

UCH-FC  
Q. Ambiental  
P979  
C-1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“Automatización de la determinación de Fe(II), Fe(III) y Fe<sub>total</sub> en continuo  
utilizando un sensor resina – ácido 5-sulfosalicílico”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los  
requisitos para optar al título de

**Químico Ambiental**

Estrella Marina Puig Frutos



Director Seminario de Título: Prof. María Inés Toral

Marzo de 2009  
Santiago - Chile



### INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile que el Seminario de Título presentado por la candidata

**ESTRELLA MARINA PUIG FRUTOS**

**“AUTOMATIZACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE Fe(II), Fe(III) Y Fe<sub>total</sub> EN CONTINUO UTILIZANDO UN SENSOR RESINA – ÁCIDO 5-SULFOSALICÍLICO”**

Ha sido aprobado por la comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Químico Ambiental

Prof. María Inés Toral  
Director Seminario de Título

Una firma manuscrita en tinta negra que parece decir "María Inés Toral", escrita sobre una línea horizontal.



### COMISIÓN DE EVALUACIÓN DE SEMINARIO DE TÍTULO

Dr. Pablo Richter

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Pablo Richter", escrita sobre una línea horizontal.

Dr. Mauricio Isaacs

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "Mauricio Isaacs", escrita sobre una línea horizontal.

Santiago – Chile, Marzo de 2009

**Estrella Marina Puig Frutos**  
28 de Septiembre de 1982



Estrella Puig Frutos, nació el 28 de Septiembre de 1982 en Santiago, egresó del Liceo Experimental Manuel de Salas en año 2000. Ingresó a Licenciatura en Ciencias Ambientales con Mención en Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en 2002. Obtuvo el grado de licenciada en 2007 con su unidad de investigación en "Automatización en continuo y por FIA para la determinación de Fe(II), Fe(III) y Fe<sub>total</sub>". Un año más tarde realizó su seminario de título en "Automatización de la determinación de Fe(II), Fe(III) y Fe<sub>total</sub> en continuo, utilizando un sensor resina – ácido 5-sulfosalicílico". Durante sus años de estudio participó en el II congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica, realizado en Buenos Aires, Argentina en 2007 y en el IX Encuentro de Química Analítica y Ambiental que se realizó en la ciudad de Concepción, Chile en 2008. Posteriormente se integró a la empresa Agriquem América como responsable del Área de Medio Ambiente. Participó como presidente del grupo de jóvenes de la Colectividad Valenciana de Chile durante el periodo 2004 a 2008 e integró el cuerpo de danzas y tradiciones valencianas desde el año 1997.

## DEDICATORIA

A mis papás por el amor y apoyo entregado siempre para lograr todo lo que hoy soy. A mi amor por la alegría, pasión y responsabilidad con que me enseñó a ver las cosas, simplemente por ser como es.



## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al proyecto FONDECYT por el financiamiento de la investigación a través del proyecto 1070905. Agradezco muy especialmente a todos los compañeros y profesores que aportaron en la realización de esta investigación con ideas, materiales, compañía, ayuda, cariño y amistad. Al laboratorio de Química Analítica por abrir sus puertas, infraestructura y conocimiento para realizar mi seminario de título. Por último agradezco de forma muy especial a la Profesora María Inés Toral, por la excelente disposición, apoyo incondicional y sobre todo por la confianza, cariño y amistad. Gracias.



## INDICE DE CONTENIDOS



<b>DEDICATORIA</b>	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	III
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b>	IV
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	VI
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	VII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	IX
<b>RESUMEN</b>	X
<b>ABSTRACT</b>	XI
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Antecedentes generales	1
1.2 Hipótesis	12
1.3 Objetivo general	12
1.4 Objetivos específicos	12
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
2.1 Aparatos e instrumentos	14
2.2 Materiales	14
2.3 Reactivos	15
2.4 Soluciones	16
2.5 Procedimientos	21

<b>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
3.1 Comparación entre posibles sensores para la detección de Fe.	31
3.2 Evaluación del porcentaje de uso, contracción y coloración del sensor R-ASS-Fe para las tres formas de trabajo.	34
3.3 Evaluación de diferentes fluidos para estudiar la capacidad de liberación del analito.	39
3.4 Optimización del eluyente.	42
3.5 Evaluación de la solución Medio o carrier que será utilizada para la determinación de hierro en condición ácida.	47
3.6 Relación entre la concentración del ASS y la contracción de la columna.	49
3.7 Evaluación de la formación de los complejos y la capacidad de retención de la resina dependiendo del pH.	52
3.8 Optimización y elección de la configuración del sistema de determinación	55
3.9 Evaluación de la posibilidad de determinación simultánea.	61
3.10 Verificación de la determinación especiada.	62
3.11 Evaluación de los parámetros de muestreo.	64
3.12 Estudio con muestras reales de residuos de procesos mineros.	69
3.13 Aplicación y funcionalidad del método como herramienta de protección al medio ambiente.	70
<b>IV. CONCLUSIONES</b>	<b>71</b>
<b>V. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>72</b>





## INDICE DE TABLAS

<b>Tablas</b>		<b>Página</b>
1	Soluciones de Fe(III) que se utilizó en el trabajo.	17
2	Soluciones de Fe(II) que se utilizó en el trabajo.	18
3	Soluciones de HCl que se utilizó en el trabajo.	19
4	Soluciones de ASS que se utilizó en el trabajo.	19
5	Preparación de las resinas que se utilizó.	20
6	Composición de tampones bórico/borato que se utilizó.	20
7	Soluciones de NH <sub>3</sub> que se utilizó en el trabajo.	21
8	Comparación cualitativa de las respuestas entregadas por los tres métodos de trabajo	37
9	Estudio del efecto de diferentes fluidos sobre el complejo retenido en el sensor.	40
10	Configuración del sistema optimizado	60
11	Señales obtenidas por medio del método estudiado	69
12	Comparación de concentraciones entre el método utilizando el sensor y el mismo método en líquidos.	69



## INDICE DE FIGURAS



<b>Figuras</b>		<b>Página</b>
1	Ácido sulfosalicílico.	4
2	Coloración de los complejos Fe-ASS dependientes del pH preparados en batch.	4
3	Estructuras, rango de pH y longitud de onda de los complejos Fe-ASS. Posibles complejos formados entre Fe y ASS en razones.	5
4	Efecto de la convección y de la difusión sobre los perfiles de concentración del analito en el detector:	10
5	Esquema de los métodos de trabajo de Retención del complejo, Inyección secuencial y de Resina cargada.	32
6	Comparación del porcentaje de uso, contracción y coloración del sensor para tres formas de trabajo.	36
7	Evaluación de la elución del complejo ASS-Fe utilizando diferentes concentraciones de HCl.	43
8	Evaluación de la capacidad de elución y recarga de la columna.	45
9	Efecto de la solución Medio sobre la muestra retenida en la columna.	48
10	Efecto de la concentración del ASS y el número de inyecciones realizadas sobre la contracción de la columna.	50
11	Comparación de la longitud de la resina para 3 inyecciones sucesivas de ASS a concentraciones de 2%(p/v), 4%(p/v) y 6%(p/v).	51
12	Estudio de pH para complejo ASS-Fe(III) retenido en resina DEAE Shephadex A-25.	52

13	Estudio de pH para complejo ASS-Fe(II) retenido en resina DEAE Shephadex A'25.	53
14	Condiciones de mezcla para diferentes componentes del sistema en estudio.	55
15	Configuración del sistema en continuo.	58
16	Diagrama del comportamiento del sensor durante un ciclo de trabajo de Fe(III) en medio básico (retención de muestra y limpieza de la columna).	59
17	Verificación de la determinación especiada.	62
18	Curvas de calibración para Fe(III).	64
19	Estudio de interferentes en medio ácido	67



## LISTA DE ABREVIATURAS

- FIA: análisis por inyección en flujo
- ASS: ácido 5-sulfosalicílico
- Fe-ASS: complejo entre ASS y Fe(II) ó Fe(III)
- DEAE: di-etilaminoetil
- Resina: polímero de dextrán funcionalizado con DEAE
- Resina-ASS: resina acoplada a ASS
- Eluyente: Solución utilizada para limpiar la columna
- ASS+HCl: solución eluyente compuesta por ASS 1,2% y HCl 0,5M

## RESUMEN

En la actualidad la química analítica busca métodos confiables para la determinación de analitos de interés, donde la utilización de sensores y sistemas de inyección en flujo (FIA) y/o en continuo han adquirido gran importancia.

El ácido 5-sulfosalicílico (ASS) tiene la capacidad de formar complejos coloreados dependientes del pH con Fe(II) y Fe(III); donde sólo Fe(III) presenta coloración en medio ácido, mientras que ambos estados de oxidación lo hacen en medio básico pudiendo determinarse  $Fe_{total}$  ya que forman complejos de igual absorptividades molares.

En este trabajo se presenta un sistema automático en continuo para determinar Fe(II), Fe(III) y  $Fe_{total}$ , utilizando un sensor resina-ASS por método colorimétrico.

En estudios realizados se verificó la formación del sensor *in situ*, la reversibilidad del sistema y que el complejo es eluido al aplicar HCl 1 M, teniendo que cargarse con ASS la resina previo a cada inyección de muestra.

Se optimizó las condiciones de trabajo a: una solución que otorga el medio adecuado para la determinación, la muestra ingresando en continuo y siendo eluida por una mezcla de ASS y HCl lo que permite al mismo tiempo la liberación del metal y la carga de la resina con ASS.

Luego de la optimización se trabajó en un rango de trabajo entre 100  $\mu\text{g/L}$  y 4000  $\mu\text{g/L}$  con buena linealidad y la determinación de 5 muestras en una hora. El método fue aplicado a una muestra real proveniente de un proceso minero, obteniendo resultados similares a los descritos para la misma muestra por medio espectrofotométrico manual, con lo que se abre un gran número de aplicaciones de monitoreo de efluentes con fines ambientales.

## ABSTRACT

In these days, are necessary of analytic methods with quality analytical, in order to determinate analytes of interest. Lately the utilization of sensors and flow injection analysis (FIA) has been each day more important.

The 5-sulfosalicylic acid (SSA) has the capacity to form colored complexes with Fe(II) and Fe(III) at different pH values. The Fe(III) gives violet color in acid pH, but Fe(II) does not give any color. However, both Fe(II) as Fe(III) in basic medium, it generated a yellow complexes. This fact allows the determination of  $Fe_{total}$ .

