, Mn, Na, Rb, Sr, Ti, V, Y, Zn, Zr

3.1.3.2 Contaminación

Al establecer por primera vez el método analítico, se debe verificar la contaminación antes de llevar a cabo el programa, que las celdas y contenedores no estén sucios y de ser necesario realizar un enjuague con HCl del contenedor y de todos los capilares, posteriormente enjuague con agua.

3.1.4 Muestras analizadas

Para el cumplimiento de algunos de los parámetros establecidos en la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México se seleccionará una muestra de las diferentes analizadas.

La muestra de subsalicilato de bismuto (figura 5) se seleccionó debido a la dificultad del análisis por la presencia en gran cantidad de Bismuto y la parte orgánica que dificulta su medición en el equipo de absorción atómica con generador de hidruros donde las muestras deben de estar en soluciones libres de residuos orgánicos que pueden causar que se obstruyan los capilares. La cantidad alta de iones de bismuto en las digestiones ácidas forma un precipitado de bismuto metálico al entrar en contacto con el reductor, además de tener un máximo de 10 ppm como límite de arsénico por la FEUM undécima edición.

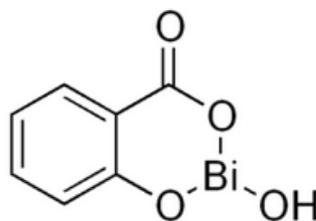


Figura 5. Estructura química del subsalicilato de bismuto.

Así también se seleccionaron las muestras de paracetamol- cafeína (figura 6), al igual con un máximo de 3 ppm permitidas por la FEUM undécima edición y ser compuestos con gran cantidad de materia orgánica y otros.

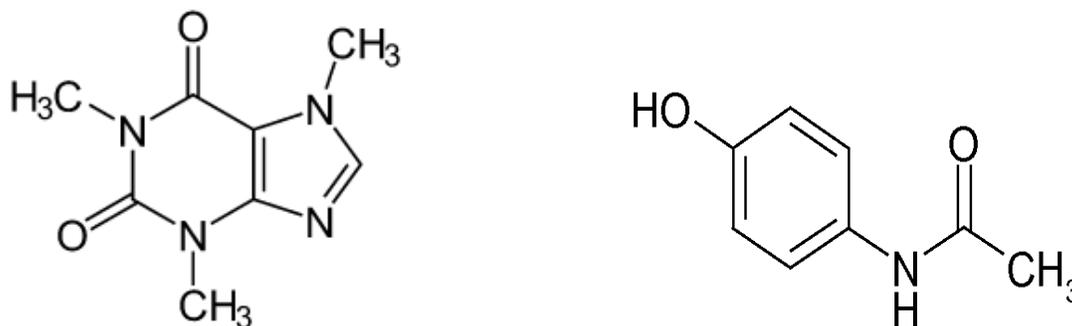


Figura 6. Izquierda cafeína(1,3,7-trimetil-1*H*-purina-2,6(3*H*,7*H*)-diona) y en la derecha el paracetamol (*N*-(4-hidroxifenil)etanamida)

3.2 Determinación de arsénico por la FEUM undécima edición

La siguiente descripción es del método establecido para la terminación de arsénico, por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) que es el documento expedido por la Secretaría de Salud que consigna los métodos generales de análisis y los requisitos sobre identidad, pureza y calidad de los fármacos, aditivos, medicamentos, productos biológicos y biotecnológicos y en su undécima edición. Dichos métodos analíticos oficiales tienen el objetivo de ayudar a los laboratorios de calidad a cumplir con las normativas vigentes.

3.2.1 Descripción del método prueba límite de arsénico (Prueba MGA 0111)

Actualmente la FEUM undécima edición emplea el método MGA 0111 como prueba límite de arsénico. Esta prueba se basa en la secuencia de dos reacciones químicas cuantitativas llevadas a cabo bajo condiciones establecidas, a partir del arsénico contenido en un producto dado. En la primera reacción el arsénico se reduce por la acción de zinc y en presencia de hidrogeno genera la arsina, la segunda reacción cuando la arsina formada reacciona con un compuesto de dietilditiocarbamato de plata, formándose un compuesto colorido, el cual es valorado por espectrofotometría UV-Vis. Hay dos métodos de cuantificación el método I para materiales inorgánicos y el método II para materiales orgánicos.

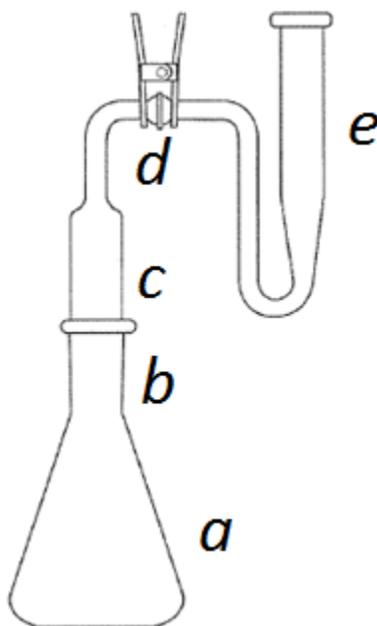


Figura 7. Montaje del aparato utilizado para la determinación de arsénico. [14]

Los componentes son **a** es matraz donde se genera la arsina, **b** y **d** son juntas esmeriladas para efectos de ensamble hermético, y **c** es la unidad depuradora y **e** un tubo de absorción (ver figura 7).

3.2.1.1 Preparación de la muestra.

Si la cantidad de muestra no se especifica en la monografía correspondiente, se calcula con la siguiente fórmula:

$$G = \frac{3.0}{L}$$

Donde:

G =Cantidad de muestra necesaria en gramos

L = Límite de arsénico en partes por millón (ppm)

3.2.1.2 Interferencias químicas.

El cromo, cobalto, cobre, mercurio, molibdeno, níquel, paladio, plata y las sales de cada uno de ellos pueden interferir en la formación de arsina. El antimonio que forma estibina produce una interferencia positiva en el desarrollo del color con el reactivo de dietilditiocarbamato de plata, cuando se sospecha de la presencia de antimonio en las muestras, el complejo de color rojo de la segunda reacción puede ser comparado con un espectrofotómetro o colorímetro a 535 y 540 nm, puesto que a esta longitud de onda la estibina es despreciable.

3.2.1.3 Interpretación

La absorbancia de la solución colorida de la muestra no es mayor a la obtenida con la solución de la referencia, entonces el arsénico no es mayor al límite indicado en la monografía del producto analizado.

3.2.2 Muestras analizadas por la prueba MGA 0111

3.2.2.1 Aditivo

Un aditivo es toda sustancia que se incluye en la formulación de los medicamentos y que actúa como vehículo, conservador o modificador de algunas de sus características para favorecer su eficacia, seguridad, estabilidad, apariencia o aceptabilidad, aunque por sí mismo carezca de efecto terapéutico. En algunas formulaciones son los responsables de hacer llegar el fármaco a su sitio de acción de manera adecuada jugando un papel importante en la biodisponibilidad, así como de la estabilidad del medicamento. [23]

Tabla 3. Aditivos analizados por el método MGA 0111 de la FEUM undécima edición.

Número	Nombre de aditivo	Límite máximo (ppm)
1	Ácido alginico	3
2	Dihidroxiestearato de aluminio	4
3	Bentonita	5
4	Bentonita purificada	3
5	Carbonato de magnesio	4
6	Carragenina	3
7	Citrato ácido	3
8	Dióxido de silicio	3
9	Dióxido de silicio coloidal	8
10	Dióxido de titanio	1
11	Fosfato de amonio	3
12	Fosfato dibásico de calcio	3
13	Fosfato dibásico de sodio	8
14	Fosfato monobásico de calcio	2
15	Fosfato monobásico de sodio	8
16	Fosfato tribásico de calcio	3
17	fructosa	1
18	Goma guar	3
19	Goma xantana	3
20	Lecitina	3
21	Manitol	1
22	Metacrilato de amonio, copolímero	2
23	Óxido de zinc	5
24	Silicato de magnesio y aluminio	3
25	Sulfato de sodio	2
26	Trisilicato de magnesio	8
27	Estearato de zinc	1.5

3.2.2.2 Fármacos

"Fármaco es toda sustancia natural sintética o biotecnológica que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presenta en forma farmacéutica y que reúne condiciones para su empleo como ingrediente de un medicamento". [23]

Tabla 4. Fármacos analizados por el método MGA 0111 de la FEUM undécima edición

Número	Nombre de fármaco	Límite máximo (ppm)
1	Acetato de magnésico	3
2	Hidróxido de aluminio (gel)	10
3	Hidróxido de aluminio (gel seco)	8
4	Clorhidrato de arginina	1.5
5	Benzonato	1.5
6	Bicarbonato de sodio	2
7	<i>Subsalicilato de bismuto</i>	10
8	Bitartrato de potasio	2
9	<i>Cafeína</i>	3
10	Carbonato de calcio	3
11	Carbonato de litio	8
12	Acetato de clormadinona	2
13	Cloruro de sodio	1
14	Clorhidrato de difenidol	1
15	Clorhidrato de doxopram	5
16	Fumarato ferroso	3
17	<i>Sulfato ferroso</i>	3
18	K ₂ HPO ₄	3
19	KH ₂ PO ₄	3
20	H ₃ PO ₄	3
21	Glutamato de calcio	3
23	Hidróxido de calcio	3
24	Hidróxido de magnesio	3
25	Hidróxido de potasio	4
26	Leucina	2
28	Cloruro de metiltioninio	8
29	Metionina	1.5
30	Peptina	3
31	Prolina	1.5
32	Protionamida	2
33	Sucralfato	4
34	Sulfato de magnesio,anhidro	3
35	Sulfato de magnesio, heptahidratado	3
36	Citrato de tamoxifeno	2
37	Sulfato de zinc	14

3.2.2.3 Preparados farmacéuticos

“Las especialidades farmacéuticas o preparados farmacéuticos, además de fármaco(s) pueden llevar sustancias adicionadas o aditivos, tales como colorantes, saborizantes, conservadores, diluyentes, bases, desintegrantes, reguladores, etc., para dar mayor estabilidad, elegancia, aceptación, facilitar su preparación o uso, etc., siempre y cuando no esté específicamente limitado en la monografía correspondiente o en cualquier otro capítulo de la FEUM undécima edición.” [23]

Tabla 5. Preparados farmacéuticos analizados por el MGA 0111 de la FEUM.

Número	Nombre del preparado farmacéutico	Límite máximo (ppm)
1	Hidróxido de aluminio y magnesio	0.6
2	Citrato de sodio y fosfato de sodio	2
3	Solución Hartmann	0.08
4	Hierro dextran	2
5	Hidróxido de magnesio	0.6

4. HIPÓTESIS

El método MGA 0111 prueba límite de arsénico se encuentra reportado por la FEUM undécima edición para cuantificar el arsénico presente como impurezas en formulaciones farmacéuticas, por tanto, es posible implementar la metodología analítica por espectroscopia de absorción atómica con generador de hidruros como método alternativo.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Optimizar el método analítico para cuantificar arsénico por la técnica de espectroscopia de absorción atómica con generador de hidruros a fin de proponer un procedimiento alternativo al reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11ª edición.

5.2 Objetivos particulares

- Realizar el estudio sobre los factores que influyen en la determinación de arsénico (concentraciones adecuadas de estándares para el intervalo lineal y interferencias de otros metales), por medio de la técnica de espectroscopia de absorción atómica con generador de hidruros. (AAGH).
- Optimizar las condiciones de trabajo del espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros (voltaje de la lámpara, flujos de soluciones y concentración de ácido clorhídrico) y tratamiento de la muestra problema.
- Evaluar los parámetros estadísticos asociados con la curva de calibración usando los lineamientos mínimos establecidos.
- Demostrar la aplicación del método a la evaluación de fármacos que deben ser analizados mediante el método farmacopeico MGA 0111 (prueba límite de arsénico).
- Comparar los resultados del método alternativo con el farmacopeico empleando una muestra modelo.

6. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo de un procedimiento analítico óptimo para la determinación de arsénico utilizando espectroscopia de absorción atómica con generador de hidruros se justifica con la finalidad de mejorar los resultados de la prueba límite de arsénico del método MGA 0111 de la FEUM undécima edición, ya que estos métodos son rápidos, de alta selectividad y presenta varias ventajas.

- El procedimiento planteado en general es más rápido y más fácil de realizar en comparación con el MGA 0111.
- Empleando esta técnica es factible tanto realizar la prueba límite de arsénico, como la cuantificación del arsénico en la muestra.
- Al ser un método alternativo los laboratorios farmacéuticos podrán optar por esta metodología para cumplir con las normas oficiales vigentes relacionadas con el límite permitido de arsénico.
- Se puede medir arsénico en concentraciones de nivel traza ($\mu\text{g} / \text{L}$) en varias muestras a la vez con una sola curva de calibración.
- En ambos métodos las dificultades son: la presencia de otros metales que evitan la formación de la arsina, por lo que se desarrolló una metodología que contrarreste esta desventaja.
- Se emplearán volúmenes más pequeños, y menos sustancias o reactivos, con tiempos de reacción menores.
- Inmediatamente después de la medición de la curva de calibración se analizan las muestras y se obtiene la concentración, sin necesidad de realizar el método espectrofotométrico UV-Vis, lo que significa un ahorro de tiempo.
- El método desarrollado deberá demostrar que satisface los requisitos establecidos en *la guía de validación de métodos analíticos* del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México para su aplicación analítica; esto se comprueba cumpliendo los parámetros estadísticos relacionados con la validación. [24]

7. DESARROLLO

7.1 Reactivos

Tabla 6. Lista de reactivos, pureza y marca respectivos.

