



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Inorgánica y Analítica
Laboratorio de Química Vegetal

“Desarrollo de un método para la determinación directa de Pb mediante Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica (ETAAS) en suspensiones de pelo y uña (“slurries”) como biomarcadores de exposición”

MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE QUÍMICO

GABRIELA ANDREA VALDEBENITO ZENTENO

DIRECTOR DE TESIS

Dra. MARÍA E. BÁEZ CONTRERAS

PROFESOR PATROCINANTE

Dra. MARÍA E. BÁEZ CONTRERAS

Santiago 2008

*Dedicado a mis padres,
Eliana y Gabriel
Que siempre me han entregado
lo mejor en la vida.*

Agradecimientos

A mis maravillosos padres por enseñarme el valor de la perseverancia y el esfuerzo, y sobretodo por siempre apoyar todos mis sueños e ideales.

A mi familia, que siempre ha creído en mí y han estado conmigo a lo largo de toda mi vida.

A Claudio Araneda, por todo su amor, apoyo, paciencia y por ser la persona que complementa mi vida.

A Raúl Moscoso, Raúl Riveros y Catalina Páez por compartir los altos y bajos de esta vida universitaria y por esta amistad que espero dure para toda la vida.

A mis amigas Carla Criollo, Johanna Rojas y Karina Perez por compartir conmigo interminables sesiones de estudio y por siempre tener una palabra de apoyo y ánimo para seguir adelante.

A todos los que componen el Laboratorio de Química Vegetal, Germán Meneses, Adalí Quiñones, Paola Alvial, María Verónica Dias , Lizethly Cáceres, Jannette Espinoza, Edward Fuentes y Sra. Rosario, por hacer del laboratorio como un segundo hogar.

A mi profesora María E. Báez por enseñarme que la ciencia siempre va acompañada de una gran cuota de humanidad y que a pesar de las tribulaciones de la vida uno siempre debe tener fuerza para salir adelante.

Por último, a la Universidad de Chile por entregarme una educación de calidad que me da la seguridad necesaria para enfrentarme a la vida y al mundo.

Agradecemos al proyecto Memorias Facultad 2007 por financiar éste proyecto de Tesis y al Laboratorio de ADN y Genética molecular del Servicio Médico Legal por el uso de su equipamiento de laboratorio.

Resumen

El Plomo tiene efectos tóxicos sobre la salud del ser humano, principalmente asociados a encefalopatías, irritabilidad, enfermedades de riñón y alteraciones de las funciones reproductivas. El pelo y las uñas son matrices alternativas para realizar el monitoreo de éste metal y pueden ser usadas como un índice a la exposición medioambiental a este metal pesado.

En esta memoria de Título se desarrolló un método de determinación de Pb en muestras de pelo y uñas mediante el uso de la técnica de suspensiones (“slurries”) mediante Espectroscopía de Absorción Atómica con Horno de Grafito. Se estudiaron los parámetros que afectan la preparación de la suspensión e inyección de la muestra, entre éstos el efecto del tamaño de partículas, cantidad de μL de suspensión inyectada en la plataforma de L’Vov, la influencia de la agitación manual antes de la inyección y la cantidad de material usado para preparar ésta. Se encontró que la mejor suspensión se obtiene al usar partículas entre 38 y 45 μm de tamaño, que suspensiones preparadas con 20 mg de sólido en 5 mL finales es adecuada, que el volumen a inyectar sobre la plataforma no debe superar los 10 μL y que una agitación de la suspensión antes de cada medición es un paso necesario para la obtención de resultados reproducibles y que eviten desviaciones de la ley de Beer. Se aplicó un diseño experimental exploratorio 2^{6-2} para dilucidar los factores que ejercen un efecto significativo sobre la señal instrumental obtenida en soluciones acuosas y en suspensiones de las matrices pelo y uñas, teniendo en cuenta cinco variables que permiten describir dicha señal (área, altura, señal de *background*, ancho de *peak* y tiempo de aparición de la señal). Los factores estudiados fueron: Temperatura de carbonización, Temperatura de atomización, tipo y cantidad de modificador usado, cantidad de ácido dentro de la suspensión y cantidad de agente surfactante, encontrándose que las mejores condiciones para obtener la mejor señal analítica para ambas matrices eran el uso de Glicerol al 2% p/v como agente surfactante, 0,5% v/v de ácido nítrico, modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ al 2% v/v, temperatura de carbonización de 1000°C y 2200°C para la

temperatura de atomización. Para optimizar tres de los parámetros instrumentales se aplicó un diseño factorial total 3^3 usando soluciones acuosas donde se encontró que el uso de 0,2% v/v de HNO_3 , 900°C de temperatura de carbonización y 1800°C de atomización, son suficientes para obtener la mejor señal analítica. Sin embargo para las matrices se emplearon 1000 y 1800°C para completar la descomposición de la matriz y obtener una mejor forma de las señales analíticas. Todos los diseños multivariados fueron interpretados mediante ANOVA.

Con los parámetros optimizados, se realizó una curva de calibración acuosa desde donde se obtuvieron los parámetros de calidad analítica a del método instrumental. El modelo de regresión lineal para concentraciones entre 0 y $40 \mu\text{g/L}$ presentó un coeficiente de determinación de $0,9927$ con un valor LOQ de $8,14$ y LOD de $2,44 \mu\text{g/L}$, respectivamente.

Finalmente, una vez optimizados los factores significativos tanto para soluciones acuosas como para ambos tipos de matriz, se procedió a aplicar la metodología desarrollada en diez pares de muestras reales de pelo y uña preparadas como suspensiones y provenientes de voluntarios no expuestos a fuentes directas de Plomo. La cuantificación de Pb en ambas matrices se realizó mediante el método de adición estándar, luego de haber comprobado una leve interferencia de matriz especialmente en pelo, cuando se compararon las respectivas pendientes con aquella obtenida para la curva de calibración acuosa. Con dicho método de calibración, se obtuvieron coeficientes de determinación en la mayoría de los casos iguales o superiores a $0,99$ los que son adecuados para la determinación de elementos sub-traza en matrices complejas.

Summary

“Direct determination of Lead by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry in hair and fingernails slurries as exposition biomarkers “

Lead induces toxic effects on human's health, such as encephalopathies, behavior changes, kidney diseases and reproductive functions alterations. Hair and fingernails are alternative biomarkers for monitoring this particular heavy metal, and they can be used as an index of environmental exposure. In this study it was developed a Lead determination method in hair and fingernails samples by using the Slurry sampling technique for Atomic Absorption Spectrometry with Graphite Furnace.

The parameters that affect the slurry preparation, like size particle effect, slurry agitation, the amount of μL injected on the L'Vov platform and the amount of material to prepare the slurry, were studied.

According to the results, the best slurry is obtained by using particle sizes between 38 and 45 μm , slurries prepared with 20 mg of solid material in 5 ml of final volume, an injection of no more than 10 μL on the L'Vov platform with an agitation previous step immediately before every measure.

A screening factor design 2^{6-2} was applied in order to study the factors that have a significant effect on the instrumental signal for hair and fingernails samples, taking into account five variables that allow describing it, like area, peak height, background signal, broadening of the peak and the signal apparition time.

The carbonization and atomization temperatures, type and amount of modifier used, acid concentration in the slurry and type and amount of surfactant agent effects, were studied. The best slurry instrumental conditions were the use of Glicerol 2% w/v, 0,5% v/v of nitric acid, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2% v/v modifier, 1000°C and 2200°C of carbonization and atomization temperatures, respectively.

In order to optimize three instrumental parameters, a 3^3 total factorial design, was carried out using aqueous solutions, founding that the use of HNO_3 0,2% v/v, a carbonization temperature of 900°C and 1800°C for atomization, are the best conditions for obtaining the best analytical signal. However, for hair and fingernails samples, the use of 1000°C and 1800°C are better conditions for complete matrix decomposition and to achieve better signals shapes.

All these multivariate designs were interpreted by ANOVA.

With the optimum parameters, a calibration curve with aqueous solutions was carried out, obtaining the quality analytical parameters for the instrumental method. According to the lineal regression model, for concentrations between 0 and $40\ \mu\text{g/L}$, the determination coefficient was of 0,9927 and the LOQ and LOD values were 8,14 and $2,44\ \mu\text{g/L}$, respectively.

Finally, with the significant factors for aqueous solutions and for both matrixes, this method was applied to ten pairs of hair and fingernails slurry samples, from no exposed volunteers to direct sources of Lead.

The quantification of Lead in both matrixes was carried out by standard addition method, after having a slight matrix interference of hair when the slopes of aqueous solutions and hair regressions were compared. With this quantification method, good determination coefficients were obtain, all equal or higher than 0,99 values. In most cases these values were adequate for the measurement of sub trace elements in these complex matrixes.

Índice General

Resumen	ii
Summary	iv
Índice general	vi
Índice de tablas	viii
Índice de Figuras	ix
1. Introducción	1
2. Hipótesis	8
3. Objetivos	9
3.1 Objetivo General	9
3.2 Objetivos Específicos	9
4. Procedimiento Experimental	10
4.1 Materiales y Equipos	10
4.1.1 Materiales	10
4.1.2 Reactivos	10
4.1.3 Soluciones	10
4.1.4 Equipos	11
4.1.5 Equipos de uso General	11
4.1.6 Muestras	12
4.2 Métodos	12
4.2.1 Procedimiento General	12
4.2.2 Tratamiento de las Muestras	14
Lavado	14
Molienda	14
4.2.3 Parámetros Instrumentales	15
Efecto del Tamaño de Partículas	15
Mediciones de Repetibilidad	15
Modificadores de Matriz	16
Diseño Exploratorio Multivariado	16
Optimización del Método Instrumental	19
5. Resultados y Discusión	21
5.1 Efecto del Tamaño de Partículas	21
5.2 Estudios relacionados con el volumen inyectado, repetibilidad, cantidad de muestra en la suspensión y número de partículas inyectadas	23
5.3 Estudio de Modificadores	29
5.4 Resultados de Diseño Exploratorio Multivariado	33
5.5 Superficie de Respuesta	40

5.6 Resultados en Muestras Reales	46
6. Conclusiones	49
7. Bibliografía	51

Índice de Tablas

4.1	Programa de Temperaturas Horno de Grafito	13
4.2	Secuencia del Muestreador Automático	13
4.3	Diseño experimental exploratorio Factorial 2^{6-2} para solución acuosa	16
4.4	Matriz de Diseño Experimental para solución acuosa	17
4.5	Diseño Exploratorio para matrices Pelo y Uñas	18
4.6	Matriz de Diseño Experimental para Matrices Pelo y Uñas	18
4.7	Optimización en soluciones acuosa	19
4.8	Matriz de optimización para soluciones acuosa	19
5.1	Resultados de Área y Altura según tamaño de partículas	23
5.2	Número de partículas en 1 mg	28
5.3	Matriz de respuesta Soluciones acuosa	33
5.4	Factores significativos para Soluciones acuosa	33
5.5	Matriz de respuesta para matriz pelo	34
5.6	Factores significativos para matriz pelo	34
5.7	Matriz de respuesta para matriz uña	35
5.8	Factores significativos para matriz uña	35
5.9	Comparación de factores significativos entre soluciones acuosa, matriz pelo y matriz uña	38
5.10	Matriz de respuesta para la optimización en soluciones acuosa	41
5.11	Factores significativos de optimización para soluciones acuosa	41
5.12	Niveles Óptimos para soluciones acuosa	44
5.13	Parámetros de Calidad Analítica	45
5.14	Resultados en muestras reales de pelo y uñas	47
5.15	Concentraciones de Pb en muestras de pelo y uñas expresadas en μg por gramo de muestra	47

Índice de Figuras

5.1	Distribución de tamaño de partículas para pelo y uñas	22
5.2	Gráficos área y altura según μL inyectados sobre la plataforma	24
5.3	Mediciones de Repetibilidad en área usando 1% de Glicerol y 2% de Glicerol	25
5.4	Resultados en área y altura usando distintos tipos de suspensiones	26
5.5	Grafico Diámetro de partículas vs N° de partículas en por mg	28
5.6	Estudio de Modificadores en soluciones acuosas: Curvas de pirólisis, atomización y señales de <i>Background</i> para $25\mu\text{g/L}$ Pb	31
5.7	Curvas de pirólisis y atomización para matriz pelo y uñas con modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ y modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	32
5.8	Cartas Pareto con los efectos estandarizados para soluciones acuosas, matriz pelo y matriz uña	36
5.9	Gráfico correspondientes a las interacciones para altura, área y señal de <i>Background</i> ...	43
5.10	Curva calibración para las soluciones acuosas, usando valores de optimización	45
5.11	Curva calibración acuosa vs matriz uña y matriz pelo	46

1. Introducción

La industrialización, urbanización, operaciones a nivel de la industria minera y metalúrgica, el incremento del tráfico vehicular y el uso de fertilizantes y pesticidas en la agricultura han provocado un gran aumento en la contaminación del medioambiente por metales pesados tales como Cadmio, Mercurio y Plomo. Este último es de gran interés debido a que puede producir una gran variedad de efectos adversos en la salud tales como encefalopatías, irritabilidad, enfermedades de riñón y alteraciones a las funciones reproductivas, todas asociadas a niveles de exposición crónica bajos intermedios, debido a la ingesta de alimentos, agua y aire [1].

Así, no solo la población expuesta ocupacionalmente (población de alto riesgo) se verá afectada ya sea por intoxicación aguda y/o crónica, sino que también la población general será susceptible a exposición crónica de pequeñas dosis por largo tiempo. Existen escasos estudios en Chile respecto a niveles de exposición a plomo de la población. Motivo de estudio han sido las ciudades de Antofagasta, Arica y Santiago. A nivel internacional, los límites máximos para niveles de plomo en sangre han ido variando en función de los antecedentes anteriores. Desde 1991, se considera que niveles $> 10 \mu\text{g/dl}$ son riesgosos para la salud, recomendación válida para EEUU y para la Organización Mundial de la Salud. Un estudio realizado en Santiago reveló que un 6.4% de lactantes de 18 meses tiene niveles $> 10 \mu\text{g/dl}$, con un promedio de $5 \mu\text{g/dl}$; el mismo promedio en Estados Unidos en niños (1 -5 años) en 1994 era de $2.7 \mu\text{g/dl}$. En Antofagasta, se determinó una media geométrica de $8.7 \mu\text{g/dl}$ en niños expuestos y de $4.22 \mu\text{g/dl}$ en no expuestos, sin embargo un 47% de la población estudiada tenía niveles sobre $10 \mu\text{g/dl}$ [2].

La principal matriz para analizar la concentración de Plomo presente en el organismo es la sangre, pero su debilidad radica en su poca capacidad para diferenciar entre una exposición crónica de niveles bajos por largo tiempo de una exposición a niveles altos en un corto tiempo usando solo

una muestra de sangre, por lo que se necesitan varias mediciones para obtener una estimación de los efectos de éste metal sobre la salud. Esta dificultad en evaluar la naturaleza exacta de la exposición depende no solo de mejorar las técnicas analíticas actuales, sino que también pasa por comprender su compleja toxico-cinética dentro del cuerpo humano. Uno de los primeros estudios sobre este tema [3] estableció un modelo de tres compartimentos el que es reconocido en la literatura actual [4]. En el primero, el plomo ingerido o inhalado pasa al torrente sanguíneo y tiene una vida media de 35 días, desde éste se intercambia a los compartimientos contiguos y a la orina. El segundo corresponde al plomo que es transferido a los tejidos blandos teniendo como vía de excreción estructuras integumentarias (pelo, uñas, sudor) y pérdidas a través del tracto alimentario en fluidos tales como saliva, bilis, secreciones gástricas y pancreáticas. En este “pool” la vida media es de 40 días. El tercero corresponde al plomo que reside en el esqueleto el cual se mueve al torrente sanguíneo y puede permanecer en los huesos por más de 30 años. Así, el plomo es secretado del cuerpo en una pequeña cantidad, pero es su permanencia en el esqueleto que puede producir los efectos a largo o corto plazo cuando hay una exposición continua.

Es por este complejo modelo tri-compartimentado, donde el plomo circula entre la sangre, los huesos y los tejidos blandos, que la sangre no corresponde a un bio-marcador lo suficientemente sensible como para diferenciar entre los diferentes niveles de plomo a la cual un individuo pueda estar expuesto, por lo que existe hoy un renovado interés en la búsqueda de bio-marcadores alternativos entre éstos plasma, saliva, pelo, uñas, orina y huesos.

