



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

“Diferenciación y determinación de especies orgánicas (DMA y MMA) e inorgánicas de arsénico en algas *Porphyra columbina* y *Durvillaea antarctica* por HG-AAS para biomonitorización ambiental”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Ambiental por:

VERÓNICA ANDREA STUARDO CAAMAÑO

Director: Carmen Niedmann Dellinger

Co-director: Inés Ahumada

Santiago – Chile

2020

Índice General

Índice de tablas.....	IV
Índice de figuras.....	V
Abreviaturas.....	VI
Resumen.....	VIII
Summary.....	X
1 Introducción.....	1
1.1 El arsénico y sus propiedades químicas	1
1.2 El uso industrial del arsénico como fuente de contaminación	1
1.3 Transformaciones en el medio ambiente y en el medio biológico	2
1.4 Arsénico en los organismos marinos y su metabolismo en las algas marinas	3
1.5 Toxicidad de arsénico y sus metabolitos.....	6
1.6 Evaluación determinación analítica de especies de arsénico en muestras complejas .	8
1.7 Generación de Hidruros	10
1.8 Problemática actual en Chile y octava región	12
2 Hipótesis y Objetivos.....	14
2.1 Hipótesis.....	14
2.2 Objetivo General	14
2.3 Objetivos Específicos.....	14
3 Materiales	16
3.1 Estándares analíticos	16
3.2 Reactivos:.....	16
3.3 Insumos	16
3.4 Equipos.....	17
4 Métodos	18
4.1 Implementación y optimización de condiciones analíticas para formación de arsina gaseosa.	18
4.1.1 Evaluación de la respuesta de DMA y MMA en medio ácido	18
4.1.2 Evaluación de la respuesta de DMA y MMA frente a la capacidad reductora de borohidruro	18
4.1.3 Evaluación de respuesta y linealidad para Asi-DMA y MMA	19
4.2 Optimización de elución y separación en SPE.....	19
4.2.1 Evaluación capacidad de retención de la columna QAX.....	19

4.2.2	Evaluación del pH de elución para DMA y MMA	20
4.2.3	Estudio de interferencias entre los analitos DMA-MMA-Asi	21
4.3	Método de extracción de las especies DMA, MMA y Asi en algas.....	22
4.3.1	Recolección y Preparación del material utilizado como blanco matriz.....	22
4.3.2	Pre-tratamiento de la muestra	22
4.3.3	Elección y optimización de la etapa de clean-up para el Método de extracción.....	23
4.4	Optimización e Implementación del método de extracción	25
4.4.1	Método de extracción Optimizado.....	29
4.5	Validación del método analítico.....	30
4.5.1	Límites de detección y límites de cuantificación.....	30
4.5.2	Linealidad	31
4.5.3	Precisión y exactitud	31
4.5.4	Porcentaje de Recuperación (%R)	32
4.5.5	Determinación de la incertidumbre.....	34
4.6	Análisis de especies de arsénico en muestras de algas.....	36
4.6.1	Recolección de las muestras	36
4.6.2	Determinación analítica de DMA, MMA y As inorgánico en muestras de algas	40
5	Resultados.....	43
5.1	Implementación y optimización de condiciones analíticas para formación de arsina gaseosa.	43
5.1.1	Condiciones instrumentales	43
5.1.2	Evaluación de la respuesta de DMA y MMA en medio ácido	43
5.1.3	Evaluación de la respuesta de DMA y MMA frente a la capacidad reductora de Borohidruro	45
5.1.4	Evaluación de respuesta y linealidad para Asi-DMA y MMA	47
5.2	Optimización de SPE	48
5.2.1	Evaluación capacidad de retención de la columna	48
5.2.2	Evaluación del pH de elución para DMA y MMA	49
5.2.3	Estudio de interferencias entre los analitos DMA-MMA-Asi	50
5.3	Método de extracción de las especies DMA, MMA y Asi en algas.....	52
5.3.1	Elección del clean-up para el Método de extracción	52
5.4	Optimización e Implementación de la metodología analítica del método de extracción	54
5.4.1	Diseño Experimental.....	54
5.4.2	Resultados Diseño experimental DMA	56

5.4.3	Resultados Diseño experimental MMA.....	58
5.4.4	Resultados Diseño experimental Asi	60
5.4.5	Optimización de los factores determinantes del diseño experimental	61
5.5	Validación del método analítico implementado.....	65
5.5.1	Linealidad	65
5.5.2	Límites de cuantificación y detección.....	66
5.5.3	Precisión.....	67
5.5.4	Recuperación.....	71
5.5.5	Incertidumbre	71
5.6	Análisis de las muestras recolectadas por el método de extracción implementado ..	72
6	Discusión	77
6.1	Implementación y optimización de condiciones analíticas para la formación de arsina gaseosa.....	77
6.2	Evaluación capacidad de retención de la columna de amina cuaternaria de intercambio aniónico fuerte.....	78
6.3	Evaluación del pH de elución para DMA y MMA e interferencias por coelución entre DMA-MMA-Asi	79
6.4	Elección del clean-up para el método de extracción	80
6.5	Optimización e Implementación de la metodología analítica del método de extracción	80
6.6	Validación del método analítico implementado de extracción SPE seguido de detección por espectroscopía de absorción atómica y generador de hidruros (HG-AAS)...	81
7	Conclusiones.....	84
	Referencias.....	85
	Anexos.....	94

Índice de Tablas

Tabla 1. Valores de pH de los eluidos	20
Tabla 2. Modificaciones del método de extracción.	24
Tabla 3. Factores y valores del DE.	26
Tabla 4. Matriz de interacciones bifactoriales del DE.	26
Tabla 5. Niveles de la curva calibración.	31
Tabla 6. Fortificados para análisis de exactitud.	33
Tabla 7. Identificación y clasificación de las muestras recolectadas.	37
Tabla 8. Criterios de aceptación.	40
Tabla 9. Condiciones analíticas del sistema GH-AAS.	43
Tabla 10. Respuesta de DMA y MMA frente a diferentes concentraciones de HCl.	44
Tabla 11. Respuestas de DMA y MMA frente a diferentes concentraciones de HCl y NaBH ₄	45
Tabla 12. Concentraciones óptimas de trabajo de HCl y NaBH ₄ para las especies DMA, MMA y Asi.	47
Tabla 13. Rango lineal y ecuación de la recta por especie obtenida.	47
Tabla 14. Resultados análisis clean-up	52
Tabla 15. Análisis de varianza de DMA.	54
Tabla 16. Análisis de varianza de MMA.	54
Tabla 17. Análisis de varianza de Asi.	55
Tabla 18. Evaluación del volumen alícuota.	62
Tabla 19. Evaluación del tiempo en ultrasonido.	62
Tabla 20. Evaluación de la linealidad.	65
Tabla 21. Límites de detección y cuantificación instrumental y del método para DMA, MMA y Asi en matriz (m).	66
Tabla 22. Evaluación de la repetibilidad.	67
Tabla 23. Resultados reproducibilidad.	69
Tabla 24. Resultados de recuperación	71
Tabla 25. Incertidumbre combinada y relativa.	72
Tabla 26. Análisis de muestras de algas de <i>Porphyra columbina</i> (Luche) y <i>Durvillaea</i> antártica (cochayuyo).	73

Índice de Figuras

Figura 1 Bahía de Coronel. Puntos de recolección	38
Figura 2 Península Coliumo. Puntos de recolección	38
Figura 3 CTSM, mapa de puntos de succión y descarga	39
Figura 4 CTB Puntos de almacenamiento, succión y descarga	39
Figura 5 Efecto de la concentración de HCl sobre la respuesta de DMA y MMA en GH-AAS, empleando NaBH ₄ 0,5% (m/v)..	44
Figura 6, Respuesta frente a HCl y NaBH ₄	46
Figura 7. Capacidad de retención de especies de As en la columna QAX a los siguientes pHs: 7-8-9 y 11.....	48
Figura 8 Porcentajes de recuperación a diferente pH de elución.....	49
Figura 9. Recuperación por especie en cada eluido.....	50
Figura 10. Influencia entre las especies por eluido.....	51
Figura 11 a. Gráficos resultados de DE para DMA	56
Figura 11 b: Gráficos del DE MMA.....	58
Figura 11 c. Gráficos resultados DE para Asi.....	60
Figura 12. Optimización del tiempo de tratamiento con ultrasonido en el proceso de extracción de DMA, MMA y Asi.....	63
Figura 13. Optimización del volumen de alícuota para el proceso de extracción de DMA, MMA y Asi.....	63
Figura 14. Diagrama método de extracción implementado.....	64
Figura 15. Controles para la evaluación de repetibilidad..	68
Figura 16. Controles para evaluación de reproducibilidad.....	70
Figura 17. Determinación de DMA en muestras de Coronel y Coliumo.....	74
Figura 18. Determinación de Asi en muestras de Coronel y Coliumo.	74
Figura 19. Determinación de DMA, MMA y Asi frente al total de muestras analizadas.....	75
Figura 20. Concentración de DMA (mg*kg ⁻¹) en cada zona de Coronel por Punto de recolección	75
Figura 21. Promedio de hallazgos DMA (mg*kg ⁻¹) en muestras de <i>Porphyra Columbina</i> por punto de recolección, Bahía de Coronel.	76
Figura 22. Comparación del % de muestras con Asi detectado frente al total de las muestras analizadas en Coronel por punto de recolección.....	76

Abreviaturas

AOAC: Asociación de químicos agrícolas oficiales (Association of Official Agricultural Chemists).

Asi: Arsénico inorgánico

As (III): Arsenito

As (V): Arseniato

AsB: Arsenobetaína

AsC: Arsenocolina

AsAz: Arsenoazúcares

AsLip: Arsenolípidos

BMDL0.5: Límite inferior de Asi en la dosis de referencia para una incidencia incrementada de 0.5% de cáncer de pulmón (lower limit on the benchmark dose for a 0,5% response).

CTB: Central termoeléctrica Bocamina

CTSM: Central termoeléctrica Santa María

Cc: Curva de calibración

CV%: Coeficiente de variación relativo

CV: Coeficiente de variación

CVh%: Coeficiente de variación de Horwitz

DE: Diseño experimental

DMA: Ácido dimetil arsénico.

DMAE: Dimetilarsiniletanol

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

HG-AAS: Espectrofotometría de absorción atómica acoplada a generación de hidruros (Hydride generation with atomic absorption spectrometry).

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución (High pressure liquid chromatography).

IDA: ingesta diaria admisible.

ISTP: ingesta semanal tolerable provisional.

JECFA: Organización Conjunta de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
/Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios.

LD₅₀: Dosis letal 50 (Letal dosis 50).

LOD i: Límite de detección instrumental

LOD m: Límite de detección del método de extracción

Abreviaturas

LOQ i: Límite de cuantificación instrumental

LOQ m: Límite de cuantificación del método de extracción

MMA: Ácido monometil arsónico.

pc: peso corporal

% R: Porcentaje de recuperación del analito

Redox: Óxido-reducción

rpm revoluciones por minuto.

SAM: S-Adenosil metionina.

SAX: Columna de amina cuaternaria, marca Phenomenex.

SPE: Extracción en fase sólida

QAX: Columna de amina cuaternaria, marca UCT.

t_{calc}: t student calculada

t_{crit}: t student crítica de tabla

TMA: Trimetiarsina

TMAO: Óxido de trimetilarsina.

Resumen

El arsénico es uno de los tóxicos ambientales más nocivo a la salud. La toxicidad del arsénico depende de su especie química y de su grado de oxidación. Las especies químicas del arsénico pueden clasificarse en dos grandes grupos: especies arsenicales inorgánicas y orgánicas.

El arsenito [As (III)] y el arseniato [As (V)] son las dos especies inorgánicas mayoritarias presentes en el medio ambiente. Los efectos adversos del As en la salud humana han sido estudiados de forma casi exclusiva para el Asi, el cual está clasificado como cancerígeno humano (Grupo I) por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2002).

Por su gran importancia como agente tóxico ambiental, es de gran interés conocer su incidencia sobre los seres vivos. Desde un punto de vista biológico-ambiental, la determinación de arsénico en algas es relevante, pues, las algas marinas pueden acumular metales en altas concentraciones en comparación con otros microorganismos o en el agua de mar, lo que los hace buenos monitores de contaminación en las aguas costeras.

En el presente estudio se implementó un método analítico para la determinación de DMA, MMA y Asi en muestras de algas marinas mediante su extracción por SPE con la técnica de intercambio iónico utilizando una columna de amina cuaternaria (QAX) y acoplada a la técnica de detección de HG-AAS. Se agregó a la etapa de extracción un método de limpieza que permitió disminuir las interferencias durante la etapa de separación en la columna. Se utilizaron tres solventes de elución: H_3BO_3 (pH 4,5), CH_3COOH (pH 3) y HNO_3 (pH <1) que se agregaron a la columna en orden descendente de pH eluyendo separadamente las especies en el siguiente orden: DMA, MMA y Asi.

Para la extracción de los tres analitos desde la matriz de algas, se utilizó la técnica de sonicación en baño de ultrasonido por cavitación acústica de las especies hacia el medio (H_2O_2 3% y HNO_3 0,1 M) y posterior precipitación de las principales interferencias (mucopolisacáridos) en la columna QAX, con solvente de etanol, aplicando temperaturas inferiores a -10°C .

Para DMA el LOD fue de $216 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y LOQ de $717 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, para MMA el LOD fue de $94 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y LOQ $313 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y finalmente para Asi el LOD fue de $54 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y LOQ de $178 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. La recuperación alcanzada para DMA cumplió con los criterios de aceptación de la AOAC (85,7-94, 3%) y para Asi (95,9 – 92,4%), en ambos casos con un t_{calc} menor al t_{crit} . Para MMA el porcentaje de recuperación alcanzado en los tres niveles evaluados no cumplió con los criterios antes mencionados (80,4%, 75,2% y 68,1%) con un t_{calc} mayor que el t_{crit} , por lo tanto, el método implementado sólo fue aplicable para DMA y Asi de acuerdo con los criterios de validación evaluados.

El método de análisis implementado y validado fue utilizado para analizar un total de veintinueve muestras de algas marinas. Diecinueve muestras analizadas en la localidad de Coronel (sector industrial de mayor riesgo de contaminación ambiental) y diez muestras en la localidad de Coliumo, Tomé (zona lejana a industrias). En el total de las muestras analizadas se encontró DMA con una concentración promedio de $1,89 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en Coronel y $1,38 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ en Coliumo. Ninguna muestra presentó señal detectable para MMA. Para Asi se encontraron dos muestras de *Porphyra columbina* de la localidad de Coronel, con una concentración promedio de $0,28 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y doce muestras (once muestras de *Porphyra columbina* y una muestra de *Durvillaea antarctica*) contenían concentraciones trazas superiores al LOD y menores al LOQ.

En base a los criterios vigentes, las cantidades de arsénico inorgánico encontradas fueron elevadas pero no tendrían un efecto nocivo para la salud, sin embargo, no se puede asegurar cuáles serían los efectos sobre la exposición prolongada respecto del BMDL DMA, MMA y Asi, pues se requieren estudios más profundos que consideren también la influencia del estado nutricional de cada individuo.

El método implementado y validado de SPE por columna QAX acoplado con una etapa de clean up y sistema de detección HG-AAS presentó un nuevo enfoque de especiación, y demostró ser adecuado para la cuantificación de Asi y DMA en muestras de algas marinas, utilizando una instrumentación económica y al alcance de muchos laboratorios de salud pública en Chile, para el control y vigilancia sanitaria ambiental.

Summary

Arsenic is one of the most harmful environmental toxins to health. The toxicity of arsenic depends on its chemical species and its degree of oxidation. Arsenic chemical species can be classified into two large groups: inorganic and organic arsenical species.

Arsenite [As (III)] and arsenate [As (V)] are the two major inorganic species present in the environment. The adverse effects of Arsenic on human health have been studied almost exclusively for inorganic As, which is classified as a human carcinogen (Group I) by the International Agency for Research on Cancer (IARC, 2002).

Because of its great importance as an environmental toxic agent, it is of great interest to know its incidence of living beings. From a biological-environmental point of view, the determination of arsenic in algae is relevant, since seaweeds can accumulate metals in high concentrations compared to other microorganisms or in seawater, which makes them good pollution monitors in The coastal waters.

In the present study, an analytical method for the determination of DMA, MMA and Asi in marine algae samples was implemented by SPE extraction with the ion exchange technique using a quaternary amine column (QAX) and coupled to the detection technique from HG-AAS. A cleaning method was added to the extraction stage that allowed reducing the interference during the column separation stage. three elution solvents were used: H_3BO_3 (pH 4.5), CH_3COOH (pH 3) and HNO_3 (pH <1) that were added to the column in descending order of pH, eluting the species separately in the following order: DMA, MMA and iAs.

For the extraction of the three analytes from the algae matrix, the sonication technique was used in ultrasonic bath by acoustic cavitation of the species towards the medium (H_2O_2 3% and HNO_3 0.1 M) and subsequent precipitation of the main interferences (mucopolysaccharides) in the QAX column, with ethanol solvent, applying temperatures below -10°C .

For DMA the LOD was $216\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and LOQ of $717\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, for MMA the LOD was $94\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and LOQ $313\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and finally for Thus the LOD was $54\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and LOQ of $178\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The recovery achieved for DMA met the AOAC acceptance criteria (85.7-94, 3%)

and for Asi (95.9 - 92.4%), in both cases with a t_{calc} less than the critical rate. For MMA, the percentage of recovery reached in the three levels evaluated did not meet the aforementioned criteria (80.4%, 75.2%, and 68.1%) with a t_{calc} greater than the t_{crit} , therefore, the method implemented it was only applicable for DMA and Asi according to the validation criteria evaluated.

The method of analysis implemented and validated was used to analyze a total of twenty nine samples of seaweed. Nine teen samples analyzed in the town of Coronel (industrial sector with the highest risk of environmental pollution) and ten samples in the town of Coliumo, Tomé (area far from industries). In the total of the samples analyzed, AMD was found with an average concentration of $1.89 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in Coronel and $1.38 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ in Coliumo. No sample presented a detectable signal for MMA. For Asi, two samples of *Porphyra columbina* from the locality of Coronel were found, with an average concentration of $0.28 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, besides, twelve samples were found to contain trace concentrations higher than the LOD and lower than the LOQ of Asi.

Based on the current criteria, the amounts of inorganic arsenic found would not hurt health, however, the risks of the effects of prolonged exposure to the BMDL of DMA, MMA and Asi cannot be controlled, since deeper studies that also consider the influence of the nutritional status of each individual.

The method implemented and validated SPE by QAX column coupled with a clean up stage and HG-AAS detection system introduced a new speciation approach, and proved to be suitable for the quantification of Asi and DMA in seaweed samples, using a economic instrumentation within the reach of many public health laboratories in Chile, for environmental health control and surveillance

1 Introducción

1.1 El arsénico y sus propiedades químicas

El arsénico, un metaloide, se produce naturalmente, es el elemento número 33 más abundante en la corteza terrestre y es un componente de más de 245 minerales.

El arsénico es un elemento químico de número atómico 33, masa atómica 74,92, símbolo As. Su configuración electrónica es $[\text{Ar}]3d^{10}4s^24p^3$ y presenta 4 estados de oxidación (-III, 0, III y V) [1,2]. Es un metaloide, es decir, tiene un comportamiento intermedio entre un metal y un no metal. Las formas no metálicas son más predominantes y forman más fácilmente aniones que cationes, así, la mayoría de las reacciones analíticas en medio acuoso forman arsenitos o arseniatos.

El arsénico es un sólido que presenta dos formas alotrópicas cristalinas a presión atmosférica. La más importante de las dos es el arsénico gris, una forma metálica estable, frágil, quebradiza, de estructura romboédrica y conductora del calor y de la electricidad. El arsénico gris recién cortado, posee un característico brillo metálico, pero se torna opaco al exponerlo al aire. Al calentarse, se oxida rápidamente a óxido de arsénico (III). La segunda forma alotrópica, el arsénico amarillo, se obtiene por enfriamiento brusco del vapor procedente de la sublimación del arsénico gris, constituido por moléculas tetraédricas de As. El arsénico amarillo presenta estructura cúbica, no conductora, inestable, translúcida y de baja densidad (1,97 g cm⁻³), que revierte a la forma gris al exponerlo a la luz o al calor. Además de estas dos formas cristalinas, se conoce una variedad amorfa, el arsénico negro, que es un sólido no metálico y es isoestructural con el fósforo negro, que presenta tres modificaciones diferentes dependiendo de la temperatura, y que da lugar al arsénico gris si se calienta por encima de 270°C [3].

1.2 El uso industrial del arsénico como fuente de contaminación

El arsénico tiene numerosas aplicaciones industriales que son consideradas como potenciales fuentes de contaminación del agua, suelo y aire [4], como en la industria del vidrio y en la de los semiconductores, en el curtido de pieles y también, pero en grado más limitado, en la fabricación de pesticidas, fungicidas, promotor del crecimiento de algunos animales de granja y aditivo para piensos de animales y en la manufactura de diversos productos farmacéuticos. Asimismo, se emplea como conservante para madera y medicamento contra el cáncer, así como en pigmentos, fuegos artificiales y armamentos. Sin embargo, las principales

fuentes antropogénicas de arsénico proceden del empleo de combustibles fósiles para la producción de energía y de la fundición de metales no ferrosos en las actividades mineras, en las que el arsénico puede ser un subproducto en la extracción de diversos minerales [4,5].

A partir de los procesos de fundición y tostación de los minerales de plomo, cinc, oro y cobre se producen emanaciones de gases y partículas que contienen arsénico, en la forma de óxido arsenioso (As_2O_3), el cual puede permanecer en el aire por varios días y ser movilizadopor el viento largas distancias, pudiendo contaminar aguas, sedimentos y suelos a lo largo de su trayectoria.

1.3 Transformaciones en el medio ambiente y en el medio biológico

El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en el medioambiente, debido tanto a fuentes naturales como fuentes antropogénicas. Es el principal constituyente de más de 200 especies de minerales, de las cuales más del 60% están a la forma de arsenatos, 20% como sulfuros y sales de sulfato, junto con cobre, níquel, plomo, cobalto u otros metales y el 20% restante se encuentra como arseniuros, arsenitos, óxidos y arsénico elemental [4].

El arsénico y sus compuestos son móviles en el medio ambiente. La meteorización de las rocas convierte los sulfuros de arsénico en trióxido de arsénico, que ingresa al ciclo del arsénico como polvo o por disolución en lluvia, ríos o aguas subterráneas. Por lo tanto, la contaminación de las aguas subterráneas por arsénico es una seria amenaza para la humanidad en todo el mundo. También puede entrar en la cadena alimentaria causando una amplia distribución en los reinos de plantas y animales.

El contenido medio de arsénico en la corteza terrestre es de $2,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [6], pudiéndose encontrar en rocas ígneas, metamórficas o sedimentarias. Las concentraciones de arsénico encontradas en rocas ígneas van de 1 a $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Concentraciones más altas se encuentran en rocas sedimentarias arcillosas de hasta 900 mg de As por kilo.

El arsénico también es posible encontrar en la atmósfera, debido a que algunos de sus compuestos son relativamente volátiles contribuyendo de manera significativa su presencia en ésta. El 60% del arsénico en la atmósfera corresponde a fuentes naturales y el resto a fuentes antropogénicas. La actividad volcánica y la volatilización de arsénico a baja temperatura constituyen las principales fuentes naturales de emisión de arsénico a la atmósfera [4].

Por último, el As también está presente en las aguas naturales, como consecuencia de reacciones geoquímicas, donde se libera el arsénico desde los minerales que lo contienen dando lugar a la contaminación natural de acuíferos [7]. En aguas libres de contaminación y en aguas subterráneas las concentraciones típicas están dentro del rango de $1\text{-}10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. En aguas

superficiales y aguas subterráneas de áreas de mineralización de sulfuros se pueden encontrar concentraciones del orden de 100-5000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Como se logra destacar, la concentración de arsénico varía dependiendo de la fuente y de las propiedades geoquímicas y niveles de concentración del suelo. Un aumento en la concentración de fosfatos derivados de fertilizantes y de la descomposición de los materiales orgánicos naturales en el agua, podría haber promovido el crecimiento de la biota de sedimentos y la consecuente desorción de arsénico desde los sedimentos hacia acuíferos de aguas subterráneas.

El arsénico se encuentra en aguas naturales generalmente como arsenitos y arseniatos, dependiendo de las condiciones redox, el pH y la actividad biológica [8]. En general, el estado de oxidación V predomina bajo condiciones oxidantes, como es el caso de las aguas superficiales [8]. Sin embargo, en aguas menos oxigenadas como es el caso de las aguas subterráneas, pueden encontrarse arsénico tanto en estado de oxidación III como V.

Las especies orgánicas de arsénico suelen estar presentes en menores concentraciones que las inorgánicas, aunque su concentración puede aumentar como consecuencia de diversos procesos, como reacciones de metilación, desorción de partículas de los sedimentos, recirculaciones, vertidos, etc.

Respecto de las cantidades de arsénico presentes en las aguas marinas, los organismos marinos pueden acumular cantidades considerables de compuestos orgánicos de arsénico. La concentración de arsénico es mayor en organismos marinos que en organismos de aguas dulce. [9]. Las cantidades de arsénico en agua marina están distribuidas en los diferentes compartimientos principalmente; arseniato en agua de mar, carbohidratos que contienen arsénico en algas y AsB en animales [10]. Las concentraciones resultantes de As en la biota marina surgen de una serie de interacciones complejas entre varios procesos en donde se ve reflejado la cantidad de metal absorbido por el organismo, la proporción de As que es distribuido a cada uno de sus tejidos, y la medida en que éste entra y puede ser retenido en cada compartimento celular. Con respecto a esto último, si existe requerimiento metabólico para este metal, la concentración que puede ser tolerada en el organismo sin haber iniciado mecanismos de desintoxicación, el rol que cumple el tejido como fuente de almacenamiento es primordial.

1.4 Arsénico en los organismos marinos y su metabolismo en las algas marinas

El arsénico se encuentra principalmente en sus formas orgánicas, aunque el arsénico inorgánico también puede estar presente, en los diferentes organismos marinos que son utilizados como alimento en humanos (pescados, crustáceos, moluscos, algas, etc). El arsénico

orgánico se encuentra prácticamente en todas las especies marinas principalmente como AsB, compuesto que contiene un átomo de arsénico pentavalente, el cual se ha demostrado que es metabólicamente inerte y no tóxico [11]. En las algas se destacan los AsAZ y AsLip [10].

El ión tetrametilarsonio se ha encontrado en algunos moluscos gasterópodos [12, 13] óxido de trimetilarsiosa en algunos peces [10] y carbohidratos que contienen arsénico (presumiblemente que resulta directamente del consumo de algas) en algunos moluscos bivalvos [12]. Los riesgos que presentan estos compuestos deben evaluarse en el contexto de su ocurrencia, sus concentraciones y la importancia de los organismos que los contienen respecto a la dieta de cada persona.

La ingesta de compuestos orgánicos de arsénico, como los presentes en pescados, mariscos y algas, hace incrementar los niveles de arsénico en orina en los humanos [14, 15].

En la flora y fauna marinas, el proceso comienza con la absorción de arseniato por parte de las algas marinas, el cual se transforma en compuestos orgánicos de diversa complejidad, como AsAZ y especies liposolubles. Las especies MMA y DMA son intermediarias en este proceso, por lo que también pueden encontrarse en las algas [16, 17]. Sin embargo, la transformación de arseniato en especies metiladas no continua hasta la formación de TMA, sino que se produce la transferencia del grupo adenosil de la SAM al átomo de arsénico. La hidrólisis de la adenina y posterior glicosidación dan lugar a los AsAZ, que a su vez son la base para la formación de AsLip. El grupo de investigación de Benson [81], fue el primero en estudiar la formación de AsLip en algas unicelulares, mediante el empleo de arseniato marcado isotópicamente y monitorización de los productos mediante radiocromatografía [4]. El tratamiento enzimático no permitió identificar correctamente los compuestos hidrosolubles en ese momento, aunque posteriormente fueron identificados como AsAZ [81, 82]. De acuerdo con Benson y Summons (1981) [81, 83], la biosíntesis de fosfolípidos que contienen arsénico puede facilitar la incorporación del arsénico a las bicapas lipídicas que forman la membrana celular, así como su paso a través de la membrana y posterior excreción. Por otro lado, la presencia de DMA en algas se podría explicar, además de por su acumulación durante la biosíntesis de AsAZ, por la descomposición parcial de los mismos [16].

La AsB es el compuesto mayoritario presente en la fauna marina, y su biosíntesis se ha propuesto a partir de los AsAZ presentes en las algas, incorporados a través de la cadena alimentaria. Este mecanismo comprende la descomposición de los AsAZ por microorganismos en condiciones anaerobias, dando lugar a DMAE. Una oxidación posterior, seguida de una metilación, conducen a la formación de AsB, siendo la AsC un compuesto intermedio del proceso de transformación [17]. Finalmente, tras la muerte de los organismos marinos, se

produce la degradación de la AsB en especies metiladas (MMA, DMA y TMAO) y arsénico inorgánico, por lo que estas especies pueden estar presentes en el agua [18].