Nombre del reactivo	% Pureza	Marca del reactivo
Yoduro de potasio (KI)	99.9	J.T. Baker
Hidróxido de sodio (NaOH)	98.5	J.T. Baker
Borohidruro de sodio	99	SIGMA-ALDRICH®
Ácido clorhídrico	37.8	J.T. Baker
Ácido nítrico	65.2	J.T. Baker
Hidróxido de calcio	97.8	J.T. Baker
Ácido sulfúrico	98.2	J.T. Baker
Acetato de plomo	103.3	J.T. Baker
Zinc granular	20 mallas	R1-Z01
Trióxido de arsénico	R1-T04	R1-T04
Peróxido de hidrogeno	32	J.T. Baker
Estándar de arsénico	1000± 3 µg/mL	HIGH-PURITY

7.2 Equipo

- Espectrofotómetro de absorción atómica, modelo SpectrAA-800, marca Varian Australia 1995
- Espectrofotómetro de absorción atómica, modelo SpectrAA-100/200, marca Varian Australia 1995
- Generador de hidruros (VGA 77. Varian Australia)
- Espectrofotómetro ultravioleta-visible lambda 18, marca Perkin Elmer.
- Mufla, THERMOLYNE, TYPE 1500 Furnace.
- Parrilla de agitación, THERMOLYNE, MIRAK
- Balanza analítica, Boeco, Alemania.

7.3 Material

Tabla 7. Material de laboratorio utilizado durante el desarrollo del trabajo.

Material	Marca
Pipetas volumétricas 0.5,1,2,3,4,5,6,7,10 mL	KIMAX
Matraces volumétricos 10,20,25,50,100, 500 mL	KIMAX
Probeta graduada de 10 mL	KIMAX
Celdas de cuarzo de 2 mL de paso óptico	Perkin Elmer
Tripie	Crisol
Mortero y pistilo	Crisol
5 equipos para determinar arsénico	Pyrex
Termómetro	Brannan
Embudo de vidrio	Pyrex
Vidrio de reloj	Pyrex

7.4 Muestras problema

Tabla 8. Muestras empleadas como modelo para la aplicabilidad del método.

Muestra	Presentación	Lote	Marca
Materia prima subsalicilato de bismuto	Polvo color blanco	30211-SSM5	FarmaQuímica S.A. de C.V
Paracetamol-Cafeína (500-50 mg)	tabletas	9C010	Química y farmacia S.A de C.V
Sulfato ferroso	Tabletas	111164	Laboratorios Valdecasas, S.A
Vitaminas	Tabletas	L79717	Pfizer,S.A de C.V.

7.5 Metodología experimental

7.5.1 Estudio de la influencia de longitud de onda.

1. Preparar una solución stock de 0.1 ppm de arsénico (As) a partir de un estándar de 1000 ppm: medir 1 mL del estándar y aforar a 100 mL con HNO₃ 2 % v/v (*solución A*); tomar 1 mL de la solución A y aforar a 100 mL con HCl 5 M (*solución B*); 0.1 ppm As.
2. Preparar una solución stock de 0.2 ppm de arsénico (As) a partir de un estándar de 1000 ppm: medir 1 mL del estándar y aforar a 100 mL con HNO₃ 2 % v/v (*solución A1*); tomar 1 mL de la solución A y aforar a 50 mL con HCl 5 M (*solución B2*); 0.2 ppm As.

- Preparar una solución de yoduro de potasio (KI) al 1% p/v: pesar 0.5 g de yoduro de potasio y aforar a 50 mL con agua desionizada.
- Preparar 500 mL de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 5 M: tomar 202 mL de HCl concentrado y aforar a 500 mL con agua desionizada.
- Preparar borohidruro de sodio, NaBH₄ (50 mL): pesar 0.25 g de NaOH y disolver en 30 mL de agua desionizada; en la solución anterior disolver 0.3 g de NaBH₄ y aforar a 50 mL con agua desionizada.
- Preparar las curvas de calibración como se indica en la tabla 9 y tabla 10, esperar 1 hora antes de la medición para que se lleve a cabo la reacción completa de reducción.

Tabla 9. Sistemas para la curva de calibración (Detección 197.2 nm)

Sistema	Vol. (mL) KI 1% p/V	Vol (mL) As 0.1 ppm.	Concentración As (ppb)	Aforo (mL) con HCl 5 M
1	1	2	8	25
2	1	3	12	25
3	1	4	16	25
4	1	5	20	25
5	1	6	24	25

Tabla 10. Sistemas para la curva de calibración (Detección 193.7 nm)

Sistema	Vol. (mL) KI 1% p/V	Vol (mL) As 0.2 ppm.	Concentración As (ppb)	Aforo (mL) con HCl 5 M
1	1	1	8	25
2	1	1	10	20
3	1	2	16	25
4	1	2	20	20
5	1	3	24	25

7.5.2 Estudio de la influencia de concentración de ácido clorhídrico.

- Preparar 100 mL varias soluciones a concentraciones diferentes de ácido clorhídrico de 3, 4, 5, 6 y 9 molar.
- Preparar una solución stock de 0.1 ppm de arsénico (As) a partir de un estándar de 1000 ppm: medir 1 mL del estándar y aforar a 100 mL con HNO₃ 2 % v/v

(*solución A*); tomar 1 mL de la solución A y aforar a 100 mL con HCl 5 M (*solución B*); 0.1 ppm As.

3. Preparar una solución de yoduro de potasio (KI) al 1 % p/v: pesar 0.5 g de yoduro de potasio y aforar a 50 mL con agua desionizada.
4. Preparar los sistemas de la tabla 11, esperar una hora antes de la medición para que se lleve a cabo la reacción completa de reducción.

Tabla 11. Estudio de la influencia del ácido clorhídrico.

Sistema	Vol. (mL) KI 1% p/V	Vol (mL) As 0.1 ppm.	Concentración As (ppb)	Aforo a 25 mL con HCl
1	1	4	16	3 M
2	1	4	16	4 M
3	1	4	16	5 M
4	1	4	16	6 M
5	1	4	16	9 M

7.5.3 Validación del sistema y método en GH.

7.5.3.1 Validación del sistema GH.

1. Preparar una solución stock de 0.1 ppm de arsénico (As) a partir de un estándar de 1000 ppm: medir 1 mL del estándar y aforar a 100 mL con HNO₃ 2 % v/v (*solución A*); tomar 1 mL de la solución A y aforar a 100 mL con HCl 5 M (*solución B*); 0.1 ppm As.
2. Preparar una solución de yoduro de potasio (KI) al 1% p/v: pesar 0.5 g de yoduro de potasio y aforar a 50 mL con agua desionizada.
3. Preparar 500 mL de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 5 M: tomar 202 mL de HCl concentrado y aforar a 500 mL con agua desionizada.
4. Preparar borohidruro de sodio, NaBH₄ (50 mL): pesar 0.25 g de NaOH y disolver en 30 mL de agua desionizada; en la solución anterior disolver 0.3 g de NaBH₄ y aforar a 50 mL con agua desionizada.
5. Preparar la curva de calibración como se indica en la tabla 12. Una vez preparada la curva de calibración, esperar una hora antes de la medición para que se lleve a cabo la reacción completa de reducción.

Tabla 12. Sistemas para la curva de calibración.

Sistema	Vol. (mL) KI 1% p/V	Vol (mL) As 0.1 ppm.	Concentración As (ppb)	Aforo (mL) con HCl 5 M
1	1	2	8	25
2	1	3	12	25
3	1	4	16	25
4	1	5	20	25
5	1	6	24	25
6	1	7	28	25

7.5.3.2 Validación del método con muestra variable en GH.

1. Preparar una solución de yoduro de potasio (KI) al 1% p/v: pesar 0.5 g de yoduro de potasio y aforar a 50 mL con agua desionizada.
2. Preparar 500 mL de una solución de ácido clorhídrico (HCl) 5 M: tomar 202 mL de HCl concentrado y aforar a 500 mL con agua desionizada.
3. Preparar borohidruro de sodio, NaBH₄ (50 mL): pesar 0.25 g de NaOH y disolver en 30 mL de agua desionizada; en la solución anterior disolver 0.3 g de NaBH₄ y aforar a 50 mL con agua desionizada.
4. Pesar 0.3 gramos de muestra.
5. Adicionar 15 mL de HCl 0.075 M a la muestra del paso 6 y un mililitro de una solución de As de 10 ppm y agitar 15 minutos a 500 rpm.
6. Filtrar con papel filtro de poro medio y se lavó con agua desionizada.
7. El filtrado se afora con ácido clorhídrico 5 M a 25 mL (*Stock m1*).
8. De la solución stock m1, tomar 7 mL y aforar a 25 mL nuevamente con ácido clorhídrico 5 M (*Stock m2*).
9. Preparar la curva de calibración como se indica en la tabla 13. Una vez preparada la curva de calibración, esperar una hora antes de la medición para que se lleve a cabo la reacción completa de reducción.

Tabla 13. Sistemas para la curva de calibración de linealidad del método cantidad de muestra variable.

Sistema	Vol. (mL) KI 1% p/V	Vol (mL) As 0.112 ppm.	Concentración As (ppb)	Aforo (mL) con HCl 5 M
1	1	1	4.48	25
2	1	2	8.96	25
3	1	3	13.44	25
4	1	4	17.92	25
5	1	5	22.40	25
6	1	6	26.88	25

7.5.3.3 Validación del método manteniendo la muestra constante en GH

1. Pesar 0.3 g de muestra cafeína-paracetamol por sextuplicado, nombrar del 1 al 6 los sistemas.
2. Adicionar 1,2,3,4,5,6 mL de As 10 ppm dependiendo del número que le corresponde al sistema y 15 mL de HCl 0.075 M.
3. Agitar por 20 minutos a 500 rpm.
4. Filtrar y aforar a 25 mL cada sistema con HCl 5 M (*Stock mc1*).
5. Tomar 7 mL de cada sistema del stock mc1 y aforar nuevamente a 25 mL con HCl 5 M. (*Stock mc2*)
6. Preparar los sistemas de la curva de calibración de la tabla 14.

Tabla 14. Sistemas para la curva de calibración de linealidad del método cantidad de muestra constante.

Sistema	Vol. (mL) KI 1% p/V	Vol (mL) Stock mc2.	Concentración As (ppb)	Aforo (mL) con HCl 5 M
1	1	1	4.48	25
2	1	1	8.96	25
3	1	1	13.44	25
4	1	1	17.92	25
5	1	1	22.40	25
6	1	1	26.88	25

7.5.4 Metodología digestión acida de la muestra

7. Pesar 0.3 g de subsalicilato de bismuto.
8. Adicionar 5 mL de ácido nítrico. (Para el recobro adicionar 1 mL de una solución de As a 10 ppm)
9. Agitar a 500 rpm y calentar sin llegar a la ebullición por 1 hora
10. Filtrar la solución del filtrado aforar a 25 mL con HCl 5 M.
11. De la solución anterior se preparar un sistema tomando 1 mL, 1 mL yoduro de potasio y aforar a 25 mL con HCl 5 M.
12. Esperar una hora para la reducción de As^{5+} a As^{3+}
13. Medir en el espectrofotómetro de AA-GH.

7.5.5 Modificaciones del tratamiento de muestra.

1. Pesar 0.3 g de subsalicilato de bismuto, (repetir 10 veces este paso.)
2. Preparar los siguientes sistemas de la tabla 15, en las pesadas anteriores y adicionar el volumen correspondiente.
3. Agitar a 500 rpm y a temperatura ambiente por 15 minutos.
4. Filtrar, la solución del filtrado aforar a 25 mL con HCl 5 M.
5. De las soluciones anteriores preparar los 10 sistemas tomando 1 mL de cada una, 1 mL yoduro de potasio y aforar nuevamente a 25 mL con HCl 5 M.
6. Esperar una hora para la reducción de As^{5+} a As^{3+}
7. Medir en el espectrofotómetro de AA-GH.

Tabla 15. Sistemas propuestos para el tratamiento de muestra.

Sistema	Solución de digestión	Volumen (mL)
1	Ácido clorhídrico 5 M	10
2	Ácido clorhídrico 1 M	10
3	Ácido clorhídrico 0.1 M	10
4	Ácido clorhídrico 0.1 M	10
5	Ácido clorhídrico 0.08 M	10
6	Ácido clorhídrico 0.08 M	10
7	Hidróxido de sodio 0.1 M	10
8	Hidróxido de sodio 0.1 M	10
9	Ácido nítrico 2% v/v	10
10	Ácido nítrico 2% v/v	10

7.5.6 Metodología farmacopeica modificada (FEUM)

1. Pesar 0.3 g de subsalicilato de bismuto.
2. Adicionar 0.3 g de hidróxido de calcio. (Para el recobro adicionar 1 mL de una solución de As a 10 ppm)
3. Calcinar a 490 °C por 2 horas.
4. Al residuo de la ignición adicionar 15 mL de HCl 0.075 M y agitar a 500 rpm 15 minutos.
5. Filtrar la solución y aforar a 25 mL con HCl 5 M.
6. De la solución anterior tomar 1 mL, también 1 mL yoduro de potasio y aforar a 25 mL con HCl 5 M.
7. Esperar una hora para la reducción de As^{5+} a As^{3+}

7.5.7 Propuesta de generador de hidruros (GH)

1. Pesar 0.3 g de muestra.
2. Adicionar 15 mL de HCl 0.075 M (en el recobro adicionar 1 mL de la solución de As a 10 ppm) y agitar 15 minutos a 500 rpm.
3. Filtrar con papel filtro de poro medio y se lavó con agua desionizada.
4. El filtrado se afora con ácido clorhídrico 5 M a 25 mL (*stock 1*).
5. Preparar un sistema con 1 mL de la solución anterior, se adiciono 1 mL de yoduro de potasio y aforo nuevamente a 25 mL con HCl 5 M.
6. Preparar una hora antes de la medición para permitir la reducción completa de As.