In this work is present an automatic system in continuous by spectrophotometric technique to determine Fe(II), Fe(III) and  $Fe_{total}$ , using a sensor resin-SSA

In this study, the formation of sensor in situ and the reversibility of the system were verified.

In addition the complexes were eluted with a mixture of HCl 1 mol/L and SSA 1.2%(w/w). In this condition, the resin is charged and the metallic ions are eluted.

The conditions of work were carried out optimized the chemical and physical variable for the determination of the Fe concentration at the different oxidation state. In these conditions, for both species of iron a range of determination between 100  $\mu\text{g/L}$  and 4000  $\mu\text{g/L}$  were found.

The method was used in a real sample of a mining process. The proposed method can be used in different environmental applications.

# I INTRODUCCIÓN

## 1.1. Antecedentes generales

En la actualidad, la química analítica se orienta principalmente a satisfacer las necesidades de información para la industria y de los procesos mineros. Para esto, es necesario disponer de métodos automatizados que sean confiables, rápidos, transportables, de bajo consumo de reactivos, con una mínima generación de residuos, requerimientos de mano de obra y costos.

En los suelos existe una gran variedad de metales y compuestos, algunos se presentan en pequeñas cantidades como son Ga o Br o en grandes proporciones como K, Ca o Fe siendo este último de gran interés ya que regula y participa en gran número de procesos, tanto geoquímicos como bioquímicos (Peiteado, E. y col, 2002). Además, compuestos de hierro son residuos derivados de diversos procesos antropogénicos tales como faenas mineras, el cual se acumula provocando daños ecológicos de diversa consideración.

Por otra parte, dado que el hierro, es un elemento traza esencial para la vida de los organismos en sus distintos estados de oxidación, es de gran interés comprender y evaluar el rol que cumple éste, en diversas áreas tales como la biogeoquímica oceánica, la transformación de compuestos orgánicos disueltos en agua, los efectos sobre el crecimiento bacteriano y otras especies o la limitación de la actividad biológica, entre otras ( Martín J.H. y col, 1988, Obata H. y col, 1997, Öztürk M. y col, 2003, Pons C. y col, 2005, Pozdnyakov I. y col, 2007). Debido a la importancia de los

iones metálicos de hierro en procesos biológicos e industriales, se hace completamente necesaria la cuantificación de la concentración total de Fe a niveles traza y/o su especiación redox, es decir, conocer la concentración independiente para cada uno de los iones metálicos en sus diferentes estados de oxidación.

El interés por determinar compuestos a niveles traza, ha surgido principalmente en áreas relacionadas con protección ambiental, alimentación, química agrícola y en la fabricación de materiales puros. Sin embargo, la determinación directa de iones metálicos a dichas concentraciones es bastante limitada, debido a las bajas cantidades presentes y la alta interferencia de otras moléculas o elementos que influyen en las mediciones (Guo Y. y col, 2004).

Hasta la actualidad, se han usado diversos métodos para la determinación simultánea de especies de Fe(II) y Fe(III), entendiéndose por determinación simultánea a la cuantificación de dos o más compuestos en una misma aplicación de muestra (Luque M. D. 1986). Dentro de las técnicas que utilizan este tipo de determinaciones destacan polarografía, voltametría, y los análisis por inyección en flujo (FIA) (Pehkonen, S. 1995. Muller, H. y col, 1990. Kuroda, R. y col, 1988. Bubnis, B.P. y col, 1983.).

La forma de cuantificación de iones metálicos de hierro más utilizada en la actualidad, se realiza por medio de reactivos específicos para la determinación de cada uno de los estados de oxidación. La 1,10-fenantrolina ha sido usada para la determinación de Fe(II), mientras que 4-metil-2,6-di(hidroximetil)fenol, 4-cloro-2,6-

di(hidroximetil)fenol y 4-bromo-2,6-di(hidroximetil)fenol han sido utilizados para determinar Fe(III) (Abbaspour y col, 2003, Abbaspour y col, 2004).

La manera de especiar por medio de sistemas de determinación directa de hierro utilizando o-fenantrolina y dicromato de potasio, se basa en establecer las concentraciones de Fe(II) y  $Fe_{total}$ , y luego por diferencia de estas concentraciones obtener Fe(III) (APHA 1998). Sin embargo, este sistema utiliza reactivos diferentes para determinar el Fe(II) y el  $Fe_{total}$  lo que hace más costoso e ineficiente el método.

En 1999 A. Safavi y col. lograron determinar por medio de un espectrofotómetro los diferentes estados de oxidación de los iones metálicos de hierro utilizando una mezcla de ácido 5-sulfosalicílico (ASS) y 1,10-fenantrolina, los cuales forman complejos con ambos estados de oxidación del Fe. Éstos presentan máximos de longitud de onda diferentes, posibilitando determinar cada una de las especies (Safavi A. y col, 2001).

Estudios posteriores sobre la especiación de los iones metálicos de hierro mostraron la posibilidad de determinar ambas especies utilizando ASS como único reactivo, gracias a la formación de diferentes complejos con Fe(II) y Fe(III) al variar el pH en el cual ocurre la reacción (Paipa C. y col, 2005).

La estructura del ácido 5-sulfosalicílico, mostrada en la Figura 1, presenta 3 grupos funcionales, cada uno con pKa característicos que le confieren a la molécula una variedad de disponibilidades para reaccionar.



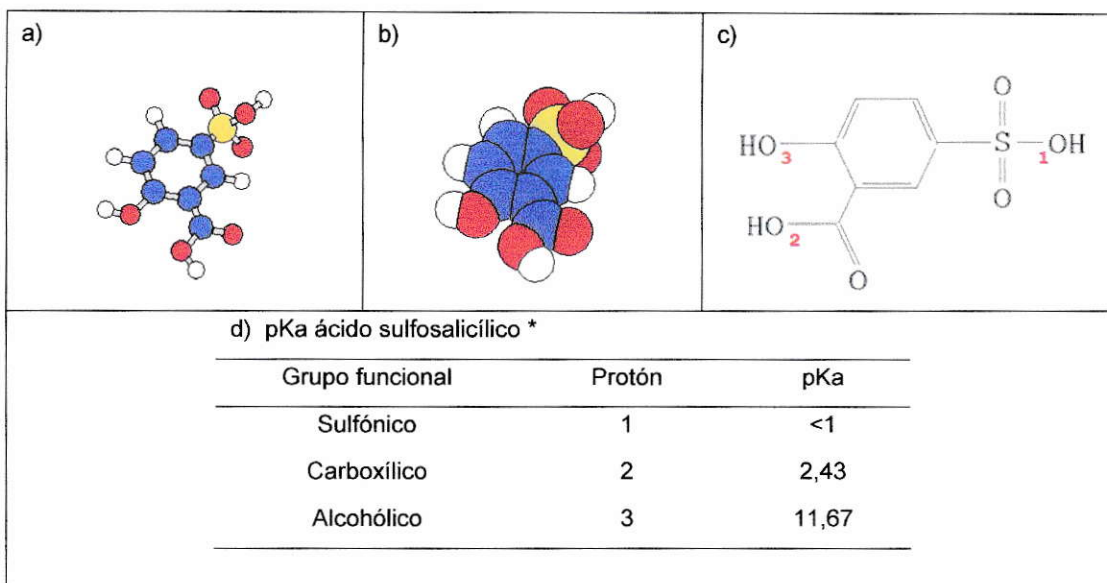


Figura 1: Ácido sulfosalicílico. a) Estructura del ácido sulfosalicílico representada con átomos y enlaces en posición estructural. b) Estructura del ácido sulfosalicílico en tres dimensiones. c) Esquema del ácido sulfosalicílico y sus protones ácidos mostrando los sitios activos. d) Tabla que muestra los valores de pKa de los grupos funcionales del ASS.

Debido a la existencia de estos 3 protones ácidos, que pueden ser disociados en soluciones acuosas dependiendo del pH, el ASS tiene la capacidad de formar diferentes complejos coloreados con cada uno de los estados de oxidación del Fe (Figura 2) (Pozdnyakov I. y col, 2006).



Figura 2: Coloración de los complejos Fe-ASS dependientes del pH preparados en batch a) Complejos Fe(II)-ASS a pH 2 y pH 8. b) Complejos Fe(III)-ASS a pH 2 y pH 8.

(Puig E. y col, 2007)

La estructura del complejo Fe(III)-ASS depende de la concentración de los iones de Fe(III) o Fe(II), del ASS y del pH del medio (Pozdnyakov I. y col, 2007), pudiéndose formar complejos con una, dos y tres moléculas de ASS en la esfera de coordinación del Fe (Sillen L.G. y col, 1964) como se muestra en la Figura 3.

