

Tesis Doctoral

Métodos de introducción de muestras para espectrometrías de alta performance

Morzan, Ezequiel Martín

2015-12-16

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Morzan, Ezequiel Martín. (2015-12-16). Métodos de introducción de muestras para espectrometrías de alta performance. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Morzan, Ezequiel Martín. "Métodos de introducción de muestras para espectrometrías de alta performance". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-12-16.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física

Métodos de introducción de muestras para espectrometrías de alta performance

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física

Autor

Ezequiel Martín Morzan

Directores de Tesis

Mabel B. Tudino

Facundo M. Fernández

Consejero de estudios

Fernando Battaglini

Lugar de trabajo

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física
Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE)
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires

y

School of Chemistry and Biochemistry, Georgia Institute of Technology

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2015
Fecha de defensa:

Métodos de introducción de muestras para espectrometrías de alta performance

Resumen

En las espectrometrías atómicas y de masas se requiere que el analito se encuentre en estado gaseoso para su análisis. Pero, en la mayoría de los casos, las muestras se encuentran en estado sólido o en solución. De esta manera, los mecanismos que habilitan el cambio de fase del analito requieren un cuidadoso estudio de modo tal de hacerlos eficientes. Así, los cambios de fase se transforman en el paso crítico en las valoraciones analíticas llevadas a cabo con estos espectrómetros ya que influyen de manera sustantiva las cifras de mérito del método particular. Es por ello que los desarrollos de nuevos sistemas de transferencia de materia a fase gaseosa podrían ofrecer ventajas por sobre las técnicas convencionales tales como, la optimización de cifras de mérito características de la técnica y la factibilidad de muestreo localizado en el caso de problemas sólidos.

En lo que respecta a la espectrometría atómica, se presenta un novedoso sistema de introducción total de muestra por generación de aerosol térmico dentro de una celda de atomización calentada por llama conocido por sus siglas en inglés “*TS-FFAAS*” (*thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry*). Con el objetivo último de que el desempeño analítico del “*thermospray*” pueda superar al de la absorción atómica convencional con llama e incluso la atomización electrotérmica, así como que sea capaz de extender su aplicación a analitos poco volátiles, se han realizado diversos estudios teóricos y experimentales en el marco del presente tesis. Los experimentos se han centrado en el estudio de las variables operativas que permiten la optimización de la señal analítica, entre ellos: material de la celda de atomización y modificación de su superficie interna, dimensiones de la celda, temperatura alcanzable y su distribución (axial y radial), caudal de transporte de muestra y su naturaleza (uso de solventes orgánicos), cantidad de muestra inyectada, estequiometría de la llama de combustión que calefacciona la celda (entorno redox), influencia de otros parámetros físicoquímicos, etc. En base a los resultados se discutirán los posibles mecanismos de atomización/desolvatación que permitan explicar la variación de sensibilidad observada para analitos de diferente volatilidad. Se presentan también estudios teóricos que permiten explicar la generación de señal analítica así como su tamaño y forma. Se discuten los resultados obtenidos para la determinación de analitos de distinta volatilidad en muestras reales, lo que permite evaluar las bondades de la técnica en el análisis elemental de rutina.

Por otra parte, se mostrará el desarrollo de un novedoso sistema de introducción de muestras para espectrometría de masas que permite el muestreo localizado de sólidos de superficies irregulares habilitando la generación de imágenes químicas de topologías no planas. Además, se presentará la posibilidad de correlacionar fragmentos provenientes de una misma sustancia en una mezcla compleja a través de la introducción dinámica de la muestra en medio del flujo de un plasma de helio caliente.

Palabras clave: Espectrometría Atómica, aerosol térmico, celda de atomización, Espectrometría de masas, análisis directo en tiempo real (DART), generación de imágenes moleculares.

Sample introduction methodologies for high performance spectrometries

Abstract

It is well known that mass and atomic spectrometries require the analytes in gaseous form for enabling its determination. But mostly, samples are solids or liquids. Consequently, the mechanisms that allow the change of phase of the analyte need to be studied carefully as they are critical at the moment of optimizing the figures of merit of a given analytical procedure. In this way, new systems for mass transfer could offer advantages with respect to other classical methodologies such as, improvement of figures of merit and localized sampling of solid problems.

For atomic spectrometry, a new system of total sample introduction by means of thermospray production inside a flame furnace is employed. The approach is known as thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry (TS-FFAAS). In this thesis, several experimental and theoretical studies have been performed with the aim of testing TS as a method able to exceed the analytical performance of flame atomic absorption spectrometry and probably electrothermal, and also to broaden its applications to analytes of low volatility. Experiments have been focused on the operational variables that allow the improvement of the analytical signal, amongst them: furnace material, changes of the material in the internal surface of the furnace, furnace volume, temperature of the furnace (axial, radial), carrier flow rate, nature of the carrier (organic solvents), sample volume, flame stoichiometry (redox environment), influence of other physicochemical parameters, etc. In the light of the results, some explanation on the differences in sensitivity observed for analytes of different volatility will be given by assessing probable mechanisms of desolvation/atomization inside the furnace.

Theoretical studies are also presented in order to explain the generation of the analytical signal as well as its shape and size. Obtained results for the determination of different analytes in real samples are shown and evaluated in terms of the goodness of TS-FFAAS for routine elemental analysis.

Additionally, the development of a new system for sample introduction in mass spectrometry will be shown. It allows the focalized sampling of solids with irregular surfaces and enables the generation of chemical images of non planar topology. Moreover, the possibility of correlating mass fragments of a given compound in a complex mixture through the dynamic introduction of a sample flowing in a hot helium plasma, will be presented for the first time.

Keywords: Atomic Spectrometry, Thermospray, atomization furnace, Mass Spectrometry, Direct Analysis in Real Time (DART), Ambient ionization, Molecular imaging.

Métodos de introducción de muestras para espectrometrías de alta performance



Ezequiel M. Morzan

Agradecimientos

Este trabajo de tesis no hubiese sido posible sin el apoyo y la compañía de muchas personas.

A mis directores Mabel y Facundo a quienes admiro, y de quienes he aprendido mucho mas de lo que me había imaginado antes de ingresar al doctorado. Que impidieron que mis intereses volátiles me alejaran de la meta de esta tesis. Definitivamente esto no hubiese sido posible sin su guía, ayuda y apoyo.

A quienes, si bien la burocracia no permite mas directores, siempre me brindaron su guía para lo que necesite. Jorge Stripeikis, de los mejores docentes que tuve durante mi carrera, siempre con la explicación precisa en el momento adecuado. Fernando Iñon, con sus críticas constructivas a mi trabajo ha hecho de esta tesis una tesis mejor. Roberto Etchenique, trabajar con el durante los últimos meses fue muy formador.

A mis compañeros de laboratorio en el INQUIMAE. A Orne mi compañera inseparable durante los primeros años sin ella no hubiese podido terminar. A Luca, Juli, Dani, y Yani. Pero especialmente a Cristina que me cuidó como una madre.

A mis compañeros de laboratorio en Georgia Tech. Rachel, Adam, Eric, Joel, Xiaoling, Christina, Manshui y Prabah. Todos ellos dejaron su marca en mí y en esta tesis. Pero especialmente a Maru y Julia quienes me ayudaron tanto académicamente como personalmente, estaré por siempre agradecido con ellas y sus familias.

A mis compañeros y amigos del INQUIMAE siempre conteniéndonos y apoyándonos los unos a los otros, sobre todo los del T6 quienes mas escucharon mis alegrías y tristezas. Juan, Ale, Rolo, Leo, German, Pao, Nati, Pablo, Vero y Silvina (Quien estuvo en silencio el tiempo suficiente para que termine de escribir...). Pero especialmente a Alejandra que me ayudó con los trámites durante toda la tesis, sin ella la fecha de defensa sería en 2020. MIL GRACIAS!!!

A mis compañeros y amigos del CITEFA: Néstor, Marcelo, Francisco, Laura, Fernando, y Raúl. Quienes tomaron un joven y despistado estudiante de medicina y lo formaron e incentivaron para seguir en la dirección adecuada. A ellos les debo el resto de mi carrera.

A mis amigos!! Cada uno, a su manera, no han dejado de acompañarme.
Nati, Ari, Kipa, Nadia, Miji, Hernan, Por su apoyo casi psicológico...
Diego, Andy, Facto, Agustin, Santa, Mario, Sabro,... siempre conmigo.
Dani, Mariano y Adrian que aunque no tengan idea que hago están ahí siempre.

A mi familia, que me apoyaron y apoyan desde siempre de forma incondicional.
Alice, Pao y Eze: siempre apoyo y palabras de aliento
Mis primos, tios y abuelos. Algunos presentes y algunos que ya no están físicamente siempre están ahí para cuidarme.
A mis viejos y hermanos que les debo todo lo que soy. Por su esfuerzo constante y por su ejemplo.
Pero sobre todas las cosas por la libertad para elegir mi propio camino.

Pero especialmente a mi compañera, mi amiga, mi aliada, mi abogada...etc. Con quien tengo la suerte de compartir mi vida y que cada día me hace mas feliz. A Deby que es mi todo y mucho mas...

GRACIAS!!

A quienes me precedieron,
a quienes son mis contemporáneos,
y a quienes me procederán
en el estudio de la Química Analítica.

"Canta, oh musa, la cólera del pelida Aquiles; cólera funesta que causó infinitos males a los aqueos y precipitó al Hades muchas almas valerosas de héroes, a quienes hizo presa de perros y pasto de aves; cumpliáse la voluntad de Zeus desde que se separaron disputando el Atrida, rey de hombres, y el divino Aquiles."

Homero , La Iliada

Motivaciones

El oráculo había profetizado que el hijo de la ninfa Tetis encontraría su muerte joven en un campo de batalla. Con la intención de impedirlo, Tetis sumergió a su hijo recién nacido en el río estigio para volverlo inmortal, pero lo sostuvo por su talón que nunca tocó las aguas y permaneció tan débil como el de un mortal.

Así comienza el mito de Aquiles, quien fue conocido como el guerrero más temible y despiadado, ejércitos enteros temblaron ante su presencia, peleó incontables batallas y aniquiló miles de soldados enemigos. Lo creían invencible, la aspiración máxima de cualquier guerrero. Sin embargo, llegó el día en que una flecha alcanzó su talón, y el héroe griego más grande cayó derrotado.

¿Es posible hacer de Aquiles un mejor guerrero?

En todas las batallas libradas contra la ignorancia humana, pocos campeones han sido tan victoriosos como las espectroscopías y las espectrometrías. Entre estas técnicas, aquellas que son más rápidas, sensibles y selectivas son las que, al momento del análisis, el analito se encuentre en fase gaseosa. Este hecho que le otorga las ventajas fundamentales en performance es, al mismo tiempo, su "talón de Aquiles" debido a que la mayor parte de las muestras contienen al analito en fase condensada.

Entonces, es necesario implementar métodos que solucionen la incompatibilidad fundamental entre el mundo de la fase líquida de la muestra, y el mundo de la fase gaseosa del espectrómetro. Métodos que permitan transformar al analito de un pez en un ave.

Esta tesis busca explorar posibles soluciones para este dilema, para mejorar la performance obtenida con soluciones tradicionales.

Índice de contenido

I.- Introducción	1
I.1.- Estado del arte de los métodos de introducción de muestras para espectrometría de absorción atómica	2
I.2.-Estado del arte de los métodos de introducción de muestras para espectrometría de masas	11
I.3.-Bibliografía	22
1.- Capítulo 1: Modelo teórico del funcionamiento del TS-FF-AAS	31
1.1 – Introducción	33
1.2 –Variables operativas en TS-FF-AAS	33
1.2.1 - Geometría de la celda de atomización	33
1.2.2 - Material de la celda de atomización	34
1.2.3 - Tamaño y número de orificios de la base de la celda de atomización	34
1.2.4 - Estequiometría de la llama que calienta la celda y el capilar	35
1.2.5 - Naturaleza del carrier	36
1.2.6 - Volumen de inyección	36
1.2.7 - Caudal de solución de transporte	37
1.3 - Estudios teóricos de mecanismos de desolvatación/atomización de la celda: Influencia de las variables operativas	38
1.3.1 - Validación del modelo de simulación con datos experimentales	40
1.3.2 - Medición de temperatura: Fundamentos de la operación utilizando una cámara de fotos digital	41
1.3.3 - Validación de la medición de la temperatura	43
1.3.4 - Evaluación de la distribución de la temperatura de la pared de la celda de atomización	44
1.4 - Evaluación teórica de la dependencia de la señal analítica obtenida con el caudal de muestra	46
1.4.1 - Evaluación teórico-experimental de la eficiencia de atomización en la celda	47

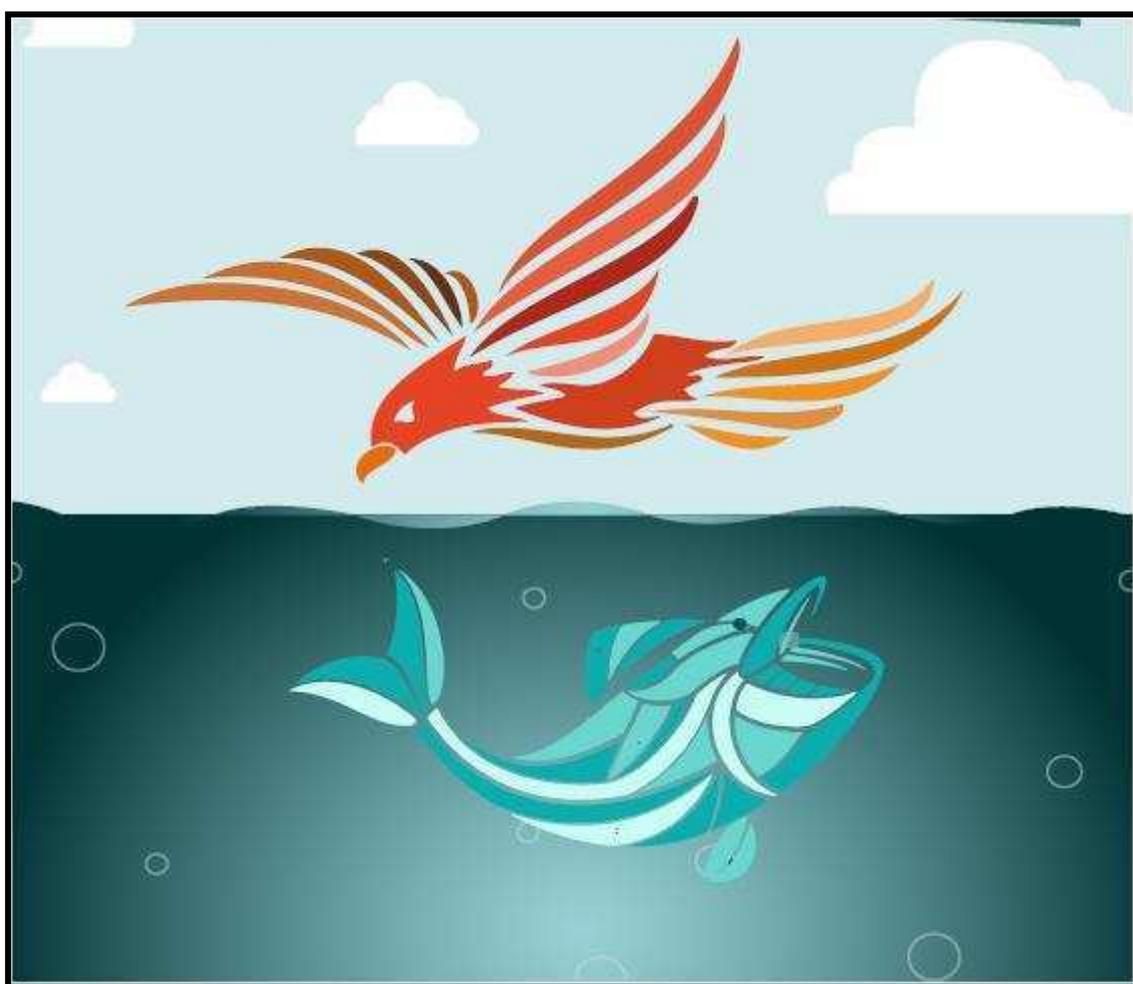
1.4.2 - Evaluación teórica de la dependencia de la señal analítica con el caudal de muestra	54
1.5 - Comparación de cifras de mérito obtenidas para Au, Cd, Cu, Zn por FAAS y por TS-FF-AAS	59
1.6 - Materiales y Métodos	60
1.6.1 – Reactivos	60
1.6.2 – Instrumental	60
1.6.3 - Tratamiento de datos	61
1.7 – Bibliografía	63
2.- Capítulo 2: Influencia de la superficie interna de la celda de atomización	65
2.1 – Introducción	65
2.2 - Optimización de las Variables operativas para la cuantificación de Oro por TS-FF-AAS con atomizador de níquel	69
2.2.1 - Naturaleza del "carrier"	69
2.2.2 - Volumen de inyección	72
2.2.3 - Caudal de "carrier"	73
2.2.4 - Material de la celda de atomización para la cuantificación de oro.: Níquel versus cuarzo	73
2.2.5 – Diámetro interno de la celda de atomización	77
2.3 - Performance analítica	77
2.4- Determinación de oro en medicamento homeopático (Aurea Oligoplex)	79
2.5 - Aplicación de método de extracción en fase sólida para preconcentración en línea de oro con detección por TS-FF-AAS	81
2.5.1 - Síntesis y operación de sólidos híbridos mesoporosos (SHM)	81
2.5.2 - Metodología de preconcentración en línea con detección por TS-FF-AAS	84
2.5.3 - Performance analítica de SPE acoplado a TS-FF-AAS	85

2.6 - Influencia de la modificación química de la superficie interna de la celda de atomización	87
2.7 - Materiales y métodos	88
2.7.1.- Reactivos	88
2.7.2 – Instrumental	89
2.7.3 - Tratamiento de datos	91
2.8 – Bibliografía	91
3.- Capítulo 3: Influencia del ambiente interno del atomizador	93
3.1 – Introducción	95
3.2 - Influencia de compuestos orgánicos sobre la señal analítica	97
3.2.1 - Solventes orgánicos	97
3.2.2 - Adición de otros compuestos ricos en carbono	100
3.3 - Efecto combinado del uso de alcoholes “carrier” y estequiometría de la llama	101
3.4 - Distribución de temperaturas en la celda de atomización	104
3.5 - Influencia del caudal de solución “carrier”	106
3.6 - Diseño experimental Box-Behnken múltiple (MBBD)	107
3.7 - Modelado empírico por cuadrados mínimos (LS)	108
3.8 - Optimización de la arquitectura de las redes neuronales artificiales (ANN)	108
3.9 - Capacidad predictiva de los modelos LS y ANN	109
3.10 - Análisis de las condiciones óptimas	111
3.11 - Determinación de magnesio en comprimidos vitamínicos	115
3.12 - Materiales y métodos	117
3.12.1.- Reactivos	117
3.12.2 – Instrumental	117
3.12.3 - Tratamiento de datos	118
3.13 – Bibliografía	118

4.- Capítulo 4: Introducción dinámica de muestras en DART-MS	121
4.1 - Introducción	121
4.2 - Análisis de la muestra por DART-MS: método estático	126
4.3 - Análisis de la muestra por DART-MS: método dinámico	127
4.4 - Métodos estadísticos para la correlación de fragmentos	131
4.4.1 - Matriz de Correlación	132
4.4.2 Análisis jerárquico de clusters - distancia angular	135
4.5 Análisis de la fragmentación de los compuestos	136
4.6 - Materiales y métodos	137
4.6.1 – Instrumentación	137
4.6.2 - Procedimiento para la introducción dinámica de muestras	138
4.7 – Bibliografía	138
5.- Capítulo 5: Generación de imágenes moleculares de superficies no planas mediante sonda robótica acoplada a ionización por plasma	139
5.1 – Introducción	141
5.2 - Generación de imágenes 3D de superficie no plana	143
5.3 - Imagen de muestra real	149
5.4 - Obtención de imágenes de mayor resolución	150
5.5 - Materiales y métodos	154
5.6 – Bibliografía	156
6.- Conclusiones	157

Introducción

“Métodos de introducción de muestras para espectometrías de alto rendimiento”



"Alice: Would you tell me, please, which way I ought to go from here?
The Cheshire Cat: That depends a good deal on where you want to get to.
Alice: I don't much care where.
The Cheshire Cat: Then it doesn't much matter which way you go.
Alice: ...So long as I get somewhere.
The Cheshire Cat: Oh, you're sure to do that, if only you walk long enough."
— Lewis Carroll, *Alice in Wonderland*

1.-Introducción

Si tal como dice uno de los dichos más antiguos y populares de la química analítica: el análisis es sólo tan bueno como la muestra conseguida, por analogía, puede pensarse que en una espectrometría de alta performance la determinación sólo puede ser tan buena como la introducción de la muestra.

Las espectrometrías de alta performance son aquellas que pueden determinar al analito aún en muy bajas concentraciones, con una gran especificidad y rapidez. Estas tienen en común que requieren que el analito se encuentre en estado gaseoso. Pero, en la mayoría de los casos, las muestras se encuentran en estado sólido o en solución. De esta manera, los mecanismos que habilitan el cambio de fase del analito requieren un cuidadoso estudio de modo tal de hacerlos eficientes. Así, los cambios de fase se transforman en el paso crítico en las valoraciones analíticas llevadas a cabo con estos espectrómetros ya que influyen de manera sustantiva las cifras de mérito del método particular. Es por ello que los desarrollos de nuevos sistemas de transferencia de materia a fase gaseosa podrían ofrecer ventajas por sobre las técnicas convencionales.

Estas técnicas pueden clasificarse según el espectro registrado. Aquellas que se basan en la medición del espectro electromagnético y están focalizadas en la determinación elemental, se dividen en función de que registren la absorción, la emisión o la fluorescencia atómica. En función de la manera en la que se genera el vapor atómico, estas técnicas reciben denominaciones particulares como: espectrometría de absorción/emisión atómica en llama (FAAS del inglés flame atomic absorption spectrometry/AES del inglés atomic emission spectrometry), fluorescencia atómica en llama (AFS, del inglés atomic fluorescence spectrometry), absorción atómica sobre horno de grafito (GFAAS, del inglés graphite furnace

atomic absorption spectrometry), emisión atómica sobre plasma inductivamente acoplado (ICP-OES, del inglés inductively-coupled plasma-optical emission spectrometry) descritos más adelante. Para poder realizar la determinación elemental mediante este tipo de técnicas y el instrumental asociado, los métodos de introducción de muestras son los responsables de volatilizar y atomizar al analito.

Por otro lado, existen espectrometrías de alta performance que registran el espectro de masas. Estas metodologías están especializadas en la detección tanto de compuestos orgánicos como elementales. Se analizan especies elementales solo cuando la introducción de muestras se produce mediante plasma inductivamente acoplado (ICP-MS, del inglés inductively coupled plasma-mass spectrometry), y se detectarán analitos orgánicos con el resto de las metodologías que se explican luego. Estas metodologías tienen en común que requieren la volatilización y además la ionización del mismo.

En este trabajo se estudiarán alternativas novedosas para la introducción de muestras en espectrometrías atómicas y espectrometrías de masas. Si bien ambas metodologías de análisis tienen en común la necesidad de vaporización total o parcial de la muestra, tienen diferencias fundamentales en cuanto a la instrumentación requerida, lo que hizo que se difundieran en épocas diferentes. De la misma manera, los métodos que habilitan la introducción de muestra evolucionaron de forma diferente tanto técnica como históricamente, pero compartiendo aún su objetivo fundamental: **la transferencia reproducible de una porción representativa de la muestra que contiene al analito al espectrómetro, con la mayor eficiencia y rapidez en la volatilización y atomización/ionización del analito.**

1.1.-Estado del arte de los métodos de introducción de muestras para espectrometría de absorción atómica

Si bien Kirchoff y Bunsen estudiaron las espectroscopías atómicas en la década de 1860, no fue sino hasta 1955 cuando se desarrollaron capacidades instrumentales que permitieran “medir” la absorción de los átomos y su relación con la concentración de un analito en una muestra de manera robusta. Nace así de la mano de Walsh^[1], la espectrometría de absorción atómica en llama (FAAS). Esta técnica se basa en la absorción de energía radiante por parte de átomos elementales de modo de producir transiciones electrónicas entre el estado basal y algún estado excitado de los electrones. Estas transiciones son propias y características para cada

átomo por lo que el método se convierte en un poderoso instrumento de análisis cualitativo y cuantitativo de metales en solución.

La señal analítica (Absorbancia) se obtiene como respuesta a la interacción de una población de átomos en estado gaseoso con una fuente de radiación que consiste normalmente en una lámpara de cátodo hueco, cuyo material se compone del elemento que se pretende analizar. Al hacer incidir esta radiación a través de la muestra, los átomos **absorberán** parte de la energía que es lo que realmente se mide. La diferencia entre energía incidente y transmitida se recibe en un detector, permitiendo realizar una determinación cuantitativa del elemento. Para la obtención de los átomos en estado fundamental se requiere de un adecuado tratamiento térmico. Este proceso se denomina vaporización/atomización de la muestra.

En sus comienzos, Kirchhoff y Bunsen introducían la muestra sólida dentro de la llama con la ayuda de una espátula, produciéndose la vaporización y atomización de la muestra en la propia llama. Si el catión de la sal introducida podía ser llevado a su estado atómico y excitado con bajo requerimiento energético (en general cationes de elementos alcalinos y alcalino-térreos), se podrían observar colores característicos correspondientes a la **emisión radiativa** (retorno al estado fundamental) si esta correspondía a la zona del espectro visible. Nótese que estos experimentos trataban de correlacionar la concentración del analito en la muestra con la intensidad de emisión atómica. Por el contrario, en el caso de la espectrometría de absorción atómica, se requiere tener una población de átomos en el estado fundamental evitando poblar el estado excitado. Esto obliga también a vaporizar/atomizar de manera eficiente. Así, desde prácticamente los primeros modelos comerciales y hasta la actualidad, la vía más tradicional y económica de realizar este proceso de vaporización/atomización utiliza una llama de combustión de aire-acetileno junto con un sistema nebulizador neumático para la introducción y transporte de la muestra a la llama, que es ahora la cubeta atómica.

A pesar del alto grado de desarrollo y aplicación que ha alcanzado la técnica, la pérdida de muestra durante el proceso de nebulización, el difícil control de la temperatura de la llama, la dilución del analito en el gran volumen de la llama, la interacción del analito con un entorno de llama fuertemente reactivo y el limitado tiempo de residencia del analito en la zona de absorción, limitan su capacidad de detección y su sensibilidad. De hecho, usualmente, el rendimiento de los procesos de nebulización/atomización es inferior al 1%. A pesar de esto se pueden conseguir límites de detección del orden de los mg L^{-1} .

Otra metodología desarrollada a fines de la década de 1960 consiste en la atomización por vía electrotérmica sobre una celda de grafito (GFAAS) ^[2,3,3]. En esta metodología algunos

microlitros de muestra (entre 10 - 100 microlitros) se depositan en el interior de la celda. Luego, se genera dentro de la celda una corriente eléctrica que se traduce en un cambio de temperatura que puede realizarse “de a pasos” o modo “step”, o mediante la aplicación de una rampa de temperatura de pendiente variable o modo “ramp”. Estos cambios de temperatura en cualquiera de sus modalidades, primero permiten evaporar el líquido de la matriz de muestra (en el caso que se trate de soluciones), luego calcinar la eventual materia orgánica que pudiera existir en dicha matriz, y por último producir un gran aumento de temperatura para volatilizar y atomizar el analito.

Las principales ventajas de la metodología del GFAAS por sobre el FAAS son: el ingreso a la celda de la muestra completa (líquida o en suspensión homogénea o “*slurry*”), el pequeño volumen de la celda que acota la dilución del analito y disminuye la dispersión radial del vapor atómico concentrándolo en el eje óptico, y la muy baja reactividad del entorno químico en atmósfera de argón. Es por eso que mediante esta técnica se pueden alcanzar límites de detección del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$, es decir, 2 a 3 ordenes más bajos de lo que se consiguen con la metodología de FAAS. En contraste, debido a factores inherentes al proceso de introducción de muestra (uso de pequeños volúmenes, baja reproducibilidad del punto de deposición del analito en la celda), a la falta de isothermicidad temporal y espacial en el volumen de celda y a las interferencias propias de la matriz de muestra, la reproducibilidad suele ser más pobre que la obtenida con FAAS. También los programas de calentamiento son más lentos (proceden en varias etapas), disminuyendo así la frecuencia analítica en comparación con FAAS. Si bien esta última cualidad no ha podido ser mejorada con el tiempo, los problemas propios de la falta de reproducibilidad se han ido subsanando mediante el uso de muestreadores automáticos, modificadores de matriz de muestra clásicos o permanentes [4-6], uso de hornos con plataformas de grafito de temperatura estabilizada o STPF, y alternativas de calentamiento transversal [7-9].

Entre los métodos de introducción de muestras más utilizados se encuentra también la generación química de vapor o *chemical vapor generation* (CVG) [10-13]. Entre ellas, la más difundida es la generación de hidruros (HG) descrita por primera vez por Holak en 1969. Esta técnica aprovecha la separación del analito de la matriz por conversión a hidruro volátil ofreciendo una ruta alternativa para el análisis de vestigios de elementos que tienen problemas específicos ya sea derivados de la matriz de muestra, el entorno reactivo de la llama en FAAS que impide la atomización eficiente, etc. A modo de ejemplo, los hidruros de As, Sb, Se, Bi, Pb y Te entre otros, han sido utilizados para la valoración de cualquiera de estos elementos con alta selectividad y a nivel de vestigios en muestras de diferentes características. Básicamente, la técnica consiste en

generar un compuesto volátil -hidruros u otros compuestos más modernamente citados en la literatura [11,12,14] -, separarlo en una celda de separación gas-líquido en la que una corriente de gas inerte arrastra el analito volatilizado hasta la celda de atomización típicamente de cuarzo, interpuesta en el camino óptico de una lámpara de cátodo hueco. La celda puede ser calentada por una llama de combustión u otras formas de calentamiento, o bien permanecer fría como es el caso de la técnica de vapor frío de mercurio.

Estas metodologías más comunes se resumen en la Tabla I.1.

Tabla I.1 Resumen de métodos de introducción más utilizados en espectrometría atómica

Método de Introducción	Tipo de Espectrómetro
Nebulizador neumático	FAAS, ICP
Nebulizador ultrasónico	FAAS, ICP
Generación química de vapor	Horno en llama (cuarzo)-AAS, ICP
Introducción directa	Horno de grafito
Aerosol térmico (TS-FF-AAS)	Horno en llama (Níquel)-AAS

Considerando lo expuesto, puede pensarse que las técnicas de introducción de muestras deberían haber ocupado un rol central en la investigación y desarrollo de la instrumentación analítica. Sin embargo, una comparación de los instrumentos producidos a lo largo de la historia muestra que los sistemas de introducción de muestras no compartieron la misma velocidad de desarrollo que los avances producidos en componentes ópticos y electrónicos. Como consecuencia de ello, el desarrollo de las técnicas instrumentales ha encontrado en el procedimiento de introducción de muestra una etapa limitante para la optimización de las cifras de mérito de una determinación analítica.

Aunque los problemas de la introducción de muestras fueron claros para la mayoría de los investigadores en este campo [15-17], la aparición en la década del 80 del plasma de argón generado inductivamente como fuente de excitación y medición de la intensidad emitida por el

analito (ICP-OES)^[18] relegó nuevamente el estudio de optimización de la introducción de muestra en las espectrometrías atómicas: ahora era la fuente de excitación la que se revelaba como un instrumento poderoso de optimización de señal, aunque su extraordinaria potencialidad quedara parcialmente opacada por la baja eficiencia del proceso de transferencia del analito al plasma. Algo similar ocurrió con el uso del ICP y la detección por espectrometría de masas (ICP-MS). Tal es así que algunos espectrómetros del mercado siguen utilizando la nebulización neumática convencional como alternativa.

Sin embargo, la literatura presenta varios trabajos dedicados a mejorar la eficiencia en la introducción de muestras que han resultado en mejoras valiosas de las cifras de mérito obtenidas. Un ejemplo de ello viene dado por el trabajo pionero del año 2000 de Berndt et al ^[19], en el cual se comienza a explotar el concepto de introducción de muestra por generación térmica de aerosol dentro de un horno montado sobre la llama, conocido en bibliografía por sus siglas en ingles TS-FF-AAS por "*thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry*".

En esta modalidad, un tubo de níquel se coloca sobre la cabeza del quemador del mechero. La muestra propulsada por una bomba peristáltica es introducida en el tubo a través de un capilar cerámico de pequeño diámetro. El tránsito de la muestra a través de este capilar a alta temperatura produce un aerosol que ingresa completamente en la celda de atomización, marcando entonces una gran diferencia con el 5 - 10 % de muestra original que termina llegando típicamente a la llama de un FAAS ^[1]. Este efecto se produce cuando el líquido alcanza una superficie que posee una temperatura mucho mayor que su punto de ebullición, creando una capa de líquido vaporizado que aísla al resto de la solución de la superficie caliente, este proceso se conoce como efecto de Leidenfrost ^[19-21]. Cuando se produce en un espacio confinado, como lo es el interior de un capilar, el gas escapa a gran velocidad arrastrando gotas de líquido que se desprenden en forma de aerosol cuando salen por el extremo abierto del capilar, tal como se muestra en la Figura I.1.



Figura I.1.- esquema de generación de aerosol por vía térmica

Por otra parte, la adecuada selección de la geometría y dimensiones de la celda de atomización permite el confinamiento optimizado del analito, aumentando el tiempo de residencia del vapor atómico en el volumen de observación respecto del FAAS. Si bien el uso de la celda u horno montado en llama aísla parcialmente a la llama del eje óptico favoreciendo la señal, cabe también tener en cuenta que un ingreso del 100% del solvente en la celda consume parte de la energía de la llama en vaporizarlo, haciendo que la temperatura en el interior de la celda descienda. Para contrarrestar al menos parcialmente este efecto, se realizan perforaciones en la base de la celda -usualmente seis equidistantes de 2 mm de diámetro- para permitir el ingreso de la llama e incrementar la temperatura [13,22]. La geometría y dimensiones de la celda han sido objeto de estudio en este trabajo tal como se discutirá en el capítulo 2.

De esta manera, la ventaja producida por el aumento en la cantidad de analito que alcanza la celda se ve opacada por una menor temperatura en el interior de la misma, generando como resultado un aumento de sensibilidad respecto de FAAS sólo en el caso de los elementos más volátiles (Cd, Zn, Pb, Cu, etc)^[23-28]. Recientemente Peng Wu et al.^[29] informaron resultados de análisis de 25 elementos mediante TS-FF-AAS que muestran que para los más volátiles se obtuvo una mejor sensibilidad, encontrándose lo contrario para el caso de los refractarios. El diseño experimental que comúnmente se utiliza en este tipo de metodologías se muestra en la Figura I.2.

Asimismo, es conocido que los sistemas tradicionales de nebulización neumática (como el que utiliza FAAS) pueden obstruirse a la altura del capilar cuando se utilizan con soluciones muy salinas o con sólidos suspendidos, obligando a trabajar en el aislamiento del analito previo a su determinación. Sin embargo, la introducción directa de este tipo de muestras es más factible mediante un sistema de generación de aerosol térmico que utiliza capilares mucho menos estrechos que en el caso de FAAS. Se ha demostrado ^[30,31] que este enfoque reduce la manipulación de la muestra, minimizando las pérdidas del analito, los riesgos de contaminación externa y el consumo de reactivos, a la vez que incrementa la frecuencia analítica.

A través del "set up" experimental de la Figura I.2, pueden encontrarse fácilmente las variables operativas que influyen en la señal obtenida, a saber: naturaleza de la solución transportadora o *carrier* (proporción en el caso de soluciones mezcla), caudal de *carrier*, volumen de inyección, relación combustible comburente de la llama, geometría y material de la celda de atomización. Estas son las variables que deben ajustarse para obtener una óptima sensibilidad analítica tal como discutiremos en los capítulos 1, 2 y 3.

Sin embargo y a pesar de la gran cantidad de trabajos publicados utilizando la metodología de TS-FF-AAS, poco trabajo se ha publicado respecto de los mecanismos que habilitan la formación del vapor atómico en la celda de atomización. Sólo dos trabajos ^[21,32] han estudiado el mecanismo de formación de aerosol por vía térmica como los usados habitualmente en TS.

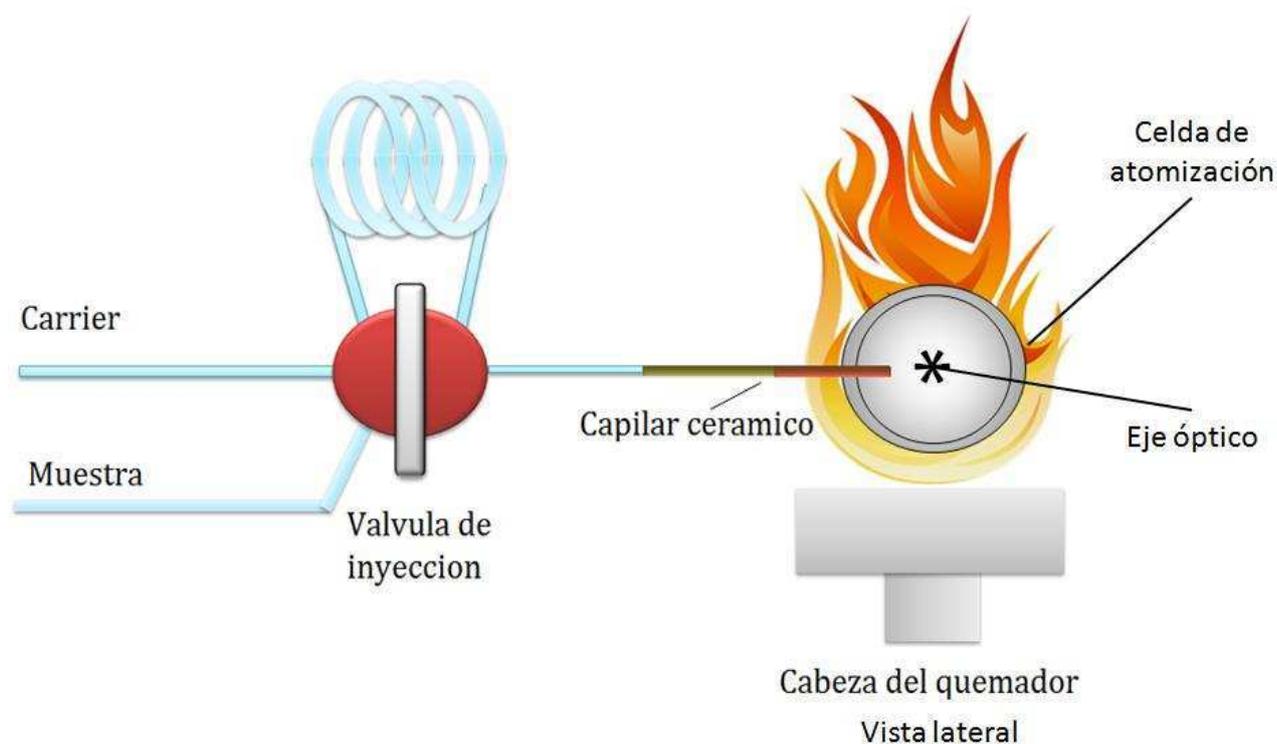


Figura I.2.- Diseño experimental empleado en las mediciones por TS-FF-AAS

Consecuentemente, los estudios de optimización de esta metodología se han basado mayormente en evidencia empírica sin un marco teórico formal que permitiera identificar las variables operativas, evaluar su influencia y la relación entre ellas. De esta manera se podrían desarrollar nuevas estrategias que permitieran disminuir los límites de detección, aumentar la sensibilidad e incrementar el abanico de aplicaciones, extendiéndolo a analitos aún no explorados dado el grado de desarrollo actual de la metodología de TS-FF-AAS. Algunos ejemplos serán presentados en los capítulos 2 y 3.

En esta línea de pensamiento, se presenta en el capítulo 1 el primer modelo teórico que permite predecir las características de la señal obtenida en TS, así como la influencia que sobre la misma tienen las distintas variables operativas que identificáramos más arriba.

En cuanto al material de la celda de atomización -que asumieramos como variable previamente-, la mayoría de los trabajos emplean tubos de níquel o aleaciones del mismo como material sin explorar otras alternativas.

En 2006, Petrucceli et. al.^[33] introdujeron el uso de tubos de titanio como material de la celda de atomización. Da Silva et al.^[34] informaron en 2009 el uso de celdas de titanio obteniendo una señal analítica para el analito cobre que duplicaba la adquirida sobre celda de níquel. Los autores proponen un mecanismo de atomización que se produciría a través de la formación de óxido de titanio superficial, y adjudican la alta sensibilidad con el tubo de Ti a la interacción producida entre la superficie de TiO₂ y el analito Cu. Sin embargo, el tubo de titanio no sólo es mucho más caro sino que la vida útil de la celda es corta y dependiente de la cantidad de orificios de la base. Además se han hecho intentos combinando tubos de níquel con tubos de titanio para incrementar la vida útil sin demasiado éxito.

Recientemente, Dedina et al.^[35] han investigado el uso de celdas de zafiro, mucho más caras pero resistentes. Hasta la fecha, sólo un trabajo^[29] informa el uso de celdas de cuarzo para la determinación de Cd con la preconcentración por la técnica de “*Cloud Point extraction*” (CPE) y la introducción de la muestra en una fase micelar.

En el capítulo 2 se mostrará la influencia de la superficie interna de la celda sobre la señal analítica para diversos analitos. Además se presentarán estudios de dispersión radial del vapor atómico, lo que está relacionado con las dimensiones (tamaño y forma) de la celda.

Como se ha señalado anteriormente, la gran limitación de la metodología de TS-FF-AAS es su baja temperatura, lo que impide que elementos proclives a formar compuestos refractarios se atomicen eficientemente. Esto origina que solo existan en bibliografía estudios de determinación de analitos volátiles como dijéramos precedentemente. Para extender la aplicabilidad de esta metodología, se encuentran en bibliografía escasos informes de derivatización para formar especies más volátiles e impedir la formación de compuestos refractarios^[32]. A pesar de que estos trabajos se mostraban promisorios, el uso de esta estrategia no se continuó difundiendo.

Particularmente en el caso de elementos refractarios como los alcalino térreos que forman hidroxio-oxo compuestos estables en la llama, desde los trabajos de Berndt et al y hasta la fecha, no hay reportes en la literatura utilizando la técnica de *thermospray*, lo que se atribuye a la poca o nula sensibilidad^[19,30] asequible.

En el capítulo 3 se evalúan solventes orgánicos solubles en agua como sustancias transportadoras del analito, de modo tal que se pueda mitigar el enfriamiento de la celda de

atomización al presentar una energía de vaporización menor que la del agua. Al mismo tiempo, estos solventes generan un entorno rédox más adecuado al reducir la concentración de oxígeno, y con ello la producción de compuestos oxigenados. Al mismo tiempo, el uso de solventes orgánicos promueve la reducción del tamaño de gota, como se mostró en varias citas de la literatura [36-39]. De hecho, la reducción de la viscosidad y de la tensión superficial debería habilitar una dinámica de desolvatación/atomización más favorable en el tubo. Se mostrarán los resultados obtenidos para magnesio como caso líder.

Aunque esta no es la primera vez que los compuestos orgánicos son empleados como *carriers* para la generación térmica de aerosoles [37,40,41], la mayor parte de la literatura se dedica a introducir la muestra dentro de espectrómetros de masas, donde la reducción del tamaño de gota se vuelve una ventaja sustantiva. Sin embargo, pocos trabajos se han dedicado a la determinación elemental en espectrometría atómica hasta la fecha [38,39].

En este trabajo y con el fin de optimizar las señales de magnesio obtenidas, se modificarán las variables operacionales de mayor influencia sobre la sensibilidad. No obstante, considerando que el método tradicional de optimizar una variable a la vez (OVAT, *one variable at a time*) no es el más adecuado para encontrar las condiciones óptimas, se evaluaron enfoques multivariados más avanzados [42] que permiten optimizar la sensibilidad, ahorrando tiempo y reactivos con el consecuente disminución del costo. La implementación del enfoque multivariado es conocido como metodología de la superficie de respuesta (RSM, del inglés *response surface method*) [13,43,44]. Las técnicas de diseño experimental en conjunto con las de RSM han demostrado ser útiles para el desarrollo, mejora y optimización de una amplia variedad de procesos.

Cuando se aplica RSM, las respuestas experimentales se ajustan usualmente por una ecuación polinómica por el método de cuadrados mínimos (LS, del inglés *least squares*). En la mayoría de los casos estudiados utilizando esta metodología, un polinomio de segundo orden puede aproximar razonablemente el comportamiento de dichos sistemas.

Por otro lado, las redes neuronales artificiales (ANN, del inglés *artificial neural networks*) representan otra herramienta inteligente para modelado multivariado no lineal. Esta herramienta es un procesador paralelo, que tiene la capacidad de guardar conocimiento experimental, haciendo que este se encuentre disponible para su uso y predicción de nuevos datos experimentales aún no medidos. Debido a sus capacidades superiores de clasificación y predicción, las ANN han impactado fuertemente como método para construcción de modelos empíricos [45,46]. Actualmente, ANN en combinación con técnicas de diseño experimental se

emplea para encontrar condiciones óptimas para una cierta metodología o proceso [13,43,44,47]. En nuestro caso se ha utilizado ANN acoplado a diseño experimental, encontrándose una mejor capacidad predictiva de comportamiento en comparación con el uso de RSM y ajuste por LS. Esta discusión se dará en el capítulo 3 con magnesio como caso líder.

1.2.-Estado del arte de los métodos de introducción de muestras para espectrometría de masas

Al igual que lo ocurrido con la espectrometría atómica, los principios del espectrómetro de masas tiene su origen en 1890 con los primeros experimentos de Thompson en el estudio de la deflexión de los rayos catódicos, siendo el primero en medir la relación masa/carga del electrón. Pero su desembarco en el campo de la química analítica ocurrió décadas más tarde en 1940 cuando se empezó a comercializar el primer modelo de espectrómetro de masas (60° sector magnético) que diseñó Alfred Nieceir.

La espectrometría de masas se basa en la medición del movimiento diferencial de los iones cargados en un campo eléctrico o magnético en vacío [48]. Debido a que la trayectoria que desarrolla un ión está directamente relacionada con su relación masa al número de cargas (m/z), y dado que el número de cargas es fácilmente determinable a través del espaciamento isotópico, se puede determinar su masa. Pero para que estas trayectorias puedan desarrollarse sin inconvenientes, los iones no deben ser susceptibles a colisiones. Es por esto que un requerimiento esencial en la instrumentación del analizador de masas es que todos los sitios que recorren los iones se encuentren en ultra alto vacío (aprox. 10^{-8} Torr) y así evitar colisiones con otras moléculas neutras que obstaculicen sus trayectorias.

Existen distintos tipos de analizadores de masa. Si bien todos ellos miden propiedades dinámicas de los haces de iones, cada uno tiene características particulares que le otorgan ventajas y limitaciones.

En el sector magnético, un haz de iones acelerados es deflectado por un campo magnético perpendicular a la trayectoria, siendo el ángulo de deflexión dependiente de la relación m/z del ión. Por lo tanto, el sitio del impacto en el detector estará relacionado con la relación m/z .

El cuadrupolo funciona como un filtro de iones. El haz circula por el centro en cuatro barras paralelas a las que se le aplica un potencial eléctrico sinusoidal que se ajusta para permitir el paso de iones de una seleccionada relación m/z . Los iones restantes no realizan trayectorias

estables y colisionan contra las paredes del cuadrupolo sin alcanzar el detector. La gran ventaja es su costo reducido, pero su desventaja es el rango acotado de masas que puede analizar y su bajo poder de resolución. [48-52].

La espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF, del inglés *time of flight*) es un método en el que la relación masa-carga de un ión se determina a través de una medición de tiempo. Los iones son acelerados por un campo eléctrico de fuerza conocida, esta aceleración resulta en que los iones igualmente cargados tienen la misma energía cinética. Por lo tanto, la velocidad del ión depende de la relación de masa a carga. Entonces se mide el tiempo que transcurre para que la partícula alcance el detector a una distancia conocida. Este tiempo dependerá de la relación de masa a carga de la partícula ya que las partículas más pesadas alcanzan velocidades más bajas. A partir de este tiempo transcurrido y los parámetros experimentales conocidos, se encuentra la relación masa-carga del ión. [48-52]

Por otro lado, en las últimas décadas se ha explotado el uso de analizadores tipo trampa que consisten en capturar el haz en un espacio acotado utilizando potenciales eléctricos alternantes entre electrodos. Se describen a continuación las variedades comerciales más comunes.

El Quadrupole Ion Trap: Los iones se almacenan de forma dinámica en un dispositivo de almacenamiento de iones tipo cuadrupolo tridimensional. Los potenciales pueden ser escaneados para expulsar sucesivas relaciones masa-carga de la trampa en el detector (eyección de masa selectiva) y para seleccionar precursores en experimentos tandem. [48-52]

Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (Resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier, FT-ICR): Los iones se mueven en una trayectoria circular debida a un campo magnético aplicado a la trampa. La frecuencia de ciclotrón del movimiento circular del ión está determinada por su relación m/z . Por lo tanto, mediante efectos de carga inductivos se puede registrar el movimiento de los iones, pudiéndose determinar la frecuencia de ciclotrón y con ello la masa de un ión, a través de un tratamiento por transformada de Fourier de la señal registrada. En este analizador no hay separación temporal de iones, más bien todos los iones de un rango particular están atrapados en el interior, y un campo eléctrico externo aplicado ayuda a generar una señal [48-52].

Orbitrap: En un orbitrap, los iones son atrapados debido a que su atracción electrostática hacia el electrodo interior se equilibra por acción de las fuerzas centrífugas. De este modo, los iones realizan trayectorias elípticas alrededor del electrodo interior llamado *spindle*. Además, los iones también se mueven hacia atrás y adelante a lo largo del eje del electrodo central por lo que

sus trayectorias en el espacio se asemejan a hélices. Las oscilaciones axiales de los iones se detectan por inducción, y mediante el procesamiento de datos de una manera similar a la utilizada en la transformada de Fourier de espectrometría de masas de resonancia de ciclotrón de iones (FT-ICR), la trampa se puede utilizar como un analizador de masas. Como en FT-ICR, todos los iones se detectan simultáneamente sobre un cierto período de tiempo dado y la resolución se puede mejorar mediante el aumento de la fuerza del campo o mediante el aumento del tiempo de detección. Orbitrap difiere de FT-ICR por la ausencia de campo magnético y RF [48-52].

A pesar de la alta complejidad instrumental, esta técnica posee excelente selectividad y una alta sensibilidad, es por esta razón que se encuentra ampliamente difundida en el ámbito de la química analítica para aplicaciones muy diversas [48-52].

En un experimento típico de MS, se introduce una muestra sólida o líquida que se volatiliza y luego se ioniza parcialmente. Este proceso puede generar que algunas de las moléculas de la muestra se rompan en fragmentos cargados estables que ingresan dentro del espectrómetro. Por esta razón, el gran desafío que impone esta técnica es el acoplamiento entre una muestra o sistema que se encuentra a presión atmosférica y un analizador de masas que se encuentra en ultra alto vacío.

Actualmente existe una amplia variedad de técnicas de introducción/ionización utilizadas en MS. Algunas de las técnicas de ionización excitan una molécula neutra que eyecta un electrón para formar un catión radical (M^+). Otras técnicas involucran reacciones de formación de aductos con un catión (generalmente con un protón, sodio, potasio o amonio) ($M+\text{catión}$). Algunas técnicas de ionización son muy suaves y producen moléculas intactas, pero otras son muy energéticas y causan que los iones se fragmenten. Aunque la fragmentación suele complicar el espectro de masas, también provee información estructural para la identificación de compuestos desconocidos. La energía impartida durante la ionización es la que controla la fragmentación observada en el espectro. En el caso de un experimento de masa tándem, la fragmentación se logra mediante colisiones de energía controlada. Debido a la variedad de técnicas de introducción/ionización de muestras encontrada en bibliografía, a continuación se describen los fundamentos de las técnicas más difundidas y utilizadas, poniendo énfasis en las diferencias entre técnicas a presión reducida y a presión atmosférica.

Debido a que el analizador de masas requiere operación en condiciones de alto vacío, los primeros sistemas de introducción/ionización de muestras utilizaban cámaras cerradas que se evacuaban, generando un nivel de vacío al menos similar al que se encuentra dentro del analizador de masas. Los gases y muestras con elevada presión de vapor se introducían

directamente en la fuente de ionización (por ejemplo a la salida de un cromatógrafo de gases), los líquidos y sólidos eran usualmente calentados para incrementar la presión de vapor y proceder al análisis. Si el analito era térmicamente lábil, la muestra debía ser ionizada directamente desde la fase condensada, agregándose una complejidad adicional. [49–51]

La forma clásica de ionización de analitos en fase gaseosa es mediante el uso de la ionización por impacto electrónico (EI) [48-52]. Consiste en hacer circular corriente por un filamento de modo que emita electrones de alta energía que impacten con el analito, ionizándolo. Si bien es un método muy eficiente de ionización, la alta energía sobre los enlaces produce una extensa fragmentación haciendo que el ión molecular no se observe para varios compuestos.