Asimismo, es probable que la predominancia de AsB en la fauna marina se deba a la similitud entre arsénico y nitrógeno. Ambos elementos son capaces de formar betaínas, siendo la glicina betaína ((CH₃)₃N⁺+CH₂COO⁻) la más abundante e importante desde el punto de vista biológico. Este compuesto actúa a nivel de ajuste osmótico, estabilizando las membranas celulares de los organismos expuestos a cambios de salinidad en el agua donde se desarrollan [19]. Por lo tanto, cuando la salinidad es elevada, la célula absorbe pequeñas moléculas orgánicas cargadas, ya que a elevadas concentraciones son menos dañinas para las proteínas que los iones inorgánicos. La AsB ((CH₃)₃As⁺+CH₂COO⁻) es muy similar estructuralmente a la glicina betaína, por lo que es posible que las células no sean capaces de distinguirlas y absorban AsB a través del mismo sistema transportador [20].

Respecto a las macroalgas marinas, pueden concentrar metales a niveles muchas veces superiores a los encontrados en las aguas circundantes, debido en parte a la acumulación activa, y al secuestro de metales en vacuolas ricas en polifenoles. Los metales pueden ser adsorbidos sobre la superficie del alga [21, 22].

Las macroalgas pueden absorber algunos metales de forma proporcional a la concentración externa del agua [22, 23]. Por esta propiedad, las algas han sido utilizadas en fitorremediación, donde la biomasa algas es removida para reducir la carga contaminante acuática. En consideración, las algas toman algunos metales de forma proporcional a la concentración externa del agua circundante [22, 23].

De las algas pardas, del orden de las Laminariales y Fucales es sabido que son algas eficientes como biosorbentes de metales, pues presentan un elevado número de polisacáridos (alginatos) en la matriz de su pared celular. Los grupos carboxílicos son generalmente los más abundantes en la pared celular de las algas pardas y, por lo tanto, constituyen el mayor porcentaje de sitios activos (generalmente más del 70%).

La capacidad de adsorción de metales de las algas está directamente relacionada con la presencia de los sitios del alginato, polímero, que a su vez comprende un componente significativo (hasta el 40% del peso seco de las algas) [22]. El secuestro máximo o casi máximo se da a pH cerca de la constante de disociación aparente de los ácidos carboxílicos, que en algas pardas el pK₀ es cercano a 5. De esta forma los iones de As se unen a los centros activos de biosorción del material biológico mediante la formación de complejos, intercambio iónico, entre otros.

Además, la similitud entre el arsénico y otros miembros de su grupo, como fósforo y nitrógeno, es una de las razones que permite explicar la razón por la cual el arsénico llega a los organismos marinos y a las algas; En agua marina normal, a pH 8,1, el arsénico está presente fundamentalmente como As (V), y en concreto, como el oxoanión diprotonado H_2AsO_4^- ($\text{pK}_{a2} = 6,8$; radio iónico = 0,248 nm). El fosfato es un nutriente fundamental en el agua de mar, que también está presente como el oxoanión diprotonado H_2PO_4^- ($\text{pK}_{2a} = 7,2$; radio iónico = 0,238 nm) a pH 8,1. Las algas absorben el fosfato presente en el agua de mar mediante un sistema de transporte de membrana, el cual no es lo suficientemente selectivo como para discriminar entre ambas especies estructuralmente similares. Como resultado, el arsénico es capaz de acceder al interior celular de las algas, reemplazando al fosfato, lo que conduce a la disrupción de los procesos de fosforilación oxidativa, con el resultante efecto tóxico [24].

Por otro lado, las algas marinas pueden ser empleadas como bioindicadores de contaminación en aguas costeras, debido a su limitada movilidad, abundancia en los sistemas acuáticos y habilidad para capturar contaminantes lipofílicos presentes en el agua marina. Las algas son capaces de acumular estos compuestos debido principalmente a su elevada capacidad intercambiadora, permitiendo una rápida adsorción de compuestos hidrofóbicos [25].

1.5 Toxicidad de arsénico y sus metabolitos

Los compuestos del arsénico pueden encontrarse en la naturaleza de forma orgánica e inorgánica. Los compuestos inorgánicos del arsénico pueden presentarse como oxoaniones de arsenito (estado de oxidación III) y de arseniato (estado de oxidación V), como óxidos, cloruros y sulfuros en fase sólida y formando parte de minerales en la naturaleza. Los compuestos orgánicos del arsénico son productos del metabolismo en humanos y en la mayoría de los mamíferos y otros microorganismos, este mecanismo en general puede ser considerado como un proceso de desintoxicación, sin embargo, algunos de los metabolitos orgánicos, pueden ser tóxicos, de éstos los más destacados por su toxicidad son el ácido metilarsenioso (MMA) y ácido dimetilarsenioso (DMA) [26]. La presencia de estas especies trivalentes se puede considerar una evidencia directa del mecanismo de biometilación del arsénico [26].

La biometabolización del arsénico inorgánico se produce en el hígado por la reducción del arsénico pentavalente (As V) al arsénico trivalente (As III) con la posterior adición de grupos metilos mediadas por metiltransferasas a partir del co-sustrato de S-adenosilmetionina. Sin embargo, no se conoce completamente la secuencia de eventos en el metabolismo del arsénico. Se considera al glutatión (GSH) y otros grupos tioles como agentes reductores.

Estudios *in vitro* indican que se forma un complejo entre GSH y As III el cual es transportado en la bilis [27].

Estas reacciones de metilación han sido consideradas tradicionalmente como un mecanismo de detoxificación, ya que las especies metiladas de As(V) presentan una menor toxicidad y reactividad con los tejidos, que el arsénico inorgánico ingerido. Sin embargo, cuando la ingestión de arsénico inorgánico es elevada, las especies MMA(III) y DMA(III) también se han detectado en orina humana las cuales poseen un potente efecto tóxico [28].

El arsénico inorgánico y MMA (III) son potentes carcinógenos humanos ya que se han asociado con un incremento de riesgo de cáncer a la piel, pulmón, vejiga y riñones, tan bien como hiperqueratosis, cambios en la pigmentación, y otros efectos en el sistema circulatorio y nervioso. El mecanismo por el cual se produce la carcinogenicidad no ha sido esclarecido completamente, pero es sabido que el arsénico inorgánico produce ciertas deleciones mutagénicas y alteraciones cromosomales. Además, pudiera afectar la metilación del ADN, el estrés oxidativo y la proliferación celular [27]. El MMA III actúa inhibiendo la glutatión reductasa, que sintetiza a GSH y la mantiene reducida. Por otro lado, inhibe la tiorredoxina reductasa que utiliza NADPH como agente reductor [29].

Considerar también, que por otro lado se ha demostrado que la vida media de MMA V es menor que la de As V.

El As V absorbido dentro del organismo al reducirse a As III, se considera un mecanismo de bioactivación, pues el As III es mucho más tóxico que el As V y más reactivo en los diferentes tejidos [30, 31].

De este modo, se debe mencionar que la toxicidad del arsénico depende no sólo de su forma química sino también de su estado de oxidación. Según los datos de dosis letal 50 (DL50) obtenidos en animales de experimentación, definida como la dosis necesaria para producir la muerte del 50% de la población expuesta, la toxicidad de las especies arsenicales seguiría el orden decreciente: As (III) > As(V) > TMA+ > MMA > DMA > AsC > AsB = TMAO. En base a estos datos se consideraba que las especies arsenicales más tóxicas eran el As (III) y el As (V) y que la metilación de estas formas inorgánicas constituía, excepto en el caso del TMA+, una vía de detoxificación. Sin embargo, el descubrimiento de las especies arsenicales trivalentes MMA(III) y DMA(III) en orina de personas expuestas a altos niveles de arsénico [30], modificó la idea de que la metilación del arsénico inorgánico suponía su detoxificación. La especie MMA(III) puede llegar a ser hasta 26 veces más tóxica que el As (III) [31, 32].

Las concentraciones de ambos compuestos pueden encontrarse en orina, haciéndose más difícil poder detectar MMA III o As III, debido a que éstos se oxidan muy rápido a la forma pentavalente.

1.6 Evaluación determinación analítica de especies de arsénico en muestras complejas

Por lo anteriormente mencionado, el arsénico es un elemento de gran interés para estudios de análisis ambiental, debido a sus propiedades tóxicas, por lo que ha sido ampliamente estudiado por la Comunidad Científica. Desde finales de 1960 la evidencia científica ha ido en aumento, mostrando que altos niveles de As pueden causar lesiones cutáneas con efectos carcinógenos [33] y no carcinógenos [34]. Sin embargo, las correlaciones finales no se han establecido todavía. Por ello la importancia de evaluación de arsénico como impacto ambiental mediante la ingesta de éste a través de los alimentos. Hasta hace poco, la mayoría de los estudios se centraron en la determinación del total de As en la dieta, sin embargo, como se puede ver, la determinación de su contenido total en una muestra es insuficiente, puesto que su toxicidad depende no solo de su nivel de concentración, sino también de la forma química bajo la que esté presente. Ya es sabido que las especies de arsénico inorgánico (Asi) (As (III) y As (IV)) son las formas más tóxicas.

Existe una preocupación mundial acerca de la exposición de Asi en la dieta y sus formas orgánicas más tóxicas y los riesgos de salud asociados han sido caracterizados en evaluaciones recientes por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la Organización Conjunta de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación /Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) de la Organización mundial de la Salud (FAO/OMS) [79]. En su 33ª reunión, este Comité asignó un ISTP de 0.015 mg/kg pc para Asi. Sin embargo, posteriormente, el Asi BMDL para un 0,5% de aumento de la incidencia de cáncer de pulmón (BMDL0.5) se determinó utilizando un rango de supuestos para estimar la exposición del agua potable y los alimentos, con diferentes concentraciones de Asi. Finalmente, se obtuvo un BMDL0.5 de 3.0 µg/kg pc por día (2–7 µg/kg pc por día según el rango de exposición dietética total estimada). Por tanto, el comité en la reunión 72ª retiró el ISTP antes mencionado pues consideró que ya no era apropiado [79].

El reconocimiento de que la forma química de arsénico es crítica para evaluar el riesgo tóxico dentro de matrices alimentarias, junto con los avances en los métodos analíticos, se ha traducido en una expansión significativa de la cantidad de publicaciones científicas sobre estudios de especiación [4]. La determinación de los niveles de Asi en los alimentos y el cálculo de la IDA son fundamentales para establecer la exposición de fondo. Por lo tanto, las

investigaciones en el campo de la química analítica se han centrado en las últimas décadas en el desarrollo de métodos analíticos para llevar a cabo la identificación y cuantificación de sus especies químicas, tanto para poder estimar su toxicidad como para comprender los procesos bioquímicos en los que están implicadas las distintas especies de arsénico. Por otro lado, muchos compuestos arsenicales están presentes en el medio ambiente y en sistemas biológicos a nivel de trazas, por lo que se requieren adecuadas técnicas analíticas de elevada sensibilidad [35].

La determinación de especies metálicas y organometálicas en muestras complejas requiere el acoplamiento de técnicas adecuadas de separación y detección, que sean robustas, fiables, de elevada precisión y sensibilidad.

Por otro lado, el control de las etapas previas al análisis, como son la recogida, tratamiento y almacenamiento de la muestra, es muy importante, con objeto de asegurar la conservación de las formas químicas originalmente presentes [52].

La etapa de preparación de muestra es la más crítica desde el punto de vista de las posibles fuentes de error del método analítico, pudiendo afectar tanto a la fiabilidad de los resultados obtenidos como al tiempo invertido en el mismo [36, 37]. Para este tipo de análisis, las matrices son complejas con bajas concentraciones de analitos, por lo que se requieren etapas adicionales de limpieza de los extractos para la eliminación de interferencias y/o de preconcentración de los analitos de interés, que también contribuyen generalmente a incrementar el error global del método [36]. Además, durante las etapas de muestreo, almacenamiento y extracción no se deben producir contaminaciones ni pérdidas de muestra o de analitos, así como tampoco transformaciones entre especies [38].

Actualmente, la cromatografía líquida de alto rendimiento acoplado a la espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (HPLC-ICP-MS) es la técnica más utilizada para el análisis de especiación de arsénico, debido a los bajos límites de detección y a la alta selectividad de este detector incluso al analizar matrices en muestras reales. Además, técnicas analíticas como la generación de hidruros siguiendo procesos de separación como cromatografía líquida de intercambio iónico o de alto rendimiento acoplados a detectores de absorción o de emisión atómica han demostrado tener sensibilidad suficiente para monitorear la exposición al arsénico, aunque limita el análisis a las especies formadoras de hidruros [39, 40, 41].

Los estudios sobre determinación específica de los niveles de As_i en alimentos han sido alentados por la EFSA y la OMS, en todos los cuales el As es determinado por HPLC-ICP-MS. Sin embargo, muchos laboratorios involucrados en el control de alimentos y alimentos no

tienen disponible el detector ICP-MS, principalmente debido al costo relativamente alto de inversión para esta tecnología en comparación con otras técnicas de detección como AAS y espectrometría de fluorescencia [42, 43].

La vía de la separación química de las especies de arsénico con la posterior determinación de AAS, es de gran interés de estudio, ya que es más fácil y más rentable que las respectivas HPLC. La técnica de generación de hidruros (HG) es uno de los enfoques más directos, con una alta selectividad debido a que sólo algunas especies de arsénico pueden formar hidruros volátiles [42, 43, 44].

1.7 Generación de Hidruros

La generación de hidruros es una de las técnicas de fase gaseosa comúnmente utilizada para introducción de muestras para diferentes sistemas de detección como espectrometría de emisión y absorción atómica. Esta técnica es utilizada en la determinación de analitos con iones que pueden convertirse fácilmente en derivados de hidruro estables [44, 45].

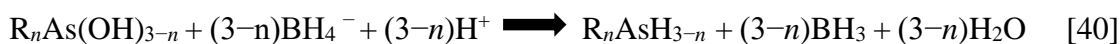
El proceso de división en generación de hidruros para la detección puede considerarse de cuatro pasos: químico, reacción que genera los hidruros; recogida y preconcentración de los hidruros evolucionados (si es necesario); transporte de los hidruros gaseosos y otros subproductos de la reacción (hidrógeno, dióxido de carbono y vapor de agua) en la fuente de excitación; y atomización de los hidruros, excitación de los átomos de analito y emisión y/o absorción de la radiación combinada con su detección [45].

Como precursor de hidruro se utiliza frecuentemente NaBH_4 , debido a su alta sensibilidad y selectividad. Otros precursores del ión hidruro que se han utilizado son TiCl_3 , SnCl_2 en HCl concentrado o aluminio en medio básico, conocida como reacción de Fleitmann [44]. El tetrahidrobórato (III), actúa como reductor y como fuente de hidruro. En el primer paso, el NaBH_4 reacciona con el oxoanión de arsénico, en esta forma el arsénico se encuentra en estado de oxidación +5, el cual se reduce al estado +3 [40].



En la mayoría de los actuales estudios, R es un grupo metilo y n se encuentra en el rango de 0–3.

Subsecuentemente, la reacción con tetrahidrobórato (III) formará la arsina correspondiente:



El borano generado en estas reacciones se hidroliza produciendo ácido bórico e hidrógeno gaseoso.



En algunos procedimientos se realiza una pre-reducción de las especies de arsénico previo a la generación de hidruros, haciendo uso de agentes reductores como KI, tiosulfato, mezclas de KI-ácido ascórbico y L-cisteína, para cuyos casos se propone el siguiente mecanismo de formación de arsinas [44]:



El Hidruro formador de la reacción AsH_n del As en el estado de oxidación $+m$, finalmente puede resumirse como sigue [45]:



Como el pK_a 1 para el ácido arsénico es 2,3, la reacción debe llevarse a cabo a un pH muy bajo; una solución de 1–2 M de HCl es comúnmente utilizada [40].

A menudo la solución de HCl utilizada se mezcla con la muestra y con una solución alcalinizada de $NaBH_4$. La reacción ocurre al instante.

La especie de analito volátil formada y los subproductos de la reacción (H_2 , CO_2 y H_2O) se separan de la celda de reacción posteriormente en un separador de fase gas-líquido, y luego transportado a la fuente de excitación. El líquido gastado es descartado como residuo [45].

En general, en la técnica de generación de hidruros, la separación de los productos volátiles de la fase líquida y el transporte de las especies gaseosas a la fuente de excitación es realizado mediante tres tipos de dispositivos [45]:

- 1.- Sistemas de flujo continuo: flujo continuo de agente reductor y la muestra.
- 2.- Sistemas de inyección de flujo: flujo continuo de agente reductor y la inyección de la muestra en el flujo del ácido portador.
- 3.-Sistemas de modo discontinuo: reacción de los reactivos a granel y recolección y/o preconcentración de hidruros por un sistema de atrapamiento.

1.8 Problemática actual en Chile y octava región

La riqueza taxonómica de la flora marina de la costa de Chile continental, comprende en la actualidad un total de 444 especies distribuidas en 89 *Phaeophyceae*, 80 *Chlorophyceae* y 265 especies *Rhodophyceae*. En los últimos 10 años, Chile se ha convertido en uno de los principales productores de extractos de algas marinas como fuente de agar agar y alginatos. La producción anual de algas excede 400.000 toneladas en peso húmedo del Grupo de las *Phaeophyceae* (algas pardas), tales como *Durvillaea antarctica*, *Lessonia nigrescens* y *Macrocystis pyrifera*, las cuales se utilizan para la extracción de alginatos, y constituyen un 50% de la producción de algas. *Gracilaria chilensis* es el alga roja (*Rhodophyceae*) más importantes comercialmente, porque constituye una fuente importante para la extracción de agar agar [46, 47]. Las algas, en general, también se utilizan en la producción de fertilizantes orgánicos, piensos para animales, cosméticos y otros preparados farmacéuticos, así también como alimento para el consumo humano. Por lo mismo, la situación de contaminación de arsénico en algas, en Chile es preocupante ya que las algas al ser consideradas bioacumuladoras primarias y un eslabón importante del metabolismo del arsénico son consecuencia de la contaminación del medio en que habitan y posibles contribuyentes al contenido de arsénico de sus productos en la industria, daño directo a la salud por consumo humano y como ente primario de bioacumulación [46].

En la octava región del Bío-Bío, los principales problemas están relacionados con el uso intensivo del territorio, producto de la demanda en la expansión urbana e industrial. Otro ámbito de atención es la actividad pesquera y las zonas de puerto. Todas estas actividades impactan ambientalmente al lugar, al mismo tiempo, que a la conservación de los recursos hidrobiológicos. La provincia de Concepción, es uno de los principales polos industriales del país, destacando la industria pesquera, manufacturera y forestal. Además, se destaca el rubro petroquímico y la industria del acero a través de la siderurgia Huachipato. Las descargas de aguas servidas domésticas y de estos residuos industriales líquidos previamente tratadas llegan de forma directa o indirecta a las masas o corrientes de agua superficiales y también a las

subterráneas, las cuales podrían ser capaces de contaminar extensas zonas acuáticas en la octava región.

Las fuentes de la contaminación marina se denotan a continuación:

- Contaminación de cuerpos de agua fluviales y lacustres por vertimientos de residuos líquidos desde plantas industriales de tipo pesqueras, petroquímicas, químicas, de celulosa y papel, manufactureras de madera, siderúrgicas, metalúrgicas, metalmecánicas, portuarias, astilleros, cuero y calzado, cerámicas, vidrio, agrícolas y talleres artesanales.

- Contaminación de aguas marinas costeras y estuarinas por vertimientos de residuos líquidos industriales desde plantas industriales de tipo pesqueras, petroquímicas, químicas, de celulosa y papel, manufactureras de madera, siderúrgicas, metalúrgicas, metalmecánicas, portuarias, astilleros, cuero y calzado, cerámicas, vidrio, agrícolas, por vertimientos de residuos líquidos domiciliarios evacuados difusamente, por redes sanitarias y por aguas lluvias. Es por ello que como objetivo principal se desea analizar el contenido de arsénico inorgánico en muestras de algas en diversas zonas de la octava región.

Coronel es una ciudad industrial y puerto marítimo [48]. La zona industrial del puerto de esta comuna se extiende desde el sector Puchoco hasta el sector Playa Negra, ocupando el borde costero de la bahía de Coronel, principalmente con galpones y pesqueras; recientemente el Puerto de Coronel ha iniciado la construcción de un nuevo parque industrial en el sector fundo Manco, éste cuenta con una chipeadora, una futura cementera y la central termoeléctrica Santa María, que se suma a las centrales Bocamina I y II del sector Lo Rojas [49, 50]. La termoeléctrica Bocamina tiene puntos de descarga directos al mar, que corresponden a aguas utilizadas en sus procedimientos [50, 51, 52]. El funcionamiento de las industrias mencionadas ha provocado una modificación del ecosistema marino, donde se observa una notoria alteración en la calidad del agua en el sector norte de la bahía, producto de la emisión de residuos al mar. En consecuencia, el estado actual de Bahía Coronel corresponde a un ecosistema modificado, con impactos asociados a la pérdida de biodiversidad [51, 52].

En la Provincia de Concepción, se identifican dos grandes unidades urbanas ambientales. En primer término, confluyen a la conurbación, las ciudades de: Lota, Coronel, San Pedro, Santa Juana y Hualqui por el sur, además de Tomé, Penco y Talcahuano por el norte.

2 Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

La optimización de un método analítico basado en el acoplamiento SPE y sistema de detección HG-AAS permitirá determinar; arsénico inorgánico y sus especies metabólicas (ácido monometilarsónico (MMA) y ácido dimetilarsónico (DMA)) en *Porphyra columbina* y *Durvillaea antártica* en zonas costeras de la octava región en Chile, para potenciar estudios de monitoreo ambiental en la zona.

2.2 Objetivo General

Optimizar e implementar un método analítico para determinar, arsénico inorgánico y las especies orgánicas MMA y DMA a través de una técnica de extracción con SPE y análisis mediante sistema HG-AAS para ser usado posteriormente en estudios de evaluación ambiental utilizando las algas *Porphyra columbina* y *Durvillaea antártica* como bioindicadores en la octava región en Chile.

2.3 Objetivos Específicos

- Desarrollar y optimizar condiciones de reducción de las especies químicas DMA y MMA con el fin de detectar su concentración mediante GH-AAS.
- Optimizar la etapa de elución de la SPE para la separación de las especies de DMA y MMA, complementaria al método implementado para determinación de arsénico inorgánico en alimentos de origen marino a través de la técnica de intercambio aniónico en una columna QAX.
- Implementar un método de extracción y limpieza en matriz, óptimo para la elución en la columna QAX determinadas.
- Validar la metodología analítica implementada para el análisis de arsénico a través de extracción SPE-QAX seguido de detección mediante sistema por espectroscopía de absorción atómica y generador de hidruros (HG-AAS).

- Determinar el contenido de arsénico total inorgánico ($\text{As}^{+5} + \text{As}^{+3}$) y orgánico (MMA y DMA) en muestras de las algas: *Porphyra columbina* y *Durvillaea antártica* en las principales zonas costeras de la octava región de Chile.
- Evaluar la probable naturaleza tóxica o inocua del arsénico presente en las muestras de algas marinas analizadas mediante el método de diferenciación implementado, considerando a las algas como bioindicadoras de contaminación de las muestras analizadas.

3 Materiales

3.1 Estándares analíticos

- Solución patrón H_3AsO_4 en HNO_3 $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ As $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Merck).
- Ácido dimetilarsínico, $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2\text{H}$, 500 mg (Sigma-Aldrich).
- Metil arsonato disódico $\text{CH}_3\text{AsO}_3\text{Na}_2$, 500 mg (Sigma-Aldrich).

3.2 Reactivos:

- Ácido nítrico 65% p/p suprapur (libre de metales, densidad $(1,51 \text{ g}\cdot\text{mL})$ PM: 63.01 g/mol) 15,6 M, Merck
- Peróxido de hidrógeno 30 % (v/v) Suprapur, Merck.
- Agua de calidad Milli-Q del sistema de purificación de Merck.
- Metanol grado HPLC, Merck.
- Acetonitrilo grado analítico, Fluka.
- Carbonato de amonio 99,999 % $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, Merck.
- Ácido acético glacial $\text{CH}_3\text{-COOH}$, 99,85 %p/p, Merck.
- Etanol Absoluto grado ACS, Merck.
- Yoduro de potasio, grado analítico, J.T.Baker.
- Ácido ascórbico, grado analítico, J.T. Baker.
- Ácido clorhídrico suprapur, Merck.
- Silicona antiespumante 30%, Sigma-Aldrich.
- Borohidruro de sodio p.a, Merck.

3.3 Insumos

- Columnas de extracción en fase sólida (SPE) CUQAX-156 (columna de intercambio aniónico de amina cuaternaria), 500 mg/6 mL, UCT.
- Tubo de centrifuga de polipropileno, de 15 y 50 mL.

- Micropipetas de 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L, 5000 μ L y 10.000 μ L.
- Probetas 10 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL y 1000 mL, Clase A.
- Vasos precipitados.
- Espátulas.
- Manifold para SPE con bomba de vacío.
- Matraces aforados de 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL, 250 mL y 1000 mL, clase A.
- Respirador medio rostro reutilizable, 3M.
- Navecillas de vidrio para masar estándares.
- Gas Carrier: Argón 99,999%.

3.4 Equipos

- Espectrómetro de AA Thermo Scientific iCE 3300, con generador de vapor de flujo continuo VP100 y Horno Vapor EC90, Thermo Scientific.
- Baño de ultrasonido, termorregulado con capacidad para 80 °C.
- Balanza analítica sensibilidad 0,001 g.
- pHmetro.
- Centrifuga con capacidad de 5000 rpm.
- Purificador de agua Milli-Q, Merck.
- Rotavapor con baño termoregulado.
- Multi-vórtex.
- Campana de extracción química.
- Sonicador (baño ultrasonido) con control de temperatura y control de frecuencia variable.
- Refrigerador para muestras con rango de 2 a 8 °C y congelador respectivo.
- Estufa para secado de muestras.
- Molino de cuchillas.

4 Métodos

4.1 Implementación y optimización de condiciones analíticas para formación de arsina gaseosa.

Primeramente, se optimizaron y definieron las condiciones instrumentales, bajo las cuales se realizaron todos los estudios de análisis en el equipo HG-AAS que a continuación son descritos en el método de trabajo.

En cada uno de los ensayos, las especies fueron sometidas a una reacción de pre-reducción, previo al análisis espectrofotométrico, esta reacción consistió en agregar una alícuota de una solución de yoduro de potasio/ácido ascórbico 10 % p/v que permitiera obtener una concentración final de yoduro de potasio y ácido ascórbico de 1% p/v en la solución donde se produce la reacción de pre-reducción. Esta reacción se dejó reposar a temperatura ambiente y en oscuridad durante 2 horas previo al análisis [42, 44].

4.1.1 Evaluación de la respuesta de DMA y MMA en medio ácido

Se prepararon soluciones estándar de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DMA y de MMA en dos medios diferentes para cada estándar, una en medio acuoso y la otra en medio de HCl 1,2 M.

Se evaluó la respuesta analítica (absorbancia) de cada una de estas soluciones frente a diferentes condiciones ácidas y reductoras. Para ello, las soluciones estándares fueron sometidas a diferentes concentraciones de HCl, el intervalo de estudio estuvo comprendido entre 0,01 M y 6 M de HCl, manteniendo constante la concentración de NaBH_4 a 0,5% p/v. Cada una de las mediciones se realizó por triplicado.

4.1.2 Evaluación de la respuesta de DMA y MMA frente a la capacidad reductora de borohidruro

Se seleccionaron las condiciones de los estándares de DMA y MMA que entregaron una mayor respuesta de absorbancia respecto a la evaluación realizada en medio ácido. Por lo tanto, se prepararon soluciones estándar de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DMA en medio acuoso y de MMA en medio HCl 1,2 M.

Posteriormente, se evaluó la respuesta analítica de cada una de estas soluciones frente a diferentes concentraciones (0,1 – 0,2 – 0,5 – 1 – 2 [% p/v]) de borohidruro de sodio como reductor y de HCl para favorecer la formación de arsina. Cada una de las mediciones se realizó por triplicado.

4.1.3 Evaluación de respuesta y linealidad para Asi-DMA y MMA

Una vez seleccionadas las concentraciones de HCl y NaBH₄, se estudió el rango de concentración lineal para MMA, DMA y Asi, para ello se preparó una curva de calibración estándar de concentración v/s absorbancia de cada una de las especies mencionadas. Los rangos de concentración estudiados fueron los siguientes; MMA y DMA (0,3 – 40 µg/L) y para Asi (0,1 - 15 µg/L).

4.2 Optimización de elución y separación en SPE

En esta etapa se realizaron diversas pruebas en donde se evaluó la capacidad selectiva y de retención de la columna, por lo cual en cada ensayo se evaluaron los pasos de la extracción en fase sólida usando una columna de amina cuaternaria fuerte de 500 mg (QAX-500 mg).

4.2.1 Evaluación capacidad de retención de la columna QAX.

Se prepararon soluciones de carga a una concentración de 125 µg L⁻¹ en un medio de H₂O₂ 3% y HNO₃ 0,1 M de DMA, MMA y Asi, previo a la carga, cada una de estas soluciones fueron ajustadas con carbonato de amonio a pH 7 – 8 – 9 - 11.

La columna QAX-500 mg fue acondicionada con 3 mL de metanol y 3 mL de una solución de (NH₄)₂CO₃ con H₂O₂ 1,5% y HNO₃ 0,05 M o de cloruro de amonio dependiendo del pH de estudio (el pH de carga fue verificado con tiras de papel pH). Luego se agregaron 4 mL de cada solución estándar de carga a la columna.

Finalmente, el eluido fue ingresado al sistema HG-AAS en las condiciones analíticas definidas, seleccionándose la de mayor absorbancia [53].