El pelo y las uñas, a diferencia de la sangre, permiten evaluar la exposición crónica o a lo largo plazo de un periodo determinado de tiempo, gracias a que tienen una tasa de crecimiento constante (0,1 mm. por día las uñas y entre 0,07 mm. a 0,1mm. por día el pelo) y porque son productos metabólicos finales capaces de incorporar varios elementos dentro de su estructura, a medida que van creciendo. Además, las ventajas de trabajar con este tipo de muestras son principalmente su fácil obtención, preservación y estabilidad luego de la recolección, se obtienen

mediante técnicas no invasivas y no constituyen un gran costo de transporte o almacenamiento. En estudios muy recientes se ha empleado uñas como bioindicador de exposición a plomo, encontrándose concentraciones altamente significativas según el hábito de fumar, la presencia de stress mental y dolor de pecho, además se establecieron diferencias al considerar distintos intervalos etarios [5]. También se han comparado las concentraciones en pelo y uña en poblaciones urbanas y rurales y según tipo de empleo, la presencia de hipertensión, diabetes y enfermedad coronaria, edad, sexo y hábito de fumar [6,7].

Tanto el pelo como las uñas están compuestos principalmente por queratina, una proteína fibrosa rica en azufre, que les confiere dureza y a su vez propiedades similares que llevan a pensar en su utilidad a la hora de usarlos como bio-marcadores [4]. Debido a que cada una de estas matrices crece a una razón constante, proveen una ventana de vigilancia mucho mayor (meses o semanas, dependiendo del largo), lo que permite establecer un calendario de la exposición retrospectivamente. En general, se puede decir que el mecanismo de incorporación de las sustancias químicas al pelo puede producirse desde la sangre hasta su raíz, desde el sudor y el sebo y desde al ambiente externo. Pero aun así el mecanismo exacto de incorporación es desconocido y solo se ha podido teorizar al respecto. La presencia de aminoácidos que contienen grupos sulfhidrilos, que pueden formar enlaces S-S entrecruzados para estabilizar la red proteica de la fibra, es mencionada como una posibilidad de unión [8], además de la gran afinidad que tienen los metales por los grupos sulfhidrilos de la queratina. Aun cuando hasta la fecha existan numerosos estudios donde se evalúa la confiabilidad de usar el pelo [9-14] y las uñas [7,15-17] como bio-marcadores útiles para medir la exposición a Plomo, todavía existe dentro de la comunidad científica el debate sobre sus limitaciones para diferenciar entre el contenido de plomo endógeno del contenido exógeno, así como también diferenciar la cantidad de plomo existente en diferentes poblaciones, dependiendo de la edad, sexo, color de pelo y hábitos de fumar.

Debido a que las uñas y el pelo son muestras sólidas es común que para la determinación analítica se utilice un pre-tratamiento de digestión ácida o alcalina [18], pero esta metodología presenta varias desventajas. Este tipo de digestiones y sobretodo en muestras biológicas, alargan el análisis, además de consumir grandes volúmenes de ácidos minerales. Generalmente, en las digestiones ácidas se usa ácido nítrico, con la desventaja de la formación de humos nitrosos, altamente carcinogénicos y con el riesgo a la vez de la pérdida del analito por volatilización y de producir contaminaciones por el alto grado de manipulación de la muestra.

El uso de suspensiones (“*slurries*”) es la alternativa para estudiar muestras sólidas, ya que no presentan las desventajas descritas anteriormente. Permiten la medición directa en sólidos mediante técnicas tales como fluorescencia de rayos X, emisión por llama o arco, plasma inductivamente acoplado y espectrometría de absorción atómica, además de combinar las cualidades de las muestras acuosas y sólidas, todas en una.

La evolución de la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica (ETAAS) mediante el uso de plataforma de L’Vov, modificadores de matriz y adecuado procesamiento de señales contribuye a las aplicaciones de rutina de esta alternativa de muestreo de sólidos. Entre sus cualidades se encuentran la posibilidad de diluir las suspensiones o de introducir pequeños volúmenes de muestra al Horno de Grafito, lo que permite la determinación de concentraciones altas de analito, la facilidad para adicionar modificadores de matriz y usar el método de adición estándar, la introducción misma de la muestra es fácil, comparada con la introducción directa de un sólido, la velocidad del análisis es la misma que para soluciones acuosas y es posible el análisis secuencial multi-elemental con la misma suspensión [19].

Al usar la metodología de muestras en suspensiones medidas por Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica o *Slurry Sampling* (SS-ETAAS) se deben considerar diversos factores, que influirán directamente en la calidad de la medición analítica [20]. Dentro de estos factores los más importantes son: tamaño de partículas usadas en la suspensión, medio líquido de

suspensión, agentes estabilizantes, sistema de homogeneización y el uso de modificadores de matriz adecuados. El tamaño de partículas es importante para asegurar la estabilidad y homogeneidad de la suspensión, además de afectar la exactitud y precisión de la medición analítica. En general, partículas desde 300 μm [21] hasta 50 μm [22] han sido usadas con buenos resultados, pero se recomienda el uso de partículas $<$ a 50 μm con una estrecha distribución, ya que al usar partículas de mayor tamaño puede resultar en un mayor deterioro del recubrimiento del horno, además de formar mas residuos carbonosos dentro de la plataforma de L'Vov. Por lo tanto, un paso de molienda y/o tamizado debe ser adoptado para la obtención adecuada del tamaño de partículas, teniendo siempre en cuenta la posible contaminación que resulta del contacto entre la muestra y el equipo de molienda y/o tamiz.

Con respecto al medio de suspensión, generalmente se usan medios ácidos y oxidantes, que ayudan a la extracción del analito desde la suspensión al medio, mejorando así la precisión. El ácido nítrico diluido es el más usado, ya que no solo presenta ventajas sobre el medio de suspensión, sino que también puede ser usado como modificador de matriz. En este caso, concentraciones entre 0,5%(v/v) y 2%(v/v) de ácido son aceptadas, para evitar la corrosión del tubo de grafito que puede suceder a concentraciones mas altas. Los agentes de estabilización, por otro lado ayudan a simplificar la preparación de suspensiones homogéneas, ya que mojan el material sólido, dispersando los aglomerados, evitando su precipitación y la necesidad de re-homogenización luego de cada medición. En el caso de matrices orgánicas, Glycerol [9] y Triton X-100 [23] son los más usados. Se debe tener especial cuidado en elegir la cantidad de agente adecuado, ya que una alta cantidad podría aumentar la señal del blanco, la señal de fondo o “*background*” y producir interferencias químicas. Los sistemas de homogeneización también son importantes para obtener una suspensión estable. La apropiada agitación de la suspensión antes de la medición asegura la representatividad del analito dentro de la suspensión inyectada, además de asegurar que una apropiada cantidad de partículas entren al horno de grafito. Un mínimo de 50 partículas de material

sólido deben ser inyectadas, [21] y esto dependerá principalmente de la homogeneidad del material, la distribución del analito en el sólido, su densidad, el tamaño de partículas y la distribución del analito en la suspensión. Otro hecho demostrado es que la homogeneidad de la suspensión estará relacionada principalmente con la cantidad de material usado para preparar la suspensión y así la precisión no estará relacionada con la cantidad de material inyectado en el horno de grafito [24]. La razón masa/volumen de la suspensión debe ser óptima para que se cumpla con la representatividad de la alícuota inyectada, especialmente si se emplea como técnica de extracción del analito en la misma suspensión. Sin embargo un incremento en la concentración de la muestra aumentará los efectos de matriz debido a la mayor cantidad de elementos concomitantes en el atomizador.

El uso de modificadores de matriz en el análisis de muestras de pelo para la determinación de Pb es fundamental debido a la gran cantidad que es introducida dentro del atomizador, lo que lleva al uso de temperaturas de pirólisis muy altas para poder carbonizar todo ese material, evitando la volatilización prematura del elemento. Los modificadores mas usados en este caso son Pd, Pd+Mg(NO₃)₂ y NH₄H₂PO₄ [9,12,14]. La eficiencia de estos modificadores de matriz dependerá de su mecanismo de acción, ya sea sobre el analito o sobre la matriz y del programa de temperaturas del horno de grafito en el que actúa. En el caso de las uñas, no existen referencias en la literatura donde se encuentre información sobre su comportamiento en suspensiones, pero se puede teorizar que al ser ambas de similar composición, las uñas deberían comportarse de igual manera frente a todos los factores mencionados anteriormente.

Aun cuando SS-ETAAS ha ido evolucionando a través del tiempo, la optimización de cada uno de los factores mencionados causa, en la mayoría de los casos, el aumento en el tiempo de desarrollo de la metodología, por lo que la aplicación de calibraciones multi-variadas mediante modelos estadísticos es una alternativa para optimizar en pocos experimentos los factores que realmente son significativos para la obtención de las mejores condiciones en las que se puede

realizar una medición. En la actualidad, el uso de modelos multi-variados aplicados a las mediciones en ETAAS es escaso y principalmente orientado a la investigación de errores sistemáticos producidos en este tipo de análisis [25] y al manejo de las interferencias espectrales y químicas producidas en el análisis de muestras sólidas [26].

En la presente memoria, se desarrolló una metodología para obtener suspensiones de pelo y uñas mediante el uso de métodos multi-variados para la realización de estudios exploratorios relacionados con los múltiples factores que pueden influir en la obtención de señales adecuadas en ETAAS para la determinación de Pb en pelo y uñas. De igual forma, atendiendo a los factores significativos encontrados se optimizaron éstos para la obtención de resultados que cumplan con los requisitos para determinaciones a niveles ultra-traza en que se encuentran este tipo de elementos en las matrices seleccionadas. Además se aplicó la metodología desarrollada en 10 muestras reales tanto de uña como de pelo, de personas no expuestas directamente a fuentes de plomo, lo que aportaría con datos recientes al estudio de la factibilidad del uso de pelo y uñas como biomarcadores de la exposición a plomo.

2. Hipótesis

El estudio y optimización sistemática mediante herramientas quimiométricas de los parámetros que influyen en la preparación de suspensiones de pelo y uña como también de los factores que influyen en la determinación instrumental de Pb en dichas matrices conducirá al desarrollo de un método que permita la obtención de límites de detección y cuantificación adecuados, como también de una exactitud y precisión acordes con la condición de elemento traza o subtraza de este elemento en matrices biológicas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Desarrollo de un método que permita la determinación de Plomo en muestras de pelo y uñas mediante Espectroscopia de absorción Atómica con Horno de Grafito empleando herramientas quimiométricas para la optimización de parámetros instrumentales.

2.2 Objetivos Específicos

- Definir la importancia del uso de la molienda criogénica en la obtención de suspensiones estables y reproducibles
- Desarrollar y optimizar un método de preparación de suspensiones de pelo y uña adecuado para la determinación de Pb mediante GFAAS.
- Definir las condiciones óptimas de secado, carbonización y atomización, como también el uso del mejor modificador de matriz en muestras reales para la determinación instrumental.
- Aplicar dicha metodología en un número limitado de muestras de pelo y uña provenientes de individuos pertenecientes a poblaciones con diferentes características, con fines de comparación.

4. Procedimiento Experimental

4.1 Materiales y Equipos

4.1.1 Materiales

- Micropipeta de desplazamiento de aire 200 μL -1000 μL Brand
- Micropipeta de desplazamiento de aire 10 μL -50 μL Brand
- Material de Vidrio de uso general y volumétrico clase A

4.1.2 Reactivos

- Ácido Nítrico 65%, PA Merck
- Acetona Grado Pesticida Fischer Scientific
- Nitrato de Magnesio Hexahidratado 99,995 + % Aldrich Chem.
- Paladio en polvo 99,999%, Aldrich
- Fosfato Ácido de Amonio Merck 0,0005% Pb
- Glicerol PA Winkler 0,00008% Pb
- Tritón X-100 Sigma
- Plomo Titrisol 1,000 g L^{-1} , Merck
- Argón 99,998% ($\text{H}_2\text{O} < 2 \text{ ppm}$, $\text{O}_2 < 2 \text{ ppm}$, $\text{N}_2 < 3 \text{ ppm}$) AGA
- Agua calidad Nanogrado

4.1.3 Soluciones

- Soluciones de Plomo. A partir de una solución Titrisol de 1.000 g L^{-1} se obtuvo por dilución con agua nanogrado una solución de 10 $\mu\text{g/mL}$. A partir de ésta solución se obtuvieron soluciones de calibración de 8, 16, 24, 32 y 40 $\mu\text{g/L}$.

- Solución de Fosfato Ácido de Amonio 4% p/v. Se pesó 4 g de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y se diluyó a 100 mL con agua calidad nanogrado. Con el fin de remover las trazas de plomo presentes en esta solución, se le agregó 0,1 mL de Tritón X-100 junto con 1 mL de Pirrolidinditiocarbamato de Amonio al 1% y se agitó en un embudo de decantación junto con 20 mL de Cloroformo, descartando la fase orgánica. De la solución resultante, se obtuvieron soluciones de 1% v/v y 2% v/v, diluyendo con agua nanogrado.
- Solución de Nitrato de Magnesio. Se pesaron 40 mg y 80 mg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ y se diluyó a 10 mL para obtener soluciones de 0,4% p/v y 0,8% p/v, respectivamente

4.1.4 Equipos

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer 1100 B, equipado con Horno de Grafito HG-700, Corrector de Fondo con lámpara de Deuterio, Muestreador Automático AS-70 y Impresora Epson LQ-570.
- Lámpara de cátodo hueco de Plomo Perkin Elmer
- Horno de Grafito Piroclítico con plataforma de L'VOV, Perkin Elmer (n° serie 112660).
- Molino Criogénico Spex modelo 6750

4.1.5 Equipos de Uso General

- Balanza Analítica 40SM – 200AS Precisa.
- Balanza 4000C Precisa.
- Equipo Purificador de Agua Nanopure Ultrapure Water System Barnstead.
- Batería de Tamices USA Standard Test Sieve 38 μM y 45 μM Gilson Company
- Medidor de Tamaño de partículas
- Ultrasonido Transsonic Digital Elma

4.1.6 Muestras

Para todos los estudios de optimización de parámetros instrumentales e interferencias de matriz, se utilizó un homogenizado de pelo y uñas, preparado en el momento, obtenido a partir de muestras de personas voluntarias. Las muestras de pelo y uñas fueron almacenadas a temperatura ambiente en sobres de papel. Para el estudio en muestras reales, se utilizaron muestras de pelo y uñas de 10 personas diferentes, no expuestas ocupacionalmente.

4.2 Métodos

4.2.1 Procedimiento General

Las muestras de pelo y uñas, una vez obtenidas, son sometidas a un riguroso proceso de lavado para eliminar la posible contaminación exógena que éstas pueden presentar. Luego, se las somete a un ciclo de molienda criogénica de aproximadamente 3 min, para ser tamizadas en tamices de acero inoxidable desde donde solo se ocupa la fracción de 45 μM . Se pesan 20 mg de éste material sólido y se traspasa a un matraz volumétrico de 5mL, el cual es ajustado al volumen correspondiente con 4% p/v de glicerol y 0,5% v/v de HNO_3 . De ésta suspensión se extrae 1 mL a un vaso del muestreador automático, desde el cual se inyectan 10 μL de suspensión junto con 10 μL del modificador sobre la plataforma de L'Vov dentro el Horno de Grafito. El programa de temperaturas y la secuencia del muestreador automático se muestran en las tablas 4.1 y 4.2. En la tabla 4.1; las etapas 1 y 2 corresponden al secado de las muestra; la etapa 3 a la carbonización de la materia orgánica y volatilización de la matriz; la etapa 4 a la atomización del analito; la 5 a la limpieza de horno y la 6 a un enfriamiento previo a la siguiente inyección. Las señales fueron procesadas como unidades de área (A-s) con un período de integración de 5 s. El flujo de gas inerte fue cortado en la etapa de atomización, funcionando a 300 mL/min en las etapas previas y en la etapa de limpieza.

La longitud de onda utilizada fue 283.3 nm con un *slit* de 0,7 nm. La fuente de poder de la lámpara fue ajustada a 7 mV y las mediciones fueron realizadas con corrector de fondo (lámpara de deuterio) y en modo AA-BG.