7.5.8 Medición en el EAA-GH

1. Encender el equipo de absorción atómica y dejar calentar la lámpara por 30 minutos antes de medir.
2. Optimizar el voltaje de la lámpara, debajo de 550 volts.
3. Ajustar los flujos de las soluciones: 8 mL/min para muestra, 1 mL/min para la línea de ácido clorhídrico 5 M y agente reductor NaBH_4 .
4. Calibrar a cero el equipo con ácido clorhídrico 5 M.
5. Medir en el equipo.

7.5.9 Procedimiento del MGA 0111 Prueba Límite de Arsénico (FEUM)

7.5.9.1. Preparación solución de referencia.

1. Pesar 132 mg de trióxido de arsénico, pulverizado y secado a 105 ° C durante 1 hora.
2. Transferir a un matraz de un litro.
3. Disolver en 5 mL de hidróxido de sodio 1:5 m/v, se neutralizo con ácido sulfúrico 2 N y se agregó 10 mL más de ácido sulfúrico 2 N.
4. Aforar con agua recientemente hervida y fría.
5. Transferir 10 mL de la solución anterior a un matraz de un litro y agregar 10 mL de ácido sulfúrico 2 N y aforar, con agua hervida y fría.
6. Cada mililitro contiene 1µg de arsénico. (*Solución concentrada de referencia*)
7. En dos matraces, en el primero se tomaron 3 mL de la solución concentrada de referencia (*referencia 1 As 48 ppb*) y por segundo se mide 1 mL de la solución concentrada (*referencia 2, As 16 ppb*), en ambos matraces se adiciono 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, se agregó igual peróxido de hidrogeno 30 %, hasta la formación de humos fuertes y se deja enfriar.
8. Adicionar 10 mL de agua y calentar de nuevo para el desprendimiento de los residuos de peróxido de hidrogeno.
9. Enfriar y diluir con agua a 35 mL.

7.5.9.2. Método AII, compuestos orgánicos, preparación de las muestras.

1. Pesar las siguientes cantidades de muestra (ver tabla 16).

Tabla 16. Muestras orgánicas analizadas por el método MGA 0111.

Sistema	Muestra	Cantidad(gramos)
1	Cafeína 1	1
2	Cafeína 2	0.3
3	Subsalicilato de bismuto.	0.3

2. Para la muestra de *subsalicilato de bismuto*, adicionar 0.3 g de hidróxido de calcio.
3. Calcinar a 490 °C por 2 horas
4. Disolver el residuo de la ignición con 5 mL de ácido clorhídrico 3 molar y aforar a 35 mL, continuar con el procedimiento general
5. Para la muestra de *cafeína 1*, agregar 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, perlas de ebullición y calentar en la campana no más de 110 ° C, hasta la carbonización y de ser necesario agregar más ácido sulfúrico.
6. Continuar hasta el inicio la descomposición se agrega peróxido de hidrogeno 30 %.
7. Continuar la digestión hasta desprendimiento de vapores de trióxido de azufre y la solución sea incolora o presente un color amarillo.
8. Enfriar, y agregar 10 mL de agua y calentar nuevamente para eliminar las trazas de peróxido de hidrogeno.
9. Enfriar y lavar con 10 mL de agua, aforar a 35 mL y continuar con el procedimiento general.
10. En la muestra de *cafeína 2*, adicionar 15 mL de HCl 0.075 M y agitar 15 minutos a 500 rpm.
11. Filtrar e igualar a 35 mL con agua desionizada.

7.5.9.3. Procedimiento general.

1. En los 5 matraces (referencias y muestras) por separado, agregar 20 mL de ácido sulfúrico 7 N, 2 mL de yoduro de potasio, 0,5 mL de cloruro estanoso concentrado ácido, 1 mL de 2-propanol.
2. Esperar 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Colocar algodón en la unidad depuradora impregnado con acetato de plomo.
4. Pesar en 5 vasos diferentes, 3 gramos de zinc granular (malla No.20).
5. Conectar las juntas, previamente lubricadas.
6. Colocar por separado en cada tubo de absorción, 3 mL de dietilditiocarbamato de plata en piridina.
7. Adicionar el zinc 3 gramos en cada matraz y conectar inmediatamente la unidad depuradora.
8. Esperar 45 minutos para la formación de hidrogeno y su paso por el sistema, manteniendo una temperatura de 25 ° C, y esperar el desarrollo del color, agitar en intervalos de 10 minuto.
9. Desconectar la unidad depuradora del matraz, y transferir en frascos las soluciones coloridas del tubo de absorción de las referencias y muestras.

7.5.9.4. Medición el espectrofotómetro ultravioleta-visible lambda 18

1. Prender equipo y dejar calentar 20 minutos para su correcto funcionamiento.
2. Calibrar el equipo, usando celdas de 2 cm de paso óptico.
3. Realizar la medición del espectro de absorción de 280 a 700 nm.
4. Guardar los datos en formatos de texto y ASC II.

8. RESULTADOS Y ANÁLISIS

8.1 Estudio de influencia de la longitud de onda

Después de varios experimentos, trabajando a la longitud de onda más sensible (193.7nm) sin poder obtener un ajuste lineal, se decidió evaluar otra longitud de onda, 197.2 nm. Se observa que la primera longitud es más sensible, dado que los resultados de absorbancia son más altos comparados con los obtenidos a 197.2 nm; sin embargo, a la longitud de 193.7 nm los datos se ajustan más a una ecuación polinómica de orden 2, dado que los residuales no son homocedásticos muestran una tendencia o comportamiento anómalo, entonces no se puede aplicar el método de mínimos cuadrados, por otro lado, los resultados con la longitud de 197.2 nm (absorbancia en función de la concentración de arsénico) se ajustan adecuadamente a una ecuación lineal, esto por la homocedasticidad de sus residuales que aparecen esparcidos en el eje x sin tendencias, por lo que se usa 197.2 nm como la longitud óptima para determinar As, la figura 8 muestra el comportamiento de ambas longitudes.

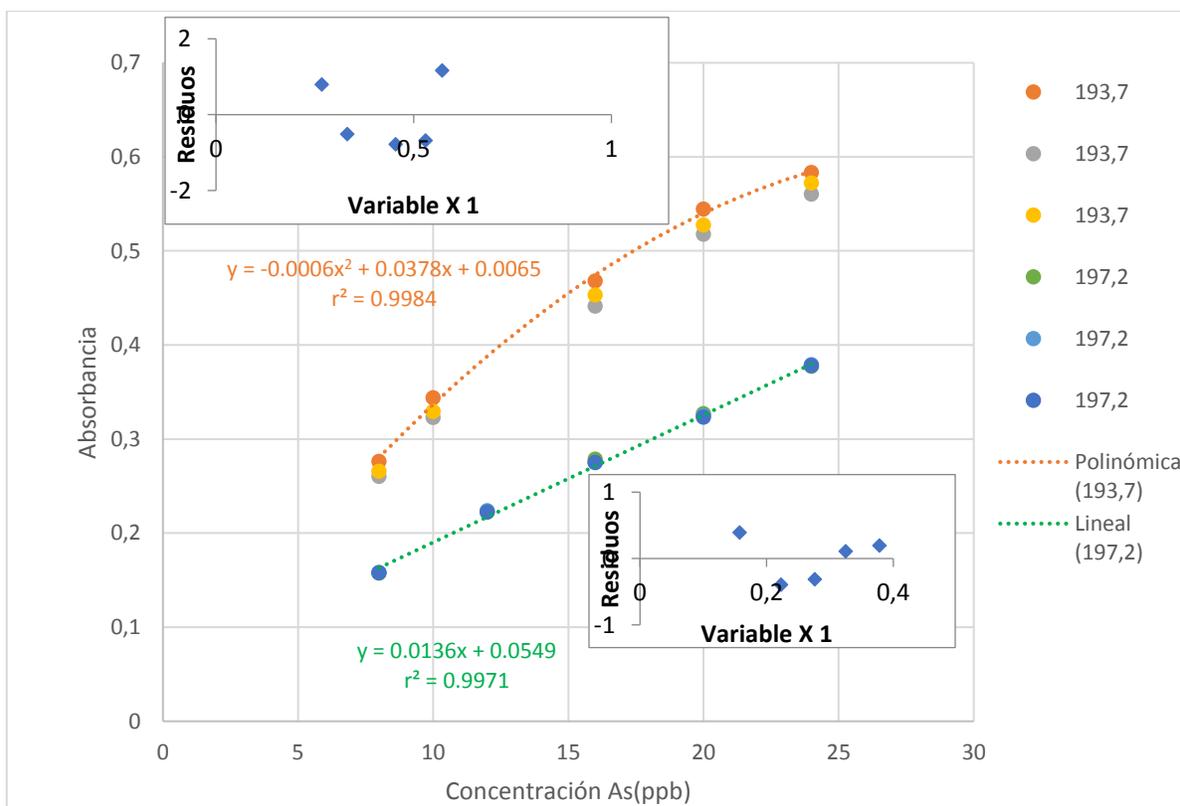


Figura 8. Gráficas de las curvas de calibración medidas a dos longitudes de onda.

8.2 Estudio de la influencia de concentración de ácido clorhídrico

Siendo que el ácido clorhídrico tiene la función de dar las condiciones ácidas para la generación del hidruro volátil, se evaluó la influencia de la concentración del ácido clorhídrico en la señal. Se prepararon cinco sistemas a la misma concentración de As (16 ppb) y se varió la concentración de HCl, de 3 - 9 M. Como se observa en la figura 9, al incrementarse la concentración (hasta 5 M) la absorbancia presenta una tendencia a aumentar, pero a partir de dicha concentración, la absorbancia se mantiene constante aún a concentraciones mayores de HCl, por lo que se decide usar la concentración de 5 M; una concentración mayor ocasiona mayor corrosión al equipo, además de generar residuos más agresivos.

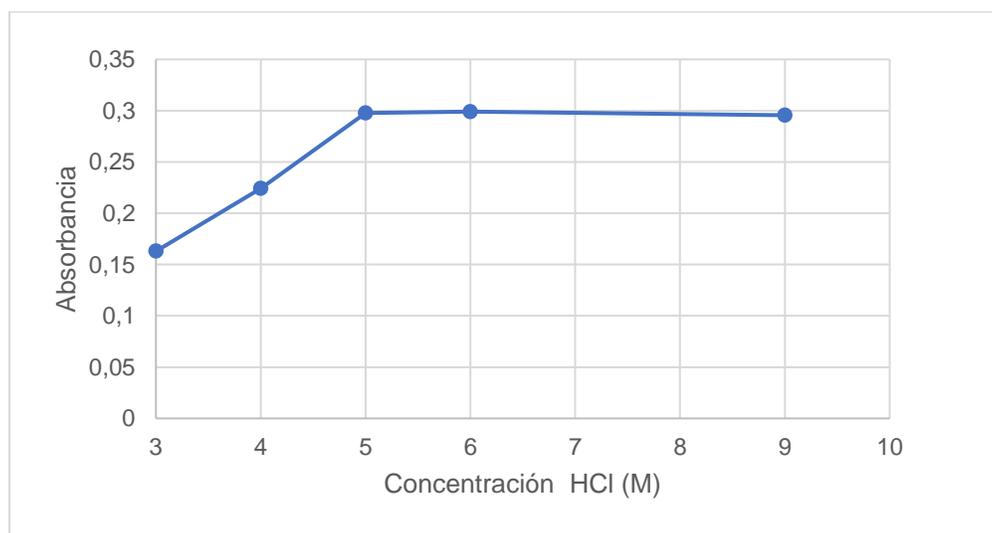


Figura 9. Gráfica de influencia de la concentración del HCl (As 16ppb)

8.3 Evaluación de las condiciones óptimas.

Se realizaron en tres días diferentes, curvas de calibración similares, las cuales se ajustan a una línea recta, con un coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.98, y también cumplen con el análisis estadístico de los residuales; por tanto, las condiciones empleadas dichas condiciones se consideran adecuadas para llevar a cabo la determinación y cuantificación de arsénico (figura 10).

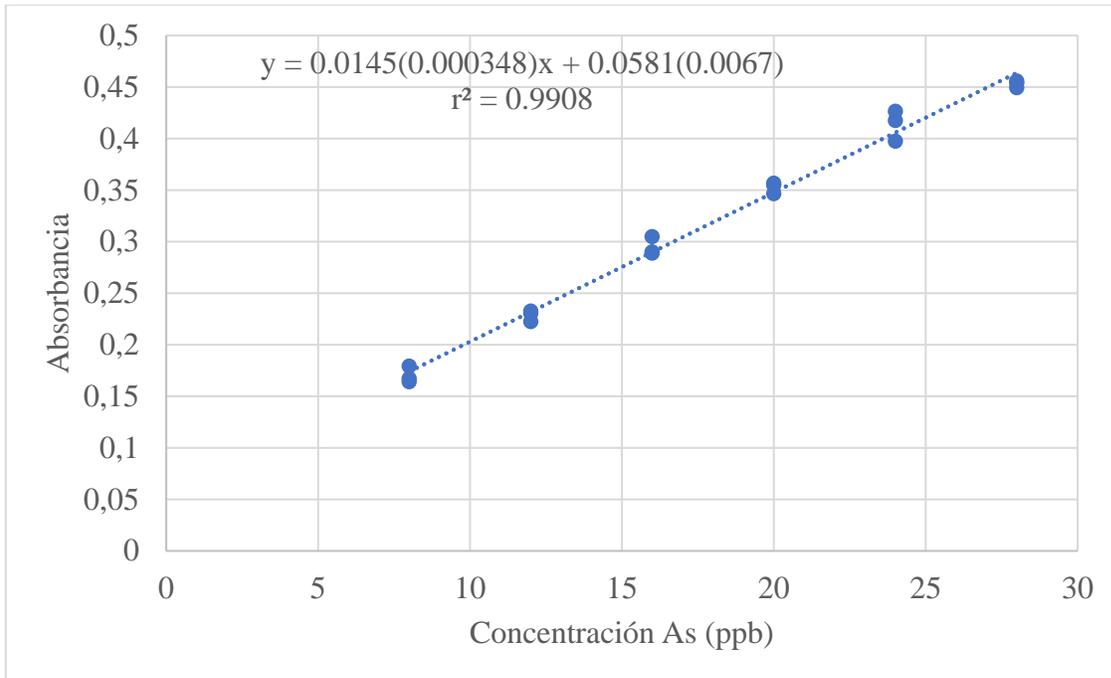


Figura 10. Curvas de calibración obtenidas a las condiciones óptimas.