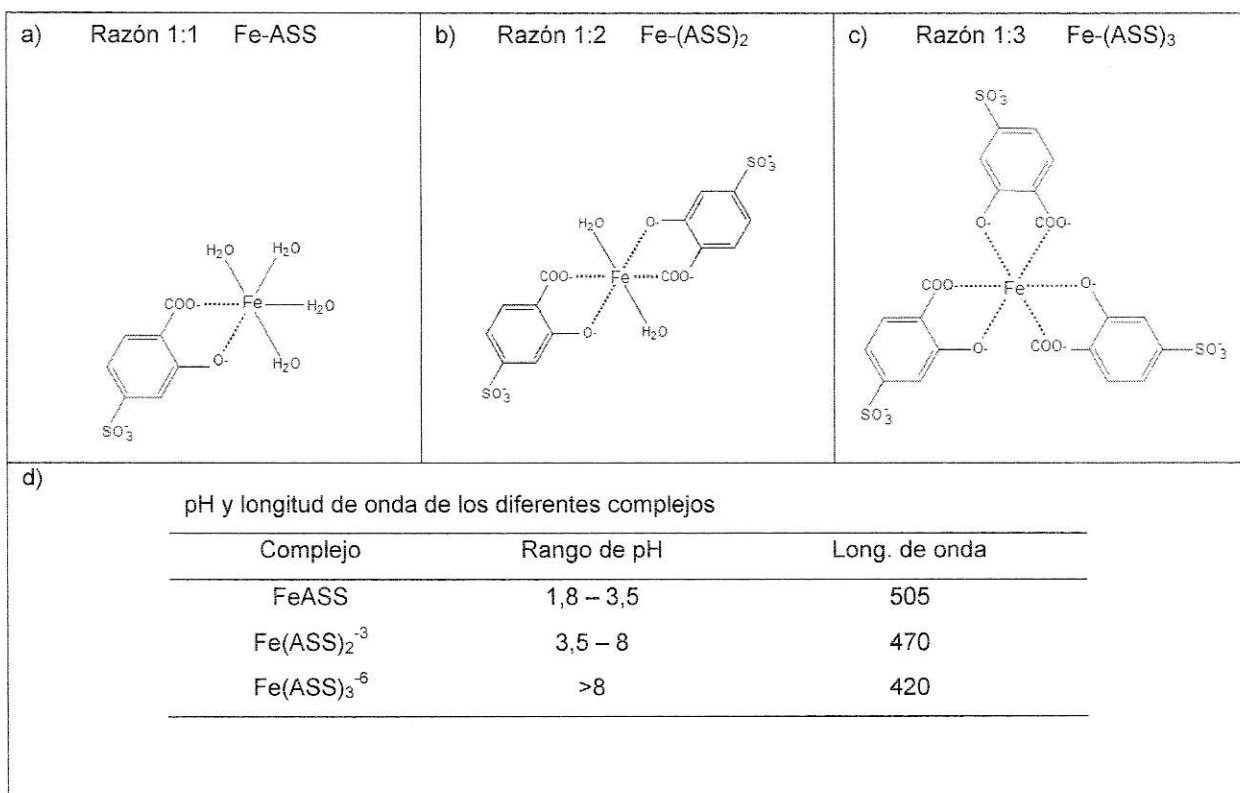


Figura 3: Estructuras, rango de pH y longitud de onda de los complejos Fe-ASS. Posibles complejos formados entre Fe y ASS en razones a) 1:1 b) 1:2 y c) 1:3. d) muestra el rango de pH al cual existen los diferentes complejos y la longitud de onda máxima que presentan a los respectivos pH.

Sin embargo muchos autores coinciden en la formación de redes iónicas como forma de interacción entre estos compuestos, más que como complejos independientes (Smith, G. y col, 2007).

Un estudio realizado por Paipa y col. el 2005 mostró que el uso de ASS para determinar hierro presenta menores errores experimentales comparado con la técnica de determinación directa mediante o-fenantrolina, presentando un rango de trabajo entre 5 mg/L y 18 g/L con una desviación estándar relativa de 2%.

En estudios realizados por Paipa y col. el 2006, lograron determinar la presencia de cobre y hierro en solución acuosa, utilizando la formación de complejos con ASS dependientes del pH. En este estudio se demostró que el espectro de absorción de Fe(II) y Fe(III) en medio básico tienen la misma forma y presentando ambos complejos absorptividad molar equivalente ( $5201 \text{ L}/(\text{mol cm})$ ), lo que hace posible realizar la determinación de  $\text{Fe}_{\text{total}}$  en medio básico. Se encontró además que la intensidad de las bandas de absorción es dependiente de la concentración de la muestra, pudiendo cuantificarse la concentración del analito por medio de curvas de calibración. Por otra parte, el Fe(III) puede ser determinado en medio ácido, y el Fe(II) determinado por diferencia entre  $\text{Fe}_{\text{total}}$  y Fe(III).

El método para la determinación manual de Fe por medio de la formación de complejos con ASS, tiene un rango de trabajo aproximadamente de 1 a  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Paipa C. y col, 2006), lo cual no satisface completamente las necesidades industriales que buscan rangos de determinación más amplios. Para aumentar el campo de utilización del método se optó por la realización de un trabajo en dos etapas: primero la automatización del método en líquido, con el objetivo de aumentar la frecuencia de muestreo (Puig E. y col, 2007) y en una segunda etapa aumentar la sensibilidad para detectar el metal a niveles traza.

Dos estudios sobre interferentes, en el método de determinación por medio de ASS, muestran que prácticamente no hay interferencias en las mediciones (Safavi A. y col, 2001, Karamanev D.G. y col. 2002). Safavi muestra que cationes como  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mo}^{6+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  no presentan interferencias significativas en los espectros a concentraciones hasta 100 veces mayores que el analito. Un año después Karamanev realiza determinaciones de Fe en aguas de drenaje y soluciones similares, encontrando que no presentan interferencia sobre la medición ninguno de los metales estudiados ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ).

En una unidad de investigación realizada en nuestro laboratorio, se efectuaron todos los estudios necesarios para la determinación automatizada de Fe(II), Fe(III) y  $\text{Fe}_{\text{total}}$  en continuo y por FIA en sistema con detección en fase líquida, lográndose establecer un método para realizar mediciones de forma rápida, económica y fácil de utilizar (Puig E. y col, 2007).

Los métodos de extracción en fase sólida tienen grandes beneficios en comparación a la extracción líquido-líquido, debido a que se generan menos residuos, bajas cantidades de solventes y reactivos, menores costos, bajos tiempos de preparación de la muestra y una mayor selectividad, lo que implica obtener menos interferentes. La extracción en fase sólida ocurre entre un líquido (muestra) y una fase sólida (sorbente). Una aproximación simple del método corresponde al paso de la muestra líquida a través de una columna, que contiene el sorbente adecuado para retener los analitos de interés. Posteriormente se pasa una solución apropiada de eluyente que libera el analito de la columna. El método de retención se realiza en 4 pasos: 1) empaque de la columna con el material sorbente adecuado, 2) percolación

de la muestra por la columna, donde el mecanismo de retención depende de la naturaleza del sorbente y del analito, 3) limpieza de la columna para retirar impurezas (opcional) y 4) elución del analito de la columna. Una desventaja que se presenta en este tipo de métodos, es la obstrucción que puede producirse en la columna por partículas y compuestos que son adsorbidos (Camel V. 2003), siendo necesario optimizar cada uno de estos pasos.

Una herramienta muy utilizada en la industria, especialmente en el área de producción, procesos, monitoreo y control de calidad son los sensores, los cuales pueden clasificarse principalmente en dos grupos: sensores biológicos y sensores artificiales (UAM 2003). Los primeros, también conocidos como biosensores, biomarcadores o bioindicadores, son en su mayoría células o moléculas especializadas capaces de detectar diferentes parámetros, como por ejemplo, sensibilidad a la luz, movimiento, temperatura, campos magnéticos, gravedad, humedad, presión y otros aspectos físicos del ambiente (UAM 2003). Por medio de estos sensores se ha podido detectar toxinas, nutrientes, feromonas, además de componentes metabólicos como glucosa u oxígeno, presencia o ausencia de compuestos u organismos, entre muchos otros. Por otra parte, los sensores artificiales son dispositivos creados por el hombre, capaces de recibir y responder a un estímulo o a una señal del ambiente. De este tipo podemos mencionar sensores de luz como celdas solares, sensores de sonido como micrófonos, de temperatura como termómetros, de tensión eléctrica como voltímetros y químicos como los electrodos ión-selectivos o electrodos de vidrio, entre otros (UAM 2003). Un tipo de sensor artificial muy utilizado en laboratorios e industrias corresponde a sensores ópticos que son detectores capaces de determinar la cantidad de luz que

es absorbida por una solución o sustancia, a los que se conoce como fotómetros. Éstos miden la absorbancia de un compuesto a una longitud de onda determinada.

Los métodos FIA son muy utilizados para exámenes rutinarios y automáticos de distintas especies en sangre y orina, entregando buenos y rápidos resultados, además de utilizar equipos económicos y fáciles de operar. Además, la técnica FIA puede ser acoplado a otros sistemas de detección como espectrofotómetros o columnas de extracción. Todas estas propiedades hacen pensar que la técnica FIA, puede ser utilizado en otras áreas de estudios ya que cumple con la mayoría de las características antes descritas (Fonseca O. 2003).

Estos sistemas tienen como base el transporte de la muestra hacia el detector por medio de una corriente líquida portadora (carrier) la cual contiene los reactivos necesarios para la reacción. Son transportados por mangueras hasta el detector mediante el flujo generado por una bomba peristáltica pudiendo producirse dos tipos de dispersión: radial o perpendicular al flujo y longitudinal o paralela al flujo. Se ha demostrado que la difusión longitudinal, en un tubo estrecho, no es significativa, sin embargo, la difusión radial, siempre y en cualquier circunstancia es importante. En el caso de FIA la difusión radial desde las paredes hacia el centro tiene una función importante, que es dejar las paredes sin analito y así eliminar la contaminación entre las muestras. Al inyectar una muestra por medio de una válvula de inyección se observan cambios en la distribución de la muestra producto de la difusión radial y longitudinal como se observa en la Figura 4 (Skoog D. A. y col, 2001).

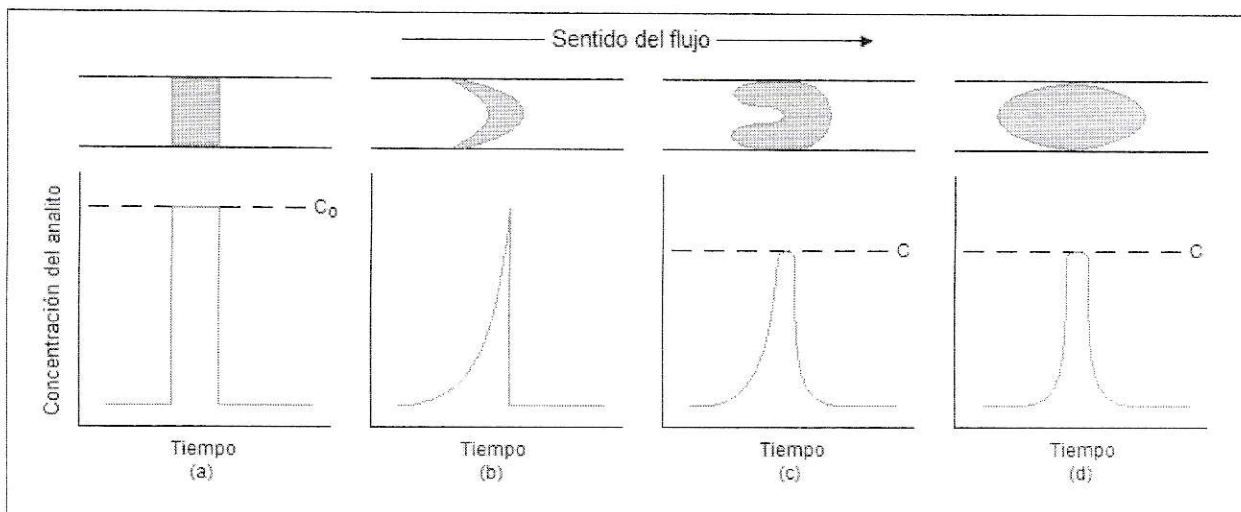


Figura 4: Efecto de la convección y de la difusión sobre los perfiles de concentración del analito en el detector: (a) sin dispersión; (b) dispersión por convección; (c) dispersión por convección y por difusión radial; (d) dispersión por difusión.