Tabla 4.1 Programa de Temperaturas Horno de Grafito

Etapa	Temperatura Horno (C°)	Tiempo (s)		Flujo de Gas (mL min ⁻¹)	Ciclo de Lectura (s)
		Rampa	Hold		
1	100	10 ^a 10 ^b	30 ^a 10 ^b	300	-
2*	280	40	10	300	-
3	Variable	Variable	Variable	300	-
4	Variable	0	5	0	0.0
5	2500	2	3	300	-
6	30	2	3	300	-

* Esta etapa se adoptó solo para el programa de suspensiones

a) Programa de soluciones acuosas

b) Programa en suspensiones

Tabla 4.2 Secuencia del Muestreador Automático

Número de Inyecciones	1
Número de Pasos de Enjuague	1
Velocidad de succión	Lenta 70%
Velocidad de Pipeteo	Lenta 70%
Protocolo de Pipeteo	1: Enjuague
	2: Modificador
	3: Muestra
	4: Enjuague

4.2.2 Tratamiento de Muestras

- Lavado

Se cortaron aproximadamente 1 – 0,5 g de pelo y 60 mg de uñas con tijeras y cortaúñas de acero inoxidable, lavados previamente con acetona y agua nanogrado, para evitar contaminaciones. El pelo se lavó una vez con un surfactante no iónico Triton X-100 al 1%, luego con Acetona una vez, con agua nanogrado tres veces y finalmente con acetona una vez, para dejar secar por 1 hora a 50° C [27]. Las uñas fueron sometidas a un procedimiento estándar de lavado el cual consistió en un lavado en Triton X-100 1% sonicando por 20 min, luego un lavado con Acetona, con agua nanogrado tres veces y finalmente con acetona una vez, dejando secar a 50° C por 30 min.

- Molienda

La molienda de la muestras se realizó en un molino criogénico, el cual muele el material por impacto con barras magnéticas. El vial donde se depositan las muestras consiste de un tubo central de policarbonato, una barra magnética y dos terminales de acero inoxidable. La barra magnética es introducida dentro del tubo junto con una cantidad aproximada de 0,5 g de pelo o 50 mg de uñas. El ciclo de molienda consiste en una etapa de pre-enfriamiento donde el tubo es sumergido en nitrógeno líquido, para dar dureza a la muestra. Luego se aplica un campo magnético para que la barra alcance a la muestra a una alta velocidad, con una frecuencia de 20 impactos por segundo [28].

Tanto las uñas como el pelo fueron sometidas a un pre-enfriamiento de 1 min, el ciclo de molienda para las uñas fue de 2 min y para el pelo de 3 min. Las muestras fueron tamizadas en tamices de acero inoxidable para asegurar un tamaño de partículas menor a 50 µm.

4.2.3 Parámetros instrumentales

- Efecto del tamaño de partículas

En este estudio se evaluaron dos fracciones de tamaño de partículas, según la batería de tamices usados, la fracción entre 45 μm y 38 μm y la fracción de tamaño de partículas menor a 38 μm . Además, se analizaron las muestras sin tamizar, una vez salidas del molino, para evaluar la eficiencia de la molienda, debido a que el pelo no es una matriz frágil y tiene características diferentes a las uñas, por sobretodo con respecto a la estática que presenta. Es por esto que se estudiaron dos tiempos de molienda para esta matriz correspondientes a 2 y 3 min. Por otro lado, las uñas al tener mas dureza que la matriz pelo se muelen mas fácilmente, siendo suficientes 2 minutos para moler la totalidad del material.

Todos los resultados de tamaño de partículas fueron obtenidos mediante Difracción de Luz, que consiste en la irradiación un haz de luz láser que incide sobre las partículas dentro de la suspensión, las que difractarán la luz del láser, sobre un sistema de lentes receptoras en ángulos inversamente proporcionales al tamaño de partículas. La determinación del tamaño de la partícula se mide por integración de la dispersión debida a todas las partículas interpuestas en el camino del láser.

- Mediciones de Repetibilidad

Es importante estudiar los factores que pueden influir en la repetibilidad de las señales analíticas, tales como la cantidad de μL inyectados en la plataforma, la influencia de la agitación manual de la suspensión antes de la inyección dentro de la plataforma y la cantidad de material usado para realizar la suspensión.

Para evaluar la influencia de la cantidad de μL inyectados sobre la plataforma, se realizaron mediciones en duplicado inyectando 5, 10, 20 y 30 μL usando una suspensión de 80 mg para realizar el efecto de la cantidad de partículas inyectadas sobre las señales de área y la altura.

Con respecto a la influencia que tiene la agitación sobre la estabilidad y la homogeneidad, se realizaron seis mediciones con y sin agitación, medidos a diferentes concentraciones de agente surfactante.

- Modificadores de matriz

Se evaluaron distintos tipos de modificadores indicados para el análisis de plomo en matrices biológicas. Se evaluaron seis modificadores en total, de los cuales Pd + Mg(NO₃)₂, Pd, NH₄H₂PO₄ y Pd + NH₄H₂PO₄ son los mas usados. Además se analizó el modificador Mg(NO₃)₂ para evaluar su modo de acción individual sobre el analito y cuando actúa en conjunto con otro modificador. Por último, la mezcla NH₄H₂PO₄ + Mg(NO₃)₂ es una mezcla no usual para analizar Plomo, pero aun así se analizó su efectividad dentro del estudio. En estas mediciones se utilizó una solución acuosa de 20 µg/ L de Pb.

- Diseño Exploratorio Multivariado

Se evaluaron seis factores experimentales mediante un diseño factorial fraccionario (2⁶⁻²), para encontrar aquellos factores que afectan significativamente la respuesta instrumental en área y altura, ancho y tiempo de aparición del *peak* y la señal de “background”. En la tabla 4.3 se muestran los factores involucrados en éste diseño experimental y los valores correspondientes a cada nivel. La tabla 4.4 muestra la matriz de diseño experimental correspondiente a las soluciones acuosas.

Tabla 4.3 Diseño Experimental Exploratorio Factorial 2⁶⁻² para solución Acuosas

Factor	Nivel	
	-1	+1
Tipo de Modificador	NH ₄ H ₂ PO ₄ + Mg(NO ₃) ₂	NH ₄ H ₂ PO ₄
Tipo de Surfactante	Triton X-100	Glicerol
Concentración de Ácido	HNO ₃ 0,2%	HNO ₃ 0,5%
Temperatura de Carbonización	600°C	900°C
Temperatura de Atomización	1800°C	2200°C
Cantidad de Modificador	1% v/vNH ₄ H ₂ PO ₄ ; 1% v/vNH ₄ H ₂ PO ₄ + 0,4%p/v Mg(NO ₃) ₂	2% v/v NH ₄ H ₂ PO ₄ 2% v/vNH ₄ H ₂ PO ₄ + 0,8%p/v Mg(NO ₃) ₂

Tabla 4.4 Matriz de Diseño Experimental para solución Acuosa.

N° Experimento	Tipo de modificador	Tipo de surfactante	Cantidad de ácido	Temperatura de atomización	Temperatura de carbonización	Cantidad de modificador
1	1	1	-1	-1	-1	1
2	-1	-1	-1	-1	-1	-1
3	1	-1	-1	-1	1	-1
4	-1	1	1	1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	1	1
6	-1	1	-1	-1	1	1
7	1	1	1	1	1	1
8	1	1	-1	1	-1	-1
9	1	1	1	-1	1	-1
10	-1	-1	-1	1	-1	1
11	-1	1	-1	1	1	-1
12	1	-1	-1	1	1	1
13	1	-1	1	1	-1	-1
14	-1	-1	1	1	1	-1
15	1	-1	1	-1	-1	1
16	-1	1	1	-1	-1	-1
Repetición 2	-1	-1	-1	-1	-1	-1
Repetición 6	-1	1	-1	-1	1	1
Repetición 10	-1	-1	-1	1	-1	1
Repetición 15	1	-1	1	-1	-1	1

Este diseño fraccionario estudia el efecto de 6 factores en 16 experimentos, los cuales fueron medidos en un solo bloque. Éste tipo de diseño consta solo de dos grados de libertad para estimar el error experimental, por lo que las pruebas estadísticas podrían ser un tanto débiles.

Para solucionar esto, se aumentó el número experimentos repetidos a 4, correspondientes a los experimentos 2, 6, 10 y 15, para así llegar al cálculo del error experimental.

Este mismo diseño experimental fue aplicado a ambas matrices, habiendo elegido el surfactante con el diseño anterior y estudiándose la cantidad de éste.

En la tabla 4.5 y 4.6 se muestran los valores correspondientes a cada nivel con respecto a cada factor estudiado y la correspondiente matriz de diseño experimental, para ambas matrices respectivamente. En el caso de las matrices el cálculo del error experimental se realizó con los experimentos 2, 5, 6 y 10.

Tabla 4.5 Diseño Exploratorio para matrices Pelo y Uñas

Factor	Nivel	
	-1	+1
Tipo de Modificador	NH ₄ H ₂ PO ₄ + Mg(NO ₃) ₂	NH ₄ H ₂ PO ₄
Cantidad de Surfactante(% p/v)	Glicerol 1%	Glicerol 2%
Concentración de Ácido(% v/v)	HNO ₃ 0,2%	HNO ₃ 0,5%
Temperatura de Carbonización	600°C	1000°C
Temperatura de Atomización	1800°C	2200°C
Cantidad de Modificador	1% v/v NH ₄ H ₂ PO ₄ ; 1% v/v NH ₄ H ₂ PO ₄ + 0,4% p/v Mg(NO ₃) ₂	2% v/v NH ₄ H ₂ PO ₄ 2% v/v NH ₄ H ₂ PO ₄ + 0,8% p/v Mg(NO ₃) ₂

Tabla 4.6 Matriz de Diseño Experimental para Matrices Pelo y Uñas

Nº Experimento	Tipo de modificador	Cantidad de modificador	Cantidad de surfactante	Cantidad de Ácido	Temperatura de Atomización	Temperatura de Carbonización
1	1	-1	-1	-1	1	-1
2	1	-1	1	-1	-1	1
3	1	-1	1	1	-1	-1
4	1	1	1	-1	1	-1
5	-1	1	1	1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	-1
7	1	-1	-1	1	1	1
8	1	1	-1	-1	-1	1
9	1	1	1	1	1	1
10	-1	-1	-1	-1	-1	-1
11	-1	1	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	1	1	1	-1
13	-1	-1	-1	1	-1	1
14	-1	-1	1	-1	1	1
15	-1	1	-1	-1	1	1
16	-1	1	-1	1	1	-1
Repetición 2	1	-1	1	-1	-1	1
Repetición 5	-1	1	1	1	-1	1
Repetición 6	1	1	-1	1	-1	-1
Repetición 10	-1	-1	-1	-1	-1	-1

- Optimización del Método Instrumental.

Una vez identificados los factores significativos, se llevo a cabo una optimización instrumental mediante esta técnica, obteniéndose el modelo matemático que explica el sistema y los valores óptimos para cada factor de las soluciones acuosas. El diseño experimental seleccionado fue un diseño factorial total (3^3) compuesto por 31 experimentos incluyendo 4 puntos centrales. La tabla 4.7 muestra los valores de los niveles correspondientes a cada factor y la tabla 4.8 muestra la matriz del diseño experimental de optimización.

Tabla 4.7 Optimización en soluciones acuosas

Factor	Nivel		
	-1	0	1
Temperatura carbonización(°C)	700°	800°	900°
Temperatura atomización(°C)	1800°	2000°	2200°
Cantidad ácido (% v/v)	0,25	0,5	0,75

Tabla 4.8 Matriz de optimización para soluciones acuosas

N° Experimento	Temperatura Carbonización	Temperatura Atomización	Cantidad ácido	N° Experimento	Temperatura Carbonización	Temperatura Atomización	Cantidad ácido
1	1	1	1	17	-1	-1	-1
2	1	0	-1	18	1	1	-1
3	-1	1	-1	19	0	0	0
4	0	0	0	20	-1	0	-1
5	0	-1	-1	21	-1	-1	0
6	-1	0	0	22	-1	1	1
7	0	-1	1	23	0	1	0
8	1	-1	0	24	0	-1	0
9	0	0	-1	25	0	0	1
10	-1	0	1	26	1	0	1
11	1	1	0	27	0	0	0
12	-1	-1	1	28	0	0	0
13	1	-1	1	29	0	0	0
14	1	-1	-1	30	-1	1	0
15	0	1	1	31	0	1	-1
16	1	0	0				

Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Centurión XV para el análisis de datos.

Las mediciones correspondientes tanto al diseño experimental exploratorio como a los de optimización para las soluciones acuosas, fueron realizadas con una solución de $32 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb.

Para el diseño experimental en matrices se utilizaron suspensiones de 20 mg donde se extrajo 1 mL de la suspensión resultante al vaso del muestreador automático.

Las matrices no fueron contaminadas con Pb, tomando en cuenta el contenido de plomo intrínseco de las muestras.

5. Resultados y Discusión

5.1 Efecto del tamaño de partículas

Las ventajas de usar una molienda criogénica en éste tipo de técnica son principalmente su rapidez y eficiencia en trabajar con muestras biológicas, además de evitar la contaminación que puede ser provocada cuando la muestra entra en contacto con otros sistemas de molienda tales como morteros, molinos de zirconio, planetarios o de centrífuga, donde puede suceder además de una gran contaminación, un gran pérdida de la muestra.

Varios trabajos han tenido éxito en emplear una molienda criogénica, obteniendo resultados muy favorables en cuanto al tamaño de partículas alcanzado [12, 23, 28, 29].

En este estudio se evaluó la eficiencia de la molienda, midiendo el tamaño promedio de las partículas de pelo y uñas luego del proceso de molienda. Con respecto a la media del tamaño de partículas, esta fue de 48,4 μm para pelo y de 22,2 μm para uñas, aun cuando en pelo se aleja con respecto a la distribución normal. La figura 5.1 muestra la distribución del tamaño de partículas con respecto a la frecuencia. Para analizar lo anterior se calcularon los valores *Skewness* (grado de asimetría) y de *Curtosis*, que caracteriza la elevación o el achatamiento relativo de una distribución comparada con la distribución normal. Para el grado de asimetría los valores calculados fueron para pelo 3,027 y para uñas 0,4975 encontrándose una distribución sesgada levemente hacia la derecha en el segundo caso. Al calcular la *Curtosis* el valor para uñas fue -1,24 y para pelo 9,26. El primer caso corresponde a una curva platicúrtica, y el segundo caso a una curva leptocúrtica. El comportamiento normal exige que la *curtosis* sea igual a 0. En el caso del pelo, con un valor positivo y mayor, presenta una distribución infrecuente hacia los mayores tamaños de partícula, lo que conduce a mayores valores de varianza. De todas formas de los datos obtenidos se puede deducir que el tamaño de partícula en uña, valores superiores a 100 μm son muy infrecuentes (por ello no fueron considerados en el cálculo de los valores anteriores) y de los resultados obtenidos un

90 % se encuentra en tamaños inferiores a 65,56 μm en cambio para pelo un 70 % se encuentra en tamaños inferiores a 83.

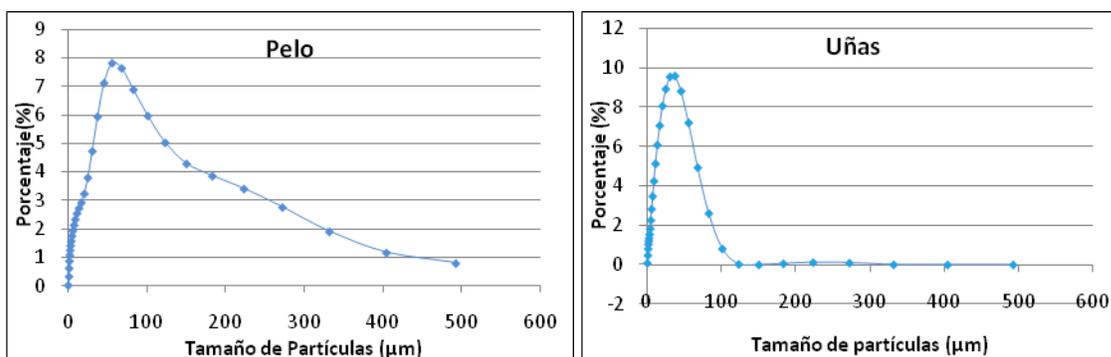


Figura 5.1 Distribución de tamaño de partículas para a) pelo y b) uñas a 2y 3 min de molienda, respectivamente.