La capacidad de retención de la columna se calculó con la siguiente fórmula:

$$\bullet \quad \%R = 100 \left[1 - \left(\frac{[\text{Analito post carga}]}{[\text{Analito teórica}]} \right) \right] \% \quad [53]$$

4.2.2 Evaluación del pH de elución para DMA y MMA

De acuerdo, a la valoración del pH de acondicionamiento en la columna, se procedió a evaluar el pH necesario para eluir cada uno de los analitos en la columna [53].

La columna QAX-500 mg, se activó con 3 mL de metanol, se acondicionó con 3 mL de una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 35 mM, H_2O_2 1,5 %p/V y HNO_3 0,05 M (pH ~7), se agregaron 4 mL de solución de carga ($62,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DMA o MMA en H_2O_2 1,5% y HNO_3 0,05 M ajustado a pH 7 con $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ saturado y finalmente cada estándar fue eluido con un volumen de 10 mL de la solución en estudio [42, 43].

Se preparó un buffer de acetato de sodio a diferentes concentraciones para el análisis de la elución de DMA y soluciones de ácido acético a diferente concentración para evaluar la respuesta de MMA. Cada especie fue eluida por duplicado y se registró el promedio de absorbancia en cada caso como respuesta analítica del estudio. Los valores de pH de cada elución que se utilizaron se muestran en la tabla N°1:

Analito	pH 1	pH 2	pH 3
DMA	6	5	4,5
MMA	3	2,7	2,5

Tabla 1. Valores de pH de los eluidos

De este análisis, se seleccionó el pH de elución que permitió obtener un mayor porcentaje de recuperación.

4.2.3 Estudio de interferencias entre los analitos DMA-MMA-Asi

Se evaluó la presencia de cada una de las especies del estudio en los 3 eluidos, con el objetivo de conocer si existía algún tipo de interferencia entre los analitos que pudiera afectar la recuperación de cada uno de éstos.

Para ello se prepararon soluciones mix de MMA, Asi y DMA a una concentración de $62,5 \mu\text{g L}^{-1}$ en un medio de H_2O_2 1,5% y HNO_3 0,05 M, ajustado a pH 7 con carbonato de amonio saturado. Las soluciones estándares se prepararon de acuerdo, al siguiente diseño experimental:

- a) Influencia de MMA y Asi sobre DMA: Solución individual de DMA y soluciones mixtas: DMA-MMA, DMA-Asi.
- b) Influencia de DMA y Asi sobre MMA: Solución individual de MMA y soluciones mixtas: DMA-MMA, MMA-Asi.
- c) Influencia de DMA y MMA sobre Asi: Solución individual de Asi y soluciones mixtas: DMA-Asi, MMA-Asi.

Además, se realizó un mix que contenía los 3 analitos del estudio para evaluar su recuperación y la interferencia que pudiera existir en cada caso.

De esta forma, 4 mL de cada solución estándar preparada del diseño experimental fue agregada a la columna QAX-500 mg, que previamente había sido activada con 3 mL de metanol y acondicionada con 3 mL del mismo medio de H_2O_2 , HNO_3 y 35 mM de carbonato de amonio de la solución estándar.

Se realizaron 3 eluciones seriadas sobre la columna QAX. El pH de cada eluido fue el seleccionado en el ensayo anterior. De acuerdo, a las diferentes constantes de ionización de las especies estudiadas, se analizaron las respuestas de las especies en cada eluido, esperando encontrar las especies del estudio en el orden siguiente: DMA (1^{er} eluido), MMA (2^{do} eluido) y Asi (3^{er} eluido).

Cada eluido fue traspasado a un matraz aforado de 25 mL, se agregó una alícuota de 2,5 mL de una solución de yoduro de potasio/ácido ascórbico 10% p/v y se dejó reposar a temperatura ambiente en oscuridad durante dos horas para favorecer la reducción. Luego, se llevó a aforo con agua ultra pura a las soluciones que contenían el primer eluido y con una solución de HCl 4 M a los matraces que contenían al segundo y tercer eluido. La concentración teórica final para DMA, MMA y Asi fue de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Finalmente, se midió la absorbancia y se cuantificó la recuperación alcanzada por los analitos del estudio en cada una de las pruebas de elución.

4.3 Método de extracción de las especies DMA, MMA y Asi en algas.

4.3.1 Recolección y Preparación del material utilizado como blanco matriz

Se recolectó aleatoriamente un total de aproximadamente 1,5 kg de peso húmedo de algas de cochayuyo (*Durvillaea antarctica*) en una zona de baja carga contaminante en el litoral rocoso de la zona del “faro de Cocholgüe” de la localidad de Cocholgüe, Tomé, VIII Región del Bío Bío (36°34'39.3"S 73°00'04.5"W-36.577571, -73.001236).

Las algas recolectadas fueron transportadas inmediatamente al laboratorio de Salud ambiental Concepción de la Seremi de Salud Bío-Bío, entidad donde se realizó este trabajo de investigación.

4.3.2 Pre-tratamiento de la muestra

Las algas recolectadas fueron lavadas con un chorro de agua potable para eliminar restos de arena, restos de organismos marinos, conchas entre otros residuos. Posteriormente, se lavaron tres veces con agua desionizada tipo II y finalmente se sumergieron durante 1 hora en agua Tipo I. Luego, se estilaron y se secaron en estufa a 60 °C durante 18 horas. Las muestras secas fueron homogenizadas en una licuadora de acero inoxidable, y luego pulverizadas en un molino de cuchillas para laboratorio. Finalmente, se obtuvo una muestra homogenizada de 200 gramos aproximadamente en base seca, la cual fue almacenada a -20°C en frascos de polipropileno (frascos con tapa previamente tratados con una solución de HNO₃ al 20% p/v para la eliminación de residuos metálicos) [54].

4.3.3 Elección y optimización de la etapa de clean-up para el Método de extracción

La optimización del método de extracción consideró como base el siguiente método: se pesaron 0.5 ± 0.005 g alga seca pulverizada en un tubo de centrifuga de 15 mL. A este tubo, se agregaron 10 mL de solución de HNO_3 0.1 M con H_2O_2 3%, la mezcla se sometió a agitación en un multivortex a máxima revolución durante 15 minutos. Seguidamente, el tubo fue sumergido en un baño de ultrasonido a 80°C de temperatura, durante una hora. Se centrifugó durante 15 minutos a 4000 rpm. 5 mL del sobrenadante fue traspasado a otro tubo de centrifuga de 15 mL. Se ajustó el pH adicionando gotas de una solución de carbonato de amonio saturado hasta conseguir un pH cercano a 7. Luego, se completó el aforo a 10 mL con agua ultrapura. Finalmente 4 mL de esta solución fueron agregados a la columna QAX [42, 43]. La columna fue cargada con este extracto post acondicionamiento y activación de acuerdo con los resultados obtenidos de las evaluaciones previas.

Los blancos matrices fueron sometidos al mismo proceso de extracción y a los eluidos finales se les midió su absorbancia.

Se evaluó la respuesta de cada una de las especies frente al método de extracción con las siguientes variables: modificaciones respecto al tipo de extractante, agente purificador de interferencias o reactivos precipitantes. Finalmente, se evaluó la recuperación obtenida de DMA, MMA y Asi en el primer, segundo y tercer eluido respectivamente. De acuerdo con estos resultados, se procedió a optimizar la etapa de clean-up del método de extracción antes mencionado. Las variables y los métodos de extracción y clean-up utilizados son mencionados en la tabla N°2:

Método de extracción	Extractante	Clean-up	Vol. de carga QAX (mL)
Ultrasonido 1 hora x 80°C	10 mL HNO ₃ 0,1 M+ H ₂ O ₂ 3%	Carga: 7 mL de extracto acidulado con HNO ₃ . Acond: 5 mL metanol Equilibrio: 5 mL HNO ₃ 0,1 M. Carga: 7 mL de extracto acidulado con HNO ₃ . Lavado: 5 mL agua ultrapura Elución: 5% metanol.	5
Ultrasonido 1 hora x 80°C	10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%	1) ZnSO ₄ 2,1 M y NaOH 10%. 2) 5 mL Cloroformo x 2v (fase superior y fase inferior)	4
Ultrasonido 1 hora x 80°C	1) 10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3% 2) 10 mL CH ₃ OH (evaluación en solución ácida y neutra)	5 mL de CHCl ₃ x 3v	4,5
Ultrasonido 30 min a 60°C	1) 10 mL de CH ₃ OH 2) 10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%	1) 5 mL de CHCl ₃ x 3v	5
Ultrasonido 30 min a 60°C (2 veces)	10 mL de CH ₃ OH y 5 mL de cloroformo	1) 10 mL de agua y 10 mL de cloroformo. 2) Agregar 3 mL de HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%	5
1) Ultrasonido 1 h a 60 °C 2) Ultrasonido 1 h a 40°C	1) 10 mL de agua y 10 mL de CH ₃ OH. 2) H ₂ O ₂ 3%	5 mL de CHCl ₃ x 2v	5
Ultrasonido 1 hora x 80°C	10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%	4 mL de CHCl ₃ x 2v	5
1) Ultrasonido 1 hora x 80°C 2) Ultrasonido 30 min x 60 °C	1) 10 mL HNO ₃ 0,1 M +H ₂ O ₂ 3%. 2) 10 mL de metanol.	5 mL de CHCl ₃ x 2v	5
1)Ultrasonido 30 min. 2)Ultrasonido 1 hora 80°C.	1) 10 mL de metanol. 2) 10 mL HNO ₃ 0,1M +H ₂ O ₂ 3%.	5 mL de CHCl ₃ x 3v	5
1) Ultrasonido 1 hora x 80°C	1) 10 mL HNO ₃ 0,1M +H ₂ O ₂ 3%.	1) 20 mL de etanol absoluto 2) 5 mL de etanol absolute	5

Tabla 2. Modificaciones del método de extracción. Modificaciones del extractante y método clean-up para optimización [15, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64].

4.4 Optimización e Implementación del método de extracción

Una vez seleccionada la técnica de limpieza y el método de extracción para la separación química y determinación de DMA-MMA y Asi en alga, se procedió a realizar diferentes ensayos mediante un diseño experimental con el modelo de cribado [65] para evaluar cuáles de los factores estudiados tenían una influencia estadísticamente significativa en los resultados de recuperación del método analítico.

Se definieron tres factores de variación, los cuales fueron estudiados de manera conjunta de acuerdo, a un diseño multifactorial [65]. Estos factores estaban incluidos en las etapas de extracción y limpieza del método analítico, los cuales fueron los siguientes:

Tiempo de sonicación: tiempo en horas durante el cual el contenido de alga en solución de HNO_3 y H_2O_2 estaría sometido a extracción en el baño de ultrasonido termorregulado.

Volumen de alícuota de muestra: volumen de alícuota en mililitros que se tomó de la solución sobrenadante de HNO_3 y H_2O_2 posterior al sometimiento de la muestra a extracción con ondas de ultrasonido y centrifugación.

Volumen del solvente: volumen de etanol absoluto en mililitros utilizado durante la etapa de clean-up para precipitación de las sales y otros compuestos orgánicos de elevado peso molecular. Este volumen de etanol correspondió al que se agregó a la alícuota antes mencionada.

La matriz estadística se elaboró con las interacciones bifactoriales (como la combinación de dos letras de la tabla n°4) AB AC y BC de los valores de cada factor. Para la elaboración de la matriz cada factor estudiado tomó un valor nominal, un valor bajo y un valor alto, como se indica en la tabla N°3. Cada uno de ellos fue combinado con el fin de evaluar los efectos principales de cada factor, es decir, la diferencia entre la respuesta en el nivel más alto de un factor y la respuesta al nivel más bajo del mismo factor, cuando todos los demás factores son conservados en sus valores centrales [65].

Etapa del método	Tipo de Factor	Valor nominal	Valor Alto	Valor Bajo
Extracción	Tiempo de sonicación (horas) A	1	3	0,5
Limpieza	Volumen de alicuota del extracto (mL) B	2	8	0,5
Limpieza	Volumen de etanol (mL) C	25	50	12

Tabla 3. Factores y valores del DE. Se indica la etapa del método analítico en la cual se modificó cada factor y los valores alto y bajo en base al valor nominal o de referencia.

Se aplicaron 8 experimentos para cumplir con el mínimo requerimiento estadístico, los cuales fueron analizados a través de la elaboración de una matriz estadística, que permitió evaluar los factores estudiados que influían de forma significativa en los resultados y cuáles no lo hacían.

Se agregaron 2 experimentos como controles de calidad (QC), ambos utilizaron los valores nominales para cada factor. La tabla n°4 muestra el diseño de matriz que se usó para la evaluación de las variables en la extracción. Cada fila corresponde a un experimento donde se utilizaron las diferentes combinaciones posibles con los valores altos, nominales y bajos.

Número de ensayos	Factores			Interacciones			
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
Experimento 1	+	+	-	+	-	-	-
Experimento 2	0	0	0	Control	Control	Control	Control
Experimento 3	+	+	+	+	+	+	+
Experimento 4	+	-	+	-	+	-	-
Experimento 5	-	+	+	-	-	+	-
Experimento 6	0	0	0	Control	Control	Control	Control
Experimento 7	+	-	-	-	-	+	+
Experimento 8	-	-	+	+	-	-	+
Experimento 9	-	+	-	-	+	-	+
Experimento 10	-	-	-	+	+	+	-

Tabla 4. Matriz de interacciones bifactoriales del DE. Con signo positivo se simboliza valor alto, negativo valor bajo y control los factores se mantienen en valor de referencia. A: Tiempo

de sonicación (horas), B Volumen de sobrenadante del extracto (mL) y C Volumen de etanol (mL).

Los resultados de esta matriz fueron adquiridos a través del modelo de cribado del software Statgraphics con el análisis de ANOVA donde se evaluó la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental [65]. La tabla ANOVA particiona la variabilidad de recuperación en piezas separadas para cada uno de los efectos y prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. Donde se calcularon los siguientes componentes:

Suma de cuadrados: Se midió el incremento en la varianza del error experimental que ocurriría si cada término fuera eliminado de forma independiente del modelo. Ésta se calculó de la manera siguiente:

$$S_{\text{error}} = \sum_{i=1}^n e_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \tilde{y}_i)^2 \quad [65]$$

Donde e_i es el residual i-ésimo, que mide la diferencia entre la respuesta observada para la corrida i y el valor previsto por el modelo ajustado.

Gf: los grados de libertad asociados con cada término. [65]

Cuadrado medio: estima la varianza del error experimental y se calculó de la siguiente manera:

$$\tilde{u}^2 = \text{MSE} = \frac{S_{\text{error}}}{df_{\text{error}}} \quad [65]$$

Razón-F: divide el cuadrado medio de un efecto entre el error del cuadrado medio. La cual fue usada para determinar la significancia estadística del ensayo.

$$F = \frac{MS_{\text{effect}}}{\text{MSE}} \quad [65]$$

Valor-P – el valor-P asociado con la prueba de la hipótesis nula. Los valores-P que se encontraron por debajo del valor crítico de 0.05 con un nivel de significancia del 5% se consideraron como valores estadísticamente significativos en el nivel de significancia [65].

R-cuadrado – se consideró como el porcentaje de la variabilidad en la respuesta explicada por el modelo ajustado, con el fin de medir qué tan bien el modelo se ajustaba a la respuesta observada de los datos. El R-cuadrado se calculó de la siguiente forma:

$$R^2 = 100 \left(1 - \frac{S_{error}}{S_{total}}\right) \% \quad [65]$$

R-cuadrada (ajustada por g.l.) – este valor dio cuenta del número de grados de libertad en el modelo ajustado. En situaciones como ésta, en que el número de coeficientes en el modelo ajustado es relativamente grande con respecto al número total de corridas, el estadístico R-cuadrada puede exagerar la habilidad del modelo ajustado para predecir la respuesta. La R-cuadrada ajustada compensa este efecto por medio de la siguiente ecuación:

$$R^2 = 100 \left[1 - \left(\frac{n-1}{n-p}\right) \frac{S_{error}}{S_{total}}\right] \% \quad [65]$$

Donde p es el número de coeficientes estimados en el modelo ajustado.

Error estándar del estimado. – se calculó la desviación estándar estimada del error experimental [65].

Error absoluto medio - el promedio de los valores absolutos de los residuales. Este valor indica el error promedio al predecir la respuesta observada usando el modelo ajustado [65].

Estadístico Durbin-Watson – estadístico calculado desde los residuales, se calculó de la manera siguiente:

$$DW = \frac{\sum_{i=1}^{n-1} (e_{i+1} - e_i)^2}{\sum_{i=1}^n e_i^2} \quad [65]$$

A través del estadístico Durbin-Watson se midió la correlación serial en los residuales para determinar si existe alguna dependencia entre las observaciones sucesivas.

Finalmente, en cada experimento se evaluó la recuperación para cada analito, y se seleccionó el experimento con las variables que influían significativamente para conseguir una mayor recuperación.

Todos los resultados de recuperación que fueron obtenidos mediante este diseño experimental se evaluaron bajo 3 gráficos estadísticos: diagrama de Pareto, superficie de respuesta y gráfico de efectos principales.

Para crear un diagrama de Pareto estándar, cada efecto fue convertido en un t-estadístico (cada efecto se dividió por su error estándar).

4.4.1 Método de extracción Optimizado

Etapa de extracción: En un tubo de centrifuga de 15 mL, se pesaron 0,5 gramos de alga seca pulverizada, se agregaron 10 mL de mezcla de H₂O₂ 3% con HNO₃ 0,1 M, se agitó por 3 minutos en vórtex. Esta mezcla se sumergió en un baño de ultrasonido a 80°C durante 2 horas. Se dejó reposar a temperatura ambiente hasta enfriar, se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos.

Clean-up: Se tomó una alícuota de 0,5 mL del sobrenadante del extracto centrifugado y se agregaron 20 mL de etanol, éstos se agitaron por 3 minutos en vórtex y se mantuvieron por 30 minutos a -10°C. Posteriormente, se retiró y se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. Se tomó el sobrenadante y se agregó a un matraz de fondo redondo, éste se dejó reposar en congelador. Se repitió el proceso anteriormente mencionado con el residuo del tubo de centrifuga agregando sólo 5 mL de etanol. El sobrenadante fue agregado al matraz de fondo redondo y se colectó el total de etanol como extractante. Éste se evaporó en un rotavapor a 64 mbarr y a 40°C, con el objetivo de concentrar la fase de etanol [15].

Separación y detección: Se agregaron 5 mL de agua ultrapura al extracto, y unas 3 a 4 gotas de una solución de carbonato de amonio saturado con el objetivo de neutralizar esta solución a pH cercano a 7 (se verificó el pH con tiras reactivas de papel pH) [15, 42, 43].

Se preparó el sistema de SPE con el equipo manifold y bomba de vacío. Las columnas QAX, se activaron con 3 mL de metanol, seguidos de 3 mL de la fase de carga (H₂O₂ con HNO₃) y luego se adicionaron los 5 mL del extracto. Se eluyó el DMA con 6 mL de una solución de H₃BO₃ 2%, seguido de 6 mL ác. acético 0,05 M para eluir principalmente MMA y 6 mL de HNO₃ 0,75 M con el objetivo de obtener Asi [42, 43].

Los eluidos se trataron con 1 mL de solución de KI 10%; al primer eluido se le adicionaron 3 mL de agua ultrapura y al segundo y tercer eluido se le agregaron 3 mL de HCl 4 M, agitándose cada una de estas soluciones. Luego, se dejaron reducir a temperatura ambiente en oscuridad durante 1 hora [44]. Finalmente, se procedió a realizar la lectura de cada eluido en el equipo HG-AAS, con el objetivo de medir la absorbancia y realizar la cuantificación.

4.5 Validación del método analítico.

Los criterios de aceptación para el procedimiento de la validación, se determinaron bajo los parámetros de validación señalados en la guía de validación de métodos analíticos AOAC 2012 y en el Codex Alimentarius, 19ª Edición [66, 67, 68].

4.5.1 Límites de detección y límites de cuantificación

Los valores de los límites se determinaron midiendo la señal de 10 blancos matrices para detectar MMA y Asi, y 6 blancos matrices para detección del DMA. Cada uno de ellos se fortificó a una concentración cercana al blanco matriz. de acuerdo, a lo establecido en las guías de procedimiento para validación de métodos analíticos de la AOAC [70] y harmonized guidelines de la IUPAC [68], los criterios de aceptación se basaron en el apéndice F de la AOAC 2012 [66].

La determinación de la concentración de cada blanco matriz fortificado, se obtuvo a través de la interpolación de una curva de calibración que tomó valores bajos en sus 4 niveles de calibración (ver tabla n°5). Los límites se obtuvieron de acuerdo, al siguiente cálculo [69]:

$$\text{LOD} = (3 * \text{Sb}) + a \quad (\text{fórmula 1})$$

$$\text{LOQ} = (10 * \text{Sb}) + a \quad (\text{fórmula 2})$$

Sb: desviación estándar de los blancos fortificados.

a: coeficiente de posición.

4.5.2 Linealidad

Se preparó una curva de calibración con soluciones estándares con 6 niveles de concentración en unidades de microgramos por litro para cada uno de los analitos en estudio, como se indica en la tabla N°5 [66, 68]. Estos rangos de concentración se encontraron dentro del rango lineal ya establecido para DMA, MMA y Asi en la parte de optimización del método.

Niveles de la cc	Conc.DMA ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Conc.MMA ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Conc.Asi ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
blanco	0	0	0
Std 1	1	0,4	0,25
Std 2	2	0,8	0,5
Std 3	8	2	2,5
Std 4	14	8	5
Std 5	20	14	7,5
std 6	32	20	10

Tabla 5. Niveles de la curva calibración. Niveles de concentración en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de DMA, MMA y arsénico inorgánico en las curvas de calibración respectivas.

Se evaluó la linealidad de estas curvas durante 3 días diferentes con una curva de calibración preparada para cada día. Se evaluó si la concentración se comportaba linealmente con respecto a la señal de absorbancia. Se hizo uso de las gráficas correspondientes y se determinaron los coeficientes de correlación lineal como criterio de aceptación. El criterio de aceptación fue un coeficiente de determinación (r^2) $\geq 0,99$ [71], valor correspondiente al promedio de 3 curvas de calibración preparadas en días diferentes.

4.5.3 Precisión y exactitud

Para evaluar la precisión y exactitud del método, se preparó un extracto de alga (cochayuyo), pulverizada y mantenida bajo las condiciones de almacenamiento indicadas en la sección de pretratamiento de la muestra como material control.

Para la determinación de la repetibilidad se repitió el siguiente procedimiento 6 veces; se pesaron 0,5 g de extracto y se agregó una alícuota de 100 μL de solución madre que contenía 4 - 1,6 y 1 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) de DMA, MMA y Asi respectivamente, con el objetivo de obtener una concentración final cercana al nivel 2 en las curva de calibración final de cada analito [68, 70].

Para la determinación de la reproducibilidad o precisión intermedia, se pesaron 0,5 g de extracto algal y cada extracto se fortificó con 100 µL de una solución madre que contenía 4 - 1,6 y 1 (mg*L⁻¹) de DMA, MMA y Asi respectivamente, con el objetivo de interpolar al segundo nivel de la cc, posterior a realizado el método de extracción. Este procedimiento se repitió 9 veces durante 3 días diferentes. Las concentraciones de los fortificados se señalan en la tabla N°6, nivel 1 [68, 70].

El contenido de cada especie de arsénico en los extractos se determinó en el sistema GH-AAS.

El criterio de aceptabilidad para la evaluación de la precisión se realizó de acuerdo con la evaluación del coeficiente de variación de Horwitz [66, 68, 71, 72]:

$$CVh\% = 0,02 \times c^{0.8495} \quad (\text{fórmula 3})$$

- Donde:

CVh: coeficiente de variación de Horwitz

c: valor nominal del analito expresado en potencia de 10.

Para la repetibilidad, el CVh% obtenido debe ser $< \frac{1}{2} * (CVh\%)$.

Para la precisión intermedia el CVh% debe ser $< \frac{2}{3} * (CVh\%)$.

4.5.4 Porcentaje de Recuperación (%R)

Junto con la determinación de la precisión intermedia se evaluó el porcentaje de recuperación de las distintas especies de arsénico en el extracto fortificado. Para ello, se utilizaron 3 fortificados del ensayo de precisión intermedia, y además, se prepararon 3 fortificados en matriz a un nivel alto respecto a la cc y 3 fortificados al centro de la cc para cada caso. En total se obtuvieron nueve mediciones diferentes. Las concentraciones de los fortificados en matriz y sus respectivas concentraciones teóricas se señalan en la tabla N°6 [68, 70, 71, 72].

Niveles en la curva de calibración	Analito	Concentración analito en cc ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentración analito en matriz ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Nivel 2	DMA	2	0,8
	MMA	0,8	0,32
	Asi	0,5	0,2
Nivel Intermedio	DMA	14	5,6
	MMA	8	3,2
	Asi	5	2
Nivel Alto	DMA	25	10
	MMA	16	6,4
	Asi	8,5	3,4

Tabla 6. Fortificados para análisis de exactitud. Concentraciones teóricas de los fortificados usados para análisis de Repetibilidad, precisión intermedia y Recuperación.

El valor de la recuperación se obtuvo en cada caso, según la siguiente fórmula [66, 71]:

$$\%R = \left[\frac{(C_m - C_0)}{C_a} \right] * 100 \quad (\text{fórmula 4})$$

- Donde:

$\%R$ = porcentaje de recuperación de cada ensayo.

C_m = es la concentración medida del analito en la muestra fortificada.

C_0 = es la concentración presente en un blanco matriz.

C_a = es la concentración equivalente al valor teórico adicionado a la muestra.

Se evaluó el valor obtenido de recuperación mediante una prueba t estadística como criterio de aceptación de validación para cada uno de los niveles de concentración fortificados.

El valor t_{calc} se calculó en base a prueba t de acuerdo, a la siguiente ecuación [71]:

$$t_{\text{calc}} = \frac{(100 - \%R)}{(S * \sqrt{n})} \quad (\text{fórmula 5})$$

$t_{\text{calc}} < t_{\text{crit}}$ (indica que no existe diferencia estadísticamente significativa)

- Donde:

t_{calc} = t observado o calculado.

$\%R$ = porcentaje de recuperación.

S = Desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación.

n = Número de lecturas o valores observados.

Para obtener el valor t_{crit} se consideraron los grados de libertad (v) y el porcentaje de seguridad deseado ($1-\alpha$) para un error α de 0,05, es decir, con un 95% de confianza.

4.5.5 Determinación de la incertidumbre

Se determinó la incertidumbre a través del sesgo y la precisión, valores obtenidos en condiciones de recuperación y reproducibilidad, durante el estudio de validación del método.

La incertidumbre asociada al material de referencia no fue considerada, pues sólo se contó con el material control y se consideró como despreciable para este método [68, 71, 73].

La Incertidumbre relativa asociada al sesgo ($u_{relativa\ sesgo}$) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación [71, 73]:

$$u_{sesgo} = \sqrt{(Sesgo)^2 + \left(\frac{CV\%}{\sqrt{n}}\right)^2 + umrc^2} \quad (\text{fórmula 6})$$

- Donde:

Sesgo = % de diferencia entre el promedio de recuperación del material control y el valor teórico asociado.

CV% = coeficiente de variación del sesgo.

n = número de ensayos realizados para evaluación del sesgo.

$umrc$ = Incertidumbre asociada al material de referencia, igual a 0.

Posteriormente, se calculó la incertidumbre total combinada a través de la suma de las varianzas de las incertidumbres estándares relativas de la precisión (CV% de la reproducibilidad) y el error sistemático (sesgo), a través de la siguiente ecuación [71, 73]:

$$Uc = \sqrt{(usesgo)^2 + (ureproducibilidad)^2} \quad (\text{fórmula 7})$$

Donde:

Uc = Incertidumbre total combinada.

$u(\text{sesgo})^2 = \text{Varianza relativa del sesgo.}$

$u(\text{reproducibilidad})^2 = \text{Varianza relativa de la precisión.}$

Finalmente, con el valor de la incertidumbre combinada se calculó la incertidumbre expandida. Para entregar un margen de confianza del 95 % con respecto a los resultados de incertidumbre obtenidos, se calculó la incertidumbre expandida con un k de 2, es decir [71, 73]:

$$U_{\text{expandida}} = k * U_{\text{combinada}} \quad (\text{fórmula 8a})$$

$$U_{\text{expandida}} = 2 * U_{\text{combinada}} \quad (\text{fórmula 8b})$$

4.6 Análisis de especies de arsénico en muestras de algas.

4.6.1 Recolección de las muestras

Se recolectaron muestras de algas de *Porphyra columbina* (luche) y *Durvillaea antártica* (cochayuyo) en los litorales rocosos de la zona intermareal de las localidades de Coronel (zona contaminada) y Coliumo (zona libre de contaminación) respectivamente. La recolección de cada muestra se realizó mediante un muestreo al azar simple. En Coliumo se recolectó en 2 puntos diferentes y en Coronel 5 puntos de muestreo, con el objetivo de realizar una comparación entre una zona más contaminada y otra de menor influencia de contaminación y también para comparar la influencia de efluentes en la bahía de Coronel. En cada área de recolección se seleccionó arbitrariamente un punto inicial y se definió una transecta con 5 y hasta 3 estaciones (según el espacio de muestreo) con una separación aproximada de 5 metros entre ellas [74]. En cada estación se recolectó aleatoriamente una muestra de aproximadamente 500 a 1000 gramos en peso de alga húmeda.

En la localidad de Coronel cada área seleccionada se ubicó en diversos puntos de la bahía, unos más cercanos y otros más próximos a los efluentes industriales, de acuerdo a como se indica en la figura N°2. La ubicación de los puntos de recolección en Coliumo se indican en la figura N°3.