Una alternativa es la ionización química (CI) [48-52]. CI es una técnica de ionización “suave” que produce iones con menor deposición de energía, y como resultado, menos fragmentación. Como ésta técnica incrementa la abundancia del ión molecular, se utiliza para verificar la masa molecular de un analito, y como complemento de la información estructural obtenida por EI. Sólo se requiere una pequeña modificación de la fuente de EI para realizar experimentos de CI. Se utiliza un gas reactivo (usualmente metano o amoníaco) que al acoplarse a la celda de CI produce aductos iónicos (CH_5^+ o NH_4^+) que son excelentes donores de protones, y transfieren la carga a los analitos.

Fast Atom Bombardment (FAB) [48-52] y *Secondary Ion Mass Spectrometry* (SIMS) [48-52] utilizan átomos o especies de alta energía para pulverizar, esparcir e ionizar la muestra en un solo paso. En estas técnicas, un haz de átomos neutros (FAB) o iones (SIMS) se enfoca en la muestra en fase condensada. El impacto de este haz de alta energía causa que un sector de la muestra se pulverice, se esparza en la cavidad y se ionice en un solo paso. Dado que no se requiere calentamiento, éstas técnicas (especialmente FAB) son útiles para el estudio de compuestos térmicamente lábiles. En cuanto a las diferencias entre técnicas, FAB requiere de la aplicación de una matriz (usualmente glicerol) sobre la muestra, y es deseable que el analito sea soluble en esta matriz. En cambio SIMS no requiere matriz, lo que provoca que el muestreo sea más complejo. Su utilidad mayor es en estudios de química de superficies.

Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) [48-52,53] es una técnica utilizada para analizar moléculas de muy altos pesos moleculares. Se basa en vaporizar e ionizar el analito directamente desde la fase condensada. En MALDI, la muestra se mezcla con un compuesto matriz elegido de tal manera que presente absorción a la longitud de onda del láser, luego la mezcla se seca y se coloca al vacío. La desorción y vaporización son producidas por un mismo pulso de láser que se enfoca sobre esta mezcla seca, siendo la energía absorbida por la matriz. Esta energía provoca la

eyección de iones de analito desde la superficie. Aunque anteriormente ya existían otras técnicas basadas en la ionización por láser (como *laser desorption ionization* (LDI) [48-52], esta técnica produjo una gran revolución debido a que, no sólo alcanza a volatilizar e ionizar compuestos con pesos moleculares elevados, sino que es una técnica de desorción láser universal ya que no es el analito el que absorbe la energía del pulso láser, sino que es la matriz la que absorbe la energía y la transfiere al analito. MALDI es generalmente utilizada en el análisis de polímeros, proteínas, ácidos nucleicos, y péptidos. Mediante esta técnica se pueden analizar compuestos con un peso molecular de hasta 200.000 Daltons, límite de masa que se incrementa continuamente con las mejoras de los detectores [54-56].

Electrospray ionization (ESI) [57-59] es una técnica que se utiliza mayoritariamente para acoplar un cromatógrafo líquido a un espectrómetro de masas o para analitos térmicamente lábiles y de alto peso molecular. En esta metodología, la muestra líquida circula dentro de un capilar metálico y el *electrospray* se crea aplicando un alto potencial (1-6 kV) en el metal del capilar. Entonces el campo eléctrico induce una carga neta sobre las pequeñas gotas de líquido que abandonan el capilar. A medida que el solvente se evapora, la gota se achica y la densidad de carga sobre la superficie se incrementa. La gota finalmente alcanza un punto donde la repulsión coulombica de la carga eléctrica supera la tensión superficial que la mantiene unida, haciendo que la gota explote liberando analitos iónicos con cargas múltiples. Debido a este hecho, los compuestos de alto peso molecular son observados a bajos valores de m/z , lo que incrementa el rango de masas susceptible de ser analizado. En la Tabla I.2 se resumen los principales métodos de introducción/ionización de muestras a baja presión que se utilizan para espectrometría de masas.

Tabla I.2.- Principales métodos de introducción/ionización de muestras a baja presión para espectrometría de masas.

Nombre	Abreviatura	Descripción
Analito en fase gaseosa		
Impacto electrónico	EI	Electrones energéticos que impactan sobre el gas analizado
Ionización Química	CI	Iones reactivos que impactan sobre el gas analizado
Ionización de campo	FI	Electrodo de potencial elevado que ioniza analitos en fase gaseosa
Desorción		
Desorción de campo	FD	Electrodo de potencial elevado que desorbe líquidos en el extremo
Bombardeo con átomos rápidos	FAB	Átomos energéticos que impactan sobre la superficie analizada
Espectrometría de masas de iones secundarios	SIMS	Iones energéticos que impactan sobre la superficie analizada
Desorción por láser	LD	Pulso láser de alta energía que desorbe analitos superficiales
Desorción por plasma	PD	Plasma que desorbe analitos superficiales
Desorción láser asistida por matriz	MALDI	Un pulso de láser de alta energía excita la matriz y transfiere parte de la energía al analito que se desorbe y ioniza.
Formación de aerosol		
Ionización por electrospray	ESI	Formación de aerosol por potencial elevado en el extremo de nebulizador
Ionización por termovaporización	TS	Formación de aerosol por temperatura elevada en el extremo de nebulizador

En la actualidad, un campo muy fructífero de investigación en el área de la espectrometría de masas consiste en la ionización de los analitos bajo condiciones ambientales en sistemas abiertos conocido como *ambient ionization MS* [57,58,60–65]. Quince años atrás hubiera sido impensable sostener un objeto delante del espectrómetro de masas y adquirir su espectro en

tiempo real sin necesidad de tratamiento previo de la muestra. Este nuevo enfoque ha sido un avance revolucionario en el campo de la espectrometría de masas porque habilita la ionización directa de moléculas superficiales, sin cerramientos, con mínimo pretratamiento de muestra, y produciendo una ionización suave de modo tal que la mayor parte de los iones sean detectados con mínima fragmentación.

En 2004 Cooks y colaboradores^[66] introducen por primera vez el concepto de análisis bajo condiciones ambientales mediante la metodología de *desorption electrospray ionization* (DESI). En este caso, un aerosol generado por ESI se hace impactar sobre una muestra sólida en un sistema abierto. Estas pequeñas gotas cargadas solubilizan parcialmente al analito para luego realizar una trayectoria hacia el espectrómetro de masas.

Casi simultáneamente, en 2005 Cody y colaboradores^[67] desarrollan una metodología con una filosofía semejante de ionización en condiciones ambientales. Se utiliza una fuente de plasma de helio que impacta sobre la muestra desorbiendo al analito térmicamente e ionizándolo previamente a su ingreso al espectrómetro de masas. Se habilita de esta manera un análisis directo en tiempo real denominado por sus siglas en inglés (DART) ^[65,68,69].

DART es una de las técnicas más versátiles de ionización a presión atmosférica. Se trata de una fuente de ionización química basada en una descarga tipo “*glow*” que opera a presión atmosférica. Los iones se generan por desorción térmica seguida de protonación en la fase gaseosa. Entonces, en un experimento típico, la muestra se coloca sobre un soporte entre la salida de la fuente de DART y el orificio de entrada del espectrómetro de masas. En esta región, un flujo de átomos de helio metaestables a alta temperatura generan “*clusters*” de agua protonada. Estos “*clusters*” reaccionan con moléculas desorbidas térmicamente de la superficie y producen moléculas de analito protonado que ingresarán al MS, tal como se muestra en la Figura I.3. La ventaja de esta metodología con respecto a las basadas en la formación de *electrospray* es que se pueden analizar tanto analitos polares como no polares (mientras puedan desorberse térmicamente) ya que no es necesaria la presencia de ningún solvente para promover la desorción/ionización. El mecanismo más aceptado se conoce como *transient microenvironment* ^[70,71].

En el capítulo 4 se explora el concepto de introducción dinámica de la muestra para DART-MS en contraste con la introducción estática clásica. De esta manera, se genera un nuevo eje temporal que será utilizado para correlacionar fragmentos provenientes de una misma molécula y así simplificar el espectro de masas obtenido. Al mismo tiempo se obtiene información estructural de los compuestos presentes en la muestra sin necesidad de separación previa.

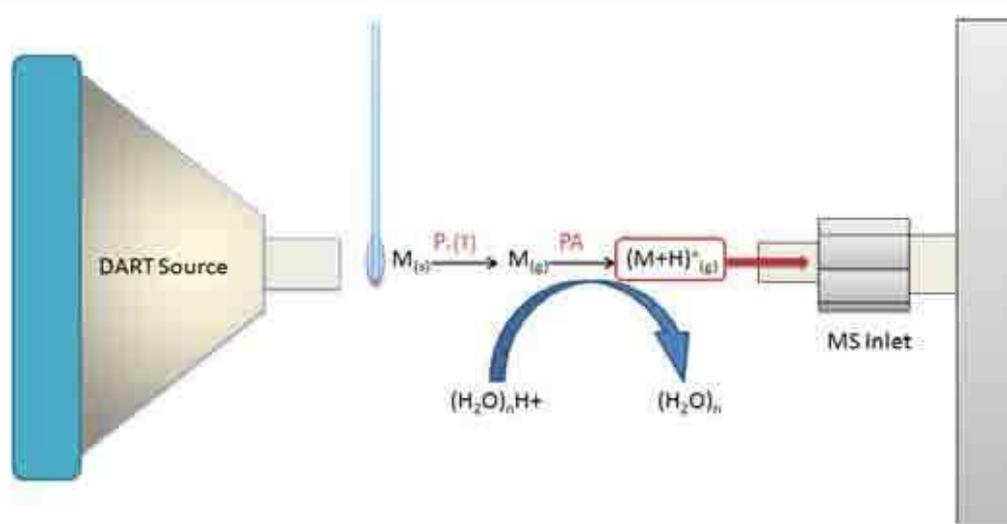


Figura I.3.-Esquema de funcionamiento del sistema DART.

A partir de los primeros trabajos de Cody y Cooks se desarrollaron diferentes tipos de métodos de introducción a presión atmosférica [57,58,60–65].

El interés en el uso de métodos de análisis a presión atmosférica se debe a que estas técnicas de introducción/ionización de muestras evitan introducir la superficie de la muestra en un sistema de vacío, eliminando los inconvenientes y restricciones propios de tal operación. Además, el análisis realizado en condiciones ambientales brinda la oportunidad de estudiar materiales en condiciones ambientales reales. De allí que el uso de estas novedosas metodologías, ha permitido liberar al análisis de restricciones de tamaño y de volatilidad. Estas técnicas también permiten el análisis directo de la superficie de varios materiales con una mínima preparación de muestra, simplificándolo y acelerándolo. Son utilizados actualmente para el análisis rápido de diversos materiales tales como medicamentos, explosivos y alimentos, entre otros.

El desarrollo de las nuevas metodologías de introducción de muestras que permiten la desorción/ionización de pequeñas secciones de muestra, sumado a la gran sensibilidad que ofrecen las espectrometrías de masas al detectar efectivamente una escasa cantidad de iones, habilitaron el desarrollo de una novedosa rama dentro de la espectrometría de masas que es la de generación de imágenes moleculares o *mass spectrometry imaging* (MSI). Las metodologías de MSI realizan un muestreo localizado de la muestra en diversos sitios registrando el espectro de masas y asociándolo a la posición donde fueron capturados. Luego, mediante un tratamiento adecuado se pueden generar las imágenes moleculares de los distintos iones registrados en la muestra. La principal fortaleza de este tipo de técnicas es que permiten la visualización de múltiples distribuciones moleculares sin la necesidad de marcadores químicos o anticuerpos.

Tabla I.3.- Resumen de métodos de introducción/ ionización de muestras presión atmosférica para espectrometría de masas.*

Abreviación	Nombre en inglés	Cita	Abreviación	Nombre en inglés	Cita
Extracción Sólido-Líquido					
DESI	Desorption electrospray ionization	72	DICE	Desorption ionization by charge exchange	75
EASI	Easy ambient ionic spray ionization	73	LMJ-SSP	Liquid micro junction-surface sampling probe	76
DAPPI	Desorption atmospheric pressure photo-ionization	74	LESA	Liquid extraction surface analysis	77
Plasma					
DART	Direct analysis in real time	78	OCBI	Desorption corona beam ionization	84
FAPA	flowing atmospheric pressure afterglow	79	PADI	Plasma assisted desorption ionization	85
ASAP	Atmospheric solids analysis probe	80	APTID	Atmospheric pressure thermal desorption/ionization	86
LTP	Low temperature plasma probe	81	HAPGDI	Helium atmospheric pressure glow discharge ionization	87
DAPCI	Desorption atmospheric pressure chemical ionization	82	PPAMS-LTP	Plasma pencil atmospheric mass spectrometry LTP	88
DBDI	Dielectric barrier discharge ionization	83	MHCD	Ambient microhollow cathode discharge ionization	89
En dos pasos: Térmica/meccánica desorción/ablación (sin laser)					
ND-EESI	Neutral desorption extractive electrospray ionization	90	AP-TD/SI	Atmospheric pressure thermal desorption secondary ionization	92
BADCI	Beta electron assisted direct chemical ionization	91	PESI	Probe electrospray ionization	93
En dos pasos: ablación basada en laser					
ELDI	Electrospray assisted laser desorption ionization	94	LEMS	Laser electrospray mass spectrometry	99
MALDES	Matrix assisted laser desorption electrospray ionization	95	LD-APCI	Laser desorption atmospheric pressure chemical ionization	100
LAESI	Laser ablation electrospray ionization	96	IR-LAMICI	Infrared laser ablation metastable induced chemical ionization	101
LADES	Laser assisted desorption electrospray ionization	97	PAMLDI	Plasma assisted multiwavelength laser desorption ionization	102
LDESI	Laser desorption electrospray ionization	98	LAAPPI	Laser ablation atmospheric pressure photoionization	103
Desorción acústica					
RADIO	Radio frequency acoustic desorption and ionization	104	LIAD/APCI	Laser induced acoustic desorption/atmospheric pressure chemical ionization	106
LIAD/ESI	Laser induced acoustic desorption electrospray ionization	105	SAWN	Surface acoustic wave nebulization	107
Multimodo					
DEMI	Desorption electrospray/metastable induced ionization	108			
Otras técnicas					
REIMS	Rapid evaporative ionization mass spectrometry	109	SwiFerr	Switched ferroelectric plasma ionizer	111
LDI	Laser desorption ionization	110	LSI	Laser spray ionization	112

* Las técnicas se listan por su nombre en inglés debido a que así son conocidas en el lenguaje habitual de esta disciplina.

Las bases generales del procedimiento se describen en la Figura I.4. Para poder realizarlo, un espectrómetro de masas sólo debe estar equipado con una sonda o haz capaz de producir iones de una sección localizada de la superficie de la muestra, y con una plataforma con capacidad de movimiento en las coordenadas x e y. Mediante la utilización de software especializado, el movimiento de la plataforma puede ser programado para permitir un barrido de la superficie de la muestra de manera continua o discreta. Cada espectro de masas individual adquirido, es asignado a una sección particular de la muestra donde fue registrado, creando un “*pixel*” de la imagen. Posteriormente, se utiliza un software para reunir toda la información de los “*pixels*” en una imagen cuya escala de color es relativa a la intensidad de señal de un ión particular donde se visualiza la distribución molecular a lo largo de las dimensiones de la muestra. Entonces es posible obtener tantas imágenes como iones se detecten en la muestra.

A pesar de que los primeros ejemplos de imágenes moleculares fueron obtenidos hace 40 años ^[113], sólo hace pocos años que se ha empezado a extender el uso de MSI. El desarrollo de las técnicas de generación de imágenes basadas en MALDI-MS a fines de la década del 90 ha abierto un amplio rango de aplicaciones biológicas ^[114]. Rápidamente, la histología molecular basada en imágenes generadas por espectrometría de masas se convirtió en una nueva tecnología prometedora para el descubrimiento de biomarcadores, distribución de metabolitos de drogas, análisis de lípidos y proteómica ^[115-126].

Desde ese momento se fueron utilizando cada vez más técnicas de ionización para la generación de imágenes moleculares. Esencialmente tres técnicas de desorción/ionización son típicamente utilizadas para generar un muestreo localizado, y de esta manera, adquirir datos de un experimento de MSI: SIMS, MALDI, DESI y técnicas relacionadas. Sin embargo, experimentos de MSI basado en otras técnicas de escaneo como PESI y ablación láser también se han explorado.

Actualmente, MSI es una tecnología en constante evolución que se ha aplicado a imágenes de tejidos biológicos, films delgados de bacterias, hojas y tallos de plantas, cuarzo, placas de circuitos y huellas digitales, entre otros ^[127-140]. Los continuos adelantos en la instrumentación en espectrometría de masas continúan ampliando el rango de aplicaciones para las cuales MSI puede ser utilizado.

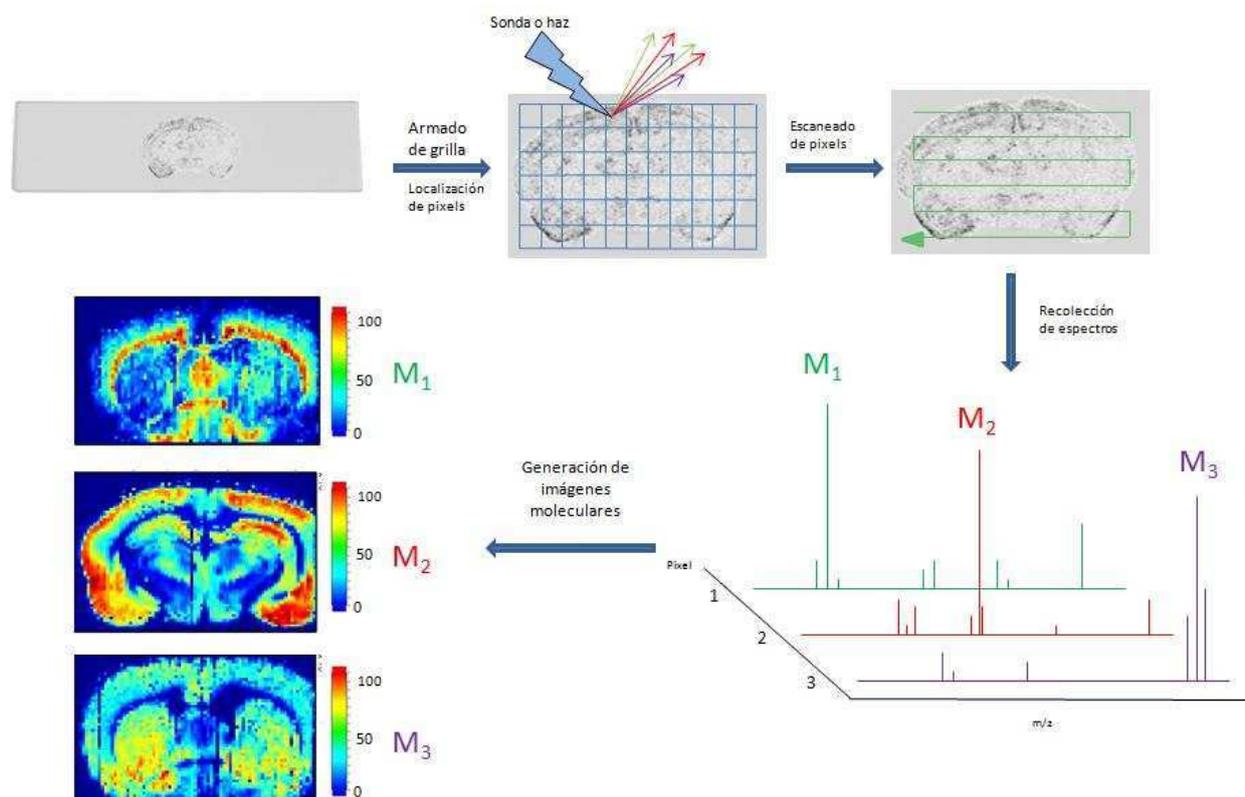


Figura I.4.- Visión general de un experimento de MSI. La muestra se monta sobre una superficie y, si es requerido por la técnica de desorción/ionización, se aplica una capa de matriz. Luego el espectrómetro de masas es programado para adquirir espectros de determinados sitios de muestreo sobre la superficie, para luego compilar en un set de datos el espectro de masas y el sitio de adquisición. Entonces la intensidad de cualquier ión puede ser visualizada en una escala de color arbitrario que depende de la intensidad del ión.

En el capítulo 5 se mostrará una prueba de principio de un método de MSI para el análisis sistemático de superficies no planas, irregulares o curvadas acoplando una sonda robótica con una fuente de ionización DART.

Bibliografía

- [1] G.F. Kirkbright, Michael Sargent, Atomic Absorption and Fluorescence Spectroscopy Hardcover, Academic Press Inc , **1975**.
- [2] B. V. L'vov, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **1997**, *52*, 1–23.
- [3] B. V. L'vov, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2011**, *66*, 557–564.
- [4] S. M. Orimoto, T. A. Shino, K. W. Agatsuma, **2010**, *26*, 809–813.
- [5] H. M. Ortner, E. Bulska, U. Rohr, G. Schlemmer, S. Weinbruch, B. Welz, **2002**, *57*, 1835–1853.
- [6] Y. Wu, B. Hu, T. Peng, Z. Liao, Z. Jiang, *Talanta* **2001**, *55*, 841–5.
- [7] D. a. Katskov, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2007**, *62*, 897–917.
- [8] D. A. Katskov, **2005**, 220–226.
- [9] D. a. Katskov, N. Darangwa, *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 1079.
- [10] Z. Fan, Z. Jiang, F. Yang, B. Hu, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *510*, 45–51.
- [11] R. E. Sturgeon, R. C. De Campos, **2002**, *57*, 2047–2056.
- [12] A. D'Ulivo, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2004**, *59*, 793–825.
- [13] R. Moretto Galazzi, M. A. Z. Arruda, *Talanta* **2013**, *117*, 543–8.
- [14] R. E. Sturgeon, J. W. Lam, *J. Anal. At. Spectrom.* **1999**, *14*, 785–791.
- [15] A. W. Boorn, **1984**, *56*.
- [16] D. D. Smith, R. F. Browner, *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 533–537.
- [17] R. F. Browner, A. W. Boorn, D. D. Smith, **1982**, 1411–1419.
- [18] C. Støving, H. Jensen, B. Gammelgaard, S. Stürup, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *84*, 209–14.
- [19] A. Gáspár, H. Berndt, *Spectrochim. acta, Part B At. Spectrosc.* **2000**, *55*, 587–597.
- [20] J. Davies, H. Berndt, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *479*, 215–223.
- [21] M. L. Brancalion, E. Sabadini, M. a Z. Arruda, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6527–6533.

- [22] M. L. Brancalion, E. Sabadini, M. a Z. Arruda, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2009**, *64*, 89–94.
- [23] E. Rodrigues Pereira-Filho, H. Berndt, M. Aur??lio Zezzi Arruda, *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 1308–1315.
- [24] G. A. Petrucelli, R. J. Poppi, R. L. Mincato, E. R. Pereira-Filho, *Talanta* **2007**, *71*, 620–626.
- [25] K. Miranda, E. Rodrigues Pereira-Filho, *Anal. Methods* **2009**, *1*, 215.
- [26] X. Wen, P. Wu, K. Xu, J. Wang, X. Hou, *Microchem. J.* **2009**, *91*, 193–196.
- [27] C. R. T. Tarley, E. D. C. Figueiredo, G. D. Matos, *Anal. Sci.* **2005**, *21*, 1337–1342.
- [28] F. M. de Oliveira, C. Marchioni, J. a V. D. a Barros, A. C. do Lago, C. Wisniewski, P. O. Luccas, *Anal. Chim. Acta* **2014**, *809*, 82–7.
- [29] P. Wu, Y. Zhang, Y. Lv, X. Hou, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2006**, *61*, 1310–1314.
- [30] H. Berndt, E. Pulvermacher, *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 1826–1834.
- [31] A. Gáspár, É.´ Széles, H. Berndt, *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 136–140.
- [32] G. D. Matos, M. a Z. Arruda, *Talanta* **2008**, *76*, 475–478.
- [33] G. a Petrucelli, P. K. Stocco, M. I. M. S. Bueno, E. R. Pereira-Filho, *J. Anal. At. Spectrom.* **2006**, *21*, 1298.
- [34] M. da Silva Gomes, E. Rodrigues Pereira-Filho, *Microchem. J.* **2009**, *93*, 93–98.
- [35] S. Musil, T. Matoušek, J. Dědina, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2015**, *108*, 61–67.
- [36] J. W. Novak, R. F. Browner, **1980**, *792*, 792–796.
- [37] J. W. Novak, R. F. Browner, *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 287–290.
- [38] A. W. Boorn, R. F. Browner, *Anal. Chem.* **1982**, *54*, 1402–1410.
- [39] J. Mora, A. Canals, V. Hernandis, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **1996**, *51*, 1535–1549.
- [40] C. R. T. Tarley, E. D. C. Figueiredo, G. D. Matos, E. Section, **2004**, 2709–2714.

- [41] F. Zarrin, S. L. Kaufman, J. R. Socha, *J. Aerosol Sci.* **1991**, *22*, S343–S346.
- [42] E. D. Dodds, M. R. McCoy, L. D. Rea, J. M. Kennish, **2005**, *40*, 419–428.
- [43] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, L. A. Escaleira, *Talanta* **2008**, *76*, 965–77.
- [44] H. Ebrahimzadeh, N. Tavassoli, O. Sadeghi, M. M. Amini, *Talanta* **2012**, *97*, 211–7.
- [45] A. A. Spectrometry, **2015**.
- [46] G. M. Escandar, A. C. Olivieri, N. (Klaas) M. Faber, H. C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, R. J. Poppi, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 752–765.
- [47] Y. Arslan, T. Matoušek, J. Kratzer, S. Musil, O. Benada, M. Vobecký, O. Y. Ataman, J. Dědina, *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 828–837.
- [48] Gross, Jürgen H, *Mass Spectrometry a textbook*, Springer, **2005**
- [49] T. Y. Zhang, A. Brajter-Toth, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *442*, 97–103.
- [50] T. M. Brewer, J. Castro, R. K. Marcus, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2006**, *61*, 134–149.
- [51] J. Slobodni, M. E. Jager, S. J. F. Hoekstra-oussoren, M. Honing, B. L. M. Van Baar, U. A. T. Brinkman, **1997**, *32*.
- [52] K. Dreisewerd, *The Desorption Process in MALDI*, **2003**.
- [53] M. L. Reyzer, R. M. Caprioli, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 29–35.
- [54] M. E. Bier, *Electrospray MALDI Mass Spectrom.* **2010**, 265–344.
- [55] C. G. Yang, M. E. Bier, *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1663–71.
- [56] A. A. Aksenov, M. E. Bier, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 219–230.
- [57] M.-Z. Huang, C.-H. Yuan, S.-C. Cheng, Y.-T. Cho, J. Shiea, *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto, Calif.)* **2010**, *3*, 43–65.
- [58] M.-Z. Huang, S.-C. Cheng, Y.-T. Cho, J. Shiea, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *702*, 1–15.
- [59] G. L. Bosco, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 781–794.
- [60] M. J. Culzoni, P. Dwivedi, M. D. Green, P. N. Newton, F. M. Fernández, *Med. Chem. Commun.* **2014**, *5*, 9–19.

- [61] A. Venter, M. Nefliu, R. Graham Cooks, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 284–290.
- [62] D. J. Weston, *Analyst* **2010**, *135*, 661.
- [63] E. Monge F Fernandez, M. F. Mari, **2015**.
- [64] G. a Harris, L. Nyadong, F. M. Fernandez, *Analyst* **2008**, *133*, 1297–301.
- [65] A. T. Navare, J. G. Mayoral, M. Nouzova, F. G. Noriega, F. M. Fernández, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 3005–13.
- [66] Z. Takats, *Science (80-.)*. **2004**, *306*, 471–473.
- [67] R. B. Cody and J. A. Laramée, USA Pat., 6949741, 2005.
- [68] J. H. Gross, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 63–80.
- [69] C. Y. Pierce, J. R. Barr, R. B. Cody, R. F. Massung, A. R. Woolfitt, H. Moura, H. a Thompson, F. M. Fernandez, *Chem. Commun. (Camb)*. **2007**, 807–9.
- [70] L. Song, A. B. Dykstra, H. Yao, J. E. Bartmess, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 42–50.
- [71] L. Song, S. C. Gibson, D. Bhandari, K. D. Cook, J. E. Bartmess, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 10080–10088.
- [72] Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. *Science* 2004, *306*, 471.
- [73] Haddad, R.; Sparrapan, R.; Eberlin, M. N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, *20*, 2901.
- [74] Haapala, M.; Pol, J.; Saarela, V.; Arvola, V.; Kotiaho, T.; Ketola, R. A.; Franssila, S.; Kauppila, T. J.; Kostianen, R. *Anal. Chem.* 2007, *79*, 7867.
- [75] Chan, C.-C.; Bolgar, M. S.; Miller, S. A.; Attygalle, A. B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, *21*, 1554.
- [76] Van Berkel, G. J.; Sanchez, A. D.; Quirke, J. M. E. *Anal. Chem.* 2002, *74*, 6216.
- [77] Kertesz, V.; Van Berkel, G. J. *J. Mass Spectrom.* 2010, *45*, 252.
- [78] Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. *Anal. Chem.* 2005, *77*, 2297.
- [79] Andrade, F. J.; Shelley, J. T.; Wetzell, W. C.; Webb, M. R.; Gamez, G.; Ray, S. J.; Hieftje, G. M. *Anal. Chem.* 2008, *80*, 2646.
- [80] McEwen, C. N.; McKay, R. G.; Larsen, B. S. *Anal. Chem.* 2005, *77*, 7826.

- [81] Harper, J. D.; Charipar, N. A.; Mulligan, C. C.; Zhang, X.; Cooks, R. G.; Ouyang, Z. *Anal. Chem.* 2008, 80, 9097.
- [82] Takats, Z.; Cotte-Rodriguez, I.; Talaty, N.; Chen, H.; Cooks, R.G. *Chem. Commun.* 2005, 15, 1950.
- [83] Na, N.; Zhao, M.; Zhang, S.; Yang, C.; Zhang, X. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2007, 18, 1859.
- [84] Wang, H.; Sun, W.; Zhang, J.; Yang, X.; Lin, T.; Ding, L. *Analyst* 2010, 135, 688.
- [85] Ratcliffe, L. V.; Rutten, F. J. M.; Barrett, D. A.; Whitmore, T.; Seymour, D.; Greenwood, C.; Aranda-Gonzalvo, Y.; Robinson, S.; McCoustra, M. *Anal. Chem.* 2007, 79, 6094.
- [86] Chen, H.; Zheng, O. Y.; Cooks, R. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2006, 45, 3656.
- [87] Andrade, F. J.; Wetzel, W. C.; Chan, G. C. Y.; Webb, M. R.; Gamez, G.; Ray, S. J.; Hieftje, G. M. *J. Anal. At. Spectrom.* 2006, 21, 1175.
- [88] Stein, M. J.; Lo, E.; Castner, D. G.; Ratner, B. D. *Anal. Chem.* 2012, 84, 1572.
- [89] Symonds, J. M.; Galhena, A. S.; Fernandez, F. M.; Orlando, T. M. *Anal. Chem.* 2010, 82, 621.
- [90] Chen, H.; Wortmann, A.; Zenobi, R. *J. Mass Spectrom.* 2007, 42, 1123.
- [91] Steeb, J.; Galhena, A. S.; Nyadong, L.; Janata, J.; Fernandez, F. M. *Chem. Commun.* 2009, 31, 4699.
- [92] Basile, F.; Zhang, S. F.; Shin, Y. S.; Drolet, B. *Analyst* 2010, 135, 797.
- [93] Hiraoka, K.; Nishidate, K.; Mori, K.; Asakawa, D.; Suzuki, S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007, 21, 3139.
- [94] Shiea, J.; Huang, M. Z.; HSu, H. J.; Lee, C. Y.; Yuan, C. H.; Beech, I.; Sunner, J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 3701.
- [95] Sampson, J. S.; Hawkridge, A. M.; Muddiman, D. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006, 17, 1712.
- [96] Nemes, P.; Vertes, A. *Anal. Chem.* 2007, 79, 8098.
- [97] Rezenom, Y. H.; Dong, J.; Murray, K. K. *Analyst* 2008, 133, 226.
- [98] Sampson, J. S.; Muddiman, D. C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23, 1989.
- [99] Dixon, R. B.; Sampson, J. S.; Muddiman, D. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2009, 20, 597.

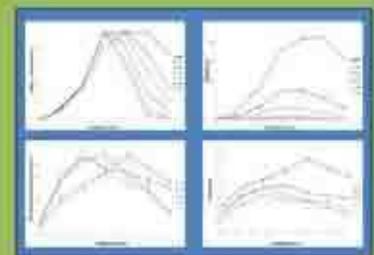
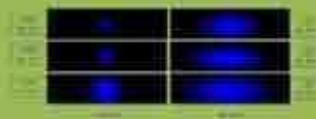
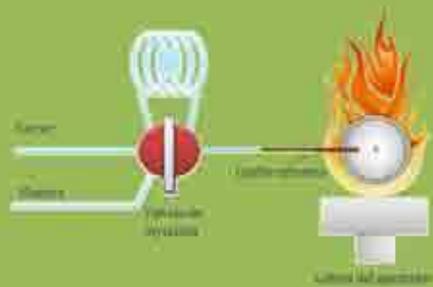
- [100] Cheng, S.-C.; Cheng, T.-L.; Chang, H.-C.; Shiea, J. *Anal. Chem.* 2009, 81, 868.
- [101] Brady, J. J.; Judge, E. J.; Levis, R. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2009, 23, 3151.
- [102] Coon, J. J.; Steele, H. A.; Laipis, P. J.; Harrison, W. W. *J. Mass Spectrom.* 2002, 37, 1163.
- [103] Galhena, A. S.; Harris, G. A.; Nyadong, L.; Murray, K. K.; Fernandez, F. M. *Anal. Chem.* 2010, 82, 2178.
- [104] Zhang, J.; Zhou, Z.; Yang, J.; Zhang, W.; Bai, Y.; Liu, H. *Anal. Chem.* 2012, 84, 1496.
- [105] Vaikkinen, A.; Shrestha, B.; Kauppila, T. J.; Vertes, A.; Kostianen, R. *Anal. Chem.* 2012, 84, 1630.
- [106] Gao, J.; Borton, D. J., 2nd; Owen, B. C.; Jin, Z.; Hurt, M.; Amundson, L. M.; Madden, J. T.; Qian, K.; Kenttamaa, H. I. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2011, 22, 531.
- [107] Heron, S. R.; Wilson, R.; Shaffer, S. A.; Goodlett, D. R.; Cooper, J. M. *Anal. Chem.* 2010, 82, 3985.
- [108] Nyadong, L.; Galhena, A. S.; Fernandez, F. M. *Anal. Chem.* 2009, 81, 7788.
- [109] Schafer, K. C.; Denes, J.; Albrecht, K.; Szaniszlo, T.; Balog, J.; Skoumal, R.; Katona, M.; Toth, M.; Balogh, L.; Takats, Z. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2009, 48, 8240.
- [110] Schafer, K. C.; Szaniszlo, T.; Gunther, S.; Balog, J.; Denes, J.; Keseru, M.; Dezso, B.; Toth, M.; Spengler, B.; Takats, Z. *Anal. Chem.* 2011, 83, 1632.
- [111] Neidholdt, E. L.; Beauchamp, J. L. *Anal. Chem.* 2011, 83, 38.
- [112] Inutan, E. D.; Trimpin, S. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* 2010, 21, 1260.
- [113] H. Liebl. Ion microprobe mass analyzer. *J. Appl. Phys.* **1967**, 38, 5277.
- [114] R. M. Caprioli, T. B. Farmer, J. Gile. *Anal. Chem.* **1997**, 69, 4751.
- [115] M. Schuerenberg, C. Luebbert, S.-O. Deininger, R. Ketterlinus, D. Suckau, *Nat. Methods* **2007**, 4.
- [116] S. C. C. Wong, C. M. L. Chan, B. B. Y. Ma, M. Y. Y. Lam, G. C. G. Choi, T. C. C. Au, A. S. K. Chan, A. T. C. Chan. *Exp. Rev. Prot.* **2009**, 6, 123.
- [117] Y. Sugiura, M. Setou. *Pharm.* **2010**, 5, 31.
- [118] E. Solon, A. Schweitzer, M. Stoeckli, B. Prideaux. *AAPS J.* **2010**, 12, 11.

- [119] S. N. Jackson, H.-Y. J. Wang, A. S. Woods. *Anal.Chem.* **2005**, 77, 4523.
- [120] K. Amaya, E. Monroe, J. Sweedler, D. Clayton. *Int. J. Mass Spectrom.* 2007, 260, 121.
- [121] H. Tanaka, N. Zaima, N. Yamamoto, D. Sagara, M. Suzuki, M. Nishiyama, Y. Mano, M. Sano, T. Hayasaka, N. Goto-Inoue, T. Sasaki, H. Konno, N. Unno, M. Setou. *Eur. J. Vasc. Endovasc.* 2010, 40, 657.
- [122] A. Brunelle, O. Laprevote. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393, 31.
- [123] L. A. McDonnell, G. L. Corthals, S. M. Willems, A. van Remoortere, R. J. M. van Zeijl, A. M. Deelder. *J. Proteomics* **2010**, 73, 1921.
- [124] A. van Remoortere, R. J. M. van Zeijl, N. van den Oever, J. Franck, R. Longuespee, M. Wisztorski, M. Salzet, A. M. Deelder, I. Fournier, L. A. McDonnell. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, 21, 1922.
- [125] P. Chaurand, S. A. Schwartz, R. M. Caprioli. *J. Proteome Res.* **2004**, 3, 245.
- [126] J. Franck, K. Arafah, M. Elayed, D. Bonnel, D. Vergara, A. Jacquet, D. Vinatier, M. Wisztorski, R. Day, I. Fournier, M. Salzet. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, 8, 2023.
- [127] S. Khatib-Shahidi, M. Andersson, J. L. Herman, T. A. Gillespie, R. M. Caprioli. *Anal. Chem.* **2006**, 78, 6448.
- [128] M. Stoeckli, D. Staab, A. Schweitzer. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, 260, 195.
- [129] J. Watrous, N. Hendricks, M. Meehan, P. C. Dorrestein. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 1598.
- [130] Y.-L. Yang, Y. Xu, P. Straight, P. C. Dorrestein. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 885.
- [131] W.-T. Liu, Y.-L. Yang, Y. Xu, A. Lamsa, N. M. Haste, J. Y. Yang, J. Ng, D. Gonzalez, C. D. Ellermeier, P. D. Straight, P. A. Pevzner, J. Pogliano, V. Nizet, K. Pogliano, P. C. Dorrestein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, 107, 16286.
- [132] S. Cha, Z. Song, B. J. Nikolau, E. S. Yeung. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 2991.
- [133] G. Hamm, V. Carre, A. Poutaraud, B. Maunit, G. Frache, D. Merdinoglu, J.-F. F. Muller. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, 24, 335.
- [134] D. M. Anderson, V. A. Carolan, S. Crosland, K. R. Sharples, M. R. Clench. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, 23, 1321.
- [135] F. J. M. Rutten, D. Briggs, J. Henderson, M. J. Roe. *Archaeometry* **2009**, 51, 966.
- [136] K. Lehmann, A. Berger, T. Gotte, K. Ramseyer, M. Wiedenbeck. Growth related Mineral Mag. **2009**, 73, 633.

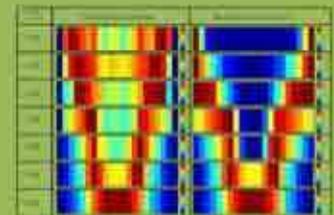
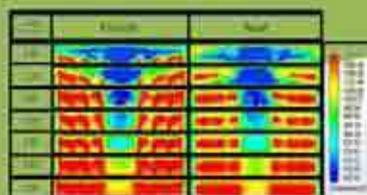
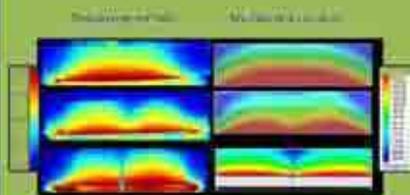
- [137] M. V. Zoriy, D. Mayer, J. S. Becker. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, 20, 883.
- [138] M. J. Bailey, B.N. Jones, S.Hinder, J. Watts, S. Bleay, R. P. Webb. *Nucl. Instrum. Methods B* **2010**, 268, 1929.
- [139] D. R. Ifa, N. E. Manicke, A. L. Dill, R. G. Cooks. *Science* **2008**, 321, 805.
- [140] H.-W. Tang, W. Lu, C.-M. Che, K.-M. Ng. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 1589.

Capítulo 1

"Modelo teórico del funcionamiento del TS-FF-AAS"



$$S_{(\phi)} = K\Phi C_s \left(\sum_{\Delta v} \left(\chi_{(\phi,p)} \cdot \beta_{S(\phi,x)} \cdot e^{-\left(\frac{E_A}{R T_{(\phi,p)}}\right)} \right) \right)$$



“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

— Carl Sagan

1.1 – Introducción

La metodología analítica tradicional utiliza espectroscopia por absorción atómica con llama para la cuantificación de la mayoría de los elementos químicos a niveles de parte por millón.

A pesar del alto grado de desarrollo y aplicación que ha alcanzado la técnica, el rendimiento de los procesos de nebulización/atomización es inferior al 1%.

Por otro lado la técnica requiere, en muchas oportunidades, la realización de un ataque previo de la muestra que permita o bien solubilizarla, o eliminar la matriz que la acompaña (materia orgánica, alta salinidad, etc.), lo que consume tiempo e incrementa los riesgos de contaminación.

En los últimos años y con el fin de reducir estos inconvenientes, se ha comenzado a explotar el concepto de introducción de muestra por “*thermospray*” (TS-FF-AAS) tal como presentáramos en el capítulo introductorio.

La señal analítica obtenida con TS-FF-AAS es marcadamente dependiente de distintas variables operativas que permiten su optimización. Estas variables operativas son: a) la naturaleza de la solución de transporte de muestra o “*carrier*”, b) el volumen de inyección, c) el caudal de “*carrier*”, d) la geometría (dimensiones y forma) de la celda de atomización (flame furnace), e) el material de la celda, e) el tamaño y número de orificios en la base de la celda, f) la estequiometría de la llama que calienta la celda y el capilar.

Se realiza a continuación una descripción de las distintas variables operativas en TS con vías a estudiar las posibilidades de optimización.

1.2 – Variables operativas en TS-FF-AAS

1.2.1 - Geometría de la celda de atomización

La celda de atomización cumple con la función de confinar el vapor atómico en el volumen restringido del horno montado en llama, evitando de esta manera la dilución del analito

en los gases que forman la llama. Por lo tanto, la geometría cumple un rol fundamental en los procesos de generación de la señal analítica. Siendo que un aumento en la longitud de la celda es necesariamente un aumento en el camino óptico que atraviesa la lámpara de cátodo hueco (LCH) y por ende de la señal, la disminución de volumen se realiza por reducción del radio. Por lo tanto, cuanto menor es el radio de la celda, menor será la dispersión del vapor atómico en el volumen total y mayor la concentración en el camino óptico de la LCH. Sin embargo, si se disminuye el radio de la celda, la relación superficie interna/volumen crecerá y el contacto entre el vapor atómico y dicha superficie interna intensificará la interacción existente entre ambos. Además, la reducción del radio implica un aumento de la velocidad lineal del fluido que escapa axialmente del interior de la celda, con lo que el tiempo de residencia del analito se verá disminuido. O sea que el radio óptimo de la celda surge de una relación de compromiso, tal como se discutirá en el capítulo 2 utilizando como ejemplo la determinación del oro.

1.2.2 - Material de la celda de atomización

El material de la celda es la barrera que confina el vapor atómico. Este material de la celda de atomización no es inerte desde el punto de vista fisicoquímico. Sobre esta superficie se pueden producir procesos de absorción y adsorción de especies atómicas y moleculares presentes en el seno de la celda. Cuanto mayor sea la afinidad de la superficie interna de la celda con el analito en estado de vapor atómico, (o especies derivadas del analito que puedan formarse), los átomos capaces de absorber radiación disminuirán y con ello la señal analítica. Es por esta razón que la búsqueda de un material inerte se ha vuelto de gran importancia, no sólo en la técnica de TS-FF-AAS sino también en el método de generación de vapor químico [1-3].

En el capítulo 2 se evaluará la influencia de distintos materiales de la superficie interna del atomizador en la señal analítica.

1.2.3 - Tamaño y número de orificios de la base de la celda de atomización

Los orificios en la base de la celda de atomización cumplen la función de contrarrestar el efecto de disminución de la temperatura debida a la vaporización del solvente, permitiendo el ingreso parcial de los gases de combustión. Sin embargo, si bien a

mayor área total de los orificios se obtiene un mayor ingreso de gases de combustión y un aumento de la temperatura, esos gases que ingresan al interior de la celda también diluyen el vapor atómico. Existen varios trabajos en bibliografía [4-6] que optimizan la cantidad y el área de los orificios según el analito. Para los analitos tales como cadmio que requieren una menor temperatura de atomización, se utiliza preferentemente un área total de orificios pequeña. Lo opuesto es válido para analitos menos volátiles con mayor temperatura de atomización. En este trabajo se utilizará una celda con seis orificios de 2 mm de diámetro cada uno, que ha mostrado ser la más difundida en la bibliografía debido a que ha presentado una sensibilidad adecuada para los analitos que suelen determinarse por TS-FF-AAS.

1.2.4 - Estequiometría de la llama que calienta la celda y el capilar

La combustión es una reacción en fase gaseosa de tipo exotérmica en la que intervienen un combustible (metano, propano, acetileno, etc.) y un comburente (oxígeno, aire, óxido nitroso, etc.). Si el combustible se encuentra presente en el medio de reacción en cantidades mayores a la estequiométrica se dice que la llama es reductora, existe una mayor proporción de materia carbonosa. La llama presenta un cono de reducción amarillo si la mezcla es, por ejemplo aire/acetileno, o rojo si es óxido nitroso/acetileno. Si por el contrario existe un excedente de comburente la llama se torna oxidante y se encuentran mayores proporciones de compuestos oxigenados, toma un color azul pálido si es que se utiliza aire como comburente. La energía liberada en la combustión se aprovecha para incrementar la temperatura de los gases del medio. De esta forma, cuando los gases de la llama se encuentren en relación estequiométrica, la energía elevará la temperatura de los productos hasta un máximo. Un excedente de alguno de los reactivos provoca que parte de la energía se consuma en calentar los reactivos excedentes, y la temperatura final alcanzada sea menor que en el caso estequiométrico [7]. Es por esta razón que la estequiometría de la llama es un factor clave que modifica el ambiente redox, y la temperatura del interior de la celda y de la punta del capilar cerámico.

En el capítulo 3 se estudiará la influencia de la estequiometría de la llama y las condiciones redox del ambiente del atomizador.

1.2.5 - Naturaleza del carrier

La elección de un medio portador adecuado es indispensable para obtener una señal analítica optimizada. Las opciones más frecuentes de soluciones de transporte para la introducción de muestra mediante la metodología de aerosol térmico son: aire, agua, soluciones ácidas o alcalinas. La utilización de aire tiene como ventaja la de enfriar menos el capilar cerámico que en el caso del uso de un solvente pero por otro lado, el uso de aire como “*carrier*” suele provocar un efecto memoria que no permite la limpieza adecuada del capilar.

También se pueden utilizar álcalis o ácidos tal como se verá en el capítulo siguiente dedicado a la cuantificación de oro. Si bien el uso de un medio ácido compatible es conveniente para aquellas muestras que provienen de digestiones en ese medio, debe notarse que el tubo metálico es susceptible al ataque ácido por lo que es necesario limitar la concentración de ácidos minerales.

Por otro lado, y con el fin de reducir la energía que se consume para vaporizar la muestra, el uso de solventes orgánicos miscibles con el agua parecería ser una alternativa interesante para la optimización de la señal analítica. Por otra parte, el aumento de la cantidad de solvente orgánico en la mezcla “*carrier*” proporciona un medio de menor tensión superficial y densidad en comparación con el agua, disminuyendo en consecuencia el tamaño medio de la gota tal como describe la ecuación empírica de Elkotb ^[8]. La influencia del uso de este tipo de mezclas en la señal analítica de magnesio y su determinación en complejos vitamínicos se presentan en el capítulo 3.

1.2.6 - Volumen de inyección

La altura y el área de la señal están directamente relacionadas con el volumen de inyección. A medida que el volumen de inyección aumenta, aumenta la señal en área ya que crece la masa de analito que ingresa a la celda y por ende al eje óptico. Sin embargo, la señal en altura crece hasta un dado punto en el cual la velocidad de ingreso de muestra a la celda es igual a la velocidad de egreso, o sea que el vapor atómico ocupa todo el volumen de la celda de atomización y la altura de la señal se hace prácticamente constante. De esta manera, una vez superado el volumen de la celda, la señal se ensancha en lugar de aumentar en altura. Esta

circunstancia es desfavorable desde el punto de vista analítico toda vez que conspira contra la frecuencia de análisis sin mejorar la sensibilidad. En el capítulo 2 se mostrará el efecto en la señal de oro y la utilidad del cociente altura/área de pico en la medida de deformación de la señal transitoria que se obtiene en TS.

1.2.7 - Caudal de solución de transporte

El caudal de solución de transporte o “*carrier*” es un parámetro crítico para la determinación elemental por TS-FF-AAS. A medida que se incrementa el caudal aumenta la cantidad de muestra que ingresa a la celda por unidad de tiempo, lo que implica un aumento en la altura de la señal analítica obtenida. Por otro lado, al incrementar la cantidad de muestra que ingresa, también aumenta la cantidad de energía consumida en vaporizar el solvente, disminuyendo la energía disponible para atomizar el analito. Este último efecto implica un descenso de la temperatura promedio y por consiguiente de la señal. En consecuencia, se busca una solución de compromiso. Esta situación de compromiso deviene en encontrar el caudal de solución transportadora que genere la mayor altura de pico. Este valor de caudal óptimo depende del analito ya que, los diferentes analitos poseen diferente volatilidad. En los analitos más volátiles, la disminución de temperatura por aumento del caudal no tendrá una influencia tan marcada como en los menos volátiles. La Figura 1.1 permite observar dos aspectos interesantes: a) cuanto más volátil es el analito, mayor es la influencia del caudal de “*carrier*” en la sensibilidad y b) cuanto menos volátil es el analito, menor el caudal de “*carrier*” para el que se alcanza altura máxima. Nótese que la volatilidad crece de cobre a cadmio.

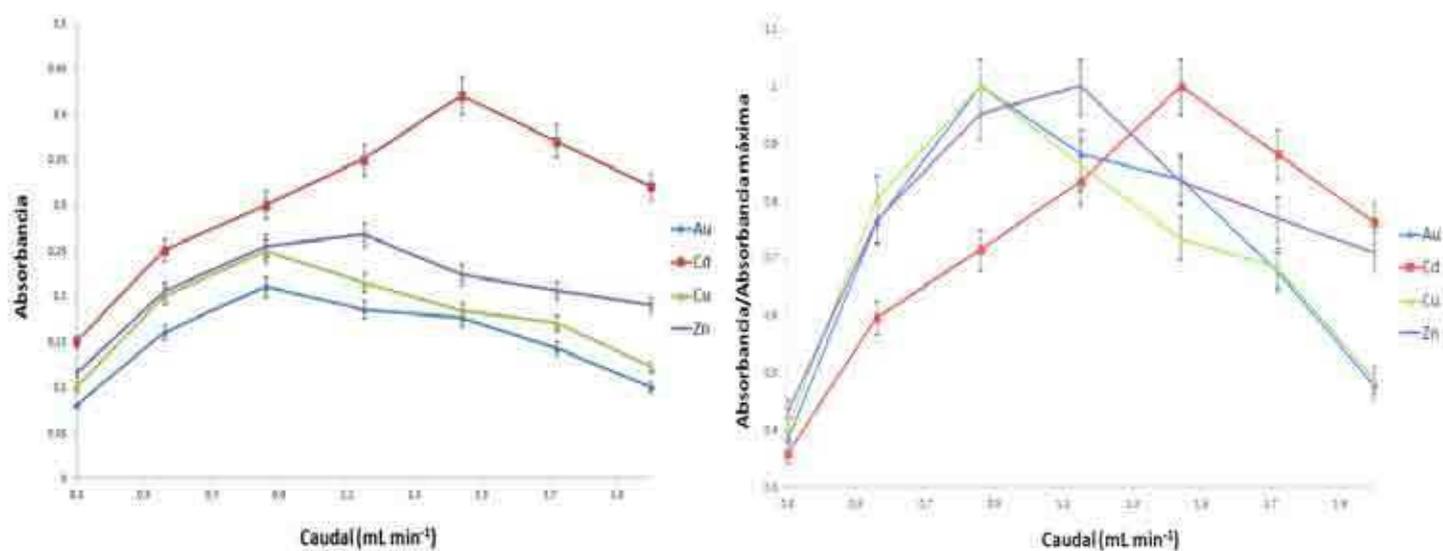


Figura 1.1.- Arriba: gráfico de altura de pico vs. caudal de "carrier" utilizado. Abajo: Absorbancia normalizada (Absorbancia/Absorbancia máxima) vs. caudal de "carrier".