En cuanto a la diferencia en el tiempo de molienda de 2 y 3 min para la matriz pelo, los resultados obtenidos no fueron significativamente desiguales. Para una molienda de 2 min la media del tamaño de partículas fue de 31,47 μm y para los 3 min fue de 35,86 μm . Por lo tanto como sus promedios son similares, se eligió la molienda de 3 min como la más adecuada para ser aplicada a la matriz pelo.

Después de analizar los tamaños de partículas promedio para ambas matrices, se procedió a separar mediante tamizado dos fracciones de partículas entre los 45 μm y 38 μm y partículas menores a 38 μm .

El tamaño de partículas dentro de la suspensión es un factor importante ya que va ligado a la homogeneidad y estabilidad de la suspensión, así como también a la repetibilidad y reproducibilidad de las señales analíticas.

En la tabla 4.1 se muestran los resultados de los estudios de la influencia del tamaño de partículas sobre las señales de área y altura.

Tabla 5.1 Resultados de Área y Altura según tamaño de partículas

	Promedio Área	RSD %
Uñas 45 μm -38 μm	0.113	2.65
Uñas menor que 38 μm	0.476	3.56
Pelo 45 μm -38 μm	0.046	9.88
Pelo menor que 38 μm	0.53	4.13
	Promedio Altura	RSD %
Uñas 45 μm -38 μm	0.374	2.56
Uñas menor que 38 μm	1.482	3.52
Pelo 45 μm -38 μm	0.169	16.82
Pelo menor que 38 μm	1.619	5.08

Si bien la fracción de 38 μm da los mejores promedios en área para ambas matrices, hay que notar que los promedios de altura son muy superiores a lo esperado. Esto podría deberse a que al ser partículas de menor tamaño, al momento de producirse la inyección, entra una gran cantidad de pequeñas partículas de material a la plataforma dentro del horno de grafito, dando mayores valores con respecto a la altura de las señales. Es por esta razón que para la preparación de la suspensión se usó solo partículas entre los 45 y 38 μm , las que dan promedios de área y altura dentro de los valores correspondientes a la ley de Beer.

5.2 Estudios relacionados con el volumen inyectado, repetibilidad, cantidad de muestra en la suspensión y número de partículas inyectadas

En la figura 5.2 a y b se muestran los resultados para el estudio de la cantidad de μL inyectados sobre la plataforma. Las mediciones se realizaron con una suspensión en matriz pelo ya que la finalidad de estos análisis es medir el comportamiento de la suspensión en general dentro del horno de Grafito y de igual manera el comportamiento del inyector, utilizándose la fracción 38-45.

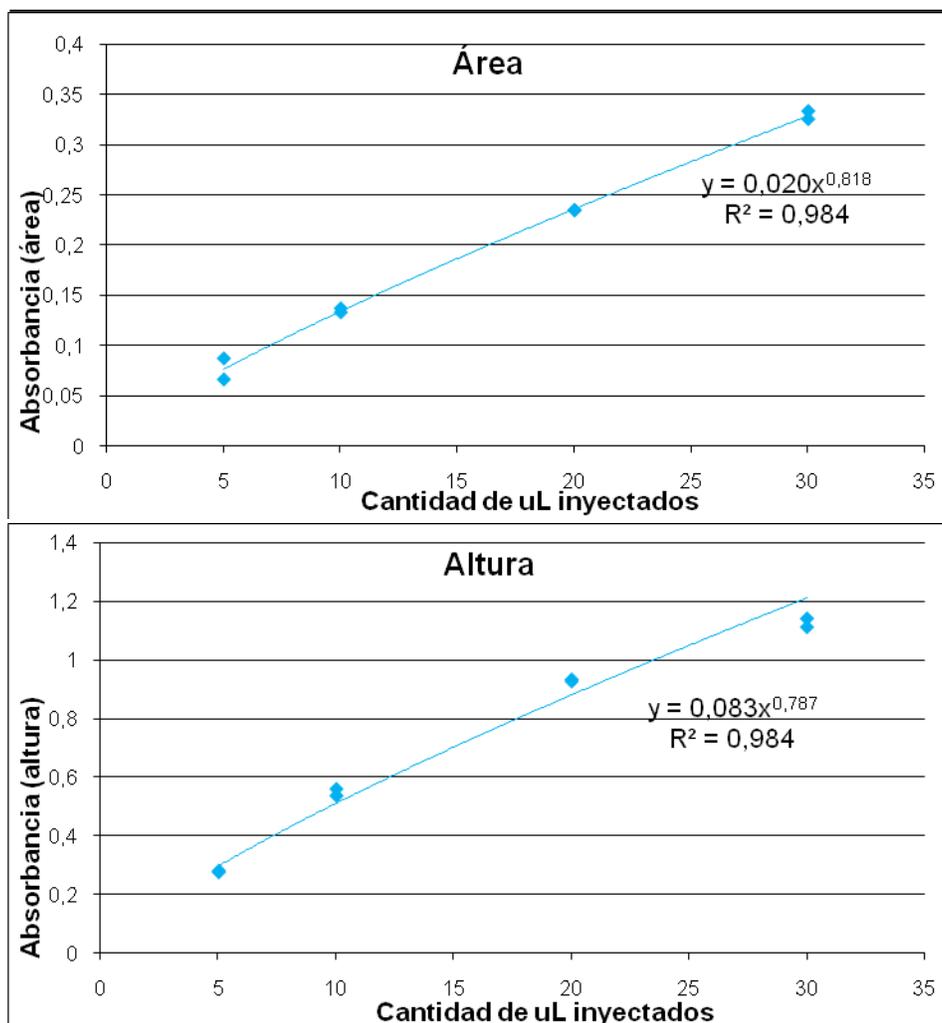


Figura 5.2 Gráficos a) área y b) altura según μL inyectados sobre la plataforma

Según los gráficos obtenidos, al aumentar la cantidad de μL inyectados aumentan al mismo tiempo los valores de área y altura, sin embargo no hay una relación lineal. El comportamiento responde a un modelo potencial y al comparar los exponentes de ambos tipos de medición puede señalarse que respondería a un comportamiento no lineal del inyector, mas que a una desviación de la ley de Beer, lo que frecuentemente se observa en dicho tipo de equipos. La mejor elección sería usar la mayor cantidad de material sólido posible, en este caso 30 μL , sin embargo, al aumentar la cantidad de μL inyectados, la cantidad de residuos carbonáceos dentro de la superficie del horno de grafito también lo hace. En consecuencia esos residuos podrían interferir en la medición generando una creciente absorción de fondo, debida a la dispersión de la energía del haz de radiación por partículas sólidas

interpuestas y para resolver el problema sería necesaria una limpieza manual después de cada inyección, lo que sería impráctico, especialmente en mediciones de rutina. Por esta razón, se eligió inyectar solo 10 μ L, tanto de suspensión como de modificador, dando un total de 20 μ L sobre la plataforma de L'vov.

Con respecto a los estudios de la influencia de la agitación sobre la repetibilidad de las mediciones, la figura 5.3 a y b muestran los resultados sobre dos suspensiones de 1% y 2% de agente surfactante, realizadas con y sin agitación.

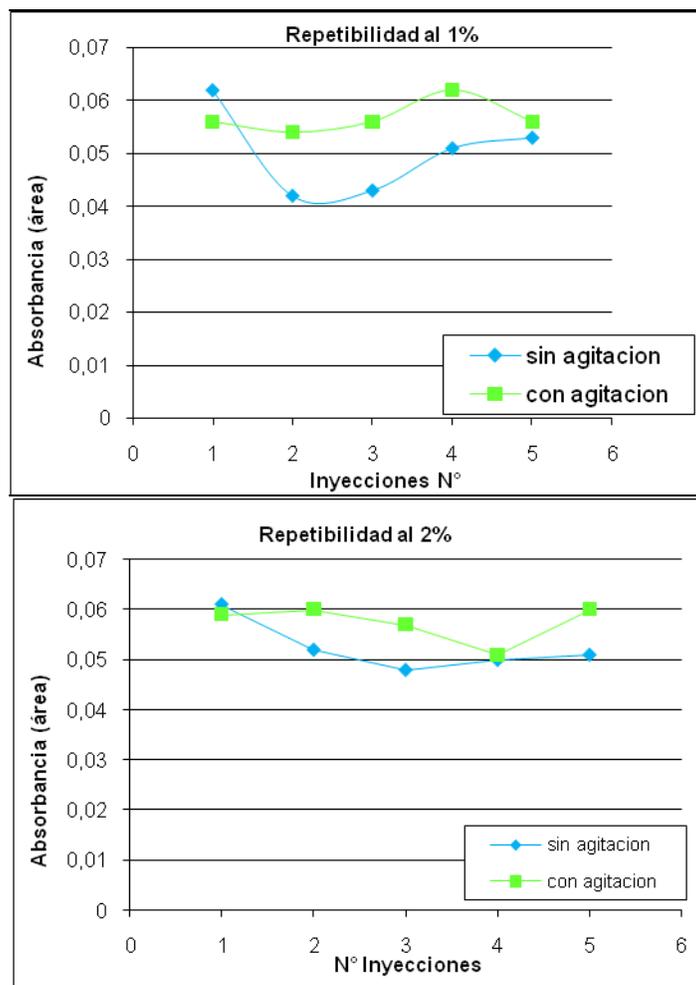


Figura 5.3 Mediciones de Repetibilidad en área usando a)1% de Glicerol y b) 2% de Glicerol

De los gráficos se puede concluir que la repetibilidad es menor al realizar las mediciones sin agitación y también se puede observar un ligero aumento en el área y mejor repetibilidad aun

cuando no se realice la agitación para la suspensión al 2% de agente surfactante, conduciendo a una mayor estabilidad de la suspensión.

Así como se evaluaron la cantidad de μL inyectados sobre la plataforma, también se estudió la influencia de la cantidad de material para preparar la suspensión.

La figura 5.4 a y b muestra los resultados de estos estudios, realizados variando la cantidad de solido en la suspensión, manteniendo constante la cantidad de μL inyectados a 10 μL .

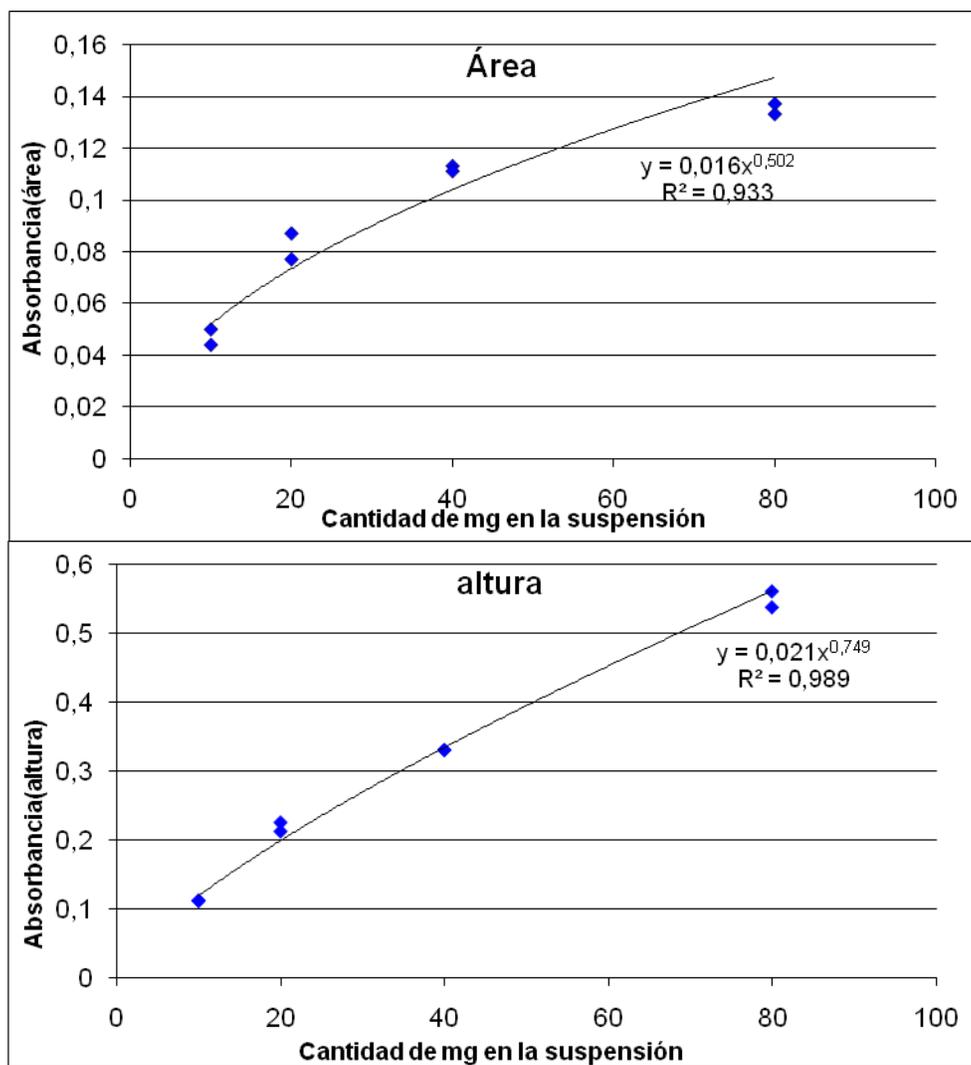


Figura 5.4 a) y b) Resultados en área y altura usando distintos tipos de suspensiones

Los resultados obtenidos para los valores de área según la cantidad de material usado en la preparación de la suspensión tampoco responden a una relación lineal a pesar de que al aumentar

esta cantidad aumentan también los valores tanto de área como de altura, respondiendo el comportamiento a una función potencial, produciéndose la misma dificultad que la observada al aumentar el valor de μL inyectados.

Un factor importante dentro de la técnica de suspensiones es determinar la concentración adecuada de la suspensión para asegurar la entrada de una cantidad de partículas dentro del horno, ya que se pueden presentar dos tipos de situaciones: a) en el caso de usar suspensiones muy diluidas, hay que tomar en cuenta que se puede producir una cantidad insuficiente de partículas dentro del horno y b) en el caso de usar una suspensión muy concentrada se corre el riesgo de tener dificultades en el pipeteo.

El cálculo de la masa de material sólido que se coloca en la superficie de la plataforma, puede hacerse según la siguiente fórmula:

$$Mf = \left(\frac{Ms}{Vs} \right) * Vf$$

Donde, Mf es la masa final en mg dentro del horno de grafito, Ms es la masa en mg de muestra usado para preparar la suspensión, Vs el volumen en mL del fluido en que se suspenden las partículas y Vf es el volumen en μL de suspensión inyectado.

Mientras más material se usa para preparar la suspensión a un volumen fijo, más representativa será la concentración del analito de la muestra sólida original. Para asegurar la representatividad del analito proveniente de la matriz, se deben introducir al menos 50 partículas de material sólido suspendido dentro del horno de grafito. En este estudio se usó una suspensión de 20 mg diluida en 5 mL, inyectando 10 μL de suspensión, da según la fórmula anterior un total de 40 μg de material inyectado sobre la plataforma, lo que es suficiente para asegurar la entrada de 50 partículas como mínimo.

Según el estudio de Miller-Ihli [21], a medida que la densidad del material aumenta, el número de partículas en 1 mg disminuirá linealmente. A su vez si la masa de material usado en la suspensión

aumenta, también aumentarían linealmente la cantidad de partículas y si el diámetro de las partículas aumenta a el doble, el número de partículas disminuirá con un factor de 8. La tabla 5.2 muestra la cantidad de partículas en 1 mg de material, con respecto al volumen y al diámetro de las partículas.