Se analizaron un total de 4 muestras de *Durvillaea antártica* (cochayuyo) y 6 muestras de *Porphyra columbina* (luche) en Coliumo, y un total de 19 muestras de *Porphyra columbina* (luche) en Coronel, distribuidas e identificadas como se señala en la tabla n°7. Es decir, el total del análisis completó 29 muestras.

En la tabla N°7 se identifican las muestras recolectadas en las zonas de Coliumo y Coronel agrupadas, por fecha de recolección y localidad.

ID Punto recolección	Fecha recolección	Especie	ID Muestra	Localidad
Punto B-1	30-11-2017	<i>Porphyra columbina</i>	ML-B1	Maule, Coronel
			ML-B2	Maule, Coronel
			ML-B3	Maule, Coronel
			ML-B4	Maule, Coronel
Punto B-2	17-12-2017	<i>Porphyra columbina</i>	ML-B2.5	Puchoco, Coronel
			ML-B2.6	Puchoco, Coronel
			ML-B2.7	Puchoco, Coronel
			ML-B2.8	Puchoco, Coronel
Punto B-3	17-12-2017	<i>Porphyra columbina</i>	ML-B3.9	Lo Rojas, Coronel
			ML-B3.10	Lo Rojas, Coronel
			ML-B3.11	Lo Rojas, Coronel
Punto B-4	17-12-2017	<i>Porphyra columbina</i>	ML-B4.12	Playa negra, Coronel
			ML-B4.13	Playa negra, Coronel
			ML B4.14	Playa negra, Coronel
			ML B4.15	Playa negra, Coronel
Punto B-5	17-12-2017	<i>Porphyra columbina</i>	ML B5.16	Estero Manco, Coronel
			ML B5.17	Estero Manco, Coronel
			ML B5.18	Estero Manco, Coronel
			ML B5.19	Estero Manco, Coronel
Punto A -1	26-11-2017	<i>Durvillaea antártica</i>	MC-A1	Casa Poli, Coliumo
			MC-A2	Casa Poli, Coliumo
			MC-A3	Casa Poli, Coliumo
			MC A4	Casa Poli, Coliumo
Punto A - 2	26-11-2017	<i>Porphyra columbina</i>	ML-A1	Casa Poli, Coliumo
			ML-A2	Casa Poli, Coliumo
			ML -A3	Casa Poli, Coliumo
Punto A - 3	01-01-2018	<i>Porphyra columbina</i>	ML A4.1	Morrito Punta Los Morros, Coliumo
			ML A4.2	Morrito Punta Los Morros, Coliumo
			ML A4.3	Morrito Punta Los Morros, Coliumo

Tabla 7. Identificación y clasificación de las muestras recolectadas. Identificación y clasificación de las muestras por tiempo y localidad de recolección. Señala el lugar y la fecha en donde las muestras fueron recolectadas, la especie recolectada y el código de identificación asignado por muestra.

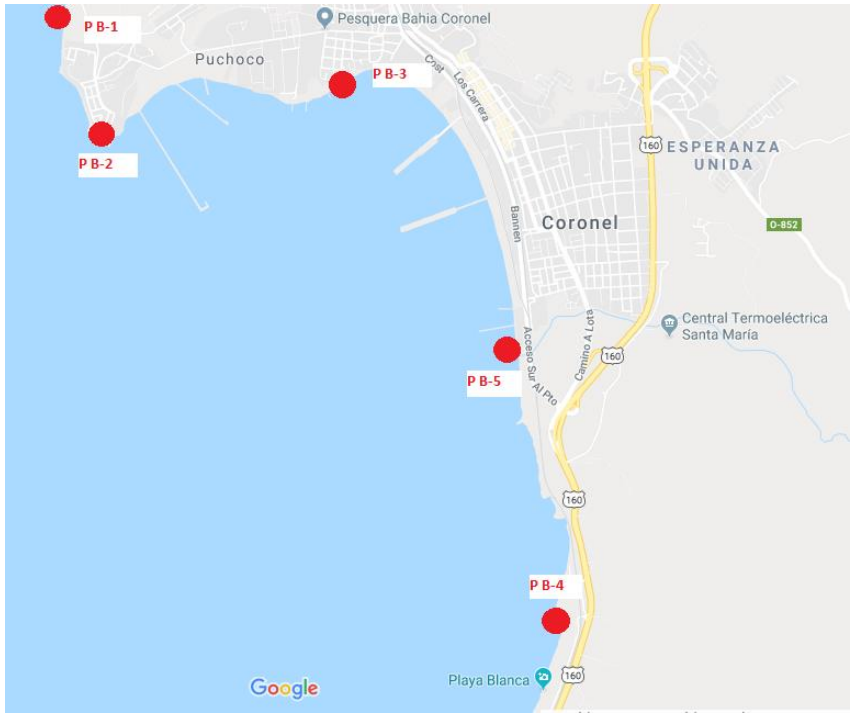


Figura 1 Bahía de Coronel. Puntos de recolección

Los puntos de recolección de muestras identificados en círculos rojos. P B-1: Playa Maule (-36.994706, -73.186793). P B-2: Puchoco (-37.028389, -73.177902). P B-3: Muelle artesanal Lo Rojas (-37.024373, -73.159019). P B-4: Playa Negra (-37.058692, -73.142088) y P B-5: Desembocadura del estero Manco (-37.042352, -73.145220).



Figura 2 Península Coliumo. Puntos de recolección

Puntos de recolección de muestras identificados en círculos azules. P A-1: Casa Poli (-36.527548, -72.976669) y P A-2: Morrito Punta, Los Morros (-36.524134, -72.954268).



Figura 3 CTSM, mapa de puntos de succión y descarga
 Puntos de succión de agua y descarga de efluentes industriales, CTSM (-37.039464, -73.145941).



Figura 4 CTB Puntos de almacenamiento, succión y descarga
 Bocamina 1 (CTB1) y Bocamina 2 (CTB2), patios de almacenamiento de combustible (carbón bituminoso), las correas de transporte de dicho carbón desde las instalaciones de descarga en cabo Froward a los patios de acopio y la subestación eléctrica S/E Bocamina. Puntos de aducción y descarga de CTB1 y CTB2. (-37.025612, -73.167476).

4.6.2 Determinación analítica de DMA, MMA y As inorgánico en muestras de algas

Con el método implementado y validado se procedió a realizar el análisis de muestras de algas correspondientes a *Porphyra columbina* y *Durvillaea antártica* recolectadas en zonas costeras de la región del Bío-Bío.

Cada análisis se realizó interpolando una curva de calibración convencional, utilizando la curva de calibración implementada del método de validación y evaluando la respuesta de absorbancia en cada caso.

Con el fin de asegurar la calidad de los resultados, en cada análisis se realizó una verificación tanto al sistema de funcionamiento del espectrofotómetro como a la metodología de ensayo. Por cada 10 muestras analizadas, se incluyeron los siguientes controles de calidad: un fortificado de muestra, un blanco reactivo y un duplicado de muestra. Los criterios de aceptación para DMA, MMA y Así, se señalan en la tabla N°8.

Tipo de control	Criterio de aceptación	Valor aceptabilidad
Recuperación fortificado	% de Recuperación	80-110 (%)
Blanco reactivo	Interferencia en la señal	< LOD
Duplicado	Coeficiente de variación	20%
Estándar de verificación	Señal de absorbancia	90-110% de la indicada por el fabricante

Tabla 8. Criterios de aceptación.

Blanco reactivo

Con el fin de descartar y/o identificar posibles interferencias provenientes de los reactivos, del material de laboratorio o de la manipulación en el procedimiento, Se procedió tanto con los materiales como a los reactivos involucrados en el proceso del ensayo a realizar el mismo procedimiento de ensayo descrito para las muestras. La lectura del blanco reactivo se realizó al principio de cada lote de muestras.

Estándar de verificación del sistema instrumental

Previo a cada lectura en el sistema GH-AAS, se ajustó el sistema óptico del equipo para lograr un máximo óptimo de absorbancia. Este ajuste se verificó midiendo la señal de absorbancia de un estándar de verificación de concentración de $7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, cuya señal, según el fabricante debía ser de 0,150 (Criterio de aceptación: 90 a 110% respecto a la concentración teórica). Además, el estándar de verificación fue cuantificado posterior a la medición de una curva de calibración y al final de la determinación de las muestras.

Quality control (QC): Fortificado de muestra.

Se comprobó una óptima recuperación de la metodología de ensayo a través de la evaluación de un fortificado en muestra. Se fortificó una muestra seleccionada aleatoriamente a una concentración equivalente al 3er punto en la curva de calibración de cada uno de los analitos, equivalente a 3,2 mg*kg⁻¹ para DMA, 0,8 mg*kg⁻¹ para MMA y 2,5 mg*kg⁻¹ para Asi (miligramos de especie por kilogramo de alga seca), y se evaluó la recuperación de cada una de las especies, mediante el valor del porcentaje de recuperación (%R) del fortificado. El porcentaje de recuperación se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%R = \left(\frac{(C_e - C_o)}{C_a} \right) * 100 \text{ (fórmula 9)}$$

C_e : Concentración de analito de la muestra fortificada.

C_o : Concentración de analito de la muestra sin ser fortificada.

C_a : Concentración teórica del valor de analito adicionado a la muestra.

Duplicados

Por cada set de muestras analizadas, se repitió el método de ensayo de una de las muestras y se verificó que la diferencia porcentual relativa (RPD) entre los resultados obtenidos de cada una de ellas, no era superior al 20%. La RPD se calculó de acuerdo, a la siguiente fórmula [75]:

$$RPD = \frac{|C_1 - C_2|}{\left(\frac{C_1 + C_2}{2} \right)} * 100 \text{ (fórmula 10)}$$

C_1 : Medida de la concentración de la primera muestra X.

C_2 : Medida de la concentración de la segunda muestra X.

Expresión de resultados y cálculos.

Los resultados para el análisis de las muestras se expresaron en unidades de mg*kg⁻¹ acompañados del valor de su incertidumbre calculada para cada uno de los analitos. Donde los miligramos corresponden a la cantidad de especie por kilogramos de muestra algal seca [67, 75].

Los resultados se expresan de la siguiente manera:

- Los resultados \geq LOQ se expresan con el valor de concentración determinado acompañados del valor de su incertidumbre asociada seguido por la unidad de medida de mg*kg⁻¹.

- Los resultados \geq LOD y $<$ LOQ se expresan con el valor de concentración determinado seguido por la unidad de medida ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) y por las iniciales “TR” que indican que es un valor cualitativo para trazas.
- Finalmente, para valores $<$ LOD se expresan con la sigla “ND” que indica que el valor no ha sido detectado por el método de ensayo.

La concentración de especie presente en la muestra en $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, se calculó con la siguiente fórmula:

$$[X] \text{ en mg per Kilogramo de muestra} = \frac{C \cdot \text{FD} \cdot V}{P} \quad (\text{fórmula 11})$$

C= Concentración en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ obtenida de la interpolación de la cc estándar.

FD= Factor de dilución.

V= volumen en litros del eluido final (10 mL)

P= peso de la muestra en kilogramos.

5 Resultados

5.1 Implementación y optimización de condiciones analíticas para formación de arsina gaseosa.

5.1.1 Condiciones instrumentales

El programa optimizado con condiciones instrumentales definidas entregó una sensibilidad adecuada para las concentraciones de especies arsenicales utilizadas en los ensayos, otorgando un máximo de absorbancia y buena estabilidad en la señal.

Las condiciones analíticas del sistema GH-AAS definidas se muestran en la tabla N°9, a continuación:

<input type="checkbox"/> Flujo de la muestra 8-8,6 mL/min	<input type="checkbox"/> Lámpara de cátodo hueco
<input type="checkbox"/> Flujo HCl: 1 mL/min	<input type="checkbox"/> Corrección de fondo: con lámpara de deuterio
<input type="checkbox"/> Flujo NaBH ₄ /NaOH: 2 mL/min	<input type="checkbox"/> Corriente de lámpara: 75%
<input type="checkbox"/> Gas carrier: Argón	<input type="checkbox"/> Ancho rendija: 0,5 nm
<input type="checkbox"/> Flujo gas: 125-130 mL/min	<input type="checkbox"/> T°celda: 900°C
<input type="checkbox"/> Velocidad de la bomba peristáltica: 34 rpm	
<input type="checkbox"/> Longitud de onda: 193,7 nm	

Tabla 9. Condiciones analíticas del sistema GH-AAS.

5.1.2 Evaluación de la respuesta de DMA y MMA en medio ácido

Las respuestas de absorbancia obtenidas para DMA y MMA ($10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) preparadas en medio acuoso y en medio ácido, frente a diferentes concentraciones de HCl como carrier y con una concentración de 0,5% p/v de NaBH₄ utilizado como reductor, se muestran en la siguiente tabla:

[HCl] M	Absorbancia (A λ)			
	DMA acuoso	DMA ácido	MMA acuoso	MMA ácido
0,01	0,034	0,003	0,002	0,121
0,025	0,03	0,004	0,078	0,123
0,05	0,026	0,008	0,011	0,129
0,08	0,052	0,012	0,014	0,135
0,1	0,043	0,055	0,013	0,131
0,3	0,053	0,006	0,076	0,13
0,5	0,091	0,013	0,065	0,148
1	0,084	0,017	0,068	0,179
4	0,029	0,014	0,083	0,162
6	0,029	0,01	0,078	0,144

Tabla 10. Respuesta de DMA y MMA frente a diferentes concentraciones de HCl. Absorbancias de DMA y MMA a una concentración de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en un medio acuoso y en medio ácido (1,2 M de HCl) a diferentes concentraciones de HCl. La primera columna de la tabla muestra las diferentes concentraciones de HCl en unidades de molaridad. Se mantuvo constante la concentración del reductor de NaBH_4 .

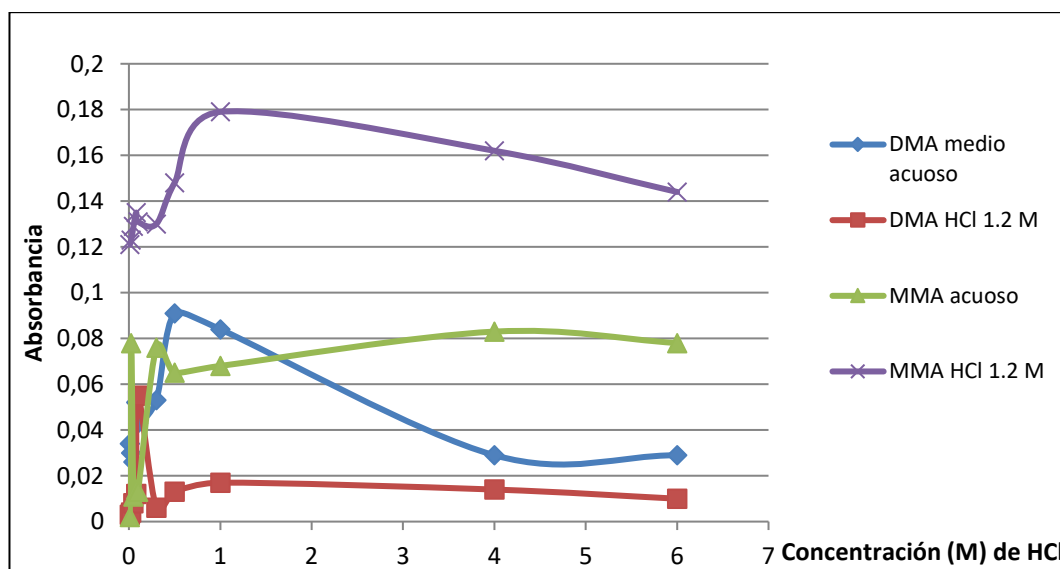


Figura 5 Efecto de la concentración de HCl sobre la respuesta de DMA y MMA en GH-AAS, empleando NaBH_4 0,5% (m/v). Las respuestas de absorbancia fueron obtenidas a partir de soluciones estándares a una concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de As por especie en medio acuoso y HCl 1,2 M.

5.1.3 Evaluación de la respuesta de DMA y MMA frente a la capacidad reductora de Borohidruro

En el ensayo anterior se determinó para DMA una mayor señal de absorbancia en medio acuoso y para MMA en medio ácido, por lo tanto, se evaluó la respuesta de estas especies con diferentes concentraciones de borohidruro en las condiciones señaladas.

Para este análisis, se comparó la respuesta de absorbancia frente a un rango de concentración de HCl desde 0,01 M a 0,5 M para DMA y desde 1 M a 6 M para MMA, frente a diferentes concentraciones de borohidruro de sodio, de acuerdo, a las señales más altas encontradas en el ensayo anterior.

En la tabla N°11 se indican las señales de absorbancia obtenidas para las especies arsenicales de DMA y MMA frente a diferentes concentraciones de HCl y NaBH₄.

Analito	[HCl]	A [NaBH ₄]	B [NaBH ₄]	C [NaBH ₄]	D [NaBH ₄]	E [NaBH ₄]
		0,1% p/V	0,2% p/V	0,5% p/V	1% p/V	2% p/V
DMA	0,01 M	0,04	0,071	-	-	-
	0,05 M	0,043	0,068	-	-	-
	0,1 M	0,049	0,071	0,097	-	-
	0,3 M	0,045	0,082	0,111	-	-
	0,5 M	0,037	0,076	0,121	0,143	-
MMA	1 M	-	0,03	0,14	0,15	0,161
	4 M	-	0,097	0,14	0,155	0,158
	6 M	-	0,091	0,139	0,162	0,158

Tabla 11. Respuestas de DMA y MMA frente a diferentes concentraciones de HCl y NaBH₄. Absorbancias para DMA y MMA como respuesta frente a diferentes concentraciones de NaBH₄ y HCl.

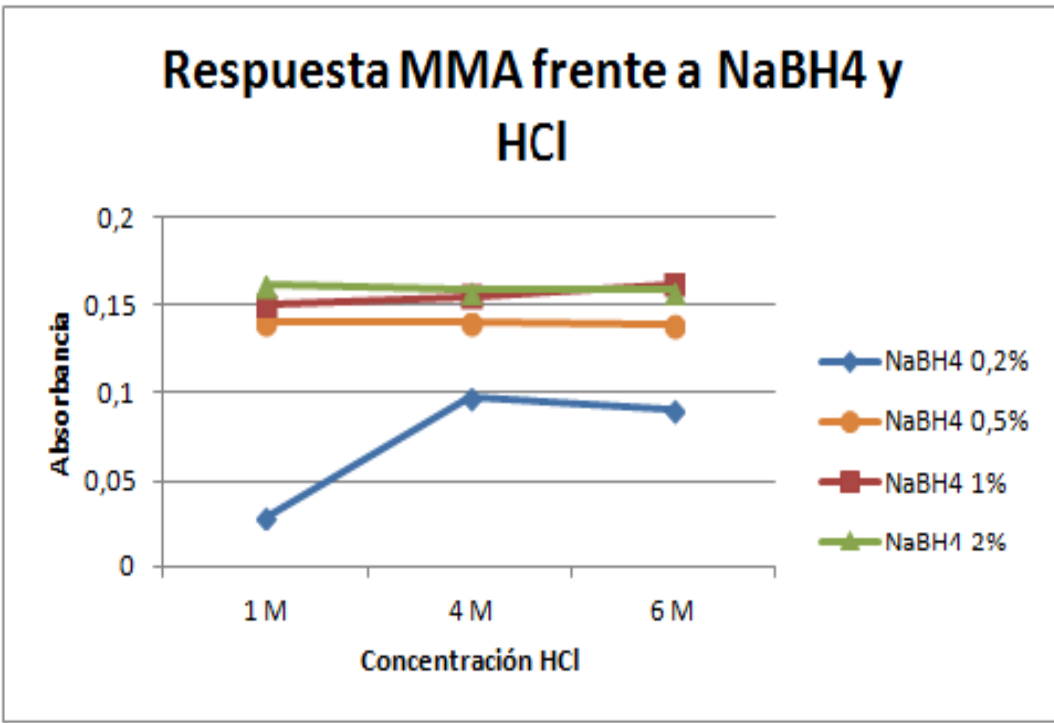
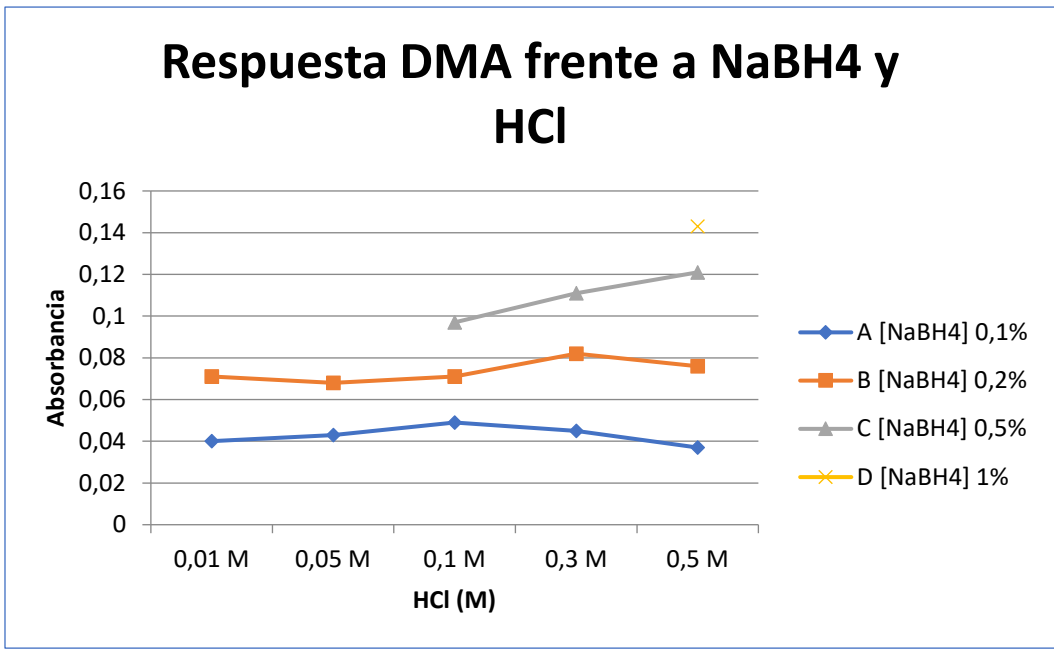


Figura 6, Respuesta frente a HCl y NaBH4

Gráficos (a, b): gráfico de absorbancia como respuesta frente a diferentes concentraciones de HCl, manteniendo constante la concentración de NaBH₄ en cada caso, para DMA y MMA. Similar a la figura 5.

5.1.4 Evaluación de respuesta y linealidad para Asi-DMA y MMA

Se trabajó con las condiciones de Carrier HCl y reductor NaBH₄ determinadas para las especies de DMA y MMA. Para la determinación de Asi, se utilizaron las condiciones descritas por el fabricante del equipo instrumental. En la tabla N°12, se señalan estas condiciones de trabajo.

Concentraciones óptimas	MMA	DMA	Asi
HCl (M)	6	0,5	6
NaBH ₄ (%)	1	1	0,5

Tabla 12. Concentraciones óptimas de trabajo de HCl y NaBH₄ para las especies DMA, MMA y Asi.

Bajo estas condiciones se obtuvo el rango lineal de respuesta para las concentraciones por especie, señaladas en la tabla N°12.

Especie	Rango estudiado ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Rango lineal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Ecuación de la recta	r^2
MMA	0,3 - 40	0,3-20	$y = 0,0159x + 0,0024$	0,9986
DMA	0,3 - 40	1,0-40	$y = 0,0104x - 0,0007$	0,9983
Asi	0,1-15	0,1-10	$y = 0,0314x + 0,0012$	1

Tabla 13. Rango lineal y ecuación de la recta por especie obtenida.

5.2 Optimización de SPE

5.2.1 Evaluación capacidad de retención de la columna

Un mayor % de retención de la columna SPE se obtuvo a pH 7 para las especies iónicas de DMA, MMA y Asi, como se puede observar en el gráfico N°3.

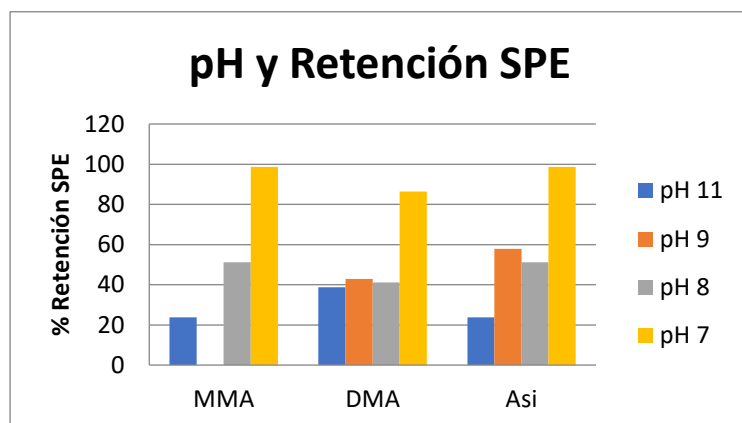


Figura 7. Capacidad de retención de especies de As en la columna QAX a los siguientes pHs: 7-8-9 y 11.

Los resultados de retención en la columna QAX en el rango de pH de 7 a 11, se indican en la tabla N°13.

Especie	pH acondicionamiento	Concentración analito de la post-carga ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Capacidad de retención QAX (%)
MMA	11	7,63	23,70
	8	4,88	51,20
	7	0,13	98,69
DMA	11	6,12	38,81
	9	5,71	42,89
	8	5,89	41,06
	7	1,36	86,36
Asi	11	7,63	23,70
	9	4,21	57,89
	8	4,88	51,20
	7	0,13	98,69

Tabla 13. Análisis retención en QAX.

Porcentaje (%) de retención para DMA, MMA y Asi dentro del rango de pH: 7 a 11.

5.2.2 Evaluación del pH de elución para DMA y MMA

El valor de recuperación más alto para DMA, 98,77%, se obtuvo utilizando un tampón de acetato a pH 4,5. Para MMA se obtuvo la mayor recuperación a pH igual 3, utilizando una concentración de ácido acético de 0,05 M con un % de recuperación de 37,1%.

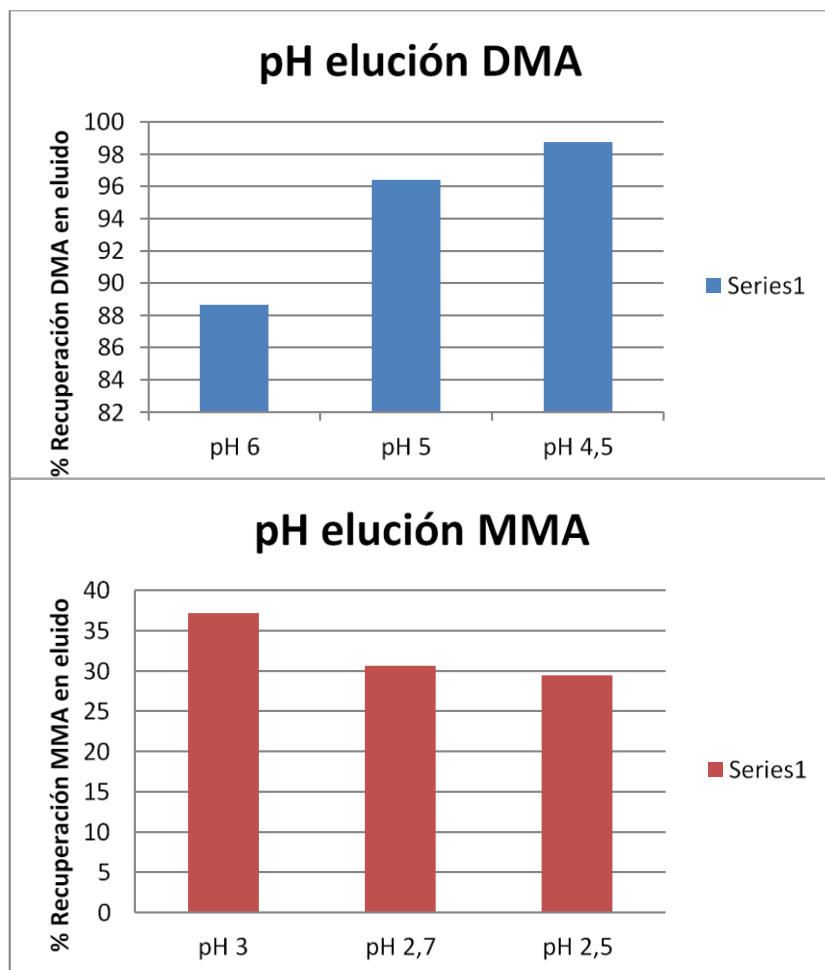


Figura 8 Porcentajes de recuperación a diferente pH de elución.

Gráfico (a,b): % de Recuperación DMA y MMA a diferentes valores de pH en eluido a) % recuperación DMA utilizando soluciones buffer de acetato de sodio a diferentes concentraciones: pH 6, pH 5 y pH 4,5. b) % recuperación MMA a pH 3 (ácido acético 0,05 M), pH 2.7 (ácido acético 0,1 M) y pH 2.5 (ácido acético 0,5 M).

5.2.3 Estudio de interferencias entre los analitos DMA-MMA-Asi

A partir de los resultados obtenidos en los estudios de optimización de separación en columna, se seleccionó el pH más adecuado para la separación de las especies arsenicales. Es decir, se trabajó con un valor de pH 7 en la carga de la columna, y el pH de elución tomó los valores de 4,4 (H_3BO_3 2% p/V) para la obtención de DMA en el primer eluido, un valor de 3 (CH_3COOH 0,05 M) para la obtención de MMA en el segundo eluido y un pH < 2 (HNO_3 0,75 M) para la obtención final de Asi.