El análisis ANOVA simple evaluando la influencia del factor día, se observa en la figura 11 de caja y bigotes, las cajas se pueden sobreponer en los tres días y por tanto se puede decir que si hay ajuste entre los días, ya que el valor-P es de 0.9841, mayor que de 0.05 no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias y desviación estándar en los tres días, con un nivel de confianza del 95% (ver el análisis completo en anexo 1).

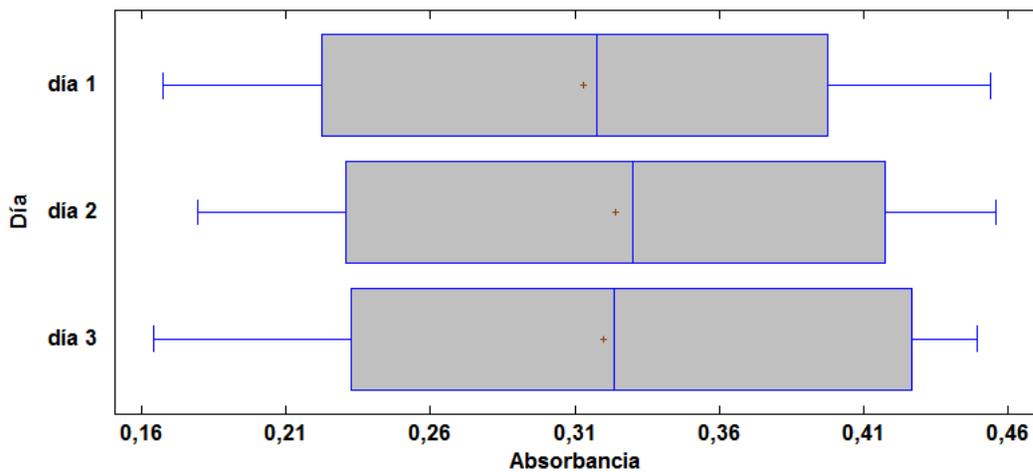


Figura 11. Grafico caja y bigotes evaluando el factor día.

Las condiciones óptimas seleccionadas para la determinación de arsénico son:

- Longitud de onda de 197.2 nm.
- Emplear HCl 5 M en la preparación de los sistemas y en la calibración del equipo.
- Flujo de soluciones: 6 a 8 mL por muestra, 1 mL para reductor y 1 mL para ácido.
- 1 hora mínimo de espera para llevar a cabo la reducción completa de As^{5+} a As^{3+} por la reacción con el yoduro de potasio.
- 30 minutos (al menos) de calentamiento de la lámpara.
- Mantener un voltaje menor a 550 volts

8.4 Digestión acida

A fin de evaluar la factibilidad del método para ser propuesto a la FEUM, se selecciona la materia prima de subsalicilato de bismuto, ya que esta molécula contiene una parte inorgánica y una orgánica, el bismuto en grandes cantidades causa interferencias en la detección de arsénico (ver tabla 2) disminuyendo la señal hasta en un 50 % y dada la falta de solubilidad del bismuto a elevadas concentraciones, complicando su tratamiento.

Obteniéndose un recobro muy bajo de 1 ppb de las 16 ppb agregadas al sistema, además la muestra está constituida por bismuto en más del 50 %, los iones en la solución del bismuto reaccionan con el reductor formándose un sólido negro que precipita justo en la celda de reacción, obstruyendo la línea de drenaje del equipo VGA 77 (ver figura 12).



Figura 12. Fotografía sólido negro formado al momento de agregar el reductor.

Por tal motivo se analizó químicamente el origen del problema, usando la diferencia de potenciales que existe entre el reductor BO_2^-/BH_3^- que es de -1.241, el bismuto BiH_3/Bi^0 de -0.97 y para el arsénico de AsH_3/As^0 de -0.225, se demuestra que la reacción que ocurre es la reducción BiH_3 a Bi^0 por la acción del borohidruro de sodio, y eso demuestra que el sólido negro formado es bismuto metálico (Reacción de Nylander) y por tanto al estar en exceso el bismuto todo el reductor es consumido en dicha reducción y no se forma la arsina el hidruro de nuestro interés.[25]

Se propuso un método para aislar el bismuto de la solución, consistió primeramente la digestión acida para liberar los iones de bismuto en la muestra, posteriormente se agregó hidróxido de sodio para poder formar un hidróxido de bismuto, es un sólido de color naranja a rojo, y después de la formación se separa por filtración a vacío, y con la solución se continua con el procedimiento descrito, pero nuevamente se obtuvieron recobros de 1 ppb, se plantea que igual el As forma algún complejo con el bismuto y se pierde en la filtración, para descartar que la precipitación y la digestión se realizó un experimento usando el estándar de arsénico, donde se obtuvieron recobros cercanos al 90 % dicho esto es la muestra lo que casusa la pérdida del As adicionado, este procedimiento de aislar el bismuto y sus resultados no son considerados, se continua con la búsqueda de un procedimiento ideal.

8.5 Modificaciones del tratamiento de muestra

Se continuó con un procedimiento usando dos ácidos clorhídrico y nítrico, también se probó una base hidróxido de sodio, en diferentes concentraciones y como se observó en la tabla 17. El análisis de ANOVA para analizar la influencia de la digestión y la concentración, se tiene un valor-P de 0.0043 menor al 0.05 por lo que hay una diferencia estadísticamente significativa entre la manera de tratar la muestra y la concentración. Por los valores más altos en la absorbancia y concentración (ver tabla 17) se seleccionó HCl a 0.08 M.

Tabla 17. Resultados del primer tratamiento (muestra fortificada con 16 ppb de arsénico).

Sistema	Medio de digestión	Absorbancia	As (ppb) experimental
1	Ácido clorhídrico 5 M	0.0422	2.31
2	Ácido clorhídrico 1 M	0.0814	4.43
3	Ácido clorhídrico 0.1 M	0.1001	5.47
4	Ácido clorhídrico 0.1 M	0.1028	5.62
5	Ácido clorhídrico 0.08 M	0.1220	6.92
6	Ácido clorhídrico 0.08 M	0.1226	6.96
7	Hidróxido de sodio 0.1 M	0.0386	2.09
8	Hidróxido de sodio 0.1 M	0.0029	0.16
9	Ácido nítrico 2 % v/v	0.0176	0.95
10	Ácido nítrico 2 % v/v	0.0257	1.12

8.6 Método farmacopeico (FEUM) modificado

También se probó el procedimiento de la FEUM modificando la última parte, con un ácido diluido 0.08 M.

Se aprecia en la tabla 18 que la recuperación es baja, 5% de la cantidad adicionada. Esto se debe a que una vez que se adiciona el carbonato de calcio al sistema, como es una base la solución aumenta su pH, y nuestro método funciona solo en medio ácido, esto trae como consecuencia los bajos recobros experimentales.

Tabla 18. Resultados del método (FEUM) modificado.

Sistema	As (ppb) teórica	Absorbancia	As (ppb) experimental
1	16	0.0196	0.89
2	16	0.0233	1.06
3	16	0.0227	1.03
4	16	0.0258	1.17

En la tabla 19 se muestran los resultados del tratamiento de muestras de subsalicilato de bismuto fortificadas con arsénico a 16 ppb, comparando los dos procedimientos el de la FEUM modificado y el de generador de hidruros.

Tabla 19. Resultados obtenidos de muestras de subsalicilato de bismuto.

Tratamiento	GH1	GH2	GH3	FeuM1	FeuM2
Conc. As (ppb)	6.28	6.07	7.58	1.06	1.17
% Recobro	39.25	37.93	47.37	6.62	7.71

Con la modificación del procedimiento farmacopeico la recuperación de Arsénico fue del 7.16% en promedio. Realizando nuestra propuesta de tratamiento por generador de hidruros, la recuperación fue de 41.52 %, en promedio, la cual, aunque se considera baja, es mejor que la anterior. El análisis de ANOVA comparando ambos métodos muestra una diferencia estadísticamente significativa ya que el valor-P fue de 0.0029 es menor de 0.05 para un nivel de confianza del 95 %.

8.7 Propuesta de generador de hidruros (GH)

Se probó esta metodología usando diferentes muestras y usando el subsalicilato de bismuto por ser una muestra bastante complicada para determinar por generador de hidruros como se ha visto. En tabla 20 se muestra un porcentaje del 65% de recobro, con la disminución de la concentración del ácido clorhídrico hasta 0,075 M. Se probó ácido clorhídrico 0,05 M y agua, pero se obtienen resultados de recobro menores. Evaluando otro tipo de muestras como tabletas de cafeína/paracetamol y sulfato ferroso, se obtienen en promedio porcentajes de recobro del 88.5 % y 89.1% respectivamente, en el caso de un fármaco multivitamínico 77.6 % de recobro.

Tabla 20. Resultados obtenidos de varias muestras.

Muestra	Absorbancia	% recobro
Cafeína- paracetamol (tabletas)	0.2731	90.99
	0.2597	86.06
Subsalicilato de bismuto (materia prima)	0.1953	62.38
	0.1979	63.34
Sulfato ferroso (tabletas)	0.2596	86.02
	0.2772	92.50
Vitaminas (Tabletas)	0.2386	78.30
	0.2351	77.02

El análisis de ANOVA considerando los porcentajes de recobro para las cuatro matrices muestra una diferencia significativa por un valor-P de 0.0024 menor al 0.05, con un 95 % de confianza. El bismuto es un elemento causante de altas interferencias en la detección de arsénico por generador de hidruros (GH) es alto el porcentaje de recobro, se descartó esa muestra y en un nuevo análisis de ANOVA con las restantes tres muestras Cafeína-paracetamol, sulfato ferroso y vitaminas, se obtuvo un valor-P de 0.0686 el cual es mayor de 0.05 por lo que ahora ya no existe una diferencia estadística significativa para un nivel de confianza del 95 %.

La metodología propuesta para determinar arsénico por generador de hidruros (GH) es aplicable perfectamente a matrices de fármacos que no tengan elementos causantes de interferencias en la respuesta analítica, pero da resultados aceptables con un porcentaje de recobro mayor al 50 % como es el caso del subsalicilato de bismuto.

Por dichos resultados, se decide utilizar tabletas de cafeína/paracetamol como muestra modelo para validar los parámetros estadísticos correspondientes al método ya que de las cuatro analizadas es la que menos contiene elementos causantes de interferencias (ver tabla 2).

8.8 Validación del método AAGH-AA usando tabletas de caféina- paracetamol

Usando las condiciones óptimas obtenidas se procedió a realizar la validación del sistema obteniendo, los siguientes resultados con respecto al sistema y el método.

8.8.1 Precisión del sistema

Para la precisión del sistema se usó un estándar de 1000 ppm de arsénico, y se obtienen los resultados de la tabla 21, los valores corresponden a seis diferentes curvas de calibración en el intervalo de concentración de 8 a 28 ppb de arsénico.

Tabla 21. Resultados de seis curvas de calibración a seis niveles de concentración.

Sistemas	As (ppb)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
1	8	0.1524	0.151	0.1512	0.1497	0.1504	0.1515
2	12	0.2223	0.2233	0.2223	0.2208	0.2229	0.2188
3	16	0.2791	0.2815	0.2795	0.2796	0.2779	0.2782
4	20	0.3460	0.3446	0.3448	0.3427	0.3432	0.3415
5	24	0.4029	0.4026	0.4058	0.3976	0.3999	0.3993
6	28	0.4481	0.4468	0.4487	0.4393	0.4403	0.4362

Para el cumplimiento de la precisión del sistema, se selecciona la concentración de 16 ppb de arsénico ya que corresponde a la concentración intermedia de la curva de calibración y también al 100% de la muestra preparada por dilución para su medición (tabla 22).

Tabla 22. Sextuplicado a una concentración de 16 ppb de arsénico

Sistema	Absorbancia
1	0.2791
2	0.2815
3	0.2795
4	0.2796
5	0.2779
6	0.2782

Usando los resultados de la tabla 22, se calcula la desviación estándar (0,0012) y el coeficiente de variación (0.4579 %).

El criterio de aceptación por la guía de validación de métodos analíticos [24] en específico al método físico-químico es mantener un coeficiente de variación menor o igual a 1.5 % ($CV \leq 1.5\%$), por lo tanto, si se cumple y se acepta que el sistema es preciso. ($0.4579 \leq 1.5\%$).

8.8.2 Linealidad del sistema

Para la linealidad del sistema se usaron las seis curvas de calibración en el intervalo de 8 a 28 ppb de arsénico que se muestran en la tabla 21. Todos los sistemas se prepararon por dilución como se describe en la parte experimental.