Tabla 5.2 Número de partículas en 1 mg

Diámetro(μm)	Volumen de partículas (cm^3)	Nº partículas/1 mg
25	$8,18 \cdot 10^{-9}$	122249
50	$6,55 \cdot 10^{-8}$	15267
100	$5,24 \cdot 10^{-7}$	1908
250	$8,18 \cdot 10^{-6}$	122
500	$6,55 \cdot 10^{-5}$	15

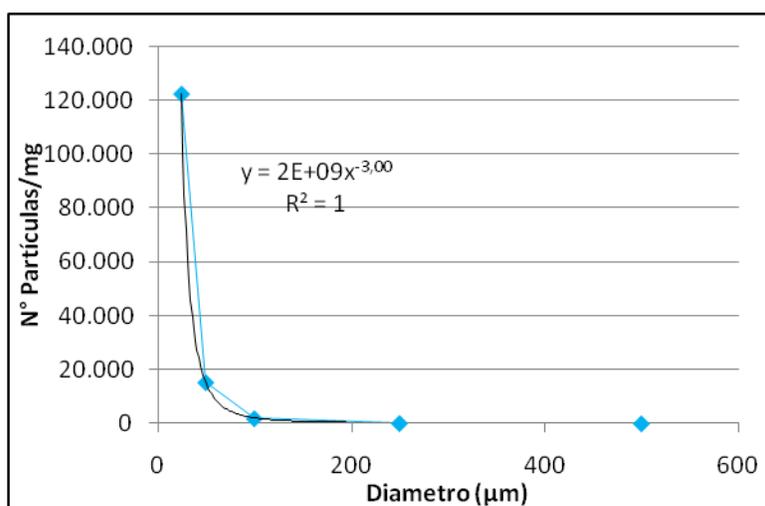


Figura 5.5 Gráfico Diámetro de partículas vs Nº de partículas en por mg.

Tomando en cuenta el promedio de tamaño de partículas obtenidas para ambas matrices y que los datos de la tabla tienen una relación potencial, es posible calcular la cantidad de partículas presentes en los $40 \mu\text{g}$ introducidos dentro del horno de grafito.

Debido a que el gráfico de la figura 5.5 presenta una gran pendiente, se produce una gran incerteza en el cálculo del número de partículas contenidas en 1 mg de material siguiendo la función potencial a la que se ajustan los datos presentados en la tabla 5.2, por lo que los resultados obtenidos son aproximados. Sin embargo, la cantidad resultante es mayor que la cantidad mínima requerida y suficiente para realizar la determinación mediante el uso de

suspensiones. Por lo tanto para la matriz pelo, 706 partículas son introducidas junto con la inyección de 10 µL de suspensión, y en el caso de la matriz uña la cantidad de partículas es de 7199, aproximadamente.

Los resultados obtenidos concuerdan con los aquellos provenientes de los experimentos sobre la influencia de la cantidad de suspensión inyectada sobre la plataforma, la cantidad de material usado en la preparación de la suspensión y el efecto del tamaño de partículas, ya que si se usa una suspensión muy concentrada de partículas con diámetro muy pequeño y si además se inyecta una gran cantidad dentro del horno de grafito, se corre el riesgo de saturar la plataforma, producir crepitación con la consecuente volatilización del analito, producir una gran cantidad de residuos y aumentar la señal de fondo, lo que se aleja de lo deseado.

5.3 Estudio de Modificadores

La elección del mejor modificador es uno de los puntos fundamentales en las mediciones por ETAAS. La gran cantidad de modificadores descritos en la bibliografía complica aun mas esta elección, por lo que generalmente se tiende a evaluar primero un modificador que ha sido considerado universal, una mezcla de Pd y $Mg(NO_3)_2$. Este modificador tiene dos mecanismos de acción principales, primero estabiliza térmicamente el analito y luego elimina los interferentes iónicos clorados durante la etapa de pirolisis [13]. Sin embargo, también presenta desventajas en cuanto a su estabilidad en la presencia de la matriz, por lo que se requieren rigurosos estudios sobre su capacidad de estabilizar el analito y sobretodo cual es su acción sobre la absorción de fondo producida por la gran cantidad de materia orgánica introducida al horno de grafito. Debido a que generalmente es complejo elegir un adecuado modificador basándose en las propiedades físicas y químicas del analito, de la matriz y de los mismos modificadores, lo mejor es tener la mayor cantidad de información para poder decidir adecuadamente.

En la figura 5.6a y b se muestran los resultados de los seis modificadores estudiados junto con su acción sobre la señal de *fondo*, en una solución acuosa de 25 µg/L de Pb.

Como se puede apreciar en los gráficos, el mejor modificador resulta ser la mezcla $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ que tiene la capacidad de estabilizar el analito hasta 1100°C además de tener el comportamiento esperado con respecto a la señal de *background*, ya que éste es minimizado a 600°C . Por otra parte la señal correspondiente a la atomización se mantiene relativamente estable frente al ascenso de temperatura en esta etapa. Para el estudio en matrices se eligió el modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, además del modificador de Fosfato Ácido de Amonio solo, con fines comparativos, para evaluar la acción del ion fosfato sobre la matriz. En la figura 5.7 a y b se muestran los resultados de los dos modificadores elegidos, para cada matriz además de su acción sobre las señales de fondo.

Si bien el modificador que contiene paladio es el más usado de acuerdo a la bibliografía, los resultados obtenidos en este estudio señalan que no es el modificador adecuado para realizar mediciones en soluciones acuosas específicas para Pb, ya que no es capaz de estabilizar el analito a altas temperaturas a diferencia del comportamiento que presenta el modificador de fosfato. Es por esto que éste modificador no se eligió para los experimentos posteriores.

Según los resultados en matrices, tanto el modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como la mezcla $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ tienen la capacidad de estabilizar a ambas matrices hasta una temperatura de 1000°C en la etapa de carbonización. Para el caso de la matriz pelo, ambos modificadores se comportan similarmente ya que dan señales de área con valores similares entre si, pero en el caso de la matriz uña se puede apreciar un aumento en el área en presencia de modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ a diferencia de lo que pasa en presencia de la mezcla $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, lo que indicaría una interacción diferente de esta matriz en presencia y ausencia de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Un estudio más acabado de las interacciones entre los dos modificadores, ambas matrices y la temperatura, se llevó a cabo en el diseño exploratorio.

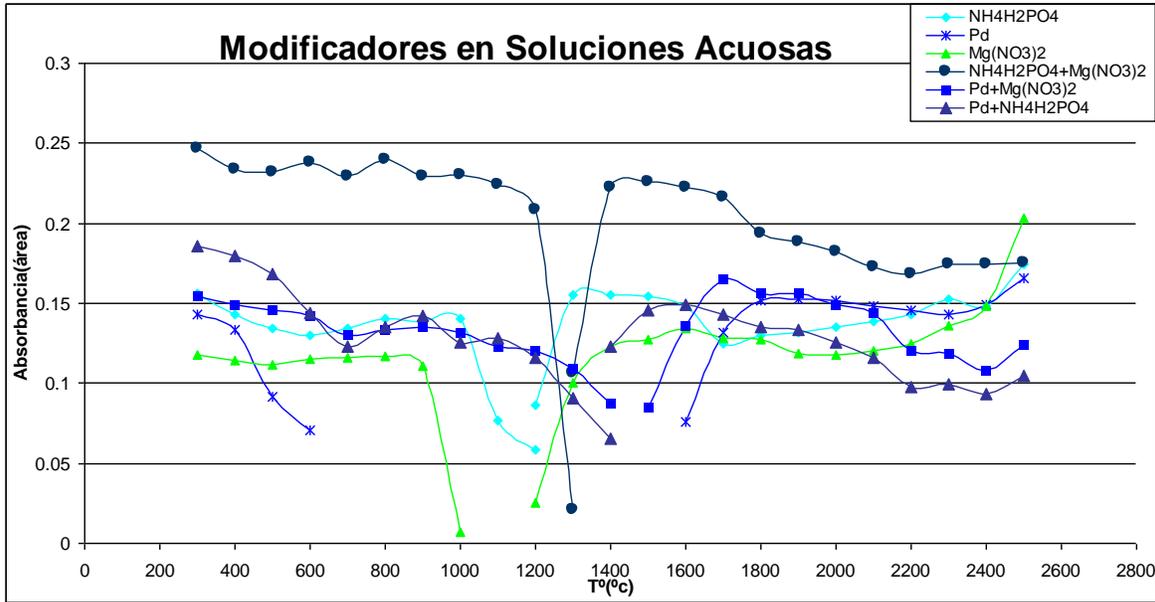


Figura 5.6 a) Estudio de Modificadores en soluciones acuicas: Curvas de pirólisis y atomización para 25µg/L Pb para :
 ◆ NH₄H₂PO₄ , (*) Pd, (▲) Mg(NO₃)₂, (●) NH₄H₂PO₄ + Mg(NO₃)₂, (■) Pd + Mg(NO₃)₂, (△) Pd + NH₄H₂PO₄

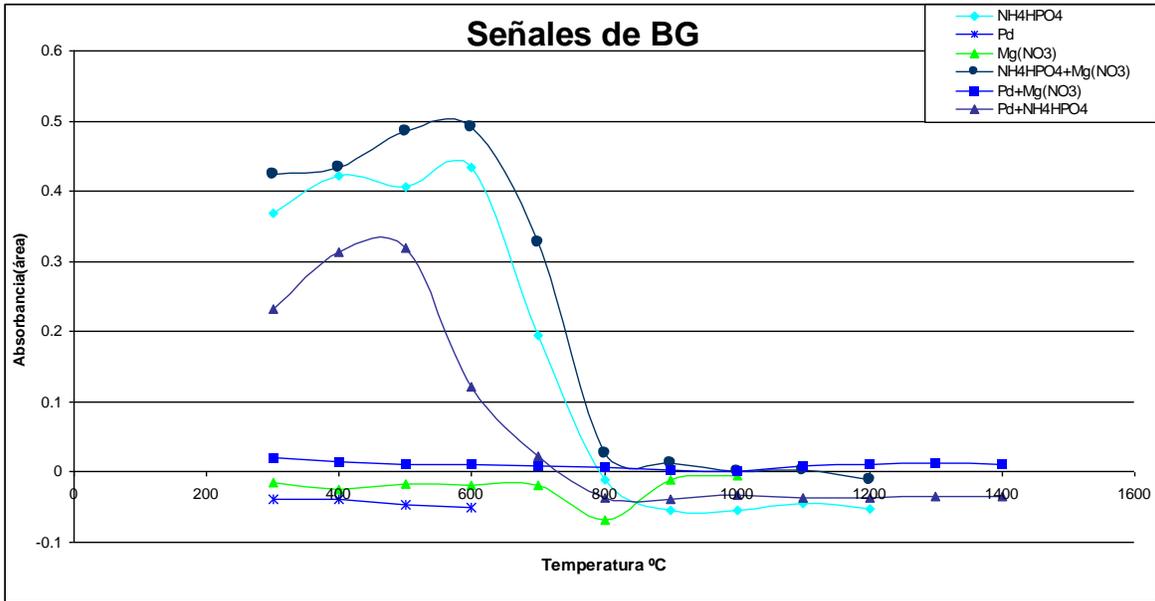


Figura 5.6 b) Señales de Background en soluciones acuicas a 25µg/L Pb para : (◆) NH₄H₂PO₄ , (*) Pd, (▲) Mg(NO₃)₂,
 (●) NH₄H₂PO₄ + Mg(NO₃)₂, (■) Pd + Mg(NO₃)₂, (△) Pd + NH₄H₂PO₄

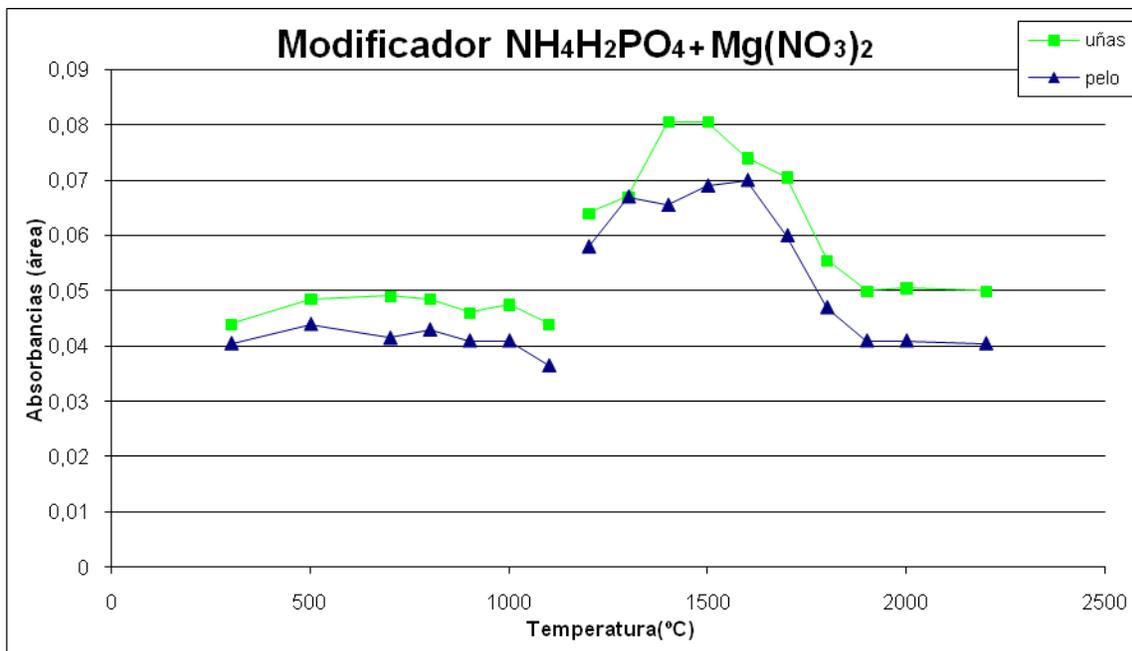


Figura 5.7 a) Curvas de pirólisis y atomización para matriz (▲) pelo y (■) uñas con modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$

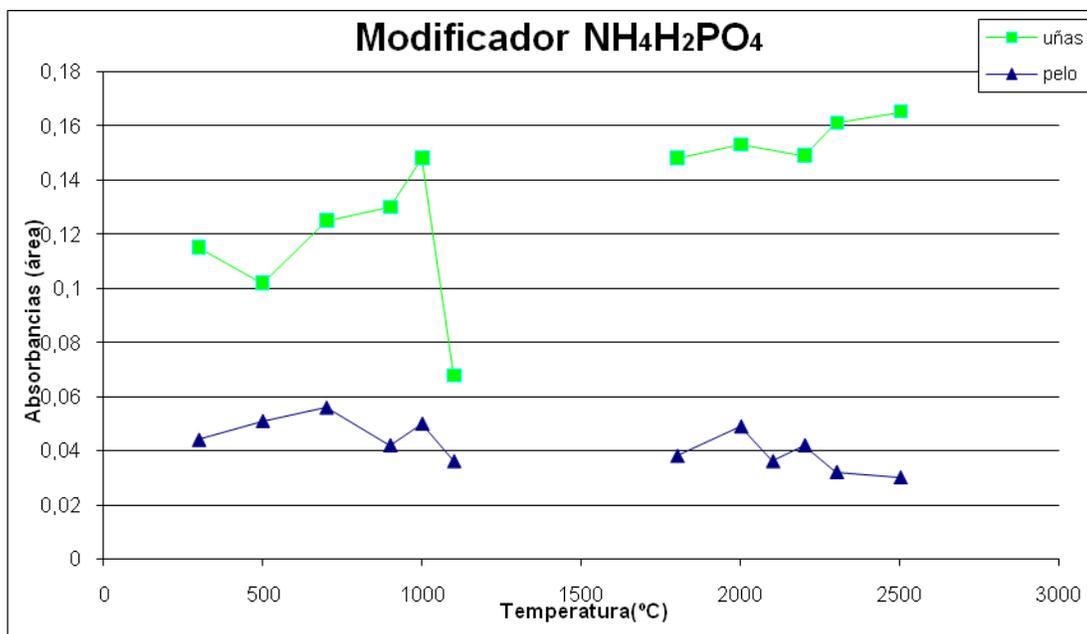


Figura 5.7 b) Curvas de pirólisis y atomización para matriz (▲) pelo y (■) uñas con modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$

5.4 Resultados del Diseño exploratorio multivariado

Las tablas 5.3, 5.5 y 5.7 muestran las matrices de respuesta para las soluciones acuosas y para las matrices pelo y uñas, correspondiente al diseño experimental. La tabla 5.4, 5.6 y 5.8 muestran los efectos de cada factor obtenidos del análisis estadístico.