Se evaluó la influencia de cada especie sobre la otra respecto de la recuperación de cada una en el eluido cuando las especies arsenicales se encontraban en mezcla. En la tabla n°14 se muestran los porcentajes de recuperación por especie. En el primer eluido la especie primordialmente encontrada es DMA, en el segundo eluido es MMA y en el tercer eluido es Asi. De las soluciones aplicadas se encontró que la recuperación de DMA en el primer eluido se ve disminuida por presencia de MMA en un 4,2% (solución de DMA y MMA) y por Asi en un 4,66% (solución de DMA y Asi). Respecto de la recuperación obtenida para MMA frente a DMA ésta disminuye en un 0,47%, considerándose despreciable. Frente a Asi la recuperación de MMA se ve disminuida en un 2,4% valor que no se considera influyente. Para la recuperación de Asi en el tercer eluido, MMA disminuye el valor de su recuperación en un 14,28% y DMA disminuye el valor en un 11,12%. (figura N°9).

Se obtuvo un %R para DMA de un 88,8, para MMA un 42,5% y un 98,9% para Asi, para soluciones estándar preparadas de forma individual. Para la solución de la mezcla de las 3 especies en mezcla, se obtuvieron los siguientes resultados, 85%, 42% y 88%. (figura N°9).

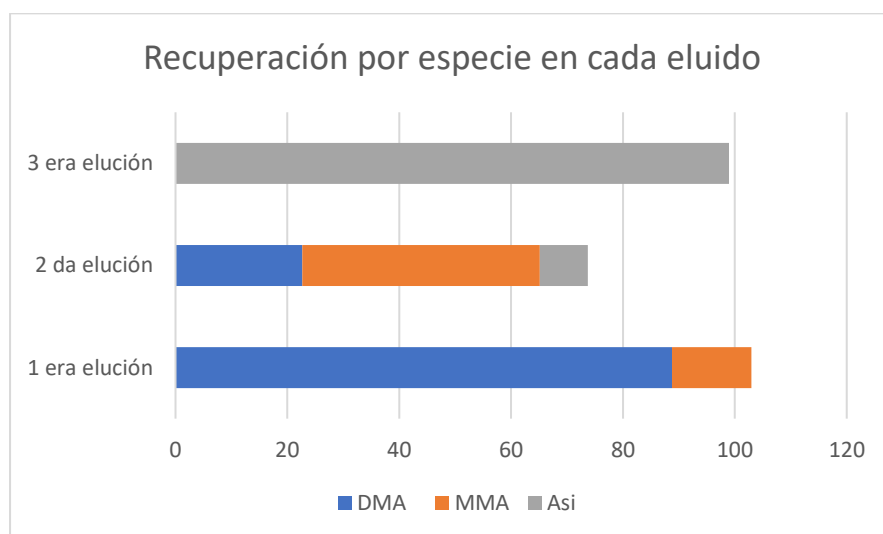


Figura 9. Recuperación por especie en cada eluido. Porcentaje de recuperación de DMA, MMA y Asi en cada eluido en columna QAX.

En el primer eluido se obtuvo principalmente DMA, se obtuvo una señal minoritaria del analito MMA con un 2,3% y no se obtuvo respuesta para el Asi. En el segundo eluido se obtuvo un porcentaje de recuperación de DMA de un 14,1%, MMA 42% y Asi no fue observado. En el tercer eluido, no se encontró la presencia de DMA, MMA obtuvo un valor despreciable de un 0,69% y Asi obtuvo una respuesta de aproximadamente un 88%. (Ver figura N°10).

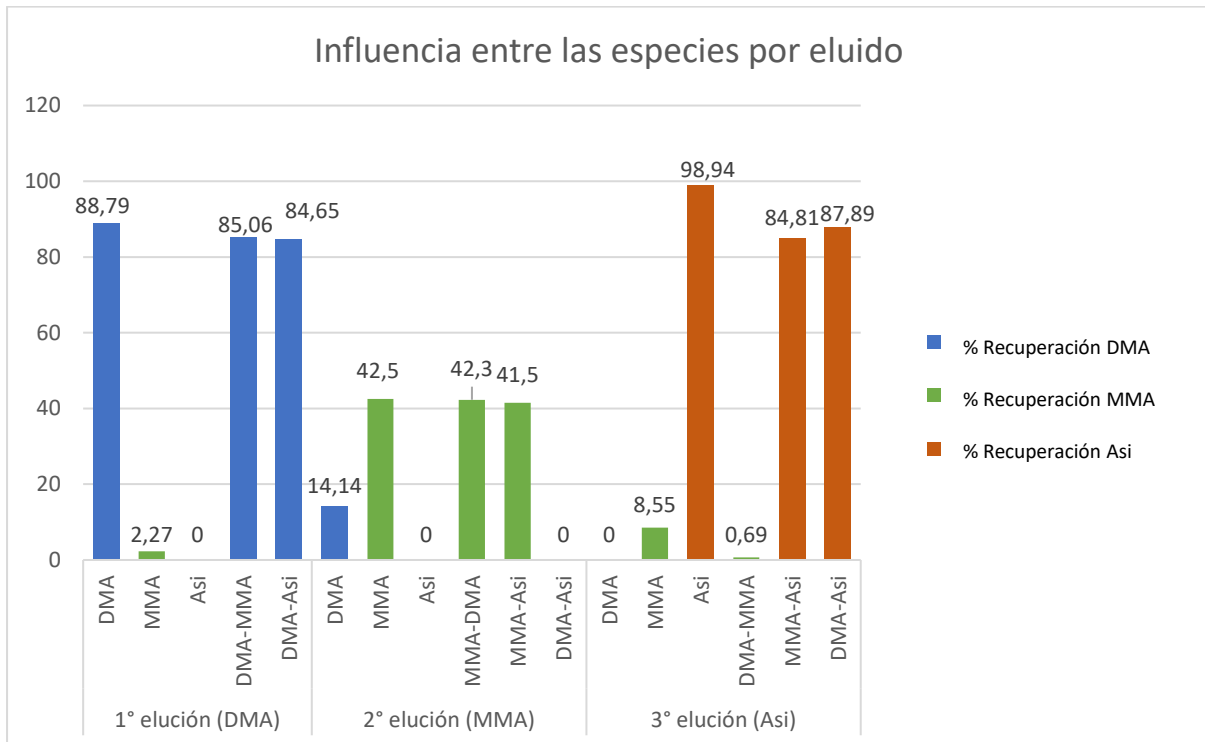


Figura 10. Influencia entre las especies por eluido. Muestra el % de recuperación en cada eluido cuando las especies se aplicaron por separado y en mezcla en la columna QAX.

5.3 Método de extracción de las especies DMA, MMA y Asi en algas

5.3.1 Elección del clean-up para el Método de extracción

Método de extracción	Extractante	Clean-up	V. carga QAX (mL)	Conc ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recuperación (%)		
					DMA	MMA	Asi
Ultrasonido 1 hora x 80°C	10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%	Columna C-18: Acond: 5 mL metOH Equilibrio: 5 mL HNO ₃ 0,1 M. Carga: 7 mL de extracto acidulado con HNO ₃ . Lavado: 5 mL agua ultrapura Elución: 5% metOH	5	1,0	0	0	0
Ultrasonido 1 hora x 80°C	10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%	1) ZnSO ₄ 2,1 M y NaOH 10%.	4	1,0	0	0	0
		2) 5 mL CHCl ₃ x 2v (fase superior y fase inferior)					
Ultrasonido 1 hora x 80°C	1) 10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%	1) 5 mL de CHCl ₃ x 3v	4,5	2,0	0	7,1	51,3
	2) 10 mL CH ₃ OH (evaluación en solución ácida y neutra)				0	3,4	0,8
Ultrasonido 30 min a 60°C	1) 10 mL de CH ₃ OH 2) 10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%	1) 5 mL de CHCl ₃ x 3v	5	2,0	8,3	4,8	6,9
Ultrasonido 30 min a 60°C 2 veces	10 mL de CH ₃ OH y 5 mL de cloroformo	1) 10 mL de agua y 10 mL de CHCl ₃ .	5	2,0	0	4,9	44,7
		2) Agregar 3 mL de mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%			0	14,2	53,9

Tabla 14. Resultados análisis clean-up

Método de extracción	Extractante	Clean-up	V. carga QAX (mL)	Conc ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Recuperación (%)		
					DMA	MMA	Asi
1) Ultrasonido 1 h a 60 °C	1) 10 mL de agua y 10 mL de CH ₃ OH.	5 mL de CHCl ₃ x 2v	5	2,0	Interf.	52,5	65,3
2) Ultrasonido 1 h a 40°C	2) H ₂ O ₂ 3% (evaluación en solución neutra y ácida)				Interf.	64,1	67,8
Ultrasonido 1 hora x 80°C	10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3% (evaluación en solución neutra y ácida)	4 mL de CHCl ₃ x 2v	5	2,0	Interf.	0	0
					Interf.	0	0
1) Ultrasonido 1 hora x 80°C 2) Ultrasonido 30 min x 60 °C	1) 10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%. 2) 10 mL de metanol.	5 mL de CHCl ₃ x 2v	5	2,0	Interf.	0	0
1)Ultrasonido 30 min. 2)Ultrasonido 1 hora 80°C.	1) 10 mL de metanol. 2) 10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%.	5 mL de CHCl ₃ x 3v	5	2,0		0	0
1) Ultrasonido 1 hora x 80°C	1) 10 mL HNO ₃ 0,1 M+H ₂ O ₂ 3%.	1) 20 mL de etanol absoluto 2) 5 mL de etanol absoluto	5	2,0	68,54	26,37	56

Tabla N°14: Clean-up y modificaciones al método de extracción. Optimización clean-up.

5.4 Optimización e Implementación de la metodología analítica del método de extracción

5.4.1 Diseño Experimental

En la tabla 15 se muestran los resultados del análisis ANOVA para la recuperación de DMA, MMA y Asi para los siguientes componentes: suma de cuadrados, grados de libertad (GI), cuadrado medio, razón-F y Valor-P. Para cada efecto principal, interacción, y error experimental.

Análisis de Varianza para Recuperación DMA

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo de extracción	3176,04	1	3176,04	16,11	0,0278
B:Volumen alicuota	15111,9	1	15111,9	76,64	0,0031
C:Volumen etanol	640,82	1	640,82	3,25	0,1692
AB	609,354	1	609,354	3,09	0,177
AC	350,066	1	350,066	1,78	0,2749
BC	82,3045	1	82,3045	0,42	0,5642
Error total	591,504	3	197,168		
Total (corr.)	20562	9			

Tabla 15. Análisis de varianza de DMA

R-cuadrada = **97,2008 %**

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **87,4035 %**

Error absoluto medio = **7,25**

Estadístico Durbin-Watson = **2,27067** (p=0,8211)

Análisis de Varianza para Recuperación MMA

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Tiempo de extracción	0,6498	1	0,6498	0,01	0,9284
B:Volumen alicuota	3662,82	1	3662,82	53,73	0,0052
C:Volumen etanol	71,5208	1	71,5208	1,05	0,3811
AB	2,62205	1	2,62205	0,04	0,857
AC	171,125	1	171,125	2,51	0,2113
BC	0,08405	1	0,08405	0	0,9742
Error total	204,501	3	68,1671		
Total (corr.)	4113,33	9			

Tabla 16. Análisis de varianza de MMA.

R-cuadrada = **95,0283 %**

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **85,085 %**

Error absoluto medio = **4,3524**

Estadístico Durbin-Watson = **2,48178** (P=0,9098)

Análisis de Varianza para Recuperación As inorg

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:Volumen alicuota	17696,4	1	17696,4	121,51	0,0016
B:Volumen etanol	229,408	1	229,408	1,58	0,2983
C:Tiempo de extracción	4,41045	1	4,41045	0,03	0,8729
AB	19,6565	1	19,6565	0,13	0,7377
AC	13,005	1	13,005	0,09	0,7846
BC	0,26645	1	0,26645	0	0,9686
Error total	436,916	3	145,639		
Total (corr.)	18400,1	9			

Tabla 17. Análisis de varianza de Asi

R-cuadrada = **97,6255 %**

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = **92,8764 %**

Error absoluto medio = **5,2448**

Estadístico Durbin-Watson = **1,91834** (P=0,7263)

A continuación, se muestran los resultados del análisis de diseño de cribado en diagramas de Pareto, gráfico de superficie de respuesta y gráfica de los efectos principales en la figura n°1 para los resultados obtenidos de DMA, MMA y Asi.

En los diagramas de Pareto de las figuras 11 a, 11 b y 11 c, se muestran los efectos generados como un t estadístico y graficados en orden descendente de su magnitud absoluta. Además, se ha dibujado una línea azul sobre cada factor considerado significativamente estadístico a un nivel de significancia cercano al 4%.

5.4.2 Resultados Diseño experimental DMA

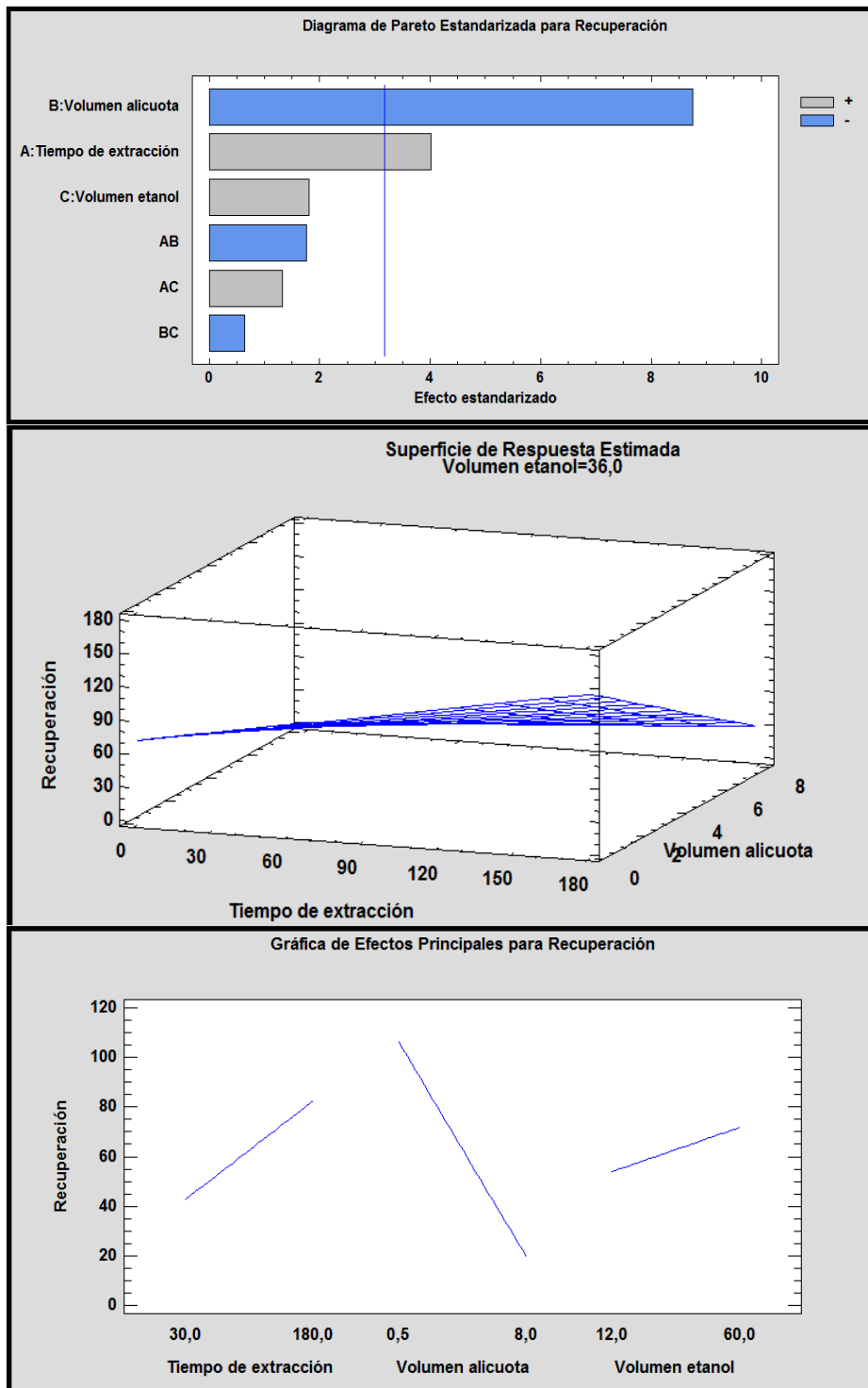


Figura 11 a. Gráficos resultados de DE para DMA

Diagrama de Pareto estandarizada, Gráfico Recuperación vs tiempo de extracción y gráfico de efectos principales (variables fijas: tiempo de extracción, volumen de alícuota y volumen de etanol).

Diagrama de Pareto DMA: La gráfica muestra que los efectos sobre el nivel de significancia α correspondiente a la línea azul vertical fueron el volumen de alícuota (negativo, de forma inversamente proporcional) y el tiempo de extracción (positivo, directamente proporcional). Los demás efectos y las interacciones no son significativas.

Gráfico de superficie de respuesta estimada DMA: El gráfico muestra la recuperación de DMA como una función del volumen de la alícuota y tiempo de extracción. La recuperación se mantiene a medida que aumenta el tiempo de extracción, sin embargo, la recuperación aumenta cuando el volumen de la alícuota del extracto es menor.

Gráfico de efectos principales DMA: Indica que la respuesta sobre la recuperación varía notoriamente cuando uno de los factores (volumen de alícuota, el volumen de etanol y el tiempo de extracción) varía de su nivel más bajo a su nivel más alto, con los demás factores conservándose en el punto central de la región experimental (a la mitad de su valor, entre el nivel bajo y el nivel alto).

5.4.3 Resultados Diseño experimental MMA

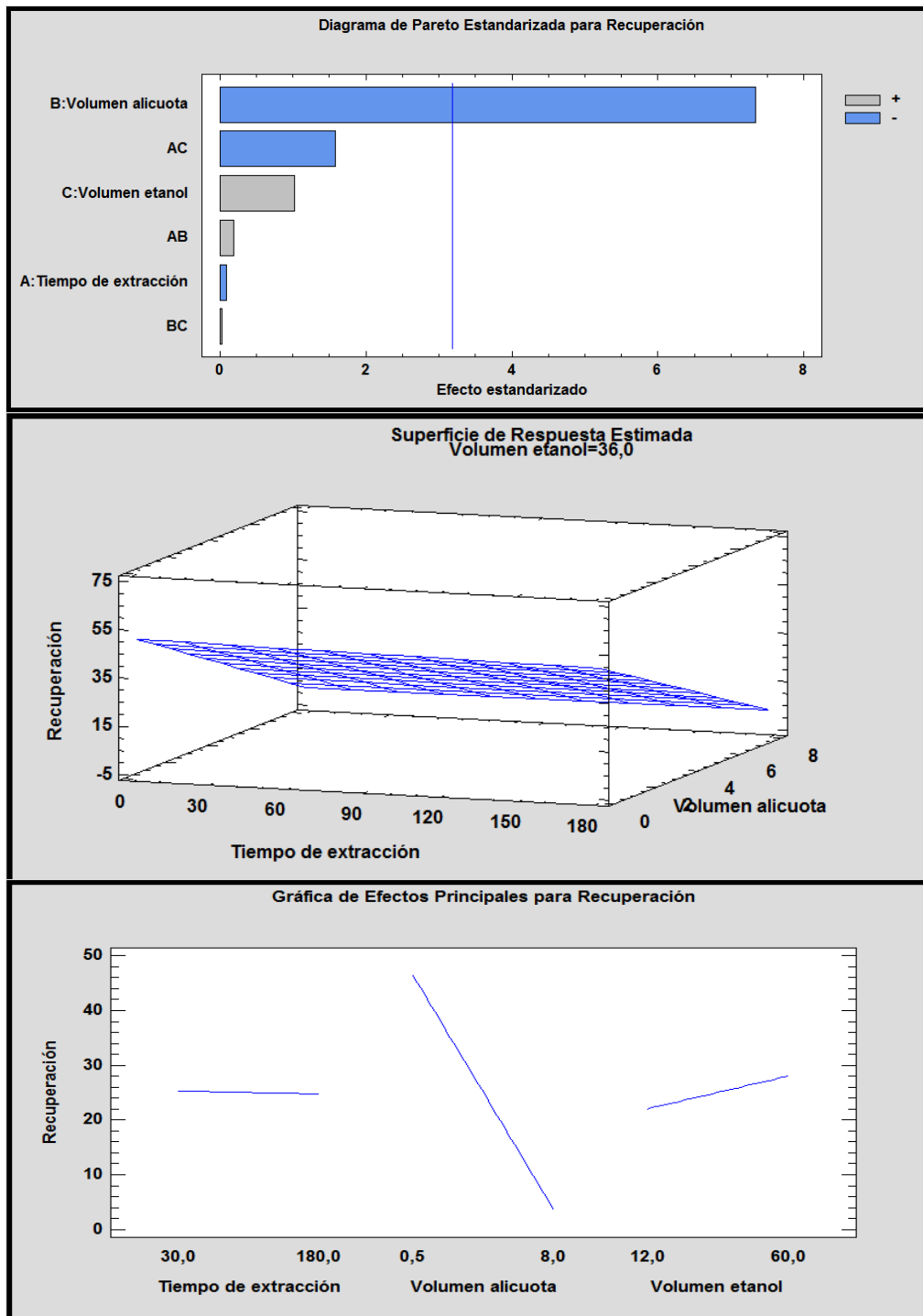


Figura N°11 b: Gráficos del DE MMA. Diagrama de Pareto estandarizada, Gráfico Recuperación vs tiempo de extracción y gráfico de efectos principales (variables fijas: tiempo de extracción, volumen de alícuota y volumen de etanol).

Diagrama de Pareto MMA: El efecto del volumen de alícuota se encuentra sobre el nivel de significancia α correspondiente a la línea azul vertical (negativo, de forma inversamente proporcional). Los demás efectos y las interacciones no son significativas.

Gráfico de superficie de respuesta estimada MMA: el gráfico muestra la recuperación de MMA como una función del volumen de la alícuota y tiempo de extracción. La recuperación se mantiene a medida que aumenta el tiempo de extracción, sin embargo, la recuperación aumenta cuando el volumen de la alícuota del extracto es menor.

Efectos principales MMA: Para los gráficos de efectos principales para MMA, se muestra cómo la respuesta prevista varía notoriamente cuando el volumen de alícuota es cambiado de su nivel más bajo a su nivel más alto, con todos los otros factores conservándose en el punto central del valor experimental (entre el nivel bajo y el nivel alto).

5.4.4 Resultados Diseño experimental Asi

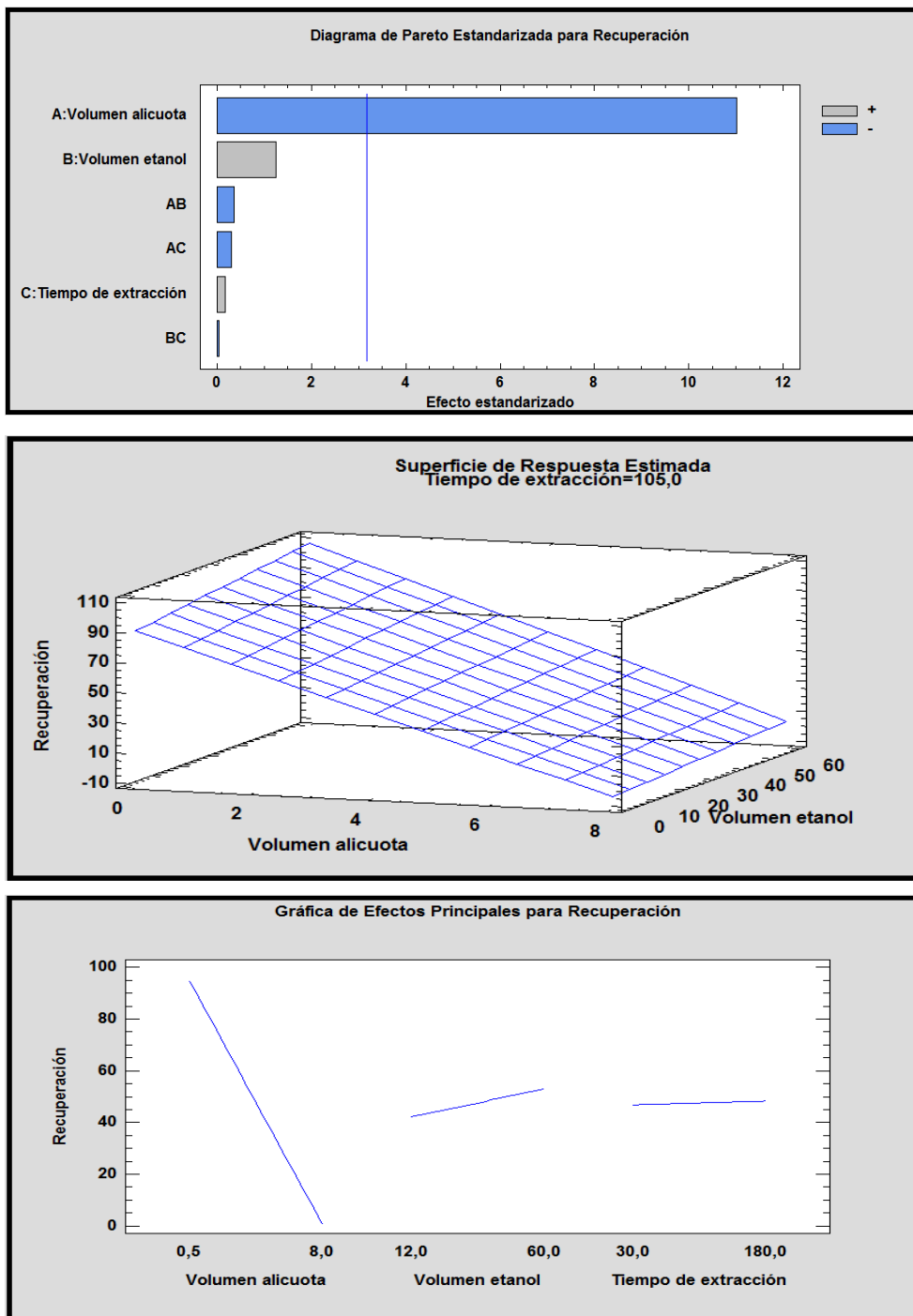


Figura 11 c. Gráficos resultados DE para Asi.

Diagrama de Pareto estandarizada, gráfico recuperación vs tiempo de extracción y gráfico de efectos principales (variables fijas: tiempo de extracción, volumen de alícuota y volumen de etanol).

Diagrama de Pareto Asi: El efecto del volumen de alícuota se encuentra sobre el nivel de significancia α correspondiente a la línea vertical (negativo, de forma inversamente proporcional). Los demás efectos y las interacciones no son significativas.

Gráfico de superficie de respuesta estimada Asi: el gráfico muestra la recuperación de Asi como una función del volumen de la alícuota del extracto y volumen de etanol. La recuperación aumenta a medida que aumenta el volumen del extracto y el volumen de etanol agregado.

Efectos principales: Para el gráfico de efectos principales para Asi, se muestra cómo la respuesta prevista varía notoriamente cuando el volumen de alícuota es cambiado de su nivel más bajo a su nivel más alto, con todos los otros factores conservándose en el punto central de la región experimental (a la mitad entre el nivel bajo y el nivel alto). La respuesta respecto a la variación del tiempo de extracción no varía de forma importante. Para la respuesta frente a la variación del volumen de etanol se observa que existe una pequeña diferencia entre la recuperación obtenida a un nivel más bajo frente a uno más alto.

5.4.5 Optimización de los factores determinantes del diseño experimental

Respecto al análisis de ANOVA, se encontró como factor significativo el volumen de alícuota. La respuesta varía considerablemente en función del volumen de la alícuota cuando se mantienen constantes el resto de los factores evaluados. Además, se observó que el tiempo de extracción es un factor significativo en la recuperación de DMA, pues la recuperación varía en función del tiempo de extracción cuando se mantienen constantes el resto de los factores evaluados. Los demás factores e interacciones no se consideraron significativos. Con estos antecedentes, se consideró definir a través de un estudio de optimización, el volumen de alícuota de carga y el tiempo de extracción en el baño de ultrasonido, a través de un estudio de optimización.

Considerando que, a un menor volumen de alícuota de carga, la recuperación aumenta positivamente, se evaluó la respuesta de cada especie frente a los siguientes volúmenes de alícuota: 0,5 - 1 - 1,5 - 2 y 4 mL. La mayor recuperación se obtuvo con un volumen de 0,5 mL, obteniéndose una concentración final de 4,25 de DMA $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 1,5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de MMA y 3,19 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Asi. Ver tabla N°18 (resultados promedio de análisis por duplicado) y gráfico n°12.

Se evaluó el tiempo de extracción y se comparó la recuperación de los analitos a tiempos de exposición de 2 y 3 horas en el baño de ultrasonido (no se evaluaron tiempos mayores por

considerarse una disminución de la eficiencia del método de extracción). Los valores de la tabla N°19 muestran los resultados obtenidos, las concentraciones promedio y el valor de su coeficiente de variación. Se obtuvo la mejor respuesta para un tiempo de extracción de 2 horas para las tres especies del estudio manteniendo un volumen de alícuota de 0,5 mL y un volumen de etanol de 25 mL (valor nominal de etanol establecido en el diseño de cribado). La respuesta para DMA fue mayor un 11,6%, para MMA un 26% y para Asi un 31,6% con respecto a la recuperación que se obtuvo frente a la utilización de un tiempo de 3 horas en el baño de ultrasonido (Ver gráfico N°13).