La figura 13 muestra la distribución de las seis curvas de calibración descritas en la tabla 21, para realizar el análisis de linealidad, obteniéndose un coeficiente de determinación (r^2) de 0.995 mayor a 0.98, por lo tanto, se cumple ese criterio de aceptación.

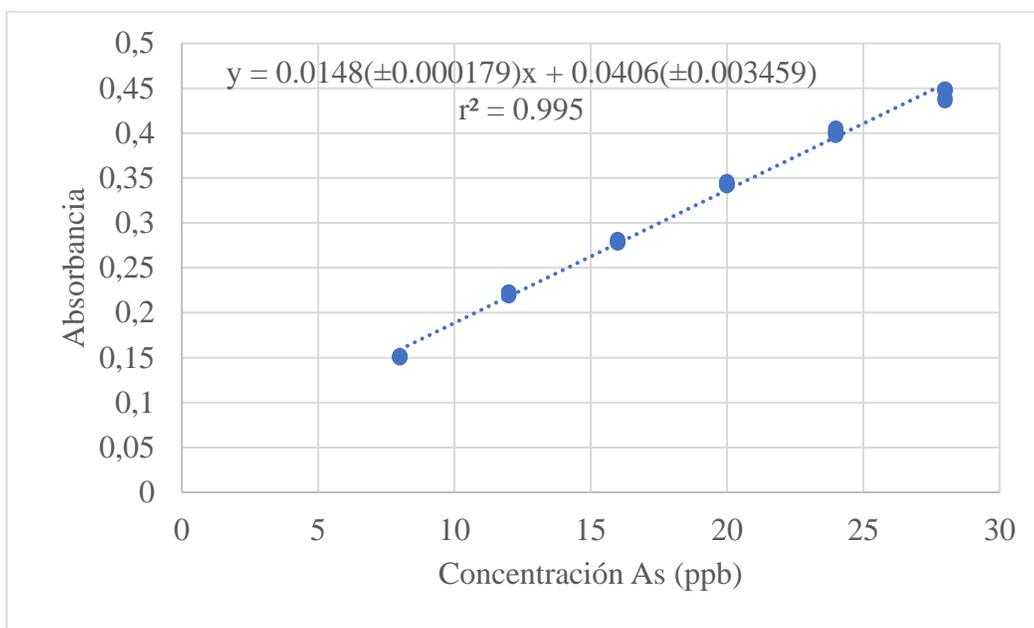


Figura 13. Gráfica de las curvas de calibración para linealidad del sistema.

Los residuales del sistema se muestran en la figura 14, presentan homocedasticidad, ya que los datos se esparcen esparcidos a lo largo del eje x sin ninguna tendencia, siendo otra característica que determina que el sistema es lineal. [26]

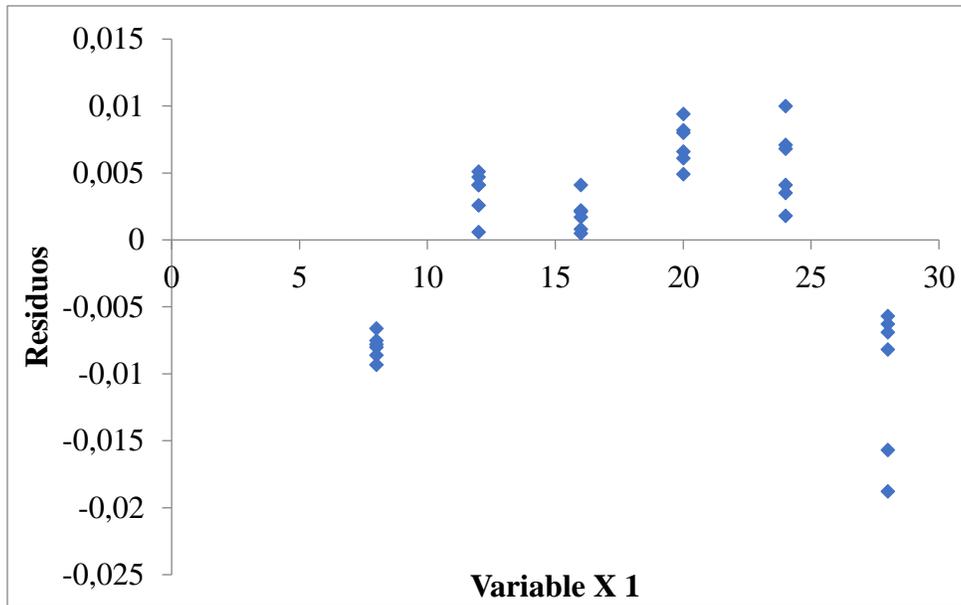


Figura 14. Gráfica de Residuales.

Se observa en la figura 14 que los residuales del sistema del sistema 6 a 28 ppb, están más dispersos, y se contrasta en la figura 13 donde están alejados de la línea de tendencia de linealidad, se decide omitir dichos valores y solo usar de 8 ppb hasta 24 ppb el intervalo de linealidad del sistema, como se muestra en la figura 15, obteniéndose un coeficiente de determinación (r^2) de 0.998 mayor a 0.98, el cual cumple el criterio de aceptación.

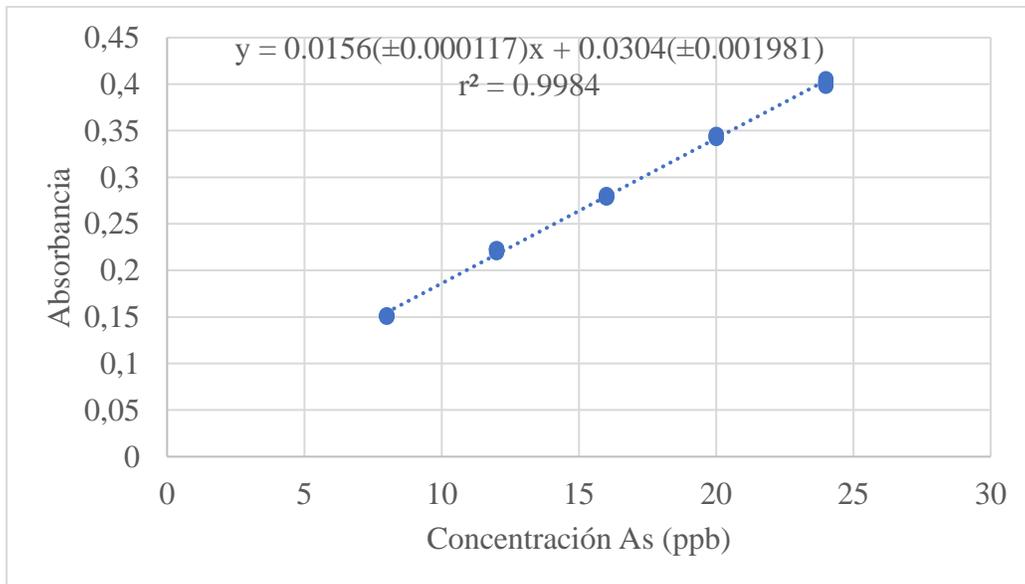


Figura 15. Gráfica de aceptación de linealidad del sistema

Los residuales del sistema mostrados en la figura 16, presentan mejor homocedasticidad, ya que los datos se esparcen esparcidos a lo largo del eje x y en forma aleatoria, sin ninguna tendencia, determina que el sistema es lineal. [26]

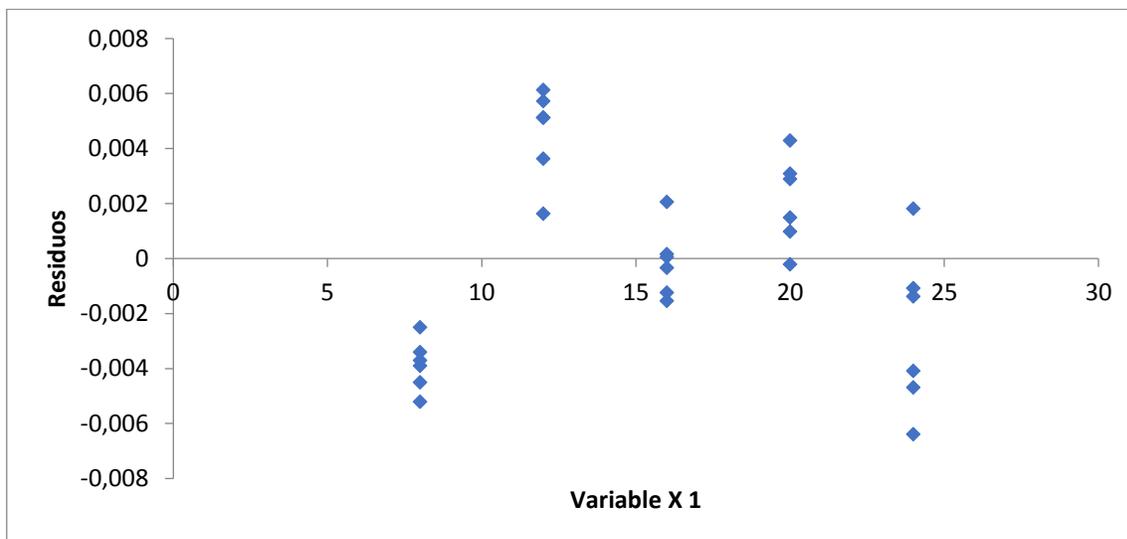


Figura 16. Gráfica de Residuales.

La tabla 21 muestra los datos que se utilizaron para el análisis estadístico de linealidad del sistema, solo usando los primeros cinco niveles de concentración de 8 a 24 ppb, para evaluar los criterios de intervalo de confianza de la pendiente y la ordenada.

Otro criterio que evaluar es el intervalo de confianza de la pendiente $IC(\beta_1)$, en este caso se tiene (0.0158, 0.0153) y no incluye el cero, cumpliéndose el criterio marcado en la guía de validación. El intervalo de la ordenada al origen $IC(\beta_0)$, fue de (0.0263, 0.0344) no incluye el cero, pero dicho criterio no está considerado en la guía de validación. [24]

8.8.3 Validación de los parámetros del método usando una muestra de cafeína-paracetamol

Se eligió la muestra de cafeína-paracetamol por su alto porcentaje de recobro comparado con las otras muestras.

Para continuar con los parámetros el método se debe conocer exactamente la cantidad de arsénico total en la muestra, para lo cual se procedió a determinar la concentración de

arsénico en 0.3 gramos la cantidad necesaria para el método y es la que se utilizara para fortificar las muestras posteriormente. Los resultados se muestran en la tabla 23 donde se observa la nula presencia de arsénico en la muestra de cafeína-paracetamol.

Tabla 23. Determinación de arsénico en 0.3 gramos de muestra.

sistema	Stock 1 (0,3 g)	absorbancia	Concentración experimental
1	1 mL	0.0043	Sin datos
2	1 mL	-0.0027	Sin datos
3	2 mL	-0.0042	Sin datos
4	2 mL	-0.0087	Sin datos
5	3 mL	-0.0047	Sin datos

Así también se prepara una muestra pesando una mayor cantidad, 1.5 gramos de muestra, a fin de que la muestra este 5 veces más concentrada para detectar la presencia de arsénico (tabla 24); sin embargo, no se detectó arsénico ni aun concentrando la cantidad de muestra.

Tabla 24. Determinación de arsénico en 1.5 gramos de muestra.

Sistema	Stock (1.5 g)	absorbancia	Concentración experimental
1	1 ml	-0.0058	Sin datos
2	2 ml	-0.0071	Sin datos

8.8.4 Exactitud y repetibilidad del método

Para evaluar la exactitud y repetibilidad, siendo que ya se conoce el contenido de analito de interés(arsénico) es prácticamente nulo, se procedió a fortificar seis muestras, en cinco concentraciones diferentes de 4.48 a 22.4 ppb de arsénico (tabla 25).

Tabla 25. Sextuplicado de muestras diferentes a 5 niveles de concentración.

As (ppb)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6
4.48	0.0781	0.0764	0.0742	0.0774	0.0784	0.0777
8.96	0.1431	0.1512	0.1438	0.1446	0.1451	0.1450
13.44	0.2030	0.2066	0.1970	0.2028	0.2028	0.2062
17.92	0.2587	0.2714	0.2595	0.2546	0.2547	0.2549
22.40	0.2955	0.3278	0.3072	0.3120	0.3128	0.3123

De dichas curvas se seleccionó el punto intermedio para realizar el análisis correspondiente, se usó la ecuación expresada en la linealidad del método para conocer la cantidad recuperada de As con respecto a la adicionada y ambas están expresadas en la tabla 26.

Tabla 26. Valores intermedios de las curvas para el recobro.

sistema	As (ppb) Adicionada	As (ppb) Recuperada	% de recobro(Y)
1	13.44	13.75	102.33
2	13.44	14.03	104.39
3	13.44	13.29	98.901
4	13.44	13.74	102.22
5	13.44	13.74	102.22
6	13.44	14.00	104.16

Se obtuvo un porcentaje de recobro (Y) en promedio o media aritmética de 102.37, y un intervalo de confianza para la media poblacional IC(μ) (100.31, 104.44), como se puede apreciar, dicho promedio aritmético está incluido en el intervalo.

El coeficiente de variación (CV) es 1.9246 menor del 3%, el límite máximo permitido para métodos químico-espectrofotométricos, y dados los resultados obtenidos por estos dos criterios de aceptación, se establece que el método es exacto y repetible.

8.8.5 Linealidad del método

Ya determinada la cantidad de analito como se describió, con respecto a la linealidad se seleccionan los datos de cuatro curvas de calibración, las cuales se expresan en la tabla 27.