1.3 - Estudios teóricos de mecanismos de desolvatación/atomización de la celda: Influencia de las variables operativas

Para profundizar en el estudio de los mecanismos de desolvatación/atomización producidos en la celda y generar un modelo que permita entender la importancia de las variables descritas arriba, es necesario conocer la distribución de la temperatura en el interior de la celda. Pero debido al ingreso de la llama de combustión por los orificios en la base de la celda (ver introducción) y al caudal de muestra que llega a la zona central, la dinámica de fluidos en el interior se hace muy compleja. Por otra parte, si la celda es de níquel como habitualmente, la conducción térmica del metal no hace posible medir la distribución de temperatura mediante métodos no invasivos como por ejemplo los métodos espectroscópicos. Por otro lado, los solventes que ingresan pueden alterar las medidas de una sonda y tampoco resultan adecuados los métodos invasivos tales como las termocuplas. Por estas razones se decidió simular los procesos que ocurren dentro de la celda utilizando métodos de simulación por elementos finitos, para luego comparar los resultados con los datos obtenidos experimentalmente.

El método de elementos finitos es una técnica numérica que permite hallar una solución aproximada a problemas complejos que involucran varias ecuaciones diferenciales

parciales. Éste método realiza una subdivisión del dominio completo del problema en secciones volumétricas pequeñas y simples denominadas elementos finitos. Mediante métodos variacionales se minimiza una función error asociada al sistema en estudio [9].

Se entiende que mediante este método, se podrá obtener una aproximación a la distribución de temperaturas en el interior de la celda. Aunque las temperaturas reales no sean exactamente las estimadas, se presume que se tratará de valores muy cercanos que permitirán compararse, en términos relativos, con los valores obtenidos en los procesos que efectivamente ocurren en el interior de la celda.

Las simulaciones fueron realizadas utilizando el programa Solidworks 2014, con el modulo de "*flow simulation*". Para correr adecuadamente la simulación en este entorno de programación, y debido a que este programa no tiene parámetros para modelar una llama de acetileno/aire, se decidió emplear solo aire a la temperatura y velocidad de la llama (1800°K, 0,138 cm/s [7]). Puesto que el programa también carece de un modelo para simular el efecto de Leidenfrost del que habláramos en el capítulo introductorio, se utilizó como aproximación el ingreso de vapor de agua a 262 ° K en lugar de agua líquida, a una temperatura tal que el valor de $\Delta H \text{ min}^{-1}$ que ingresa a la celda equivalga al del agua líquida a 293° K para alcanzar una temperatura final de 1000° K como agua vapor. (ver materiales y métodos) Estas aproximaciones hacen que la temperatura local real no sea exactamente la calculada.

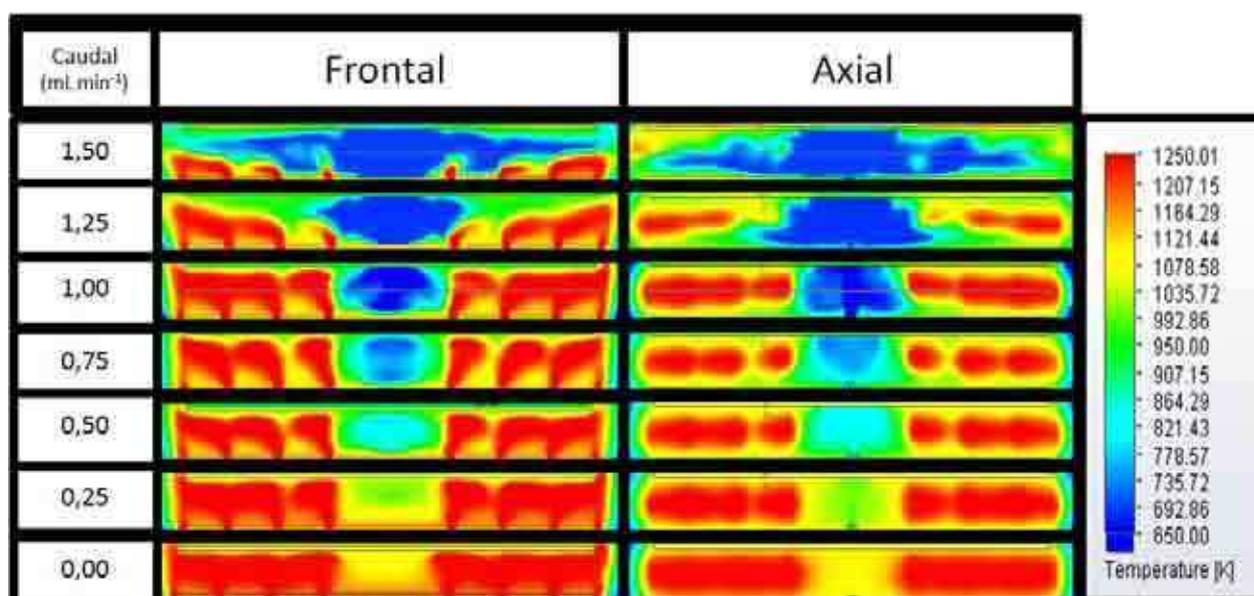


Figura 1.2.- Distribución de temperatura en el interior de la celda de atomización a distintos caudales. Vistas frontal y axial.

En las Figuras 1.2 y 1.3 se observan los resultados de simulación de distribución de temperaturas, y de distribución de fracción másica del vapor en el interior de la celda de atomización. Se presentan vistas axiales y frontales a diferentes caudales de ingreso de solución transportadora.

El método permitió también estimar el tiempo de residencia del vapor atómico en el eje óptico utilizando las ecuaciones diferenciales de transporte de materia. Se obtuvieron valores de (190 ± 20) ms, no observándose diferencias significativas al utilizar caudales variables entre 0,1 y 2 mL min⁻¹. Nótese que se trata de valores que exceden en más de dos órdenes los valores de la literatura para los tiempos de residencia en FAAS que oscilan entre 0,1 y 1 ms en el eje óptico [7], constituyendo una de las mayores fortalezas del TS-FF-AAS por sobre la técnica convencional con llama.

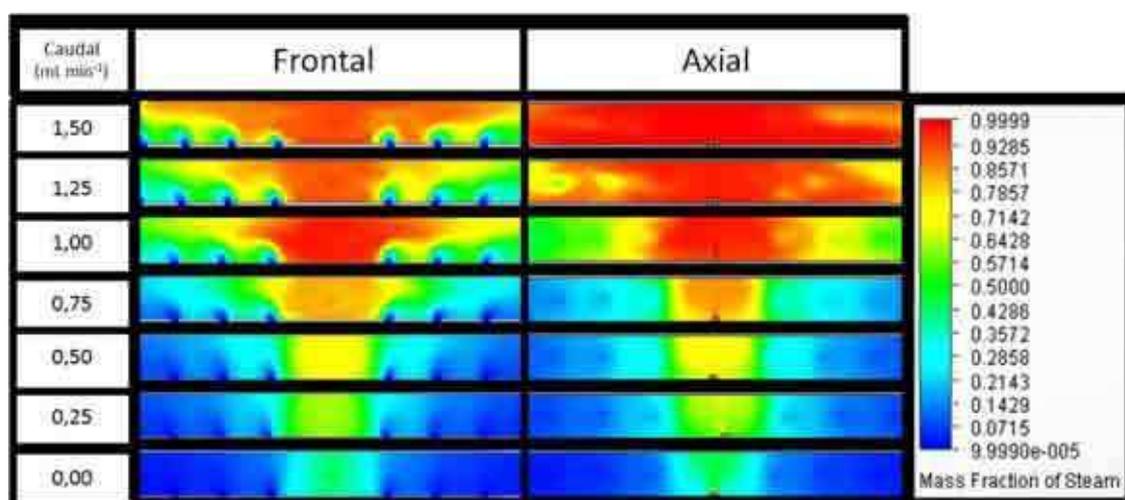


Figura 1.3 - distribución de la fracción másica del vapor en el interior de la celda de atomización.
Vistas frontal y axial

1.3.1 - Validación del modelo de simulación con datos experimentales

Para validar los resultados obtenidos mediante simulación, o sea la distribución de temperaturas y de fracción másica del vapor en el interior de la celda, se recurrió a experimentos que permitieran establecer el grado de concordancia entre los resultados del modelo y los resultados experimentales que pudieron ser realizados en el laboratorio. La mejor aproximación experimental consistió en medir la distribución de la temperatura sobre la superficie externa de la celda de atomización tal como se detalla en los apartados siguientes.

Ya que los resultados obtenidos a través de simulación referidos a la distribución de la temperatura y de fracción másica de vapor dentro de la celda, no pueden ser convalidados por medición directa, se evaluará el grado de concordancia de la predicción a través de parámetros que sí pudieron ser medidos experimentalmente. Se realizó entonces un estudio de la distribución de la temperatura sobre la superficie externa de la celda de atomización, las curvas de señal vs. caudal, y la identificación de las zonas de atomización preferencial. Los experimentos de medición de temperatura se detallan a continuación.

1.3.2 - Medición de temperatura: Fundamentos de la operación utilizando una cámara de fotos digital

El estudio de los fundamentos de la técnica de TS-FF-AAS requiere conocer la distribución de temperaturas en la celda de atomización, la que por otra parte es un parámetro crítico ya que pone límites al número de analitos susceptibles de ser valorados. En el marco de este trabajo de tesis se ha desarrollado un método que permite estimar con buena aproximación la distribución de la temperatura en la celda de atomización, para luego contrastarlo con los resultados obtenidos mediante la simulación y así validar el modelo

Como se describe en literatura ^[10,11], y asumiendo que la superficie metálica de la celda de atomización se comporta como un cuerpo gris, la temperatura de la superficie está relacionada con su emisión de luz a dos diferentes longitudes de onda según la ecuación 1.

$$\frac{1}{T} = \frac{k}{h C} \left(\frac{\text{Ln} \left(\frac{I_1}{I_2} \right) + \text{Ln} \left(\frac{\varepsilon(\lambda_1, T)}{\varepsilon(\lambda_2, T)} \right) + 5 \text{Ln} \left(\frac{\lambda_1}{\lambda_2} \right)}{\frac{1}{\lambda_2} - \frac{1}{\lambda_1}} \right) \quad [Ec. 1]$$

Donde λ_1 y λ_2 son las longitudes de onda de trabajo, I_1 e I_2 son las respectivas intensidades, k es la constante de Boltzman, h es la constante de Planck y C es la velocidad de la luz. $\varepsilon_{(\lambda, T)}$ es la emisividad del objeto que depende de la longitud de onda y la temperatura del objeto. En este trabajo se ha utilizado una cámara fotográfica digital como fotodetector.

Mediante la cámara digital se obtienen tres señales en tres canales diferentes: rojo, verde y azul. Las señales se adquieren mediante el uso de filtros ópticos que se colocan

delante de los detectores en cada uno de los pixeles. Sin embargo, como los filtros no son monocromáticos y la sensibilidad de los fotodetectores no es la misma para todas las longitudes de onda, no es posible aplicar la ecuación 1 directamente.

Para salvar estas dificultades, se utilizó una mufla operada a distintas temperaturas conocidas y se obtuvieron las señales en cada uno de los canales a dichas temperaturas. Luego se ajustaron los resultados mediante la ecuación 2 que es una versión reducida y aproximada de la ecuación 1.

$$\frac{1}{T} = A * \ln \left(\frac{I_1}{I_2} \right) + B \quad [\text{ec. 2}]$$

Donde I_1 y I_2 son las señales obtenidas para dos diferentes canales (rojo y verde o verde y azul); A y B son constantes que dependen de cada canal particular, la sensibilidad del detector a las diferentes longitudes de onda (rojo, verde y azul) y la emisividad del material. En la Figura 1.4 se muestran los resultados obtenidos que ajustan de manera adecuada con el modelo propuesto.

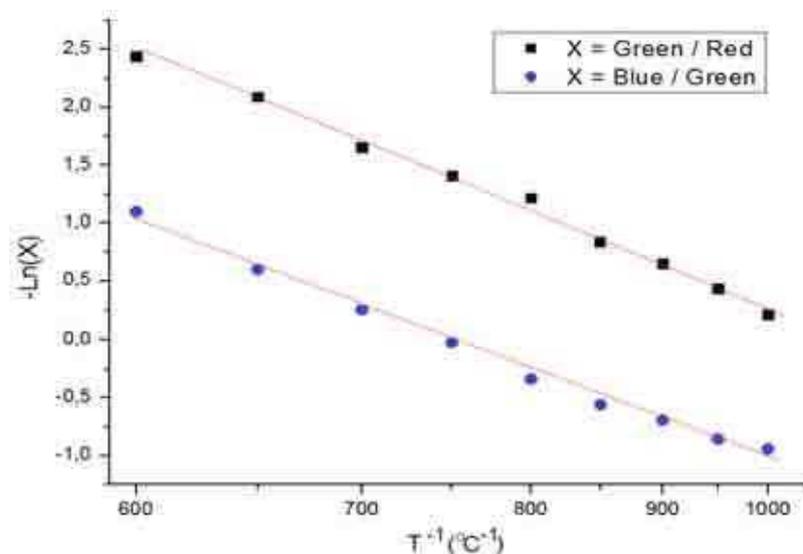


Figura 1.4.- Curvas de ajuste del modelo propuesto utilizando los canales verde y azul (círculo azul), y verde y rojo (cuadrado negro)

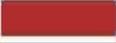
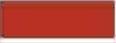
Por lo tanto, mediante el modelo ajustado es posible calcular los valores de A y B para la relación de señales verde-roja y azul-verde y, consecuentemente, estimar la temperatura en las distintas zonas del tubo.

1.3.3 - Validación de la medición de la temperatura

La Tabla 1 muestra la relación que existe entre la temperatura medida mediante la termocupla de la mufla, el color observado en la fotografía original y la temperatura estimada utilizando los canales verde-rojo y azul y verde. También se incluyen la temperatura media y el error porcentual de esa estimación.

La Figura 1.5 muestra la relación entre la temperatura real y la estimada por el método propuesto. Se obtiene una recta de pendiente unitaria y ordenada al origen nula y un error porcentual menor al 1,5%, lo que hace este método válido para la estimación de temperatura en la pared exterior de la celda de atomización.

Rigurosamente, el modelo de ajuste de temperaturas se basa en suponer que el calentamiento del tubo en la mufla es equivalente al de la llama (verdadera fuente de energía en TS-FFAAS) y que por ende, la emisión propia de la llama es despreciable frente a aquella del propio tubo o celda de atomización. Esto equivale a decir que la radiación que emite la llama es despreciable comparada con la emisión de la celda. Esta aproximación parece válida ya que la pluma de llama que queda por delante de la celda es muy delgada y posee una radiación azul pálida -en condiciones estequiométricas-, la que interferiría de manera poco apreciable en uno solo de los canales. Para asegurar la validez, se realizaron experimentos de medición de temperatura de la celda con la llama encendida e inmediatamente después de extinguida no encontrándose diferencias significativas respecto de las obtenidas en la mufla.

Temperature (°C)	R	G	B	Observed Color	Testimation (°C) channels : G/R	Testimation (°C) channels : B/G	Mean Temperature (°C)	% Error
600	23	2	6		606,33	590,46	598,40	0,27
650	89	11	20		648,84	653,04	650,94	-0,14
700	141	27	35		710,90	703,41	707,15	-1,02
750	176	43	42		750,87	751,92	751,39	-0,19
800	183	49	35		767,08	813,99	790,54	1,18
850	210	72	40		814,55	871,79	843,17	0,80
900	230	120	60		910,21	898,54	904,37	-0,49
950	255	165	70		968,53	943,68	956,11	-0,64
1000	255	205	80		1035,43	968,42	1001,93	-0,19

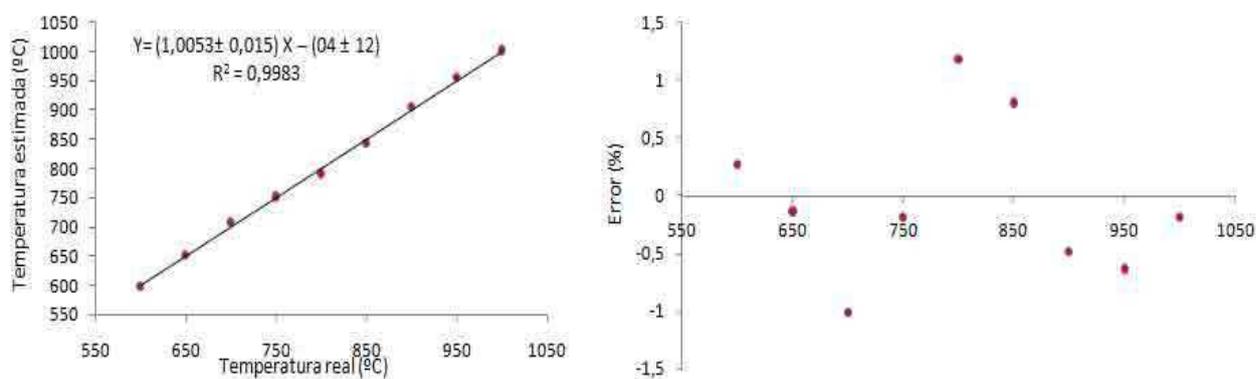


Figura 1.5.- Resultado de la validación de medidas de temperaturas. Arriba: Tabla de correlación entre información fotográfica y temperatura. Abajo: Gráfico de correlación entre el valor de temperatura estimada y la temperatura medida con termocupla, y grafico de porcentaje de error a distintas temperaturas.

1.3.4 - Evaluación de la distribución de la temperatura de la pared de la celda de atomización

Utilizando el método mencionado se procedió a medir la distribución de temperatura de la celda de atomización a distintos caudales de solución “carrier”. En la Figura 1.6 se muestran de frente y atrás, las distribuciones de temperatura obtenidas sin ingreso de solución y con ingreso de agua a un caudal constante de 1 mL min^{-1} , a modo de ejemplo.

En todos los casos se puede observar que la temperatura decrece desde el extremo inferior del tubo hasta el extremo superior lo que es consistente con la cercanía a la llama. Por

otra parte, se observa una disminución de la temperatura del tubo hacia los extremos consistente con disipación térmica. Ambos efectos generan una distribución de temperaturas en la celda montada en la llama.

También puede distinguirse una pequeña zona central de disminución de la temperatura de la celda coincidente con el punto de ingreso de la solución “*carrier*”, la que no es observable en la operada sin líquido de ingreso. Esta característica se revela más claramente en la zona posterior de la celda en la que el capilar no obstruye la adquisición de la imagen ni el recorrido de las líneas de flujo del gas de combustión.

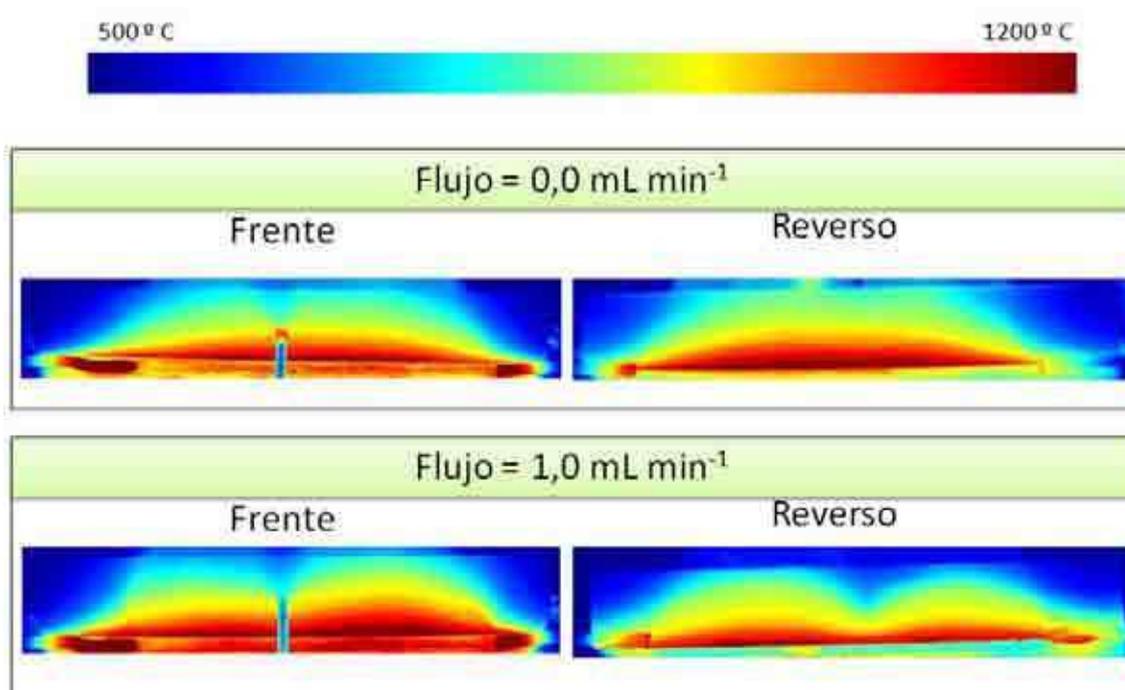


Figura 1.6.-Distribución de temperaturas en distintas condiciones de operación.

Esta pequeña zona de depresión de la temperatura aparece como resultado de que el capilar cerámico no permite un 100% de efectividad en la vaporización del solvente, formándose un aerosol que ingresa en esa zona central de la celda. Estas pequeñas gotas no vaporizadas ingresan a gran velocidad ^[12] y colisionan con la pared posterior de la celda que posee una temperatura mucho mayor que la temperatura de ebullición del solvente. Por efecto Leidenfrost, se produce una vaporización parcial y la fragmentación de la gota primaria, obteniéndose gotas secundarias más pequeñas que vuelven a colisionar en otro sector de la celda donde se produce el mismo efecto, reduciéndose sucesivamente el tamaño de la gota hasta que se logra vaporización

completa. Así, cuanto mayor sea el número de colisiones de gotas que se produzcan sobre la pared, mas energía se extraerá de la superficie de la celda y se observará una depresión de temperatura. Por lo tanto, las zonas de menor temperatura serán aquellas en las que exista una mayor vaporización del solvente y en las que se produzca preferentemente la desolvatación del analito. Esta zona de menor temperatura se corresponde con una ***zona de desolvatación***.

En la Figura 1.7 se comparan los resultados obtenidos mediante simulación con resultados experimentales, observándose muy buena concordancia.

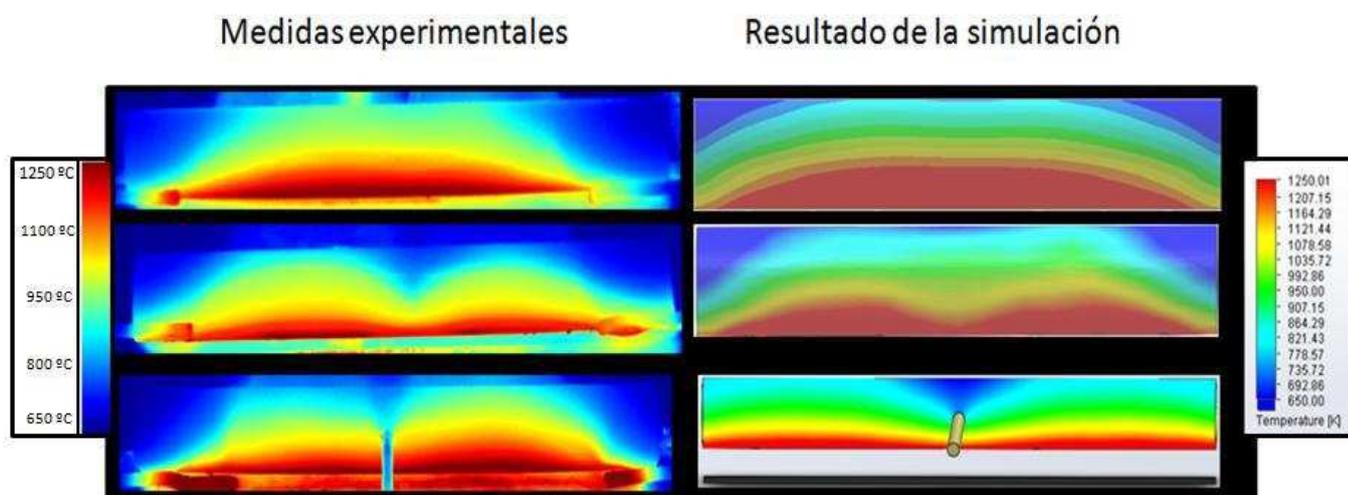


Figura 1.7. - Distribución de temperaturas sobre la superficie externa del atomizador (experimental a la izquierda y simulada por el modelo a la derecha)

1.4 - Evaluación teórica de la dependencia de la señal analítica obtenida con el caudal de muestra

La intensidad de absorción (I_{ab}) puede ser expresada en términos de número de átomos existentes en el estado fundamental (N_j) y el estado excitado (N_i). La ecuación 3 es la expresión que establece la base de las fórmulas prácticas más utilizadas en espectroscopia atómica analítica [7].

$$I_{ab} = \left(\frac{h \nu}{c} I_0 \right) \cdot (B_{ji} N_j - B_{ij} N_i) \quad [\text{Ec. 3}]$$

Donde B_{ji} representa el coeficiente de Einstein de la transición desde el nivel j al nivel i , h es la constante de Planck, c la velocidad de la luz, I_0 la intensidad de la luz emitida por la lámpara de cátodo hueco y ν la frecuencia. Generalmente, la energía para excitar al analito suele ser bastante elevada y a las temperaturas de trabajo, la fracción en estado excitado es muy pequeña, lo que permite despreciar el término que representa a la población del analito en estado excitado.

1.4.1 - Evaluación teórico-experimental de la eficiencia de atomización en la celda

Si en la ecuación 3 se sustituye el término N_j de modo que resulte expresado en función del número total de átomos presentes en todos los estados (N_t), se puede calcular la intensidad absorbida conociendo los valores de N_t en condiciones de inyección directa e inyección continua sobre un horno (o celda) montado en llama (FF, *flame furnace*). La ecuación 4 relaciona la cantidad total de analito que ingresa en la celda de atomización (N_t) con la cantidad de analito en estado atómico (N_j) para lo que usa un factor de proporcionalidad conocido como eficiencia de atomización (ϵ_a). A través de la ecuación 5 se puede calcular N_t y reemplazarlo en la ecuación 4.

$$\epsilon_{a(\Phi,p)} = \frac{N_{j(\Phi,p)}}{N_{t(\Phi,p)}} = \epsilon_n \beta_s \beta_\nu \beta_a \quad [\text{Ec. 4}]$$

$$N_{t(\Phi,p)} = \Phi C \chi_{(\Phi,p)} \quad [\text{Ec. 5}]$$

Donde Φ es el caudal de ingreso de muestra en mL min^{-1} , C es la concentración de analito en la muestra y χ es la fracción másica del vapor proveniente de la vaporización de la

muestra. N_t , N_j , ϵ_a y χ son función de Φ y p , definiendo p como la posición de un elemento de volumen infinitesimal de la celda en el que los parámetros fisicoquímicos son constantes.

Como se observa en la ecuación 4, la eficiencia de atomización (ϵ_a) es una cifra de merito compuesta que depende de una combinación de factores que permiten obtener la cantidad de analito libre en forma de vapor atómico a partir de la cantidad de analito en la solución inicial. Para esto la muestra líquida debe ser primero introducida en la celda, luego desolvatada por evaporación del solvente, luego la sal o el oxido remanente debe ser volatilizado para después poder ser atomizado. Cada uno de estos pasos debe llevarse a cabo rápidamente y con la mayor eficiencia posible para obtener una mejor performance del método. Estos pasos están mostrados en la ecuación 4 Donde ϵ_n es la eficiencia de nebulización, β_s es la fracción desolvatada, β_v es la fracción volatilizada, y β_a es la fracción atomizada.

En la literatura se utiliza el concepto de eficiencia de nebulización (ϵ_n) para describir las pérdidas de aerosol que se producen en la cámara de nebulización y previas a la llegada a la llama. Está definida como la relación entre la cantidad de muestra que ingresa en la base del mechero respecto de la cantidad total de muestra nebulizada. Como se mencionara previamente, una de las ventajas que posee el sistema de TS-FF-AAS sobre el FAAS convencional, es que se produce una introducción directa de muestra que permite ingresar a la celda el 100% de la muestra con un $\epsilon_n=1$ respecto de ϵ_n 0,05 a 0,1 de FAAS.

La fracción desolvatada (β_s) está definida como la relación entre el total de analito que se encuentra en forma desolvatada respecto del total de analito en el interior de la celda de atomización, lo que debería coincidir con la cantidad de analito total dadas las condiciones de operación de TS. Dado que en la celda de atomización existen zonas de vaporización completa (hacia los extremos) e incompleta (zona central con gotas) como ya se ha expuesto, es más apropiado hablar de **fracción desolvatada local** la que depende del parámetro p de posición y del caudal de muestra ingresante como expresáramos anteriormente para otros parámetros que también resultan p y Φ dependientes. Entonces, a lo largo de las dimensiones de la celda, esta fracción desolvatada local constituye una distribución de masa desolvatada. Existen tres sitios posibles para la desolvatación del analito. El primero se encuentra en el capilar durante la formación del aerosol térmico: el analito en solución entra en contacto con la pared del capilar a alta temperatura y se vaporiza parcialmente por efecto de Leidenfrost. O sea que en el momento de ingreso a la celda de atomización, parte del analito ya se encuentra en la fase gaseosa

permitiendo definir una eficiencia de desolvatación externa a la celda de atomización o **eficiencia de desolvatación primaria** (E_p). El resto del analito ingresa a la celda de atomización en forma de aerosol con una amplia distribución de tamaño de gotas que se proyectan hacia la pared posterior de la celda [13,14]. El segundo sitio de desolvatación del analito es el seno de la celda en el que la temperatura y el tamaño de gota gobiernan la velocidad de evaporación según la ecuación 6 [14].

$$-\frac{dm}{dt} = \left(\frac{4\pi r \Lambda}{C_p} \right) \ln \left(1 + \frac{C_p (T_f - T_b)}{L} \right) \quad [\text{Ec. 6}]$$

Donde r es el radio de la gota, c_p es la capacidad calorífica específica del vapor de solvente a presión constante, Λ es la conductividad térmica del gas, L es el calor específico de vaporización, T_f es la temperatura de la llama, T_b es la temperatura de ebullición del líquido, r es el radio de la gota y m es su masa. Debido a que m es proporcional al r^3 , la integración de esta ecuación permite deducir que el tiempo total requerido para la desolvatación total es proporcional al área superficial inicial de la gota.

Debido a que la velocidad de evaporación está relacionada con el radio de la gota, serán las gotas de menor tamaño las que posean una velocidad de desolvatación lo suficientemente alta como para ser vaporizadas en su trayectoria por el seno de la celda. El tercer sitio de desolvatación se encuentra sobre las paredes de la celda donde las gotas golpean la superficie a alta temperatura eliminándose nuevamente parte del solvente y liberándose gotas más pequeñas que recorren nuevamente la celda para perder solvente parcialmente ahora a mayor velocidad (por ser más pequeñas) y golpeando las paredes hasta que todo el líquido se elimine, quedando el analito completamente desolvatado.

Debido a que el programa de simulación no se pudo correr con modelos que habilitaran la transferencia de materia entre fases, no fue posible simular la fracción desolvatada local. Por lo tanto, se realizaron los experimentos que se describen a continuación.

Para estimar la *eficiencia de desolvatación primaria* (E_p) se realizó una perforación de 6mm en la parte posterior de la celda para permitir que el aerosol primario salga de la celda recogiendo en una probeta graduada. Con el cociente entre el volumen recogido y el volumen

de líquido total ingresado, se calcularon los valores de (E_f) para diferentes caudales de inyección tal como se muestra en la Figura 1.8.

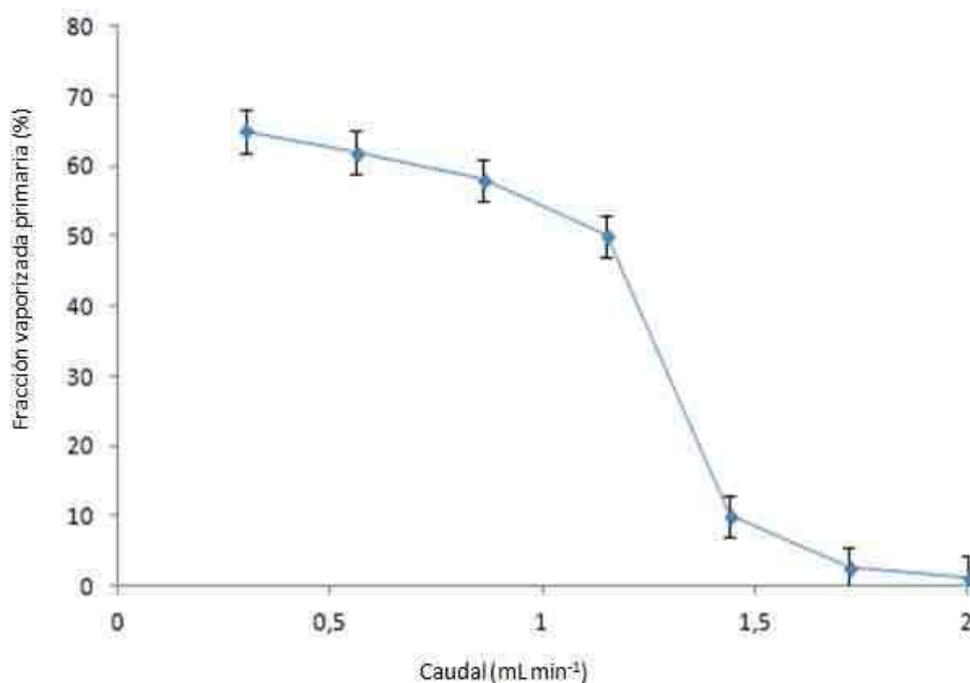


Figura 1.8.- Fracción vaporizada primaria vs. caudal volumétrico

A medida que aumenta el caudal, se incrementa el consumo de energía para evaporar el solvente en el capilar haciendo que la temperatura del capilar disminuya. Cuando la temperatura del capilar disminuye, se llega a un punto en el que dejan de cumplirse las condiciones físicas necesarias para producir el efecto de Leidenfrost y entonces, la eficiencia de desolvatación primaria (E_f) disminuye.

Por otro lado, para estimar la fracción desolvatada local dentro del tubo, se evalúa la diferencia de temperatura sobre la pared de la celda en condiciones de ausencia de "carrier" e ingreso de "carrier" a distintos caudales y en diferentes elementos de volumen, tal como se muestra en la Figura 1.9.

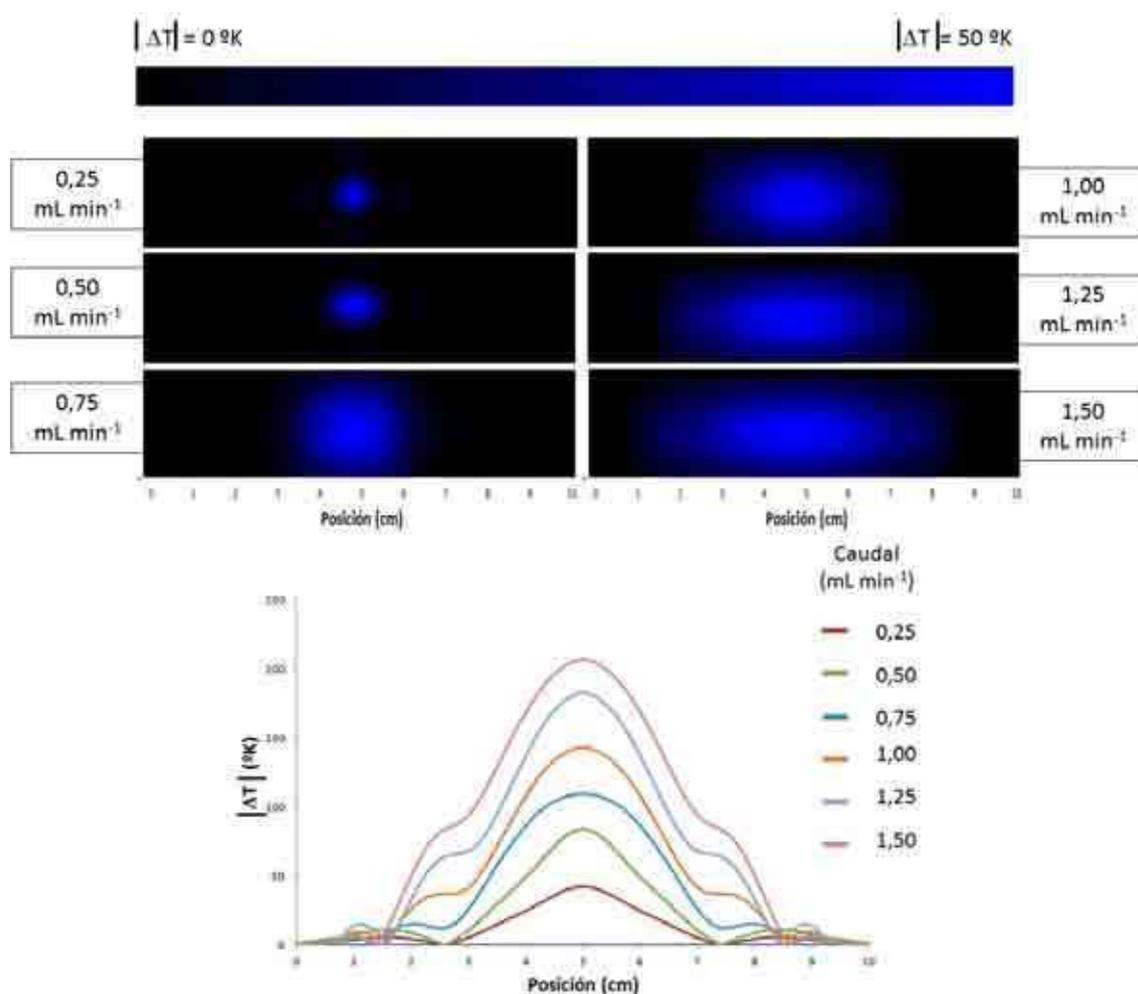


Figura 1.9.- Arriba: Diferencia de temperatura ΔT registrada con la cámara fotográfica entre la pared posterior de la celda de atomización al caudal correspondiente y sin ingreso de muestra. Abajo: Diferencia de temperaturas obtenidas sin ingreso de muestra y a distintos caudales en función de la posición en el eje central de la pared posterior de la celda.

Cuanto mayor sea la diferencia de temperatura registrada en un sector dado, se asume que en ese sector se produce una mayor desolvatación local de la muestra. Además para cada caudal ensayado, se puede suponer que el área total bajo la curva debería corresponderse con el 100% de líquido ingresado (asumiendo vaporización completa del solvente de muestra), y que la fracción desolvatada local (β_s) es proporcional a la diferencia de temperatura local. Por lo tanto, mediante la ecuación 7 se puede estimar la fracción desolvatada local (β_s).

$$\beta_{s(\Phi,s)} = 1 - \left(\frac{\Delta T_{(\Phi,s)} \cdot (1 - E_{f(\Phi)})}{\iint_s \Delta T_{(\Phi,s)} ds} \right) \approx 1 - \left(\frac{\Delta T_{(\Phi,s)} \cdot (1 - E_{f(\Phi)})}{\sum_s \Delta T_{(\Phi,s)}} \right) \quad [\text{ec. 7}]$$

Donde S, en analogía con "p" definido previamente, es la posición sobre la pared posterior de la celda de un elemento de área infinitesimal donde la temperatura es constante. La doble integral del denominador se corresponde con la vaporización de la totalidad de solvente. Entonces a través de la ecuación 7 se obtiene un factor de proporcionalidad entre la diferencia de temperatura local y la diferencia de temperatura total sobre toda la superficie posterior de la celda, lo que se correlaciona con la fracción desolvatada local.

Sin embargo, debido a que la resolución espacial de la medición de temperatura está limitada por el tamaño del pixel de la fotografía se reemplaza la doble integral del denominador por una sumatoria sobre todos los pixeles.

En cuanto a la fracción vaporizada (β_v), luego de producida la desolvatación completa, queda un aerosol seco de partículas solidas o fundidas que deben vaporizarse. Por lo tanto, este parámetro está definido como la proporción de analito total en estado gaseoso respecto de la cantidad de analito en estado desolvatado. Análogamente a lo que sucede con la evaporación, la volatilización se ve favorecida si las partículas de aerosol seco son pequeñas. Pero también depende de la composición química de las partículas: a temperatura constante, los compuestos más refractarios tendrán una eficiencia de vaporización más baja, circunstancia que es muy conocida en la literatura.

Esto último pone de manifiesto la gran limitación de TS-FF-AAS respecto de FAAS. La temperatura que se alcanza en el tubo montado en llama es mucho menor que el de la propia llama, y tanto menor cuanto mayor es la energía que se consume en vaporizar y desolvatar la muestra.

Las temperaturas de sublimación, fusión y ebullición se pueden considerar como una primera indicación de la volatilidad del compuesto formado. Sin embargo, estas temperaturas no tienen necesariamente que ser menores que la temperatura de la llama para obtener una volatilización completa. De hecho y aún cuando la temperatura de la llama es considerablemente más baja que la temperatura de fusión, la volatilización completa de aerosol seco de partículas es todavía posible si la presión de vapor final de estas partículas está por debajo de la presión de saturación. Por otro lado, como la metodología de TS-FF-AAS produce una fina suspensión de partículas, la

velocidad de vaporización es elevada. A esto se suma que el tiempo de residencia de la especie química en la celda es mucho mayor que en FAAS, produciendo una eficiencia de vaporización más cercana a la unidad como dijéramos antes.

Por último, una vez que el analito está totalmente en fase gaseosa puede encontrarse formando compuestos moleculares, en estado iónico, en estado excitado o en estado atómico. De todas ellas, solo el estado atómico es el que generará señal analítica. En las siguientes ecuaciones se ha supuesto un modelo de analito que no forma compuestos refractarios por lo que se vaporiza rápida y completamente, con lo que β_v será igual a uno.

Entonces, si se define como fracción atomizada (β_a) a la relación entre la cantidad total de analito en estado atómico y libre (N_j) respecto de la cantidad de analito total en fase gaseosa (N_0), se puede hacer uso de la ecuación de Maxwell-Boltzman para calcular N_j :

$$N_j = N_0 \cdot e^{-\left(\frac{E_a}{RT}\right)} \quad [\text{ec. 8}]$$

Donde E_a es la energía empleada en romper todos los enlaces químicos del analito en fase gaseosa o energía de atomización. Los valores de esta energía de atomización podrían obtenerse a partir de medidas de energías de disociación si se supone que el analito forma un solo tipo de compuesto molecular en la fase gaseosa y que el mecanismo de ruptura de enlace es el mismo sin importar la temperatura de la celda, lo cual no siempre es cierto. Sin embargo, como un indicador aproximado del orden de estos valores de energía, se han utilizado los que se indican en la tabla siguiente que ha sido extraída de la literatura [14].

Tabla 1.1.- Valores de energía de disociación de algunas moléculas (eV)

Molécula	Energías de disociación (eV)	Molécula	Energías de disociación (eV)
AgO	2,0	BaOH	4,7
AlO	5	Ba(OH) ₂	9,5
BaO	5	CaOH	4,3
CaO	4	Ca(OH) ₂	9,2
CrO	5,5	CuOH	2,6
CuO	3,5	MgOH	3,75
FeO	4,3	MnOH	3,2
MgO	4,5	NiO	4,1
MnO	4	ZnO	3,2

1.4.2 - Evaluación teórica de la dependencia de la señal analítica con el caudal de muestra

Si se considera que la sección eficaz del haz de luz de la lámpara de cátodo hueco es del orden del elemento finito que calcula el programa de simulación y que además, el haz recorre el eje central del atomizador al que llamaremos (x), se pueden aproximar los valores de los parámetros fisicoquímicos involucrados en los cálculos que siguen, a los correspondientes valores obtenidos en el eje central (x). Entonces, reemplazando las ecuaciones 5, 7 y 8 en la ecuación 4 e integrando a lo largo del eje central (x), se puede obtener una función que permite calcular el número total de átomos del analito en estado fundamental (N_j) para cada caudal en el referido eje.

$$N_{j(\Phi)} = \Phi C \int_x \chi_{(\Phi,x)} \beta_{s(\Phi,x)} e^{-\left(\frac{E_a}{RT_{(\Phi,x)}}\right)} dx \quad [\text{ec. 9}]$$

Reemplazando la ecuación 9 en la ecuación 2 se obtiene la ecuación 10, que permite calcular la intensidad total absorbida por el analito (I_{ab}).

$$I_{ab(\Phi)} = \left(\frac{h \nu}{c} I_0 \right) \cdot (B_{ji} \Phi C) \left(\int_x \chi_{(\Phi,p)} \beta_{s(\Phi,x)} e^{-\left(\frac{E_a}{R T_{(\Phi,x)}}\right)} dx \right) \quad [\text{ec. 10}]$$

Debido a que los cálculos de temperatura y de composición del gas se realizan mediante el método de análisis por elementos finitos, no se obtiene una ecuación que indique la dependencia de estas variables termodinámicas con la posición sino que se obtiene una cantidad finita de valores a lo largo del atomizador. Entonces se reemplaza el operador integral por el de sumatoria finita. Luego, se reemplazan por K todos los términos constantes de la ecuación.

$$I_{ab(\Phi)} = K \Phi C \cdot \left(\sum_{\Delta x} \chi_{(\Phi,p)} \cdot \beta_{s(\Phi,x)} \cdot e^{-\left(\frac{E_a}{R T_{(\Phi,x)}}\right)} \right) \quad [\text{ec. 11}]$$

Sólo resta transformar el resultado en escala de absorbancia que es la señal analítica que se registra.

$$S_{(\Phi)} = -\log \left(\frac{I_0 - I_{ab}}{I_0} \right) \quad [\text{ec. 12}]$$

$$S_{(\Phi)} = -\log \left(1 + (K \Phi C) \cdot \left(\sum_{\Delta x} \left(\chi_{(\Phi,p)} \cdot \beta_{s(\Phi,x)} \cdot e^{-\left(\frac{E_a}{R T_{(\Phi,x)}}\right)} \right) \right) \right) \quad [\text{ec. 13}]$$

Si se aproxima $\log(1+X) = X$ cuando X tiende a 0.

$$S_{(\Phi)} = K\Phi C \cdot \left(\sum_{\Delta x} \left(\chi_{(\Phi,p)} \cdot \beta_{s(\Phi,x)} \cdot e^{-\left(\frac{E_a}{RT_{(\Phi,p)}}\right)} \right) \right) \quad [\text{ec. 14}]$$

La ecuación 14 muestra que la señal analítica obtenida es proporcional a la concentración de analito en algún intervalo de concentraciones en que la señal sea muy pequeña y la aproximación logarítmica válida.

Por otro lado, como se observa en la Figura 1.10, la ecuación 14 predice la forma de campana de la curva experimental así como el sitio de aparición del máximo. Se demuestra así que, para elementos con líneas cuyo coeficiente de Einstein e intensidad de fuente son comparables, conforme aumenta la energía de atomización disminuye la intensidad de señal observada. Se observa también que a medida que la energía de atomización del analito aumenta, disminuye el caudal óptimo de operación (esto es porque tal como dijéramos, se pierde mucha energía en eliminar el solvente).

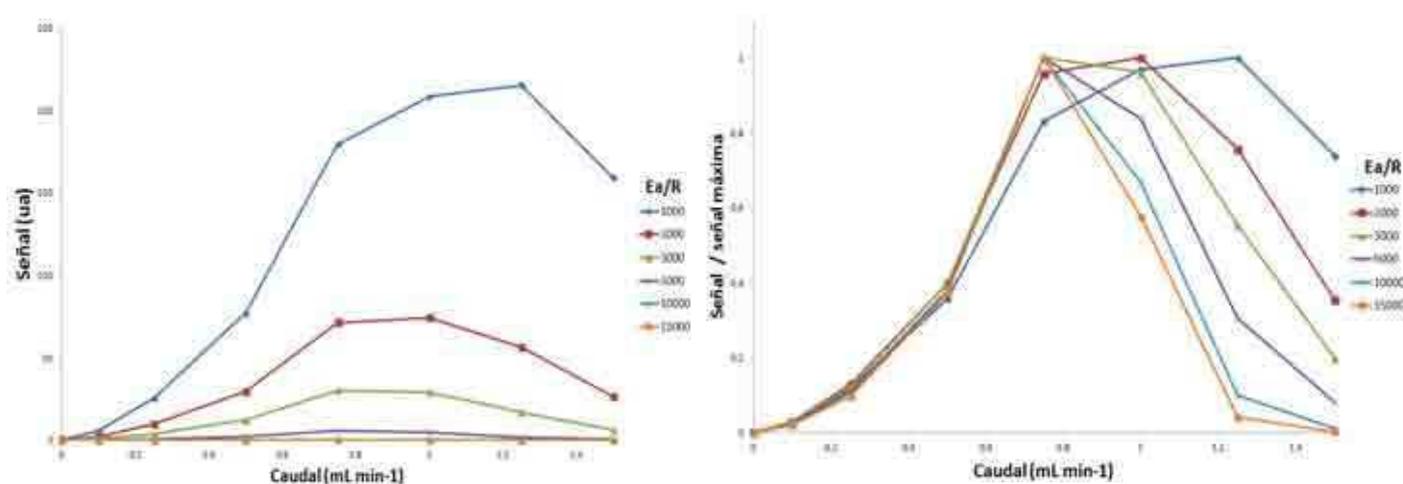


Figura 1.10 - Arriba: curvas modeladas de señal vs caudal para distintos valores de energía de atomización. Abajo: señal normalizada (dividida por la señal del máximo) vs. caudal.

1.4.3 - Evaluación teórico-experimental de la posición de la zona de atomización

El sitio en el que se produce preferentemente el proceso de atomización es clave desde el punto de vista analítico, ya que la temperatura máxima alcanzada y la extensión de la zona de máxima temperatura a lo largo del camino óptico de la LCH son los factores responsables de la intensidad de la señal. Como observáramos anteriormente, los parámetros físicoquímicos que están relacionados con la concentración de analito en estado de vapor atómico (ecuación 14) son la temperatura, la fracción másica del vapor y la fracción de desolvatación local. Estos parámetros determinan la distribución del vapor atómico en la celda de atomización. Por lo tanto, es lógico pensar que existirá alguna zona donde se alcance una mayor proporción de átomos en fase gaseosa, lo que influirá en la magnitud de la señal. La Figura 1.11 a la derecha muestra esta distribución, la que fue obtenida a partir del producto $\chi_{(\Phi,p)} \cdot \beta_s(\Phi,x) e^{-\left(\frac{E_a}{RT_{(\Phi,x)}}\right)}$ de la ecuación 14 para distintos caudales y sólo en el eje óptico.

Para evidenciar su ubicación de manera experimental, se enfrían selectivamente distintos sitios de la pared externa del tubo con una corriente controlada de aire frío. Entonces se registra el decaimiento de la señal analítica del elemento analizado en función del sitio de impacto del gas. Se repite esta operación a distintos caudales de ingreso de muestra (ver materiales y métodos). La Figura 1.11 izquierda muestra el porcentaje de decaimiento de la señal del analito, cadmio en este caso, cuando se enfría la celda de atomización en distintas posiciones y se lo compara con los perfiles de temperatura obtenidos. En la Figura 1.11 se puede observar que los sectores de la celda que tienen mayor influencia sobre la señal analítica se encuentran situados a ambos lados de la zona de desolvatación. Entre esta zona y ambos extremos de la celda -en los que el vapor atómico se diluye por los gases de combustión-, se encuentra una zona de alta temperatura y alta concentración de vapor atómico en la que la mayor parte del solvente ya fue vaporizado y la energía se utiliza mayoritariamente para atomizar el analito. Esta es la zona de atomización.