(Skoog D. A. y col, 2001)

En la dispersión influyen tres variables: el volumen de muestra, la longitud del tubo y caudal, donde para volúmenes grandes de muestra, la dispersión no produce una disminución de la señal obtenida, porque en estas circunstancias no se mezclan suficientemente la muestra y el portador (Skoog D. A. y col, 2001). Las características del método FIA no sólo dependen de la reacción misma (reactivos, muestra, detector, etc.) si no que en gran medida de variables físicas y mecánicas como el caudal, la configuración del sistema y/o el recorrido que deben hacer los componentes, entre otras.

En estudios realizados por Burguera y col. en 1984 se propuso la especiación de Fe utilizando FIA para mejorar la velocidad de los análisis, de acuerdo a las características antes descritas para este tipo de método. Sin embargo, la técnica aquí

propuesta utiliza dos detectores diferentes conectados en serie, lo que encarece la determinación al requerir de una mayor implementación.

Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio mostraron que una fase sólida compuesta por una resina de DEAE-Sephadex A-25, a la cual se le acopló el ASS previamente, permite una buena determinación de los iones de Fe y una línea base más estable mediante espectrofotometría. En este sistema se utilizó HCl para eluir los iones metálicos retenidos en la fase sólida (Toral M.I. y col, 2007).

Con el objeto de aumentar la sensibilidad del método de determinación de los iones de hierro y hierro total y continuar con la misma línea de estudio, se decidió utilizar un sensor formado por resina acoplada a ASS (Resina-ASS) para retener y preconcentrar la muestra y así bajar los niveles de detección para una determinación a niveles traza.

El sensor utilizado en este trabajo está compuesto por ASS y por una resina aniónica (DEAE Sephadex A-25), la cual es un polisacárido de dextrán funcionalizado con 2(dietilamino)etil que retiene al ácido. Cuando la muestra ingresa a la columna los iones son captados por el ASS generando la coloración de la resina en la microzona sensible del sensor.

En base a estas aproximaciones, se decide fabricar un sensor ión selectivo de resina-ASS para la determinación automatizada de Fe utilizando FIA acoplado a un método espectrofotométrico. Este sensor, podrá ser utilizado en la industria para la



determinación de este metal a niveles traza ayudando con esto a la protección del medio ambiente.

## 1.2 HIPOTESIS

Considerando que las interacciones entre el sensor-ASS y los iones metálicos de hierro son reversibles, se infiere la posibilidad de automatizar la determinación de Fe(II), Fe(III) y Fe<sub>total</sub> utilizando un sensor resina – ASS

## 1.3 OBJETIVO PRINCIPAL

Automatizar la determinación de Fe(II), Fe(III) y Fe<sub>total</sub> utilizando un sensor resina – (ASS).

## 1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar estudios preliminares:
  - evaluar la reactividad de la resina,
  - evaluar las características del eluyente,
  - evaluar el efecto del pH en los complejos Fe(II)-ASS y Fe(III)-ASS
  - evaluar la formación de los complejos.
  - evaluar la utilización de ASS.
  
- Optimizar la configuración del sistema:
  - cantidad de muestra inyectada,
  - longitud de los reactores,
  - concentración óptima de ASS para la formación del sensor.

- Optimizar la reversibilidad del sistema:
  - asegurar la liberación del analito retenido en la resina,
  - evaluar la reutilización del sensor.
  
- Comparar entre dos posibles sensores:
  - sensor 1 compuesto sólo de resina en donde fluirá el complejo metal-ASS formado previamente.
  - sensor 2 compuesto por resina sola por la que fluirán en forma secuencial, ASS y los iones metálicos.
  - sensor 3 compuesto por ASS acoplado a la resina donde fluirá el analito.
  
- Evaluar parámetros de muestreo:
  - frecuencia de muestreo,
  - límites de detección y cuantificación
  - rango de determinación,
  - principales interferentes presentes en muestras de desechos.
  
- Estudio con muestras reales de residuos de procesos mineros:
  - evaluar la funcionalidad del sensor,
  - verificar la aplicabilidad y utilidad del método como herramienta de protección al medio ambiente.

## II INSTRUMENTOS, MATERIALES, REACTIVOS Y MÉTODOS

### 2.1 APARATOS E INSTRUMENTOS:

- Espectrofotómetro Yenway 6405 uv/vis – scanning:  
Rango de longitud de onda: 190 – 1100 nm  
Resolución: 0,1 nm  
Rango de Absorbancia: -0,300 – 3,000 A  
Resolución: 0,001 A
- Bomba peristáltica Ismatec Ms-reglo  
Flujo y dirección variable  
Rango de caudal 4,7 – 0,1 mL/min
- Balanza analítica Sartorius, R200D
- Sonicator Sonics, Branson B2210-MT  
Frecuencia 47 KHz  $\pm$ 6%

### 2.2 MATERIALES:

- Tubos bomba Ismatec:  
diámetro interno: 1,02 mm  
color de referencia: blanco
- Reactores, tubos microbore PTFE Cole-Parmer Instrument Company  
diámetro interno: 0,56 mm  
diámetro externo: 1,07 mm
- Conectores, tubos Tygon autoanálisis Cole-Parmer Instrument Company  
diámetro interno: 1,02 mm  
diámetro externo: 2,95 mm
- Columna Tygon, tubos Tygon autoanálisis Cole-Parmer Instrument Company  
diámetro interno: 1,30 mm  
diámetro externo: 3,23 mm
- Columna Vidrio, tubo de vidrio.  
diámetro interno: 1,5 mm  
diámetro externo: 3,0 mm
- Celda de Vidrio en continuo, Mundo Lab  
paso óptico: 2 mm

- Válvulas de inyección y/o selección, Válvulas baja presión Rheodyne  
número de puertas: 6  
diámetro interno: 0,8 mm
- Unión en Y, multiconector Cole-Parmer Instrument Company  
utilización: tubos de diámetro externo entre 1 – 4 mm
- Material de laboratorio en general

### 2.3 REACTIVOS:

- Ácido 5-sulfosalicílico dihidratado Merck, para síntesis  
 $C_7H_6OS \cdot 2 H_2O$
- Ácido clorhídrico fumante 37% Merck, pro análisis  
HCl
- Ácido sulfúrico 95-97% Merck, pro análisis  
 $H_2SO_4$
- Ácido bórico Merck, pro análisis  
 $H_3BO_3$
- Sal de Fe(II): Sulfato de hierro(II) y amonio hexahidratado Merck, pro análisis  
 $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$
- Sal de Fe(III): Sulfato de hierro(III) y amonio dodecahidratado Merck, pro análisis  
 $(NH_4)Fe(SO_4)_2 \cdot 12 H_2O$
- Soluciones estándares para estudiar el efecto de interferentes  
Cu: Estándar de Cu(II) 1000 mg/L, Tritisol, Merk  
Zn: Estándar de Zn(II) 1000 mg/L, Tritisol, Merk  
Ni: Estándar de Ni(II) 1000 mg/L, Tritisol, Merk
- Muestra real de proceso minero
- Resina aniónica DEAE Sephadex A-25, polisacárido de dextrán funcionalizado  
con 2(dietilamino)etil

## 2.4 SOLUCIONES:

**Solución estándar de Fe(II):** En un vaso de precipitado se agregó 0,7022 g de sal de Fe(II) y 8,330 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Trasvasijo a un matraz de 100 mL se agregó 50 mL de agua destilada desmineralizada y luego el Fe(II) ácido, se agitó lentamente y se aforó al enrase con agua destilada desmineralizada.

**Solución estándar de Fe(III):** En un vaso de precipitado se agregó 0,8634 g de sal de Fe(III) y 8,330 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Trasvasijo a un matraz de 100 mL se agregó 50 mL de agua destilada desmineralizada y luego el Fe(III) ácido, se agitó lentamente y se aforó al enrase con agua destilada desmineralizada.

**Fe(III):** Se agrega 50 mL de agua destilada desmineralizada a un matraz de 100 mL, se añadió el volumen de estándar de Fe(III) necesario, se mezcló suavemente y se aforó al enrase con agua destilada desmineralizada. Luego se agita fuertemente para generar una muestra homogénea. En concentraciones más bajas se utilizó matraces de mayor volumen.

Tabla 1: Soluciones de Fe(III) que se utilizó en el trabajo.

Concentración (mg/L)	Volumen estándar (mL)	Volumen Final (mL)
30	3,0	100
25	2,5	100
6	0,6	100
4	0,4	100
2	0,2	100
1	0,1	100

Concentración (µg/L)	Volumen estándar (µL)	Volumen Final (mL)
800	200	250
600	150	250
400	100	250
300	75	250
200	50	250
100	25	250
50	25	500

**Fe(II):** Se agregó 50 mL de agua destilada desmineralizada a un matraz de 100 mL, se añadió el volumen de estándar de Fe(II) necesario, se mezcla suavemente y se aforó al enrase con agua destilada desmineralizada. Luego se agitó fuertemente para generar una muestra homogénea. En concentraciones más bajas se utilizó matraces de mayor volumen.

Tabla 2: Soluciones de Fe(II) que se utilizó en el trabajo.

Concentración (mg/L)	Volumen estándar (mL)	Volumen Final (mL)
25	2,5	100
1	0,1	100
Concentración (µg/L)	Volumen estándar (mL)	Volumen Final (mL)
800	200	250
600	150	250
400	100	250
300	75	250
200	50	250
100	25	250
50	25	500

**Complejo Fe(III)-ASS:** En un matraz de 100 mL se agregó 50 mL de agua destilada desmineralizada y 3 mL de solución estándar de Fe(III). Se pesó 1,2 g de ASS y se añadió al matraz el que se aforó hasta el enrase con agua destilada desmineralizada. Posteriormente, se puso en el sonicador durante 3 minutos y luego se homogenizó de forma manual con lo que se obtuvo una concentración de 30 mg/L.

**Solución de ambos estados de oxidación de Fe:** En un matraz de 100 mL se agregó 50 mL de agua destilada desmineralizada, 30 µL de solución estándar de Fe(III) y 30 µL de solución estándar de Fe(II). Se aforó hasta el enrase con agua destilada desmineralizada.

**Interferentes:** Para cada catión en estudio se tomó un matraz de 100 mL, se agregó 50 mL de agua destilada desmineralizada, 30 µL de solución estándar de Fe(III) y 30 µL de solución estándar de cada uno de los cationes en estudio Cu, Ni y Zn respectivamente. Se aforó hasta el enrase con agua destilada desmineralizada.