Tabla 27. Resultados cuatro diferentes curvas para la linealidad del método.

Sistema	As (ppb)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Absorbancia 4
1	4.48	0.0742	0.0774	0.0784	0.0778
2	8.96	0.1438	0.1446	0.1451	0.1449
3	13.44	0.1970	0.2028	0.2028	0.2043
4	17.92	0.2595	0.2546	0.2547	0.2547
5	22.40	0.3072	0.3120	0.3128	0.3124

Se calcula la concentración exacta obtenida en dichas curvas usando la ecuación obtenida en la linealidad del método (ver figura 17), obteniendo las concentraciones de la tabla 28.

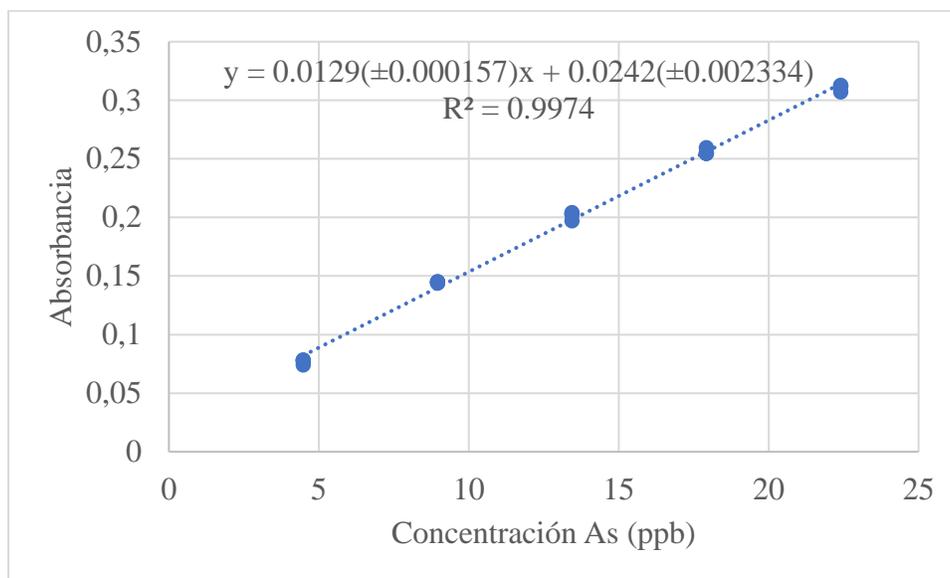


Figura 17. Gráfica de linealidad del método

Tabla 28. Concentraciones obtenidas en el método usando la ecuación de linealidad del método.

Sistema	As (ppb) teórica	As (ppb) Curva 1	As (ppb) Curva 2	As (ppb) Curva 3	As (ppb) Curva 4
1	4.48	3.87	4.12	4.20	4.15
2	8.96	9.27	9.33	9.37	9.36
3	13.44	13.39	13.84	13.84	13.96
4	17.92	18.24	17.86	17.87	17.87
5	22.40	21.94	22.31	22.37	22.34

Se seleccionan todos los niveles de concentración incluyendo el intermedio de la curva (13.44 ppb) el de principal interés, dos niveles inferiores (4.48 ppb de As y 8.96 ppb de As) y otros dos superiores (17.92 ppb de As y 22.40 ppb de As), para realizar el análisis de linealidad del método como se muestra en la tabla 28.

Con dichos datos se obtienen los parámetros estadísticos correspondientes, el coeficiente de determinación ($r^2 = 0.9974$) y este valor excede a 0.98 el mínimo para ser considerado lineal (figura 18).

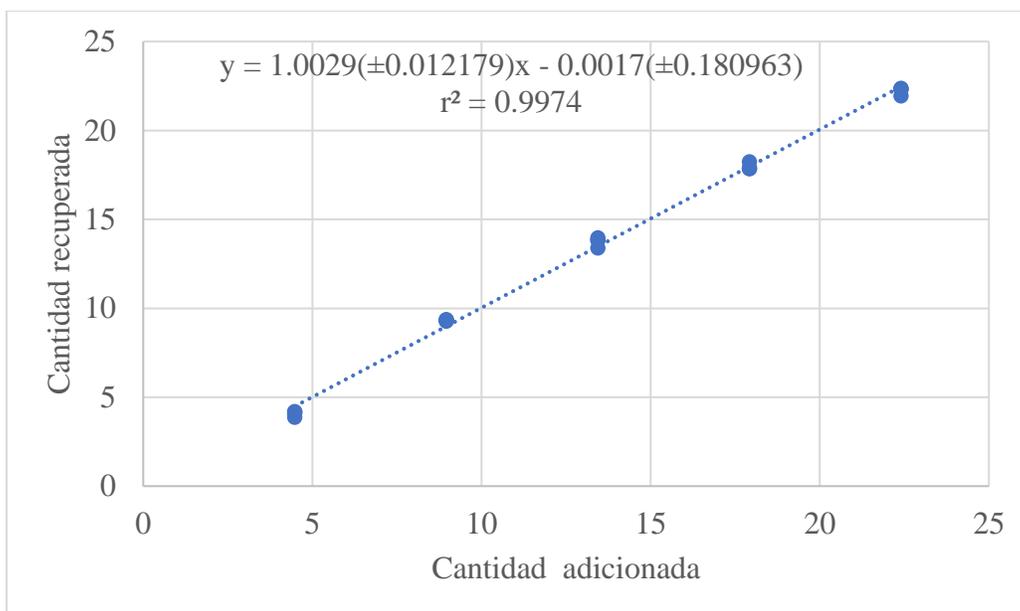


Figura 18. Cantidad adicionada vs cantidad recuperada de arsénico.

El intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) de (0.9773, 1.0284) el cual incluye el valor de uno cumpliendo ese criterio.

Otros parámetros obtenidos son intervalo de confianza para la ordenada al origen ($IC(\beta_0)$) el cual fue de (-0.3819, 0.3784) incluye el cero, la ordenada al origen (β_0) es de -0.0017.

El coeficiente de variación de regresión $CV_{y/x}$ es de 2.5606 %, este valor no es mayor al 3% para método químico- espectrofotométrico.

En análisis del porcentaje de recobro, los datos se muestran en la tabla 29.

Tabla 29. Tabla porcentaje de recobro.

sistema	As (ppb) Adicionada	As (ppb) Recuperada	% Recobro (Y)
1	4.48	3.88	86.52
2	4.48	4.12	92.05
3	4.48	4.20	93.78
4	4.48	4.16	92.75
5	8.96	9.27	103.47
6	8.96	9.33	104.17
7	8.96	9.37	104.60
8	8.96	9.36	104.43
9	13.44	13.40	99.67
10	13.44	13.84	103.01
11	13.44	13.84	103.01
12	13.44	13.96	103.88
13	17.92	18.24	101.79
14	17.92	17.86	99.67
15	17.92	17.87	99.71
16	17.92	17.87	99.71
17	22.4	21.94	97.94
18	22.4	22.31	99.60
19	22.4	22.37	99.88
20	22.4	22.34	99.74

Se obtuvo la media aritmética (Y), la cual es de 99.4683, así una desviación estándar (S) de 4.8230. El coeficiente de variación del porcentaje de recobro fue de 4.8488 el cual excede el 3 % para método químico- espectrofotométricos.

Por lo que se considera solo del sistema 5 al 20, los primeros sistemas de 4.48 ppb de arsénico al estar cercanas al límite de detección producen mayor error en la medición. Finalmente se obtuvo la media aritmética (Y), la cual es de 101.5165, así una desviación estándar (S) de 2.2310 y un coeficiente de variación de 2.1977 el cual no excede el 3 % para método químico- espectrofotométricos. El intervalo de confianza para la media poblacional (IC) de (100.4018, 102.6313) usando un valor de t de 2.1199, se observa que el intervalo incluye el valor de la media aritmética del porcentaje de recobro de 101.5165, por tanto, cumple con este criterio de aceptación el método es lineal.

8.8.5.1 Influencia del efecto de matriz

Para conocer la influencia de la matriz donde se disolvió el analito se usó las ecuaciones de linealidad del sistema (figura 15) y la ecuación de linealidad del método (figura 17), donde hay una diferencia de los componentes de la matriz obteniendo los siguientes resultados.

La varianza de los residuales es igual dado que el valor de F calculada es de 1.5145 el cual es menor que F de tablas 1.958 para n=29 en el caso del sistema y n=19 en el caso del método (ver procedimiento empleado en el anexo 2).

Así se obtuvo un valor de t calculada de 13.8788 el cual es mayor al t de tablas de 2.0117, por lo tanto, si hay un efecto de matriz respecto que las pendientes no son iguales, no es posible usar la ecuación del sistema en la determinación del contenido exacto de las muestras analizadas, siempre hay que considerar el efecto de la composición de la muestra.

En la validación del método se cometió un error, en el caso del tratamiento de la muestra lo que cual llevo a adicionar cantidades crecientes de muestra en los sistemas que se usaron en la medición y para validar los parámetros marcados por la guía de validación [24], así que para ello se evalúa si ello influye directamente en los valores de absorbancia, y se realiza en mismo procedimiento de análisis de la matriz, en este caso se usaron los datos de la tabla 30 y se obtuvo la ecuación correcta del método ver figura 19.

Tabla 30. Resultados de cuatro curvas para linealidad del método manteniendo la cantidad de muestra constante.

Sistema	As (ppb)	A1	A2	A3	A4
1	4.48	0.0639	0.0615	0.0613	0.0611
2	13.44	0.1885	0.1898	0.1995	0.2019
3	17.92	0.2372	0.2401	0.2493	0.2510
4	22.40	0.3032	0.3052	0.3124	0.3147
5	26.88	0.3465	0.3447	0.3565	0.3532

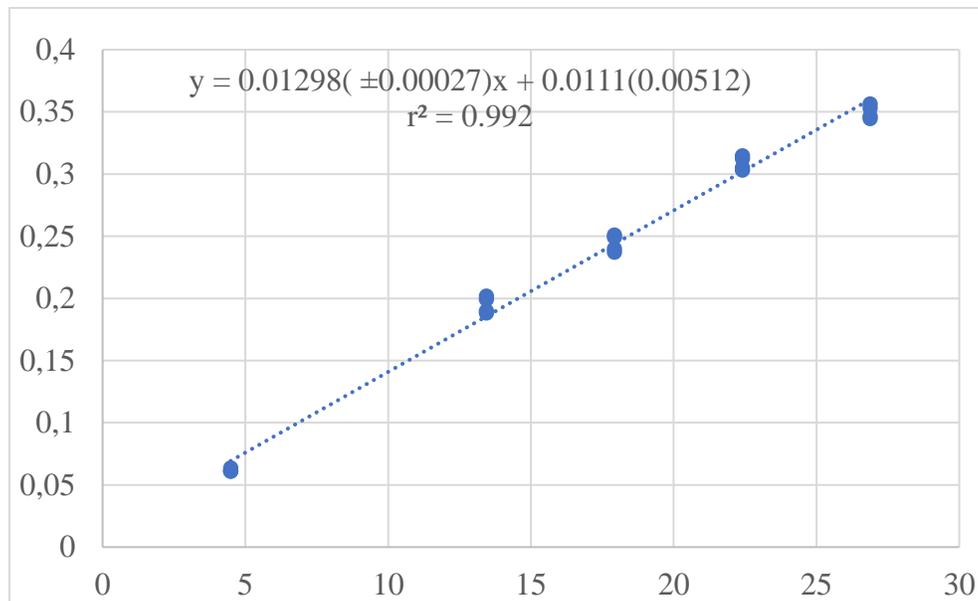


Figura 19. Gráfica de linealidad del método empleando cantidad de muestra constante.

Con los valores que se obtiene la ecuación de la figura 19 cantidad de muestra constante y los valores de la figura 17 cantidad de muestra variable, se realizó el análisis del efecto de matriz se obtuvo un valor de F calculado de 0.2213 es menor que F de tablas 2.168, lo cual indica que la varianza de los residuales es igual. Finalmente, un valor calculado para t de 0.1302, menor que $t_{0,025,36}$ de 2.0281 de tablas, por lo tanto, no existe influencia en la matriz donde se mantiene constante la cantidad de muestra y donde es variable. Por ambos procedimientos se es posible determinar la cantidad exacta de muestra, y por ser más rápido el procedimiento manteniendo la cantidad de muestra variable se usó dicha ecuación para los cálculos donde implique el uso de la ecuación del método.

8.8.6 Precisión del método

Para obtener la precisión del método se analizó por triplicado una muestra por dos analistas diferentes y dos días diferentes. Obteniendo los resultados de la tabla 31.

Tabla 31. Resultados por dos analistas en dos días diferentes.

Analista	Sistema	As (ppb)	día 1			día 2		
1	1	4.48	0.0738	0.0737	0.0694	0.0774	0.0784	0.0777
	2	8.96	0.1358	0.1364	0.1284	0.1446	0.1451	0.1450
	3	13.44	0.2007	0.2000	0.1863	0.2028	0.2028	0.2062
	4	17.92	0.2559	0.2542	0.2399	0.2546	0.2547	0.2549
	5	22.40	0.3058	0.3016	0.2861	0.3120	0.3128	0.3123
2	Sistema	As (ppb)	día 1			día 2		
	1	4.48	0.0707	0.0755	0.0740	0.0695	0.0652	0.0713
	2	8.96	0.1104	0.1421	0.1380	0.1332	0.1258	0.1361
	3	13.44	0.1635	0.2026	0.1974	0.1928	0.1843	0.1958
	4	17.92	0.2427	0.2555	0.2495	0.2429	0.2433	0.2491
	5	22.40	0.2591	0.2986	0.2944	0.3017	0.2908	0.3008

Se seleccionaron los valores del sistema número 4, a 17.92 ppb de arsénico para realizar el análisis estadístico y los valores se muestran en la tabla 32.