Vol alícuota (mL)	DMA $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CV (%)	MMA $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CV (%)	Asi $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	CV (%)
0,5	4,25	19,8	1,5	13,1	3,19	4
1	2,5	14	1,14	12,9	1,97	15,1
1,5	1,83	7,9	1,33	19,3	1,68	16,9
2	1,36	2	0,91	16,1	1,26	14,6
4	1,21	21,5	1,05	10,9	0,68	12,8

Tabla 18. Evaluación del volumen alícuota. Valores de concentración DMA, MMA y Asi obtenidos en estudio de optimización y su coeficiente de variación (%) para 3 determinaciones.

Especie	Concentración ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 2 h	CV %	Concentración ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 3 h	CV %
DMA	3,46	4,87	3,1	4,7
MMA	1,3	10,75	1,03	5,17
Asi	2,25	5,25	1,71	1,79

Tabla 19. Evaluación del tiempo en ultrasonido.

Valores de concentración para DMA, MMA y Asi en baño de ultrasonido durante 2 horas y 3 horas respectivamente, volumen de extracto constante de 0,5 mL de alícuota, y coeficiente de variación para las 3 determinaciones realizadas.

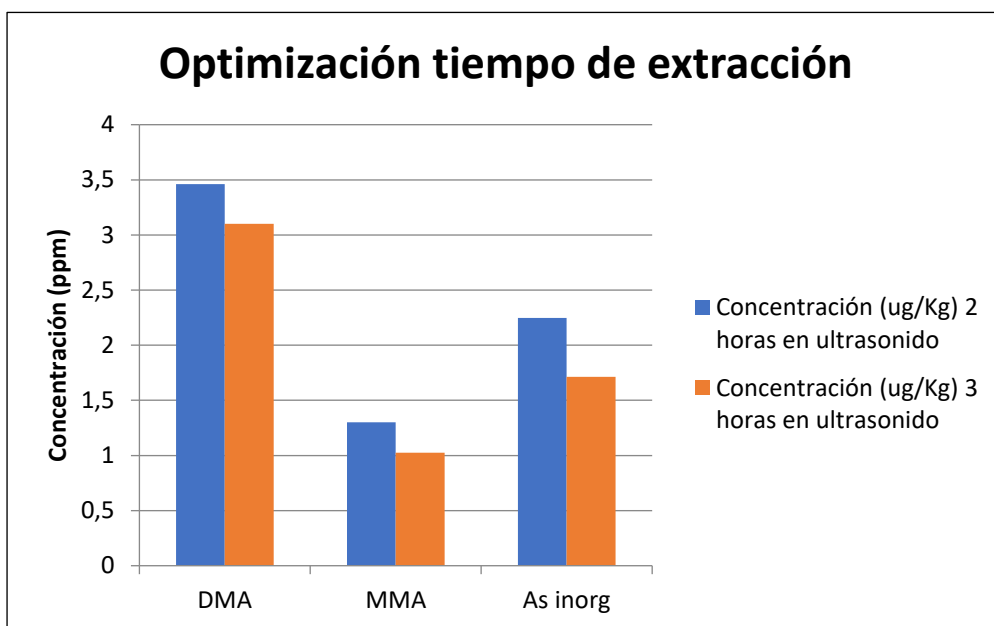


Figura 12. Optimización del tiempo de tratamiento con ultrasonido en el proceso de extracción de DMA, MMA y Asi.

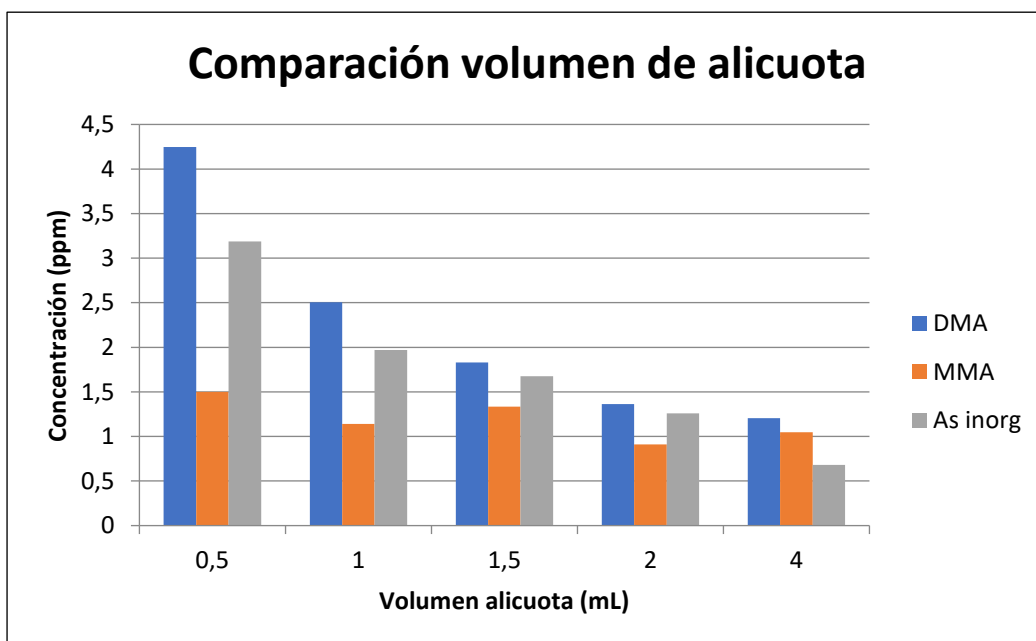


Figura 13 Optimización del volumen de alícuota para el proceso de extracción de DMA, MMA y Asi.

Finalmente, el método de extracción quedó definido como se señala en la figura N° 14:

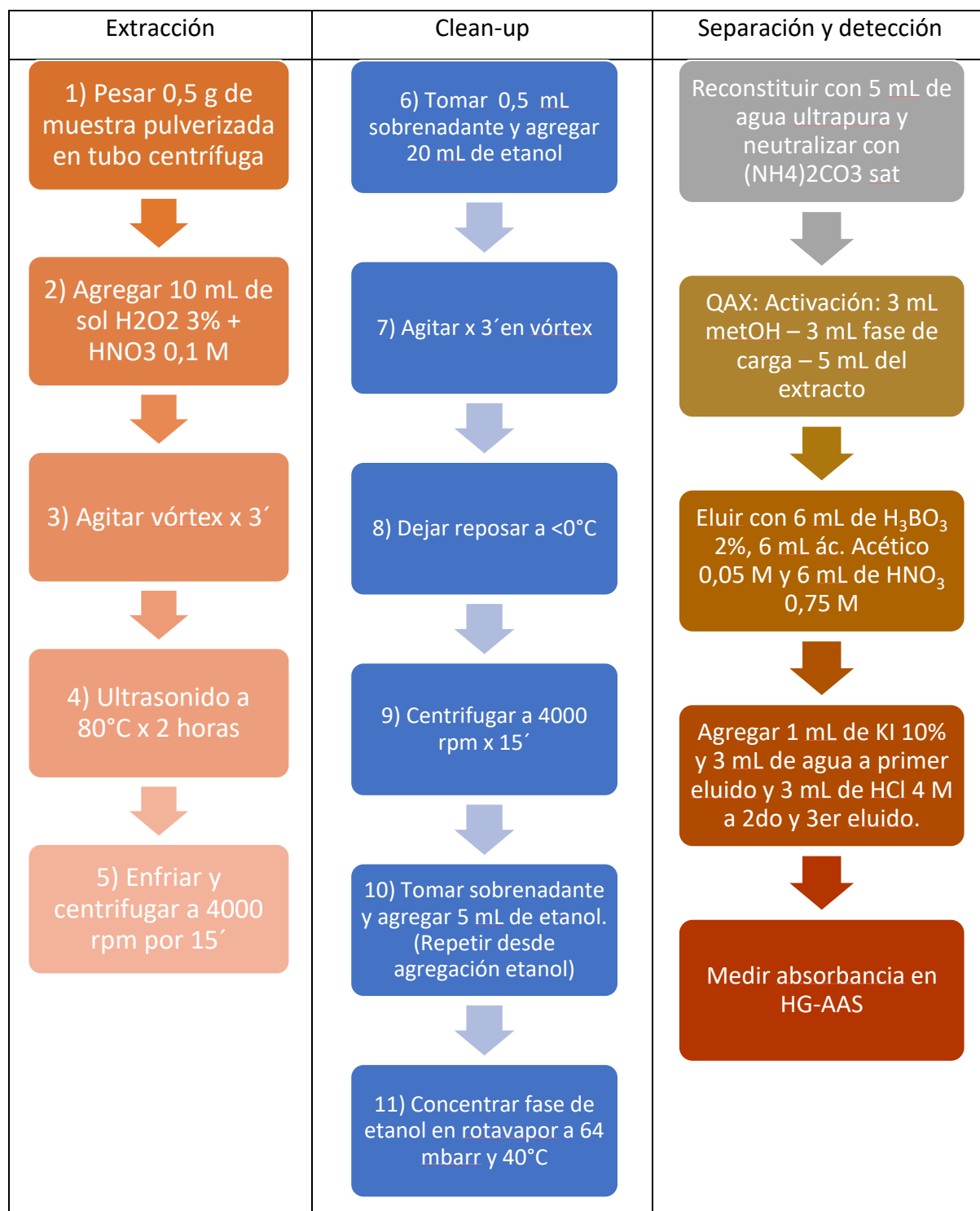


Figura 14. Diagrama método de extracción implementado

Método analítico implementado para la determinación de DMA, MMA y Asi en muestras de algas marinas.

5.5 Validación del método analítico implementado

5.5.1 Linealidad

Siendo r^2 el coeficiente de correlación de la linealidad al cuadrado y S la desviación estándar de las pendientes de cada curva de calibración. Se obtuvieron los siguientes resultados respecto de la evaluación de la linealidad para las pendientes obtenidas para las 3 curvas de calibración estándar preparadas en 3 días diferentes: el promedio del r^2 para DMA fue de 0,9991 con una Sb de 0,0008, para MMA fue de 0,9982 con una S de las pendientes de 0,0018 y para Asi el r^2 fue de 0,9992 con una Sb de 0,018. De acuerdo con estos resultados, la evaluación de la linealidad para las curvas de calibración analizadas para los 3 analitos fue aceptada, pues el r^2 fue mayor al criterio de aceptación de 0,99, con una variación aceptable entre cada una de las pendientes. Ver tabla N°20.

Especie	Fecha Análisis	Pendiente	Coeficiente de correlación al cuadrado (r^2)	Promedio del r^2	S
DMA	13-10-2017	0,016	0,9994	0,9991	0,0008
	24-11-2017	0,009	0,9997		
	15-12-2017	0,010	0,9982		
MMA	13-10-2017	0,021	0,9962	0,9982	0,0018
	24-11-2017	0,019	0,9993		
	15-12-2017	0,016	0,9992		
Asi	13-10-2017	0,026	0,9997	0,9992	0,0018
	24-11-2017	0,029	0,9987		
	15-12-2017	0,024	0,9993		

Tabla 20. Evaluación de la linealidad. Comparación de curvas de calibración de los analitos DMA, MMA y Asi. (r^2): coeficiente de correlación y (S): Desviación estándar de 3 curvas de calibración.

5.5.2 Límites de cuantificación y detección

Se pudo establecer que, la matriz del material control preparado contenía una señal detectable sólo para DMA, y no para MMA o Asi, por lo que la matriz sólo fue fortificada con estándares analíticos de MMA y Asi en la determinación de los límites de detección y cuantificación. La matriz se fortificó para obtener una concentración final de $400 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ para MMA y $200 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ para Asi. En la tabla n°21, se indican los resultados para DMA, MMA y Asi del ensayo de límites de detección y cuantificación instrumentales obtenidos por la interpolación en la curva de regresión lineal, y los límites del método que se obtuvieron a partir de los límites instrumentales, que corresponden a los límites que se establecieron para esta matriz. Los límites de cuantificación en la curva de calibración estándar se encontraron dentro del rango de $1,8 - 0,8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que los límites de cuantificación del método de extracción se encontraron dentro del rango de $717 - 178 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Especie	fortificado matriz ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$[\bar{x}]$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	S	Coefficiente de posición (b)	LOD ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	LOD m ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	LOQ m ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
DMA	matriz sin fortificar	2,4	0,2	0,0017	0,5	215,5	1,8	716,8
MMA	400	0,6	0,1	0,0021	0,2	94,5	0,8	313,1
Asi	200	0,5	0,0	0,0017	0,1	54,0	0,4	178,4

Tabla 21. Límites de detección y cuantificación instrumental y del método para DMA, MMA y Asi en matriz (m).

Valor de concentración fortificada en $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ del material de análisis). $[\bar{x}]$: concentración promedio por especie en $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, S: desviación estándar de cada especie, coeficiente (b) de posición en la ecuación de regresión lineal de la curva de calibración estándar y límites de detección instrumental y del método (LOD i y LOD m respectivamente) y límites de cuantificación instrumental y del método (LOQ i y LOQ m respectivamente).

5.5.3 Precisión

5.5.3.1 Repetibilidad

El coeficiente de variación estándar para los análisis de DMA, MMA y Asi fue menor que el coeficiente de variación de Horwitz en los ensayos de repetibilidad obtenidos en un mismo día lo que indica que los resultados presentan una desviación estándar aceptable para el desempeño del método respecto a la repetibilidad. Los resultados del ensayo de repetibilidad para cada especie se muestran en la tabla N°22. En la figura N°15, se muestran gráficos de dispersión de los resultados respecto al promedio de las concentraciones obtenidas en un mismo día para DMA, MMA y Asi. DMA, presentó una desviación de $0,11 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, mayor respecto de los otros analitos. Dos de los resultados obtenidos de la determinación de DMA sobrepasaron los límites calculados como se puede ver en el gráfico a) de la figura N°15.

Especie	Promedio ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	S	n	CVr%	CVr% horwitz
DMA	1,69	0,11	7	6,63	7,26
MMA	0,16	0,01	9	5,84	9,50
Asi	0,23	0,02	10	9,81	10,19

Tabla 22. Evaluación de la repetibilidad.

Se muestra los resultados del promedio de concentración en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de los ensayos realizados durante un mismo día, la desviación estándar (S), el número de ensayos que se realizaron por especie (n), el coeficiente de variación (CVr%) y el coeficiente de variación de Horwitz (CVr%_{horwitz}) como parámetros de evaluación.

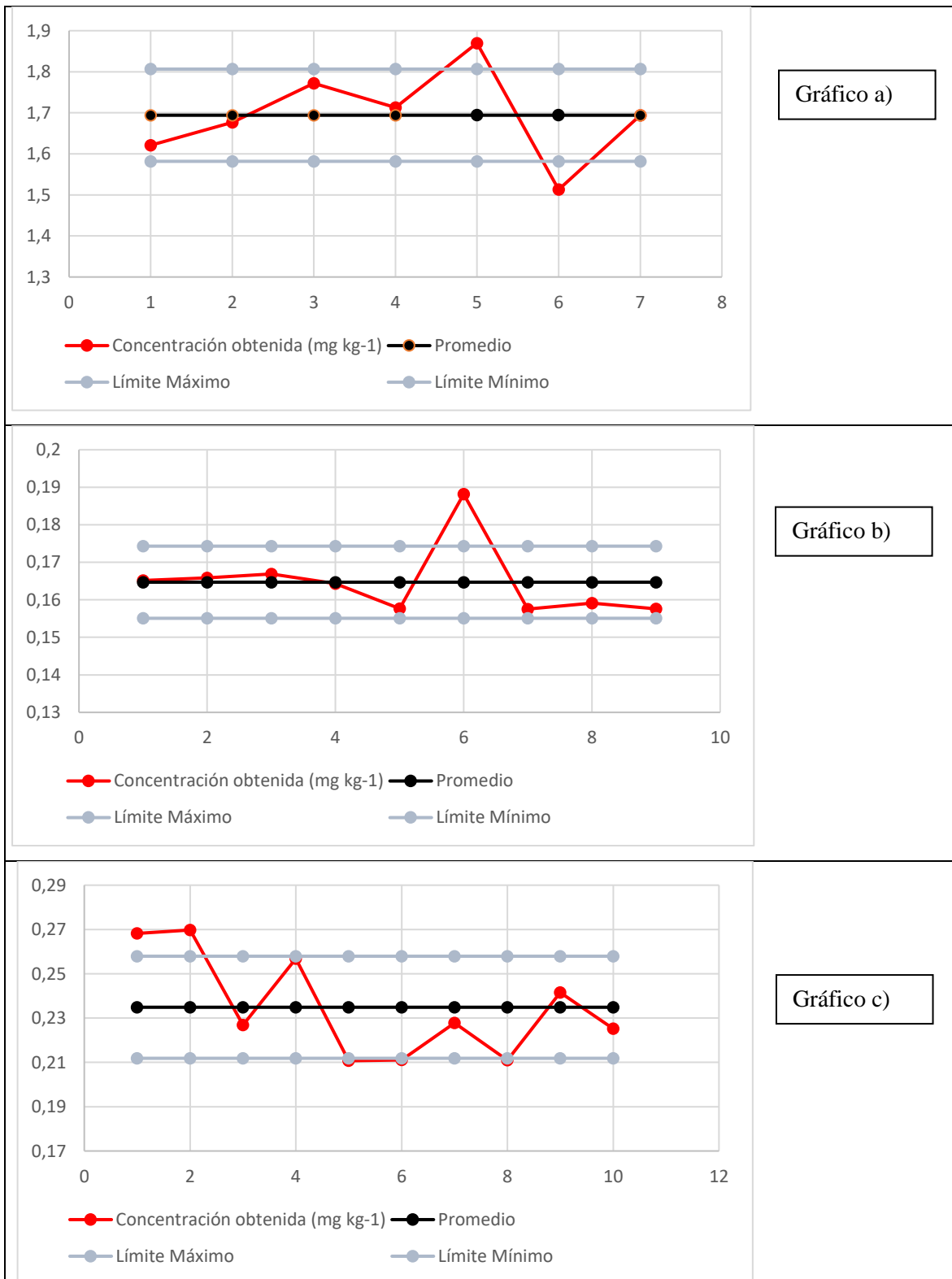


Figura 12. Controles para la evaluación de repetibilidad. Gráficos de dispersión de datos de repetibilidad respecto al promedio. Desviación de los datos obtenidos para DMA a), para MMA b) y para Asi c).

5.5.3.2 Reproducibilidad (Precisión intermedia)

El coeficiente de variación estándar para los análisis de DMA, MMA y Asi fue menor que el coeficiente de variación de Horwitz en los ensayos de reproducibilidad con 10 ensayos diferentes durante tres días para cada una de estas especies, lo que indica que los resultados presentan una desviación estándar aceptable para el desempeño del método respecto a la reproducibilidad. Los resultados obtenidos del ensayo de reproducibilidad para cada especie se muestran en la tabla N°23. La figura N°16, muestra los gráficos de dispersión de los resultados respecto al promedio de las concentraciones obtenidas en tres días para DMA, MMA y Asi. MMA, presentó una desviación mayor respecto de los otros analitos. Como puede observarse en el gráfico b) de la figura N°16, se obtuvieron dos valores fuera de los límites calculados. La desviación estándar para MMA fue de $0,10 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

Especie	Promedio	S	n	CVr%:	CVr% Horwitz:
DMA	0,23	0,02	10	9,81	10,19
MMA	1,77	0,10	10	5,46	9,68
Asi	0,26	0,03	10	10,46	12,66

Tabla 23. Resultados reproducibilidad.

Resultados del promedio de concentración en $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ para los ensayos realizados durante el mismo día, con su desviación estándar (S), el número de ensayos que se realizaron por especie (n), el coeficiente de variación (CVr%) y el coeficiente de variación de Horwitz (CVr%_{Horwitz}) como parámetros de evaluación.

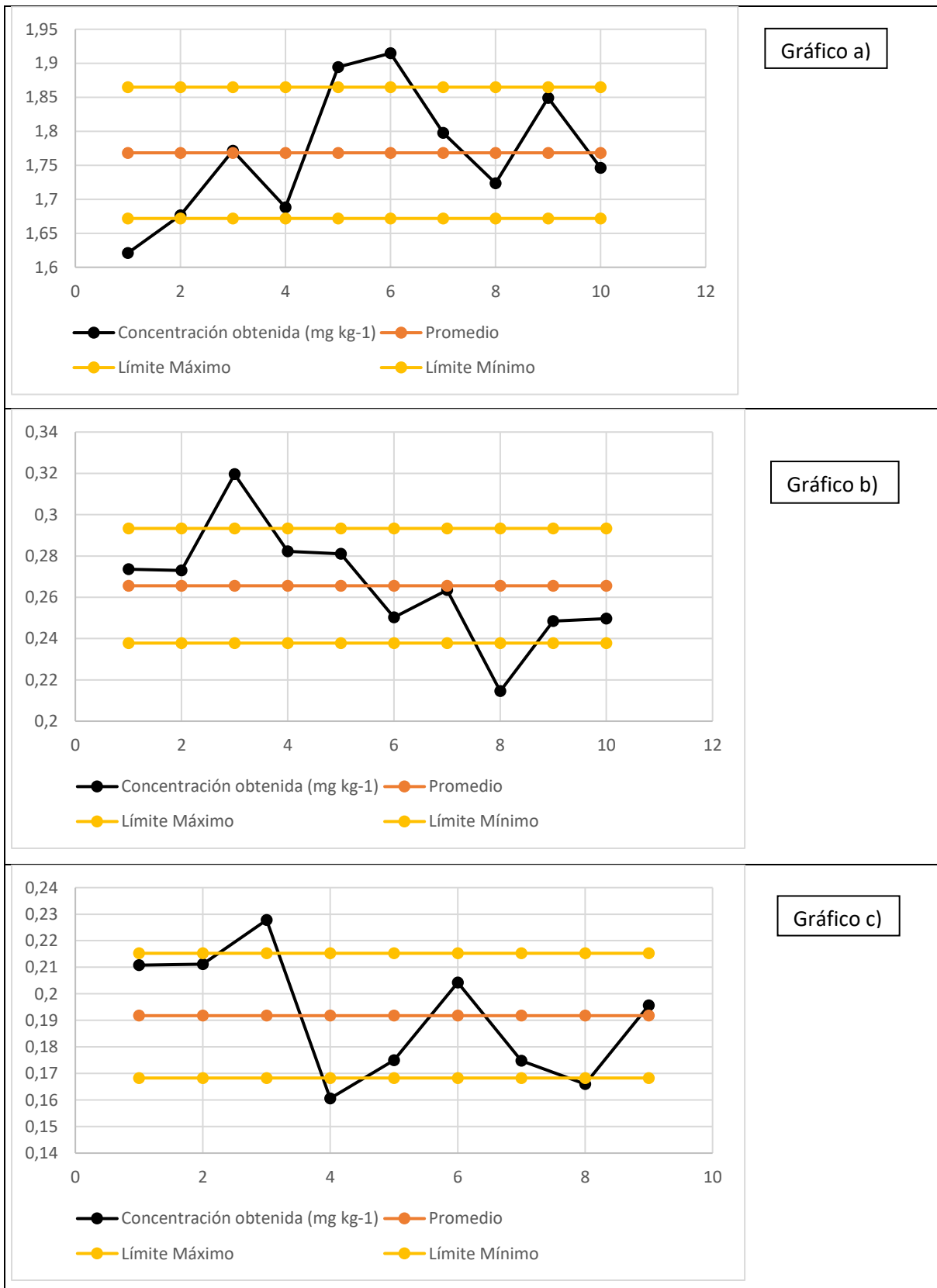


Figura 16. Controles para evaluación de reproducibilidad. Dispersión de datos de reproducibilidad respecto al promedio. Desviación de los datos obtenidos para DMA a), para MMA b) y para Asi c).

5.5.4 Recuperación

La recuperación al valor del LOQ (nivel 1 de fortificación) para DMA fue de un 85,7% con un promedio de recuperación para los tres niveles evaluados (LOQ, nivel intermedio y nivel alto) de un 89,3 % de recuperación con un t calculado menor al t crítico, por lo que, según la AOAC, los criterios de recuperación para los tres niveles de concentración evaluados son aceptados. Para MMA se obtuvo un promedio de recuperación de 74,58%, lo cual no cumple con los criterios de aceptación de la guía AOAC para los valores de concentración fortificados y evaluados en ninguno de los tres niveles estudiados (criterio AOAC 80-110% de recuperación), además, en los tres niveles de concentración evaluados el t calculado fue mayor al t crítico, por lo que la recuperación no presenta confiabilidad de los resultados. Finalmente, la recuperación en los tres niveles estudiados para Asi, presentó un promedio de un 98,4% con un t calculado menor al t crítico en los tres casos, por lo que se aceptan los valores de recuperación del método para Asi. En la tabla N°24 se muestra la recuperación por nivel estudiado con la desviación estándar, $t_{\text{crítico}}$ y t_{calc} para cada una de las especies del estudio.

Valores estadísticos	DMA			MMA			Asi		
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
%R Promedio:	85,71	87,90	94,33	80,39	75,21	68,14	95,88	106,87	92,44
S:	7,90	6,14	3,19	4,41	1,65	3,59	2,10	5,65	3,36
$t_{\text{crit}} (a=0,05; n-1)$	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
t_{calc}	3,13	3,41	3,08	7,70	26,08	15,35	3,39	2,11	3,90

Tabla 24. Resultados de recuperación

Porcentajes promedio de recuperación con n=3 para DMA, MMA y Asi de nivel recuperación equivalente al LOQ (nivel 1), nivel intermedio de la curva de calibración (nivel 2) y nivel alto de la curva de calibración (nivel 3). Su desviación estándar (S), t calculado (t_{calc}) y t_{crit} ($t_{\text{crit}} (a=0,05; n-1)$).

5.5.5 Incertidumbre

Los resultados de incertidumbre para DMA, MMA y Asi se indican en la tabla N°25. Se obtuvo una incertidumbre relativa (K=2) para DMA de 14,29 %, para MMA un 34,66 % y para Asi un 35,43%. Estos valores se utilizaron para expresar la incertidumbre de los resultados de las muestras analizadas.

Analito	Sesgo		Reproducibilidad	U	U
	CV% del sesgo	U relativa (%)	U relativa %	combinada (%)	relativa (K=2) %
DMA	1,73	7,14	0,01	7,14	14,29
MMA	3,31	17,33	0,00	17,33	34,66
Asi	3,10	17,72	0,00	17,72	35,43

Tabla 25. Incertidumbre combinada y relativa.

5.6 Análisis de las muestras recolectadas por el método de extracción implementado

Utilizando el método implementado y validado, se analizaron un total de veintinueve muestras de algas, que incluyeron veinticinco muestras de *Porphyra columbina* y cuatro muestras de *Durvillaea antártica* recolectadas en las localidades de Coronel y Coliumo, para cuantificar las especies de DMA, MMA y Asi, cuyos resultados se resumen en la tabla N°26. Del total de las muestras analizadas se encontró que el 100 % contenía una señal para DMA, mayor que su LOQ. Ninguna muestra presentó señal detectable para MMA. Para Asi se encontraron dos muestras de *Porphyra columbina* con una concentración superior al LOQ equivalentes a un 6,9% del total de las muestras y doce muestras (once muestras de *Porphyra columbina* y una muestra de *Durvillaea antártica*) contenían concentraciones trazas superiores al LOD y menores al LOQ equivalentes a un 41,4% del total. El promedio de concentración de Asi encontrado en las muestras fue de 0,28 mg*kg⁻¹, en muestras recolectadas en la zona de Coronel.