En la Figura 1.11 se muestra también como se modifica la posición de la zona de atomización en función del caudal de "carrier". Tal como discutiéramos anteriormente, a medida que se incrementa el caudal se ensancha la zona de desolvatación haciendo que la zona de atomización se corra hacia el extremo de la celda, efecto que se evidencia tanto en las mediciones experimentales como en la simulación.

Las diferencias que se encuentran entre ambas aproximaciones se observan principalmente en la zona central. En ese sector, el enfriamiento influye más sobre la señal que lo que se puede predecir a través de la concentración de vapor atómico calculada. Esto se debe a que, si bien y tal como surge de la simulación no existe una gran proporción de vapor atómico, al enfriar la zona central disminuye la eficiencia de desolvatación, con ello la concentración de vapor atómico y consecuentemente la absorbancia.

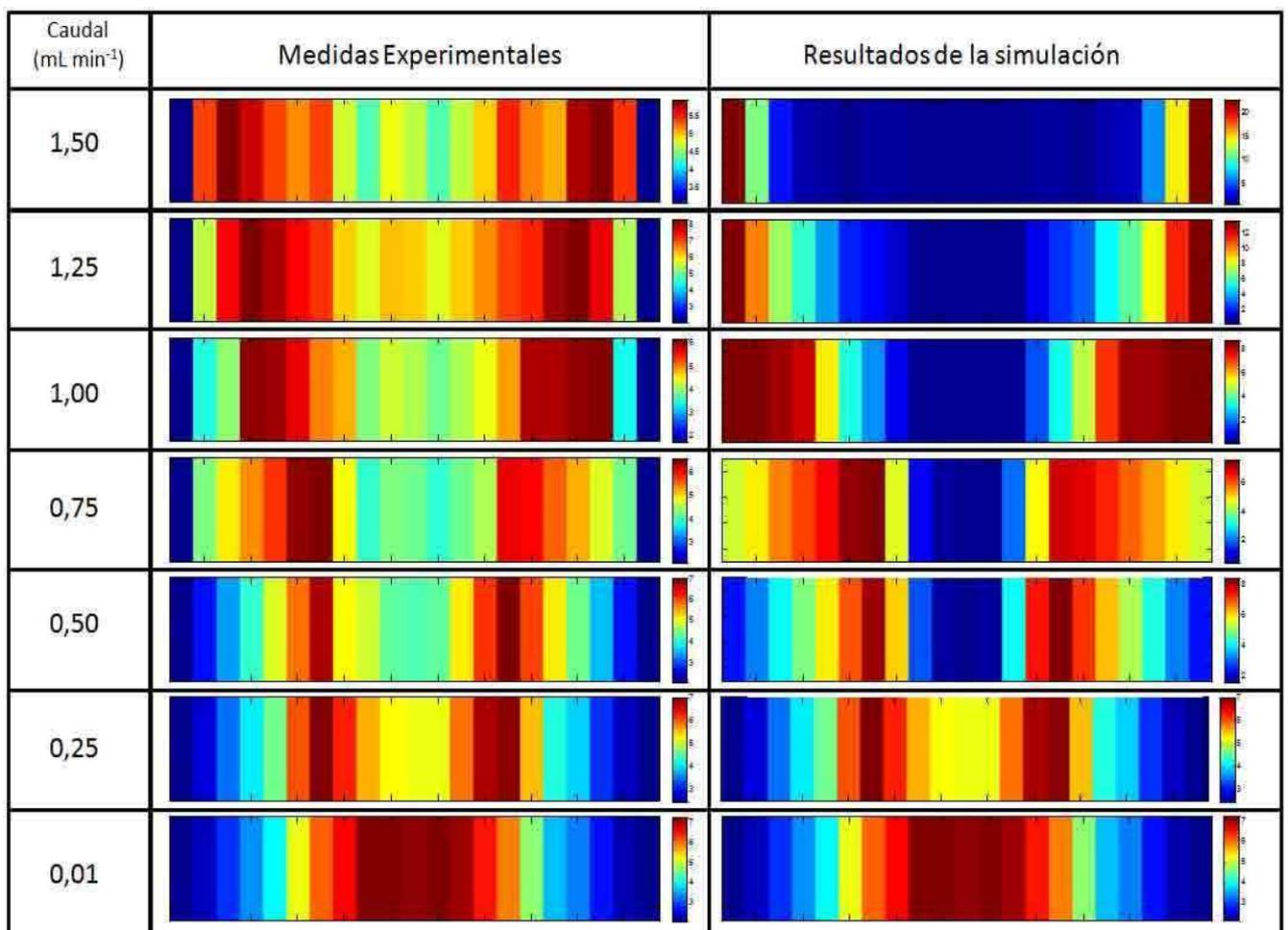


Figura 1.11 Izquierda: Proporción de vapor atómico en función de la posición en la celda de atomización (simulación) Derecha: Porcentaje de decaimiento de la señal de cadmio cuando se enfría la celda de atomización en distintas posiciones. (Verde: Mínimo, Rojo: Máximo)

1.5 - Comparación de cifras de mérito obtenidas para Au, Cd, Cu, Zn por FAAS y por TS-FF-AAS

En la Tabla 1.2 se muestran las cifras de mérito obtenidas para oro, cadmio, cobre y cinc utilizando TS-FF-AAS y su comparación con la metodología analítica tradicional de FAAS. En el caso de estos elementos que son relativamente volátiles, se verifica un incremento de la sensibilidad y mejora en los límites de detección.

Sin embargo, la performance del FAAS supera ampliamente las cifras de mérito obtenidas por TS-FF-AAS cuando se trata de elementos tales como cromo, vanadio, calcio y magnesio que a la poca volatilidad de algunos, suman la formación de compuestos moleculares estables en la llama tal como explicáramos precedentemente.

En el capítulo 3 se mostrará una estrategia para ampliar el número de analitos que se pueden valorar utilizando esta técnica novedosa. Para ello se han capitalizado los aspectos básicos de optimización de producción de vapor atómico descriptos en el presente capítulo.

Tabla 1.2.- Comparación de cifras de mérito obtenidas por TS-FF-AAS y FAAS

Cifras de Mérito	Cd		Au	
	FAAS	TS-FF-AAS	FAAS	TS-FF-AAS
Sensibilidad (L mg ⁻¹)	0,151 ± 0,003	4,602 ± 0,005	0,040 ± 0,001	0,083 ± 0,003
ADL (mg L ⁻¹)	0,05 - 5	0,002 - 4	0,12 - 15	0,08 - 10
%RSD (N=10)	2,65	1,36	5,3	5,4
LOD (mg L ⁻¹)	0,02	0,0001	0,04	0,03
LOQ (mg L ⁻¹)	0,06	0,0003	0,12	0,07
Cifras de Mérito	Cu		Zn	
	FAAS	TS-FF-AAS	FAAS	TS-FF-AAS
Sensibilidad (L mg ⁻¹)	0,175 ± 0,002	0,254 ± 0,003	0,132 ± 0,004	3,76 ± 0,03
ADL (mg L ⁻¹)	0,04 - 8	0,02 - 6	0,08 - 6	0,003 - 4
%RSD (N=10)	2,83	3,87	5,6	4,26
LOD (mg L ⁻¹)	0,01	0,006	0,03	0,001
LOQ (mg L ⁻¹)	0,03	0,018	0,08	0,003

1.6 - Materiales y Métodos

1.6.1 – Reactivos

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos calidad analítica. El agua doblemente deionizada (DIW) fue obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). El material de vidrio fue lavado con EXTRAN (Merck, Darmstadt, Germany) 1%v/v y fue mantenido en HCl 10%v/v. Antes de ser utilizado se enjuagó con DIW.

Las soluciones estándar de todos los analitos utilizados fueron preparadas diariamente por dilución apropiada de una solución madre de 1000 mg L⁻¹ (Merck).

1.6.2 – Instrumental

En todos los experimentos se utilizó un espectrómetro de absorción atómica Shimadzu AAS 6800 (Kyoto, Japon) equipado con lámparas de cátodo hueco de los analitos correspondientes y una lámpara de deuterio para corrección de fondo. Las condiciones instrumentales fueron las recomendadas por el fabricante. Se utilizó una llama de aire acetileno en condiciones estequiométricas.

El sistema TS-FF-AAS fue ensamblado utilizando una bomba peristáltica de ocho canales (IPC, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Switzerland), una válvula rotatoria de seis puertos (Valco Instruments, Houston, TX, USA), tuberías de 0.5 mm i.d. de PTFE^(R), un capilar cerámico (0,5mm diámetro interno, i.d., 6 cm de longitud) y un horno atomizador de níquel perforado con 6 orificios de 2mm de diámetro en la base y un orificio lateral de 2,3 mm por donde penetra el capilar cerámico (ver Figura 1.12). El atomizador de níquel (Inconel 600, camcam São Paulo, Brazil) posee la siguiente composición: 72% Ni, 14 -17% Cr, y 6-10% de Fe como componentes mayoritarios. Las dimensiones utilizadas fueron 9,7 mm de i.d. y 100 mm de largo.

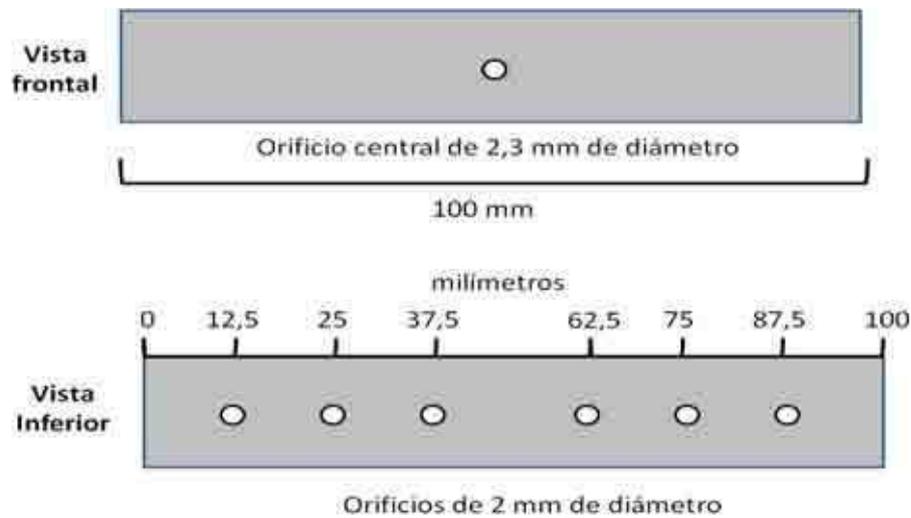


Figura 1.12.- Distribución de orificios en la celda de atomización perforada

1.6.3 - Tratamiento de datos

Las señales transitorias fueron almacenadas, utilizándose el modo altura de pico para la cuantificación ya que los picos resultaron lo suficientemente angostos como para hacer innecesario el uso de área para la obtención de las curvas de calibrado

Las simulaciones del comportamiento del ambiente interno del atomizador se realizaron con Solidworks.

Las mediciones de temperatura fueron realizadas con una cámara digital Nikon D3100. Las fotografías para la calibración de la metodología fueron adquiridas entre 600 °C y 1000 °C con intervalos de 50 °C. Una mufla (Heraeus) fue empleada para termostatar la celda de atomización. Las mediciones fueron realizadas a sensibilidad y valores de exposición fijos. La velocidad del obturador fue de 1/10 segundos y una apertura de 6,3" fue considerada óptima para el ámbito de temperaturas empleado.

El procesamiento de imágenes fue realizado con Matlab 8.0. La Figura 1.12 muestra un esquema que resume el procedimiento utilizado para estimar la distribución de temperaturas a lo largo de la celda de atomización. El programa de Matlab se anexa al final del capítulo, previo a las

A partir de las fotografías adquiridas, y siendo que cada *pixel* contiene la información de tres canales (rojo, verde y azul), se preparan tres matrices. Cada una de ellas contiene la distribución espacial de cada uno de los colores. Luego, para cada *pixel* registrado se toman los valores del canal verde (G) y se los divide por los valores del canal rojo (R.). A este valor se le aplica el logaritmo natural y se lo interpola en la curva de calibración de temperatura (Figura 1.4) obteniéndose un valor de temperatura para cada uno de los *pixels*. Lo mismo se hace para los canales azul (B) y verde (G), promediándose luego ambos valores. Por último se prepara una imagen donde a cada *pixel* se le otorga un color dependiendo de la temperatura.

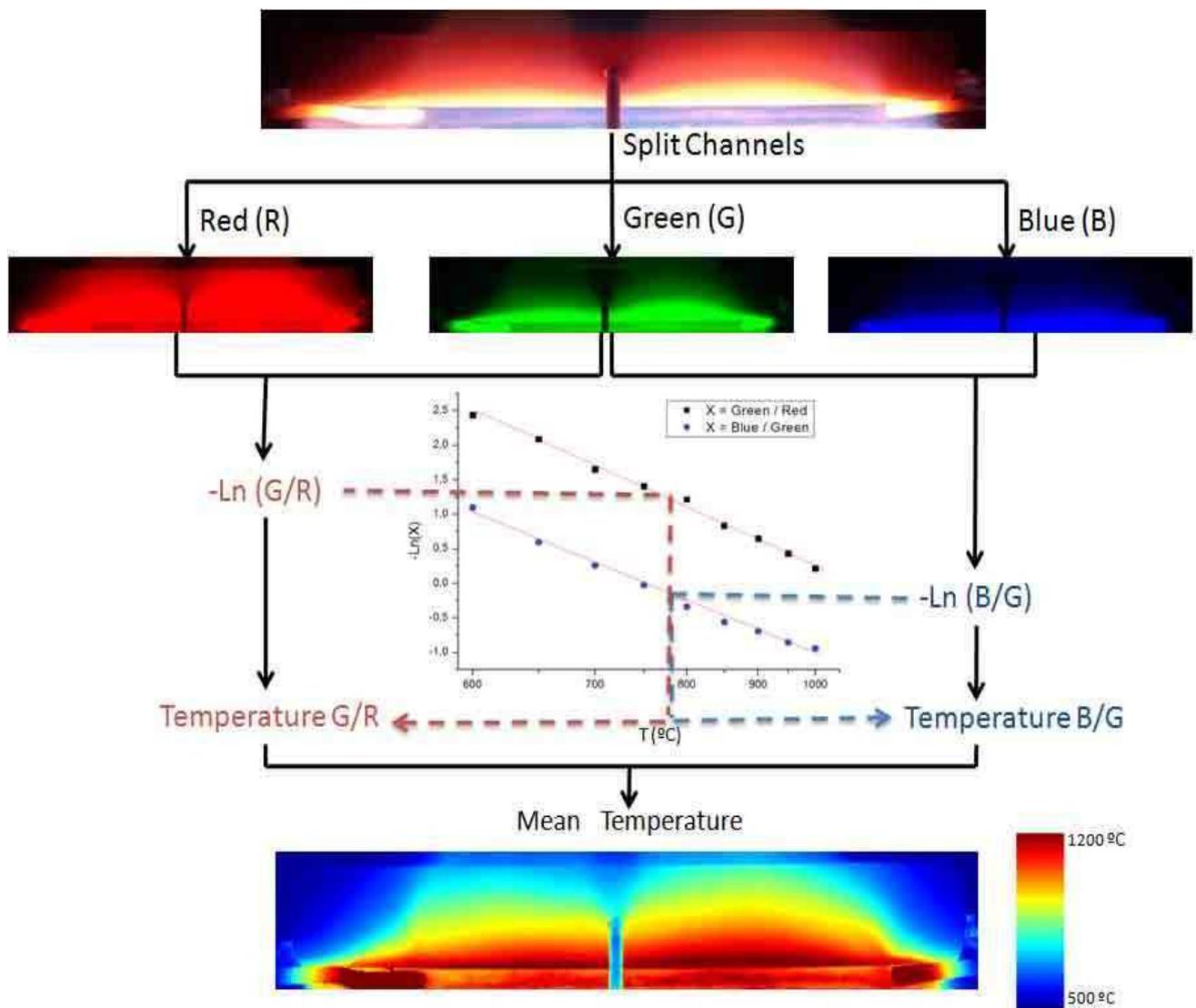


Figura 1.12- Procedimiento para la estimación de distribución de la temperatura

Programa de Matlab utilizado para el cálculo de distribución de temperaturas a partir de imágenes:

```
function [Tgr, Tgb, Tbr, Tprom]=Temp (M)

M1= double (M) ;

Tgr =4247./ (-log (M1 (:, :, 2) ./M1 (:, :, 1)) +4.07) ;

Tbr=3006./ (-log (M1 (:, :, 2) ./M1 (:, :, 3)) +4.11) ;

Tgb=4206./ (-log (M1 (:, :, 3) ./M1 (:, :, 1)) +4.11) ;

Tprom= (Tgr+Tgb) /2;
%imtool (Tgr) ;
%imtool (Tgb) ;
%imtool (Tbr) ;
imtool (Tprom) ;
end
```

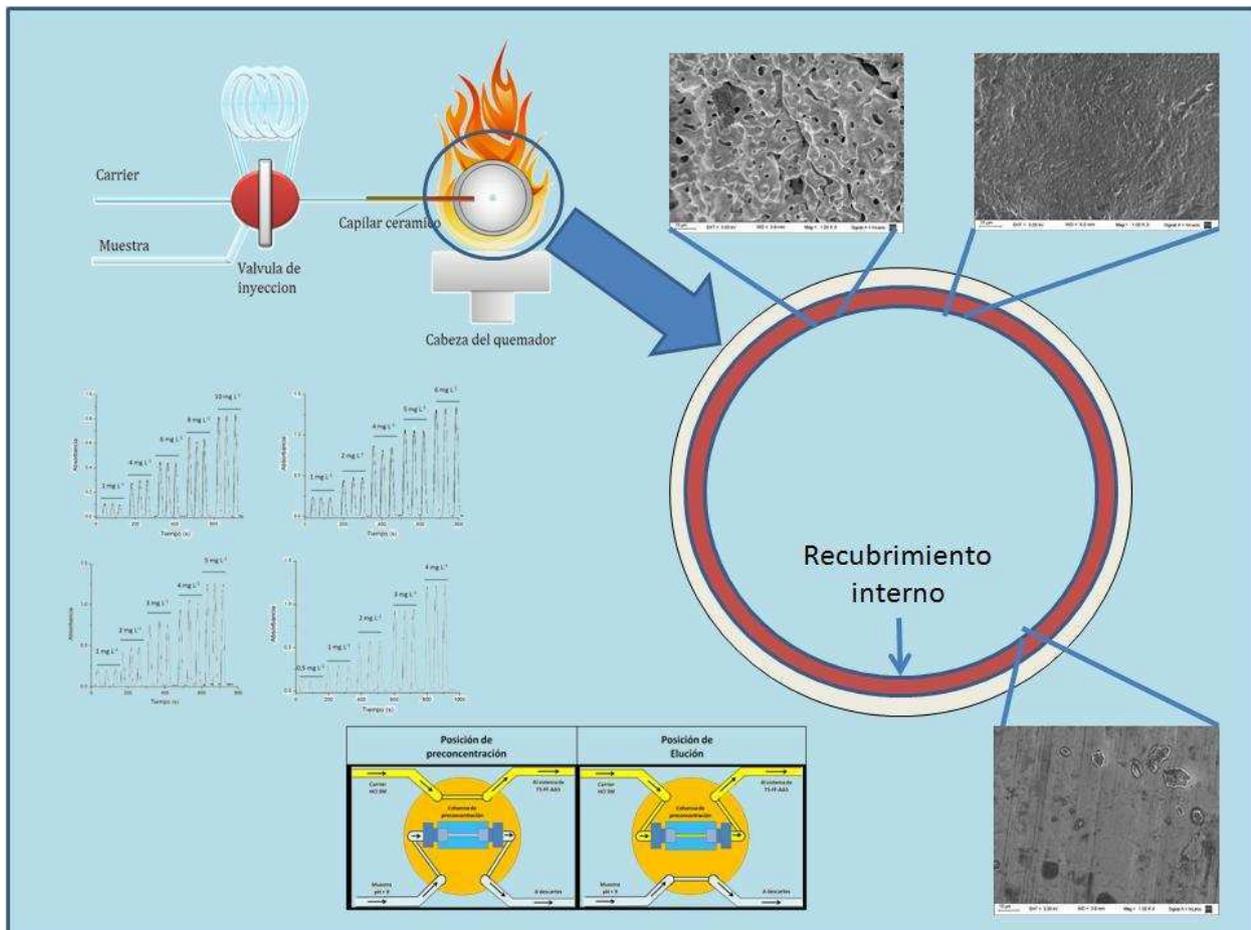
1.7 - Bibliografía

- [1] S. Musil, T. Matoušek, J. Dědina, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2015**, *108*, 61–67.
- [2] Y. Arslan, S. Musil, T. Matoušek, J. Kratzer, J. Dědina, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2015**, *103-104*, 155–163.
- [3] M. da Silva Gomes, E. Rodrigues Pereira-Filho, *Microchem. J.* **2009**, *93*, 93–98.
- [4] R. Moretto Galazzi, M. A. Z. Arruda, *Talanta* **2013**, *117*, 543–8.
- [5] J. Davies, H. Berndt, *Anal. Chim. Acta* **2003**, *479*, 215–223.
- [6] A. Gáspár, H. Berndt, *Spectrochim. acta, Part B At. Spectrosc.* **2000**, *55*, 587–597.
- [7] G.F. Kirkbright, Michael Sargent Atomic Absorption and Fluorescence Spectroscopy Hardcover, Academic Press Inc , **1975**.
- [8] M. L. Brancalion, E. Sabadini, M. a Z. Arruda, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2009**, *64*, 89–94.

- [9] Gouri Dhatt, Emmanuel Lefrançois, Gilbert Touzot, *Finite Element Method*, Wiley, 2012
- [10] K. Möllmann, F. Pinno, M. Vollmer, *Thermal An. Research and Science*, **2005**, 1–13.
- [11] J. Hult, I. S. Burns, C. F. Kaminski, *Proc. Combust. Inst.* **2005**, *30*, 1535–1543.
- [12] M. L. Brancalion, E. Sabadini, M. a Z. Arruda, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6527–6533.
- [13] J. Mora, A. Canals, V. Hernandis, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **1996**, *51*, 1535–1549.
- [14] C. Th. J. Alkemade, T. Hollander, W. Snelleman, P. J.Th. Zeegers, *Metal vapours in flames*, Pergamon Press, 1982.

Capítulo 2

“Influencia de la superficie interna de la celda de atomización”



“An expert is a person who has made all the mistakes that can be made in a very narrow field.”

— Niels Bohr

2.1 - Introducción

La cuantificación de oro en matrices naturales constituye un desafío para la química analítica debido, principalmente, a las bajas concentraciones en las que suele encontrarse.

Los métodos más utilizados para su valoración en el laboratorio de rutina involucran el uso de espectrometrías de absorción atómica (AAS) o emisión atómica (ICP-OES)^[1,2]. Sin embargo, la aplicación directa de estas metodologías no satisface los límites de detección requeridos en la mayoría de las muestras en la que este analito está presente. Es por esta razón que en la práctica, el análisis por AAS se ve precedido por una etapa de preconcentración que involucra normalmente dos tipos de procedimientos:

- ❖ La muestra se digiere con agua regia y el complejo cloroáurico (HAuCl_4) resultante se extrae en un volumen menor de solvente orgánico (normalmente, metil isobutilcetona (MIBK))^[3]. La mayor solubilidad de este complejo de oro en el solvente orgánico determina la transferencia de oro a esta fase. Posteriormente, el extracto orgánico se analiza por AAS.
- ❖ La muestra se mezcla con agentes fundentes como tetraborato de sodio (bórax), hidróxido de sodio o carbonato de sodio, y plomo (*fire assay*). Esta mezcla se funde en un horno, el oro forma una amalgama con el plomo la que, al ser más densa que el resto de los componentes, se deposita en el fondo. Posteriormente se descarta el sobrenadante y se recupera la amalgama que se disuelve en un pequeño volumen de agua regia para la posterior cuantificación de oro.

Estos procedimientos requieren una gran cantidad de muestra para alcanzar los factores de preconcentración que hacen posible la cuantificación. Por otra parte, son largos, tediosos y aumentan los riesgos de contaminación cruzada, a la vez que incorporan gran cantidad y variedad de reactivos auxiliares que podrían actuar como interferencias en la valoración. El desarrollo de

nuevos métodos y/o la optimización de los ya existentes podrían ayudar a sustituir dichos procedimientos.

En la primera parte del siguiente capítulo, se presenta como ejemplo la utilización de cuarzo como material de la celda de atomización para la determinación de oro por TS-FFAAS, y las ventajas obtenidas con respecto a la celda de níquel. Se estudiarán los efectos de la dispersión radial^[4] del vapor atómico en la celda mediante la disminución del radio del tubo empleado. En la Figura 2.1 se muestra un esquema del sistema de “*thermospray*” utilizado para la valoración de oro en el que el material y las dimensiones del tubo montado en llama son genéricos y se modifican conforme los requerimientos de cada experimento particular. Pero, en las condiciones operativas óptimas el “*carrier*” será HCl 3M, la muestra estará acondicionada con HCl de la misma concentración que la del “*carrier*” y el atomizador que se coloca en la cabeza del quemador será de cuarzo de 6,7 cm de diámetro interno. Estas metodologías se utilizarán en la determinación de oro en medicamentos homeopáticos de *Aurea Oligoplex* sin necesidad de mineralización previa tal como se requiere utilizando FAAS.

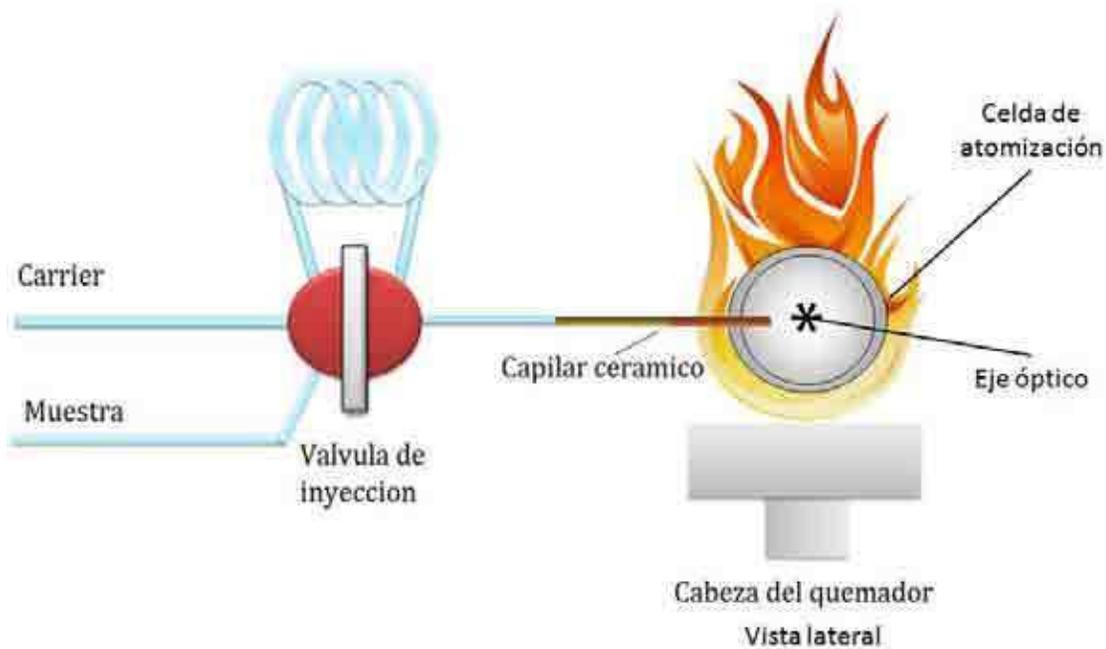


Figura 2.1.- Diseño experimental empleado en las mediciones por TS-FF-AAS.

Condiciones de trabajo optimizadas para oro: “*carrier*” HCl 3M, muestra acondicionada con HCl de la misma concentración, cuarzo como material de la celda de atomización.

Luego, se mostrará el empleo de columnas de extracción en fase sólida (SPE) acopladas en línea para la preconcentración del analito, previo a su detección por TS-FF-AAS con tubo de cuarzo.

En la segunda parte de este capítulo, se mostrarán modificaciones químicas sobre la pared interior de la celda de atomización y la influencia que sobre la sensibilidad analítica de diversos analitos ofrece esta modificación.

2.2 - Optimización de las Variables operativas para la cuantificación de Oro por TS-FF-AAS con atomizador de níquel

2.2.1 - Naturaleza del *“carrier”*

Como se mencionara en el capítulo anterior, la elección de una solución transportadora adecuada y su concentración son elementos indispensables para obtener una respuesta optimizada en TS.

En el caso de oro, no es conveniente utilizar soluciones transportadoras alcalinas ya que el oro forma productos de baja solubilidad en este medio. Además, por lo general, las muestras provienen de digestiones en medio ácido lo que hace conveniente utilizar *“carrier”* de la misma naturaleza. Por ello el uso de ácido clorhídrico pareció doblemente adecuado: proporciona pH ácido y compleja al analito lo que podría modificar positivamente las condiciones de atomización. Sin embargo, siendo la celda de atomización un tubo metálico susceptible al ataque ácido, se decidió estudiar su grado de deterioro por la acción del HCl 1,0 M.

Las micrografías de la superficie interna del tubo de níquel obtenidas por *microscopia electrónica de barrido* (SEM) bajo distintas condiciones de temperatura, en presencia del analito y frente a la exposición del ácido, se muestran en la Figura 2.2. Si se realiza la comparación con superficies no tratadas, se pueden observar diferentes grados de deformación del material cuando se utiliza repetidamente la solución ácida.

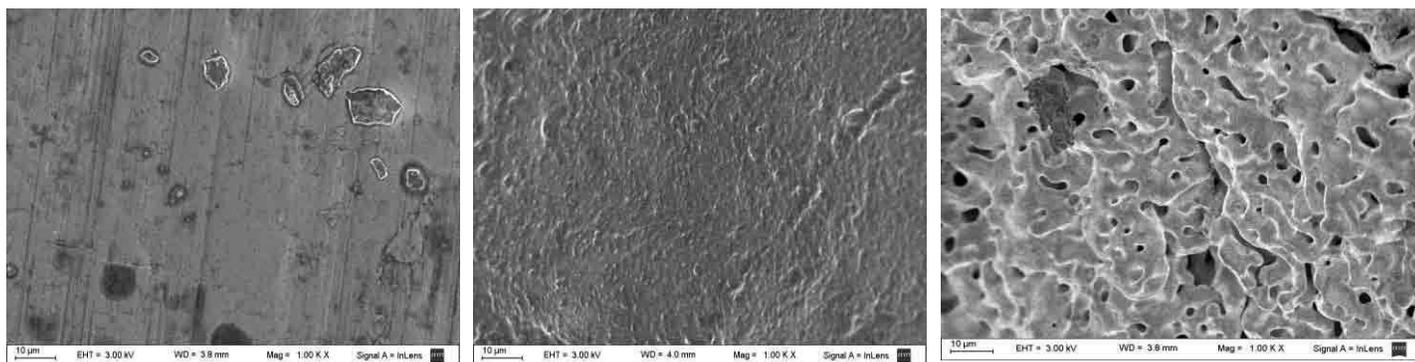


Figura 2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés) de la superficie interna de la celda de níquel. Izquierda: sin uso, centro: alta temperatura de llama y soluciones de oro en agua, derecha: alta temperatura de llama y soluciones de oro en HCl 1,0 M.

Estos experimentos llevaron a limitar la concentración de HCl hasta un máximo de 0,1M. La Figura 2.3 muestra la señal analítica de oro utilizando HCl de concentraciones crecientes no encontrándose diferencias significativas por lo que agua parecería ser la mejor opción como solución de transporte si se utiliza níquel como material de la celda de atomización.

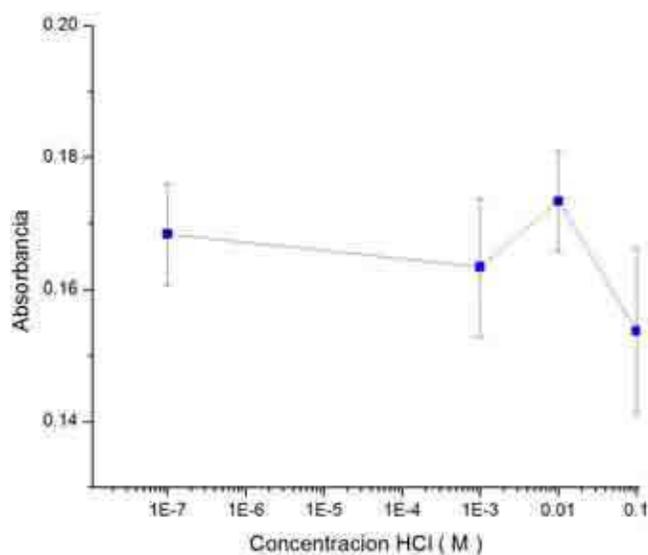


Figura 2.3.- Señal analítica (altura de pico) en función de la concentración de HCl (M)

Sin embargo, y con el fin de evaluar la posibilidad de disminuir la energía que se consume en vaporizar la muestra, se decidió agregar etanol al “carrier” de agua, ajustar la matriz de muestra a esa condición y estudiar el efecto sobre la señal. En la Figura 2.4 se muestran los resultados obtenidos para el empleo de distintas proporciones etanol/agua. Se observa que a medida que la proporción de etanol crece, la señal disminuye contrariamente a lo esperado. Cabe destacar que el empleo de un medio de menor tensión superficial y densidad que el del agua disminuye el tamaño medio de gota (como se discutirá en el capítulo 3), lo que haría pensar en un incremento en la eficiencia de atomización del analito y por ende de la señal. Sin embargo, el etanol es un combustible que consume oxígeno, genera un entorno más reductor y un enfriamiento de la celda. De esta manera, el proceso de atomización se hizo mas ineficiente y la señal analítica disminuyó. La Figura 2.4 muestra que el último efecto prevalece sobre el primero, independientemente de la proporción de etanol que contenga el “carrier” por lo que se decidió que la adición de solvente no era una buena alternativa, optándose por el uso de agua solamente.

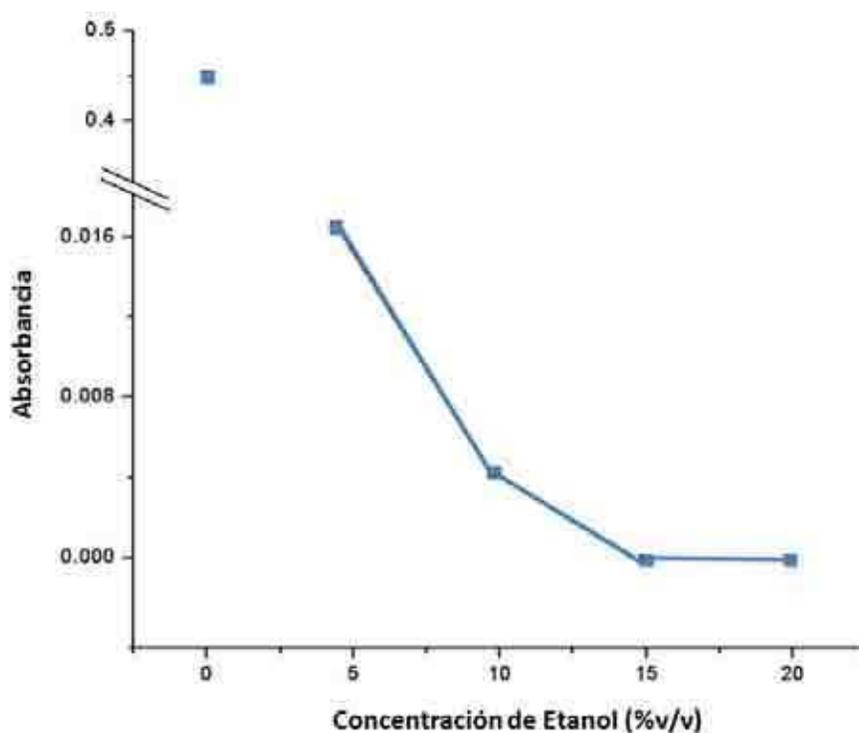


Figura 2.4.- Señal analítica (altura de pico) vs. % de etanol/agua de la solución “carrier”. Solución patrón de 1 mg Au.L^{-1} ajustada al “carrier”, $500 \mu\text{L}$ de “loop” de muestra, $0,9 \text{ mL.min}^{-1}$ caudal de “carrier”.

2.2.2 - Volumen de inyección

Como se discutiera en el capítulo 1, la altura y el área de la señal están directamente relacionadas con la variable volumen de inyección. En la Figura 2.5 se muestra la optimización de la señal analítica en función del volumen de inyección para el caso del oro. A medida que se aumenta el volumen de inyección aumenta la altura del pico, situación que se hace mucho menos notoria entre 500 y 750 μL . Si bien la altura del pico para 750 μL es ligeramente mayor que la de 500 μL , la relación altura/área muestra un descenso pronunciado, indicando un ensanchamiento importante del pico con un aumento poco significativo de la altura. Por lo tanto se selecciona un volumen de **500 μL** como óptimo para la inyección.

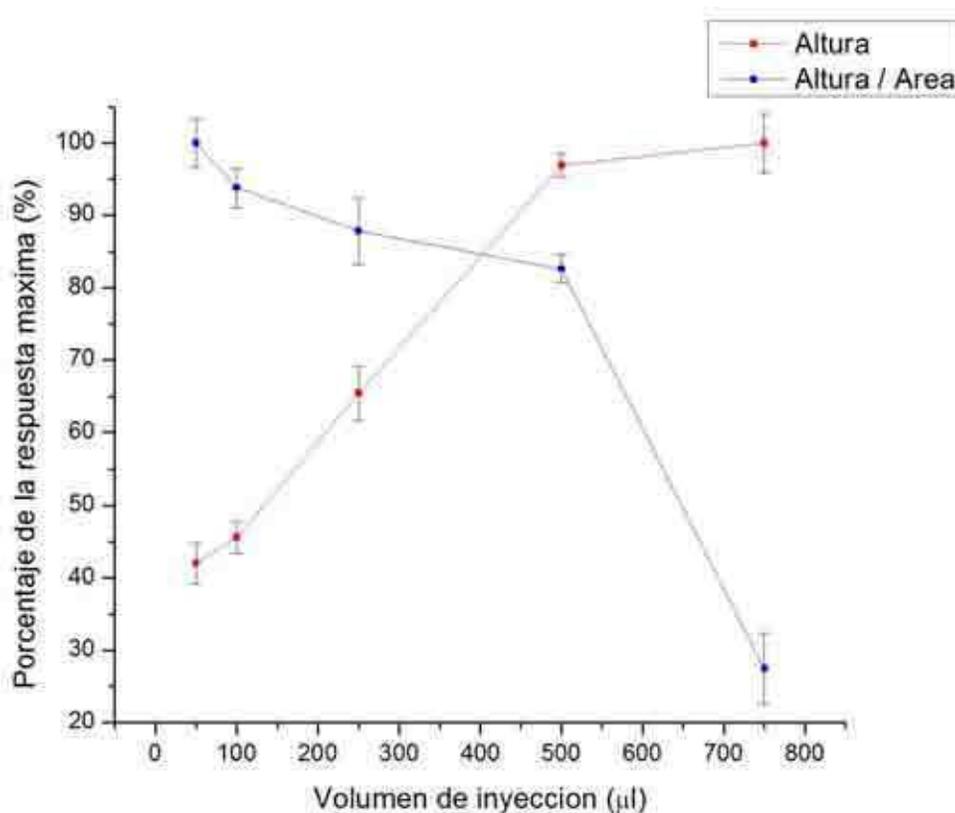


Figura 2.5.-Respuesta porcentual de altura (línea roja) y relación area/altura (línea azul) vs. volumen de inyección (μl) para 1 mg Au.L⁻¹ en agua, caudal de "carrier" 0,9 mL.min⁻¹.

2.2.3 - Caudal de "carrier"

En el capítulo 1 discutimos la influencia que sobre la señal analítica en TS tiene la variable operativa caudal de "carrier". La Figura 2.6 muestra la dependencia de la señal con el caudal de solución de transporte, encontrándose un máximo en $0,9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Este valor surge de una solución de compromiso entre el mayor ingreso de muestra a la celda y la disminución de la temperatura de la misma ya que, un aumento de la energía requerida para desolvatar se transforma en una disminución de la energía disponible para obtener vapor atómico.

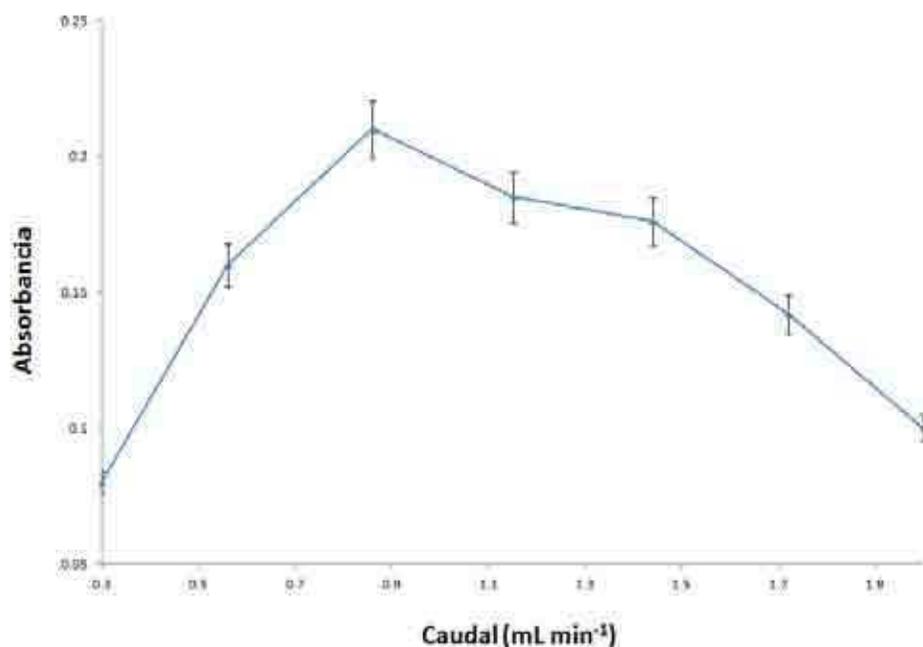


Figura 2.6.- Señal (altura de pico) vs. caudal de "carrier", $1 \text{ mg Au}\cdot\text{L}^{-1}$ en agua, $500 \mu\text{L}$ "loop" de muestra.

2.2.4 - Material de la celda de atomización para la cuantificación de oro.: Níquel versus cuarzo.

Si bien la celda de níquel es la opción clásica en TS-FF-AAS [5-8], se decidió estudiar la performance de una celda de cuarzo en la determinación de oro con el objetivo de utilizar HCl de concentración superior a $0,1 \text{ M}$ como solución de transporte, ya que tales experimentos no

resultaban posibles con la celda metálica de acuerdo a lo observado en las micrografías SEM (ver Figura 2.2). En nuestro concepto, el uso de HCl de alta concentración (tal como se lo utiliza en la extracción de oro con MIBK), favorecería la formación de un complejo cloroáurico que podría facilitar la eficiencia de formación de vapor atómico de oro en el horno del “*thermospray*” y por ende la sensibilidad analítica.

Asumiendo que el cuarzo debería mostrarse inerte a la acción de los ácidos minerales, (excepción hecha del HF), se decidió utilizarlo como material de la celda y elevar así la concentración de HCl a utilizar como “*carrier*” y matriz de muestra. La Figura 2.7 muestra que un aumento en la concentración de HCl se traduce en un aumento de la altura de pico hasta alcanzar un “*plateau*” para concentraciones de 3M en adelante. Se decidió entonces utilizar HCl 3M como matriz de muestra y ajustar la solución de “*carrier*” a la misma concentración ya que permite un aumento de la sensibilidad tal como se mostrará en el apartado dedicado a cifras de mérito. Una ventaja adicional del tubo de cuarzo como celda de atomización es que hace posible ingresar a la celda de TS muestras fuertemente ácidas, condición que ostentan todas aquellas que provienen de mineralización para, por ejemplo, destrucción de la materia orgánica. Nótese que, excepción hecha del “*carrier*” HCl 3 M ajustado a la matriz de muestra, las restantes variables operativas se mantuvieron idénticas a las optimizadas con celda de níquel a fin de compararlas en términos de performance analítica. Esto incluye las dimensiones de ambas celdas: idéntica longitud de 10 cm y prácticamente el mismo diámetro interno (i.d.) de 9,7 mm para níquel y 9,4 mm para cuarzo. La influencia de la variable diámetro interno se discutirá en el próximo apartado.

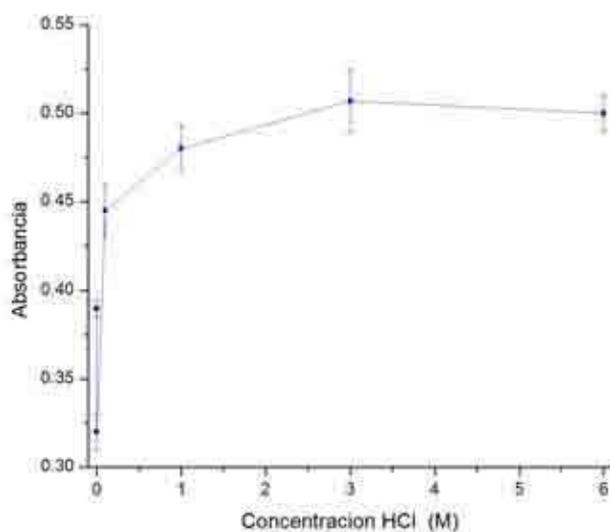


Figura 2.7.- Optimización de la concentración de HCl utilizado como "carrier" en la determinación de oro por TS-FF-AAS con tubo de cuarzo. 2 mg Au.L⁻¹ en matriz ajustada al "carrier", 500 µL de "loop", 0,9 ml.min⁻¹ de caudal

En la Figura 2.8 se muestran las imágenes SEM de la superficie interna del tubo de cuarzo estresada por temperatura y en medio ácido 1,0 M, análogamente a lo realizado con el tubo de níquel.

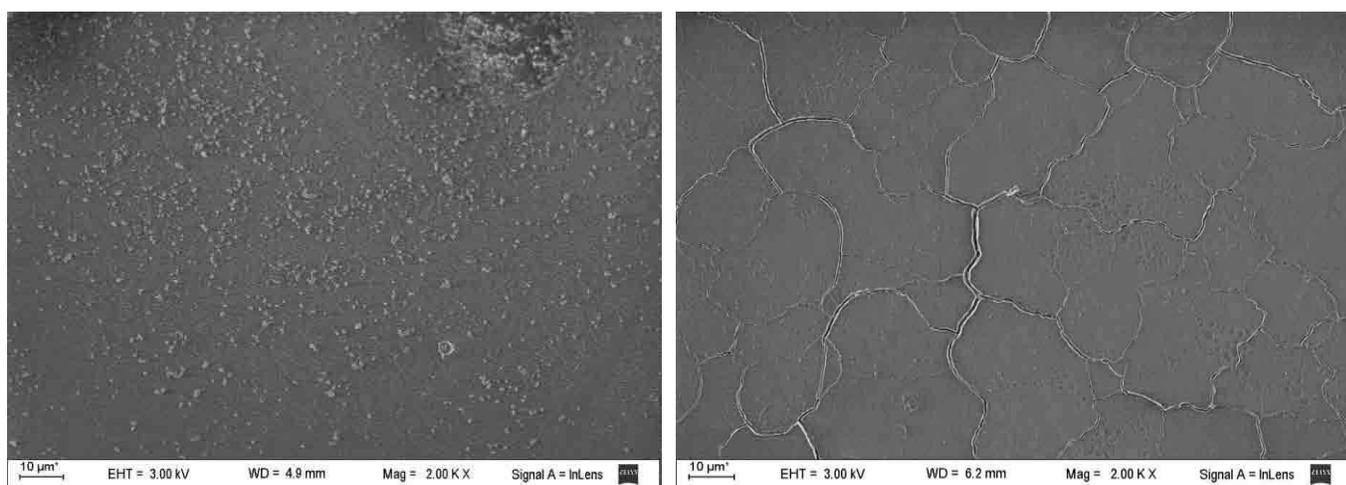


Fig. 2.8 Microscopía de barrido electrónico (SEM) de la superficie interna de la celda de cuarzo. Izquierda: sin uso, derecha: alta temperatura (llama) y soluciones de oro en HCl 1 M.

Como era de esperarse, no se observan efectos de corrosión cuando las soluciones ácidas se evaporan dentro de la celda. Sólo se observan algunas grietas provocadas por el choque térmico ocasionado por los ciclos de calentamiento/enfriamiento que se producen toda vez que se enciende y apaga el mechero, sumado a los impactos de las gotas del aerosol formado. Es interesante observar también que, cuando se magnifica la escala, se observan grietas superficiales en forma radial consistentes con colisiones contra el cuarzo posiblemente debidas al impacto de las gotas de aerosol sobre las paredes. A pesar de esto, la vida útil de la celda de cuarzo es superior al año en condiciones de uso continuo en las condiciones descritas. La Figura 2.9 muestra imágenes SEM amplificadas que permiten observar con mayor detalle lo expresado.

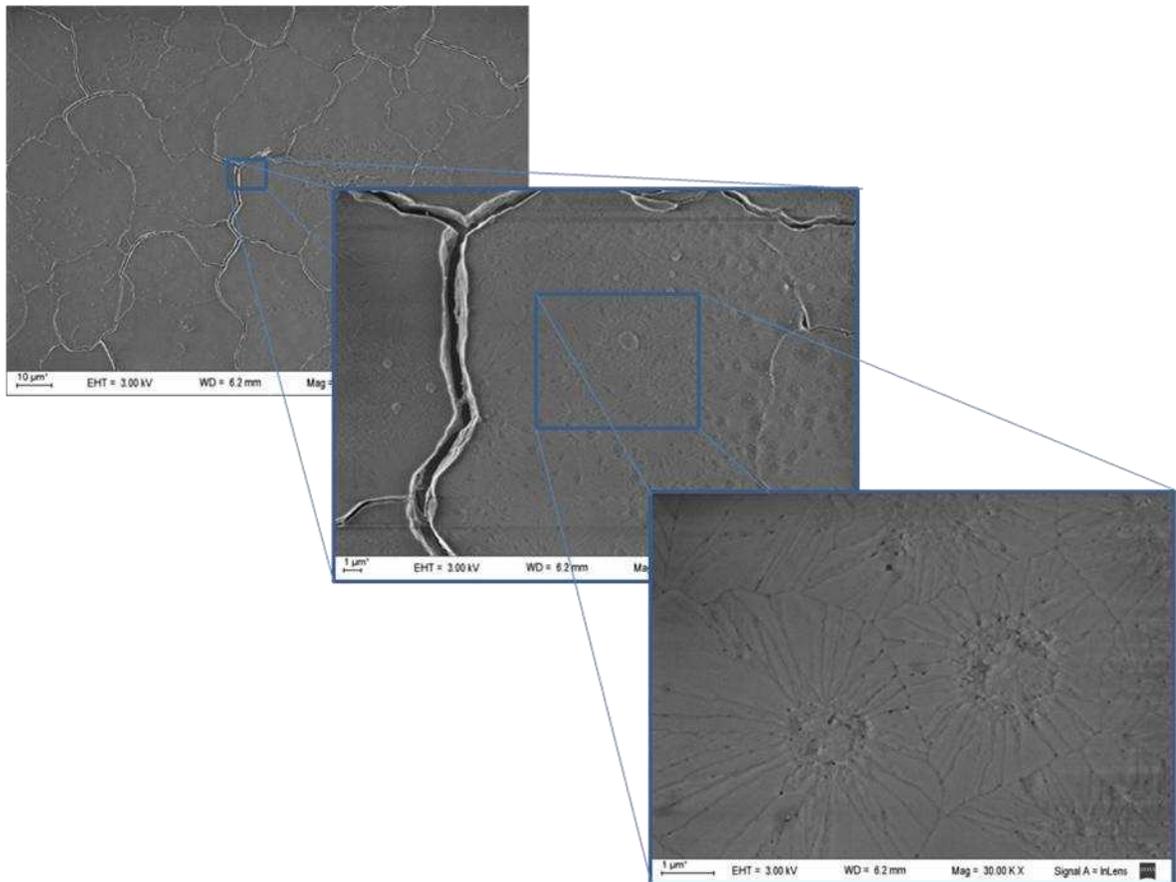


Fig. 2.9.- Imágenes SEM de la superficie interna del tubo de cuarzo con distinto grado de amplificación: llama de alta temperatura y soluciones de oro en HCl 1 M.

2.2.5 – Diámetro interno de la celda de atomización

Las dimensiones de la celda de atomización son variables que influyen la señal analítica como se discutiera en el capítulo 1. Con el objetivo de optimizar aún más el desempeño de la celda de cuarzo y considerando que podíamos disponer de un tubo de diámetro interno más pequeño (i.d. =6,7 mm) sólo con este material, se decidió comparar su respuesta con respecto al de 9,4 mm i.d. utilizado previamente. Estos experimentos dieron como resultado un incremento en la sensibilidad para la determinación de oro de un 15% al utilizar el tubo de cuarzo de menor diámetro.