**HCl:** Se agregó 350 mL de agua destilada desmineralizada a un matraz de 500 mL, se le agregó el volumen de ácido necesario para cada solución, se agitó levemente y aforó hasta el enrase con agua destilada desmineralizada mezclando suavemente.

Tabla 3: Soluciones de HCl que se utilizó en el trabajo.

pH	Molaridad (M)	Volumen ácido (mL)	Volumen Final (mL)
0	1	41,7	500
0,3	0,5	20,8	500
0,5	0,3	12,5	500
0,6	0,25	10,4	500
1	0,1	4,2	500
1,1	0,08	3,3	500
	Molaridad (M)	Volumen ácido ( $\mu$ L)	Volumen Final (mL)
2,0	0,01	420	500
2,1	0,007	295	500
2,3	0,005	210	500
2,5	0,003	125	500
3	0,001	40	500
4	0,0001	16	2000

**ASS:** Se pesó la masa de ASS necesaria, se agregó a un matraz de 100 mL el cual se aforó hasta el enrase con agua destilada desmineralizada y se puso en el sonicador durante 3 minutos para disolver completamente el ácido.

Tabla 4: Soluciones de ASS que se utilizó en el trabajo.

Concentración (%p/v)	Masa de ASS (g)	Volumen Final (mL)
1,2	1,2	100
2	2	100
4	4	100
6	6	100



**Resinas:** a un vaso de precipitado de 100 mL se agregó 4 g de resina y en caso de preparar Resina-ASS se agregó 1,2 g de ASS. En cualquiera de los casos se agregó 100 mL de agua destilada desmineralizada y se agitó durante 30 minutos.

Tabla 5: Preparación de las resinas que se utilizó.

Tipo	masa resina (g)	masa ASS (g)	Volumen final (mL)
Resina	4	-----	100
Resina-ASS	4	1,2	100

**Tampón bórico/borato:** En un vaso de precipitado de 250 mL se masó la cantidad de  $H_3BO_4$  deseada, se agregó 200 mL de agua destilada desmineralizada y se agitó durante 1 hora sobre placa calefactora a 40°C aprox. La solución se pasó a un matraz de 250 mL y se aforó hasta el enrase con agua destilada desmineralizada. Posteriormente se ajustó el pH deseado agregando mínimas cantidades de una solución saturada de NaOH.

Tabla 6: Composición de tampones bórico/borato que se utilizó.

	Molaridad (M)	pH	masa $H_3BO_4$ (g)	Volumen final (mL)
T1	0,5	8	7,73	250
T2	0,1	8	1,55	250

**Estándar de  $NH_3$ :** Se preparó una solución estándar de amoníaco 2,5 M se utilizó un matraz de 250 mL con 200 mL de agua destilada desmineralizada al cual se le agregó 47 mL de amoníaco, se aforó al enrase con agua destilada desmineralizada y agitó para homogenizar la solución.

**NH<sub>3</sub>**: Se agregó 350 mL de agua destilada desmineralizada a un matraz de 500 mL, se le añadió el volumen de amoníaco deseado, se agitó levemente, se aforó hasta el enrase con agua destilada desmineralizada y se mezcló nuevamente.

Tabla 7: Soluciones de NH<sub>3</sub> que se utilizó en el trabajo.

pH	Molaridad (M)	Volumen estándar NH <sub>3</sub> (mL)	Volumen Final (mL)
12	2,5	50	500
10	2,5x10 <sup>-2</sup>	5,00	500
9	2,5x10 <sup>-3</sup>	0,50	500
8	2,5x10 <sup>-4</sup>	0,05	500

## 2.5 PROCEDIMIENTOS:

- **Comparación de sensores**

Se comparó de forma teórica el uso de tres posibles sensores los cuales serán estudiados posteriormente.

### Fabricación de los sensores

#### A) Resina + Fe-ASS:

Se inyectó 100 µL de complejo Fe(III)-ASS 30 mg/L formado en batch a la columna con resina.

#### B) Resina + ASS + Fe:

Se inyectó de forma secuencial a la columna con resina, 100 µL de ASS 1,2%(p/v) y posteriormente 100 µL de Fe(III) 30 mg/L.

### C) Resina-ASS + Fe:

Se inmovilizó el reactivo en la resina , para esto se agregó 0,3 g de ASS en 25 mL de agua destilada desionizada, con lo que se generó una solución de 1,2%(p/v) de ASS la cual se agitó durante 30 minutos con 1 g de resina sephadex (Resina-ASS) posteriormente se empaquetó una columna de a la cual se le inyectó una muestra de Fe(III) 30 mg/L

- **Evaluación del porcentaje de uso, contracción y coloración del sensor resina-ASS para tres formas de trabajo diferentes.**

Se utilizó un sistema en continuo monocanal para ingresar las muestras y reactivos, acopló a una columna de tygon que contiene el sensor. La columna se ubicó sobre un fondo blanco frente a una cámara filmadora con la que se registró el estudio. Se realizó tres repeticiones para cada una de las formas de trabajar, cada repetición utilizó una columna nueva, para mantener la condición inicial entre las pruebas.

- **Evaluación de diferentes fluidos para determinar el uso posible dependiendo de la capacidad de liberar el analito.**

Se utilizó HCl 1 M, HCl diluido (HCl (dil)) 7 mM, ASS 4%(p/v), H<sub>2</sub>O destilada desmineralizada, Tampón 1 (T1) tampón bórico/borato 0,5 M pH 8, Tampón 2 (T2) tampón bórico/borato 0,1 M pH 8, NH<sub>3</sub> pH 12 (NH<sub>3</sub> (1)) y NH<sub>3</sub> pH 8 (NH<sub>3</sub> (2)) como fluidos en estudio.

Se empaquetó una columna de tygon de 3 cm de longitud con resina se le inyectó posteriormente 100  $\mu$ L de complejo de Fe(III) y a continuación grandes cantidades del fluido estudiado, se observó si el fluido es o no capaz de liberar el analito.

Para esto se ubicó el sensor sobre un fondo blanco frente a la cámara filmadora. Se capturó fotografías a 2 segundos, 20 segundos y 20 minutos para cada uno de los fluidos en estudio. Se realizó tres repeticiones con cada uno de los fluidos.

- **Evaluación de la variación de la capacidad de elución dependiendo de la concentración y composición del eluyente.**

Se trabajó con un sistema multicanal, donde a un carrier de HCl(dil) se le agregó por medio de válvulas de inyección la muestra y el eluyente. Se ubicó el sensor sobre un fondo blanco frente a la cámara filmadora. Se filmó todo el proceso y se capturó las fotografías en tiempo establecidos de la filmación con lo que se comparó cada una de las inyecciones de manera sistemática.

Para evaluar la capacidad de elución dependiente de la concentración se empaquetó una columna de tygon de 3 cm con resina-ASS a la cual se le inyectó 100  $\mu$ L de muestra de 30 mg/L de Fe(III) y posteriormente 50  $\mu$ L de ácido (HCl) se evaluó cada uno de los eluyentes estudiados (HCl 0,1 M, 0,3 M, 0,5 M, 0,7 M y 1 M ). Cada una de las pruebas se realizó por triplicado utilizando columnas nuevas.

Para evaluar la capacidad de elución dependiente de la composición se cargó una columna de tygon de 3 cm con resina a la cual se le inyectó 50  $\mu\text{L}$  de ASS 1,2%(p/v), y 100  $\mu\text{L}$  de Fe(III) 30 mg/L los cuales fueron retenidos por la columna y posteriormente se inyectó 50  $\mu\text{L}$  del eluyente en estudio ( 0,5 M HCl, 0,5M HCl+4% ASS y 4% ASS), se filmó todo el proceso y se obtuvo las fotografías para la máxima coloración de cada una de las inyecciones. Finalmente, se realizó una segunda inyección de muestra (100  $\mu\text{L}$  de Fe(III) 30 mg/L) con la cual se observó la capacidad de carga de cada uno de lo eluyentes en estudio. Cada una de las pruebas se realizó con columnas nuevas tres repeticiones para cada una.

- **Evaluación de carrier ácido que no eluya la muestra y que tenga la capacidad de dar el medio necesario para la determinación ácida.**

Se trabajó con un sistema multicanal, donde a un carrier HCl 7 mM (HCl(dil)) se le agregó por medio de válvulas de inyección la muestra y el eluyente. Se empaquetó una columna de tygon de 3 cm de longitud con resina a la cual se le inyectó en forma secuencial 100  $\mu\text{L}$  de ASS 1,2% y 100  $\mu\text{L}$  de Fe(III) 30 mg/L. El sensor se ubicó sobre un fondo blanco frente a la cámara filmadora. Se filmó todo el proceso y se capturó las fotografías a 1, 10 y 20 minutos posterior a la inyección de la muestra. Se trabajó con carrier ácidos de concentraciones entre 1 mM y 80 mM de HCl. Cada una de las pruebas se realizó por triplicado y se utilizó columnas nuevas.

- **Evaluación de la dependencia de la contracción de la columna con la concentración del ASS o el número de inyecciones.**

Se trabajó con un sistema multicanal, donde a un carrier ácido se agregó por medio de válvulas de inyección la muestra y el eluyente. Para esto se utilizó un carrier de HCl 0,003 M, muestra de 30 mg/L de Fe(III), resina sola y soluciones de ASS de concentraciones 2%(p/v) 4%(p/v) y 6%(p/v). Se empaquetó con resina columnas de tygon de 3cm de longitud. Se realizó tres series de inyecciones secuenciales de 100 µL de ASS a la concentración en estudio seguida de 100 µL de muestra. El sensor se ubicó sobre un fondo blanco frente a la cámara de video, donde se filmó todo el proceso y se capturó las fotografías correspondientes al momento final de inyección de la muestra, para las tres series. Cada una de las pruebas se realizó con columnas nuevas y se repitió tres veces para cada una de las concentraciones estudiadas.

Se consideró la longitud del sensor previo a la primera inyección (inyección 0) como el 100% y se midió la longitud del sensor (solo segmento donde hay resina) posterior a cada una de las inyecciones, se calculó así la longitud en porcentaje para cada inyección. Se analizó los datos por medio de Prism 4 para Windows versión 4.01, 2004 con el cual se realizó un análisis no paramétrico ANOVA de una cola, utilizando un análisis de Bonferroni.