Tabla 32. Precisión del método, por dos analistas en dos días diferentes.

		Analista 1	Analista 2
Día	1	0.2559	0.2427
		0.2542	0.2555
		0.2399	0.2495
	2	0.2546	0.2429
		0.2547	0.2433
		0.2549	0.2491

Se obtuvo una media aritmética y de 0.2498, una desviación estándar (S) de 0.006 y un coeficiente de variación (CV) de 2.4172 el cual es menor al 3%, para método químico o espectrofotométrico, y por tanto cumplió con el criterio de aceptación, por lo que el método es preciso. Por el análisis de ANOVA evaluando el factor día se obtuvo un valor-P de 0.9362 el cual es mayor de 0.05, por lo tanto, no existe diferencia estadísticamente significativa para ambos días, con un nivel del 95 % de confianza.

8.8.7 Estabilidad analítica de la muestra.

Para este parámetro se deben establecer las condiciones a evaluar, de acuerdo con la muestra. Se prepararon tres muestras diferentes, las cuales se dividen en cuatro diferentes condiciones. Las muestras que fueron sometidas a bajas temperaturas se dejan reposar antes de la medición, ya que la densidad y otras propiedades como la viscosidad puede influir en la cantidad de muestra que entra al capilar y es analizada (tabla 33). Las otras se mantuvieron a temperatura ambiente y solamente se midieron a diferentes tiempos.

Tabla 33. Datos sobre la estabilidad de la muestra.

Muestra	25 °C por 3 horas	-3 °C por 24 horas	Normal 3 días	Normal 1 semana
1	0.1713	0.2007	0.1944	0.2028
2	0.1805	0.1861	0.2066	0.2062
3	0.1735	0.1863	0.1970	0.2043

La media aritmética (y) para cada muestra respectivamente son: 0.1751, 0.1910, 0.1993 y 0.2044, también se calculó la diferencia absoluta de la media aritmética $|d_i|$ con respecto a la condición inicial la cual es a 25°C después de tres horas. Las diferencias de media absoluta fueron 0.0159, 0.0242, 0,0293, respectivamente, las cuales son menores del 3% para métodos químicos o espectrofotométricos, la muestra se mantiene estable.

8.8.8 Limite detección

a) *limite detección(LD) empleando la relación señal ruido.*

El LD se determina de esta manera, ya que se está usando un instrumento que mide una respuesta analítica, la absorbancia, y presenta una señal de ruido basal. Por lo que se determina la respuesta de los sistemas blancos. En la tabla 34 se muestra, el valor promedio de cinco blancos, y el producto de tres veces dicho valor, para conocer la cantidad de analito que se considera el límite de detección, en este caso 4.48 ppb.

Tabla 34. Promedio de blanco y curvas de calibración usadas en límite de detección.

Muestra		Señal analítica		
Blanco o ruido		0.00366		
3 * ruido		0.01098		
Curvas de calibración				
Analito ppb	Curva 1 (A)	Curva 2 (A)	Curva 3 (A)	Curva 4 (A)
4.48	0.0742	0.0774	0.0784	0.0778
8.96	0.1438	0.1446	0.1451	0.1449
13.44	0.1970	0.2028	0.2028	0.2043
17.92	0.2595	0.2546	0.2547	0.2547
22.40	0.3072	0.3120	0.3128	0.3124

b) *Limite detección con base a la desviación estándar de los blancos.*

En la tabla 35 se observan las lecturas de cinco blancos y empleando la ecuación de linealidad del método para determinar el límite de detección.

Tabla 35. Blancos de ácido clorhídrico 5 M

Blancos	Absorbancia
1	0.0036
2	0.0048
3	0.0030
4	0.0031
5	0.0038

Se obtuvo con la tabla 34 una pendiente (β_1) de 0.01293 y una ordenada al origen (β_0) de 0.0242, un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9974 es mayor que 0.98 un criterio de aceptación. Se obtiene una desviación estándar de la pendiente S_{b1} de 0.000157, y una desviación estándar $S_{s/x}$ de 0.00445. El intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$ (0.0126,0.0132) no incluye el cero. Así también la desviación estándar de los blancos (S_b) de 0.0007. Para calcular finalmente el límite de detección (LD) de 0.1836.

c) *Límite de detección con base a la desviación estándar de la regresión.*

Para realizar este procedimiento se usan los mismos datos del inciso b) pero se usa la desviación estándar de la regresión $S_{y/x}$ de 0.0044 en el cálculo del LD obteniendo 1.1355 ppb As.

d) *Límite de detección con base a la desviación estándar de la ordenada al origen.*

Esta parte para el cálculo de LD se usa la desviación estándar de la ordenada al origen (S_{b0}) con un valor de 0.00233, se obtiene un límite de detección de 0.5954 ppb As.

Una comparación los tres últimos límites de detección es máxima de 1 ppb, en los análisis estadísticos.

8.8.9 Límite de cuantificación

a) *Límite de cuantificación señal ruido.*

En lo que respecta al límite de cuantificación, es necesario conocer la señal ruido basal, que presenta el equipo de absorción atómica, y se usa el promedio de cinco blancos, y las curvas de calibración para linealidad del método para obtener la ecuación. En la tabla 36 el límite de cuantificación estimado según la curva es de 4.48 ppb de arsénico, ya que es la cantidad inmediata a 10 veces el ruido.

Tabla 36. Promedio de blanco y curvas de calibración usadas en límite de cuantificación.

Muestra		Señal analítica		
Blanco o ruido		0.00366		
10 * ruido		0.0366		
Curvas de calibración				
Analito ppb	Curva 1 (A)	Curva 2 (A)	Curva 3 (A)	Curva 4 (A)
4.48	0.0742	0.0774	0.0784	0.0778
8.96	0.1438	0.1446	0.1451	0.1449
13.44	0.1970	0.2028	0.2028	0.2043
17.92	0.2595	0.2546	0.2547	0.2547
22.40	0.3072	0.3120	0.3128	0.3124

b) Límite de cuantificación basado en la desviación estándar de los blancos.

Usando la tabla 37 se muestran las cinco lecturas de blancos.

Tabla 37. Blancos de ácido clorhídrico 5 M

Blancos	Absorbancia
1	0.0036
2	0.0048
3	0.0030
4	0.0031
5	0.0038

Se obtuvo con los datos de la tabla 36, una pendiente (β_1) de 0.0129 y una ordenada al origen (β_0) de 0.0242, un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9974 es mayor que 0.98 un criterio de aceptación. Se obtiene una desviación estándar de la pendiente S_{b1} de 0.000157, y una desviación estándar $S_{y/x}$ de 0.00445. El intervalo de confianza para la pendiente $IC(\beta_1)$ (0.0126, 0.0132) no incluye el cero, esto usando un valor de t de 2.0860. Así también la desviación estándar de los blancos (S_b) de 0.0007. Para calcular finalmente el límite de cuantificación (LC) de 0.5563.

c) Límite de cuantificación basado en la desviación estándar de la regresión.

Para realizar este procedimiento se usan los mismos datos del inciso b) pero se usa la desviación estándar de la regresión $S_{y/x}$ de 0.00445 en el cálculo del LC obteniéndose 3.4409 ppb de As.

d) Límite de cuantificación basado en la desviación estándar de la ordenada al origen.

Esta parte se complementa del inciso b) y como modificación para el cálculo de LC se usa la desviación estándar de la ordenada al origen (S_{b0}) con un valor de 0.0023, donde se obtiene un límite de cuantificación de 1.8045 ppb de As.

Una comparación los tres últimos límites de cuantificación es máxima de 3.4 ppb de As, en los análisis estadísticos.

8.8.10 Robustez

Para evaluar los factores instrumentales del equipo se tomó el de mayor relevancia el voltaje, una muestra es medida a un voltaje normal, y dos condiciones diferentes (tabla 38).

Tabla 38. Tres muestras de cafeína de concentración 4.48 ppb analizadas a tres diferentes voltajes para calcular la robustez del método.

Muestra	Voltaje (volts)		
	432	486	497
	Bajo(Y ₁)	Normal (Y ₀)	Alto(Y ₂)
1	0.0723	0.0738	0.0738
2	0.0707	0.0737	0.0764
3	0.0701	0.0691	0.0742

Se calculó la media aritmética(Y₀) de la condición normal y de las otras condiciones fueron (Y₁) 0.0710, para (Y₀) 0.0722 y para (Y₂) 0.0748, igual se calculó la diferencia absoluta de a media aritmética de cada condición respecto a la condición normal (|d_i|), las cuales fueron (|d_i|) 0.0011 para 432 volts y (|d_i|) 0.0026 para 497 volts, el valor no excede el 2 % y como sólo se evalúa esa condición crítica se dice que el método es robusto.

Por el análisis de ANOVA evaluando como factor el voltaje se obtuvo el valor-P 0.1134, puesto que es mayor de 0.05 no existe significancia entre el los niveles de voltaje, esto para un nivel del 95 % de confianza.

8.8.11 Tolerancia

En la tolerancia se evaluó los resultados obtenidos por dos equipos de absorción atómica, esas dos condiciones de uso son las que se evaluaron, con una misma muestra analizada por triplicado, como se muestra en la tabla 39.

Tabla 39. Datos de tres muestras obtenidos en el equipo 1 (spectrAA800) y equipo 2 (spectrAA 200).

Muestra	Equipo 1 spectrAA800	Equipo 2 spectrAA 200
1	0.2455	0.2497
2	0.2495	0.2443
3	0.2429	0.2458

Se calculó la media aritmética (\bar{y}) obteniéndose un valor de 0.2463, la desviación estándar (S) de 0.0028, el coeficiente de variación (CV) 1.1230 % y este valor no excede el 3 % para métodos químico- espectrofotométricos.

En el análisis de ANOVA se evaluó el factor equipo, donde se obtuvo un valor-P de 0.8129, el cual es mayor de 0.05 por lo tanto no existe diferencia significativa entre ambos equipos, para un nivel de significancia del 95 %.

8.9 Método MGA 0111 de la FEUM

Se obtuvieron también los resultados del método MGA 0111 de la FEUM, los cuales se interpretaron de manera más cualitativa que cuantitativa. Se analizaron tres muestras, dos de cafeína (0.3 y 1 gramo) y una de subsalicilato de bismuto, dos soluciones de referencia de arsénico (48 y 16 ppb) para comparar las muestras y decir si cumple con la cantidad máxima permitida de arsénico.

En la figura 20 se muestran los equipos empleados, después de 30 minutos de llevarse a cabo la reacción. se observa en la parte superior de cada equipo lo que es el tubo de absorción, la solución de color amarillo es la de nuestro interés, debido a la formación del complejo colorido, pero no es posible diferenciar a simple vista si se cumple con el límite establecido.



Figura 20. Resultados de la determinación de arsénico método FEUM.

Solo el análisis de método MGA 0111 se empleó un tiempo de una hora con 15 minutos en las dos reacciones críticas.

Para dar una interpretación química más exacta, se midió en un espectrofotómetro UV-Vis empleando 45 minutos en calentar el equipo y medir, se emplearon celdas cerradas de 2 mm de paso óptico (figura 21). Los olores que se desprenden de la solución son fatales para el ser humano [27], por eso es mejor usar este tipo de celdas donde se emplea menos volumen y evita la salida de los olores.



Figura 21. Fotografía de las celdas de cuarzo cerradas empleadas.

Los espectros obtenidos se muestran en la figura 22. Se puede decir que las muestras analizadas no exceden el límite de arsénico de la farmacopea, la muestra de referencia 1 de As, es la que tiene una mayor absorbancia de todas y tiene una concentración teórica de 48 ppb, por lo que las demás están por debajo de dicho valor de concentración, ya que la prueba limite solo es la comparación de la muestra y la referencia, hasta esta parte se termina la prueba.

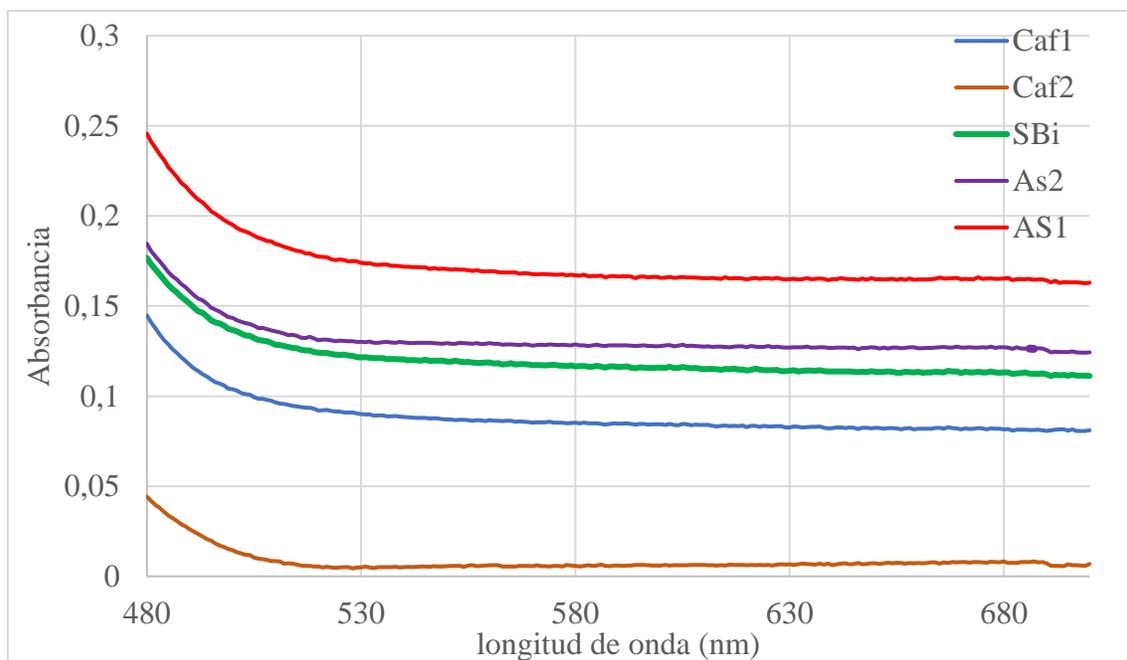


Figura 22. Espectros de absorción obtenidos para las soluciones.