Esto es explicable si consideramos que la disminución de la sección del tubo (en este caso a la mitad) limita la dispersión del analito en el volumen de celda, concentrándolo. Si bien una reducción a la mitad podría esperarse que resultara en un aumento al doble de la concentración del analito en la fase gaseosa, sólo se verifica un incremento del 15% en señal como mencionáramos. Esta situación podría deberse a que también aumenta en un 40% la relación entre la superficie interna del cuarzo y el volumen de la celda y, si bien la interacción entre el analito y el cuarzo es más débil que en el caso del níquel, la proporción del analito que se contacta con la superficie interna es mayor, haciendo disminuir la cantidad de analito en fase gaseosa. De allí que el incremento en sensibilidad, si bien importante, no sea el esperado

2.3 - Performance analítica

En la Tabla 2.1 se muestran las cifras de mérito para la determinación de oro con FAAS, TS-FF-AAS en diferentes condiciones operativas y GFAAS. Se puede observar un incremento de la sensibilidad de aproximadamente 150% cuando se reemplaza el tubo de níquel por uno de cuarzo de diámetro interno semejante y más aún cuando este diámetro interno disminuye como se discutiera en 2.2.5. Dado que excepto por el material del tubo, las restantes variables operativas permanecieron constantes, este incremento sólo puede explicarse a través de una más eficiente atomización en el interior del tubo, circunstancia que no debería ser sorprendente dada la mayor reactividad e interacción con los átomos de oro que podría esperarse de una superficie de níquel a alta temperatura. Esta mayor interacción con la superficie de níquel disminuiría la

Capítulo 2: Influencia de la superficie interna de la celda de atomización

concentración efectiva de vapor atómico en el volumen de observación y, en consecuencia, la magnitud de la señal. Nótese que el efecto combinado del aumento en la concentración de solución de transporte y el uso de celdas de cuarzo de diámetro interno menor permite alcanzar un límite de detección (LOD) de 4 ng mL^{-1} , comparable con la metodología de GFAAS que presenta un LOD de 1 ng mL^{-1} . A esto se suma que el TS como técnica de inyección continua y no discreta, permite un aumento en la frecuencia analítica y un costo de operación equivalente a las técnicas de llama de rutina, transformándola en una alternativa muy interesante para la valoración de oro.

Tabla 2.1. Cifras de mérito para la determinación de oro por TS-FF-AAS en diferentes condiciones operativas: Comparación con FAAS y GFAAS.

Cifras de Mérito	FAAS	TS-FF-AAS	TS-FF-AAS	TS-FF-AAS	TS-FF-AAS	GFAAS
		Nickel furnace (id = 9,7 mm) Carrier Agua	Quartz furnace (id = 9,4 mm) Carrier Agua	Quartz furnace (id = 6,7 mm) Carrier Agua	Quartz furnace (id = 6,7 mm) Carrier HCl 3 M	
Sensibilidad (mL mg^{-1})	0.040 ± 0.001	0.083 ± 0.003	0.207 ± 0.005	0.237 ± 0.009	0.306 ± 0.006	$0,140 \pm 0.003$
ADL (mg mL^{-1})	0.12 – 15	0.08 - 10	0.03 – 8	0.02 - 6	0.01 - 4	0.003 – 0.080
% RSD (N=10)	5.3	5.4	6.3	5.9	2.5	4.6
LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.004	0.026	0.01	0.006	0.004	0.0009
LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.12	0.085	0.034	0.019	0.012	0.003
Frecuencia Analítica (h^{-1})	70	72	72	72	72	10

2.4- Determinación de oro en medicamento homeopático (*Aurea Oligoplex*)

El medicamento homeopático *Aurea Oligoplex* es un extracto etanólico de hierbas que requiere una digestión completa previa a su determinación por FAAS. En el presente estudio, se remplazo el método usual de determinación de oro en este medicamento por el método de TS-FF-AAS con introducción directa de muestra (sin digestión previa). La Tabla 2.2 muestra los resultados obtenidos en el análisis de cinco muestras de *Aurea Oligoplex* por ambas metodologías analíticas. Los resultados no presentan diferencia significativa para un nivel de confianza de 95% (n =5).

Tabla 2.1- Comparación de los resultados obtenidos en la determinación de oro por FAAS con digestion previa como método referee y TS-FF-AAS con introducción directa.

Método	Muestra 1 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Muestra 2 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Muestra 3 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Muestra 4 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Muestra 5 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
FAAS (Con digestión)	6,2 ± 0,2	5,0 ± 0,2	6,0 ± 0,2	6,9 ± 0,2	7,9 ± 0,2
TS-FF-AAS (Introducción directa)	6,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	6,1 ± 0,3	7,0 ± 0,3	7,8 ± 0,3

Debido a que el proceso de mineralización de muestras consume tiempo y es susceptible de contaminación, la metodología de TS-FF-AAS con inyección directa ofrece una mayor simplicidad, economía y una frecuencia analítica superior a la de la metodología clásica de análisis por FAAS.

Sin embargo, la matriz de la muestra de *Aurea Oligoplex* afecta negativamente la sensibilidad analítica (cambio de pendiente de la curva de trabajo) y obliga a la realización de una adición estándar. En este caso particular, la matriz etanólica provoca una disminución del tamaño de gota promedio del aerosol formado (ver discusión en el capítulo 3), a la vez que proporciona un entorno reductor de menor temperatura. Este último efecto prevalece sobre el primero tal como discutiéramos en la sección 2.2.1.

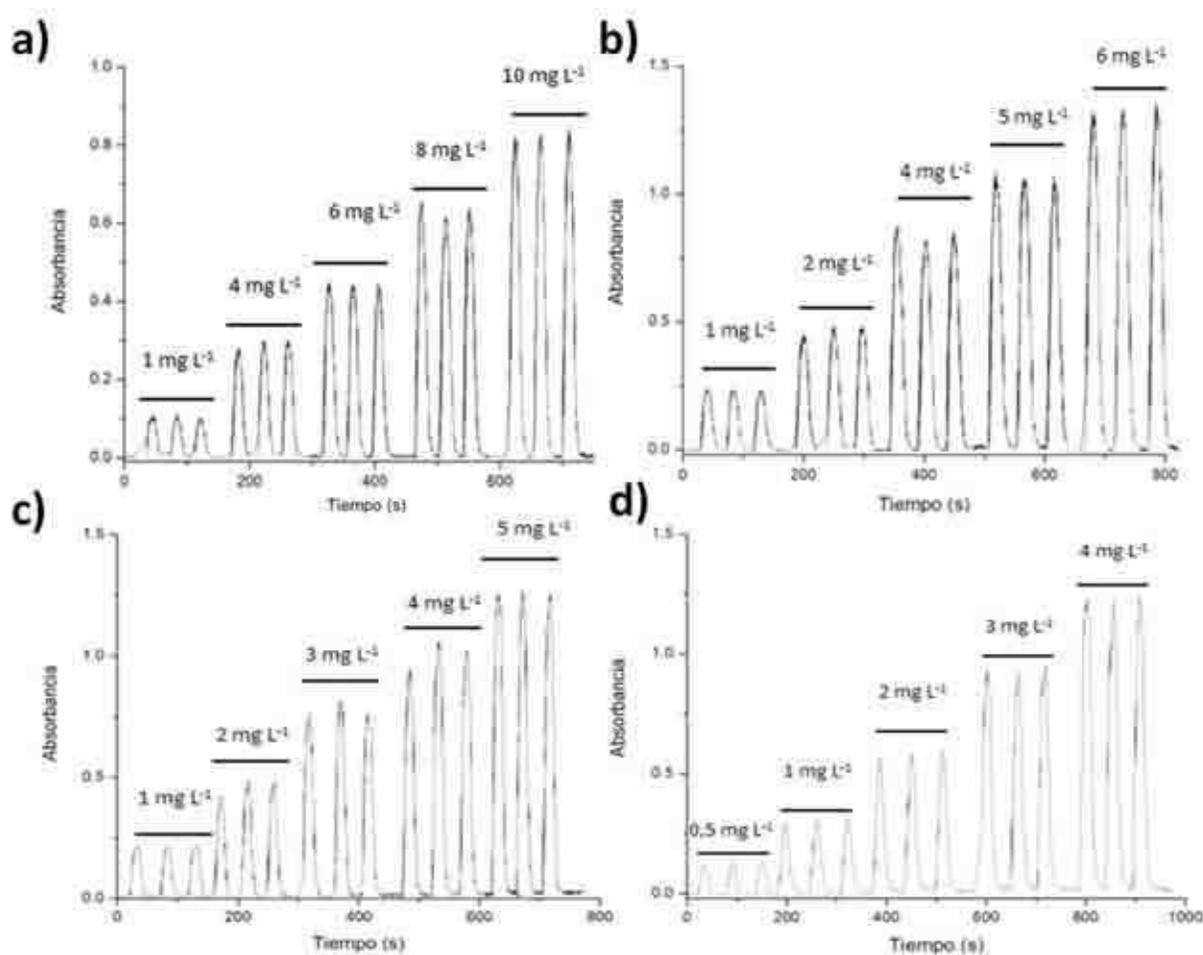


Figura 2.10.-Señales obtenidas para la medición por TS sobre a)Tubo de Níquel , b) Tubo de cuarzo (9,4 mm), c)Tubo de cuarzo (6,7mm) d) Respuesta de de estándares método optimizado.

2.5 - Aplicación de método de extracción en fase sólida para preconcentración en línea de oro con detección por TS-FFAAS.

Si bien la metodología de TS-FF-AAS mejora la performance obtenida para oro con respecto a la llama al punto de hacerlas comparables con el horno de grafito, en muchos casos se requiere alcanzar límites de detección aún más bajos. Para tal fin, se desarrolló un sistema en flujo de extracción en fase sólida (FI-SPE) [9-12] acoplado a TS-FF-AAS., el que ha sido especialmente diseñado para la determinación de vestigios de oro. Este tipo de montaje que no tiene antecedentes en la literatura, explota la alta capacidad de retención de oro por parte de sólidos híbridos mesoporosos (SHM) sintéticos y los excelentes límites de detección que pueden obtenerse para oro por TS-FFAAS.

2.5.1 - Síntesis y operación de sólidos híbridos mesoporosos (SHM)

El tetra etil ortosilicato (TEOS) es un típico reactivo utilizado en las metodologías de síntesis tipo Sol-Gel para formar macro estructuras de sílica [13-15]. Pero cuando se realiza la hidrólisis en un medio micelar por acción de un surfactante (por ejemplo CTAB, Bromuro de cetil metil amonio), las micelas inhiben el crecimiento del dióxido de silicio y se obtiene una estructura de sílica porosa del tamaño de las micelas (Ver Figura 2.11.). Ésta estructura mesoporosa formada sobre la sílica incrementa en gran medida la superficie expuesta del material. Por otro lado el aminopropilo funcionalizante puede polimerizar conjuntamente con el TEOS, dejando un grupo aminopropilo con un grupo amino terminal sobre el cual pueden retenerse elementos metálicos. Por lo tanto, se puede producir una estructura con una gran superficie de contacto con la solución y que posea además grupos amino libres para favorecer la retención elemental, como el oro en este caso. Este sólido funcionalizado con aminopropilos, es ahora un sólido híbrido mesoporoso al que denominaremos SHM.

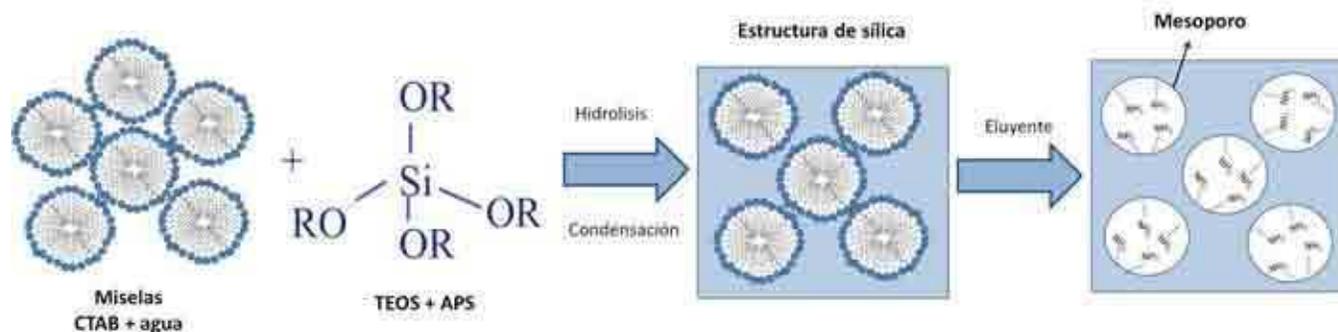


Figura 2.11- Esquema de síntesis de los sólidos híbridos mesoporosos (SHM) de sílica.

En la Figura 2.12 se muestra el porcentaje de retención del analito en el sólido a distintos valores de pH. Puede observarse que cuando el contacto entre el sólido y el analito se produce a pH básico la sorción es máxima. Esto es posiblemente debido a que tanto los grupos silicato como los amino superficiales se encuentran desprotonados y aptos para retener al analito de carga positiva, ya sea por atracción electrostática o formación de complejos con los grupos amino.

A medida que el pH disminuye la capacidad de retención también lo hace. A valores de pH por debajo de 9 los grupos amino se protonan y a valores aún más bajos (alrededor de 2), se protonan también los grupos silicato superficiales lo que produce la liberación del analito adsorbido que nuevamente pasa a solución, tal como se muestra en el esquema al pie de la Figura 2.12.

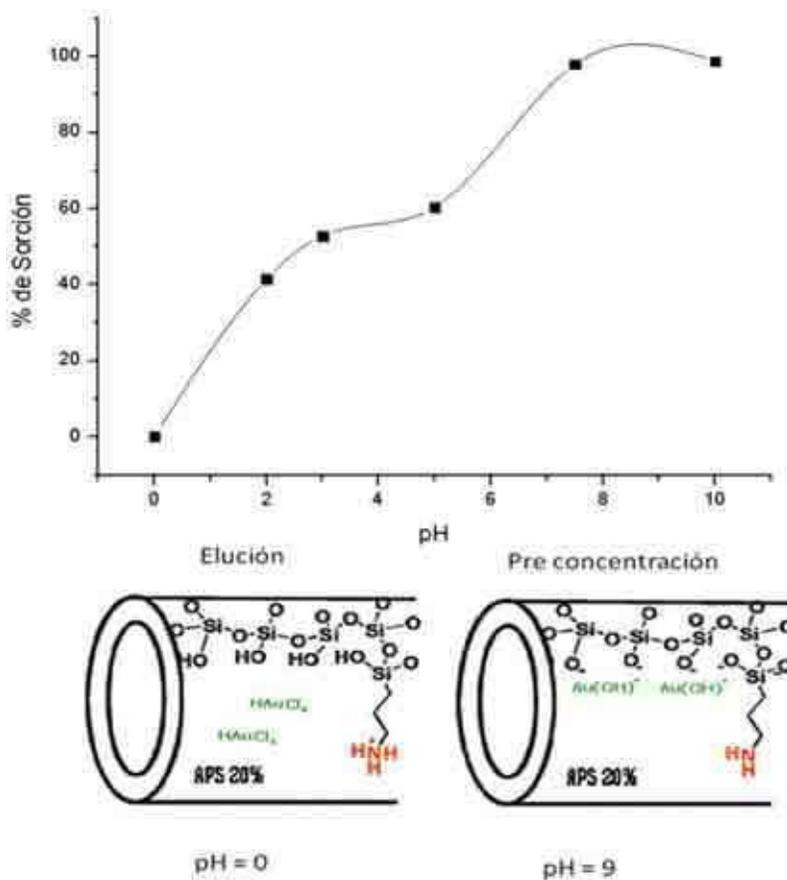


Figura 2.12- Efecto del pH sobre la capacidad de retención de Au sobre el sólido híbrido mesoporoso (SHM)

En base a la Figura 2.12, se elige pH 9 para la preconcentración y pH 0 para la elución con una solución de ácido clorhídrico. A este valor de pH, no sólo se registra la liberación del analito sino que además el detector de TS-FF-AAS con tubo de cuarzo opera con máxima sensibilidad como viéramos más arriba. En la Figura 2.13 se presenta el "set up" experimental para la cuantificación de oro con preconcentración por SHM.

2.5.2 - Metodología de preconcentración en línea con detección por TS-FF-AAS

El sistema utilizado para la preconcentración de oro en línea con la detección por TS-FF-AAS es sencillo, consiste básicamente en una válvula de seis vías que se puede operar para alternar entre las posiciones de preconcentración y elución, como se muestra en la Figura 2.13.

Cuando la válvula de seis vías se encuentra en la posición de preconcentración, la muestra que fue previamente acondicionada con NaOH hasta $\text{pH} = 9$, ingresa en la válvula y circula a través de una columna empacquetada con el sólido sintetizado a 1 mL min^{-1} durante cinco minutos. Mientras tanto, una solución de HCl 3M atraviesa la válvula e ingresa continuamente a la celda de atomización de cuarzo del TS a $0,9 \text{ mL min}^{-1}$. Una vez transcurridos los 5 min, se gira la válvula de seis vías para colocarla en posición de elución, donde la solución de HCl ahora circula por la columna de preconcentración provocando la desorción del analito y transportándolo a la celda de atomización de cuarzo del TS-FF-AAS para su detección. Este proceso se esquematiza en la Figura 2.13.

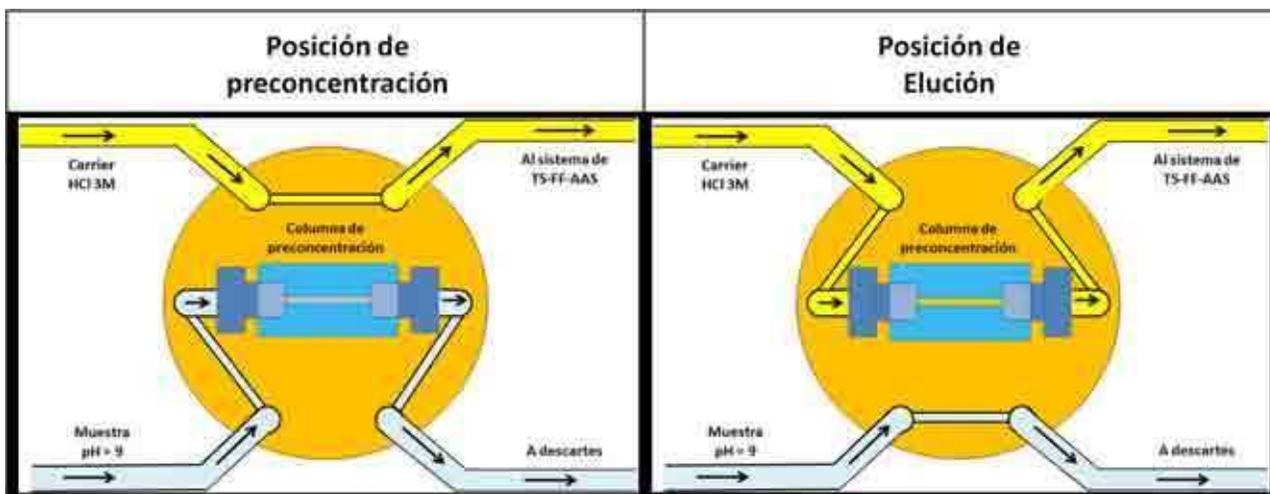


Figura 2.13.- Esquema de operación del sistema de preconcentración. Posiciones alternativas de la válvula de seis vías.

Las señales obtenidas a bajas concentraciones mediante el sistema optimizado sin preconcentración y con preconcentración se muestran en la Figura 2.14.

Dado que el volumen de muestra utilizado a través de la preconcentración es de 5 mL, y que la señal transitoria del analito tiene un ancho a media altura promedio de 34 segundos a un caudal de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, se puede estimar que el volumen en el cual se eluye cuantitativamente el analito es de 0,5 mL. Esto implica que el factor de preconcentración se aproxima a 10.

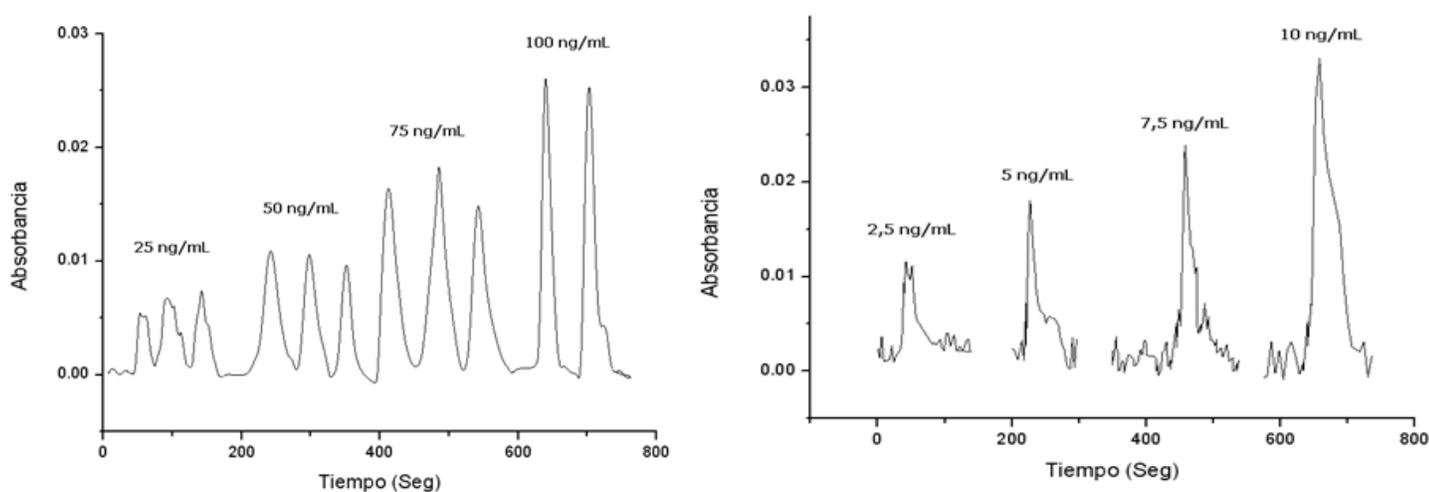


Figura 2.14.- Comparación de las señales obtenidas con el sistema optimizado sin preconcentración (a la izquierda) y con preconcentración (a la derecha)

2.5.3 - Performance analítica de SPE acoplado a TS-FF-AAS

La Tabla 2.2 muestra las cifras de mérito obtenidas para la valoración de oro con las distintas alternativas de TS-FF-AAS y en términos comparativos con FAAS y GFAAS. Se puede ver que utilizando una celda de atomización de cuarzo y un pH optimizado de trabajo, el TS-FF-AAS, supera ampliamente las cifras de mérito del FAAS y alcanza límites de detección comparables con los de horno de grafito, pero con una frecuencia analítica mucho mayor. En caso de que resulte necesario disminuir aún más el límite de detección, el acoplamiento a un sistema de preconcentración en línea por extracción en fase sólida, permite alcanzar una sensibilidad mejor que con el horno de grafito y aproximadamente el mismo LOD o aún mejor.

Tabla 2.2. Comparación de cifras de mérito para la determinación de oro con diferentes alternativas metodológicas.

	FAAS	TS-QTFF-AAS (i.d. = 6,7mm) Carrier HCl 3M	SPE TS-QTFF-AAS	Horno de Grafito
Sensibilidad (ng/mL) ⁻¹	(4,0 ± 0,1) 10 ⁻⁵	(3,1 ± 0,1) 10 ⁻⁴	(3,6 ± 0,2) 10 ⁻³	(1,40 ± 0,03) 10 ⁻³
ADL (ng/mL)	120 – 15000	13 – 4000	2 – 400	3 – 80
LOD (ng/mL)	40	4,3	0,55	0,88
LOQ (ng/mL)	120	12,8	1,86	2,64
% RSD (N=10)	5,3	2,5	6,8	4,6
Frecuencia de Análisis (h ⁻¹)	70	72	10	30
Factor de Preconcentración	-	-	10	-

En la Tabla 2.2 también puede observarse como la sensibilidad se incrementa aproximadamente un orden de magnitud cuando se utiliza la metodología con extracción en fase sólida en línea (SPE-TS-QTFF-AAS) respecto del método sin preconcentración (ver Tabla 2.2, columnas 2 y 3). Esta observación concuerda con la estimación previa del factor de preconcentración para el sistema con SPE. Sin embargo, el LOD solo disminuye 7,8 veces y no 10 veces como es lo esperado. Esto se debe a que, si bien la sensibilidad se incrementó 10 veces, el ruido de la línea de base también se incrementó como puede apreciarse en la Figura 2.14. Sin embargo, esta mejora en la sensibilidad del método mediante la utilización de columnas de SPE, va en desmedro de la frecuencia de análisis que sufre una notoria disminución.

2.6 - Influencia de la modificación química de la superficie interna de la celda de atomización

De acuerdo a la hipótesis planteada anteriormente, el gran incremento de sensibilidad observado para oro cuando se cambia níquel por cuarzo como material de la celda de atomización, reside principalmente en una menor interacción del vapor atómico con el material de la celda. Para comprobar esta hipótesis y debido a que sólo la superficie interna de la celda de atomización está en contacto directo con el vapor atómico, se decidió modificar químicamente esta superficie y estudiar la respuesta de diferentes analitos para verificar eventuales cambios de sensibilidad.

En la Figura 2.15 puede observarse la influencia del material en la sensibilidad para la determinación de distintos analitos elementales. En todos los casos, es el acero inoxidable el que genera la peor respuesta. Sin embargo, cuando el acero inoxidable se recubre por electrodeposición con cobre o níquel (ver materiales y métodos), la sensibilidad se incrementa considerablemente en todos los casos. También cuando se recubre la celda de acero con níquel, se obtiene una sensibilidad estadísticamente comparable con la obtenida con la celda de níquel. Esto indicaría que son las primeras capas de átomos metálicos de la superficie en contacto directo con la atmósfera gaseosa de la celda las que proporcionan la mayor contribución a la señal analítica.

Por último, puede observarse que la sensibilidad obtenida sobre celda de cuarzo supera a la sensibilidad obtenida con cualquiera de los hornos metálicos para todos los analitos ensayados. Esto es probablemente debido a que el material metálico incandescente de la celda de atomización tiene mayor afinidad por vapores de elementos metálicos que el dióxido de silicio constituyente del cuarzo. Por lo tanto, en un horno con superficie metálica, la concentración de vapor atómico disponible en fase gaseosa sería menor que sobre una celda de cuarzo.

Para comprobar esta aseveración, se intentó recubrir un tubo de acero inoxidable con dióxido de silicio para observar el eventual cambio en la sensibilidad. A pesar de que se obtuvo un depósito uniforme que parecía promisorio para los experimentos, los distintos ciclos de calentamiento y enfriamiento generaron una baja adherencia entre materiales con muy distinto

coeficiente de dilatación, produciéndose un descascaramiento apreciable que atentó contra la reproducibilidad de las mediciones haciéndolas poco confiables como para elaborar conclusiones.

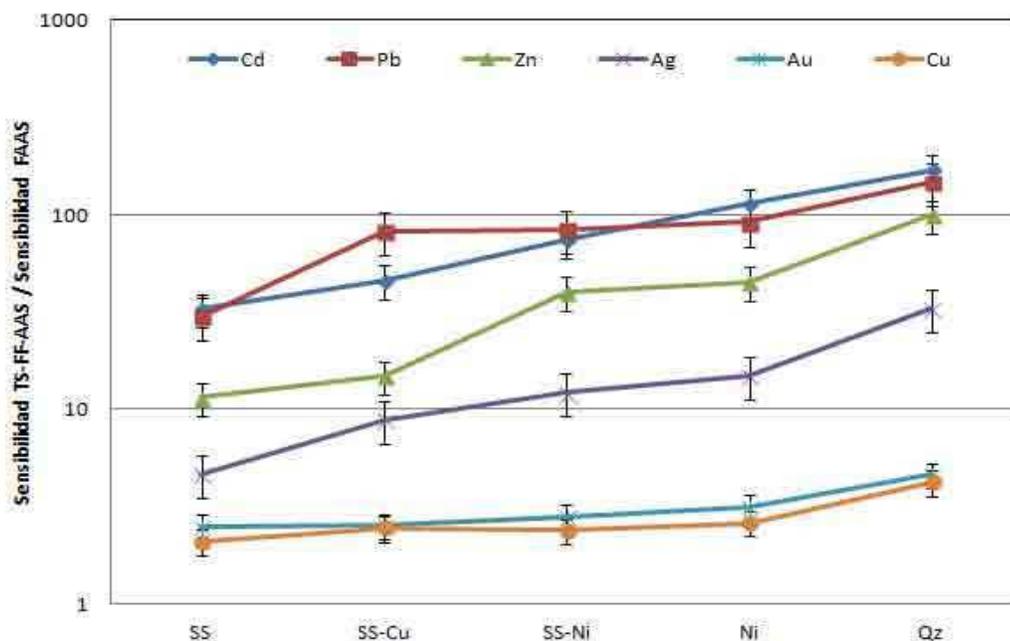


Figura 2.15.- Respuesta obtenida con TS-FF-AAS respecto FAAS, con distintos materiales de celdas de atomización y para distintos analitos. SS: acero inoxidable, SS-Cu: acero recubierto por electrodeposición con cobre, SS-Ni: acero recubierto por electrodeposición con Níquel, Ni: níquel, QT: cuarzo.

2.7 - Materiales y métodos

2.7.1.- Reactivos

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos calidad analítica. Agua doblemente deionizada (DIW) fue obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). El material de vidrio fue lavado con EXTRAN (Merk) 1%v/v y fue mantenido en HCl 10%v/v, y antes de ser utilizado se enjuagó con DIW.

Las soluciones estándar de todos los analitos utilizados fueron preparadas diariamente por dilución apropiada de una solución madre de 1000 mg L⁻¹ (Merck). HNO₃ Suprapur (Merk) fue utilizado en la mineralización de las muestras cuando fue requerido.

2.7.2 - Instrumental

En todos los experimentos se utilizó un espectrómetro de absorción atómica Shimadzu AAS 6800 (Kyoto, Japon) equipado con lámparas de cátodo hueco de los analitos correspondientes y una lámpara de deuterio para corrección de fondo. Las condiciones instrumentales fueron las recomendadas por el fabricante. Se utilizó una llama de aire/ acetileno en condiciones estequiométricas.

Un horno de microondas cerrado (MDS-2000, CEM Corporation, USA), equipado con sondas de temperatura y presión, fue empleado para la digestión de muestras. El programa de mineralización fue provisto por el fabricante.

El sistema TS-FF-AAS fue ensamblado utilizando una bomba peristáltica de ocho canales (IPC, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Switzerland), una válvula rotatoria de seis puertos (Valco Instruments, Houston, TX, USA), tuberías de 0.5 mm i.d. de PTFE, un capilar cerámico (0,5mm i.d., 6 cm de longitud) y un horno atomizador de níquel perforado con 6 orificios de 2 mm de diámetro en la base y un orificio lateral de 2,3 mm por donde penetra el capilar cerámico (como se muestra en la sección de materiales y métodos del capítulo 1. La composición del níquel que constituye el atomizador y sus dimensiones son las descritas en el capítulo 1.

Se utilizaron además como atomizadores dos tubos de cuarzo de 9,7mm de y 6,7mm de diámetro interno respectivamente y de 100 mm de longitud. Se realizaron siete perforaciones de las mismas dimensiones y en las mismas posiciones que en el caso del atomizador de níquel.

Los tubos de acero inoxidable 316L sin costura (Famiq S.R.L, Argentina) de 9,7mm de diámetro interno y 100 mm de longitud, fueron perforados en condiciones análogas a lo descrito para níquel.

Los recubrimientos realizados sobre acero se realizaron por electrodeposición de cobre o níquel, según los casos. Para esto, los tubos de acero perforado fueron sumergidos en una solución de HCl 0,1M. Luego se sumergieron en acetona, se sonicaron durante 30 min y se enjuagaron con etanol.

Posteriormente se colocó el tubo acondicionado en el sistema que se muestra en Figura 2.16. Se utilizó una fuente de corriente constante que se mantuvo fija en 100 mA. Los contraelectrodos utilizados fueron cobre y platino en el caso de la deposición de cobre y níquel, respectivamente.. El tiempo de deposición fue de ocho horas, cuatro con el extremo del tubo hacia arriba y otras cuatro con el tubo invertido.

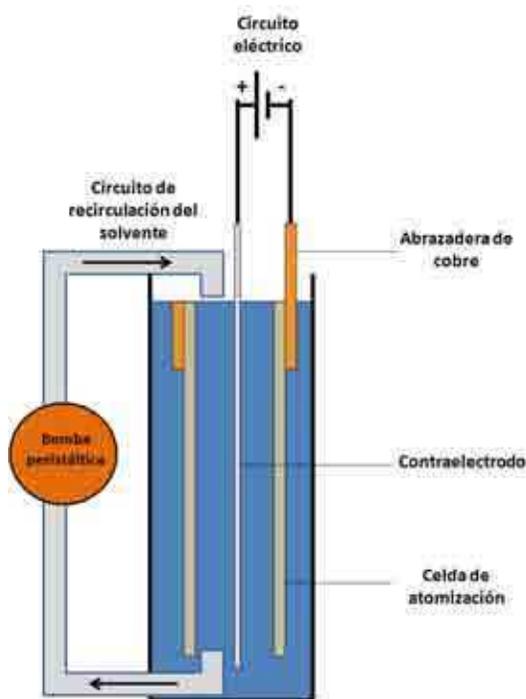


Figura 2.16.- Esquema del dispositivo empleado para la modificación de la superficie interna de la celda de atomización con cobre y níquel.

Las soluciones utilizadas en los baños de electrodeposición son:

a) Electrodeposición de Cobre:

CuSO ₄ .5H ₂ O	150-250 g/l
CuCl ₂ .5H ₂ O	30-150 g/l
H ₂ SO ₄ (d = 1.84 g/cm ³)	30-75 g/l
HNO ₃	0,1 %v/v
Urea	50 mg/l

b) Electrodeposición de Níquel:

NiSO ₄ .6 H ₂ O	340 g/L
NiCl ₂ .6 H ₂ O	113,2 g/L
H ₃ BO ₃	50,8 g/L

2.7.3 - Tratamiento de datos

Las señales transitorias fueron guardadas, utilizándose las señales para calibración en el modo altura de pico.

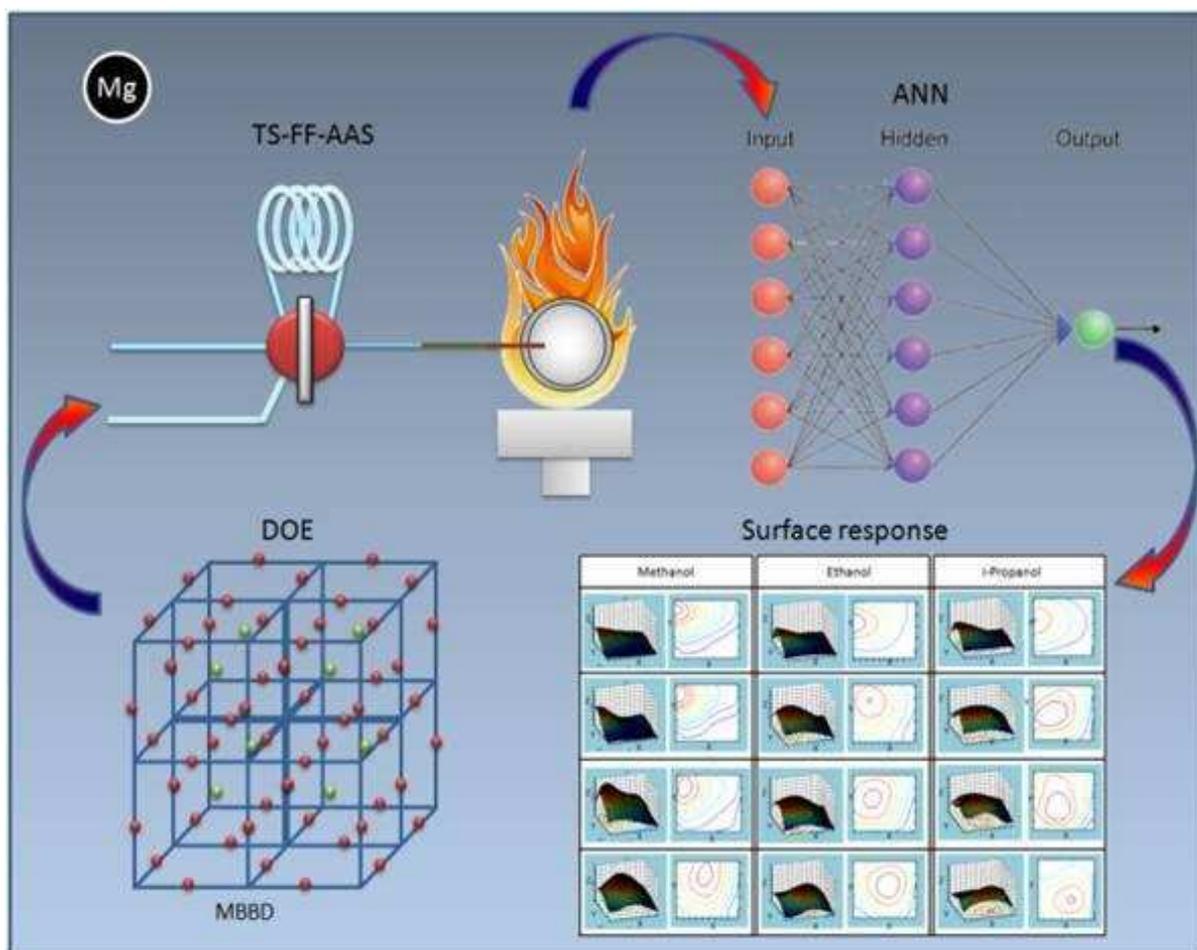
2.8 - Bibliografía

- [1] R. R. Barefoot, J. C. Van Loon, **1999**, *49*, 1–14.
- [2] B. Fairman, M. W. Hinds, S. M. Nelms, D. M. Penny, P. Goodall, *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, *15*, 1606–1631.
- [3] S. L. Ramesh, P. V. Sunder Raju, K. V. Anjaiah, R. Mathur, T. Ganeswara Rao, B. Dasaram, S. Nirmal Charan, D. V. Subba Rao, D. S. Sarma, M. Ram Mohan, et al., *At. Spectrosc.* **2001**, *22*, 263–269.
- [4] Marek Trojanowicz, *Advances in Flow Analysis*, capítulo I, Wiley, **2008**.
- [5] K. Miranda, E. Rodrigues Pereira-Filho, *Anal. Methods* **2009**, *1*, 215.

- [6] E. Rodrigues Pereira-Filho, H. Berndt, M. Aurélio Zezzi Arruda, *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 1308–1315.
- [7] X. Wen, P. Wu, K. Xu, J. Wang, X. Hou, *Microchem. J.* **2009**, *91*, 193–196.
- [8] M. A. Bezerra, V. A. Lemos, J. S. Garcia, D. G. Da Silva, A. S. Araújo, M. a Z. Arruda, *Talanta* **2010**, *82*, 437–443.
- [9] V. Camel, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **2003**, *58*, 1177–1233.
- [10] C. R. T. Tarley, F. N. Andrade, F. M. de Oliveira, M. Z. Corazza, L. F. M. de Azevedo, M. G. Segatelli, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *703*, 145–51.
- [11] V. a. Lemos, M. a. Bezerra, F. a C. Amorim, *J. Hazard. Mater.* **2008**, *157*, 613–619.
- [12] H. Ebrahimzadeh, N. Tavassoli, O. Sadeghi, M. M. Amini, *Talanta* **2012**, *97*, 211–7.
- [13] M. Kim, J. Stripeikis, M. Tudino, *Talanta* **2009**, *77*, 1068–1074.
- [14] M. L. Kim, M. B. Tudino, *Talanta* **2009**, *79*, 940–6.
- [15] M. L. Kim, M. B. Tudino, *Talanta* **2010**, *82*, 923–930.

Capítulo 3

"Influencia del ambiente interno del atomizador"



“As for me, I am tormented with an everlasting itch for things remote. I love to sail forbidden seas, and land on barbarous coasts.”

— Herman Melville, *Moby-Dick*

3.1 - Introducción

Como es bien conocido, los elementos alcalinotérreos tienden a formar hidroxido compuestos refractarios en una llama, debiéndose recurrir a una optimización de las mezclas combustible/comburente para proporcionar un entorno reductor (llama enriquecida en combustible) junto a una mínima disminución de la temperatura de la celda atómica.

Desde los primeros trabajos de Berndt, y hasta la fecha, no se han informado valoraciones de elementos alcalino-térreos por TS-FF-AAS debido a la escasa o nula sensibilidad alcanzable [1-4]. Esto se debe a que estos elementos poseen una energía de atomización más elevada que los clásicamente determinados por esta metodología. Nótese además que parte de la energía dentro de la celda de atomización se consume en vaporizar el solvente disminuyendo su temperatura y, consecuentemente, la población atómica en estado gaseoso.

En este trabajo se explora por primera vez, la determinación de **magnesio** utilizando la técnica de “*thermospray*”. Para ello, se han buscado alternativas para controlar el enfriamiento de la celda de atomización y obtener un número de átomos en estado gaseoso tal que permita mejorar la señal analítica. En esta línea de pensamiento se optó por cambiar las soluciones acuosas por solventes orgánicos miscibles en agua como soluciones “*carrier*” dada su capacidad para disminuir por combustión la cantidad de oxígeno disponible en la celda y a la vez reducir la energía requerida para su evaporación. Además, la presencia de compuestos orgánicos disminuye la tensión superficial y la densidad de las soluciones. Esto produce una reducción en el tamaño promedio de la gota de aerosol formado térmicamente y una dinámica de desolvatación/atomización más favorable, tal como discutiremos luego.

Si bien esta no es la primera vez que se presentan compuestos orgánicos empleados como “*carriers*” en TS [5-7], la literatura se ha dedicado mayoritariamente a sus aplicaciones en la introducción de muestras para espectrometría de masas, donde la

reducción del tamaño de gota se convierte en una importante ventaja. Por el contrario, los estudios dedicados al análisis elemental son muy pocos [5,8].

Para un mejor orden, los estudios realizados se presentarán en dos partes. En la primera se estudiará la determinación de magnesio utilizando diferentes mezclas en agua de solventes orgánicos miscibles y distintas relaciones aire/acetileno para producir el calentamiento de la celda de TS. El efecto combinado de ambas variables sobre la señal de magnesio se ha evaluado a través de la obtención de distintas superficies de respuesta. Para explicar los principales hallazgos, se han realizado cálculos del tamaño de gota para los diferentes solventes ensayados y estimaciones de la distribución de temperaturas en la pared externa de la celda de atomización.

En la segunda parte del trabajo se ha empleado un método de optimización multivariado que permite predecir la respuesta del magnesio a distintos caudales de solución “*carrier*”, diferentes proporciones de solvente orgánico en la mezcla con agua y diferentes estequiometrías de llama. Para esto, se ha utilizado un diseño experimental en el que el espacio muestral se subdividió en ocho secciones idénticas sobre las que se aplicó un diseño de Box-Behnken. Luego, se ha trabajado con un método predictivo que permitiera construir un modelo empírico. Para ello, se ha comparado un método de predicción simple tal como el método de ajuste con funciones polinómicas con el de redes neuronales del tipo “*back-propagation*”. El poder predictivo del método se ha utilizado no sólo para optimizar la señal, sino también para analizar algunos aspectos fisicoquímicos relacionados con la determinación de magnesio que aportarían evidencia sobre el mecanismo a través del cual se produce el vapor atómico. La subdivisión del diseño Box-Behnken así como el uso de las redes neuronales aplicado a esta metodología son explorados por primera vez en este trabajo de tesis.

A lo largo del capítulo se discutirán los hallazgos principales, con la idea de que puedan ser extrapolados a la determinación por TS-FF-AAS de otros elementos que no fueron ensayados aún y que permitirían expandir la potencialidad analítica de esta técnica.

Una vez obtenidas las variables operacionales que rindan la mejor performance analítica, se mostrarán los resultados obtenidos para la determinación de magnesio en los complejos vitamínicos efervescentes Berocca®. Como explicaremos luego, las muestras han sido disueltas en mezclas etanol/agua o metanol/agua y luego

directamente introducidos en el sistema. La validación se realizó por comparación con la técnica de FAAS luego de digestión en horno de microondas ya que no fue posible evitar el taponamiento del nebulizador neumático sin una mineralización con ácidos previa al análisis.

3.2 - Influencia de compuestos orgánicos sobre la señal analítica

3.2.1 - Solventes orgánicos

Para estudiar el efecto sobre la sensibilidad analítica de algunos solventes orgánicos solubles en agua, se evaluaron como soluciones transportadoras mezclas de agua con metanol, etanol, isopropanol, acetona y acetonitrilo en proporciones variables de 20% v/v, 40% v/v y 80% v/v. Se prepararon soluciones de 5 mg Mg L⁻¹ en cada mezcla de solventes y se inyectaron 500 µL de cada solución en un "carrier" idéntico al de la matriz de muestra a un caudal constante de 0,9 mL min⁻¹. La composición de la llama fue fijada en 1,8 L min⁻¹ de acetileno y 24 L min⁻¹ de aire, tal como recomienda el fabricante. Ya que el caudal de aire no puede ser modificado con el instrumento de trabajo, los cambios en la estequiometría de llama se realizaron a través del caudal de combustible que sí es una variable del sistema. En estas condiciones y utilizando agua como solvente, la señal de magnesio resultó indistinguible del ruido de base. En contraste, tal como se observa en la Figura 3.1, la adición de cualquier solvente orgánico produce un aumento de la señal.

Esto podría explicarse considerando que el solvente orgánico reduce por combustión la cantidad de oxígeno presente en la celda de atomización generando un ambiente rédox mas favorable previniendo la formación de compuestos oxigenados de magnesio. También, debido a la menor capacidad calorífica y menor entalpía de vaporización de los solventes orgánicos, se consume menos energía en la volatilización del solvente comparado con agua pura.

Sin embargo, como se discutió en el capítulo 1, la presencia de compuestos orgánicos en el ambiente de la celda de atomización también modifica la estequiometría de la llama y por lo tanto, la temperatura. Esto podría explicar porqué, para los casos

de isopropanol, acetona y acetonitrilo, las mezclas enriquecidas al 80% v/v en el solvente orgánico generan una señal menor que en el caso de 40% (Figura 3.1).

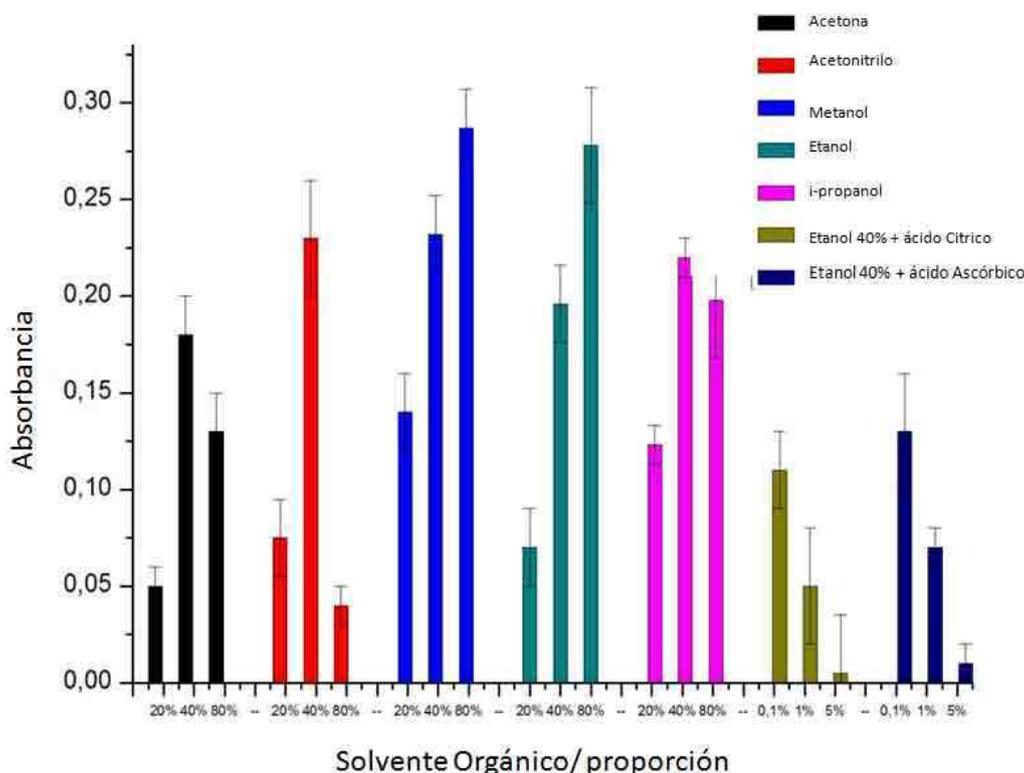


Figura 3.1.- Influencia de distintas proporciones solvente orgánico/agua en la señal analítica del magnesio.

Otro aspecto importante a considerar es la reducción del tamaño de gota del aerosol ante la presencia de los solventes orgánicos. Ha sido demostrado [9] que el tamaño de gota promedio del aerosol generado térmicamente puede ser predicha satisfactoriamente por la ecuación de Elko:tb:

$$SMD = 3.08 \cdot \nu_L^{0.385} \cdot \sigma_L^{0.737} \cdot \rho_L^{0.737} \cdot \rho_G^{0.06} \cdot \Delta p_L^{-0.54} \quad [\text{Ec. 3. 1}]$$

Donde ν_L es la viscosidad cinemática en Pa s^{-1} , σ_L es la tensión superficial en mN m^{-1} , ρ_L y ρ_G son las densidades de la fase líquida y fase gaseosa en kg m^{-3} , Δp_L es la variación de presión a través de la boquilla del capilar en Pa, y SMD es el diámetro medio de Sauter en metros.

Es bien conocido que las soluciones acuosas de solventes orgánicos poseen una menor densidad y tensión superficial que el agua pura. Entonces, el tamaño de gota del aerosol decrece a medida que la proporción orgánica aumenta habilitando una dinámica de desolvatación más rápida.

La Figura 3.2 muestra el diámetro medio de Sauter (SMD) calculado para las diferentes proporciones alcohol/agua utilizando la ecuación 3.1. Se observa como decrece el tamaño de gota del aerosol a medida que se incrementa la proporción orgánica, lo cual generaría una dinámica de desolvatación más favorable y con ello una mejora de la sensibilidad analítica.

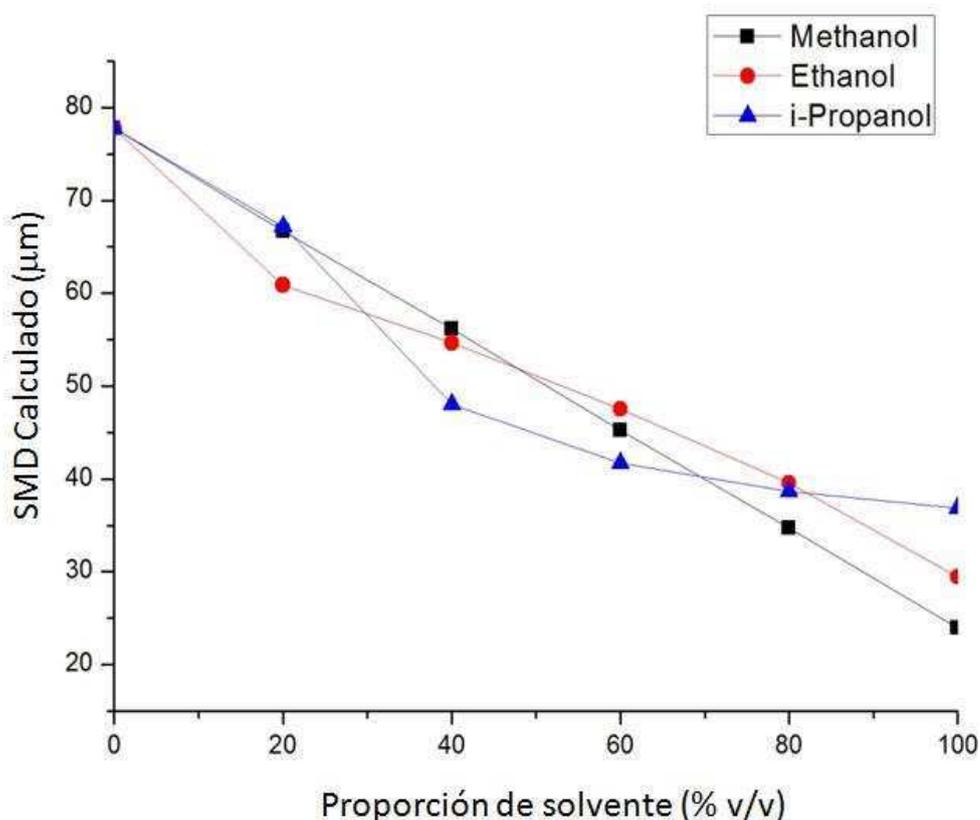


Figura 3.2.- SMD calculado para mezclas con agua de metanol, etanol e isopropanol en diferentes proporciones.