- **Evaluación de la formación de los complejos y la capacidad de retención de la resina dependiendo del pH.**

Se evaluó la formación de Resina-ASS-Fe(III), para esto se tomó 12 vasos de precipitado de 10 mL a los que se les agregó 0,06 g de ASS y 250  $\mu$ L de estándar de Fe(III), se agregó agua destilada desmineralizada hasta completar los 10 mL, se agitó. Se reguló el pH con gotas de NaOH concentrado con lo que se obtuvo un set de vasos con pH entre 1 y 12. Se agregó una cantidad fija de resina y agitó por 1 minuto para favorecer la retención del complejo. Posteriormente se empaquetó con la resina de cada uno de los vasos columnas de tygon de 3 cm de longitud. Por último, se fotografió cada una de ellas.

Se evaluó la formación de Resina-ASS-Fe(II), para esto se preparó 12 soluciones de 10 mL con 1,25 g de hidroxilamina, 0,06 g de ASS y 250  $\mu$ L de estándar de Fe(II), se agregó agua destilada desmineralizada hasta 10 mL, y se agitó. Posteriormente, se les reguló el pH con lo que se obtuvo un set de vasos con pH entre 1 y 12. Se agregó una cantidad fija de resina y agitó 1 minuto y se empaquetaron las columnas de tygon 3 cm de longitud con la resina obtenida y posteriormente se fotografió.

Cada una de las pruebas se realizó con columnas nuevas y se repitió dos veces, para verificar los resultados obtenidos.

- **Optimización y elección de la configuración FIA**

Se estudió las posibles variables de la configuración, se optimizó la cantidad de muestra inyectada, longitud de los reactores, concentración óptima de ASS para la formación del sensor y evaluando el efecto que tiene cada una de estas variables en el sistema, con lo cual se comprendió completamente el método y aumentar así sus aplicaciones. Se optimizó las variables apuntando a obtener una señal más sensible, por lo que se realizó diferentes pruebas para cada una de las variables estudiadas.

Longitud de los reactores: 20 cm hasta 1 m

Loop eluyente: 5 cm hasta 30 cm

Loop Muestra: 20 cm 300 cm

Columna: Celda en continuo de Vidrio, 2 mm paso óptico

Columna de tygon, 3 cm longitud 1,3 mm paso óptico y

Columna de vidrio, 2 cm de longitud 1,5 mm paso óptico

Flujo: 0,2 mL/min hasta 2,6 mL/min

Eluyente: 1,2%(p/v) hasta 6%(p/v) de ASS y/o 0,1 M a 1 M de HCl

Composición del eluyente: HCl y/o ASS

Tipo de mezcla: unión en "y" o como tren de muestra usando válvulas de inyección.



- **Evaluar la posibilidad de determinación simultánea.**

Se empaquetó una columna de tygon de 3 cm de longitud con resina. Se inyectó 100  $\mu\text{L}$  de ASS 1,2%(p/v) y posteriormente 100  $\mu\text{L}$  de Fe(III) 30 mg/L a una carrier ácido pH 4. Para evaluar el paso de un complejo a otro se cambió a un medio básico, compuesto de tampón bórico borato 1 M pH 10

- **Verificación determinación especiada:**

Se preparó soluciones de 300  $\mu\text{g/L}$  de Fe(II), 300  $\mu\text{g/L}$  de Fe(III) y una solución que contiene la mezcla de ambos estados de oxidación compuesta por 300  $\mu\text{g/L}$  de Fe(II) y 300  $\mu\text{g/L}$  de Fe(III). Se determinó tanto Fe(III) como Fetotal para cada una de las soluciones, y se comparó estas señales. Se realizó análisis estadístico para cada uno de los datos por medio de Prism 4 para Windows versión 4.01, 2004 con el cual se realizó un análisis no paramétrico ANOVA de una cola, utilizando un análisis de Bonferroni,

- **Evaluar parámetros de muestreo:**

Curvas de calibración

Se preparó una gama de soluciones de Fe(II) entre 0 y 1000  $\mu\text{g/L}$  y entre 0 y 2000  $\mu\text{g/L}$  de Fe(III), a cada una de las soluciones se determinó tanto Fe(III) como

$Fe_{total}$ . Con el valor de cada una de estas determinaciones se generó las curvas de calibración para cada uno de los estados de oxidación del hierro. Se evaluó la linealidad de los puntos, con lo que se obtuvo la ecuación de la recta.

#### Frecuencia de muestreo

Se determinó el número de inyecciones que se realizó en una hora de trabajo.

#### Límites de detección y cuantificación:

Se realizó 20 mediciones de una solución blanco. Se utilizó la desviación estándar del blanco y la pendiente de la curva de calibración, con lo cual se evaluó de forma teórica los límites de detección y cuantificación para el método.

#### Rango de trabajo:

Se utilizó el valor del límite de detección como límite inferior del rango de trabajo, y se evaluó una solución de 6000  $\mu\text{g/L}$  de  $Fe(III)$  en medio ácido, y hasta una solución de 4000  $\mu\text{g/L}$  de  $Fe(III)$  en la determinación de  $Fe_{total}$ .

#### Principales interferentes:

Se determinó tanto  $Fe(III)$  como  $Fe_{total}$  para una solución de 300  $\mu\text{g/L}$  de  $Fe(III)$  y diferentes soluciones compuestas por 300  $\mu\text{g/L}$  de  $Fe(III)$  y 300  $\mu\text{g/L}$  de cada uno de los cationes que se estudió y se comparó el valor que se obtuvo.

Se determinó tanto  $Fe(III)$  como  $Fe_{total}$  para una solución de  $HNO_3$  0,012% y se comparó con los resultados que se obtuvo antes.

- **Estudio con muestras reales de residuos de procesos mineros**

En un matraz de 100 mL se agregó 50 mL de agua destilada desmineralizada. Se agregó una alícuota de 12,2 mL de la muestra de desecho minero y se aforó con agua destilada desmineralizada. La solución anterior fue sometida al protocolo usado para todos los puntos de la curva de calibración tanto Fe(III) como Fe<sub>total</sub> y el valor que se encontró se interpoló en la recta, con lo que se obtuvo la concentración de la muestra.

- **Aplicación y funcionalidad del método como herramienta de protección al medio ambiente.**

Se analizó de forma teórica la funcionalidad y aplicabilidad del método.

### III RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

#### 3.1 Comparación entre posibles sensores para la detección de Fe.

Para evaluar la funcionalidad de un sensor capaz de cuantificar Fe a bajas concentraciones se proponen tres formas diferentes de trabajo en las cuales se comparan las cualidades que presentan c/u de ellas:

##### 1) Retención del complejo: (R) + (ASS-Fe).

Este método consta de un sólo paso, en el cual se inyecta el complejo coloreado ASS-Fe formado previamente el que posteriormente es retenido por interacciones entre la resina (R) y el grupo sulfónico del ASS (Figura 5a). El complejo ASS-Fe puede ser formado en el transcurso de la configuración FIA o en forma externa.

##### 2) Inyección secuencial: (R) + (ASS) + (Fe).

Método en el cual la resina empaquetada en la columna retiene una primera inyección de ASS por medio de la formación de interacciones por el grupo sulfónico del ácido. Luego en un segundo paso es inyectada la muestra de Fe, la cual es retenida al formar un complejo entre el metal y los grupos carboxílico y alcoholico del ácido. (Figura 5b)

##### 3) Resina cargada con ASS: (R-ASS) + (Fe).

Método en el cual la resina a utilizar es preparada previamente con ASS, quedando éste ligado a la resina debido a interacciones electrostáticas con el

grupos sulfónico del ácido. Luego se inyecta la muestra de hierro al sistema la que es retenida en la resina dando origen a la coloración. (Figura 5b)

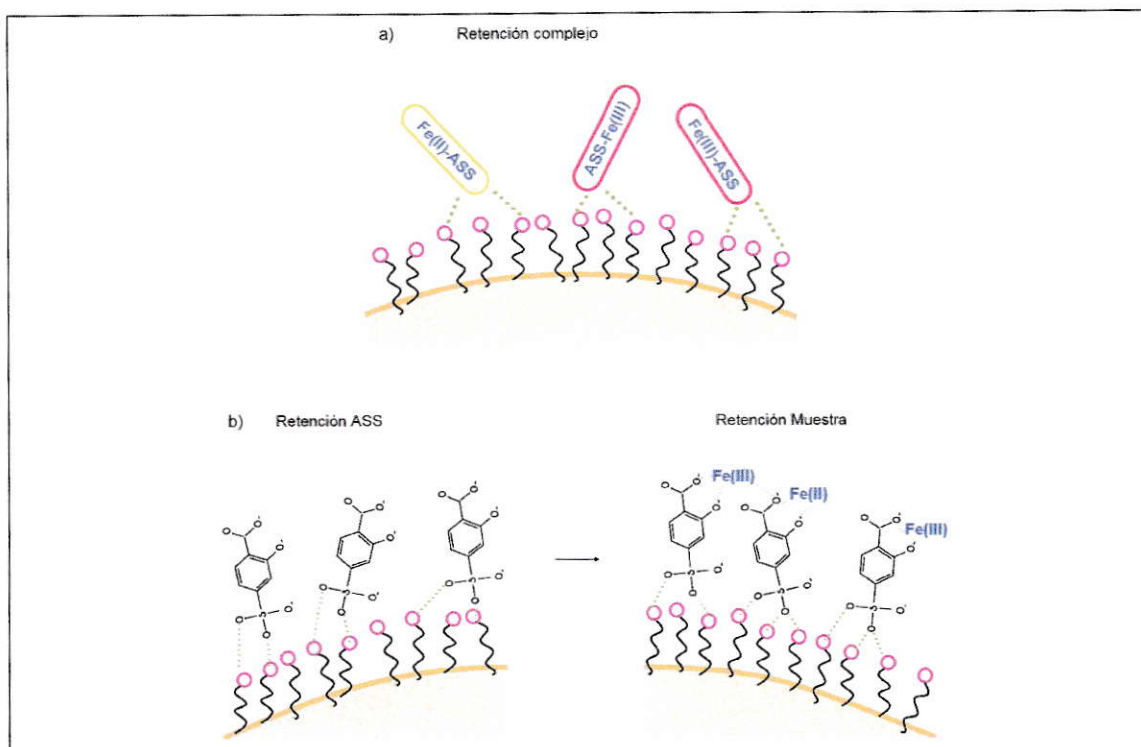


Figura 5: Esquema de los métodos de trabajo de Retención del complejo, Inyección secuencial y de Resina cargada. a) Para el método de Retención del complejo, se debe formar previamente el complejo ASS-Fe el que luego es retenido en la columna por interacciones entre la resina y la parte sulfónica del ASS del complejo. b) Para el método de Inyección secuencial, primero el ASS se acopla a la resina, siendo retenido por la parte sulfónica del ASS. Posteriormente se inyecta la muestra, la cual interacciona con el ASS por los grupos alcohólicos y carboxílicos formando el complejo coloreado ASS-Fe. Para el método del Resina cargada con ASS se acopla previamente el ASS a la resina antes de ser empaquetada y luego se inyecta la muestra.