Para realizar una cuantificación de las muestras, se calcularon las concentraciones teóricas de las referencias, y usando la ley de Lamber-Beer se determinaron los coeficientes de absorptividad molar de la referencia 1 y referencia 2 de arsénico, y también se usó un coeficiente reportado en un artículo [28], donde lograron bajar hasta 28 ppb el límite de detección, y se cuantificaron las muestras como se detalla en la tabla 40.

Tabla 40. Resultados de la posible cuantificación de arsénico en las muestras empleando los coeficientes de absorptividad molar.

Muestra	As (ppb) Teórica	As (ppb) experimental Solución Ref.1 1,350,253 cm⁻¹M⁻¹	As (ppb) experimental Solución Ref.2 3,013,408 cm⁻¹M⁻¹	As (ppb) experimental Usando fuente [28] 4,602,252cm⁻¹M⁻¹	Método GH As (ppb)
Artículo	28	95	42.76	28	25.52
Referencia 1	48.77	48.77	21.85	14.30	41.92
Referencia 2	16.26	36.28	16.26	10.64	16.08
Muestra 1	---	26.41	11.83	7.74	0.0
Muestra 2	---	1.37	0.62	0.40	0.0
Subsalicilato de bismuto	---	34.09	15.27	10.00	0.0

Como los valores de coeficientes de absorptividad molar experimentales son menores al reportado en el artículo, y por lo tanto se tienen valores de concentraciones más altas, se eligió el coeficiente de absorptividad molar de la referencia dos, por ser más cercano al del artículo, y se puede decir que, si hay arsénico en las muestras, pero en concentraciones menores a las 16 ppb de arsénico que tiene como límite la referencia dos.

En muestra uno, es posible encontrar arsénico ya que se usó una cantidad de un gramo, en el caso de la muestra 2 la concentración de arsénico obtenida es prácticamente menos de una ppb, pero se usó solamente 0.3 gramos de muestra, para hacer la comparación con el método de generador de hidruros.

En el caso de la muestra de subsalicilato de bismuto, se detectó una cantidad alta de arsénico 15 ppb muy cercano al límite de la referencia 2, pero cabe señalar que el método está detectando el arsénico de los reactivos empleados (hidróxido de calcio) debido al procedimiento especial para su tratamiento.

El método de generador de hidruros no detectó la presencia de arsénico en las muestras, a diferencia de método MGA 0111, pero si detecto en los sistemas preparados de referencia usando la ecuación de linealidad del sistema para obtener dicha concentración.

Este análisis del método MGA 0111 de la farmacopea se realizó como manera demostrativa, para conocer las características, tiempos de reacción, uso adecuado de material y equipo. Al realizar ambos métodos podemos hacer una comparación como se muestra en la tabla 41.

Tabla 41. Tabla comparativa entre ambos métodos.

Factor	Método MGA 0111	Método generador de hidruros (GH)
Tiempo de reacción	1 hora y 15 minutos	45 minutos
Límite de cuantificación	48 ppb de As	4 ppb de As

De los factores antes comparados el de mayor importancia es el límite de cuantificación, por el método propuesto se pueden detectar hasta 4 ppb de arsénico, un valor mejor comparado con el establecido por la FEUM undécima edición.

9. CONCLUSIONES

- Se logró la optimización del método analítico de espectroscopia de absorción atómica con generador de hidruros, seleccionando las condiciones óptimas que permiten cuantificar arsénico en partes por billón.
- Se cumplieron los diferentes parámetros estadísticos establecidos en la guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México; por tanto, se puede proponer como un procedimiento alternativo al método MGA 0111 prueba límite de arsénico, a la comisión respectiva de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
- EL estudio de las muestras farmacéuticas (cafeína-paracetamol, sulfato ferroso y vitaminas) demuestra la aplicación del método desarrollado y validado.
- La metodología desarrollada presentó diversas ventajas en comparación con la metodología establecida por la FEUM undécima edición, como son: sensibilidad a la detección de arsénico, tratamiento simple de la muestra, especificidad y exactitud.

10. REFERENCIAS

- [1] Gasque, L. (2011). El arsénico más que un veneno. *¿cómo vez?* Volumen 1. (No.149), 22
- [2] Reimann, C., Matschullat, J., Birke, M. & Salminen, R. (2009). Arsenic Distribution in the Environment: The Effects of Scale. *Applied Geochemistry*, 24, 1147-1167
- [3] National Research Council Committee on Medical and Biological Effects of Environmental Pollutants (1997). Arsenic: Medical and Biologic effects of environmental pollutants. National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- [4] Arsénico: intoxicación masiva a una escala sin precedentes. Recuperado 15 octubre del 2017. [Apps.who.int/iris/bitstream/10665/71243/1/feature_206.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/71243/1/feature_206.pdf)
- [5] Meharg A. 2003. The arsenic green. *Nature*. 423:688
- [6] Galvao, L., Corey, G. (1987). Arsénico. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Metepec, México.
- [7] Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR). Estudio de Caso en Medicina Ambiental (CSEM). La toxicidad del arsénico. (2009). Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU.
- [8] Rossman T. (2007). Arsenic. In : Rom W and Markowitz S eds. *Environmental and Occupational Medicine*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, pp1006-1017.
- [9] Quansah, R., Armah, F.A., Esumang, D.K., Luginaah, I., Clarke, E., & Marfoh, K, (2015) Association of arsenic with adverse pregnancy outcomes/infant mortality: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect.*;123(5): 21.
- [10] Nota descriptiva de arsénico, junio 2016, por centro de prensa de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Recuperado 22 de agosto del 2017. http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/chemicals_phc/es/
- [11] Agua potable para comunidades rurales, reusó y tratamientos avanzado de aguas residual doméstica. Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua. CYTED
- [12] Castro de Esparza, M. (2006). Presencia de arsénico en el agua bebida en América Latina y su efecto en la salud pública. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. Lima, Perú.

- [13] Armienta M.A., Rodríguez C.R., (1993). Evaluación de la presencia de Arsénico en el valle de Zimapán Hidalgo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- [14] Flanagan, S.V., Johnston, R.B., & Zheng, Y. (2012). Arsenic in tube well water in Bangladesh: health and economic impacts and implications for arsenic mitigation. *Bull World Health Organ.* 90:839-846.
- [15] Sistema de generación de hidruros. Recuperado 03 de 12 de 2016. http://www.shsu.edu/%7Eechm_tgc/sounds/flashfiles/HGAAS.scrubber.swf
- [16] Villicaña, C.F. (2015). *Determinación experimental del equilibrio de intercambio iónico del sistema arseniato/ cloruro con una resina de intercambio iónico fuerte*. Tesis de licenciatura. UNAM, FESC México.
- [17] Hobar H. WILLARD, (1984) *Métodos Instrumentales de Análisis*, Ed. Continental, sexta impresión, México D.F pp.388-392.
- [18] Skoog, A.D. (2001). *Análisis Instrumental* (7 ed.). México: NUEVA EDITORIAL INTERAMERICANA.
- [19] Harris, D.C. (2007). *Análisis químico cuantitativo* (3 ed.). Barcelona: REVERTÉ
- [20] Christian, D.G. (2009). *Química Analítica* (6 ed.). México: McGraw Hill.
- [21] Rubinson, A.K. (2001). *Análisis Instrumental* (6 ed.). Madrid, España: Prentice Hall.
- [22] Skoog, A.D. (2008). *Principios de Análisis Instrumental* (6 ed.). México: CengageLearning.
- [23] *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (11 ed.). **1,2**, 268. México. (2014).
- [24] Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (1995). *Guía de Validación de Métodos Analíticos*.
- [25] Beyer, W. (1987). *Manual de química orgánica*. 19ª edición alemana, Editorial Reverté, S.A. (p.456). España.
- [26] Blanco, M. & Cerdá, V. (2007). *Temas avanzados de quimiometría*. 1ª ed. (p. 284-292). Universidad de las Islas Baleares. España.
- [27] Hoja de datos de seguridad. Producto Piridina. (2015). Karal, S.A de CV. Departamento de control de calidad, seguridad e higiene. De acuerdo con la *Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2000*, Sistema de identificación y comunicación

de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo.
DIARIO OFICIAL.

- [28] Pérez, M.F., García, F.P., Barrado, E.E., Rojas A.H., & Méndez, M.A. (2002). Optimización del método de determinación de arsénico en aguas potables por espectrofotometría UV-Vis con dietil ditiocarbamato de plata. *Revista de la Sociedad Química de México, Vol. 46. (2). 175-179*
- [29] Agilent vapor generation accessory VGA 77 and VGA 77P user's guide. (2014). *Agilent Technologies.*
- [30] Vargas, G. (2011). *Calibración lineal.* Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

11. ANEXOS

Anexo 1. Análisis completo de influencia del factor día.

Los residuales de los diferentes días se encuentran esparcidos aleatoriamente a lo largo del eje x, sin sobrepasar los valores límite de ± 3 para considerarse anómalos.

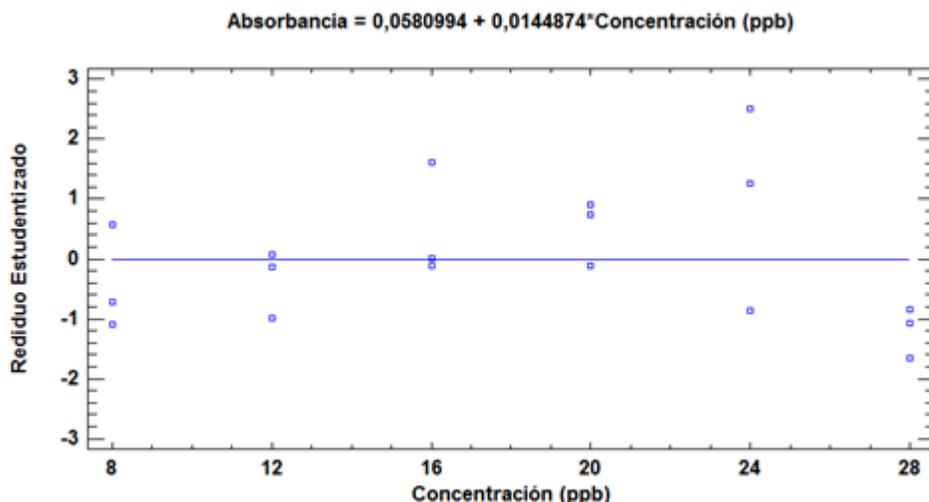


Figura 23. Grafico de residuos estandarizados para tres días diferentes.

Tabla 42. Tabla ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,000380248	2	0,000190124	0,02	0,9841
Intra grupos	0,177551	15	0,0118367		
Total (Corr.)	0,177931	17			

La tabla 42 de ANOVA nos muestra que puesto que el valor-P de la razón-F es mayor que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias, con un nivel de confianza del 95%.

Tabla 43. Verificación de Varianza

	<i>Prueba</i>	<i>Valor-P</i>
Levene's	0,0185407	0,981653

<i>Comparación</i>	<i>Sigma1</i>	<i>Sigma2</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
día 1 / día 2	0,107853	0,106886	1,01817	0,9847
día 1 / día 3	0,107853	0,111594	0,934068	0,9422
día 2 / día 3	0,106886	0,111594	0,9174	0,9270

La tabla 43 nos muestra que puesto que el valor-P es mayor que 0.05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones estándar, con un nivel de confianza del 95%.

Anexo 2. Pasos y ecuaciones para determinar la influencia de la matriz. [30]

1. Obtener el promedio de los valores “X” y la sumatoria del cuadrado de la diferencia de cada valor con el promedio:

$$\sum(x_i - \bar{x})^2$$

2. Probar que las varianzas de los residuales de ambas curvas pueden ser consideradas iguales (si no lo son ir al punto número 6):

$$F = \frac{S_{e2}^2}{S_{e1}^2} < F_{0.05, (n_1-1, n_2-1)}$$

3. Entonces calcular la varianza estimada común.

$$S_{ep}^2 = \frac{(n_1 - 2)S_{e1}^2 + (n_2 - 2)S_{e2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

4. Aplicar la prueba t

$$t_{calculada} = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{S_{ep}^2 \left(\frac{1}{\sum(x_{i1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum(x_{i2} - \bar{x}_2)^2} \right)}}$$

5. Concluir. Si las pendientes no tienen diferencias significativas. No hay efecto de matriz.

$$t_{calculada} < t_{0.025, (n_1+n_2-4)}$$

6. Cuando las varianzas de los residuales no son iguales, obtener la t calculada de:

$$t_{calculada} = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{S_{b1}^2 + S_{b2}^2}}$$

$$\text{Recordando que: } S_{b1}^2 = \frac{S_{e1}^2}{\sum(x_{i1} - \bar{x}_1)^2}$$

7. Comparar con la t de tablas.

$$t_{calculada} < t_{0.025, (n_1+n_2-4)}$$