Tabla 5.3 Matriz de respuesta Soluciones acuosas

N°Experimento	Área	Altura	BG	Tiempo	Ancho	N°Experimento	Área	Altura	BG	Tiempo	Ancho
1	0,107	0,349	0,004	0,5	1,2	11	0,0945	0,225	0,72	2,55	0,6
2	0,0615	0,157	0,096	0,7	1,9	12	0,0285	0,223	0,3845	2,3	0,35
3	0,019	0,039	0,0105	0,5	0,5	13	0,1375	0,398	0,417	1,65	0,65
4	0,11	0,238	0,1465	0,75	2,45	14	0,126	0,144	0,321	1,65	0,5
5	0,1615	0,358	0,137	0,8	1,55	15	0,13	0,376	0,5635	1,65	0,5
6	0,1255	0,242	0,141	0,85	2,15	16	0,148	0,438	0,579	2,35	0,45
7	0,0515	0,136	0,02	0,6	0,6	Repetición 2	0,0655	0,188	0,1675	1,3	0,5
8	0,0965	0,282	0,0115	0,5	1,15	Repetición 5	0,137	0,313	0,5945	1,85	0,65
9	0,0255	0,053	0,041	0,7	0,65	Repetición 6	0,14	0,507	0,543	2,25	0,55
10	0,05	0,129	0,1805	0,55	2	Repetición 10	0,045	0,419	0,497	2,45	0,7

Tabla 5.4 Factores significativos para Soluciones acuosas

Factor	Efecto		Factor	Efecto	
Variable: Área			Variable: Altura		
Tipo modificador	-0,035594	Significativo	Tipo modificador	-0,005438	No Significativo
Tipo surfactante	0,006094	No Significativo	Tipo surfactante	-0,04275	Significativo
Cantidad de ácido	0,038031	Significativo	Cantidad de ácido	0,114813	Significativo
Temperatura atomización	-0,011446	Significativo	Temperatura atomización	-0,003393	No Significativo
Temperatura carbonización	-0,025531	Significativo	Temperatura carbonización	-0,11725	Significativo
Cantidad modificador	0,008196	No Significativo	Cantidad modificador	0,0175	Significativo
Variable: Background			Variable: Ancho		
Tipo modificador	-0,107156	Significativo	Tipo Modificador	-0,25625	Significativo
Tipo surfactante	0,006781	No Significativo	Tipo Surfactante	0,175	Significativo
Cantidad de ácido	0,001594	No Significativo	Cantidad ácido	0,05625	Significativo
Temperatura atomización	-0,0035	No Significativo	Temperatura atomización	-0,0875	Significativo
Temperatura carbonización	-0,005219	No Significativo	Temperatura carbonización	0,0625	Significativo
Cantidad modificador	0,026321	Significativo	Cantidad modificador	-0,051786	Significativo
Variable: Tiempo					
Tipo modificador	-1,16562	Significativo			
Tipo surfactante	0,234375	Significativo			
Cantidad ácido	0,046875	No Significativo			
Temperatura atomización	-0,005357	No Significativo			
Temperatura carbonización	-0,478125	Significativo			
Cantidad modificador	0,0375	No Significativo			

Tabla 5.5 Matriz de respuesta para matriz pelo

N° Experimento	Área	Altura	BG	Tiempo	Ancho	N° Experimento	Área	Altura	BG	Tiempo	Ancho
1	0,025	0,175	0,2315	2,25	0,35	11	0,111	0,182	0,7955	2,45	0,8
2	0,0615	0,175	0,0685	1,3	0,55	12	0,0125	0,184	0,4025	2,2	0,45
3	0,0955	0,194	0,252	2,15	0,55	13	0,1175	0,248	0,394	1,65	0,65
4	0,0225	0,149	0,383	2,2	0,45	14	0,0485	0,161	0,332	1,55	0,5
5	0,0685	0,156	0,675	1,65	0,7	15	0,0675	0,201	0,496	1,65	0,6
6	0,144	0,377	0,388	2,2	0,55	16	0,0535	0,312	0,5895	2,25	0,5
7	0,131	0,308	0,1585	1,35	0,55	Repetición 2	0,035	0,116	0,247	1,35	0,4
8	0,043	0,135	0,049	1,3	0,5	Repetición 5	0,057	0,647	0,221	1,6	0,5
9	0,056	0,179	0,09	1,3	0,5	Repetición 6	0,1205	0,003	0,339	1,3	0,5
10	0,0475	0,18	0,548	2,5	0,7	Repetición 10	0,0505	0,556	0,198	2,35	0,65

Tabla 5.6 Factores significativos para matriz pelo

Factor	Efecto		Factor	Efecto	
Variable: Área			Variable: Altura		
Tipo modificador	0,0065	No significativo	Tipo modificador	0,007161	No Significativo
Cantidad modificador	0,003375	No significativo	Cantidad modificador	0,0045	No Significativo
Cantidad surfactante	-0,019125	Significativo	Cantidad surfactante	-0,059813	Significativo
Cantidad ácido	0,0315	Significativo	Cantidad ácido	0,071125	Significativo
Temperatura atomización	-0,034	Significativo	Temperatura atomización	-0,008232	No Significativo
Temperatura carbonización	0,01025	No significativo	Temperatura carbonización	-0,013938	No Significativo
Variable: Background			Variable: Ancho		
Tipo modificador	-0,351339	Significativo	Tipo modificador	-0,108929	Significativo
Cantidad modificador	0,105531	No Significativo	Cantidad modificador	0,034375	No Significativo
Cantidad surfactante	0,042781	No significativo	Cantidad surfactante	-0,003125	No Significativo
Cantidad ácido	-0,023594	No significativo	Cantidad ácido	-0,003125	No Significativo
Temperatura atomización	-0,042161	No significativo	Temperatura atomización	-0,108929	Significativo
Temperatura carbonización	-0,141094	Significativo	Temperatura carbonización	0,009375	No Significativo
Variable: Tiempo					
Tipo modificador	-0,276786	No significativo			
Cantidad modificador	-0,046875	No significativo			
Cantidad surfactante	0,021875	No significativo			
Cantidad ácido	-0,109375	No significativo			
Temperatura atomización	0,016071	No significativo			
Temperatura carbonización	-0,740625	Significativo			

Tabla 5.7 Matriz de respuesta para matriz uña

N° Experimento	Área	Altura	BG	Tiempo	Ancho	N° Experimento	Área	Altura	BG	Tiempo	Ancho
1	0,0705	0,45	0,325	2,15	0,4	11	0,0715	0,225	0,72	2,55	0,6
2	0,0305	0,146	0,106	1,3	0,5	12	0,0545	0,223	0,3845	2,3	0,35
3	0,092	0,295	0,3605	2,25	0,5	13	0,151	0,398	0,417	1,65	0,65
4	0,06	0,195	0,359	2,15	0,4	14	0,0385	0,144	0,321	1,65	0,5
5	0,096	0,266	0,598	1,6	0,6	15	0,098	0,376	0,5635	1,65	0,5
6	0,1215	0,541	0,529	2,2	0,5	16	0,1105	0,438	0,579	2,35	0,45
7	0,1195	0,404	0,0575	1,4	0,45	Repetición 2	0,0275	0,188	0,1675	1,3	0,5
8	0,108	0,381	0,1265	1,3	0,5	Repetición 5	0,1315	0,313	0,5945	1,85	0,65
9	0,067	0,254	0,1145	1,4	0,4	Repetición 6	0,1525	0,507	0,543	2,25	0,55
10	0,1075	0,434	0,5485	2,3	0,55	Repetición 10	0,1595	0,419	0,497	2,45	0,7

Tabla 5.8 Factores significativos para matriz uña

Factor	Efecto		Factor	Efecto	
Variable: Área			Variable: Altura		
Tipo modificador	-0,00675	No significativo	Tipo modificador	0,002643	No significativo
Cantidad modificador	-0,004156	No significativo	Cantidad modificador	0,006219	No Significativo
Cantidad surfactante	-0,020094	No significativo	Cantidad surfactante	-0,047156	No significativo
Cantidad ácido	0,002844	No significativo	Cantidad ácido	-0,033531	No Significativo
Temperatura atomización	-0,061857	Significativo	Temperatura atomización	-0,052536	No significativo
Temperatura carbonización	0,001156	No significativo	Temperatura carbonización	-0,032656	No significativo
Variable: Background			Variable: Ancho		
Tipo modificador	-0,33	Significativo	Tipo modificador	-0,080357	Significativo
Cantidad modificador	0,167219	Significativo	Cantidad modificador	0,003125	No significativo
Cantidad surfactante	-0,014656	No significativo	Cantidad surfactante	-0,028125	No significativo
Cantidad ácido	-0,006781	No significativo	Cantidad ácido	-0,009375	No significativo
Temperatura atomización	-0,027643	No significativo	Temperatura atomización	-0,133929	Significativo
Temperatura carbonización	-0,124156	Significativo	Temperatura carbonización	0,034375	No significativo
Variable: Tiempo					
Tipo modificador	-0,258929	Significativo			
Cantidad modificador	0,034375	No significativo			
Cantidad surfactante	0,028125	No significativo			
Cantidad ácido	0,021875	No significativo			
Temperatura atomización	-0,0375	No significativo			
Temperatura carbonización	-0,784375	Significativo			

A partir del análisis estadístico se pueden obtener los efectos estimados de cada factor los cuales son comparados con el error estimado, si el efecto estimado tiene un valor mayor que el valor del error absoluto ($p=0,05$), se puede afirmar que dicho efecto será significativo a un nivel de confianza dado. Los resultados de éste análisis se observan en la figura 5.8 a través de los gráficos de Pareto, donde el eje de las abscisas representa el error estándar estimado.

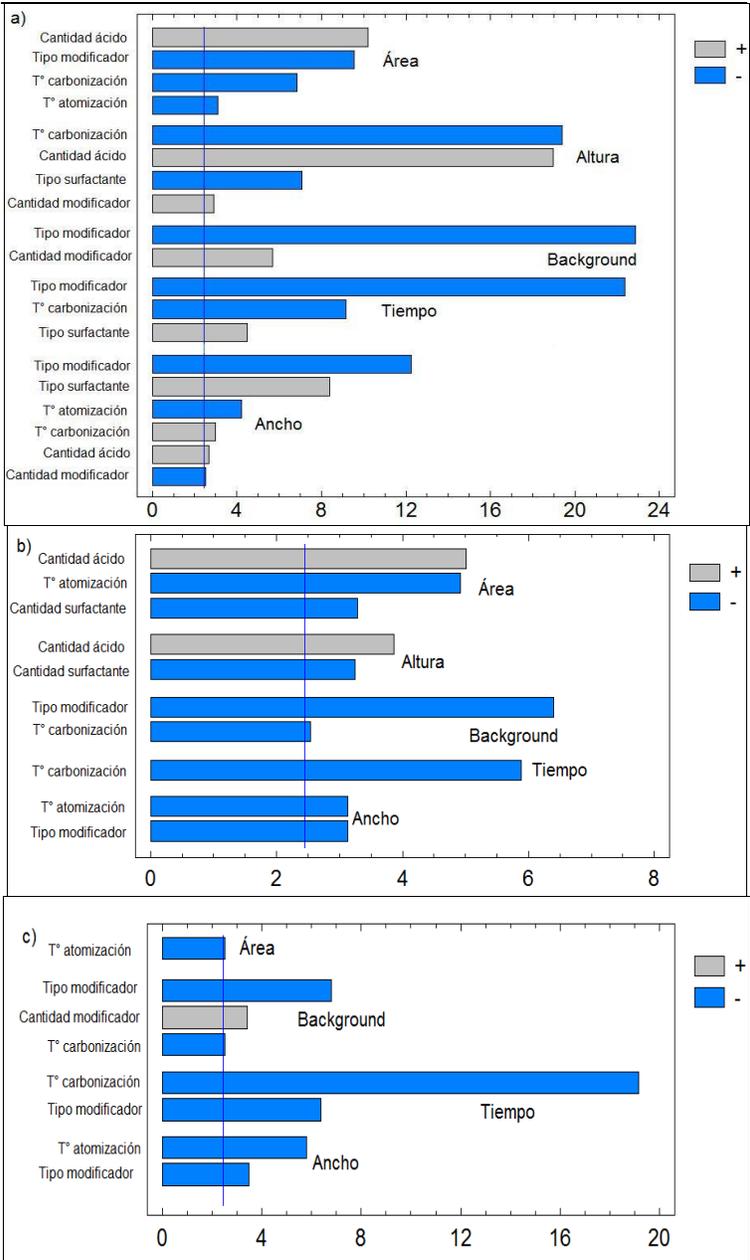


Figura 5.8 Cartas Pareto con los efectos estandarizados para a) soluciones acuosas, b) matriz pelo y c) matriz uña

Según los resultados del estudio preliminar en soluciones acuosas los factores significativos más importantes son: temperatura de carbonización, tipo y cantidad de modificador, cantidad de ácido, tipo surfactante.

Debido a que el plomo es un elemento muy volátil, la temperatura de carbonización es un factor significativo previsible, ya que al aumentarla, la cantidad de átomos de Plomo dentro del horno de grafito será eliminada antes de la atomización. Es por esto que también afecta al tiempo de aparición de la señal analítica, adelantando el *peak* a medida que se aumenta la temperatura de carbonización debido a la menor diferencia respecto a la temperatura de atomización. Lógicamente, la volatilización del analito también se verá afectada por el tipo de modificador y la concentración de modificador usada. En este caso el uso de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ produce una estabilización mejor del analito que su mezcla con $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, debido principalmente a su mecanismo de acción sobre éste. El mecanismo sugerido que ejerce el Fosforo del $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ sobre el Plomo en este caso, involucra el sustrato de grafito y el proceso de modificación inducido por el Fosforo [30]. Según este mecanismo, el plomo al llegar a una temperatura entre los 800°C y 900°C se encuentra en estado libre, luego de esto se produce la descomposición térmica del compuesto de plomo oxy-fosforado. Así mismo, se observa la aparición de monóxido y dióxido de carbono, los cuales indican la reducción del óxido de Plomo unido al grafito del horno. Este sustrato, está involucrado en la reducción o la adsorción disociativa del óxido de plomo o en la formación del compuesto oxifosforado, indicando así el mecanismo de modificación. Por lo tanto, al estar en ausencia del modificador y a bajas temperaturas (100°C), las especies de plomo se encuentran sobre la superficie del sustrato. Así, estas especies de plomo enlazadas a la superficie comienzan a desaparecer a 500°C , desapareciendo completamente a temperaturas mayores a 600°C , donde se produce tanto la desorción como la migración desde la superficie. Al introducir el modificador en cambio, las especies comienzan la desorción desde la superficie a temperaturas mayores a 650°C , estabilizando así el analito a mayores temperaturas.

Además de afectar el ancho de *peak* y el tiempo de aparición de analito, el modificador usado y su concentración afectan también a la señal de fondo, siendo el $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ en su concentración menor, el que dará las menores señales de absorción de fondo.

Con respecto al tipo de surfactante usado, en el caso de soluciones acuosas y según los resultados obtenidos, el uso de Glicerol es el mejor surfactante ya que aumenta la altura y disminuye el ancho de *peak* y retrasa la aparición de la señal. El Glicerol a diferencia del Triton X-100 tiene menos dificultades técnicas, ya que éste último al ser un surfactante no iónico, produce mucha espuma, lo que causa problemas al pipetear las soluciones desde el matraz y al introducir la gota dentro de la plataforma de L'Vov.

La tabla 5.9 muestra los factores significativos para las soluciones acuosas y su comparación con ambas matrices y que tipo de efecto tienen sobre cada variable (efecto negativo o positivo).