Para las tres formas de trabajo presentadas se debe eluir el analito retenido en la resina con el objeto de realizar una nueva medición. Este es liberado por medio de un Eluyente quedando la resina en condiciones de recibir una nueva muestra.

Cada una de las formas de trabajar presenta ventajas y desventajas:

**A) (R) + (ASS-Fe):** el hecho de requerir de sólo dos pasos, uno de retención del complejo y otro de elución, simplifica bastante la configuración FIA y la secuencia de trabajo. Sin embargo, la formación del complejo a través del sistema FIA requiere de una compleja configuración que puede dificultar el uso del sensor para el operador y la formación del complejo de manera externa requiere de un operador capacitado para realizar este paso previo.

**B) (R) + (ASS) + (Fe):** es el método que presenta mayores ventajas para la automatización de las mediciones por tener inyecciones secuenciales de los componentes del sistema, lo que disminuye la interacción del usuario. Sin embargo, para lograr una buena formación de los complejos coloreados se requiere de una compleja configuración y de un mayor tiempo de medición.

**C) (R-ASS) + (Fe):** Presenta ventajas en cuanto a la simplicidad del método tanto en número de pasos como en configuración. Sin embargo, puede presentar deficiencias en cuanto a la reutilización del sensor ya que al eluir el metal podría liberarse parte del ASS de la resina, obligando a cargar la columna con ASS nuevamente antes de la siguiente medición.

### **3.2 Evaluación del porcentaje de uso, contracción y coloración del sensor R-ASS-Fe para las tres formas de trabajo.**

Se estudió la capacidad de retención de la resina y las respuestas que entrega ésta al someterla a las tres formas de trabajo, ya que es capaz de retener tanto el complejo ASS-Fe formado previamente, como ASS libre. En todos los casos se utilizó HCl 7 mM como corriente portadora que a su vez favorece la formación del complejo ácido en la columna.

Para evaluar el porcentaje de uso del sensor se midió la longitud de la zona coloreada por el complejo en relación al largo total de la columna (Figura 6a), observándose que la forma de trabajo por inyección secuencial (B) presenta una condición favorable de retención de 77% y una coloración homogénea a todo el largo del sensor. Los métodos de trabajo A y C mostraron un menor porcentaje de uso del sensor, 38% y 60% respectivamente no logrando cubrir todo el largo de la resina lo que presenta una desventaja para la determinación de hierro.

Por un efecto aún desconocido la resina se contrae posterior a la inyección de la muestra diferenciándose dos áreas: un segmento variable sin resina ubicado a la entrada del flujo y una segunda área donde se concentra la resina. Para estudiar el efecto de contracción de la resina se hizo pasar el eluyente y luego la muestra para formar el complejo coloreado en la resina. Para obtener el porcentaje de contracción de la columna, se comparó el segundo segmento en relación al largo total de esta (Figura 6b). Al analizar la variación en la contracción de la columna en los tres métodos de trabajo, se encuentra que el sensor al cual se le inyecta ASS, ya sea acomplexado con

hierro (A) o por inyección de la molécula libre (B), presentan mayor porcentaje de contracción disminuyendo su longitud a un 89% y 79% respectivamente. Es de gran importancia controlar, o al menos considerar la variación de la longitud de la resina al momento de ubicar el sensor frente al haz del espectrofotómetro, ya que si se encuentra ubicado en la zona variable sin resina, el equipo podría entregar mediciones erróneas. La columna C que contiene resina acoplada a ASS previamente, presenta una contracción leve de tan sólo 94% lo que permite ubicar de mejor manera el haz facilitando la determinación espectrofotométrica. Este resultado indicaría además que existe una dependencia entre la contracción de la resina y la inyección de ASS, la cual puede deberse a la concentración de este último o simplemente al paso del ácido por la columna reordenando las moléculas de dextrán.

Analizando cualitativamente la coloración que presentan las diferentes formas de trabajo (Figura 6c) se encuentra que no hay diferencias notorias entre cada una de éstas al tomar la primera sección del sensor. Sin embargo, hay que considerar el porcentaje de uso de la columna (Figura 6a) al momento de elegir el método ya que existirán diferencias si se considera otra sección. Es posible observar que al inicio de la columna existe una coloración completa debido a la formación del complejo y hacia el final del sensor comienza a observarse un degradé de coloración. En el caso del método C puede verse que el extremo final del sensor está completamente decolorado, lo que podría entregar mediciones espectrofotométricas erróneas.

Es por estos motivos que se hace completamente necesaria la ubicación del haz en el primer segmento del sensor considerando además la contracción de la resina que ocurre posterior a las eluciones.



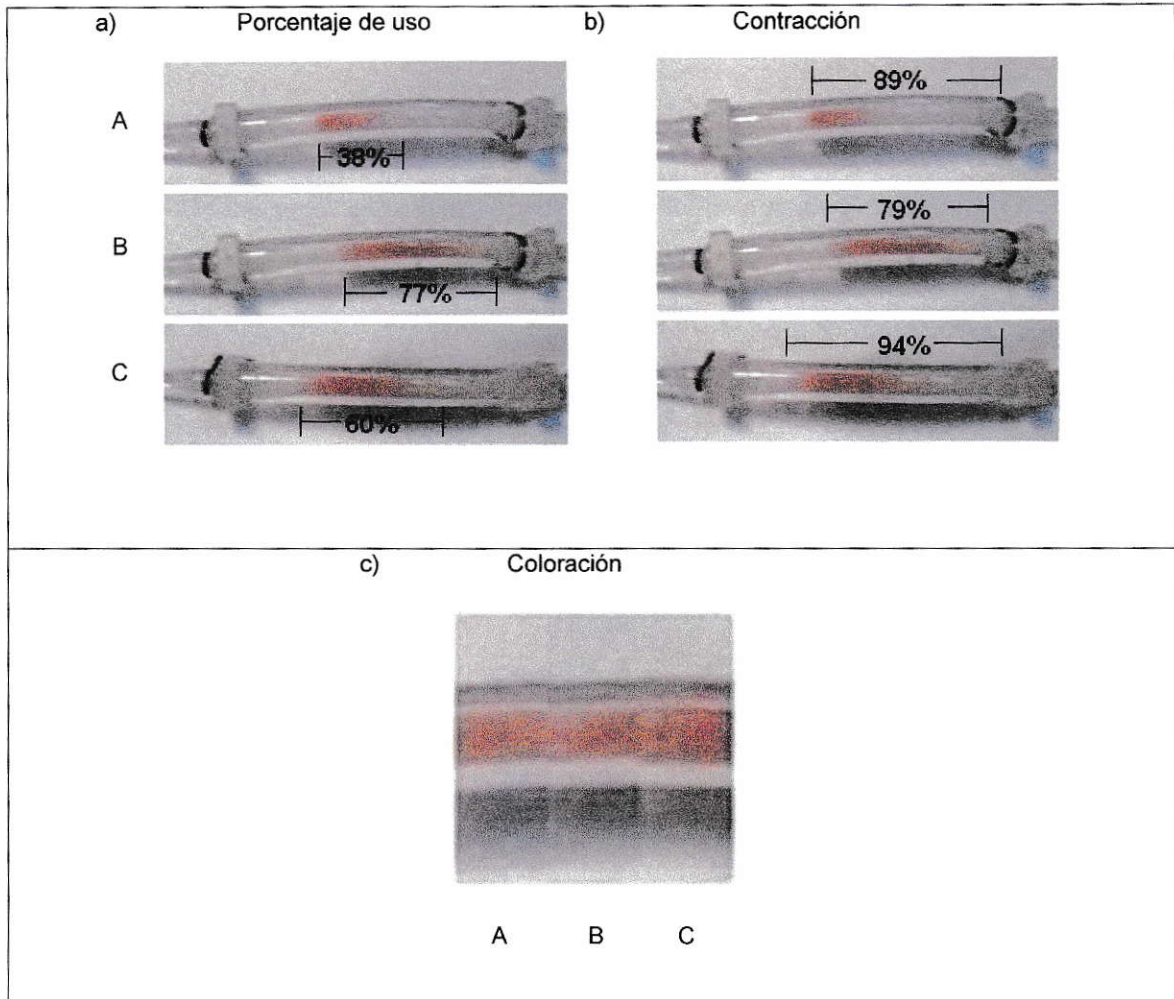


Figura 6: Comparación del porcentaje de uso, contracción y coloración del sensor para tres formas de trabajo. Se utilizó como muestras soluciones de 30 mg/L de Fe ó 30 mg/L de complejo ASS-Fe preparado previamente. a) Porcentaje de tinción del sensor con respecto al largo total de la columna. b) Porcentaje de contracción de la resina con respecto al largo total de la columna. c) Análisis cualitativo de la coloración del sensor para los tres métodos de trabajo. Experimento representativo de tres mediciones independientes.

Una de las características que se busca para elegir un método de trabajo es que el complejo coloreado ocupe la mayor parte de la columna y que se distribuya en forma homogénea. De esta manera el espectrofotómetro entregará mediciones más

certeras. Por otra parte, el mayor uso de la columna contrarresta el efecto de la contracción, lo que permite ubicar el haz en la zona intermedia del sensor.

Considerando que las condiciones en que se realizaron las pruebas fueron similares para las tres formas de trabajo, que una resina presente menor porcentaje de uso e igual coloración que otra podría deberse posiblemente a una menor cantidad de metal retenido lo que corresponde a una condición desfavorable de retención.

Se realizaron también pruebas de elución con HCl que muestran una liberación completa del hierro. Sin embargo, ocurre además una liberación parcial o completa del ASS retenido en la columna, lo que hace necesario cargar nuevamente la resina con ASS para regenerar el sensor antes de inyectar una nueva muestra a medir.

De los estudios anteriores es posible calificar con una escala de 1 a 3, considerando 1 la condición de trabajo más favorable y 3 la condición menos deseada, para cada una de las variables antes estudiadas. La suma de las calificaciones obtenidas permite una comparación cualitativa simple de los diferentes métodos, donde la menor calificación corresponde a la forma más conveniente de trabajar (Tabla 8).