Por otra parte, y como dijéramos anteriormente, los solventes orgánicos proveen un ambiente más reductor en la celda de atomización. Para estudiar si la señal analítica se incrementa efectivamente por este hecho, se adicionó KNO_3 al 1% m/v a una solución de magnesio en etanol al 60% v/v con el objetivo de liberar oxígeno en la

celda de atomización. En este caso no se obtiene señal distinguible de la línea de base, por lo que podría afirmarse que el ambiente reductor generado por el solvente orgánico previene la formación de compuestos refractarios de magnesio, aumentando la eficiencia de atomización y habilitando la aparición de señal analítica.

3.2.2 - Adición de otros compuestos ricos en carbono

Con el objetivo de continuar estudiando la influencia de los compuestos orgánicos solubles en agua en la señal analítica, se adicionaron compuestos orgánicos ricos en carbono a la matriz de la muestra y a la solución de transporte. Se agregaron ácido ascórbico entre 0,1 y 10 % m/v y ácido cítrico en igual ámbito de concentraciones, a soluciones de 5 mg L⁻¹ de magnesio en agua manteniendo las mismas condiciones operativas de los experimentos previos. No se obtuvo señal analítica en ninguno de los casos ensayados. Esto podría ser el resultado del aumento de viscosidad observado en las soluciones, lo que llevaría a un aumento del tamaño de gota del aerosol (ver ecuación 3.1) y a un empobrecimiento de la dinámica de desolvatación. O sea que, no sólo el ambiente rédox cumple un papel importante en la aparición de la señal analítica sino que los parámetros fisicoquímicos de la solución tales como viscosidad, tensión superficial y densidad influyen notoriamente en el tamaño de gota del aerosol y, por ende, en la velocidad de desolvatación del analito.

Se estudió entonces el efecto combinado de la adición de los ácidos cítrico y ascórbico a soluciones de 5 mg Mg L⁻¹ en etanol/agua 40% v/v, tal como se muestra en la Figura 3.1 de más arriba. Se puede observar una importante disminución de la señal en presencia de cualquiera de los ácidos cuando se compara con la solución de etanólica 40%v/v sola. Este empobrecimiento podría atribuirse, además del ya mencionado efecto “tamaño de gota del aerosol”, a la producción de carbón incandescente que reaccionaría con magnesio a alta temperatura para producir un carburo de magnesio térmicamente estable. Este es un comportamiento bien conocido de los elementos formadores de carburos en los hornos de grafito. De hecho, durante estos experimentos, se observó la presencia de carbón incandescente en la punta del capilar cerámico en todos los casos.

3.3 - Efecto combinado del uso de alcoholes “carrier” y estequiometría de la llama

La presencia de solventes influencia la estequiometría de llama reduciendo la temperatura, a la vez que proporciona un ambiente rédox favorable para disminuir la cantidad de especies oxidadas. Por ello, la proporción de solvente más adecuada debería establecerse como un compromiso entre entorno reductor y temperatura.

Para estudiar el efecto conjunto de la proporción orgánica en la matriz de muestra y “carrier” y la estequiometría de la llama, se repitieron los experimentos descritos en la sección 3.2.1 variando los caudales de acetileno entre 1 y 3,5 L min⁻¹. Como la mayor temperatura de la llama se obtiene para la relación estequiométrica correspondiente a de 2 L min⁻¹ de acetileno y 24 L min⁻¹ de aire (fija), los valores de combustible ensayado permitieron obtener llamas reductoras por encima de 2 L min⁻¹ (*fuel rich zone*) y oxidantes por debajo (*fuel lean zone*). Los resultados se muestran en las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5.

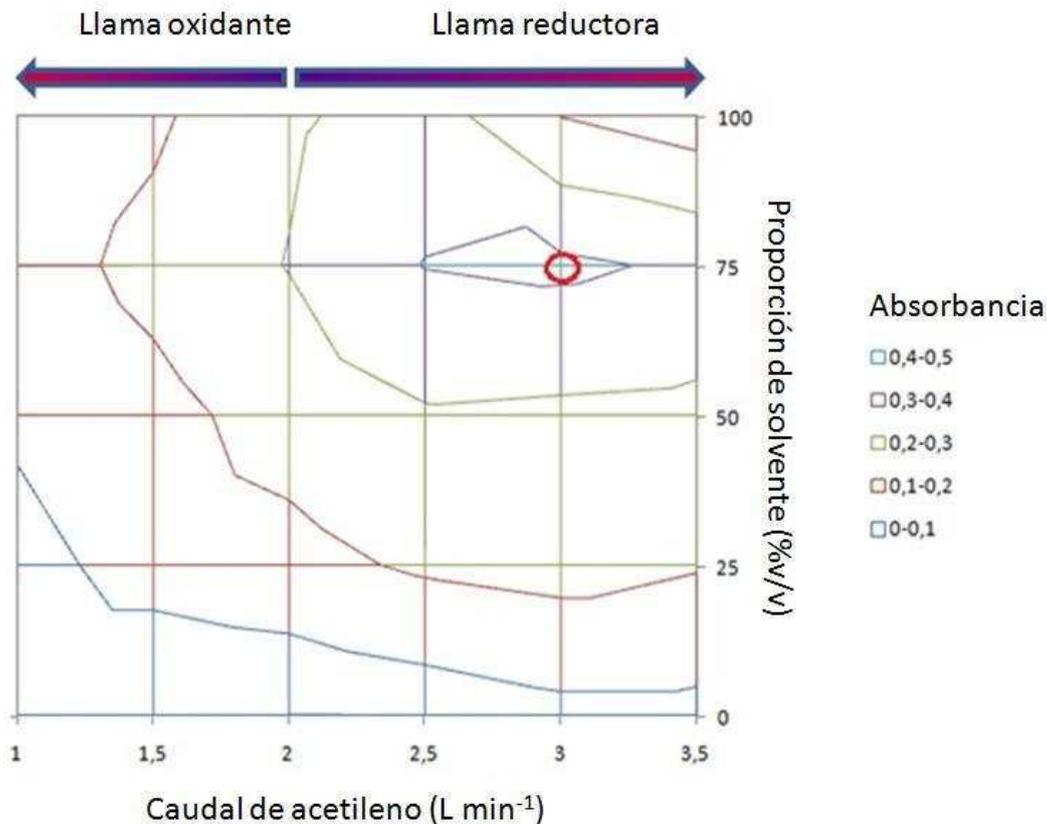


Figura 3.3.- Superficie de respuesta para metanol/agua

En las tres figuras se puede observar que para una relación constante de acetileno/aire, a medida que se incrementa la proporción de solvente orgánico en la matriz y en el “carrier”, la señal se va incrementado hasta alcanzar un máximo para luego disminuir. El primer aumento de la señal podría explicarse por el efecto conjunto de la reducción del tamaño de gota del aerosol, la disminución de la energía necesaria para volatilizar el solvente y la generación de un ambiente más reductor dentro de la celda, mejorando el proceso de desolvatación/atomización. Sin embargo, a medida que aumenta la proporción de solvente orgánico en la mezcla y el ambiente de la celda se aleja de las condiciones estequiométricas, también disminuye la temperatura y con ello, la producción de vapor atómico capaz de absorber la radiación de la LCH. Esto último podría explicar el decaimiento final de la señal.

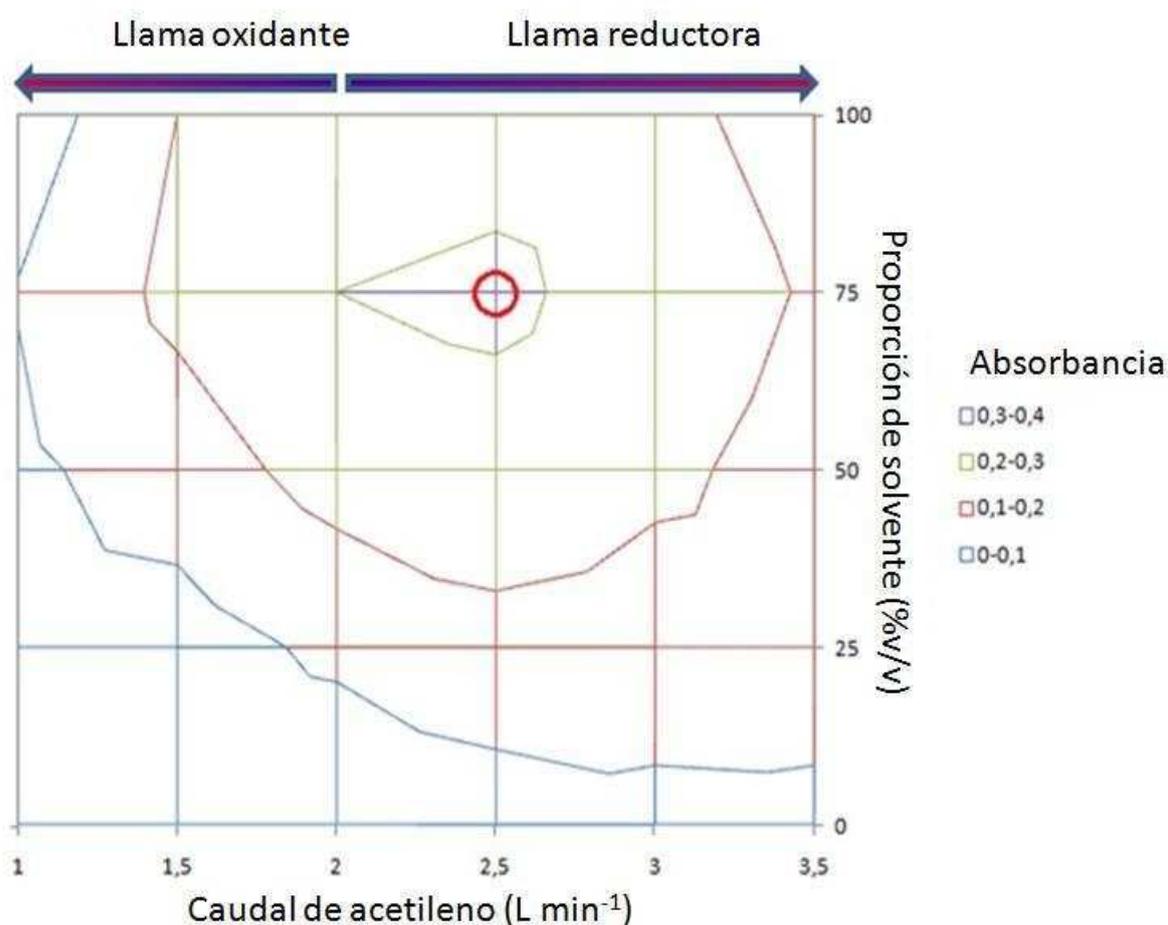


Figura 3.4.- Superficie de respuesta para etanol/agua

Por otro lado, para una mezcla solvente/agua de proporción constante, el incremento de la relación aire/acetileno reduciría la cantidad de oxígeno presente al tratarse de un medio más reductor, aumentando la señal debido a este efecto ya que no se producen cambios en el tamaño de gota. No obstante, luego de alcanzar un máximo, la sensibilidad vuelve a caer probablemente debido al enfriamiento de la celda de atomización.

Por lo tanto, las formas de las superficies de respuesta de las Figuras 3.3, 3.4 y 3.5 podrían ser explicadas como un compromiso entre el tamaño de gota (menor SMD a mayor proporción solvente/agua), la energía consumida en la volatilización del solvente (menor energía a mayor proporción solvente/agua), las propiedades rédox del ambiente de la celda (menos compuestos oxigenados conforme el ambiente es más reductor) y la temperatura alcanzada en el interior de la celda (mayor producción de vapor atómico capaz de absorber la radiación de la LCH).

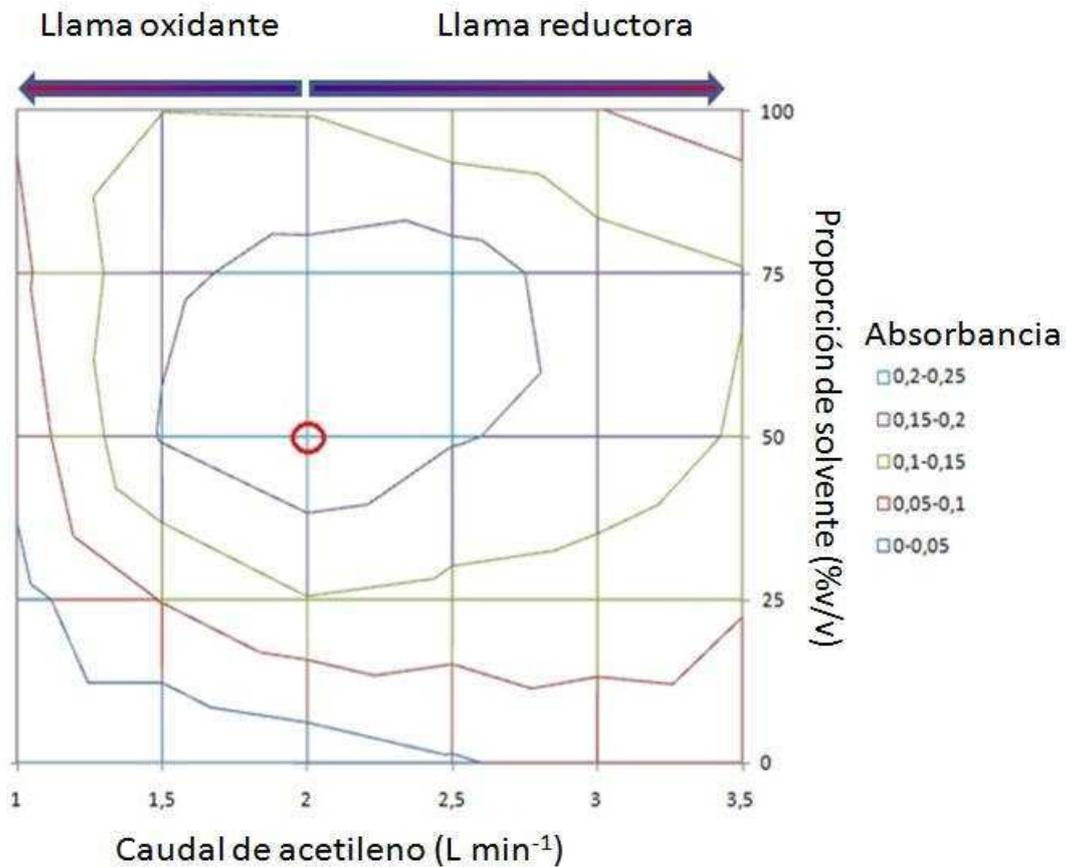


Figura 3.5.- Superficie de respuesta para isopropanol/agua

Las figuras también muestran que la posición del máximo (círculo rojo) y la altura del pico obtenida, son ligeramente diferentes para cada uno de los tres alcoholes aunque, como se mostró antes, el tamaño de gota es semejante ante la misma proporción solvente/agua. En el caso de metanol/agua, el máximo se encuentra a 75%v/v y un caudal de acetileno de 3,0 L min⁻¹. Sin embargo, en el caso del etanol, el máximo es ligeramente menor que en el caso del metanol, se encuentra en la misma proporción de compuesto orgánico pero a una menor relación acetileno/aire. Esto se debería a que el número de átomos de carbono en una molécula de etanol consume el doble de oxígeno que metanol, produciendo un ambiente más reductor con una proporción de solvente orgánico menor. Entonces, para alcanzar un ambiente redox semejante de ambas mezclas, se requeriría una fracción de metanol mayor que la requerida para etanol. Esto se traduce en que el tamaño de gota y la energía necesarios para vaporizar el solvente serán menores, explicándose entonces el incremento en la señal analítica observada para metanol/agua.

El caso de la mezcla isopropanol/agua es explicable siguiendo el razonamiento anterior. La altura de la señal del máximo es menor que en los casos anteriores, aparece a una menor proporción solvente/agua y a una menor relación acetileno/aire.

3.4 - Distribución de temperaturas en la celda de atomización

Las Figuras 3.6 y 3.7 muestran la distribución de temperaturas sobre el eje central de la pared posterior de la celda de atomización bajo distintas condiciones de operación. El método utilizado para la obtención de resultados se detalla en la sección dedicada a materiales y métodos. En la Figura 3.6 se presenta la distribución de temperatura obtenida cuando se trabaja con mezclas metanol/agua de diferentes proporciones. La Figura 3.7 muestra las diferentes distribuciones de temperatura obtenidas para llamas oxidante, estequiométrica y reductora. Se puede observar que la forma de distribución de temperaturas es semejante a la observada y descrita en el Capítulo 1.

A la derecha de ambas figuras se muestran, en escala de colores, las distribuciones de temperatura obtenidas sobre la pared posterior de la celda de atomización (ver materiales y métodos). Las líneas punteadas en el eje central muestran la posición en la cual fueron registrados los perfiles de temperatura graficados a la izquierda.

En la Figura 3.6 puede verse que la temperatura en el centro (zona de desolvatación) decrece conforme la mezcla se enriquece en metanol. Sin embargo, la zona de máxima temperatura a los lados de la zona de desolvatación muestra una temperatura mayor a medida que aumenta la proporción de metanol hasta un 75% v/v para luego decaer. Esta tendencia es consistente con la evolución de la señal de magnesio y concuerda con la descripción antes expuesta.

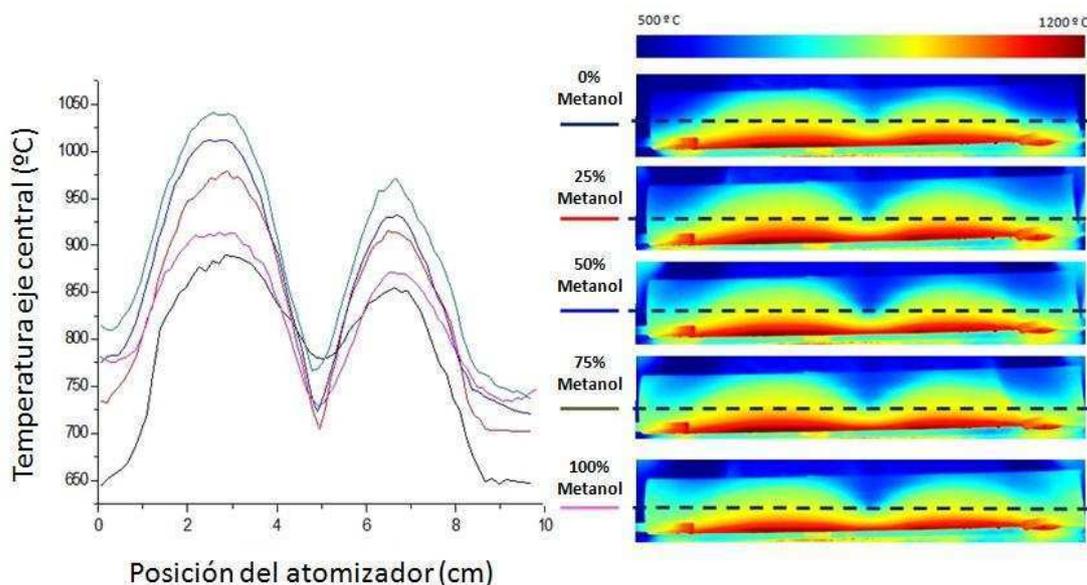


Figura 3.6: Distribución de temperaturas para distintas proporciones metanol/agua

La Figura 3.7 muestra la influencia del caudal de acetileno sobre la temperatura de la pared de la celda. Se puede observar que, como es esperable, la temperatura más alta se alcanza en condiciones estequiométricas (acetileno 2,0 L min⁻¹, aire 24 L min⁻¹). Cuando las condiciones de la llama son más oxidantes o más reductoras las temperaturas son menores de acuerdo con la literatura básica de FAAS.

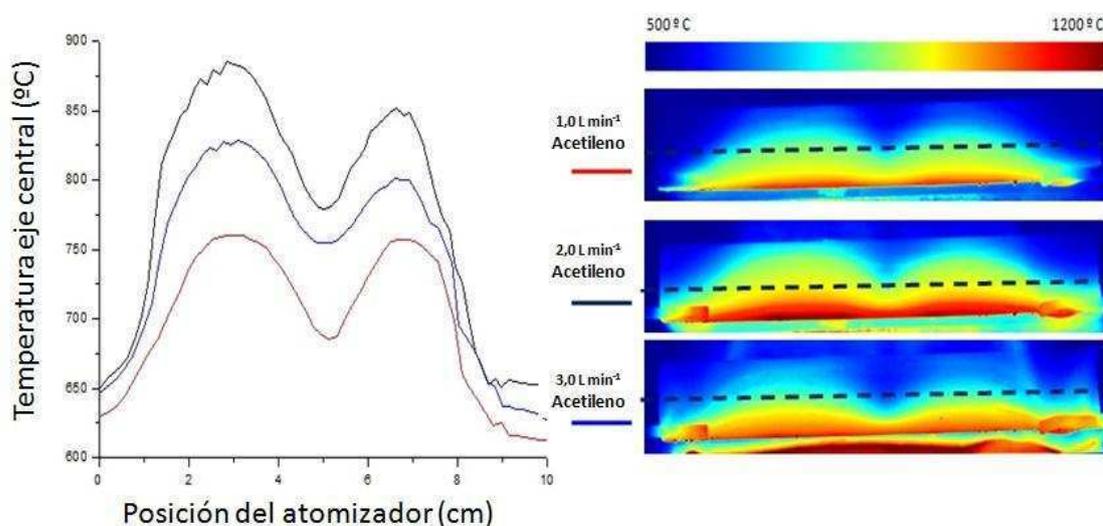


Figura 3.7: Distribución de temperaturas para diferentes estequiometrías de llama

3.5 - Influencia del caudal de solución “carrier”

El caudal de “carrier” es una variable de diseño de gran relevancia al momento de estudiar la performance analítica de la determinación de magnesio. Nótese que si se trabaja a una composición del “carrier” solvente orgánico/agua constante y se incrementa el caudal, se proporciona una mayor cantidad de materia orgánica al sistema. Este exceso de compuesto orgánico consume una mayor cantidad de oxígeno y vuelve el ambiente aún más reductor.

Entonces se hace necesario optimizar la relación de acetileno/aire junto a la composición de la solución “carrier” y el caudal al que ingresa. Estas son variables relacionadas que afectan los mismos parámetros fisicoquímicos. De allí que el enfoque clásico de optimización de una variable a la vez (OVAT) podría ser poco adecuado para este sistema y la aplicación de un diseño experimental multivariado podría extraer mucha más información. Sobre todo si este diseño pudiera restringirse a una mínima cantidad de experimentos. En las secciones de más abajo se muestra el diseño experimental empleado, así como la construcción de los modelos empíricos que permiten predecir la respuesta del magnesio por TS-FFAAS frente a la modificación de

las diferentes condiciones operativas. Todo ello es trabajo original desarrollado para esta tesis.

3.6 - Diseño experimental Box-Behnken múltiple (MBBD)

El enfoque multivariado de optimización, señala que todas las variables operativas del sistema deben ser modificadas en forma conjunta y de manera inteligente para obtener la mayor información con un mínimo de experimentos.

En este trabajo, se utilizó un diseño experimental tipo Box-Behnken (BBD) [10-12] para las tres variables mencionadas: caudal del solvente, concentración alcohólica en el solvente y caudal de acetileno. Con un BBD simple, todo el dominio experimental se muestrea con 13 experimentos. Dada la complejidad de las superficies de respuesta, este número de corridas se consideró insuficiente para la formulación de un modelo empírico correcto. Entonces, con el objetivo de aumentar de manera eficiente el número de puntos muestreados, el dominio experimental fue dividido en ocho cuadrantes, realizándose un BBD en cada uno de ellos tal como se muestra en la Figura 3.8. Se realizaron 62 corridas experimentales para cada uno de los alcoholes (metanol, etanol, isopropanol) de manera de poder realizar el modelado empírico. Esta aproximación resulta un enfoque mucho más económico comparado con las 125 corridas requeridas por un diseño "full factorial" de cinco niveles [11,13].

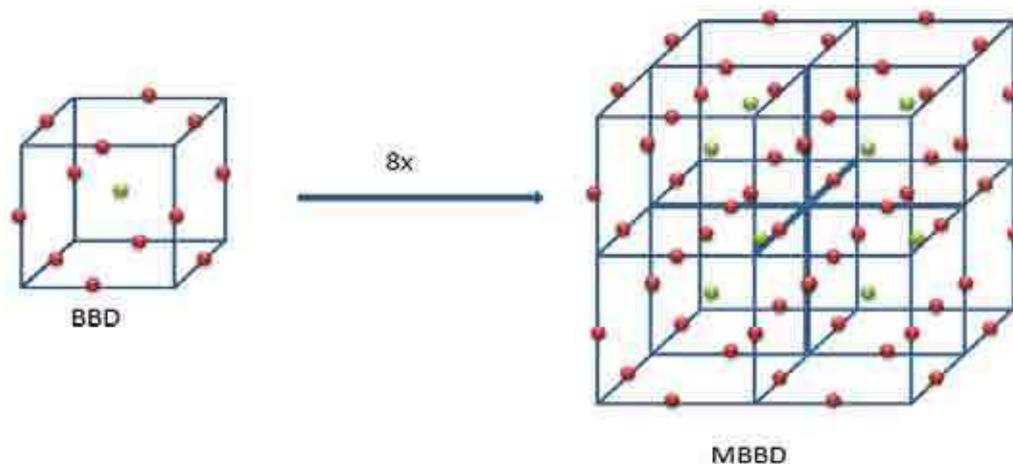


Figure 3.8.- Diseño experimental Box-Behnken Múltiple (MBBD) (El volumen ocupado por el cubo de la izquierda es idéntico al del de la derecha que se muestra ampliado para una mejor comprensión del lector)

3.7 - Modelado empírico por cuadrados mínimos (LS)

El modelo de cuadrados mínimos [14,15] es el más sencillo y conocido de los métodos de creación de modelos empíricos en química analítica y por ello suele ser el primero en probarse. Para realizar este tipo de modelado, se obtuvieron las respuestas experimentales para los tres alcoholes en estudio y se ajustaron por ecuaciones polinómicas de segundo grado y tercer grado mediante el método de cuadrados mínimos. Sin embargo, los resultados estadísticos no fueron satisfactorios: los valores de R^2 (coeficiente de correlación lineal) obtenidos fueron de 0,824, 0,852 y 0,837 para metanol, etanol e isopropanol respectivamente. Esto implica que estos modelos sólo pueden explicar aproximadamente el 85% de la variabilidad en las respuestas, y el 15 % restante se explica por los residuos.

3.8 - Optimización de la arquitectura de las redes neuronales artificiales (ANN)

Se aplicó una red neuronal tipo "*Back Propagation*" para la respuesta del sistema, y todas las neuronas se programaron con funciones de transferencia de tipo sigmoidea [16-19].

La arquitectura de la red fue diseñada utilizando los tres factores (caudal del solvente, concentración alcohólica en el solvente, y caudal de acetileno) como capa de entrada. La capa de salida se compone de un solo valor: altura de pico medida.

Típicamente, en este tipo de redes se utiliza una capa oculta. En este trabajo, se utilizó sólo una capa oculta debido a que no se observaron mejoras significativas en la performance incrementando este número.

Se realizaron varias pruebas con distinto número de neuronas (de 2 a 100) para determinar el número óptimo de neuronas en la capa oculta y así obtener la estructura óptima de la ANN. Se utilizó el error cuadrático medio (MSE) como parámetro a minimizar y decidir cuál es el número de neuronas óptimo. Los resultados para las tres ANN se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1.- Error cuadrático medio (MSE) calculado para cada ANN con diferente numero de neuronas en la capa oculta.

Numero de Neuronas	Metanol (MSE)	Etanol (MSE)	i-Propanol (MSE)
2	$7,03 \cdot 10^{-2}$	$2,69 \cdot 10^{-2}$	$7,80 \cdot 10^{-2}$
5	$3,60 \cdot 10^{-2}$	$9,41 \cdot 10^{-3}$	$4,54 \cdot 10^{-3}$
10	$3,85 \cdot 10^{-3}$	$3,68 \cdot 10^{-3}$	$1,27 \cdot 10^{-3}$
20	$2,79 \cdot 10^{-3}$	$1,17 \cdot 10^{-3}$	$3,72 \cdot 10^{-4}$
30	$3,06 \cdot 10^{-4}$	$2,71 \cdot 10^{-4}$	$9,18 \cdot 10^{-4}$
40	$1,47 \cdot 10^{-3}$	$3,09 \cdot 10^{-3}$	$7,22 \cdot 10^{-4}$
50	$1,94 \cdot 10^{-4}$	$8,76 \cdot 10^{-4}$	$1,39 \cdot 10^{-4}$
60	$2,63 \cdot 10^{-4}$	$9,49 \cdot 10^{-5}$	$4,60 \cdot 10^{-5}$
70	$1,42 \cdot 10^{-3}$	$7,93 \cdot 10^{-4}$	$8,88 \cdot 10^{-4}$
80	$1,05 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-3}$	$2,70 \cdot 10^{-3}$
90	$1,26 \cdot 10^{-3}$	$4,14 \cdot 10^{-4}$	$1,11 \cdot 10^{-4}$
100	$1,76 \cdot 10^{-3}$	$6,00 \cdot 10^{-4}$	$3,19 \cdot 10^{-3}$

3.9 - Capacidad predictiva de los modelos LS y ANN

Con el objetivo de comprobar la capacidad de predicción de ambos modelos (LS y ANN), los resultados predichos fueron comparados con 28 corridas experimentales (que no fueron utilizadas en la etapa de entrenamiento) seleccionadas especialmente cercanas a los máximos encontrados para los diferentes caudales de "carrier" de cada uno de los tres alcoholes. La Figura 3.9 presenta los resultados obtenidos de graficar los valores predichos por la red versus los valores medidos (arriba) y los valores predichos por LS versus los valores medidos (abajo).

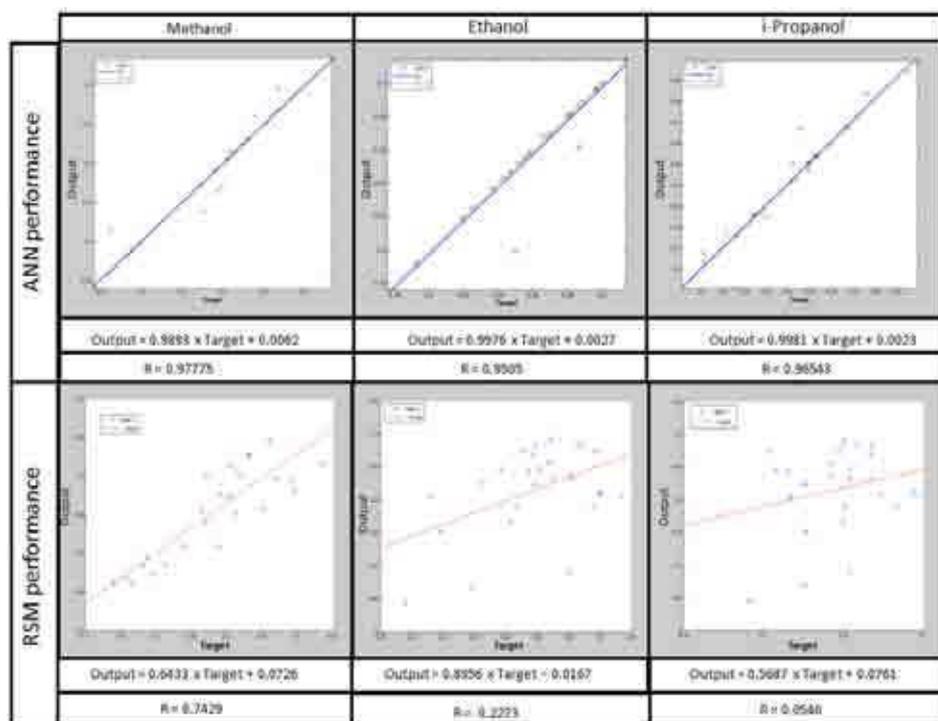


Figure 3. 9.- Performance de las predicciones realizadas con ANN para cada uno de los alcoholes (arriba), y de las predicciones realizadas con LS para los alcoholes (abajo). Las figuras grafican los resultados de la predicción vs. el valor experimental obtenido para el *set* de predicción

Se observa que los resultados predichos por LS muestran una baja concordancia con las medidas experimentales en todos los casos. Esto se debería a que la interacción entre variables es muy fuerte y la superficie que se trata de ajustar demasiado compleja para resolverse con polinomios sencillos.

En contraste, a pesar de existir unos muy pocos valores anómalos, se encuentra una muy buena correlación entre las predicciones hechas por las ANN y los datos experimentales, como los indican también los bajos valores de MSE, las pendientes y coeficientes de correlación cercanos a uno y las ordenadas al origen cercanas a cero. Por lo tanto, a diferencia del modelo creado con LS, las predicciones obtenidas a partir de redes neuronales artificiales pueden aceptarse como adecuadas para modelar la sensibilidad analítica de la metodología de TS-FF-AAS para el magnesio.

La Figura 3.10 muestra algunos resultados de las predicciones hechas con ANN para los tres alcoholes bajo diferentes condiciones de operación. Las figuras se

presentan de dos maneras, una superficie 3D y un grafico de contorno. Los ejes X, Y y Z representan el %v/v de alcohol, el caudal de acetileno ($L \text{ min}^{-1}$) y la altura de pico, respectivamente.

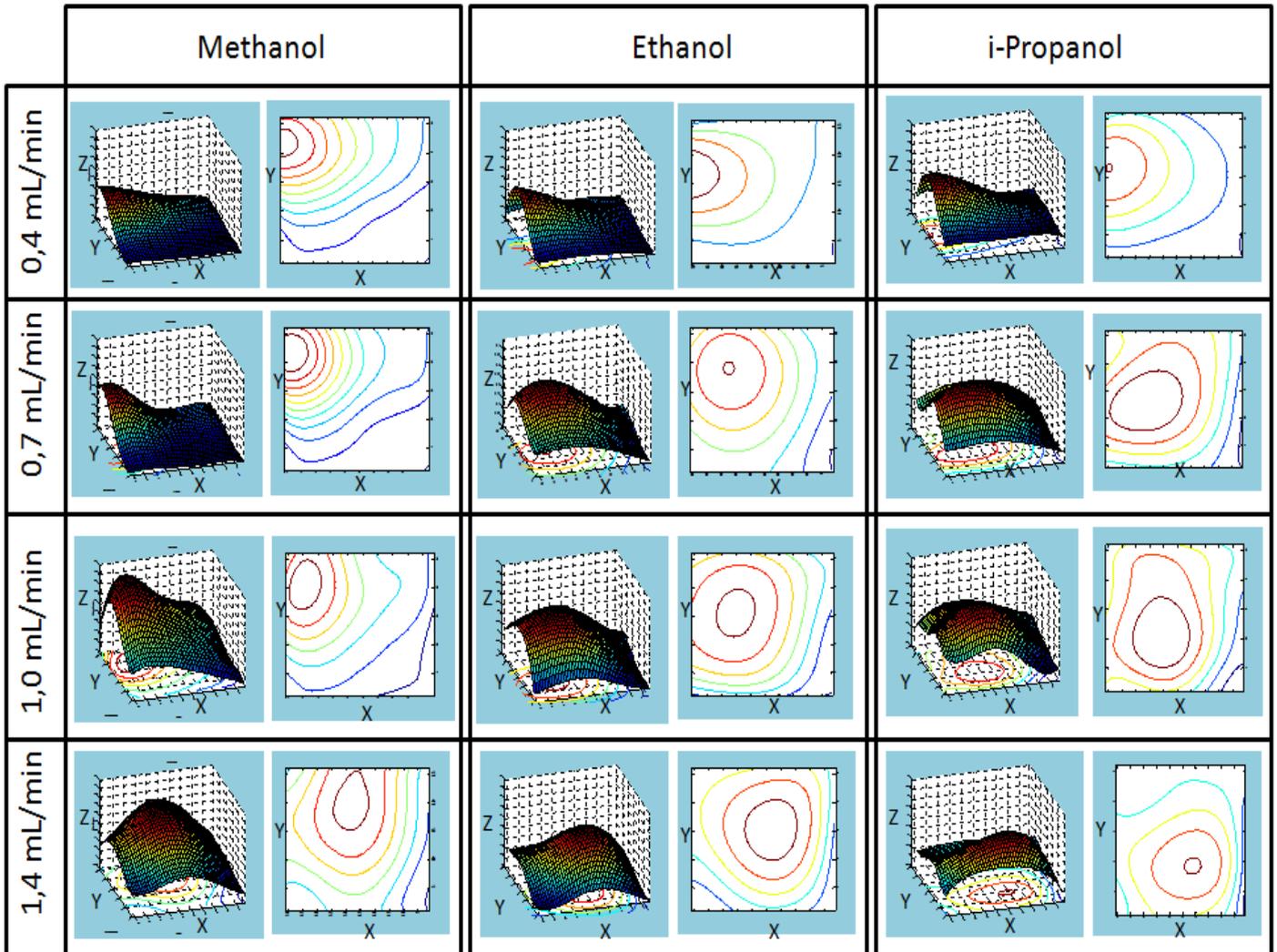


Figure 3.10. Resultado de las predicciones hechas por las ANN para cada uno de los alcoholes a diferentes caudales. X representa %v/v del alcohol, Y representa el caudal de acetileno ($L \text{ min}^{-1}$) y Z representa la altura de la señal obtenida.

3.10 - Análisis de las condiciones optimas

Las Figuras 3.10 y 3.11 (parte superior) muestran que a medida que el caudal de solución “carrier” aumenta, la maxima sensibilidad se alcanza a proporciones menores

de solvente orgánico en la mezcla con agua. Se puede observar con claridad que a medida que se produce un aumento del caudal de "carrier" se aumenta concordantemente la cantidad absoluta de alcohol que alcanza la celda. De esta manera, la proporción alcohol/agua puede reducirse manteniendo constante la cantidad total de solvente orgánico sin provocar un daño a la sensibilidad de la determinación. La Figura 11 (parte inferior) muestra la influencia del caudal de "carrier" en los moles de oxígeno consumidos en la combustión del solvente particular por minuto. Con el mismo argumento que antes, en la medida que el caudal de "carrier" se incrementa, aquellos alcoholes que presentan una mayor cantidad de átomos de carbono en la molécula alcanzan un máximo de señal a proporciones menores de solvente orgánico en la mezcla con agua.

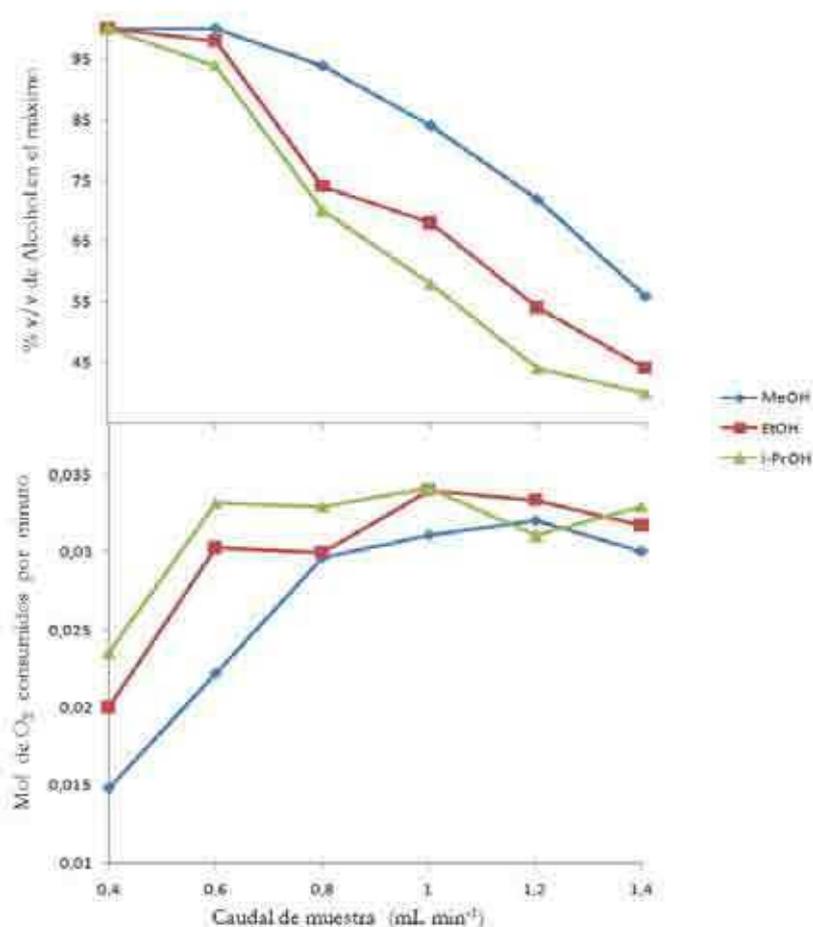


Figura 3.11.- Arriba: Porcentaje de solvente en las condiciones del máximo a diferentes caudales de muestra, Abajo: Moles de oxígeno consumidos en la combustión por el solvente por minuto para diferentes caudales

La Figura 3.12 considera la proporción de solvente en la mezcla y el caudal del combustible (acetileno) bajo las condiciones óptimas establecidas para cada una de las superficies de respuesta de la Figura 3.10. Cada uno de los puntos se corresponde con un máximo a un dado caudal de muestra. Aunque no existe un valor fijo para todos los máximos, la tendencia deja ver que una llama enriquecida en el combustible produce un ambiente más apropiado para la atomización de Mg cuando se usa metanol (de un solo átomo de carbono) en la mezcla solvente. Por el contrario, sería aconsejable una llama más pobre en acetileno conforme el número de átomos de carbono del solvente crece, por ejemplo de etanol a isopropanol.

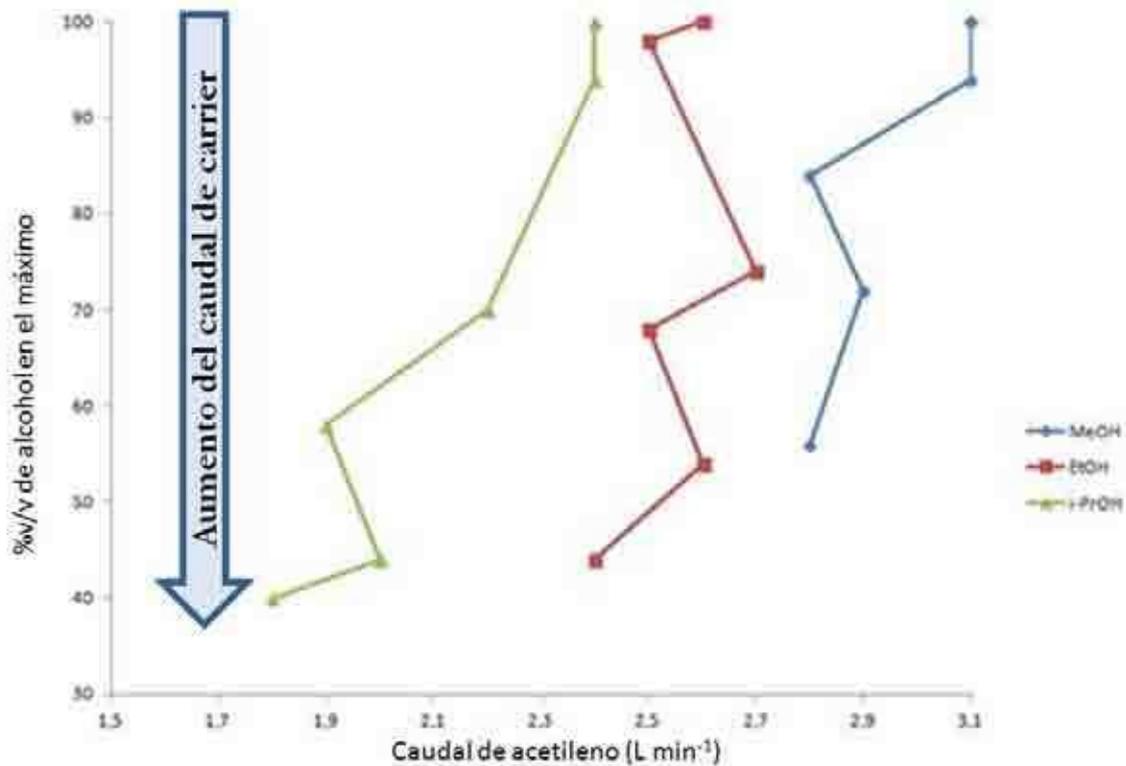


Figure 3.12.- Condiciones optimas a diferentes caudales de combustible de llama para los tres alcoholes, los caudales de solución "carrier" alcohólica aumentan en la dirección de la flecha.

La Figura 3.13 presenta la señal analítica de Mg (expresada como altura de pico) obtenida en condiciones de proporciones de solvente y estequiometría de llama óptimas en función de diferentes caudales de muestra. La figura interior muestra la influencia de la cantidad de solvente en la mezcla sobre el tamaño de la gota de aerosol medida como SMD.

El máximo obtenido en la Figura 3.13 se podría atribuir a una situación de compromiso: por un lado la señal crece a medida que el caudal de “carrier” crece y por el otro, la cantidad de solvente en forma de aerosol crece produciendo un descenso en la temperatura en el interior de la celda y con ello una generación de vapor atómico más pobre. En lo referente al diámetro de gota (interior de la Figura 3.13), la mayor proporción de solvente orgánico en la mezcla con agua conduce a un menor tamaño de gota con una mejor dinámica de desolvatación/atomización y, por ende, una mejor sensibilidad para la determinación del analito.

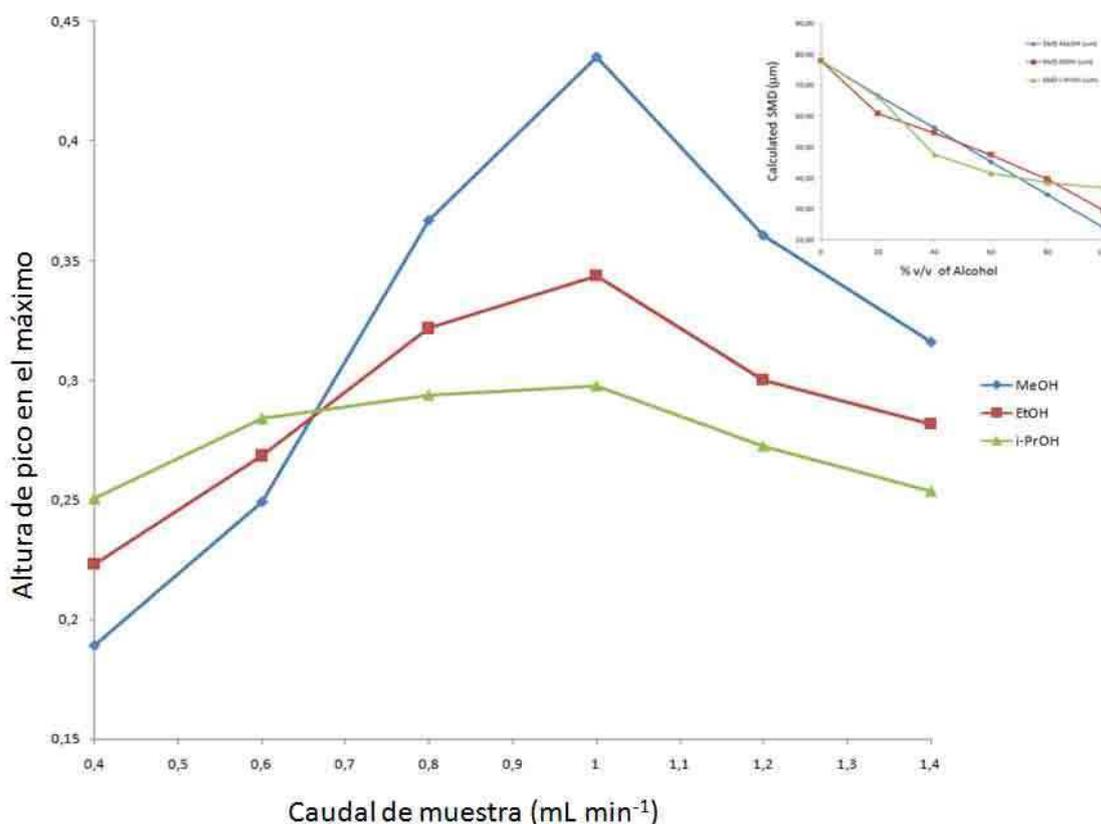


Figure 3.13.- Altura de pico en condiciones óptimas para diferentes caudales de muestra. En la esquina superior izquierda se muestra el diámetro medio calculado (SMD) vs el porcentaje de alcohol en el solvente para los tres alcoholes.

3.11 - Determinación de magnesio en comprimidos vitamínicos

En la siguiente sección se probaran las bondades del método propuesto mediante la determinación de magnesio en un complejo vitamínico efervescente. Esta determinación se realiza comúnmente mediante FAAS con una digestión previa en ácidos minerales debido a que la disolución del comprimido en agua no es completa y las partículas en suspensión obturan el capilar del nebulizador. Por el contrario, la metodología de TS-FF-AAS admite el ingreso de sólidos en suspensión, y entonces es posible realizar la determinación sin el paso previo de digestión, lo cual aumenta la frecuencia analítica, disminuyendo los costos de reactivos al mismo tiempo que previene la posible contaminación atribuible a excesivo manipuleo. En la Tabla 3.2 se muestran las cifras de mérito obtenidas para la determinación de magnesio con las condiciones optimizadas cuando se utilizan metanol/agua y etanol/agua como mezclas solventes sin digestión previa de la muestra. En la misma tabla se comparan los resultados con los obtenidos para FAAS.

Tabla 3.2.- Comparación de las cifras de mérito para el análisis convencional por FAAS y para las condiciones optimizadas para etanol y metanol en TS-FF-AAS

Cifras de Mérito	FAAS	TS-FF-AAS (MeOH)	TS-FF-AAS (EtOH)
Sensibilidad ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.707 \pm 0.06	0.086 \pm 0.04	0.063 \pm 0.05
Ambito Dinámico Lineal ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.03 - 0.4	0.068 - 5	0.09 - 5
%RSD (n=5)	2.60%	3.55%	4.02%
LOD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (3 σ b)	0.009	0.021	0.027
LOQ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (10 σ b)	0.027	0.068	0.09

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados de recuperación obtenidos agregando soluciones estándar a una suspensión de pastillas vitamínicas analizadas por TS-FF-

AAS. El porcentaje de recuperación para ambos solventes se encuentra en el ámbito de 98 - 101 %.

Tabla 3.3.- Resultados de experimentos de adición estándar realizada en cinco muestras de vitamina diferentes. Los resultados se expresan en porcentaje de recuperación.

Metodo	Muestra Enriquecida 1 (% Recuperación)	Muestra Enriquecida 2 (% Recuperación)	Muestra Enriquecida 3 (% Recuperación)	Muestra Enriquecida 4 (% Recuperación)	Muestra Enriquecida 5 (% Recuperación)
TS-FF-AAS (MeOH)	101.4	100.4	98.2	99.3	100.7
TS-FF-AAS (EtOH)	98.6	99.6	101.8	100.7	99.3

La Tabla 3.4 compara los resultados de la determinación convencional por FAAS con las metodologías aquí descritas. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las metodologías para un 95% de confianza (test t, n=5).

Table 3.4.- Determinación de magnesio en pastilla efervescente Berocca® mediante: FAAS con digestión previa de muestra; TS-FF-AAS con introducción directa de muestra sin digestión previa, utilizando etanol y metanol en condiciones óptimas.

Metodo	Muestra 1 (mg Mg por pastilla)	Muestra 2 (mg Mg por pastilla)	Muestra 3 (mg Mg por pastilla)	Muestra 4 (mg Mg por pastilla)	Muestra 5 (mg Mg por pastilla)
FAAS Con digestión de muestra	102.3 ± 0.2	99.1 ± 0.2	98.2 ± 0.2	103.6 ± 0.2	97.8 ± 0.2
TS-FF-AAS (MeOH) Sin digestión de muestra	101.1 ± 0.2	98.9 ± 0.2	100.2 ± 0.2	104.5 ± 0.2	97.3 ± 0.2
TS-FF-AAS (EtOH) Sin digestión de muestra	90.8 ± 0.2	105.3 ± 0.2	98.4 ± 0.2	102.1 ± 0.2	99.6 ± 0.2

3.12 - Materiales y métodos

3.12.1.- Reactivos

Todas las soluciones fueron preparadas con reactivos calidad analítica. Agua doblemente deionizada (DIW) fue obtenida de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). El material de vidrio fue lavado con EXTRAN (Merk) 1%v/v y fue mantenido en HCl 10%v/v, y antes de ser utilizado se enjuagó con DIW.