Tabla 5.9 Comparación de factores significativos entre soluciones acuosas, matriz pelo y matriz uña

	Soluciones Acuosas	Matriz Pelo	Matriz Uña
Área	T° atomización (-)	T° atomización (-)	T° atomización (-)
	Cantidad ácido (+)	Cantidad ácido (+)	
	Tipo modificador (-)		
	T° carbonización (-)		
		Cantidad surfactante (-)	
Altura	T° carbonización (-)		No determinado
	Cantidad ácido (+)	Cantidad ácido (+)	
	Tipo surfactante (-)	Cantidad surfactante (-)	
	Cantidad modificador (+)		
Background		T° carbonización (-)	T° carbonización (-)
	Tipo modificador (-)	Tipo modificador (-)	Tipo modificador (-)
	Cantidad modificador (+)		Cantidad modificador (+)
Ancho	T° atomización (-)	T° atomización (-)	T° atomización (-)
	Tipo modificador (-)	Tipo modificador (-)	Tipo modificador (-)
	Tipo surfactante (+)		
	T° carbonización (+)		
	Cantidad ácido (+)		
	Cantidad modificador (-)		
Tiempo	T° carbonización (-)	T° carbonización (-)	T° carbonización (-)
	Tipo modificador (-)		Tipo modificador (-)
	Tipo surfactante (+)		

En cuanto a las matrices se pueden observar resultados similares entre ambas y también con respecto a las soluciones acuosas.

La temperatura de atomización tiene un efecto negativo sobre la variable área para ambas matrices, es decir que cuando se usa la mayor temperatura el área disminuye, sin embargo lo que se busca es una señal bien definida para la integración, especialmente cuando se trata de matrices complejas.

Con respecto a la variable altura, se pueden ver similitudes entre ambas matrices y las soluciones acuosas ya que la cantidad de ácido ejerce un efecto importante sobre ellas. Para el caso de la matriz pelo y las soluciones acuosas la cantidad de ácido tiene un efecto positivo, es decir al usar la mayor cantidad, la altura de la señal aumentará. En cambio para la matriz uña, la concentración menor es suficiente para obtener la señal deseada. El uso de HNO_3 en esta técnica tiene tres razones principales: a) ayuda a la disociación de las especies formadas durante la etapa de carbonización actuando como un agente oxidante, b) ayuda a la extracción parcial del analito al medio líquido desde la matriz, para el caso de pelo y uñas y c) puede actuar como agente estabilizante mejorando la estabilidad de la suspensión mejorando la precisión de las mediciones [20].

Con respecto a la señal de *background* tanto las matrices como las soluciones acuosas tienen resultados similares, ya que el tipo y la cantidad de modificador tienen efectos significativos sobre éstas. Para este caso el modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ en su mayor concentración es el adecuado para las tres situaciones, ya que permite estabilizar el analito a más alta temperatura ayudando así a la mejor carbonización de la gran cantidad de matriz que entra al horno para ser atomizada, eliminando la señal de fondo con más eficiencia que la su mezcla con $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

También es importante mencionar el efecto de la temperatura de carbonización sobre las matrices y no sobre las soluciones acuosas. Es evidente que al estar en presencia de una matriz, la temperatura de carbonización es crítica para obtener señales analíticas de una magnitud significativa y libre de una señal de *background*. Según los resultados obtenidos, la mayor temperatura de carbonización incrementará la señal analítica sin producir pérdida de analito.

Analizando los resultados con respecto al ancho de *peak*, se puede observar que una vez más el modificador fosfato es el adecuado para disminuir el ancho de *peak*, así como también se ve afectado por la temperatura de atomización. Esto concuerda con los resultados obtenidos para la

variable área, ya que la disminución del ancho va ligada con la disminución del área que se da al aumentar la temperatura de atomización.

Finalmente en el caso del tiempo de aparición de la señal, éste se hace mínimo al usar modificador $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y también se ve afectado por la temperatura de carbonización, lo anterior es debido a la menor diferencia de temperaturas entre las etapas de carbonización y atomización, facilitando el desplazamiento de la señal, generando menos error en la medición pues en esa región es menor la señal de absorción de fondo.

Según los resultados obtenidos en el diseño exploratorio aplicado a las matrices pelo y uñas, se puede llegar a la conclusión de cuáles son las condiciones óptimas a usar en la medición de suspensiones, por lo que la mejor señal analítica será al usar $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2%, HNO_3 0,5%, temperatura carbonización 1000°C y temperatura de atomización 2200°C .

Con respecto a la cantidad de surfactante usado, aun cuando no se vio un efecto significativo sobre la matriz uña pero si sobre la matriz pelo, se eligió la mayor concentración (2%p/v) para trabajar en ambas matrices.

Otro punto importante a destacar, es que a pesar de que existen similitudes de los resultados entre el pelo, las uñas y las soluciones acuosas, sí se puede apreciar un efecto de matriz importante ya que se necesita mayor temperatura de carbonización y atomización debido a la complejidad de la matriz, de lo que se necesita en soluciones acuosas.

5.5 Superficies de respuesta

Luego de obtener los factores que tienen efectos significativos en las variables de respuesta y los niveles para los cuales se incrementa la señal instrumental, se obtuvieron los parámetros óptimos para las soluciones acuosas. La tabla 5.10 muestra la correspondiente matriz de respuesta de optimización, la tabla 5.11 muestra los factores significativos para la optimización y las figuras 5.9 a, b y c muestran las diferentes superficies de respuesta obtenidas para cada factor significativo.

Tabla 5.10 Matriz de respuesta para la optimización en soluciones acuosas

N° Experimento	Área	Altura	Background	Ancho	Tiempo	N° Experimento	Área	Altura	Background	Ancho	Tiempo
1	0,0775	0,205	0,007	0,5	1	17	0,1155	0,337	0,0035	0,5	1,6
2	0,0064	0,174	0,004	0,5	0,975	18	0,056	0,142	0,0075	0,5	0,8
3	0,1095	0,3585	0,008	0,45	2	19	0,098	0,313	0,004	0,5	1,4
4	0,09	0,3055	0,004	0,45	1,2	20	0,1065	0,347	0,0065	0,45	1,6
5	0,111	0,3385	0,0035	0,5	1,9	21	0,102	0,326	0,004	0,4	1,5
6	0,093	0,32	0,006	0,4	1,5	22	0,1015	0,2985	0,006	0,6	1,75
7	0,1	0,3085	0,004	0,5	1,6	23	0,0915	0,298	0,007	0,4	1,15
8	0,0775	0,221	0,0025	0,5	0,9	24	0,097	0,313	0,003	0,5	1,3
9	0,099	0,342	0,0045	0,45	1,15	25	0,1	0,2765	0,004	0,55	1,25
10	0,1005	0,296	0,005	0,5	1,6	26	0,0695	0,1885	0,0045	0,55	0,95
11	0,069	0,197	0,008	0,5	0,85	27	0,089	0,2975	0,005	0,5	1,15
12	0,104	0,321	0,0045	0,5	1,5	28	0,09	0,299	0,005	0,5	1,3
13	0,0835	0,188	0,0035	0,7	0,95	29	0,0935	0,302	0,005	0,5	1,35
14	0,0745	0,202	0,0035	0,55	0,95	30	0,097	0,3095	0,0085	0,5	1,5
15	0,0945	0,252	0,0075	0,55	1,25	31	0,103	0,343	0,008	0,5	1,2
16	0,0685	0,202	0,0045	0,5	0,85						

Tabla 5.11 Factores significativos de optimización para soluciones acuosas

Factor	Efecto		Factor	Efecto	
Variable: Área			Variable: Altura		
Temperatura Carbonización(A)	-0,0385667	Significativo	Temperatura Carbonización(A)	-0,132667	Significativo
Temperatura atomización(B)	-0,00727778	Significativo	Temperatura atomización(B)	-0,0168333	Significativo
Concentración ácido(C)	0,00551111	Significativo	Concentración ácido(C)	-0,0277778	Significativo
AB	-0,00325	No significativo	AB	-0,00825	No significativo
AC	0,01985	Significativo	AC	0,03175	Significativo
BC	0,00308333	No significativo	BC	-0,00466667	No significativo
Variable: Background			Variable: Ancho		
Temperatura Carbonización(A)	-0,00077778	Significativo	Temperatura Carbonización(A)	0,0555556	Significativo
Temperatura atomización(B)	0,00394444	Significativo	Temperatura atomización(B)	-0,0166667	No significativo
Concentración ácido(C)	-0,00033333	No significativo	Concentración ácido(C)	0,0611111	Significativo
AB	0,00041667	No significativo	AB	-0,0666667	Significativo
AC	0,00041667	No significativo	AC	0	No significativo
BC	-0,00075	No significativo	BC	0,00833333	No significativo
Variable: Tiempo					
Temperatura Carbonización(A)	-0,702778	Significativo			
Temperatura atomización(B)	-0,0777778	No significativo			
Concentración ácido(C)	-0,0361111	No significativo			
AB	-0,133333	No significativo			
AC	0,0875	No significativo			
BC	0,0666667	No significativo			

Al analizar los resultados, para soluciones acuosas provenientes de las superficies de respuesta, se pueden observar los siguientes comportamientos con respecto a los factores Temperatura de carbonización (**A**), Temperatura de atomización (**B**) y concentración de ácido (**C**).

Tanto para la variable altura como para la variable área, A, B, y C son factores significativos dentro de la optimización. Para la señal de *background* solo los factores A y B fueron significativos, no así la concentración de ácido, a diferencia de lo obtenido en el diseño experimental exploratorio en soluciones acuosas. Es importante también mencionar las interacciones que resultan significativas dentro del estudio de optimización. Con respecto a la variable altura en la figura 5.9a la interacción significativa más importante se da entre la temperatura de carbonización y la concentración de ácido (AC). La altura disminuirá al usar la mayor temperatura de carbonización y la menor concentración de ácido, pero llegará a un punto donde al aumentar aun mas la temperatura de carbonización, la altura se hará independiente de la concentración de ácido usada. La variable área correspondiente a la figura 5.9b también se verá afectada por este tipo de interacción, disminuyendo a la mayor temperatura de carbonización, sin importar la temperatura de atomización. Sin embargo, a mayor concentración de ácido mejorará la respuesta aun cuando la carbonización sea a temperatura baja, es decir se perderá menos si se usa mas concentración de ácido.

Para el caso de la señal de *background*, no se ven factores significativos en cuanto a las interacciones. Sin embargo es importante mencionar los efectos de la Temperatura de carbonización y la temperatura de atomización en la figura 5.9c. Según esta superficie de respuesta la señal de fondo aumentará al usar una mayor temperatura de atomización es decir a medida que se aumenta la ésta aumentará también la señal de *background*, disminuyendo el efecto benéfico de una mayor temperatura de carbonización. Ésta señal de *background* probablemente se deba a la señal no específica que aporta el modificador, debido a que en este diseño hay ausencia de matriz. A pesar de esto, el hecho de que exista ruido de fondo durante la atomización no es un factor importante, ya que la señal específica aparece antes, permitiendo integrar la señal analítica en un tiempo menor.

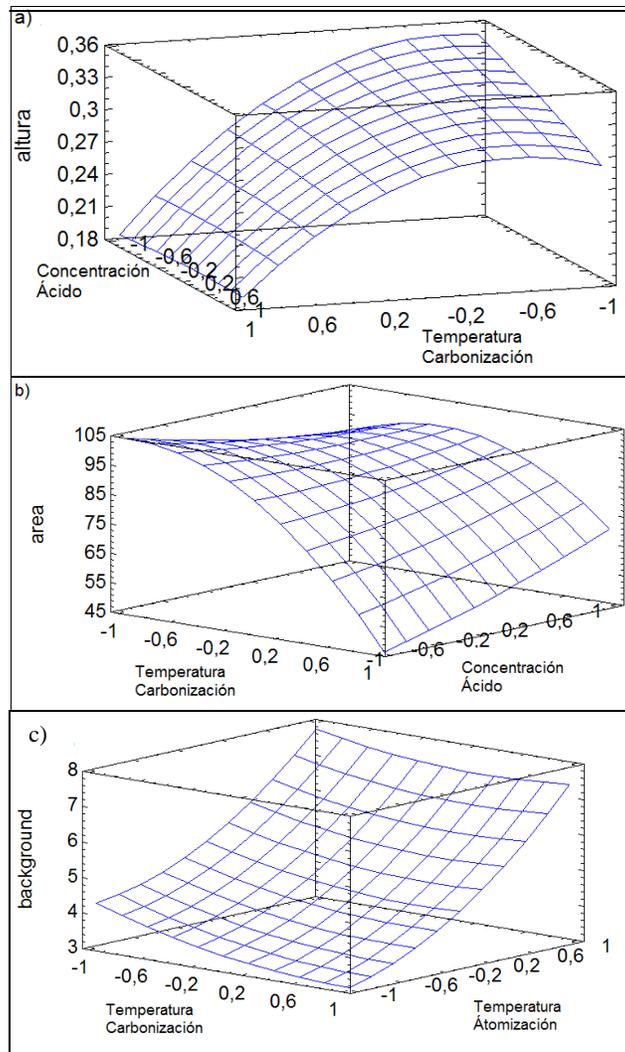


Figura 5.9 Gráfico correspondientes a las interacciones para: a) altura con respecto a la T° carbonización y la concentración de ácido, b) área con respecto a la T° de carbonización y la concentración de ácido y c) señal de *background* para los factores T° atomización y carbonización.

Para probar la idoneidad de los modelos calculados, se llevó a cabo el test de carencia de ajuste (Lack of fit) dando como resultado un valor de p mayor que el nivel de significancia elegido ($\alpha=0,05$) por lo tanto todas las ecuaciones encontradas para las variables mas importantes (área, altura y señal de *background*) explican satisfactoriamente los datos observados.

Los modelos matemáticos obtenidos para las variables área, altura y señal de *background* son:

$$\text{Altura} = 0,305855 - 0,0663333*A - 0,00841667*B - 0,0138889*C - 0,0498424*A^2 - 0,004125*AB + 0,015875*AC + 0,00440758*B^2 - 0,00233333*BC - 0,00234242*C^2$$

$$\text{Área} = 0,0911345 - 0,0192833*A - 0,00363889*B + 0,00275556*C - 0,0151124*A^2 - 0,001625*AB + 0,009925*AC + 0,0103209*B^2 + 0,00154167*BC + 0,00163758*C^2$$

$$\text{Background} = 0,00465455 - 0,000388889*A + 0,00197222*B - 0,000166667*C + 0,000290909*A^2 + 0,000208333*AB + 0,000208333*AC + 0,000707576*B^2 - 0,000375*BC - 0,0000424242*C^2$$

La tabla 5.12 muestra los niveles óptimos para cada factor, referido a las soluciones acuosas. La elección de los niveles óptimos se realizó de acuerdo a los resultados obtenidos del ANOVA que condujeran a minimizar especialmente la señal de *background* sin pérdidas del analito en la fase de carbonización, a la obtención de un tiempo de aparición de la señal lo mas cercano al inicio de la fase de atomización, aun cuando en esas condiciones se obtuviera un área o altura de *peak* inferior. En el último caso se privilegió la obtención de una señal mas apropiada para la correcta integración.

Tabla 5.12 Niveles Óptimos para soluciones acuosas

Factor	Nivel Óptimo
Temperatura de Carbonización	900°C
Temperatura de Atomización	1800°C
Cantidad de ácido	0,2% v/v

Con los factores optimizados se procedió a realizar una curva de calibración en solución acuosa. De acuerdo a los resultados obtenidos para la señal de *background*, al ser aumentada al final del tiempo de integración, se bajó ésta a dos segundos, asegurando un procesamiento más exacto de la señal. La figura 5.10 muestra la curva de calibración resultante, después del respectivo diseño exploratorio y optimización y la tabla 5.13 muestra los parámetros analíticos para ésta regresión. Los valores de LOD y LOQ fueron calculados con los tres primeros puntos de la regresión.