ID Punto recolección	ID Muestra	Localidad	DMA mg*kg ⁻¹	MMA mg*kg ⁻¹	Asi mg*kg ⁻¹
Punto B-1	ML-B1A	Maule, Coronel	2,30 ± 0,33	<LOD	0,12 ± 0,04 (<LOQ)
	ML-B1B	Maule, Coronel	2,31 ± 0,33	<LOD	0,13 ± 0,05 (<LOQ)
	ML-B2	Maule, Coronel	0,95 ± 0,14	<LOD	<LOD
	ML-B3	Maule, Coronel	1,77 ± 0,25	<LOD	0,07 ± 0,02 (<LOQ)
	ML-B4	Maule, Coronel	1,40 ± 0,20	<LOD	<LOD
Punto B-2	ML-B2.5	Puchoco, Coronel	2,78 ± 0,40	<LOD	0,17 ± 0,06 (<LOQ)
	ML-B2.6	Puchoco, Coronel	1,44 ± 0,21	<LOD	0,15 ± 0,05 (<LOQ)
	ML-B2.7A	Puchoco, Coronel	2,03 ± 0,29	<LOD	0,14 ± 0,05 (<LOQ)
	ML-B2.7B	Puchoco, Coronel	1,70 ± 0,24	<LOD	0,14 ± 0,05 (<LOQ)
	ML-B2.8	Puchoco, Coronel	2,67 ± 0,38	<LOD	0,17 ± 0,06 (<LOQ)
Punto B-3	ML-B3.9	Lo Rojas, Coronel	1,19 ± 0,17	<LOD	0,16 ± 0,06 (<LOQ)
	ML-B3.10	Lo Rojas, Coronel	1,79 ± 0,26	<LOD	0,27 ± 0,09
	ML-B3.11	Lo Rojas, Coronel	1,60 ± 0,23	<LOD	0,28 ± 0,10
Punto B-4	ML-B4.12	Playa Negra, Coronel	1,23 ± 0,18	<LOD	0,11 ± 0,04 (<LOQ)
	ML-B4.13	Playa Negra, Coronel	1,24 ± 0,18	<LOD	0,07 ± 0,03 (<LOQ)
	ML B4.14	Playa Negra, Coronel	1,60 ± 0,23	<LOD	<LOD
	ML B4.15	Playa Negra, Coronel	1,87 ± 0,27	<LOD	<LOD
Punto B-5	ML B5.16	Estero Manco, Coronel	2,18 ± 0,31	<LOD	<LOD
	ML B5.17	Estero Manco, Coronel	2,11 ± 0,30	<LOD	<LOD
	ML B5.18A	Estero Manco, Coronel	2,47 ± 0,35	<LOD	<LOD
	ML B5.18B	Estero Manco, Coronel	2,26 ± 0,32	<LOD	<LOD
	ML B5.19	Estero Manco, Coronel	3,03 ± 0,43	<LOD	<LOD
Punto A -1.1	MC-A1	Casa Poli, Coliumo	1,19 ± 0,17	<LOD	0,16 ± 0,06 (<LOQ)
	MC-A2	Casa Poli, Coliumo	1,20 ± 0,17	<LOD	0,16 ± 0,06 (<LOQ)
	MC-A3	Casa Poli, Coliumo	1,33 ± 0,19	<LOD	<LOD
	MC A4	Casa Poli, Coliumo	2,17 ± 0,31	<LOD	0,15 ± 0,05 (<LOQ)
Punto A - 1.2	ML-A1	Casa Poli, Coliumo	1,07 ± 0,15	<LOD	<LOD
	ML-A2	Casa Poli, Coliumo	1,09 ± 0,16	<LOD	<LOD
	ML -A3	Casa Poli, Coliumo	1,33 ± 0,19	<LOD	<LOD
Punto A - 2	ML A4.1	Morrito Punta, Coliumo	1,40 ± 0,20	<LOD	<LOD
	ML A4.2	Morrito Punta, Coliumo	1,73 ± 0,25	<LOD	<LOD
	ML A4.3	Morrito Punta, Coliumo	1,33 ± 0,19	<LOD	<LOD

Tabla 26. Análisis de muestras de algas de *Porphyra columbina* (Luche) y *Durvillaea antártica* (cochayuyo).

Resultados de análisis de muestras de *Porphyra columbina* (Luche) y *Durvillaea antártica* (cochayuyo) de las localidades de Coliumo (zona A), donde se recolectaron en dos puntos diferentes (Puntos: A-1 y A-2) y en la localidad de Coronel (zona B) donde la recolección fue en cinco puntos diferentes (Puntos: B-1, B-2, B-3, B-4 y B-5).

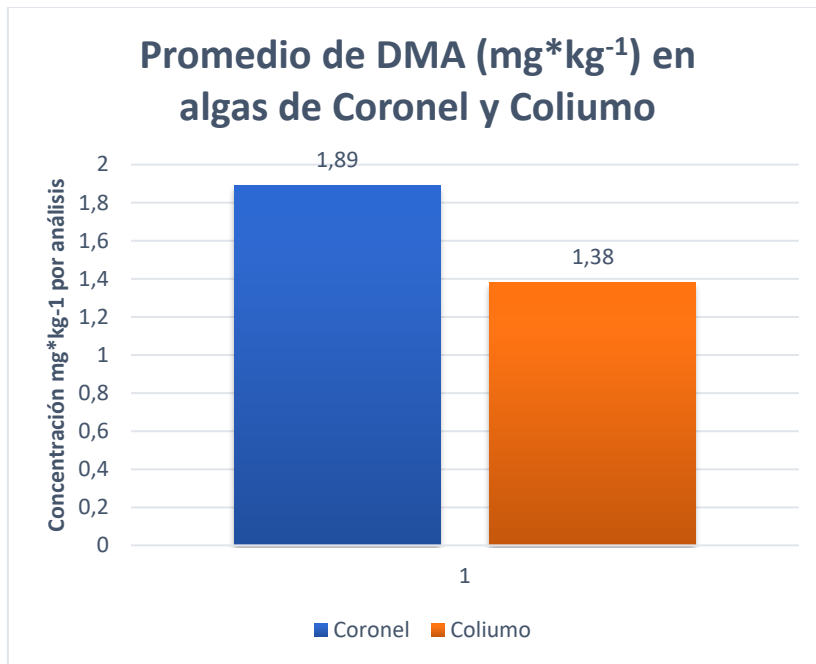


Figura 17. Determinación de DMA en muestras de Coronel y Coliumo.

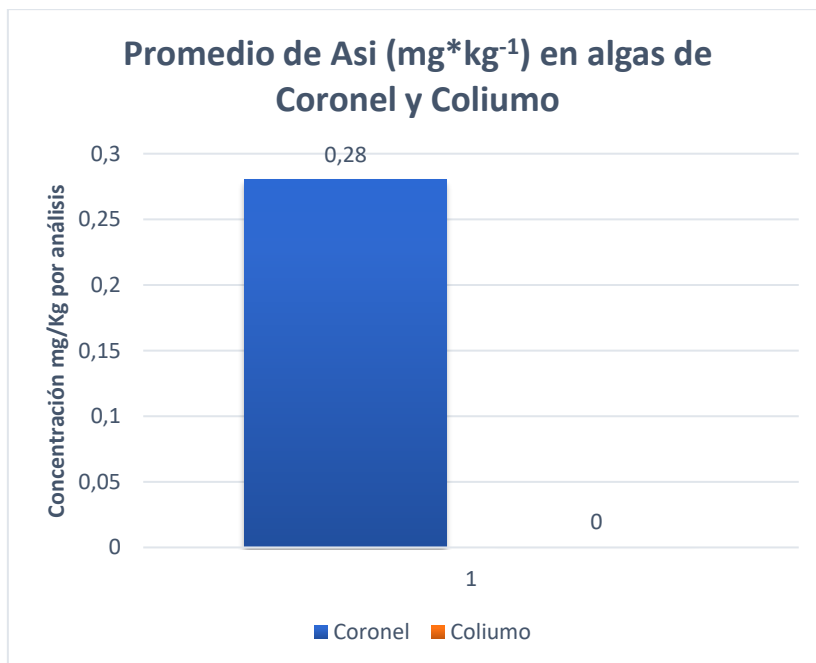


Figura 18. Determinación de Asi en muestras de Coronel y Coliumo.

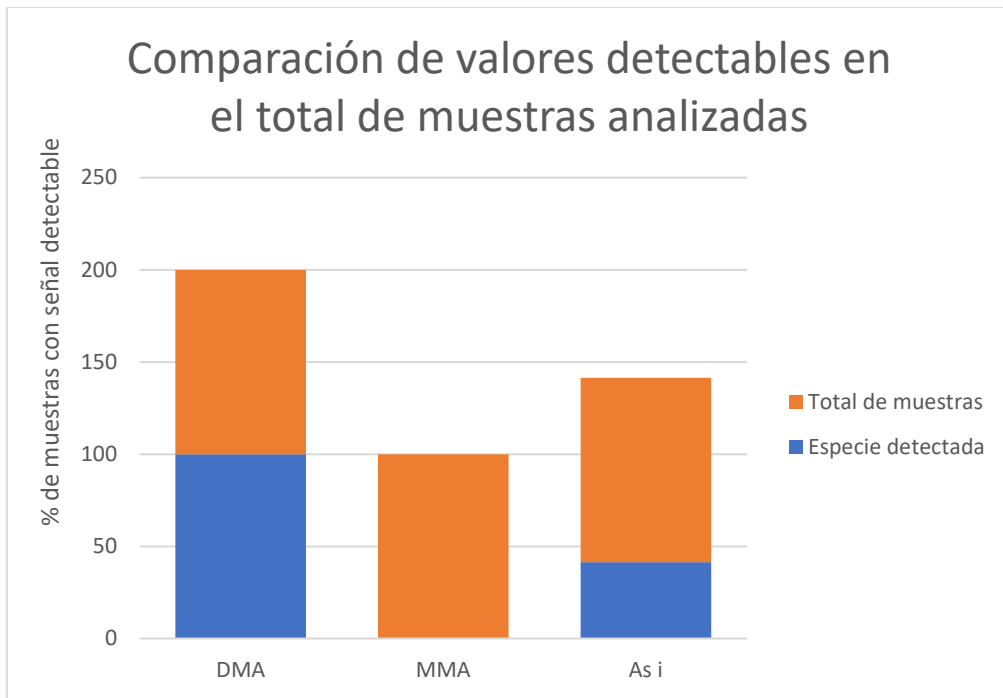


Figura 19. Determinación de DMA, MMA y Asi frente al total de muestras analizadas.

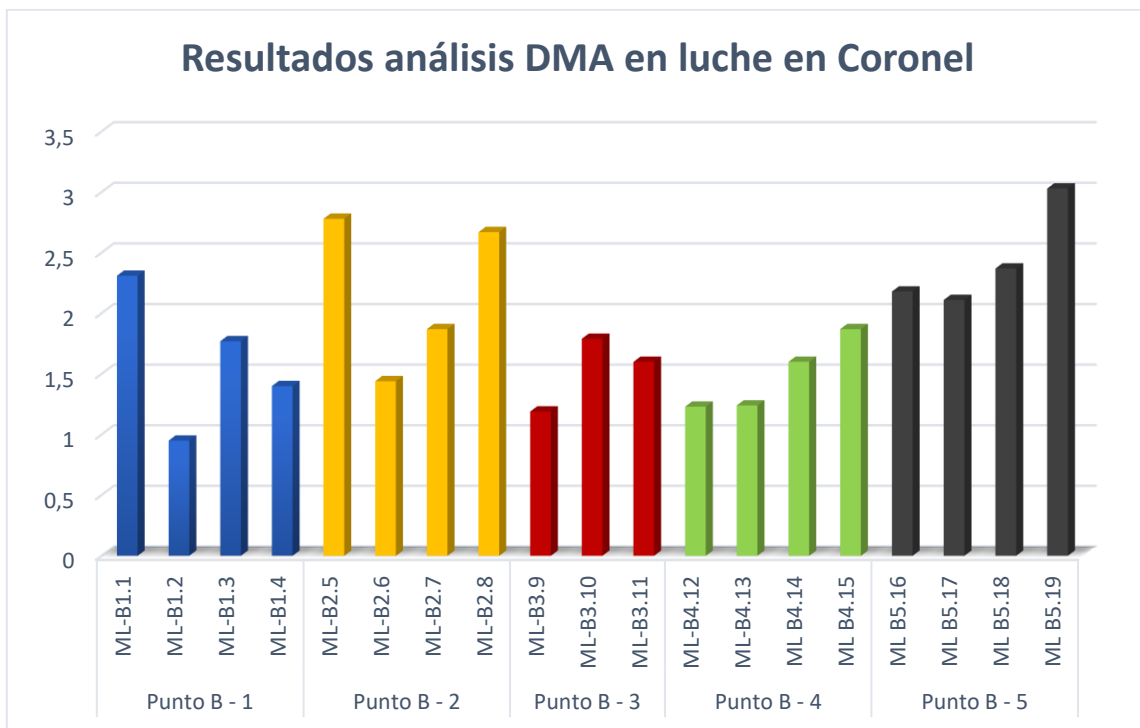


Figura 20. Concentración de DMA (mg*kg⁻¹) en cada zona de Coronel por Punto de recolección

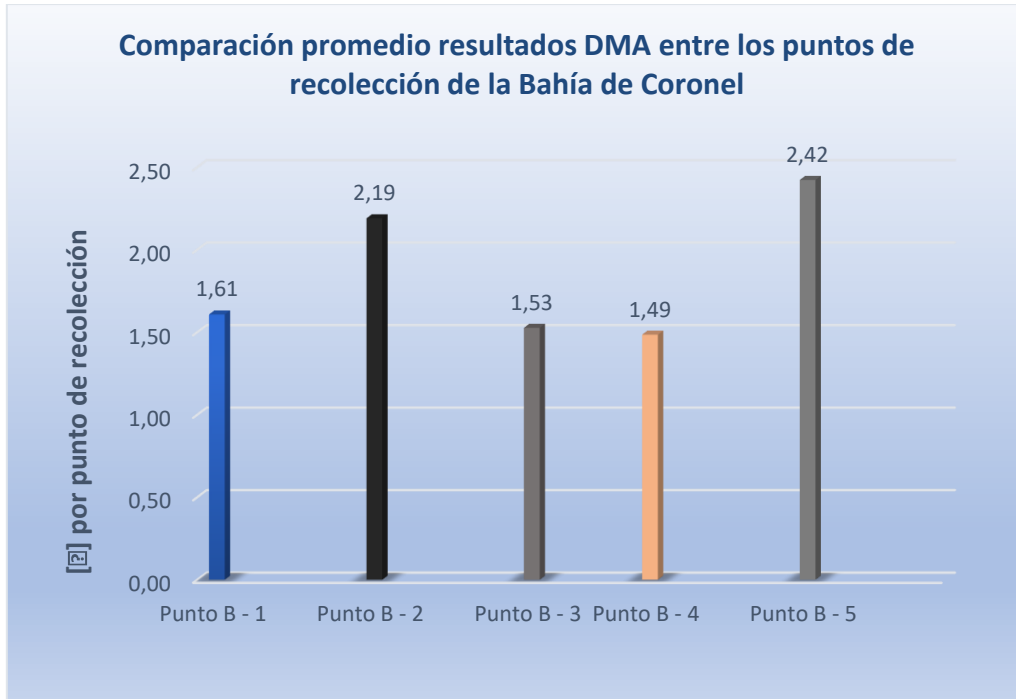


Figura 21. Promedio de hallazgos DMA (mg*kg⁻¹) en muestras de *Porphyra Columbina* por punto de recolección, Bahía de Coronel.

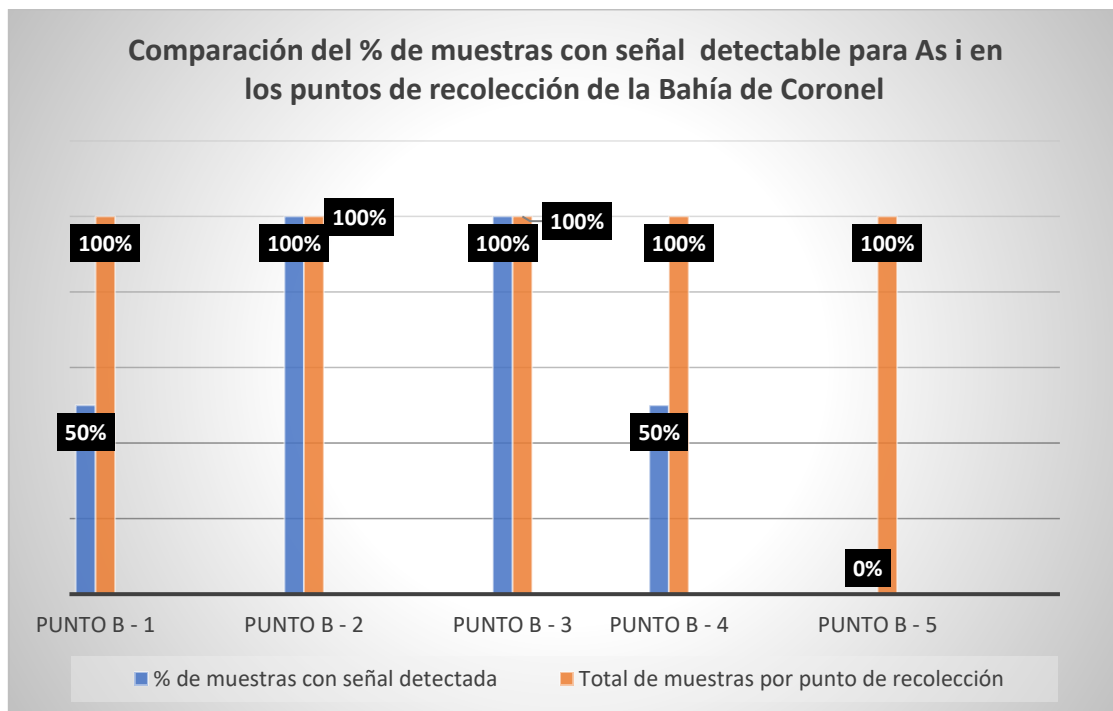


Figura 13. Comparación del % de muestras con Asi detectado frente al total de las muestras analizadas en Coronel por punto de recolección.

6 Discusión

6.1 Implementación y optimización de condiciones analíticas para la formación de arsina gaseosa

De la evaluación de la absorbancia de DMA (en medio acuoso) y MMA (en medio ácido) frente a HCl y NaBH₄, se encontró que la señal de DMA disminuía a medida que la concentración de HCl y NaBH₄ bajaban dentro del rango estudiado ([HCl]: 0,1-0,5 M y [NaBH₄]: 0,1-1%p/V) mientras que la señal para MMA se mantenía a concentraciones altas de HCl (1-6 M) y aumentaba con el aumento de la concentración de NaBH₄ (0,2-2%p/V). Las señales de respuesta se mantuvieron bajas a concentraciones insignificantes de HCl (0,01-0,1) tanto para MMA como para DMA. Los resultados para DMA son similares respecto a lo encontrado por Ascar (2006) [44] y Shraim y Col. (2000) [85], quienes evaluaron el efecto de la concentración de HCl y NaBH₄ sobre la respuesta de las diferentes especies químicas de arsénico en solución acuosa, se incrementó la respuesta a concentraciones intermedias de HCl utilizando NaBH₄ al 0,6%. Observaron también, que a concentraciones inferiores a 0,6% de NaBH₄ la señal para las especies de arsénico disminuía, similarmente a lo que ocurrió en este estudio. Sin embargo, al comparar la respuesta de MMA frente a concentraciones elevadas de HCl, los resultados fueron diferentes ya que a concentraciones elevadas de HCl (1-6 M), la respuesta aumentó a diferencia de los hallazgos encontrados por los autores citados [44, 85], donde la señal para MMA disminuía a partir de una concentración de 3 M de HCl.

Este estudio evaluó la respuesta de DMA frente a HCl (0,01 – 6 M) en un rango más amplio que lo evaluado anteriormente por Ascar (2006) [44], sin embargo, la respuesta óptima fue encontrada en concentración similar de HCl, ya que se alcanzó un máximo de respuesta a los 0,5 M de HCl y 1% p/V de NaBH₄.

La selección de las concentraciones óptimas para cada uno de estos compuestos permitió una adecuada formación de arsina gaseosa a bajas concentraciones de arsénico en cada una de las especies arsenicales del estudio (DMA, MMA y Asi). Además, la previa reacción de reducción con yoduro de potasio y ácido ascórbico realizada permitió favorecer una adecuada transferencia de electrones para la transformación a As III [42, 43, 44].

Una vez que se seleccionaron las concentraciones de HCl y NaBH₄, se estableció un rango de concentraciones para DMA, MMA y Asi que generó una respuesta lineal en un amplio rango de concentraciones, con una adecuada sensibilidad dentro del sistema de HG-AAS.

Las condiciones del análisis se establecieron en conjunto con una adecuada concentración de los componentes de la reducción antes mencionados y con los requerimientos instrumentales (velocidad de flujo de HCl y NaBH₄, mantenimiento de la presión del gas transportador de argón, velocidad de la bomba peristáltica) que finalmente permitieron una respuesta con óptima sensibilidad en el equipo analítico [44, 76].

6.2 Evaluación capacidad de retención de la columna de amina cuaternaria de intercambio aniónico fuerte

El DMA, MMA y Asi fueron selectivamente separados utilizando una columna SPE de intercambio aniónico fuerte (componente de amina cuaternaria).

Durante la evaluación de la capacidad de retención de la columna QAX frente a las soluciones tamponadas para acondicionamiento, se demostró que utilizando una solución de 35 mM de ((NH₄)₂CO₃), H₂O₂ 1,5% y HNO₃ 0,05 M ajustada a pH=7 con (NH₄)₂CO₃ saturado se logró un medio de carga en que las especies de As V, DMA y MMA mantuvieron enlaces iónicos fuertes con la fase sorbente de amina cuaternaria, debido a que a un pH igual a 7, los analitos se encontraron como iones (pH > pKa).

De la evaluación de la concentración obtenida luego de la adición de los analitos posterior al acondicionamiento de la fase sorbente entre los pHs 7 a 11, se obtuvo un mayor porcentaje de retención por parte de la amina cuaternaria (% retención en cada caso: Asi un 98,7%, MMA 98,7% y DMA 86,4%). Estos porcentajes de retención son similares a estudios como el de Yalcin y colaboradores (2001) [39] donde se probó la afinidad de una columna de intercambio iónico (SAX) obteniéndose una retención de As V y MMA de un 100% y de DMA de un 84%. El DMA fue la especie retenida en menor proporción a pH 7, la disminución en su recuperación puede deberse a que el DMA no haya sido enlazado completamente a la columna por no encontrarse totalmente ionizado a este pH (pKa DMA=6,2) [39, 77].

A un pH más elevado, se obtuvo un menor porcentaje de retención por parte de la columna, debido a que es probable que la alcalinidad de estas soluciones presentara incompatibilidad con el material de sílice [42]. Por lo tanto, el pH 7 fue seleccionado como óptimo para obtener mejores resultados de recuperación. De haber seleccionado un pH menor a 7 significaba un mayor % de pérdida para DMA e incluso MMA, no cumpliéndose el objetivo de separación.

6.3 Evaluación del pH de elución para DMA y MMA e interferencias por coelución entre DMA-MMA-Asi

La aplicación de soluciones acuosas en un medio de peróxido con estándares de los ácidos organoarsenicales (DMA y MMA) resultó en una casi completa retención por parte de la columna QAX. Del estudio para la selección de las soluciones de elución, las siguientes fueron las que presentaron una mayor recuperación: tampón de CH_3COONa a pH 4,5 (elución de DMA), donde se obtuvo una recuperación de un 98,8% y solución de CH_3COOH a pH 3, donde se obtuvo una recuperación de un 37,2% para MMA.

En una segunda etapa se evaluó la coelución simultánea entre las tres especies del estudio y se encontró que al agregar el primer volumen de solvente de elución (tampón acetato de sodio a un pH de 4,5) las especies eluyeron simultáneamente, lo que se atribuyó a que las especies interactuaron mayormente con el tampón preparado debido a que contenía un contra ion más fuerte (Na^+), y no con la amina cuaternaria de la columna, por lo que se reemplazó el solvente de elución por H_3BO_3 2% p/V, manteniéndose el pH de 4,5. Con esta modificación se logró una óptima separación de los estándares en la primera etapa del estudio.

Posteriormente, se evaluó si existía algún tipo de influencia cuando estas especies fueron aplicadas en conjunto, resultando ser que las tres especies eluyeron principalmente por separado, es decir, sin interferencias importantes. Un 14,1% de DMA fue retenido y eluido con el segundo solvente (ácido acético pH=3) pero no significó una influencia para la recuperación de MMA. Con respecto a la recuperación de Asi, el DMA no tuvo ninguna influencia ni tampoco el As V sobre el DMA. Un porcentaje de un 2,3% de MMA fue eluido con el H_3BO_3 , sin embargo, no se observó una influencia significativa en la recuperación de éste en el segundo eluido (ácido acético). Un 8,5% de MMA fue eluido con HNO_3 en la tercera elución, sin embargo, las pérdidas que se generaron por la primera elución y tercera elución para MMA no tuvieron influencia significativa sobre la recuperación de las otras 2 especies del estudio. Con el eluyente ácido bórico seguido de ácido acético en las concentraciones antes mencionadas, el As V, no fue detectado, por lo tanto, se estima que fue altamente retenido por la columna en las eluciones previas.

Los estudios de Rasmussen y colaboradores (2012 y 2013) [42, 43] utilizaron una solución de ácido acético 0,5 M (pH=2,5) como solución de lavado para eliminar las interferencias causadas por ácidos orgánicos como DMA y MMA y una solución de 0,4 M de HNO_3 y 0,5 M HCl respectivamente para eluir Asi en columnas de intercambio iónico. Estos estudios permitieron separar Asi de las demás especies orgánicas, las fueron desechadas con una solución de lavado a un pH mayor que 2,5. El Asi tuvo una buena recuperación con su

respectiva solución de elución, similar a los resultados que se obtuvieron en este estudio, donde DMA y MMA fueron obtenidas con eluciones a valores de pH mayor que 2,5 y Asi a pH menor que 1 en la columna QAX de intercambio iónico con una recuperación adecuada también.

La recuperación del Asi fue de un 88% cuando se aplicó en mezcla con DMA y MMA. Esta incompleta recuperación, es probable que sea por una competición por los sitios de interacción con la columna entre los tres analitos [78]. Sin embargo, los resultados respecto del procedimiento de elución para AsV fueron aceptados pues no existía una influencia significativa de las demás especies arsenicales para que esta pudiera ser separada de DMA y MMA.

6.4 Elección del clean-up para el método de extracción

Se agregó una etapa de limpieza previo a la carga de los extractos en la columna QAX, para eliminar las interferencias orgánicas, y optimizar la separación y recuperación de las especies arsenicales en las muestras de algas. De las etapas probadas por bibliografía, sólo un ensayo logró separar las 3 especies del estudio efectivamente, los demás métodos de extracción y limpieza probados no fueron lo suficientemente efectivos para la eliminación del contenido de sales y compuestos de alto peso molecular como los mucopolisacáridos que se estima presentes en las muestras. Por lo tanto, el método de purificación seleccionado [15] resultó ser útil en este aspecto. Por lo que se infiere que el etanol fue el solvente de extracción con mayor afinidad por las especies de arsénico en comparación con los demás solventes probados.

Por lo que se puede decir que el método de referencia que utilizó etanol en agitación con la muestra y centrifugación a una temperatura $<15^{\circ}\text{C}$ en matriz de orina y que consiguió determinar As (III), As (V), MMA, DMA, AsC y AsB con una adecuada recuperación, es comparable a los resultados obtenidos en este estudio pues las condiciones utilizadas fueron similares entre sí, lo cual respalda la aseveración de que el método es capaz de eliminar proteínas de alta masa molecular sin pérdidas importantes del analito, permitiendo sitios disponibles en la fase sorbente de la columna de retención QAX para lograr una separación y recuperación efectiva.

6.5 Optimización e Implementación de la metodología analítica del método de extracción

Respecto de los resultados obtenidos del diseño de cribado se determinó que los factores que influían en el método de extracción, con un valor estadísticamente significativo fueron el

volumen de alícuota de la muestra de la etapa de limpieza y el tiempo durante el cual la muestra estuvo sometida al baño de ultrasonido de la etapa de extracción.

Con los resultados obtenidos del análisis de ANOVA del diseño experimental se logró demostrar que el volumen de alícuota era estadísticamente significativo, pues se obtuvo un valor p menor que 0,05 en el análisis de varianza realizado a cada una de las especies [71]. Los resultados, por tanto, permitieron establecer un volumen de alícuota del extracto más bajo que el de referencia, de esta forma se demostró que los valores de recuperación para DMA, MMA y Asi aumentaron considerablemente al disminuir el volumen de alícuota tomada de la muestra.

Por otra parte, los resultados obtenidos cuando se aumentó el tiempo en que la muestra estuvo sometida a ondas de ultrasonido fueron más elevados y estadísticamente significativos para el caso de DMA, por lo cual se estableció un tiempo óptimo de 2 horas en el baño de ultrasonido de la muestra para favorecer la recuperación de las especies, especialmente la de DMA

6.6 Validación del método analítico implementado de extracción SPE seguido de detección por espectroscopía de absorción atómica y generador de hidruros (HG-AAS).

Linealidad y sensibilidad: De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad para las curvas de calibración analizadas para los 3 analitos se determinó que existe una correlación lineal para Asi dentro del rango de 0,25 a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para MMA dentro del rango 0,4 a 20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y para DMA dentro del rango de 1 a 32 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La variación de las pendientes analizadas para cada curva de calibración fue aceptable, por lo cual se aseguran resultados confiables al interpolar en estos niveles de concentración. Los límites de detección obtenidos fueron los siguientes: 0,22 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para DMA, 0,094 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para MMA y 0,054 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para Asi y los límites de cuantificación fueron de 0,72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para DMA, 0,31 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para MMA y 0,18 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para Asi. Los límites de detección determinados para DMA, MMA y Asi son por lo menos un orden de magnitud inferiores a los niveles de arsénico establecidos en la legislación chilena actual para alimentos marinos (pescados 1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de arsénico total y en moluscos y crustáceos 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de arsénico inorgánico) [84]. Es importante señalar que, en Chile no existe reglamentación para el contenido de arsénico total, inorgánico ni sus especies orgánicas en algas. El límite de cuantificación determinado para Asi es también un orden de magnitud inferior, por lo que el método del presente estudio se considera con una sensibilidad adecuada para la determinación de arsénico inorgánico y sus tres especies metiladas en muestras de algas [84].

La precisión se determinó bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, en donde se evaluó la desviación estándar de fortificados en el segundo nivel de concentración de la curva de calibración. Para la repetibilidad y reproducibilidad de las 3 especies se obtuvo un menor coeficiente de variación que el coeficiente de variación de Horwitz [66, 68, 72] por lo que se puede decir que los resultados presentan coincidencia entre sí y que el método entrega resultados confiables.