Las soluciones estándar de magnesio fueron preparadas diariamente por dilución apropiada de una solución madre de 1000 mg L⁻¹ (Merck). HNO₃ Suprapur (Merck) fue utilizado en la mineralización de las muestras cuando fue requerido.

3.12.2 - Instrumental

En todos los experimentos se utilizó un espectrómetro de absorción atómica Shimadzu AAS 6800 (Kyoto, Japon) equipado con una lámpara de cátodo hueco de magnesio y una lámpara de deuterio para corrección de fondo. Las condiciones instrumentales fueron las recomendadas por el fabricante.

Se utilizó una llama de aire/acetileno en diferentes relaciones combustible comburente: el acetileno se varió entre 1 y 3,5 L min⁻¹ mientras que el caudal de aire se mantuvo constante a 24 L min⁻¹. Los valores óptimos de acetileno fueron de 2,5 L min⁻¹ y 3,0 L min⁻¹ para etanol y metanol respectivamente. Estos valores fueron empleados en los experimentos.

Un horno de microondas del tipo "*closed vessel*" (MDS-2000, CEM Corporation, USA), equipado con sondas de temperatura y presión, fue empleado en el procedimiento de digestión de muestras. El programa de mineralización fue provisto por el fabricante.

El sistema TS-FF-AAS fue ensamblado utilizando una bomba peristáltica de ocho canales (IPC, Ismatec, Glattbrugg-Zürich, Switzerland), una válvula rotatoria de seis puertos (Valco Instruments, Houston, TX, USA), tuberías de 0.5 mm i.d. de PTFE^(R), un capilar cerámico (0,5mm i.d., 6 cm de longitud) y un horno atomizador de níquel. La composición del níquel que constituye el atomizador y sus dimensiones son las descritas en el capítulo 1.

Las mediciones de temperatura fueron realizadas con una cámara digital Nikon D3100. La metodología empleada fue la misma descrita en el capítulo 1.

3.12.3 - Tratamiento de datos

Se realizó en la modalidad altura de pico tal como se indicara en los capítulos previos.

La programación de las redes neuronales y el procesamiento de imágenes se realizó con Matlab 8.0.

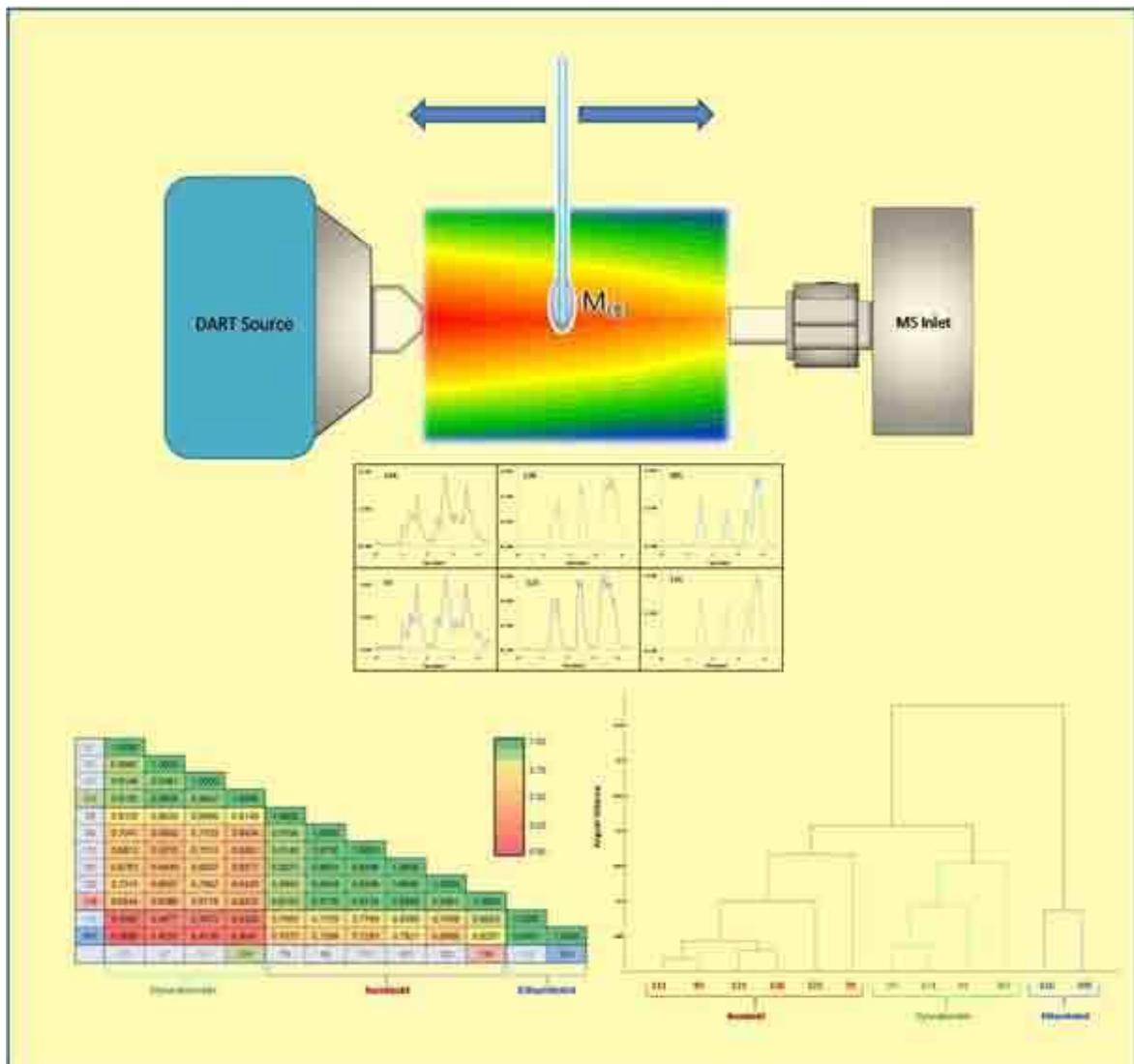
3.13 – Bibliografía

- [1] P. Wu, Y. Zhang, R. Liu, Y. Lv, X. Hou, *Talanta* 2009, 77, 1778–1782.
- [2] K. Miranda, E. Rodrigues Pereira-Filho, *Anal. Methods* 2009, 1, 215.
- [3] J. Davies, H. Berndt, *Anal. Chim. Acta* 2003, 479, 215–223.
- [4] A. Gáspár, H. Berndt, *Spectrochim. acta, Part B At. Spectrosc.* 2000, 55, 587–597.
- [5] J. Mora, A. Canals, V. Hernandis, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 1996, 51, 1535–1549.
- [6] C. C. Nascentes, M. Y. Kamogawa, K. G. Fernandes, M. a Z. Arruda, a. R. a Nogueira, J. a. Nóbrega, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 2005, 60, 749–753.
- [7] J. W. Novak, R. F. Browner, *Anal. Chem.* 1980, 52, 287–290.
- [8] A. W. Boorn, R. F. Browner, *Anal. Chem.* 1982, 54, 1402–1410.
- [9] M. L. Brancalion, E. Sabadini, M. a Z. Arruda, *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 2009, 64, 89–94.
- [10] S. L. C. Ferreira, R. E. Bruns, H. S. Ferreira, G. D. Matos, J. M. David, G. C. Brandão, E. G. P. da Silva, L. a Portugal, P. S. dos Reis, a S. Souza, et al., *Anal. Chim. Acta* 2007, 597, 179–86.
- [11] R. Leardi, *Anal. Chim. Acta* 2009, 652, 161–72.
- [12] M. a. Álvarez, G. Carrillo, *Talanta* 2012, 97, 505–512.
- [13] C. R. T. Tarley, E. D. C. Figueiredo, G. D. Matos, *Anal. Sci.* 2005, 21, 1337–1342.
- [14] D. Baş, İ. H. Boyacı, *J. Food Eng.* 2007, 78, 836–845.

- [15] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar, L. A. Escaleira, *Talanta* 2008, 76, 965–77.
- [16] F. Despagne, D. L. Massart, *Analyst* 1998, 123, 157R–178R.
- [17] A. Lopez-Molinero, P. Calatayud, D. Sipiera, R. Falcon, D. Liñan, J. Ramon Castillo, *Microchim. Acta* 2007, 158, 247–253.
- [18] H. Ebrahimzadeh, N. Tavassoli, O. Sadeghi, M. M. Amini, *Talanta* 2012, 97, 211–7.
- [19] A. Gáspár, É. Széles, H. Berndt, *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 372, 136–140.
- [20] Martínez H.D.; Iglesias A.A.; Beccaria A.J.; Goicoechea H.C. *Bioresource Technology* 2010, 101, 7537–7544.
- [21] Betikur E.; Okubsikawi S.S.; Ajala S.O.; Odelele O.S. *Renewable Energy* 2015, 78, 408-417.
- [22] Prakash Maran J.; Priya B. *Ultrasonics Sonochemistry* 2015, 23, 192-200.
- [23] Faria Silva S.; Rodrigues Anjos C.A.; Nunes Cavalcanti R.; dos Santos Celeghinim R.M. *Food Chemistry* 2015, 179, 35-43.

Capítulo 4

"Introducción dinámica de muestras en DART-MS"



“A thinker sees his own actions as experiments and questions--as attempts to find out something. Success and failure are for him answers above all.”

— Friedrich Nietzsche

4.1 - Introducción

La posibilidad de realizar el proceso de ionización a presión atmosférica fue sin duda un punto de inflexión en el desarrollo de la espectrometría de masas debido a que: permite la ionización superficial sin cerramientos, ionización directa con el mínimo pretratamiento de la muestra, la generación suave de iones (con baja deposición de energía interna) de tal manera que la mayoría de los iones detectados se encuentran sin fragmentación [1-4].

Una de las fuentes de iones a presión atmosférica más utilizada es conocida bajo el nombre de análisis directo en tiempo real (DART por sus siglas en inglés), que es una fuente basada en la ionización por plasma a alta temperatura. El método de DART es utilizado para el análisis rápido de diversos materiales, por ejemplo medicamentos, explosivos, alimentos, entre otros [2,5-7].

DART utiliza una descarga eléctrica sobre un flujo de helio (o nitrógeno) a presión atmosférica conocida como *glow discharge*, formando un plasma de helio como se representa en la Figura 4.1. El mecanismo más comúnmente considerado en la formación de iones involucra un primer paso de colisión de átomos de helio electrónicamente excitados metaestables con moléculas de agua presentes en la humedad atmosférica para formar agrupamientos o "clusters" de agua protonados (ver reacción 4.1), este mecanismo se conoce con el nombre de ionización tipo Penning [7,8].

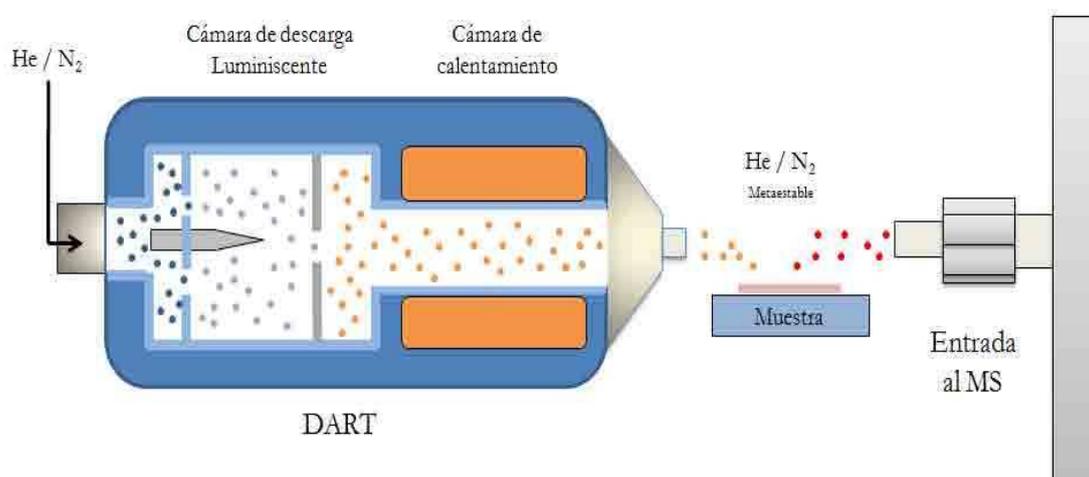
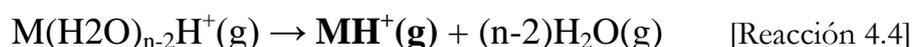
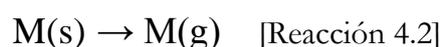
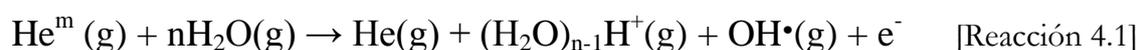


Figura 4.1.- Esquema de funcionamiento de la fuente de DART.

Luego, el calentador cerámico del DART incrementa la temperatura de los gases de salida de la fuente. De esta manera, la desorción del analito es mediada por procesos de desorción térmica, llevando a un incremento en la sensibilidad con un incremento en la temperatura del gas mientras se evite la fragmentación excesiva del compuesto analizado. Posteriormente, se producen colisiones entre los analitos térmicamente desorbidos con "*clusters*" de agua protonada para formar el ion solvatado. Si la diferencia de afinidad protónica (AP) entre estas especies que colisionan es favorable, la reacción de transferencia protónica procede (reacción 4.3). Por último, se produce la desolvatación del ion liberando al analito protonado que es la especie más comúnmente observada en modo positivo por DART-MS (reacción 4.4) [7,8]. Un resumen del mecanismo completo se muestra en la Figura 4.2.



Durante un análisis típico por DART-MS, se monta la fuente de plasma a pocos centímetros de la entrada al espectrómetro de masas abierta al ambiente. Se coloca la muestra sobre un soporte que puede ser un capilar de vidrio, una malla metálica, o simplemente unas pinzas (dependiendo de las propiedades de la muestra). Se fija la muestra con su soporte en algún punto del eje entre la salida del DART y la entrada al espectrómetro, usualmente la posición de máxima sensibilidad es más cercana a la fuente de plasma debido a que la temperatura de desorción se incrementa en esta zona, pero dependiendo de las concentraciones y de las propiedades del analito esta posición puede variar [9].

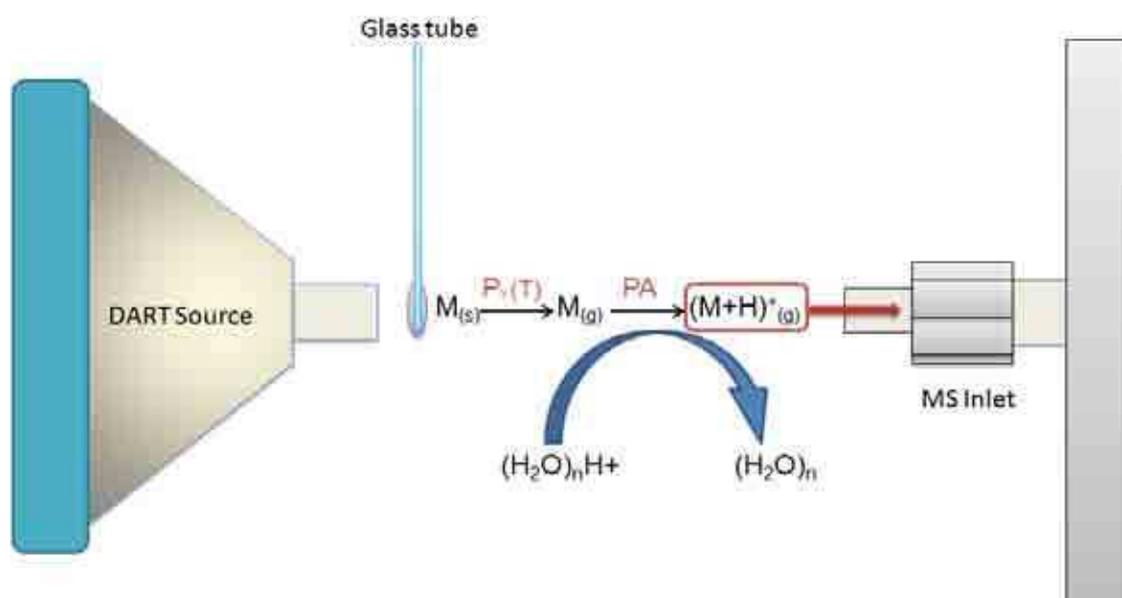


Figura 4.2.- Resumen gráfico del mecanismo de ionización de analitos por DART-MS. Donde M es la muestra, Pv es la presión de vapor, y PA es la afinidad protónica.

El análisis por DART-MS más frecuente consiste en la detección de las moléculas protonadas de los analitos buscados. Por ejemplo, un control de calidad de preparados farmacéuticos finaliza una vez que se encuentran los picos correspondientes a los compuestos activos. Pero, aunque se considere que esta metodología produce una ionización relativamente suave [4], mediante el análisis por DART-MS se suelen encontrar otros iones inesperados, lo cual revela la presencia de otros componentes o fragmentación de los iones originales. Esta información adicional que puede complicar el espectro de masas obtenido, suele considerarse como ruido de base y se descarta aunque pueda corresponderse con información valiosa. Esto es debido a que actualmente no existen métodos sencillos que permitan interpretar la información más fácilmente.

En el presente trabajo se propone una introducción dinámica de la muestra para DART-MS en contraste con la introducción estática clásica. El procedimiento se trata simplemente de, en lugar de dejar la muestra frente a la fuente de plasma fija durante el análisis, mover la muestra en el eje entre la salida del DART y la entrada del espectrómetro de masas para aprovechar el gradiente térmico generado por la temperatura del plasma. Esto promueve que distintos analitos, con distinta presión de

vapor, se desorban de manera diferencial adquiriendo una señal transitoria característica para cada uno de ellos. Luego, comparando el perfil de la señal obtenida con el de los otros picos encontrados en la muestra, es posible determinar la correlación entre iones, es decir, poder identificar fragmentos del ión original generados en el proceso de ionización.

Para probar las capacidades del método propuesto se analizaron muestras reales de pastillas para el tratamiento de la tuberculosis.

Se mostrará cómo variaciones en la velocidad de la muestra producen distintas rampas de temperatura para optimizar la diferenciación entre los componentes de la muestra. Luego, se proponen distintos algoritmos matemáticos para la correlación automática de fragmentos.

4.2 Análisis de la muestra por DART-MS: método estático

La droga anti tuberculosis examinada contiene cuatro ingredientes activos, pyrazinamida (Mr 123), Isoniazid (Mr 137), ethambutol (Mr 204) y rifampicina (Mr 822). Durante un análisis estático clásico, el soporte de la muestra se fija durante todo el tiempo del experimento en una posición cercana a la fuente de plasma, ya que es en esta zona donde se produce mayor desorción de los analitos.

En la Figura 4.3 se observa el espectro de masas de la droga analizada obtenido mediante DART-MS. Se observa la aparición de tres de los cuatro principios activos presentes en la droga, asignándose los picos correspondientes a la molécula protonada $[M+H]^+$ de cada compuesto. Sin embargo, debido a que es una desorción térmica, los analitos con masas elevadas y bajas presiones de vapor no son fácilmente detectables por esta metodología. Este es el caso de la rifampicina que no pudo ser detectada.

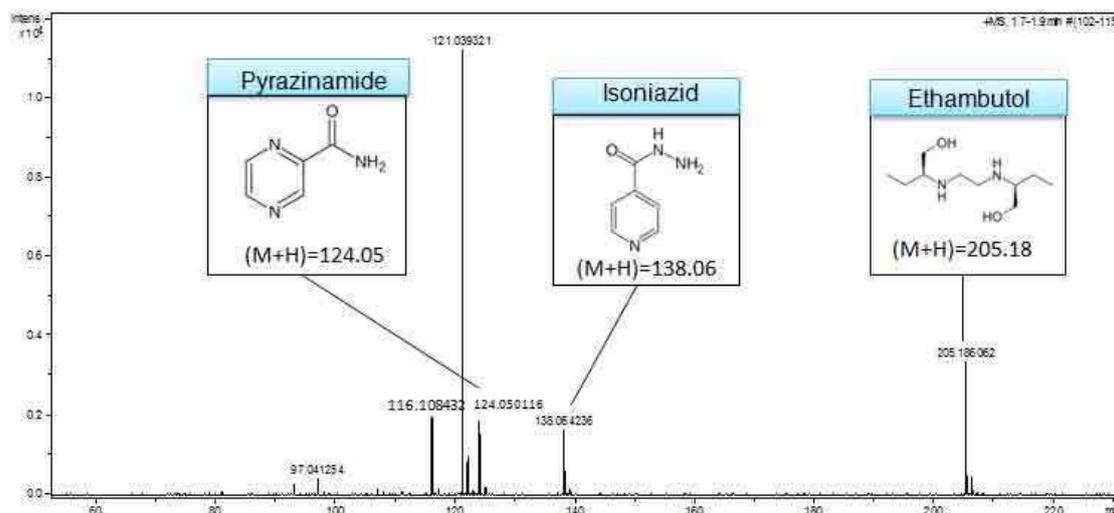


Figura 4.3.- Espectro de masas de una pastilla para el tratamiento de la tuberculosis obtenido por DART-MS.

Además, en la Figura 4.3 se pueden observar varios picos no identificados que podrían corresponder a compuestos presentes que no fueron identificados, o bien a fragmentos de los analitos ya identificados.

4.3 Análisis de la muestra por DART-MS: método dinámico

Si en lugar de fijar la posición de la muestra, se mueve el soporte a lo largo del eje entre la fuente de plasma y la entrada al espectrómetro de masas, se registran perfiles de intensidad en el tiempo que son característicos de cada ión. Esto se debe a que mientras se mueve la muestra, esta atraviesa un gradiente térmico que produce una desorción diferencial de los analitos que poseen una variación de la presión de vapor con la temperatura de manera característica.

El procedimiento consiste en colocar la muestra pulverizada en la punta de un capilar de vidrio, y luego moverlo en el espacio entre la fuente de DART y la entrada al espectrómetro de masas para poder aprovechar el gradiente térmico generado en esta zona. De esta manera se produce una desorción diferencial de los distintos compuestos que tienen presiones de vapor distintas a diferentes temperaturas.

En la Figura 4.2 se representa un diagrama del diseño experimental utilizado en los experimentos, con la fuente de plasma a 400 °C.

En la Figura 4.4 se muestra un diagrama del diseño experimental utilizado en los experimentos, y un diagrama del gradiente de temperatura generado por la fuente de DART. Además, en la base de la figura, se observan tres termografías que revelan el cambio en la temperatura de la punta del capilar de vidrio posicionado a distintas distancias de la fuente de DART.

Simplemente cambiando la velocidad del soporte de la muestra en este espacio, es posible someter a la muestra a perfiles de temperatura muy reproducibles.

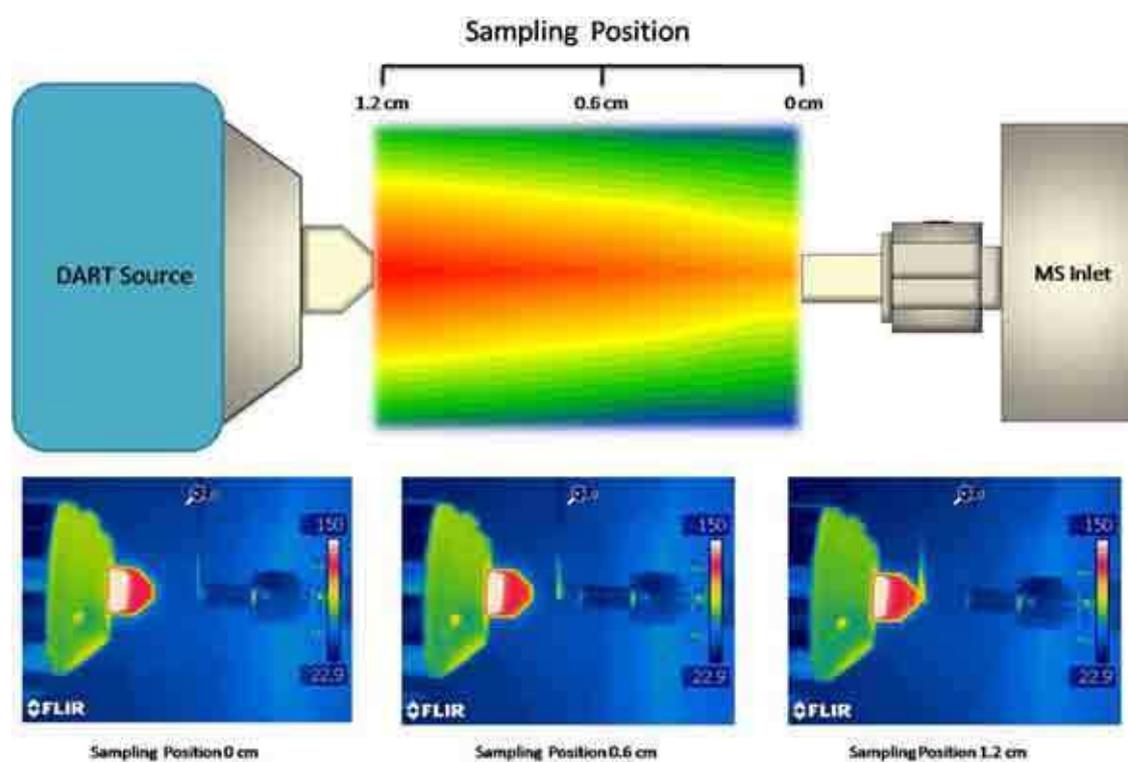


Figura 4.4: Arriba: Diseño experimental de un experimento de DART-MS con un esquema del gradiente térmico generado por la fuente de DART funcionando a 400°C. Abajo: Imágenes térmicas adquiridas con el capilar de vidrio en diferentes posiciones de muestreo.

Se registraron la temperatura y la intensidad de la señal de un ión durante una trayectoria típica de la muestra para poner en evidencia la relación existente entre las posiciones de muestreo, la temperatura a la que se somete la muestra y el perfil de intensidad de los iones detectados por DART-MS, la temperatura en la punta del capilar. Los resultados se muestran en la Figura 4.5.

En la figura se puede observar que cuando la posición del capilar de vidrio está alejado de la fuente de DART, la temperatura es mínima y se obtiene una línea de base en el espectro de masas. A medida que la muestra se acerca a la fuente de plasma, la temperatura se incrementa, aumenta la presión de vapor de cada uno de los compuestos presentes en la muestra de manera característica, y se evidencia un incremento en la intensidad de las señales adquiridas. Cuanto más cercana se encuentre la muestra a la fuente de DART, más se eleva la temperatura y las moléculas menos volátiles pueden ser desorbidas, incrementándose aún más las señales. Las diferentes velocidades de las trayectorias producen desorción de los analitos en diferentes cantidades según su correspondiente presión de vapor. Como resultado se obtiene un perfil de desorción diferente para cada compuesto que es registrado por el espectrómetro de masas. Entonces todos los fragmentos derivados del mismo compuesto deben tener el mismo perfil de intensidades.

En la Figura 4.6 se muestra una comparación de los perfiles de intensidad de la señal en el tiempo para los iones precursores y para tres iones no identificados. Puede observarse que existe una gran semejanza en el perfil registrado de los iones identificados con algunos de los iones desconocidos, lo cual sugiere que deben ser fragmentos del ión original que se producen en la fuente de ionización o en la interfaz de presión atmosférica del espectrómetro.

Esta alta correspondencia se utilizó para asignar fragmentos a los iones precursores y así poder identificar la molécula de la cual proviene cada fragmento sin usar experimentos de masa tándem, simplificando la interpretación de los espectros de masas obtenidos.

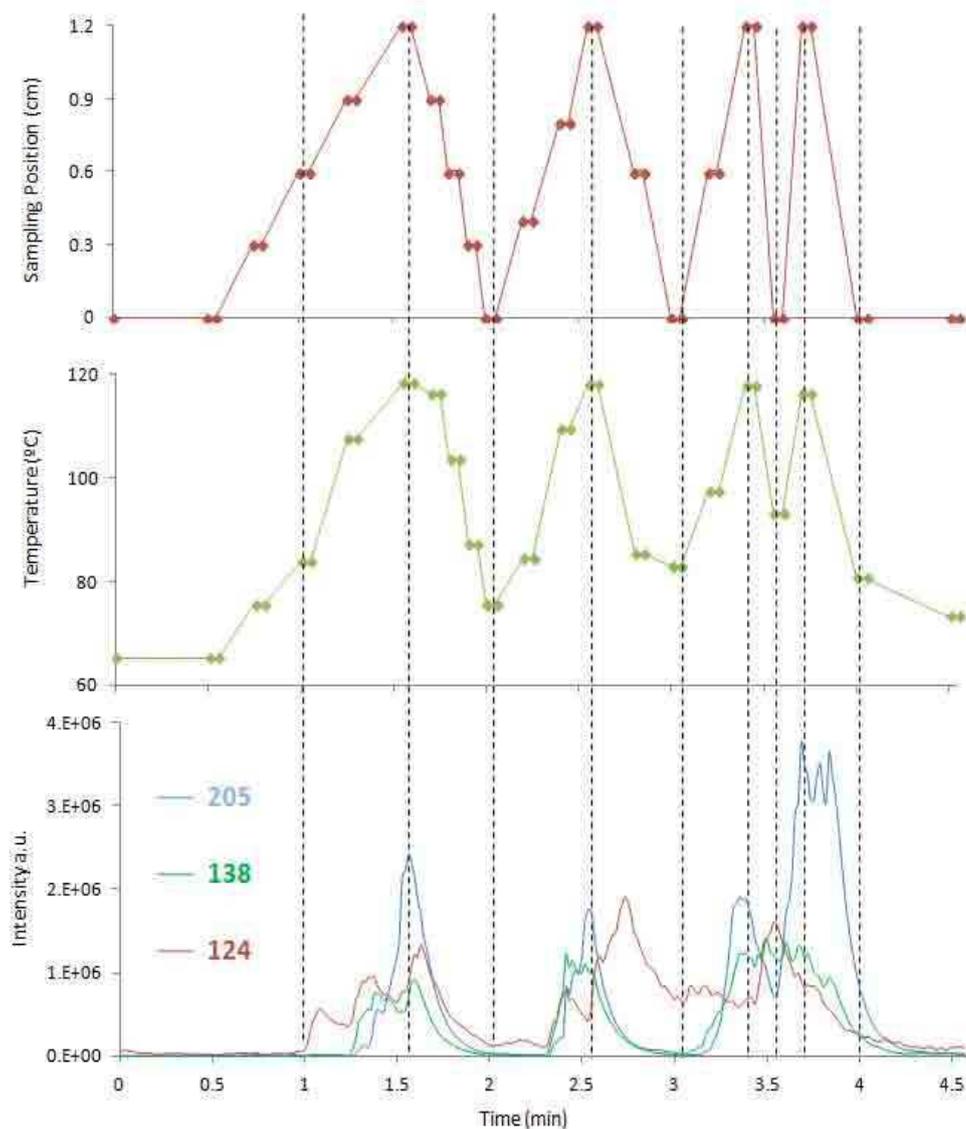


Figura 4.5: Relación entre el tiempo (eje x), la posición de la muestra (0 cm es delante de la entrada del espectrómetro de masas, y 1,2 cm es delante de la fuente de plasma), la temperatura de la punta del capilar, y el perfil temporal de la intensidad de los iones pyrazinamide protonada ($[M+H]^+= 124$, línea roja), isoniazid ($[M+H]^+= 138$, línea verde), ethambutol ($[M+H]^+= 205$, línea azul).

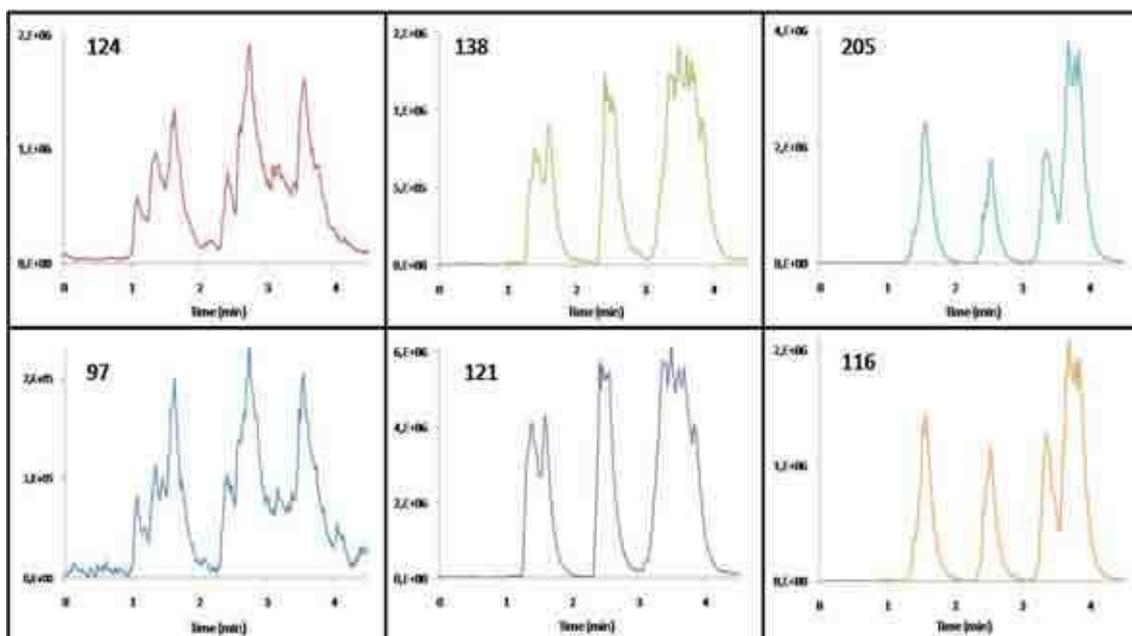


Figura 4.6: Comparación entre el perfil temporal de intensidad de iones precursores (m/z : 124, 138, 205) y de algunos iones no identificados (m/z : 97, 121, 116) obtenidos mediante la metodología de DART-MS con muestreo dinámico.

4.4 Métodos estadísticos para la correlación de fragmentos

Debido a la gran cantidad de fragmentos que se encuentran en las muestras complejas como esta, la inspección visual de todos los fragmentos resulta una tarea que consume mucho tiempo, en este caso se encontraron 12 fragmentos que se discriminaban del ruido de base. Entonces, se buscaron métodos que permitieran la identificación de iones de manera rápida y efectiva. Estos métodos deberían poder correlacionar de manera automática los fragmentos con los precursores. En este trabajo se probaron distintos métodos estadísticos que requerían distinto grado de supervisión por parte del analista. En las siguientes secciones se describirán los métodos empleados.

4.4.1 Matriz de Correlación

Excepto por el de la inspección visual, el método mas sencillo utilizado consiste en realizar una matriz gráfica donde cada posición de la matriz es un gráfico de intensidad de un ión respecto de intensidad de otro. Entonces, cada columna de esta matriz contendrá a un mismo ión en todos los gráficos de la misma columna en el eje x, y cada fila contendrá a un mismo ión en el eje y de todos los gráficos en esta fila. De manera tal que, en cada posición de la matriz se encuentre graficado un par de señales de iones, y a lo largo de toda la matriz se podrá encontrar cualquier par deseado. Si existe una relación entre los iones se evidenciará a través de una tendencia lineal en dicho grafico.

En la Figura 4.7 se observa este tipo de matriz gráfica aplicada a los perfiles de las señales de los seis iones más intensos. Se puede observar que la mayoría de los gráficos en la matriz muestran una distribución de puntos muy dispersa donde no se encuentra ninguna correlación evidente entre las señales de los iones. Sin embargo, existen algunos pocos gráficos que muestran una clara tendencia lineal. Tal es el caso de los gráficos lineales de la diagonal, circunstancia esperable debido a que se grafica en ambos ejes la señal obtenida para el mismo ión. Pero también se observa una clara tendencia lineal en las posiciones resaltadas sobre la matriz gráfica de la figura. Esto indica que el perfil de desorción de ambos iones es semejante, y por lo tanto es probable que provengan del mismo compuesto. De esta manera es sencillo evaluar gráficamente correlaciones entre fragmentos.

Sin embargo, debido a que la matriz gráfica se agranda como el número de iones al cuadrado, cuando se tiene una muestra compleja con muchos iones resulta lento y tedioso analizar todas las posiciones.

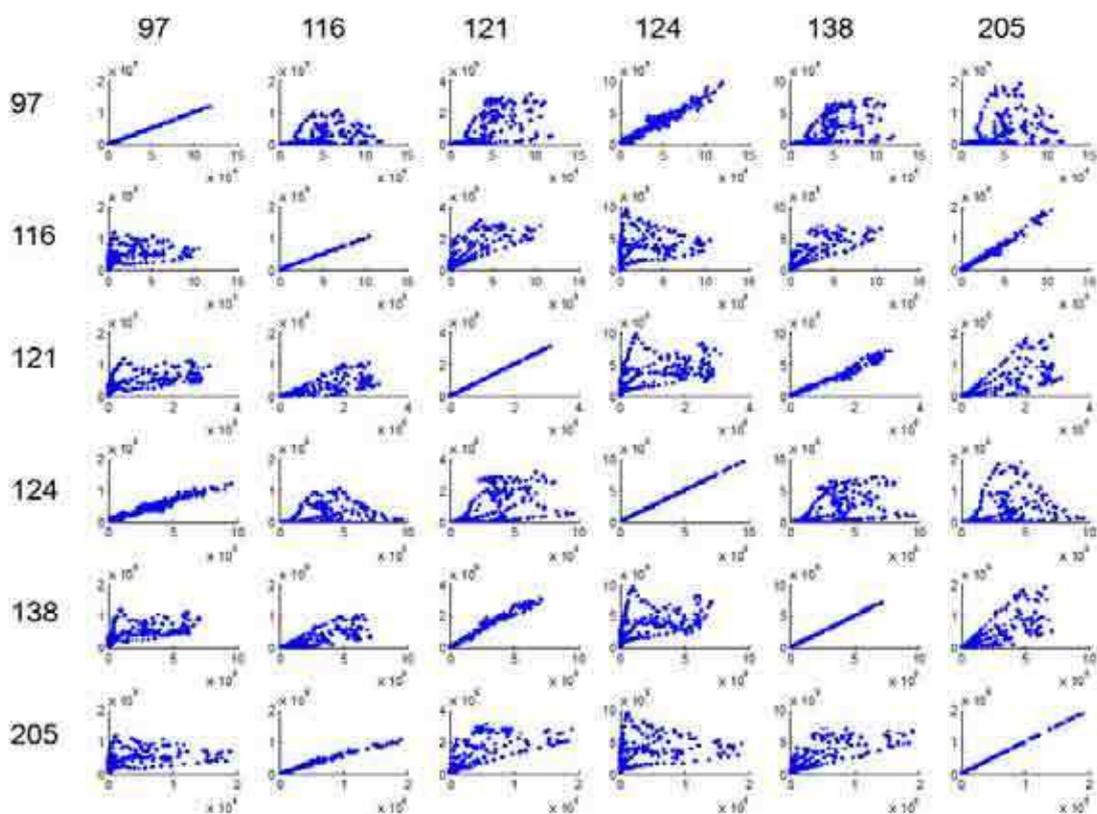


Figura 4.7.- Matriz gráfica obtenida para seis iones (m/z 97, 116, 121, 124, 138, 205).

Con el fin de acelerar este proceso, se decidió utilizar el coeficiente de correlación de Pearson (r). Se trata de un valor entre cero y uno que indica que cuánto más cercano a uno se encuentre, mayor es la probabilidad que exista una relación lineal entre las variables. La ecuación 4.1 muestra la fórmula para calcular dicho coeficiente, donde x_i es el valor de intensidad de la señal del analito que corresponde al eje x a un tiempo i , y_i es el análogo para el analito que corresponde al eje y, y n es la cantidad de tiempos registrados.

$$r = \frac{n \sum X_i Y_i - \sum X_i \sum Y_i}{\sqrt{[n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2] [n \sum Y_i^2 - (\sum Y_i)^2]}} \quad [\text{Ec. 4.1}]$$

Entonces se construyó una matriz de correlación para reemplazar la evaluación gráfica de correlación por una evaluación numérica. La matriz de correlación se construye calculando este coeficiente “r” para cada par de iones y ubicándolo sobre cada posición de la matriz. Al igual que la matriz gráfica, la matriz de correlación es una matriz simétrica cuya diagonal siempre es igual a uno. La Figura 4.8 muestra, por razones de simetría, una mitad de la matriz de correlación para los 12 iones que se diferenciaron del ruido de base. Además, se colocaron uno al lado del otro los iones con coeficiente de correlación más elevado, y se agregó una escala de colores para facilitar la interpretación de los resultados.

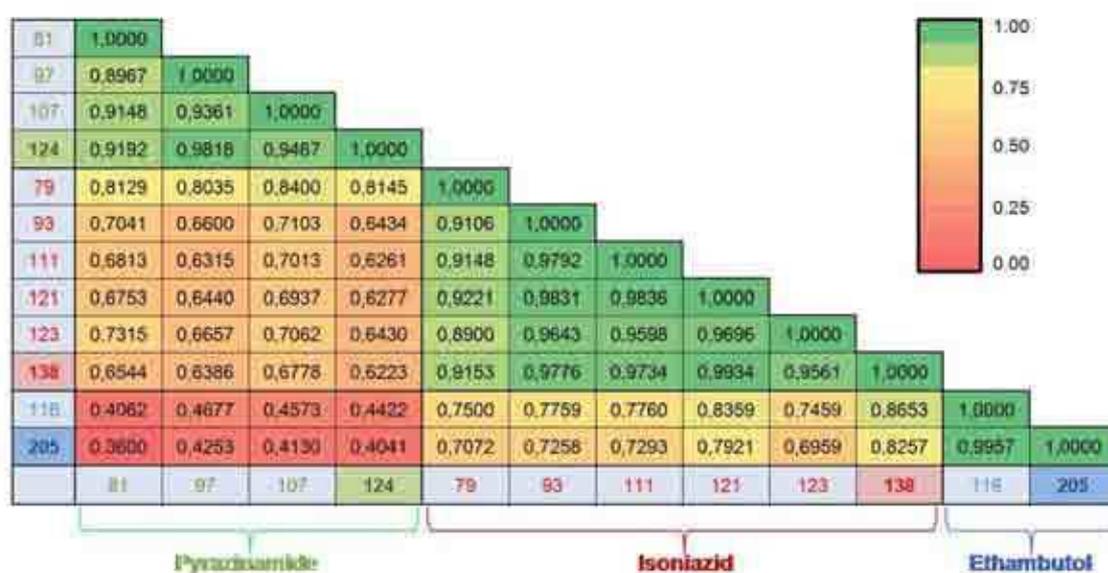


Figura 4.8.- Los iones se agruparon según el mayor coeficiente de correlación. Se agregó una escala de color para simplificar la interpretación. Se resaltaron los iones precursores identificados.

En la Figura 4.8 se pueden observar secciones triangulares verdes que, no sólo muestran una alta correlación entre los precursores y los fragmentos, sino también una buena correlación entre los fragmentos de un mismo grupo. Además, las secciones rectangulares rojas indican una baja correlación entre iones de distintos grupos. A partir de esta figura se detectan tres grupos o "clusters" de iones, observándose además que

cada uno de los iones padre identificados se encuentran en distintos grupos. Por lo tanto se puede inferir que cada uno de los iones detectados dentro de un grupo son fragmentos del ión padre de mayor m/z en el grupo.

4.4.2 Análisis jerárquico de clusters - distancia angular

En esta sección se emplea un enfoque distinto para agrupar los iones detectados. A continuación se muestra la aplicación del método de análisis jerárquico de grupos o "*clusters*" para comparar los resultados con el método anterior.

El agrupamiento jerárquico es un método de análisis de grupos que busca construir una jerarquía de grupos para decidir cuantas categorías existen, que componentes deberían ser considerados dentro de una misma categoría y cuales corresponden a categorías distintas. Esto se logra mediante el uso de una medida apropiada (medida adecuada de similitud o disimilitud entre pares de observaciones), y un criterio de enlace que especifica la disimilitud de conjuntos como una función de las distancias dos a dos entre observaciones en los conjuntos. Existen dos grandes grupos de medidas de similitud para variables continuas. Uno de ellos se basa en la medición de la distancia Euclídeana entre dos objetos en el espacio multidimensional para verificar la cercanía entre vectores. El otro grupo se basa en medidas de distancia angular para comparar entre las proporciones de los elementos que componen los vectores. La distancia angular entre objetos es el ángulo que existe en el espacio multidimensional entre dos objetos cualesquiera ^[10].

Luego los resultados se suelen presentar en un dendrograma o representación grafica en forma de árbol que organiza los datos en subcategorías ^[10]. Este tipo de representación permite analizar claramente las relaciones de agrupamiento entre los componentes e incluso entre grupos distintos.

Debido a que se desea agrupar los elementos en función de la forma del perfil de intensidad de la señal, la distancia euclidianas clásica no es una medida de similitud adecuada ya que agrupará en función de la intensidad promedio de las señales en lugar de agrupar por la forma. Para lograr esto se decidió aplicar una medida de las proporciones de la señal, como por ejemplo la distancia angular. La ecuación 4.2 muestra como se calcula esta distancia, donde d_{st} es la distancia angular.

$$d_{st} = 1 - \frac{X_i Y_i'}{\sqrt{(X_i X_i') (Y_i Y_i')}} \quad [\text{Ec. 4.2}]$$

La Figura 4.9 muestra el dendrograma obtenido para todas las señales detectadas en la muestra. Si bien es empírico, puede observarse que si se establece un límite de distancia en 0,2, se logra una división en tres grupos constituidos por los mismos componentes que los que se obtuvieron en el análisis mediante la matriz de correlación.

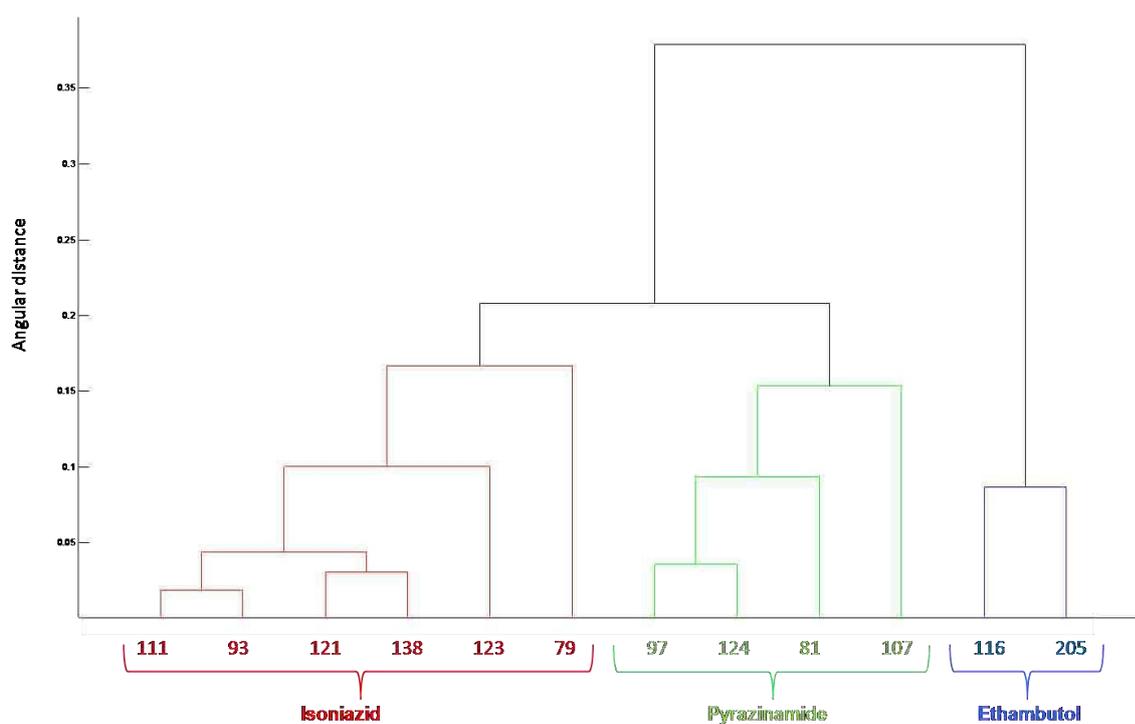


Figura 4.9.- Dendrograma obtenido utilizando la distancia angular como medida de similitud entre el perfil de los iones detectados.

4.5 Análisis de la fragmentación de los compuestos

Una vez obtenidos los iones que componen un mismo grupo, y ya que se conoce a que compuesto pertenece cada grupo, se decidió estudiar la fragmentación de

los analitos. La Figura 4.10 muestra la interpretación estructural del patrón de fragmentaciones obtenido para cada uno de los compuestos, lo cual justifica las agrupaciones que se realizaron mediante los métodos estadísticos de manera independiente.

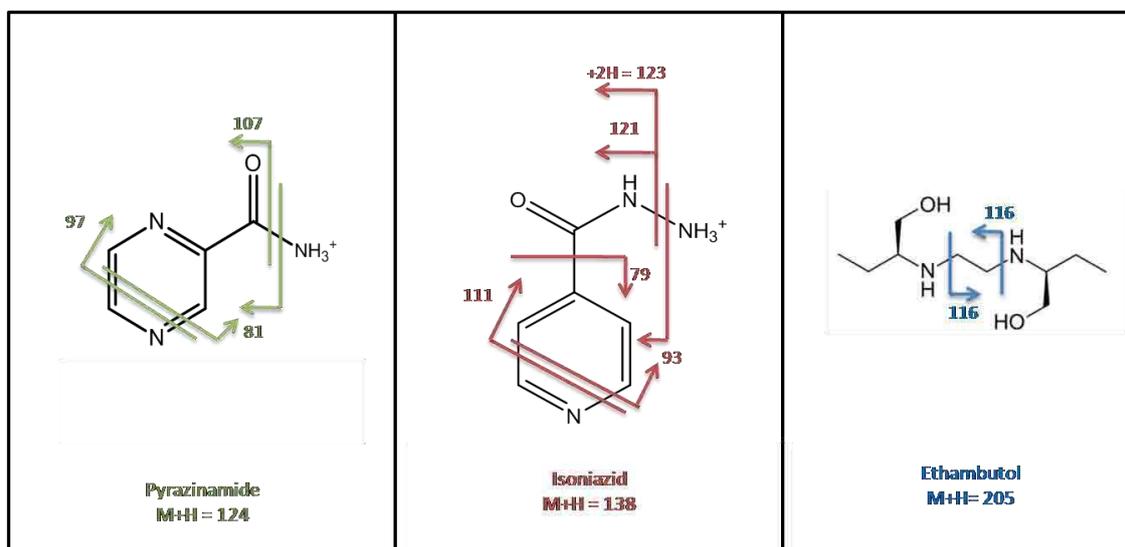


Figure 4.10: Patrón de fragmentación detectado para la pyrazinamide, isoniazid y ethambutol.

4.6 - Materiales y métodos

4.6.1 - Instrumentación

Una fuente de DART (IonSense) fue acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolo- tiempo de vuelo (micro TOF Q-II, Bruker) usando un tubo separador gas-ión (gas ion separator tube - GIST, IonSense). Se utilizó una cámara termográfica (Thermocam T400series, FLIR) para la obtención de las imágenes térmicas del sistema. Sobre una plataforma motorizada de microscopio (OptiScan II, Prior Scientific), se montó un brazo de aluminio que sostiene al capilar en la región de ionización. De esta manera, mediante la programación de la plataforma, se pudo controlar el movimiento y la velocidad de la muestra dentro del gradiente de temperatura. La comparación de los perfiles de las señales de los iones fue realizado utilizando MATLAB 8.0.

4.6.2 - Procedimiento para la introducción dinámica de muestras

El procedimiento consiste en colocar la muestra pulverizada en la punta de un capilar de vidrio, y luego moverlo en el espacio entre la fuente de DART y la entrada al espectrómetro de masas para poder aprovechar el gradiente térmico generado en esta zona, y de esta forma producir una desorción diferencial de los distintos compuestos que tienen presiones de vapor distintas a diferentes temperaturas.