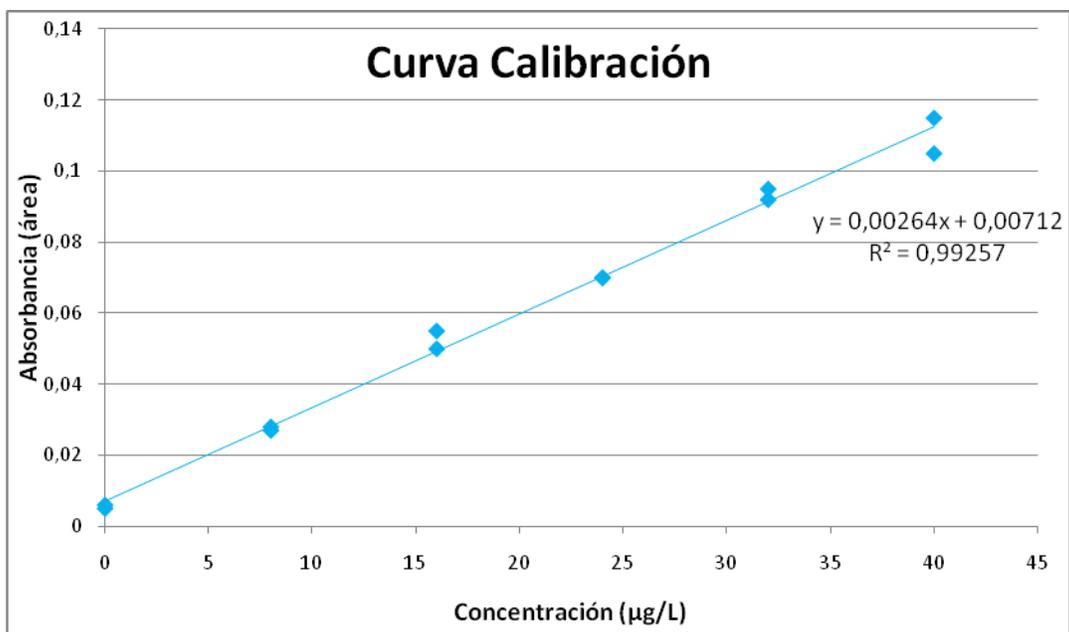


Figura 5.10 Curva calibración para las soluciones acuosas, usando valores de optimización

Tabla 5.13 Parámetros de Calidad Analítica

Parámetros Analíticos	
Coefficiente de correlación	0,99639077
Coefficiente de determinación R ²	0,99279457
Error típico	0,00240312
LOD (µg/L)	2,44378165
LOQ (µg/L)	8,14593884

Finalmente, se comparó la curva de adición estándar de cada tipo de matriz en muestras elegidas al azar con la curva de calibración acuosa, obteniéndose los gráficos de la figura 5.11.

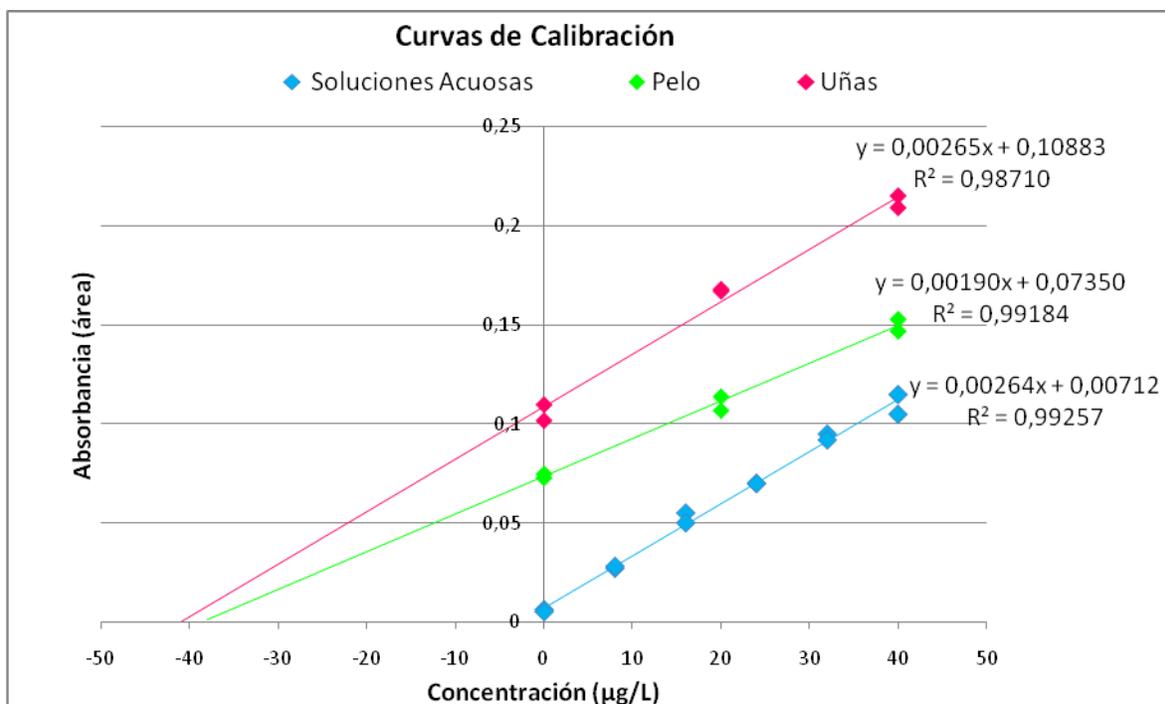


Figura 5.11 Curva calibración acuosa vs matriz uña y matriz pelo.

De los resultados de las curvas de calibración se puede observar que las pendientes de ambas matrices difieren entre si, sin embargo la pendiente de la regresión en matriz uñas no difiere de la pendiente de la regresión en solución acuosa, lo que si ocurre en la matriz pelo. Esto implica la existencia de un leve efecto interferente entre la matriz y el analito, justificando así el uso del método de adición estándar para cuantificar la cantidad de plomo presente en ambas matrices.

5.6 Resultados en muestras reales

Basándose en los resultados obtenidos del diseño experimental aplicado a las matrices, se procedió a evaluar el contenido de plomo en 10 pares de muestras provenientes de voluntarios no expuestos a fuentes directas de plomo. Para esto se utilizó la técnica de adición estándar.

La tabla 5.14 muestra los resultados obtenidos en cuanto a concentración, para los 10 pares de muestras y la tabla 5.15 presenta los resultados expresados en µg por gramo de muestra.

Tabla 5.14 Resultados en muestras reales de pelo y uñas

N° Muestra	Concentración en Pelo ($\mu\text{g/L}$)	Ecuación de regresión	Concentración en Uñas ($\mu\text{g/L}$)	Ecuación de regresión
1	8,77 \pm 0,038	y=0,00213x+0,01817 R ² =0,987	18,3 \pm 0,041	y=0,00233x+0,03950 R ² =0,986
2	3,66 \pm 0,039	y=0,00218x+0,01200 R ² =0,978	4,75 \pm 0,036	y=0,00204x+0,00908 R ² =0,979
3	15,26 \pm 0,032	y=0,00180x+0,03083 R ² =0,997	12,76 \pm 0,028	y=0,00159x+0,02325 R ² =0,993
4	9,88 \pm 0,032	y=0,00179x+0,01475 R ² =0,957	6,75 \pm 0,033	y=0,00185x+0,01683 R ² =0,985
5	7,04 \pm 0,037	y=0,00211x+0,01508 R ² =0,991	37,6 \pm 0,028	y=0,00160x+0,05433 R ² =0,991
6	12,78 \pm 0,037	y=0,00210x+0,02150 R ² =0,989	10,66 \pm 0,032	y=0,00181x+0,01892 R ² =0,998
7	6,94 \pm 0,034	y=0,00194x+0,01392 R ² =0,997	22,18 \pm 0,028	y=0,00156x+0,03425 R ² =0,985
8	21,13 \pm 0,028	y=0,00158x+0,03033 R ² =0,997	13,78 \pm 0,035	y=0,00196x+0,02475 R ² =0,997
9	9,42 \pm 0,040	y=0,00226x+0,01858 R ² =0,978	15,13 \pm 0,026	y=0,00149x+0,02408 R ² =0,992
10	7 \pm 0,041	y=0,00228x+0,01283 R ² =0,978	8,05 \pm 0,030	y=0,00168x+0,01033 R ² =0,980

Tabla 5.15 Concentraciones de Pb en muestras de pelo y uñas expresadas en μg por gramo de muestra.

Pelo ($\mu\text{g} / \text{g}$ de muestra)	Uña ($\mu\text{g} / \text{g}$ de muestra)
2,19	4,58
0,92	1,19
3,82	3,19
2,45	1,69
1,76	9,40
3,20	2,67
1,74	5,55
5,28	3,45
2,36	3,78
1,75	2,01

Según los resultados obtenidos, las concentraciones en uñas tienden a ser mayores que en pelo, lo que está de acuerdo con los datos de la bibliografía. Estos resultados sugerirían que las uñas son mejores indicadores que el pelo debido principalmente a que producen una mayor bioacumulación de metal dentro de su estructura que en pelo. Sin embargo una mejor aproximación se podría encontrar con un mayor número de muestras y un acabado estudio estadístico. Según los datos presentados en la tabla 5.14, los valores de R² para ambas matrices indican una buena correlación

entre los datos y su confiabilidad para usar el método de calibración por adición estándar para la cuantificación de Plomo en este tipo de muestra.

Es importante resaltar que no existen datos sobre población no expuesta a fuentes contaminantes de Plomo en éste tipo de matrices correspondientes a la ciudad de Santiago, por lo que sería de mucha utilidad comprobar la efectividad de ésta técnica en un número mayor de muestras.

6. Conclusiones

- Con respecto al uso de molienda criogénica:

La molienda criogénica presenta ventajas comparativas sobre los otros métodos de molienda, ya que es un método práctico y eficiente para moler las matrices orgánicas, de fácil uso y eficiente en el gasto de nitrógeno líquido. En pocos minutos es capaz de moler una gran cantidad de muestras, presentando poca pérdida de material sólido, durante el proceso.

Además, luego de someter las muestras al proceso de molienda se obtiene un tamaño de partícula adecuado para trabajar inmediatamente en la preparación de las suspensiones, disminuyendo así el tiempo total del análisis.

- Con respecto a la preparación y medición de la suspensión

La suspensión debe prepararse con partículas de la fracción entre $45\mu\text{m}$ y $38\mu\text{m}$, usando 20 mg de material, agitando la suspensión antes de cada medición e inyectando $10\mu\text{L}$ dentro del horno de grafito.

La aplicación de un diseño estadístico multivariado fue exitosa, ya que se pudo dilucidar los factores significativos en el desarrollo del método analítico, junto con la obtención de los parámetros adecuados para preparar la suspensión y algunos de los parámetros adecuados para su medición instrumental. Entre los factores estudiados para las cinco variables consideradas se definió glicerol al 2% p/v como surfactante, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ como modificador de matriz en una concentración de 2% v/v, HNO_3 al 0,5% v/v para el caso de ambas matrices y 0,2% v/v de ácido para el caso de las soluciones acuosas.

- Con respecto al programa de temperaturas adecuadas:

Las temperaturas adecuadas para maximizar la señal analítica son: Temperatura de carbonización 1000°C y Temperatura de atomización 2200°C para ambas matrices y 900°C y 1800°C para carbonización y atomización en el caso de las soluciones acuosas, respectivamente.

- Con respecto al uso de suspensiones

Según los resultados obtenidos durante todo éste estudio, se puede concluir que es posible utilizar suspensiones de pelo y uñas para cuantificar la cantidad de Plomo existente en población no expuesta.

7. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Taylor, A. "Atomic Spectrometry update – Clinical and Biological materials, food and beverages". *Journal of Atomic Absorption Spectrometry*, **13**, 57R (1998).
- 2.- Sepúlveda V, Vega J. "Exposición severa a plomo ambiental en una población infantil de Antofagasta, Chile". *Revista Médica Chile*, **128**, 221-232 (2000).
- 3.- Rabinowitz, M., Wetherill, G., Kopple, J. "Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans". *The Journal of Clinical Investigation*, **58**, 260-270 (1976).
- 4.- Barbosa, F., Tanus-Santos, J., Gerlach, R., Parsons, P. "A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: Advantages, limitations, and future needs". *Environmental of Health Perspectives*, **113**, 1669-1674 (2005).
- 5.- Mehra, R., Juneja, M. "Fingernails as biological indices of metal exposure". *Journal of Bioscience*, **30**, 253-257 (2005).
- 6.- Wolfsperger, M., Hauser, G. "Heavy metals in human hair samples from Austria and Italy – Influence of sex and smoking habits". *Science of Total Environment*, **156**, 235-242 (1994).
- 7.- Mortada, W., Sobh, M. "Reference intervals of Cadmium, lead and Mercury in blood, urine, hair and nails among residents in Mansoura city, Nile Delta, Egypt". *Environmental Research Section A*, **90**, 104–110 (2002).
- 8.- Kintz, P. "Value of hair analysis in postmortem toxicology". *Journal of Forensic Science International*, **142**, 127-134 (2004).
- 9.- Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, A., Moreda-Piñeiro, J., Bermejo-Barrera, A. "Slurry sampling Electrothermal Atomic Absorption Spectrometric Determination of Lead, Cadmium and Manganese in human hair samples using rapid atomizer programs". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **12**, 301-306 (1997).
- 10.- Stupar, J., Dolinsek. "Determination of Chromium, Manganese, Lead and Cadmium in biological samples including hair using direct electrothermal atomic absorption spectrometry". *Spectrochimica Acta part B*, **51**, 665 – 683 (1996)
- 11.- Ribeiro, A., Curtius, A., Pozebon, D. "Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide". *Microchemical Journal*, **64**, 105-110 (2000)
- 12.- Kamogawa, M., Nogueira, A. "A new strategy for preparation of hair slurries using cryogenic grinding and water-soluble tertiary-amines medium". *Spectrochimica Acta part B*, **56**, 1973-1980 (2001)

- 13.- Viitak, A., Volynsky, A. "Simple procedure for the determination of Cd, Pb, As and Se in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry using colloidal Pd modifier". *Talanta*, **70**, 890-895 (2006).
- 14.- Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, A., Romero-Barbeito, T., Moreda-Piñeiro, J., Bermejo-Barrera, A. "Use of aqueous slurry sampling for the determination of lead in human hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **43**, 1099-1107 (1996).
- 15.- Menezes, M., Maia, E. "How suitable are scalp hair and toenail as biomonitors?". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **259**, 81-86 (2004)
- 16.- Sukumar, A. Subramanian, R. "Relative element levels in the paired samples of scalp hair and fingernails of patients from New Delhi". *Science of Total Environment*, **372**, 474-479 (2007)
- 17.- Mehra, R., Juneja, M. "Fingernails as biological indices of metal exposure". *Journal of Bioscience*, **30**, 253-257 (2005).
- 18.- Chakraborty, R., Das, A.K. "Literature study of microwave-assisted digestion using electrothermal atomic absorption spectrometry". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **355**, 99-111 (1996)
- 19.- Hoenig, M., Hoeyweghen, P. "Automated trace metal analysis of slurried samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Varian Instrument at Work*, (1987).
- 20.- Cal-Prieto, M., Felipe-Sotelo, M., Carlosena, A., Andrade, J. López-Mahía, P., Muniategui, S., Prada, D. "Slurry sampling for direct analysis of solid materials by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). A literature review from 1990-2000". *Talanta*, **56**, 1-51 (2002).
- 21.- Miller-Ihli, J. "Advances in ultrasonic slurry graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **345**, 482-489 (1993)
- 22.- Bendicho, C., de-Loos-Vollebregt, M.T.C. "The influence of pyrolysis and matrix modifiers for analysis of glass materials by GFAAS using slurry sample introduction". *Spectrochimica Acta B*, **45**, 679 (1990).
- 23.- Fernandes, K. Nogueira, A. "Determination of vanadium in human hair slurries by electrothermal atomic absorption spectrometry". *Talanta*, **71**, 1118-1123 (2007).
- 24.- Miller-Ihli, J. "Slurry sampling for graphite furnace atomic absorption spectrometry". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **337**, 271-274 (1990)
- 25.- Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P. "Chemometric investigation of systematic error in the analysis of biological materials by flame and electrothermal atomic absorption spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, **560**, 143-152 (2006)
- 26.- Felipe-Sotelo, M., Cal-Prieto, M. "Handling complex effects in slurry-sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry by multivariate calibration". *Analytica Chimica Acta*, **571**, 315-323 (2006)

27.- Cortes, E. "The significance of hair mineral analysis as a means for assessing internal body burdens of environmental pollutants: results from an IAEA coordinated research programme". *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **167**, 413-421 (1993)

28.- Santos junior, D., Barbosa junior, F. "Cryogenic grinding for Cooper, lead and manganese determination in human teeth by slurry sampling GFAAS". *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, **18**, 939-945 (2003)

29.- Santos junior, D., Barbosa junior, F. "Determination of Cd and Pb in food slurries by GFAAS using cryogenic grinding for sample preparation". *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **373**, 183-189 (2002).

30.- Jackson, K. "Electrothermal Atomization for Analytical Atomic Spectrometry". Wiley and Sons Ltd., West Sussex, England, 311-357.