Respecto a la evaluación de recuperación del método analítico implementado para DMA y Asi los porcentajes de recuperación fueron aceptables [66] y repetibles en los 3 niveles fortificados de la curva de calibración [66, 68, 71], sin embargo, los resultados del porcentaje de recuperación para MMA no fueron aceptables [66, 68, 71], pues éstos fueron menores que los esperados respecto de los criterios en el apéndice F de la AOAC [66]. Al respecto es importante indicar que la especie MMA no puede ser cuantificada con el método analítico implementado.

La incertidumbre relativa de este método analítico para las 3 especies del estudio, no fueron superiores al 50%, por lo que se considera que el método presenta resultados con un margen de incertidumbre aceptable [71, 73], donde DMA, presentó una incertidumbre relativa menor que MMA y Asi.

Por lo tanto, de acuerdo, a los resultados de validación del método analítico estudiado presentó un nuevo enfoque de especiación, y resultó ser adecuado para el análisis de las especies de DMA y Asi en muestras de algas marinas. Se descartó el método para el análisis cuantitativo de MMA, pues se obtuvieron resultados bajos de recuperación respecto de los rangos de recuperación establecidos por la AOAC [66].

Mediante el método de ensayo implementado se analizaron un total de 29 muestras recolectadas en diferentes áreas de la zona de Coronel y Coliumo. En todas las muestras analizadas se encontró una cantidad detectable de DMA, lo que corresponde a lo esperado para muestras marinas producto de la metabolización del arsénico en las algas [16, 17, 26]. Se obtuvo un promedio de concentración de DMA mayor en las muestras de la zona de Coronel ($1,89 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) que en las muestras correspondientes a la zona de Coliumo ($1,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). El Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS (JECFA), ha indicado que las formas orgánicas de arsénico presentes en los mariscos requieren una consideración diferente del arsénico inorgánico en el agua [79]. No se ha informado de efectos nocivos la población que consume grandes cantidades de pescado con ingestas organoarsenicales de

aproximadamente $0,05 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal por día [79], si suponemos esta cantidad permitida para DMA proveniente de las algas marinas, tenemos que para un adulto de 70 kg de peso se permite una ingesta de 3,5 mg de DMA diario, lo cual está por sobre la media de las cantidades detectadas por kilo en peso de las muestras de Coronel y Lota.

Respecto del MMA, este metabolito no fue detectado en ninguna muestra, sin embargo, no es posible asegurar su ausencia en las muestras analizadas pues el método analítico estudiado no cumplió con los criterios de exactitud esperados.

Un 37,9% de las muestras analizadas en la zona de Coronel presentaron arsénico inorgánico frente a un 30% de las muestras analizadas en la zona de Coliumo. Dos de las muestras analizadas en Coronel y ambas recolectadas en el punto B-3 en la zona de Lo Rojas, mostraron una concentración superior al límite de cuantificación. De las muestras analizadas en Coliumo, ninguna presentó una concentración superior al límite de cuantificación. Aunque en este estudio no hubo una diferencia significativa entre las dos zonas del estudio, la zona de Lo Rojas en Coronel, presentó una mayor cantidad de muestras con presencia de arsénico inorgánico, esto probablemente por ubicarse en una zona de industrias termoeléctricas entre otras, que eliminan sus residuos al mar, sin un adecuado tratamiento preliminar.

Del total de las muestras analizadas en Coronel, el 100% de éstas presentó arsénico inorgánico en los puntos B-2 y B-3, los cuales fueron los puntos más cercanos a la zona de descarga de los efluentes.

Los resultados obtenidos en este estudio no permiten establecer en forma certera si la zona con más riesgo de contaminación (zona industrial de Coronel) presenta un mayor contenido de arsénico que Coliumo, pues las cantidades encontradas en ambas localidades fueron principalmente menores a los LOQ determinados. Sin embargo, se considera elevado el contenido de As inorgánico encontrado en algas en este estudio, de acuerdo, a lo que el comité EFSA y JEFCA en su reunión 72^a [79] dictaminó, respecto al BMDL0.5 de Asi ($3.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ pc por día según el rango de exposición dietética total estimada), lo cual obligan a evaluar el riesgo que supone su ingesta, por lo que se deduce que se requiere conocer el consumo de algas y de esta manera estimar el contenido de Asi que se ingiere diariamente y además, reconocer lo mencionado en esta misma reunión del comité [79], que es la incertidumbre relacionada con los supuestos respecto a la exposición total y a la extrapolación debido a la influencia del estado nutricional y otros factores relacionados con el estilo de vida.

7 Conclusiones

La etapa de extracción con ultrasonido y la etapa de limpieza que incluye el método establecido en este estudio, permitieron aumentar la recuperación de los analitos y eliminar las interferencias provenientes de una matriz compleja como lo es el alga.

El uso de extracción en fase sólida de intercambio iónico y la aplicación de eluciones a pHs adecuados a la columna, permitieron la separación de las tres especies arsenicales estudiadas, y su determinación mediante sistema HG-AAS, logrando la cuantificación analítica de DMA y Asi, y diferenciación de éstas respecto del arsénico total, característica primordial en estudios de evaluación de riesgos de toxicidad por contaminación de arsénico.

Respecto a la validación del método se establecieron los parámetros analíticos y criterios de validación para arsénico inorgánico y sus especies metiladas, cuyos límites de detección y cuantificación, permitieron aplicar el método a 29 muestras de algas marinas de cochayuyo y luche en la VIII región del Bío Bío.

Dado el bajo número de algas analizadas, no es posible concluir respecto de la influencia que tiene cada zona geográfica sobre la concentración encontrada de las especies arsenicales estudiadas.

A partir del análisis de muestras algales se detectó la presencia de DMA en cada una de ellas, en concentraciones superiores al LOQ (promedio de $1,89 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ en Coronel y $1,38 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ en Coliumo) y Asi en dos muestras presentes en la bahía de Coronel en concentraciones superior al LOQ (promedio de $0,28 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Del contenido de DMA encontrado, se puede decir que es probable que no cause un daño nocivo a los seres humanos, sin embargo, se requiere una investigación más profunda sobre las implicaciones en salud sobre la exposición prolongada a compuestos organoarsenicales.

De las cantidades de Asi encontradas y en base a los criterios vigentes, se puede decir que fueron elevadas respecto al $\text{BMDL}_{0.5}$ definido y tendrían un efecto nocivo para la salud en caso de una exposición prolongada, sin embargo, no se pueden mencionar cuáles serían todos los efectos a la salud, ya que se requiere información relativa al consumo, grado de exposición de la población y otros antecedentes epidemiológicos como la influencia del estado nutricional de los individuos, para poder extrapolar estos resultados y realizar una evaluación más precisa

del riesgo y toxicidad asociados a la presencia de Asi y sus especies orgánicas en algas de consumo humano.

Finalmente, el método implementado y validado de SPE por columna QAX acoplado a una etapa de clean-up y sistema de detección HG-AAS constituye una herramienta analítica para estudios de exposición ambiental al arsénico en muestras de algas marinas, pudiendo ser útil también en futuras inspecciones y fiscalizaciones medioambientales gubernamentales. Además, constituye una nueva alternativa de diferenciación, pues utilizó una instrumentación económica y de elevada sensibilidad (HG-AAS).

Referencias

- 1.- Gutiérrez Ríos, E. Química Inorgánica. Reverté, Barcelona, Spain, 1994.
- 2.- Shriver D.F., Atkins P.W. Química Inorgánica, 1ª edición, McGrawHill/Interamericana, Mexico, 2008.
- 3.- Lide D.R. Handbook of Chemistry and Physics, 85th edition, CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2004-2005.
- 4.- Ng, J.C. Environmental Health Criteria 224. Arsenic and arsenic compounds, 2da edición. 2005.
- 5.- Ng, J.C. Environmental contamination of arsenic and its toxicological impact on humans. Environ. Chem. 2005, 2da edición.
- 6.- Leermakers M., Baeyens W., De Gieter M., Smedts B., Meert C., De Bisschop H.C., Morabito R., Quevauviller P. Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation. TrAC, Trends Anal. Chem, 2006, 25, 1-10.
- 7.- Nordstrom D.K. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. Science, 2002, 296, 2143-2145.
- 8.- Sharma V.K., Sohn M. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. Environ. Int, 2009, 35, 743-759.
- 9.- Cullen W.R., Reimer K.J. Arsenic speciation in the environment. Chem. Rev, 1989, 89, 713-764.
- 10.- Edmonds J.S., Francesconi K.A., Stick R.V. Arsenic compounds from marine organisms. Nat. Prod. Rep., 1993, 10, 421-428.

- 11.- Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology*, 2002, 181-182, 211-217.
- 12.- Morita M., Shibata Y. Isolation and identification of arseno-lipid from a brown alga, *Undaria pinnatifida* (Wakame). *Chemosphere*, 1988, 17, 1147-1152.
- 13.- Cullen W.R., Reimer K.J. Arsenic speciation in the environment. *Chem. Rev.*, 1989, 89, 713-764.
- 14.- López-González M.A., Gómez M.M., Cámara C., Palacios M.A. Determination of toxic and nontoxic arsenic species in urine by microwave-assisted mineralization and hydride generation atomic-absorption spectrometry. *Microchim. Acta*, 1995, 120, 301-308.
- 15.- López-González M.A., Gómez M.M., Cámara C., Palacios M.A. Urine Clean-up Method for Determination of Six Arsenic Species by LC-AAS Involving Microwave Assisted Oxidation and Hydride Generation. *Chromatographia*, 1996, 43, 507-512.
- 16.- Neff Jerry. Bioaccumulation in marine organisms. Effect of contaminants from oil well produced water. 2da edición 2004, 62.
- 17.- Edmonds J.S., Francesconi K.A. *Arsenic and Marine Organisms*. Elsevier, 1996, 44, 147-189.
- 18.- Hanaoka K. Arsenobetain decomposing ability of marine microorganisms occurring in particles collected at depths of 1100 and 3500 meters. *Appl Organometal Chem*, 1998, 11, 265-272.
- 19.- Yancey PH., Clark ME., Hand SC., Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 1982, 217, 1214-1222.
- 20.- Francesconi K.A. Arsenic species in seafood: Origin and human health implications. *Pure Appl.Chem.*, 2010, 82, 373-381.

- 21.- Davis T., Volesky B., Mucci A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 2003, 37, 4311–4330.
- 22.- Joanna B., Michael G., Christian J., Matt G., Tara S., Sheila S., Sean B. Kelp as a Bioindicator: Does it Matter Which Part of 5 M Long Plant is Used for Metal Analysis?. *Environ Monit Assess*, 2007, 128, 311–321.
- 23.- Phillips, D. J. H. Use of macroalgae and invertebrates as monitors of metal levels in estuarine and coastal waters. In R. W. Furness & P. S. Rainbow. *Heavy metals in the marine environment*, 1990, 81–100. Boca Raton, Florida: CRC.
- 24.-Langstone W., Bebiann M., Depledge M., Sanders B. *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Londres, Reino Unido, 1998.
- 25.- Atazadeh I., Sharifi M. *Algae as bioindicators. The effects of heavy metals on algae and development of an algal index system for assessing water quality*. Lap Lambert Academic. Saarbrücken, Germany, 2010.
- 26.- Naranmandura, H., Carew, M.W., Xu, S., Lee, J., Leslie, E.M., Weinfeld, M., Le, X.C. Comparative toxicity of arsenic metabolites in human bladder cancer EJ-1 cells. *Chem. Res. Toxicol*, 2011, 24, 1586-1596.
- 27.- Delnomdedieu M., Basti MM., Otvos JD., Thomas DJ. Reduction and binding of arsenate and dimethylarsinate by glutathione: a magnetic resonance study. , 1994, 90 (2), 139-55.
- 28.- Mandal B.K., Ogra Y., Suzuki K.T. Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chem. Res. Toxicol*, 2001, 14, 371-378.
- 29.- Chowdhury UK., Zakharyan R., Hernandez A., Avram MD., Kopplin MJ., Aposhian HV. Glutathione-S-transferase-omega [MMA(V) reductase] knockout mice: Enzyme and arsenic species concentrations in tissues after arsenate administration. *Elsevier*, 216, 2006, 446-457.

- 30.- Le X.C., Lu X., Ma M., Cullen, W.R., Aposhian, H.V., Zheng, B. Speciation of key Arsenic metabolic intermediates in human urine. *Anal. Chem.*, 2000, 72, 5172-5177.
- 31.- Le XC., Ma M., Lu X., Cullen WR., Aposhian HV., Zheng B. Determination of Monomethylarsonous Acid, a Key Arsenic Methylation Intermediate, in Human Urine. *Environ Health Perspect.*, 2000, 108,1015–1018.
- 32.- Torres, S. Bioaccesibilidad de arsénico y mercurio en alimentos con potencial riesgo toxicológico, Universitat de València, 2011.
- 33.- Environmental Protection Agency (2010). IRIS Toxicological review of inorganic arsenic (cancer) (external review draft) EPA/635/R-10/001, 2010.
- 34.- Water Subcommittee on Arsenic in Drinking Water, National Academy Press National Research Council (NRC) 1999.
- 35.- Burguera M. y JL. Analytical methodology for speciation of arsenic in environmental and biological samples. *Talanta*, 1997, 44, 1581- 604.
- 36.- Dietz C., Sanz J., Sanz E., Muñoz-Olivas R., Cámara, C. Current perspectives in analyte extraction strategies. *J. Chromatogr.*, 2007, 1153, 114-129.
- 37.- Namieśnik J., Szefer P. Preparing samples for analysis - The key to analytical success. *Ecol. Chem. Eng. S.*, 2008, 15, 167-249.
- 38.- Rubio R., Ruiz-Chancho M.J., López-Sánchez J.F. Sample pre-treatment and extraction methods that are crucial to arsenic speciation in algae and aquatic plants. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2010, 29, 53-69.
- 39.- Serife Yalcin and X. Chris Le. Speciation of arsenic using solid phase extraction cartridges. *J. Environ. Monit.*, 2001, 3, 81-85.
- 40.- Howard A.G. (Boro) Hydride Techniques in trace element speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 1997, 267-272.

- 41.- Ramesh A., Riyazuddin P. Chemical interferences in hydride generation atomic spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 2010, 29, No. 2.
- 42.- Rasmussen R., Hedegaard V, Larsen E, Sloth J. Development and validation of an SPE HG-AAS method for determination of inorganic arsenic in samples of marine origin. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403, 2825–2834.
- 43.- Rasmussen R., Qian Y., Sloth J. SPE HG-AAS method for the determination of inorganic arsenic in rice—results from method validation studies and a survey on rice products. *Anal Bioanal Chem*, 2013, DOI 10.1007/s00216-013-6936-8.
- 44.- Ascar ML. Tesis doctoral. Distribución de especies inorgánicas y orgánicas de arsénico en suelos tratados con biosólidos, 2006, Universidad de Chile, Facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas. Santiago de Chile.
- 45.- Pohl P. Hydride generation – recent advances in atomic emission spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 2004, 23, No. 2, 87-101.
- 46.- Díaz O., Tapia Y., Muñoz O., Montoro R., Velez D., Almela C. Total and inorganic arsenic concentrations in different species of economically important algae harvested from coastal zones of Chile. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50, 744–749.
- 47.- Pell A., Márquez A., López J., Rubio R., Barbero M., Stegen S., Queirolo F., Díaz P. Occurrence of arsenic species in algae and freshwater plants of an extreme arid region in northern Chile, the Loa River Basin. *Chemosphere*, 2013, 90, 556–564.
- 48.- Inodú. Informe final. Estudio de variables ambientales y sociales que deben abordarse para el cierre o reconversión programada y gradual de generación eléctrica a carbón. – Licitación ID 584105-9-LE18, diciembre 2018.
- 49.- Coronel city, la ciudad en internet, página web, <http://www.coronelcity.cl/>, visitado por última vez, noviembre 2019.

50.- Parque industrial Coronel, página web, <http://www.parqueindustrialcoronel.cl>, visitado por última vez, noviembre 2019.

51.- Sistema nacional de fiscalización ambiental, página web, <http://snifa.sma.gob.cl/>, visitado por última vez, noviembre 2019.

52.- Sistema nacional de información ambiental, página web, <https://sinia.mma.gob.cl/>, visitado por última vez, noviembre 2019.

53.- Rahman I., Begum Z., Nakano M., Furusho Y., Maki T., Hasegawa H. Selective separation of arsenic species from aqueous solutions with immobilized macrocyclic material containing solid phase extraction columns. *Chemosphere*, 2011, 82(4), 549-556.

54.- Rubio R., Ruiz-Chancho M.J., López-Sánchez J.F. Sample pre-treatment and extraction methods that are crucial to arsenic speciation in algae and aquatic plants. *Trends in Analytical Chemistry*, 2010, 29, No. 1, 10.1016/1032.

55.- Bleckwedel J. Aspectos moleculares de producción de manitol por bacterias lácticas heterofermentativas. Universidad nacional de Tucumán, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.

56.- Niegel C., Matysik F-M. Analytical methods for the determination of arsenosugars—A review of recent trends and developments. *Analytica Chimica Acta.*, 2010, 657, 83–99.

57.- Han C., Cao X., Yu J.J., Wang X.R. Shen, Y. Arsenic speciation in *Sargassum fusiforme* by microwave-assisted extraction and LC-ICP-MS. *Chromatographia* 2009, 69, 587-591.

58.- Whaley-Martin, K.J.; Koch, I.; Reimer, K.J. Arsenic species extraction of biological marine samples (*Periwinkles, Littorina littorea*) from a highly contaminated site. *Talanta*, 2012, 88, 187-192.

59.- Benramdane L., Bressolle F., Vallon J. Arsenic Speciation in Humans and Food Products: A Review. *Journal of Chromatographic Science*, 1999, 37.

- 60.- McSheehy S., Pohl P., Vélez D., Szpunar J. Multidimensional liquid chromatography with parallel ICP MS and electrospray MS/MS detection as a tool for the characterization of arsenic species in algae. *Anal Bioanal Chem*, 2002, 372, 457–466.
- 61.- Boer E., Tromp M., Plat H., Krenn G., R. Wever R. Vanadium (V) as an essential element for haloperoxidase activity in marine brown algae: purification and characterization of a vanadium(V) containing bromoperoxidase from *Laminaria saccharina*. *Biochimica et Biophysica*, 1986, 872, 104-115.
- 62.- Kidgell J.T., Magnusson M., Nys R., Glasson C.R.K. *Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function*. Elsevier, 2019, 39, 1014222.
- 63.- Tian H., Yin X., Zengb Q., Zhub L., Chenb J. Isolation, structure, and surfactant properties of polysaccharides from *Ulva lactuca* L. from South China Sea. Elsevier, 2015, 79, 577-582.
- 64.- Venkat Rao Konasania., Chunsheng J., Niclas G. Karlssonb, Albers E. *Ulvan lyase from Formosa agariphila and its applicability in depolymerisation of ulvan extracted from three different Ulva species*. Elsevier, 2018, 36, 106-114.
- 65.- Statpoint Technologies, Inc. *DDE Asistente - Diseños de Cribado*, Statgraphics, 2015.
- 66.- *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19 th Edition, 2012. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements.
- 67.- *Comisión del Codex Alimentarius, Manual de Procedimiento*. 19° Edición. OMS/FAO.
- 68.- Thompson M., Ellison L.R S., Wood R. *Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis*. *Pure Appl. Chem.*, 2002, 74, No. 5, 835–855.
- 69.- Miller N. J., J. C. Miller. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Pearson Education S.A., 2020, Madrid.
- 70.- *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19 th Edition, 2012. Appendix E: Laboratory Quality Assurance.

- 71.- Guía Técnica. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Instituto de salud pública, Edición 2010.
- 72.- Horwitz W. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. Pure Appl. Chem. 1995, 67, 331–343.
- 73.- Eurachem, The Fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to Method Validation and Related Topics, Validation, 2014. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf
- 74.- Manual de muestreo para comunidades costeras. Protocolo para Litorales Rocosos y Praderas de Fanerógamas Marinas. Patricia Miloslavich y Ana Karinna Carbonini, Universidad Simón Bolívar, Centro de Biodiversidad Marina Caracas, Venezuela, 2010.
- 75.- Manual de métodos de análisis. Elemental Analysis Manual (EAM) for Food and Related Products. 2010. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/elemental-analysis-manual-eam-food-and-related-products>.
- 76.- Documento de especificaciones del producto: Specification sheet: VP100 Continuous Flow Vapor Generation System. Thermo Fisher Scientific Inc 2010. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html>.
- 77.- Catálogo de producto. Solid phase extraction products catalog. UCT Inc. <https://www.unitedchem.com>.
- 78.- Impellitteri C. Effects of pH and competing anions on the speciation of arsenic in fixed ionic strength solutions by solid phase extraction cartridges. Water Research, 2004, 38, 1207–1214.
- 79.- Expert Committee on food additives. Summary report of the seventy-second meeting of JECFA. FAO/WHO, 2010.
- 80.- Fiamegkos I, Cordeiro F, Devesa V, Vélez D, Robouch P, Emteborg H, Leys H, Cizek-Stroh A, Calle B. Reporte colaborativo. Determination of inorganic arsenic in food by flow

injection hydride generation atomic absorption spectrometry (FI-HG-AAS). Comisión europea. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, España, 2015.

81.- Benson, A. Arsonium compounds in algae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86, 6131-6132.

82- Edmonds, J.S.; Shibata, Y.; Francesconi, K.A.; Yoshinaga, J.; Morita, M. Arsenic lipids in the digestive gland of western rock lobster *Panulirus cygnus*: An investigation by HPLC ICP-MS. Elsevier. 1992, 122, 321-335.

83.- Benson, A.A.; Summons, R.E. Arsenic accumulation in Great Barrier Reef invertebrates. Science 1981, 211, 482-483.

84.- República de Chile, Ministerio de Salud, División jurídica. Reglamento sanitario de los alimentos (RSA DTO. N°977/96). Actualizado a enero 2019.

85.- Shraim A., Chiswell B, Olszowy H. Speciation of arsenic by hydride generation–atomic absorption spectrometry (HG–AAS) in hydrochloric acid reaction médium. Talanta, 1999, 50, 1109–1127.

Anexos

Anexo 1. Absorbancias y concentraciones obtenidas en sistema GH-AAS para análisis de los límites de detección y cuantificación del método.

DMA		MMA		Asi	
Absorbancia	Conc. GH-AAS (µg/L)	Absorbancia	Conc. GH-AAS (µg/L)	Absorbancia	Conc. GH-AAS (µg/L)
0,037	2,4013	0,014	0,5644	0,045	0,5293
0,036	2,3234	0,016	0,6338	0,045	0,5316
0,038	2,4614	0,012	0,4665	0,044	0,5112
0,037	2,3897	0,012	0,4471	0,046	0,5885
0,041	2,6310	0,013	0,4913	0,042	0,4235
0,032	2,0852	0,014	0,5531	0,045	0,5369
		0,016	0,6571	0,046	0,5702
		0,016	0,6684	0,046	0,5602
		0,014	0,5667	0,045	0,5384
		0,013	0,515	0,045	0,5383

Anexo 2. Datos de absorbancia, concentración obtenida por interpolación en cc y concentración final en matriz de alga para análisis de repetibilidad.

DMA			MMA			Asi		
Absorbancia	Conc. GH-AAS (µg/L)	Conc final mg/kg	Absorbancia	Conc. GH-AAS (µg/L)	Conc final mg/kg	Absorbancia	Conc. GH-AAS (µg/L)	Conc final mg/kg
0,0240	4,1140	1,6210	0,0120	0,4178	0,1651	0,0190	0,6679	0,2640
0,0250	4,2614	1,6764	0,0120	0,4178	0,1658	0,0190	0,6679	0,2655
0,0260	4,4945	1,7716	0,0120	0,4178	0,1669	0,0160	0,5607	0,2225
0,0250	4,2972	1,7131	0,0120	0,4178	0,1644	0,0180	0,6321	0,2525
0,0280	4,7304	1,8697	0,0100	0,4000	0,1577	0,0150	0,5250	0,2065
0,0220	3,8059	1,5130	0,0130	0,4721	0,1882	0,0150	0,5250	0,2069
0,0250	4,2681	1,6940	0,0100	0,4000	0,1575	0,0160	0,5607	0,2235
			0,0100	0,4000	0,1591	0,0150	0,5250	0,2068
			0,0100	0,4000	0,1576	0,0170	0,5964	0,2372
						0,0160	0,5607	0,2209

Anexo 3. Datos de absorbancia, concentración obtenida por interpolación en cc y concentración final en matriz de alga para análisis de reproducibilidad.

DMA			MMA			Asi		
Absorbancia	Conc. GH-AAS (µg/L)	Conc final mg/kg	Absorbancia	Conc. GH-AAS (µg/L)	Conc final mg/kg	Absorbancia	Conc. GH-AAS (µg/L)	Conc final mg/kg
0,0250	4,2361	1,6884	0,0100	0,6863	0,2735	0,0130	0,4030	0,1606
0,0290	4,7631	1,8946	0,0100	0,6863	0,2730	0,0140	0,4399	0,1750
0,0300	4,8462	1,9147	0,0120	0,8088	0,3196	0,0280	0,9953	0,2278
0,0240	4,1140	1,6210	0,0090	0,3816	0,1489	0,0270	0,9723	0,2107
0,0250	4,2614	1,6764	0,0110	0,5468	0,2145	0,0270	0,9676	0,2112
0,0260	4,4945	1,7716	0,0120	0,6219	0,2485	0,0220	0,8503	0,2042
0,0410	4,4998	1,7978	0,0130	0,6254	0,2497	0,0200	0,7766	0,1748
0,0390	4,3138	1,7235	0,0170	0,7064	0,2822	0,0200	0,7545	0,1660
0,0360	4,6283	1,8491	0,0170	0,7035	0,2811	0,0220	0,8289	0,1957
0,0340	4,3706	1,7461	0,0160	0,6263	0,2502			
			0,0160	0,6594	0,2634			

Anexo 4. Datos para análisis de recuperación de 3 niveles fortificados respecto a la curva de calibración realizados por triplicado para DMA.

Ensayo	Fecha	Conc. Muestra fortificada	Conc. Muestra sin fortificar (mg/kg)	Conc. Muestra adicionada (mg/kg)	% Recuperación (mg/kg)
1	23-11-2017	1,798	1,104	0,800	86,671
2	23-11-2017	1,723	1,104	0,800	77,382
3	23-11-2017	1,849	1,104	0,800	93,088

Ensayo	Fecha	Conc. Muestra fortificada	Conc. Muestra sin fortificar (mg/kg)	Conc. Muestra adicionada (mg/kg)	% Recuperación (mg/kg)
1	10-11-2017	6,366	1,104	5,600	93,965
2	10-11-2017	6,036	1,104	5,600	88,056
3	10-11-2017	5,679	1,104	5,600	81,688

Ensayo	Fecha	Conc. Muestra fortificada	Conc. Muestra sin fortificar (mg/kg)	Conc. Muestra adicionada (mg/kg)	% Recuperación (mg/kg)
1	23-11-2017	10,881	1,104	10,000	97,771
2	23-11-2017	10,252	1,104	10,000	91,471
3	23-11-2017	10,480	1,104	10,000	93,754

Anexo 5. Datos para análisis de recuperación de 3 niveles fortificados respecto a la curva de calibración realizados por triplicado para MMA.

Ensayo	Fecha	Conc. Muestra fortificada	Conc. Muestra sin fortificar (mg/kg)	Conc. Muestra adicionada (mg/kg)	% Recuperación (mg/kg)
1	17-11-2017	0,274	0,000	0,320	85,477
2	17-11-2017	0,248	0,000	0,320	77,644
3	17-11-2017	0,250	0,000	0,320	78,035

Ensayo	Fecha	Conc. Muestra fortificada	Conc. Muestra sin fortificar (mg/kg)	Conc. Muestra adicionada (mg/kg)	% Recuperación (mg/kg)
1	24-11-2017	2,467	0,000	3,200	77,096
2	24-11-2017	2,370	0,000	3,200	74,061
3	24-11-2017	2,383	0,000	3,200	74,470

Ensayo	Fecha	Conc. Muestra fortificada	Conc. Muestra sin fortificar (mg/kg)	Conc. Muestra adicionada (mg/kg)	% Recuperación (mg/kg)
1	24-11-2017	4,448	0,000	6,400	69,494
2	24-11-2017	4,100	0,000	6,400	64,070
3	24-11-2017	4,535	0,000	6,400	70,866

Anexo 6. Datos para análisis de recuperación de 3 niveles fortificados respecto a la curva de calibración realizados por triplicado para Asi.

Ensayo	Fecha	Conc. Muestra fortificada	Conc. Muestra sin fortificar (mg/kg)	Conc. Muestra adicionada (mg/g)	% Recuperación (mg/kg)
1	17-11-2017	0,197	0,000	0,200	98,264
2	17-11-2017	0,189	0,000	0,200	94,292
3	17-11-2017	0,190	0,000	0,200	95,086

Ensayo	Fecha	Conc. Muestra fortificada	Conc. Muestra sin fortificar (mg/kg)	Conc. Muestra adicionada (mg/kg)	% Recuperación (mg/kg)
1	24-11-2017	0,113	0,000	0,100	113,392
2	24-11-2017	0,104	0,000	0,100	103,767
3	24-11-2017	0,103	0,000	0,100	103,448

Ensayo	Fecha	Conc. Muestra fortificada	Conc. Muestra sin fortificar (mg/kg)	Conc. Muestra adicionada (mg/kg)	% Recuperación (mg/kg)
1	24-11-2017	0,144	0,000	0,150	96,000
2	24-11-2017	0,138	0,000	0,150	92,000
3	24-11-2017	0,134	0,000	0,150	89,333