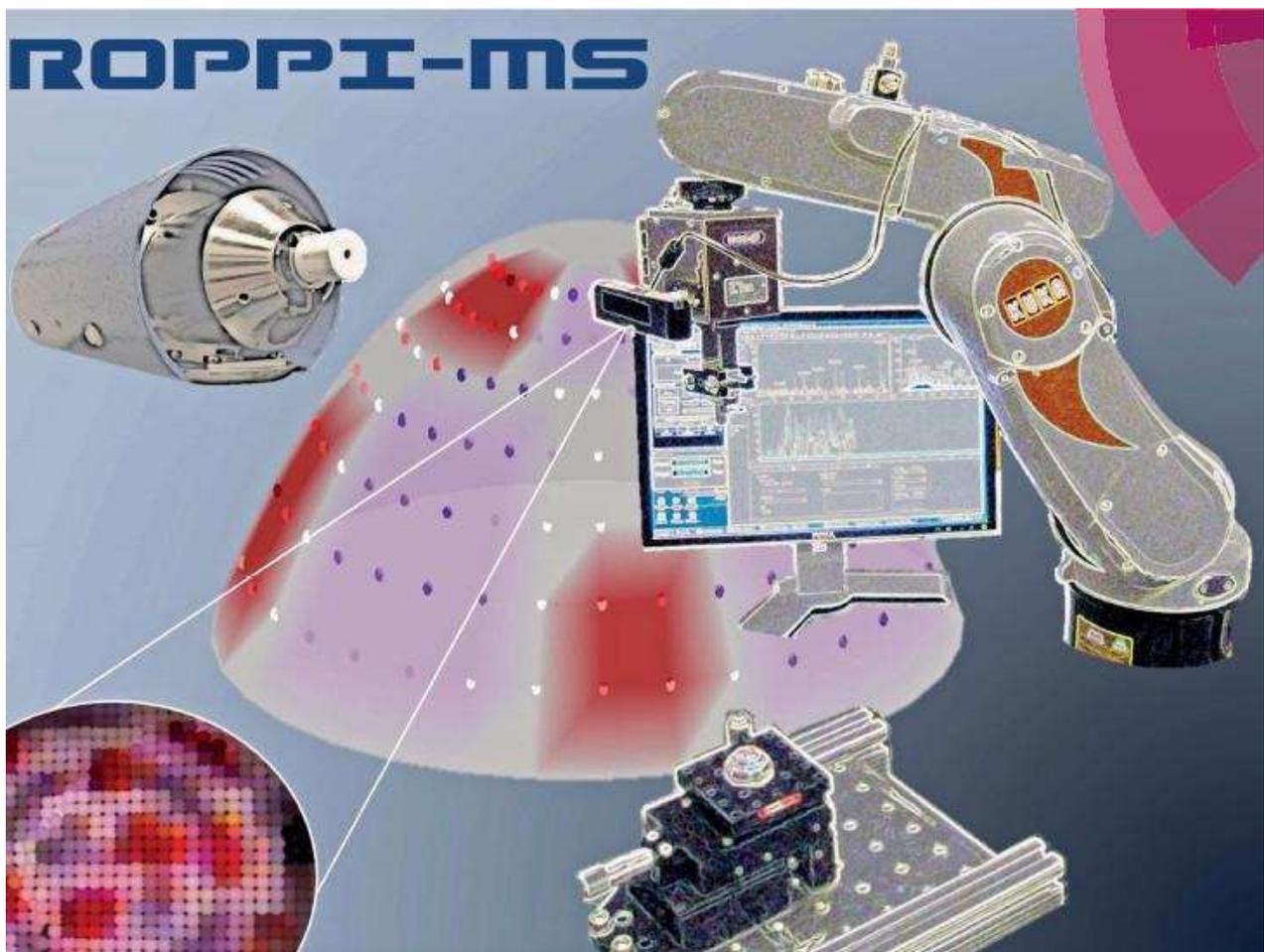
En la Figura 4.2 mostrada más arriba, se representa un diagrama del diseño experimental, utilizando el calentador de la fuente de plasma a 400 °C.

4.7 Bibliografía

- [1] G. a Harris, L. Nyadong, F. M. Fernandez, *Analyst* **2008**, *133*, 1297–301.
- [2] M.-Z. Huang, S.-C. Cheng, Y.-T. Cho, J. Shiea, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *702*, 1–15.
- [3] G. a Harris, L. Nyadong, F. M. Fernandez, *Analyst* **2008**, *133*, 1297–301.
- [4] G. a Harris, D. M. Hostetler, C. Y. Hampton, F. M. Fernández, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 855–63.
- [5] J. L. Easter, R. R. Steiner, *Forensic Sci. Int.* **2014**, *240*, 9–20.
- [6] C. Y. Pierce, J. R. Barr, R. B. Cody, R. F. Massung, A. R. Woolfitt, H. Moura, H. a Thompson, F. M. Fernandez, *Chem. Commun. (Camb)*. **2007**, 807–9.
- [7] J. H. Gross, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406*, 63–80.
- [8] E. Mongefacundo, M. F. Mari, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2015**, *23*, 153–61.
- [9] G. a Harris, C. E. Falcone, F. M. Fernández, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 153–61.
- [10] Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A By D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, and J. Smeyers-Verbeke. Data Handling in Science and Technology Volume 20A. Elsevier: Amsterdam, 1997.

Capítulo 5

“Generación de imágenes moleculares de superficies no planas mediante sonda robótica acoplada a ionización por plasma”



“Any sufficiently advanced technology is indistinguishable from magic.”

— Arthur C. Clarke, *Profiles of the Future: An Inquiry Into the Limits of the Possible*

5.1 - Introducción

Con el desarrollo de las técnicas de ionización a presión atmosférica [1-2], la generación de imágenes moleculares por espectrometría de masas (MSI) ha evolucionado como una poderosa herramienta de análisis de superficies. Durante un experimento de MSI, los datos de espectros de masas son adquiridos en función del tiempo mientras que la información espacial también se registra en forma sincronizada. Entonces, mediante el dominio del tiempo, la información espectral es correlacionada con la posición espacial para crear una imagen química al nivel molecular.

La resolución obtenida para datos de MSI es generalmente determinada por el tamaño del haz que impacta sobre la superficie (por ejemplo el enfoque del láser, la pluma del aerosol, el haz de iones, etc.). La información espacial más específica se puede obtener con resolución espacial muy alta, pero con el costo de un detrimento en la sensibilidad. Esto se debe a que una menor área muestreada implica una menor cantidad de material desorbido y detectado.

Las técnicas de ionización al vacío como desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) [3], o espectrometría de masas por ión secundario (SIMS) [4] proveen imágenes de alta resolución espacial (10 μm o 100 nm, respectivamente), pero requieren que las muestras sean planas, delgadas y compatibles con el vacío del espectrómetro. Los métodos de MSI a presión atmosférica son menos restrictivos por el tamaño y la forma de la muestra, y al mismo tiempo reducen las etapas previas de preparación de la muestra. Estas últimas incluyen técnicas basadas en micro-extracción líquido-sólido seguidas por ionización por electrospray como en el caso de "*desorption electrospray ionization*" (DESI) [5-6], y "*liquid microjunction surface sampling probe*" (LMJ-SSP) [7]. La técnica de ablación láser puede ser acoplada a varias fuentes para la generación de imágenes, como en "*laser ablation*

Capítulo 5: Generación de imágenes moleculares de superficies no planas mediante sonda robótica acoplada a ionización por plasma

electrospray ionization" (LAESI) [8], o *"infrared laser ablation metastable induced chemical ionization"* (IR-LAMICI) [9], entre otros [2].

Alternativamente, el muestreo de una superficie puede ser desacoplado del evento de ionización mediante el uso de una pequeña sonda, como una aguja sólida utilizada en *"probe electrospray ionization"* (PESI) [10-11] en el cual se basa el siguiente trabajo.

La información de MSI se adquiere típicamente para muestras planas bidimensionales, debido a la necesidad de consistencia de la geometría de la interacción superficie-sonda. El análisis por MSI de objetos más complejos puede ser realizado de una de las siguientes maneras: (1) imágenes 2D de serie de secciones de la muestra seguida por una representación en computadora de una imagen 3D o (2) imágenes seriadas de capas superficiales.

En este trabajo, se presenta un sistema robotizado de introducción / ionización de muestras para espectrometría de masas (MS), para la obtención de imágenes de superficies no planas de muestras sin procesar, in situ y a presión atmosférica. El sistema funciona mediante el sondeo de la superficie de la muestra con una aguja de acupuntura, seguido de ionización química por plasma acoplada a un espectrómetro de masas por tiempo-de-vuelo (TOF).

DART fue seleccionado como fuente de ionización por su capacidad de ionizar tanto analitos polares como no polares y por su región de ionización relativamente amplia [12-15]. El gran espectro de analitos ionizables y la implementación de una sonda robótica que permite el muestreo remoto, amplían las posibles aplicaciones de esta novedosa técnica de análisis de superficies. Por ejemplo, este sistema sería propicio para el análisis en tiempo real de metabolitos en muestras biológicas, como en el caso del análisis de tejido durante una cirugía para diferenciar regiones sanas de regiones tumorales, dada la naturaleza poco invasiva de la aguja de acupuntura utilizada como sonda.

Otra ventaja del acoplamiento de la sonda robótica a una fuente de ionización DART, es que la muestra no necesita contener una cierta cantidad de agua u otro fluido

para la ionización efectiva debido a los mecanismos de ionización inherentes de las metodologías basadas en plasma [16-19], como si es el caso del PESI.

5.2 - Generación de imágenes 3D de superficie no plana

La Figura 5.1 muestra un esquema del procedimiento de análisis propuesto. En la posición inicial, el brazo robótico que sostiene una aguja de acupuntura maniobra para introducirla en una posición precisa de la superficie de la muestra, que está montada fuera de la región de ionización. Entonces, se colecta una pequeña cantidad de analito. La aguja es luego posicionada en la zona de ionización a la salida del caudal de gas ionizante que sale de la fuente de DART. La intensidad de un ión seleccionado puede observarse para cada uno de los pasos del análisis descrito. Como es de esperarse, se observa una variación de la señal sólo cuando la sonda se posiciona en la zona de ionización, registrando el espectro de masas como se muestra en la Figura 5.2. Luego, como se representa en la dicha figura, se muestrean diversos sitios sobre la superficie analizada, y el espectro de masas adquirido es correlacionado con la posición (x, y, z) del muestreo. Finalmente, de acuerdo a la intensidad del ión analizado, se utiliza una escala de colores para graficar la imagen química obtenida. Denominaremos a esta metodología espectrometría de masas por sonda robótica acoplada a ionización por plasma del inglés "*robotic plasma probe ionization mass spectrometry*" (ROPPI-MS).

En los primeros "sets" de experimentos se utilizó el brazo robótico Lynxmotion AL5A-5. Este robot posee cinco grados de libertad de movimiento, pero al ser un modelo poco sofisticado, presenta una precisión de 5 mm. Por ello, se intentó minimizar los grados de libertad utilizados para reducir la influencia de varios de los motores y así incrementar la precisión. Entonces, usando solo dos grados de libertad se mejoró la precisión a 3 mm. Con este sistema, la muestra se montó sobre una plataforma que se mueve con tornillos micrométricos en 3 ejes con 0,01 mm de precisión cada uno, para controlar la posición de muestreo. Entonces, el robot fue programado para muestrear una única coordenada x, y, z específica, ortogonal a la plataforma, y luego la plataforma se movió mediante tornillos micrométricos para que nuevas regiones puedan ser muestreadas. El control manual de la

Capítulo 5: Generación de imágenes moleculares de superficies no planas mediante sonda robótica acoplada a ionización por plasma

plataforma permite una programación más simple del robot, ya que debe repetir una misma secuencia de movimiento. Para este “set” de experimentos, se utilizó como muestra de prueba una hemiesfera de poliestireno (13 mm de diámetro, Figura 5.2) pintada con rodamina 6G (m/z 443,2335) y Azul Nilo (m/z 318,3645) en tres filas de ocho bloques equiespaciados.

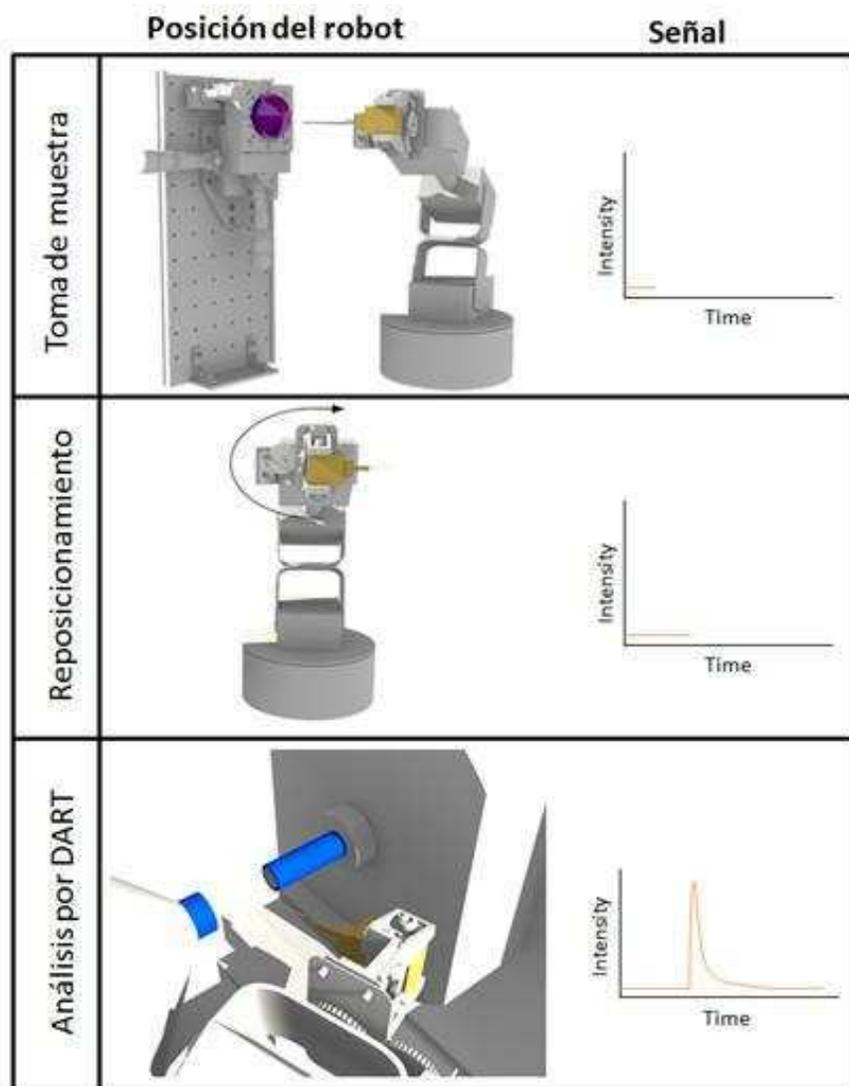


Figura 5.1.- Esquema de movimiento del brazo robótico Lynxmotion AL5A-5 y el cronograma obtenido para el ión de m/z 443 cuando el robot se encuentra en distintas posiciones.

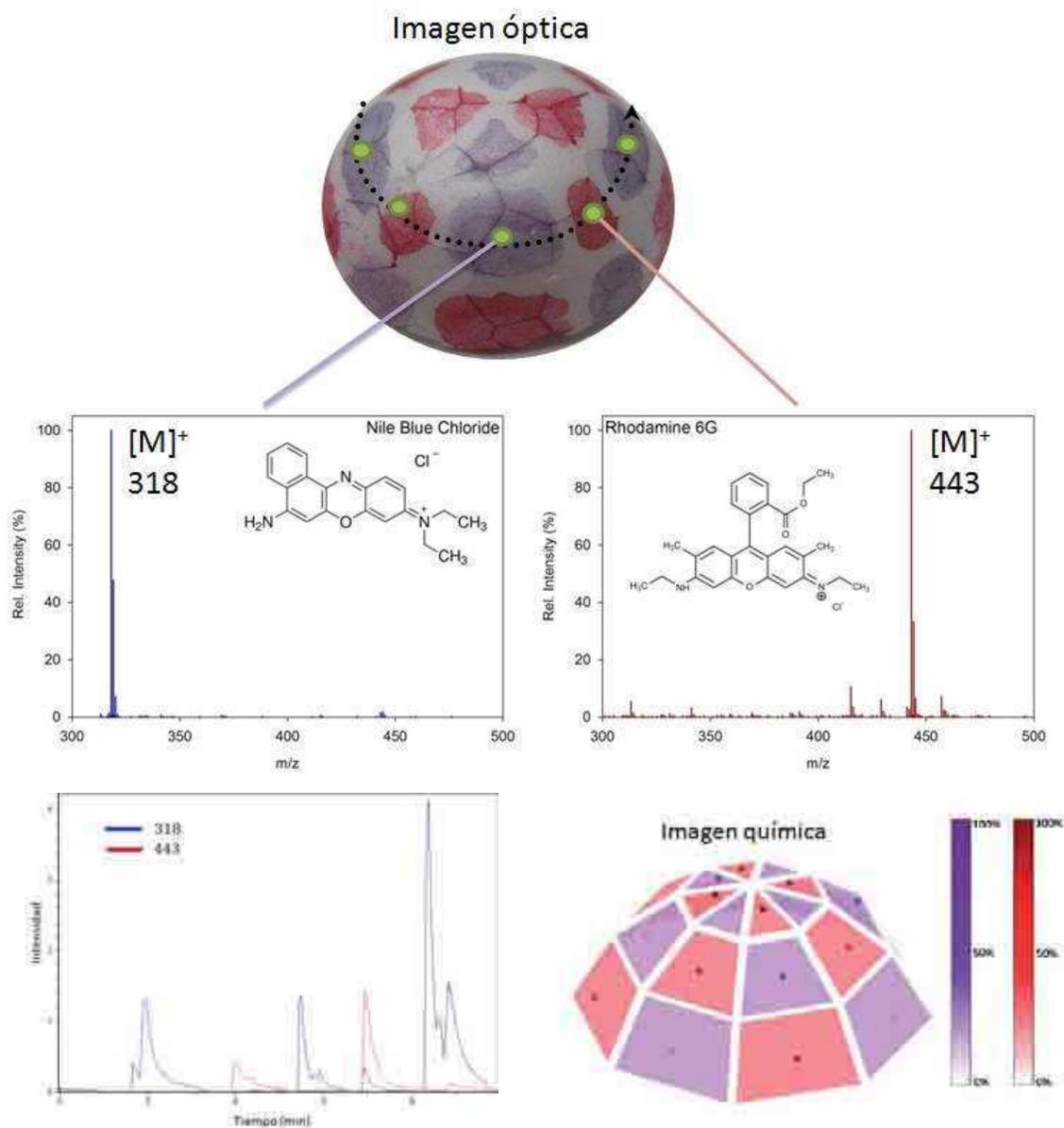


Figura 5.2.- Esquema de obtención de la imagen química. Arriba: imagen óptica de la muestra con distintos sitios de muestreo (círculos verdes). Las flechas muestran los espectros adquiridos en dos sitios ejemplo y la estructura del colorante detectado. Abajo se observan los cronogramas obtenidos para el Azul Nilo a ($m/z = 318$) y rodamina 6G ($m/z = 443$). Abajo a la derecha se muestra la imagen química generada. Los puntos marcan los sitios muestreados cuyo color depende de la intensidad de la señal detectada.

En escala de rojo para la Rodamina 6 G y azul para el Azul Nilo.

Debido a que el área muestreada por la aguja de acupuntura (180 μm) es más pequeña que el espaciado entre sitios muestreados (>3 mm), en la Figura 5.2, la señal observada fue graficada en círculos cuyo diámetro refleja la precisión del muestreo, y cuyo color está relacionado con la intensidad detectada en ese punto. Para simplificar la visualización de los distintos colorantes, se graficaron los resultados en escalas de color separadas, la escala púrpura denota la intensidad para el colorante Azul Nilo y la escala roja corresponde a la rodamina 6G. Estos puntos son superpuestos mostrando la distribución teórica del colorante sobre la superficie.

El tiempo total de análisis por ROPPI-MS depende de tres factores: la velocidad del robot, el número de posiciones muestreadas, y el tiempo de desorción/ionización de los analitos en la superficie de la aguja.

La velocidad de movimiento es una variable que depende del robot utilizado. Cuanto más sofisticado sea el brazo robótico utilizado se podrán alcanzar velocidades superiores con la misma precisión espacial. Utilizando un robot comercial como el que se mostrará en la siguiente sección, y posicionando la muestra cercana a la zona de ionización de manera que el movimiento del brazo robótico no sea demasiado extenso, se puede lograr que este factor contribuya muy poco al tiempo total del análisis.

El número de posiciones muestreadas dependerá de la resolución que se quiera alcanzar. La resolución aumenta cuanto mayor sea la cantidad de puntos muestreados homogéneamente distribuidos sobre una misma superficie, hasta que la distancia entre puntos sea igual a la precisión espacial del robot. Es decir, que es posible incrementar la resolución máxima alcanzada mediante el uso de un dispositivo robótico de mayor precisión espacial. Sin embargo, esto es cierto hasta un punto, el límite teórico para la resolución máxima alcanzada depende del tamaño de la punta de la aguja de acupuntura.

Por último, el tiempo de desorción/ionización dependerá de las propiedades fisicoquímicas de los analitos, y es el paso más lento del análisis (en el orden de los minutos). Por lo tanto, este paso es la variable limitante de la velocidad ya que es necesario

esperar hasta que la señal vuelva a línea de base para asegurar que no existe contaminación entre sitios muestreados. La duración de este paso puede ser optimizada variando la temperatura del caudal de gas proveniente del DART para inducir una desorción más rápida del material depositado en la aguja de acupuntura.

Para optimizar la temperatura del DART, una superficie de poliestireno plana fue coloreada con un marcador negro. La superficie fue muestreada robóticamente y la señal del pico base (m/z 303,4819) fue registrada en diferentes posiciones en la región de ionización, y utilizando varias temperaturas del DART entre 200°C y 400°C. La sensibilidad máxima se observó cuando la punta de la aguja se colocó a 1 mm de la salida de gases de la fuente de DART. Esto se debe a que, como se mostró en el capítulo anterior, esta es la región más caliente del caudal de gas, aumentando la presión de vapor de los analitos, y habilita una desorción más rápida resultando en señales más intensas y angostas. Por otro lado, en la Figura 5.3 se muestran los perfiles de intensidad del pico base a distintas temperaturas. Ciertamente, como se observa en esta figura, la señal analítica más alta se observó a 400°C con una fragmentación por inducción térmica despreciable. Entonces, se eligió 400°C como la temperatura de operación del calentador del DART, ya que habilita una sensibilidad mayor y una frecuencia de análisis superior.

En un experimento de DART-MS típico se utilizan temperaturas menores que las óptimas desarrolladas en este método. Esto se puede atribuir a que en un experimento típico se suele utilizar un capilar de vidrio porque mantiene la temperatura en la punta del capilar (donde se localiza la muestra) eficientemente. Pero la conductividad térmica del acero inoxidable de la aguja de acupuntura es quince veces más alta que el vidrio ^[20], lo que resulta en una disipación de calor más rápida a lo largo de la aguja, produciendo entonces una vaporización menos efectiva de los analitos depositados en la punta de la aguja.

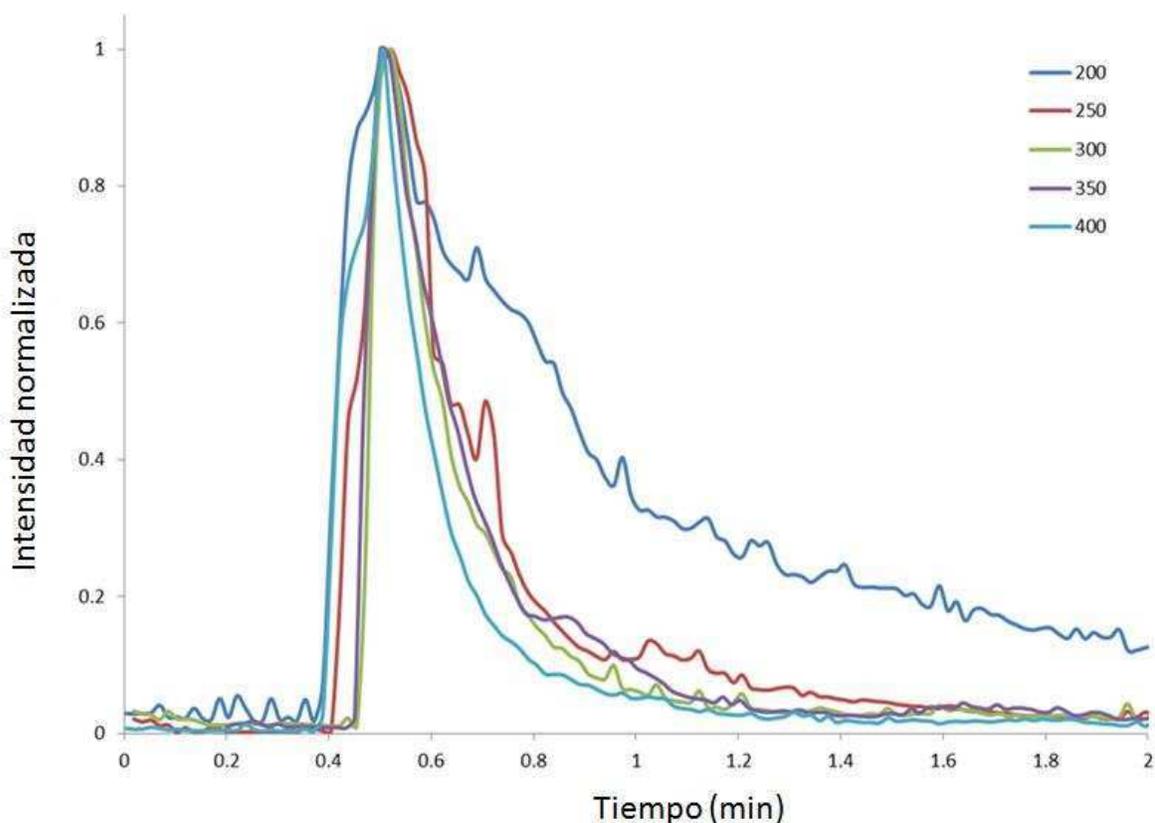


Figura 5.3.- Intensidad normalizada (dividida por la intensidad máxima registrada) para la señal obtenida del pico base detectado en el marcador negro utilizado a diferentes temperaturas de trabajo entre 200 °C y 400 °C.

La secuencia de movimiento se inicia manualmente para cada posición muestreada cuando la señal de todos los iones vuelve a línea de base, indicando que se desorbieron completamente todos los componentes y garantizando que no se contaminarán otros sitios de análisis.

El límite teórico de resolución espacial de esta técnica es determinado por el diámetro de la sonda de muestreo, que en el caso de la aguja de acupuntura es 180 μm . Sin embargo, el brazo robótico Lynxmotion es el limitante de la resolución espacial debido a su baja precisión. Por esta razón, los experimentos preliminares fueron realizados

muestreando sólo un punto por cada bloque pintado con colorante (Figura 5.2), introduciendo la punta de la aguja 2 mm dentro de la superficie de poliestireno. Este “*set up*” experimental representa una simple prueba de principios que ofrece una sensibilidad suficiente para el análisis, pero con grandes limitaciones en la resolución espacial.

5.3 - Imagen de muestra real

En esta sección se analizará una muestra de tomate cherry que fue pintado en dos regiones distintas con isoproturon como se muestra en la Figura 5.4. El isoproturon es un herbicida selectivo utilizado para el control de pasto y malezas de hoja ancha en cultivos alimenticios.

Debido a que la plataforma utilizada se mueve con tornillos micrométricos que tienen 13 mm de recorrido total en los ejes x , y o z , sólo es posible analizar superficies de dimensiones menores al recorrido. Pero el tomate cherry utilizado como muestra tiene 2,9 cm de largo y 1,6cm de ancho. Para poder analizar esta muestra se dividió al tomate en cuatro cuadrantes y cada uno de ellos fue muestreado en seis puntos (ver Figura 5.4).

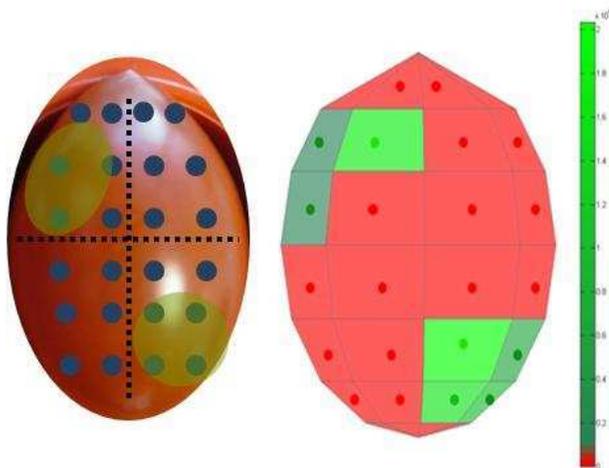


Figura 5.4.- A la izquierda: Imagen óptica de la muestra de tomate cherry, con la división en cuadrantes imaginarios (línea punteada negra), los sitios de muestreo (puntos azules), y los sitios con isoproturon impregnado (manchas amarillas). A la derecha: Imagen química

de la superficie del tomate generada para el ion principal de isotroturon ($[M+H]^+= 207$). Con los puntos de los sitios de muestreo en escala de color según la intensidad de la señal.

En la Figura 5.4 se muestra la imagen óptica del tomate utilizado como muestra, la separación de los cuadrantes imaginarios, con una representación de los sitios muestreados y de las gotas de isotroturon depositadas sobre su superficie. Sobre el lado derecho de la misma figura se muestra la imagen química obtenida para el isotroturon en la que puede observarse la correcta identificación de los sitios marcados. Puede notarse que, mediante esta metodología de generar cuadrantes imaginarios que permitan subdividir la superficie total de la muestra en secciones más pequeñas que las posibilidades de la plataforma, es posible analizar superficies más extensas y complejas mediante esta metodología simple aunque las imágenes sigan siendo de una resolución pobre.

5.4 - Obtención de imágenes de mayor resolución

Siguiendo estos experimentos iniciales, y con la finalidad de aumentar la resolución espacial de las imágenes obtenidas, se implementó el brazo robótico Kuka KR5 sixx R650 que se muestra en la Figura 5.5. Este robot de alta precisión presenta seis grados de libertad, un mayor rango de movimiento (650 mm) para permitir el análisis de muestras más grandes sin necesidad de la implementación de cuadrantes, y una precisión de 0,02 mm. Se programó este brazo robótico para muestrear la superficie con un procedimiento análogo al de las secciones anteriores pero sin la necesidad de mover manualmente la plataforma, haciendo el análisis mucho más rápido y automático.

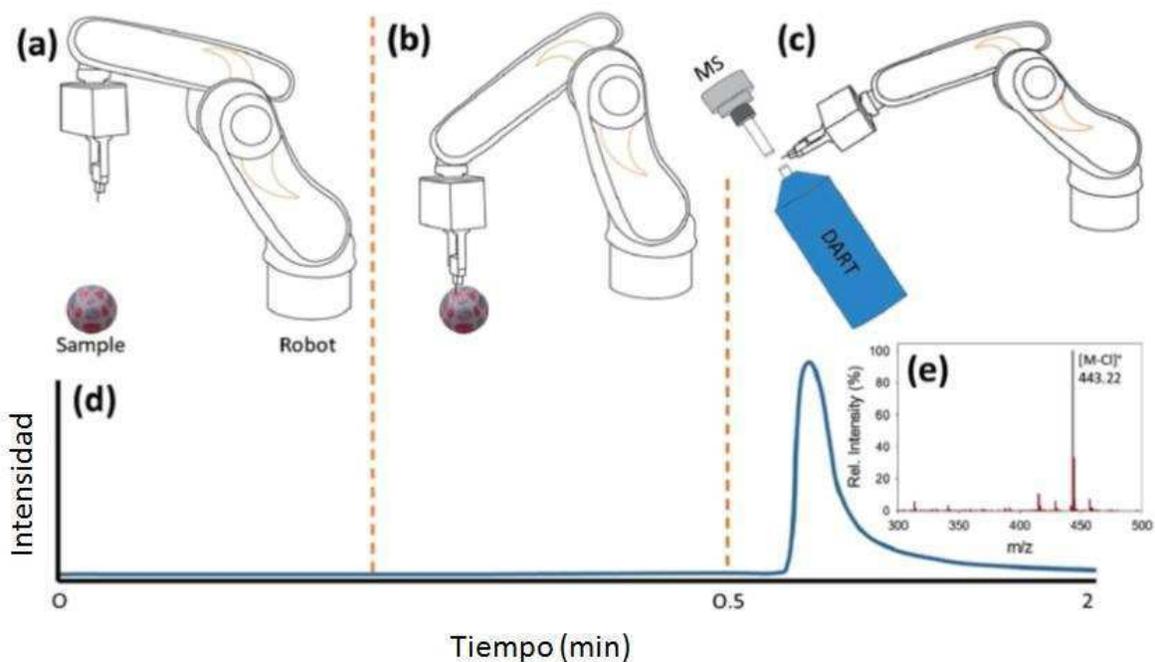


Figura 5.5.- Esquema de movimiento del brazo robótico Kuka KR5 sixx R650 y el cronograma obtenido para el ión de m/z 443 cuando el robot se encuentra en distintas posiciones.

Como complemento, para permitir seleccionar posiciones de muestreo de manera más automática al mismo tiempo que se mejora la repetitividad del posicionamiento del robot, este sistema robótico se acopló con un sistema de visualización 3D de la superficie que fue montado sobre el brazo robótico (Figura 5.6). Este tipo de censado novedoso se logra utilizando una cámara tipo RGB-D, que suplementa una imagen de cámara color con información de la profundidad de localización del pixel detectado mediante una cámara infrarroja, es decir, que no solo registra las dos dimensiones típicas de una cámara sino que además es capaz de capturar la profundidad. Este tipo de sistema de visualización se utiliza ampliamente en el contexto de la robótica ya que aporta un sistema de referencia para facilitar la programación y asegurar la precisión de los movimientos del robot, y además genera una nube de puntos de donde la sonda recogerá la muestra.

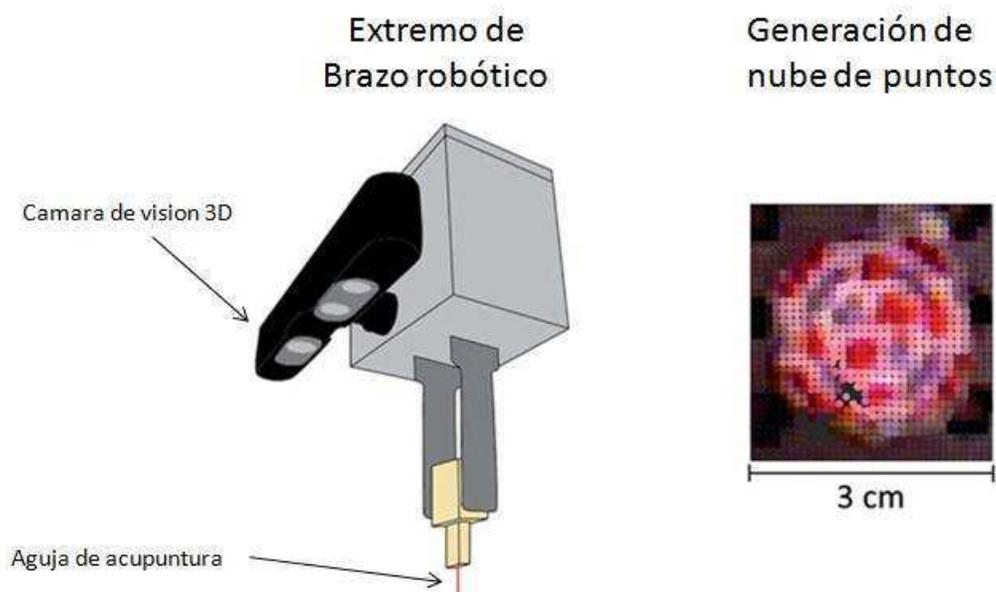


Figura 5.6.- A la izquierda: Esquema del extremo del brazo robótico con la cámara de visión 3D (negro) y la aguja de acupuntura (rojo). A la derecha: generación de nube de sitios de muestreo sobre la muestra.

Luego de ser adquiridos, los espectros de masas son convertidos en una superficie en 3D integrando el área del pico obtenido para cada sitio muestreado y asociándolo con las coordenadas x , y , z . Esta información es luego graficada con Matlab y se muestran los sitios muestreados con puntos sobre la superficie obteniéndose la Figura 5.7.

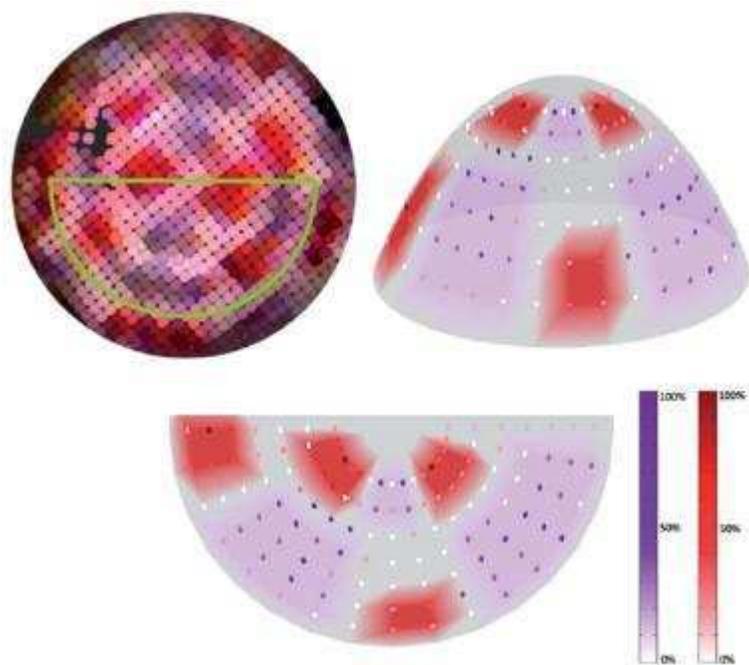


Figura 5.7.- Arriba a la izquierda se muestra la nube de sitios de muestreo 3D sobre la superficie de poliestireno pintado. A la derecha y abajo: vista lateral y superior de imágenes químicas generadas con el robot Kuka KR5 sixx R650

Aunque el brazo robótico tenga una precisión de 0,02 mm, que representa la máxima resolución espacial alcanzable por esta técnica, la resolución de la imagen 3D adquirida con el sistema de visualización de la muestra admite puntos separados por 1mm de distancia entre ellos.

Utilizando el sistema de visualización 3D, las nuevas coordenadas x, y, z son especificadas para cada secuencia de análisis para que el robot muestree la siguiente posición automáticamente. Esto elimina la necesidad del ajuste manual que era necesario en los experimentos anteriores debido a que el robot actual es capaz de producir movimientos complejos y precisos utilizando una programación más avanzada. A pesar de las múltiples ventajas del brazo robótico y de la sofisticación del sistema de visualización, el

sensor 3D está limitado en la resolución de la dimensión de profundidad z (1 mm en la configuración óptima). Esto resulta en una generación de sitios de muestreo imprecisos, particularmente en los límites de la muestra.

Además, como la aguja penetra la muestra siempre ortogonal a la plataforma que la soporta, se generan diversos ángulos de contacto entre la sonda y la muestra dependiendo de su geometría, resultando en un muestreo poco reproducible.

Este nuevo “*set*” de experimentos de muestreos en 3D fue realizado sobre una hemiesfera de poliestireno de 30 mm de diámetro que fue pintada con los mismos colorantes. La vista superior a través del sistema de visión 3D y el área muestreada se muestran en la Figura 5.7, respectivamente. La superficie se analizó mediante 128 sitios de muestreo homogéneamente distribuidos que fueron graficados en Matlab siguiendo el procedimiento descrito en la sección anterior, resultando en la Figura 5.7. La variabilidad en la intensidad detectada dentro de una misma región pintada, se atribuye principalmente a que el colorante se encuentra inhomogéneamente distribuido. Por otro lado, la detección del colorante por fuera del área intencionalmente pintada, se atribuye al sangrado de la solución del colorante a lo largo de las grietas del poliestireno.

5.5 - Materiales y métodos

Una fuente DART (Ion Sense, modelo SVP100) acoplado a un espectrómetro de masas Q-TOF (Bruker micrOTOF-QII) se utilizó para todas las mediciones en modo de iones positivos utilizando He como gas de soporte (1 L min^{-1}).

La temperatura del gas conjunto DART fue variada entre 200°C y 400°C para determinar los efectos de la temperatura de la forma de la traza de iones. El voltaje de la aguja de la fuente de DART para producir la descarga luminiscente “*glow discharge*” se fijó a -3500 V.

Se utilizaron agujas de acupuntura de acero inoxidable Millenia (0,18 mm x 13 mm) para el muestreo de superficie montándolas sobre un bloque de PEEK hecho a medida, que fue fuertemente sostenido por la pinza del robot.

La puesta a punto de los primeros experimentos se realizó con un brazo robótico Lynxmotion AL5A (Swanton, VT, EE.UU.) con 5 grados de libertad. El alcance del brazo fue de 14,60 cm y 113,40 g de capacidad de levantamiento. Sólo el servo de la “muñeca” y los actuadores de base fueron utilizados a fin de maximizar la precisión. El robot fue movido manualmente a posición inicial, muestreo y análisis almacenados en un programa de trazado de movimiento (Lynxmotion RIOS SSC-32V1.06). Esta secuencia fue repetida para cada posición de muestreo. Para la toma de muestras y análisis de posiciones, la muestra se movió manualmente usando el 3-axis RollerBlock (Thorlabs, Newton NJ) que tiene 13mm de recorrido total en el eje x, y o z.

El segundo manipulador utilizado fue un robot KUKA KR5 sixx R650 (Shelby Township, MI, EE.UU.), una plataforma orientada hacia manufactura ligera y tareas industriales. Cuenta con 6 grados de la libertad con un alcance máximo de 650 mm, una carga útil de 5 kg, y una velocidad máxima de $7,6 \text{ m s}^{-1}$. El control de movimiento del robot fue programado mediante un sistema operativo personalizado conocido como “*robot operating system*” (ROS) con una interfaz con el controlador de KUKA.

Se realizó la percepción del robot utilizando un sensor 3D de corto alcance PrimeSense (San Jose, CA, EE.UU.) Carmine 1.09 montado en el efector final del robot, justo por encima de la plataforma de muestreo, calibrado al marco de referencia del robot, y el paquete software Point Nube Library (PCL). Utilizando técnicas de visión por computador, la biblioteca toma datos desde el sensor y crea una nube de puntos 3D del medio ambiente.

El software de visualización rviz (también disponible en ROS) se utilizó para visualizar puntos de muestreo sobre la superficie y así proporcionar una interfaz para el operador humano que especifique la ubicación en la que el robot muestree. Luego, el área

del pico fue extraída del cronograma de iones, todas las imágenes fueron procesadas en Matlab 8.0® (Mathworks, Natick, MA, EE.UU.).

5.6 – Bibliografía

- [1] M. E. Monge, G. A. Harris, P. Dwivedi and F. M. Fernández, *Chem. Rev.*, 2013, 113, 2269–2308.
- [2] C. Wu, A. L. Dill, L. S. Eberlin, R. G. Cooks and D. R. Ifa, *Mass Spectrom. Rev.*, 2013, 32, 218–243.
- [3] R.M. Caprioli, T. B. Farmer and J. Gile, *Anal. Chem.*, 1997, 69, 4751–4760.
- [4] M. L. Pacholski and N. Winograd, *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2977–3006.
- [5] G. J. Van Berkel and V. Kertesz, *Anal. Chem.*, 2006, 78, 4938–4944.
- [6] J. M. Wiseman, D. R. Ifa, Q. Song and R. G. Cooks, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, 45, 7188–7192.
- [7] G. J. Van Berkel, V. Kertesz, K. A. Koeplinger, M. Vavrek and A.-N. T. Kong, *J. Mass Spectrom.*, 2008, 43, 500–508.
- [8] P. Nemes, A. A. Barton, Y. Li and A. Vertes, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 4575–4582.
- [9] A. S. Galhena, G. A. Harris, L. Nyadong, K. K. Murray and F. M. Fernández, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 2178–2181.
- [10] K. Hiraoka, K. Nishidate, K. Mori, D. Asakawa and S. Suzuki, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007, 21, 3139–3144.
- [11] L. C. Chen, K. Yoshimura, Z. Yu, R. Iwata, H. Ito, H. Suzuki, K. Mori, O. Ariyada, S. Takeda, T. Kubota and K. Hiraoka, *J. Mass Spectrom.*, 2009, 44, 1469–1477.
- [12] E. H. Seeley and R. M. Caprioli, *Anal. Chem.*, 2012, 84, 2105–2110.

- [13] A. C. Crecelius, D. S. Cornett, R. M. Caprioli, B. Williams, B. M. Dawant and B. Bodenheimer, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2005, 16, 1093–1099.
- [14] J. S. Fletcher, N. P. Lockyer, S. Vaidyanathan and J. C. Vickerman, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 2199–2206.
- [15] P. Nemes, A. A. Barton and A. Vertes, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 6668–6675.
- [16] L. S. Eberlin, D. R. Ifa, C. Wu and R. G. Cooks, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, 49, 873–876.
- [17] R. B. Cody, J. A. Laramée and H. D. Durst, *Anal. Chem.*, 2005, 77, 2297–2302.
- [18] R. B. Cody, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 1101–1107.
- [19] G. A. Harris and F. M. Fernández, *Anal. Chem.*, 2009, 81, 322– 329.
- [20] *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 62nd edn, 1981.

Conclusiones



“But I don’t want to go among mad people,” Alice remarked.
“Oh, you can’t help that,” said the Cat: “we’re all mad here. I’m mad. You’re mad.”
“How do you know I’m mad?” said Alice.
“You must be,” said the Cat, “or you wouldn’t have come here.”
— Lewis Carroll, *Alice in Wonderland*

6 - Conclusiones

En el presente trabajo de tesis, se elaboró por primera vez un modelo teórico de funcionamiento de la técnica de TS-FF-AAS. Utilizando tanto simulaciones computacionales como medidas experimentales se corroboró la validez de este modelo, ya que explica la forma de las curvas de absorbancia - caudal de muestra, puede explicar la distribución de temperatura observada sobre la superficie del atomizador a distintos caudales y predice la presencia de zonas de desolvatación y atomización preferencial que fueron encontradas mediante los experimentos de enfriamiento del atomizador. Este modelo aporta herramientas teóricas para la optimización de nuevos analitos por esta técnica.

Se demostró que cuando se utiliza cuarzo como material del atomizador, se amplifican las señales obtenidas respecto de los atomizadores tradicionales de níquel para los analitos más comúnmente utilizados en TS-FF-AAS, comprobándose entonces que la superficie interna del atomizador influye la sensibilidad analítica. Además, se mostraron los efectos de controlar la dispersión radial del vapor atómico utilizando celdas de atomización de menor diámetro interno. Mediante la utilización de estas herramientas se alcanzaron límites de detección comparables con los obtenidos en hornos de grafito cuando se las aplicó a la valoración de oro. También se implementó como prueba de concepto, un sistema de preconcentración por extracción en fase sólida en línea con detección por “*thermospray*”, mostrando una optimización del límite de detección pero con una disminución de la frecuencia analítica.

También se ha trabajado sobre el control del ambiente interno de la celda de atomización del “*thermospray*” con el objetivo de aumentar el número de analitos que puedan ser valorados por esta técnica. Se utilizó magnesio como analito testigo. La selección adecuada del solvente de la muestra –ajustado al “*carrier*”- y de la relación combustible/comburente de la llama, permitieron controlar el entorno redox en el seno de la celda, influenciando los mecanismos de atomización de magnesio. Estos estudios permitieron obtener una señal analítica para magnesio por la técnica de TS-FF-AAS que no ha sido informada en la literatura hasta el momento. Además, recurriendo a nuevas metodologías de diseño experimental exploradas en este trabajo de tesis (MBBD) y al desarrollo de redes neuronales artificiales, fue posible optimizar una superficie de respuesta compleja generada por las distintas variables operativas (estequiometría de llama, mezcla solvente, caudal de ingreso de muestra), con una mínima cantidad de experimentos.

Conclusiones

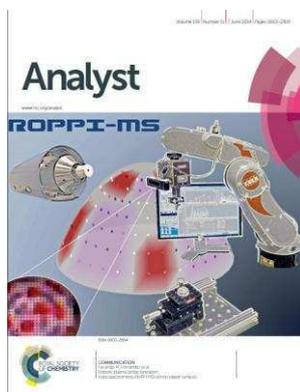
En los estudios dedicados a espectrometría de masas, se aprovechó el gradiente térmico generado por una fuente de ionización por plasma como lo es el DART-MS, y se desarrolló un sistema de introducción de muestras dinámico. Este método de introducción de muestras tiene la ventaja de poder agrupar, mediante métodos matemáticos, los iones provenientes de un mismo analito y así poder identificar rupturas y “*clusters*” relacionados. Esto no sólo simplifica la interpretación de un espectro de masas obtenido por DART, sino que también permite realizar análisis estructural sin la necesidad de un instrumento en tándem MS-MS.

Por último, se desarrolló un sistema para la generación de imágenes moleculares por espectrometría de masas a presión atmosférica que, a diferencia de todas las técnicas de MSI, permite el análisis de muestras con superficies de topologías complejas. A pesar de que las resoluciones mostradas no son comparables con las metodologías actuales, esta aproximación se presenta como prueba de principio. Sin embargo la resolución puede ser mejorada ya que el límite teórico de resolución viene dado por el tamaño de la aguja de acupuntura, que condiciona el tamaño del “*pixel*”.

Este trabajo de tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Publicaciones Científicas en revistas con referato:

1. Ezequiel M. Morzan, Ornela Piano, Jorge Stripeikis, Mabel Tudino “Evaluation of quartz tubes as atomization cells for gold determination by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry” *Spectrochimica Acta Part B* 77 (2012) 58–62.
2. Rachel V. Bennett, Ezequiel M. Morzan, Jacob O. Huckaby, Maria Eugenia Monge, Henrick I. Christensen, Facundo M. Fernandez “Robotic Plasma Probe Ambient Ionization Mass Spectrometry Imaging of Non-Planar Surfaces”. *Analyst*, 2014, 139 (11), 2658-2662.



3. Ezequiel M. Morzan, Jorge Stripeikis, Mabel Tudino “Towards broadening thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry: Influence of organic solvents on the analytical signal of magnesium” *Analytical Chemistry Research*, Volume 4, 2015, Pages 1–7.

Publicaciones en congresos:

1. Participación en el 6to congreso Argentino de Química Analítica realizado en Santa fe. Septiembre 2011. Presentando el trabajo “Determinación de magnesio por producción de aerosol térmico y espectrometría de absorción atómica con tubos montados en llama (TS-FFAAS): Estudio de la influencia del solvente sobre la sensibilidad analítica” En formato Poster Autores: Sara Gracia Lanás, Ezequiel Morzán, Ornela Piano, Jorge Stripeikis y Mabel Tudino
2. Participación en el 6to congreso Argentino de Química Analítica realizado en Santa fe. Septiembre 2011. Presentando el trabajo “Determinación de vestigios de oro: Diseño de un sistema en flujo con extracción en fase sólida (SPE) acoplado a espectrometría de absorción atómica con tubos de cuarzo en llama y

- producción de aerosol térmico (TS-QTFAAS)” en formato Oral. Autores: Morzán, Ezequiel; Piano, Ornela; Stripeikis, Jorge; Tudino, Mabel
3. Participación en 12th Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Septiembre 2012. Presentando el trabajo. “Determination of magnesium by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry: Influence of the solvent on the analytical sensitivity” En formato Poster Autores: Sara Gracia Lanas, Ezequiel Morzán, Ornela Piano, Jorge Stripeikis y Mabel Tudino
 4. Participación en 12th Rio Symposium on Atomic Spectrometry. Septiembre 2012. Presentando el trabajo. “Design of a flow system with solid phase extraction (SPE) coupled to thermospray quartz tube furnace atomic absorption spectrometry (TS-QTFAAS) for gold determination” En formato Poster Autores: Ezequiel Morzán, Ornela Piano, Jorge Stripeikis y Mabel Tudino
 5. Participación en American Society for Mass Spectrometry 2013. Realizado en Minneapolis, EEUU “Robotic plasma probe ionization mass spectrometry imaging of non-planar surfaces” Presentación en poster. Autores: Ezequiel M. Morzan, Rachel V. Bennett, Facundo M. Fernandez
 6. Participación en el 7mo congreso Argentino de química analítica. Octubre 2013 Presentando el trabajo “Introducción Dinámica de Muestras para DART-MS” Presentación Oral. Autores: Ezequiel M. Morzan, Rachel V. Bennett, Facundo M. Fernandez
 7. Participación en American Society for Mass Spectrometry 2014. Realizado en Baltimore, EEUU. Presentando el trabajo “Data-Independent Ion Correlations by Dynamic Sample Introduction Ambient MS” en formato oral. Autores: Ezequiel M. Morzan, Rachel V. Bennett, Facundo M. Fernandez