Tabla 8: Comparación cualitativa de las respuestas entregadas por los tres métodos de trabajo

columna	contracción	% uso columna	coloración	reutilización	total
A	2	3	1	1	7
B	3	1	1	1	6
C	1	2	1	3	7

De la Tabla 8 se obtiene que la forma de trabajo por inyección secuencial (método B) es la forma más favorable principalmente debido a la tinción homogénea y a la posibilidad de reutilización del sensor. La única variable que resultó menos favorable para este método corresponde a la contracción de la resina luego de la inyección del eluyente, la cual probablemente puede ser optimizada variando el caudal, la cantidad de resina o el volumen de eluyente inyectado.

### 3.3 Evaluación de diferentes fluidos para estudiar la capacidad de liberación del analito.

Se estudiaron diferentes tipos de fluidos para determinar su efecto sobre el sensor en la liberación del complejo coloreado. Para esto se analizó cualitativamente la elución del complejo sometido al paso de diferentes fluidos y se midió el efecto producido por el flujo a los 2 segundos, 20 segundos y 10 minutos (Tabla 9).

Se utilizó HCl 1 M (HCl), HCl 7 mM (HCl (dil)), H<sub>2</sub>O destilada (H<sub>2</sub>O), ASS 4%(p/v) (ASS), tampón bórico/borato 0,5 M pH 8 (T1), tampón bórico/borato 0,1 M pH 8 (T2), NH<sub>3</sub> pH 12 (NH<sub>3</sub> (1)) y NH<sub>3</sub> pH 8 (NH<sub>3</sub> (2)) como fluidos en estudio.

Previo a este estudio de capacidad de elución se inyecta a la columna 100 µL de complejo ASS-Fe para formar el sensor y posteriormente se hace pasar cada fluido.

Tabla 9: Estudio del efecto de diferentes fluidos sobre el complejo retenido en el sensor.

Fluido	Tiempo de inyección		
	2 segundos	20 segundos	10 minutos
HCl	elución completa	elución completa	elución completa
HCl <sub>(dil)</sub>	no eluye	no eluye	no eluye
H <sub>2</sub> O	no eluye	no eluye	no eluye
ASS	elución parcial	elución completa alta contracción	taponamiento
T1	cambio de complejo	no eluye	elución parcial
T2	cambio parcial de complejo	cambio de complejo no eluye	no eluye
NH <sub>3</sub> (1)	cambio del complejo	elución leve	elución parcial
NH <sub>3</sub> (2)	cambio de complejo	no eluye	no eluye

De acuerdo a los resultados de la Tabla 9 es posible realizar la elución completa del metal tanto con HCl como con ASS, mientras que sólo se obtiene una elución parcial al utilizar T1 y NH<sub>3</sub>(1) durante un largo periodo de tiempo. Así mismo es posible utilizar como corriente portadora HCl (dil), T2, H<sub>2</sub>O y NH<sub>3</sub>(2) dependiendo del medio en el cual se quiere trabajar ya que no son capaces de eluir el complejo coloreado a ninguno de los tiempos evaluados.

Considerando los tiempos de inyección es posible observar que el HCl concentrado presenta la mayor capacidad de elución comparado con los otros fluidos ya que en 2 segundos limpia completamente la columna. Por otra parte, aunque el ASS presentó una elución medianamente rápida, este compuesto contrae la columna hasta 50% del tamaño inicial, lo que hace disminuir su flujo hasta que la columna queda completamente taponada impidiendo el paso del fluido. El tampón bórico/borato 0,5M

pH8 (T1) podría también ser utilizado como eluyente ya que tiene la capacidad de liberar la muestra. Sin embargo, este compuesto tarda mucho tiempo en eluir completamente el complejo (más de 30 minutos) haciendo ineficiente el método al disminuir la frecuencia de muestreo.

Debido a la factibilidad de utilizar HCl(dil), H<sub>2</sub>O, T2 y NH<sub>3</sub>(2) como corriente portadora ya que no presentan elución de la muestra y que tanto T2 como NH<sub>3</sub>(2) logran pasar del complejo ácido (color morado) al complejo básico (color amarillo) en un corto periodo de tiempo sin liberar el metal retenido en el sensor, se abre la posibilidad de realizar una determinación simultánea de hierro sólo con la modificación del la solución Medio empleada producto de la variación del pH a la que se encuentre el sensor.

De acuerdo a los resultados de la Tabla 9, se usará como eluyente el HCl debido al alto poder de liberación del analito retenido en la columna. Se estudiará la utilización de HCl(dil), H<sub>2</sub>O, T2 y NH<sub>3</sub>(2) como posibles corrientes portadoras de la muestra.

### 3.4 Optimización del eluyente.

Para disminuir la generación de residuos, el consumo de reactivo y por consiguiente, la disminución en los costos generales y costos asociados a la eliminación de desechos, se requiere de la utilización de bajos volúmenes de eluyente y de soluciones para el funcionamiento del sensor. Los primeros estudios sobre el eluyente mostraron que la elución del metal depende tanto de la concentración del eluyente como del volumen utilizado.

Para evaluar la capacidad de elución del HCl se estudió la liberación del complejo coloreado utilizando diferentes concentraciones de ácido que fluctúan entre 0,1 M y 1 M. Se estudió también la posible reutilización del sensor posterior a la elución del metal, para cada una de las soluciones verificando la liberación o no del ASS ligado a la resina (Figura 7).

Para esto se inyecta previamente una solución de hierro (III) 30 mg/L a una columna cargada con ASS para formar el complejo coloreado y luego se inyectan 100  $\mu$ L de las diferentes soluciones del HCl. Finalmente la columna es sometida a una segunda inyección de la solución de Fe(III) 30 mg/L para determinar si se ha liberado o no el ASS de la resina.

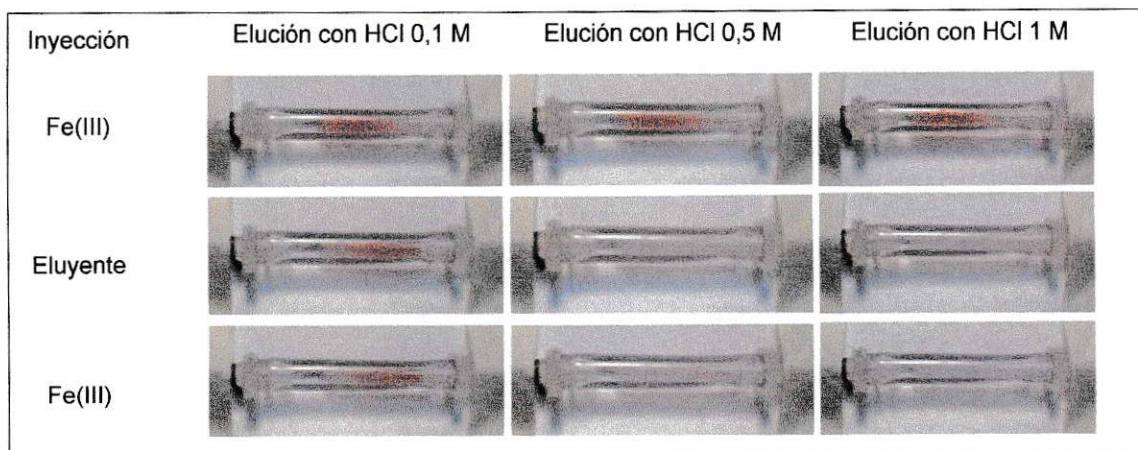


Figura 7: Evaluación de la elución del complejo ASS-Fe utilizando diferentes concentraciones de HCl. En la primera fila se muestra la columna de sephadex posterior a la inyección del analito. En la segunda fila se muestra la liberación del analito producto de la inyección de eluyente (HCl) a distintas concentraciones y en la tercera fila se muestra la retención de la muestra de Fe(III) luego de una segunda inyección. Se evalúan soluciones de ácido clorhídrico de 0,1M, 0,3M, 0,5M, 0,7M y 1M. Experimentos representativos de tres mediciones independientes.

De este estudio de eluyente se obtiene que a concentraciones menores que 0,3 M (dato no mostrado) el HCl eluye parcialmente el analito retenido en la columna, como se observa en la segunda fila en la elución con HCl 0,1 M, descartándose la posibilidad de utilizar HCl como eluyente a estas concentraciones.

Fue posible encontrar una relación entre el tiempo de elución y la concentración del eluyente observándose que al utilizar el mismo volumen de inyección, el tiempo de elución disminuye a medida que la concentración aumenta.

Aumentos en el volumen de las inyecciones de HCl (100, 150 y 200  $\mu$ L) mostraron que ácidos más diluidos (hasta 0,3 M) son capaces de eluir la muestra completamente de la columna (resultado no mostrado). Esta prueba estaría indicando



que la elución depende del volumen de eluyente inyectado. Para aumentar la frecuencia de muestreo la elución debe ser lo mas rápida posible, por lo tanto se pretende usar un volumen más pequeño para acotar el tiempo.

Al realizar las eluciones con concentraciones mayores o igual a 0,5 M, se observa una excelente liberación del analito en un corto periodo de tiempo (menor a 5 segundos). Sin embargo, al realizar una segunda inyección de muestra se observa una retención muy leve o nula. Este resultado indicaría que la utilización de altas concentraciones de HCl no sólo estaría eluyendo el Fe retenido en la resina sino que además se estaría liberando el ASS. Por esta razón se hace necesario cargar nuevamente la columna con ASS luego de la elución con HCl concentrado y previo a la siguiente inyección de la muestra para que el sensor sea reutilizable.

De acuerdo al resultado obtenido del estudio de liberación del analito, donde se indica que el mismo ASS puede ser utilizado como eluyente (Tabla 9) y la necesidad de cargar nuevamente la columna con ASS luego de la elución con HCl (Figura 7), se evalúa la posibilidad de eluir con ASS o una mezcla de ASS + HCl comparándose estos resultados con la elución utilizando HCl.

Para esto se inyecta previamente de forma secuencial, ASS para cargar la resina y Fe(III), el cual será retenido por la columna para formar el complejo coloreado. Luego se inyecta 100µL de cada uno de los eluyentes (HCl 0,5M, HCl 0,5M + ASS 4% y ASS 4%) y se compara la liberación del analito retenido en la columna. Posteriormente se compara capacidad de carga de la columna luego de la segunda

inyección de muestra de Fe(III) comparando la coloración que se genera en cada caso (Figura 8).

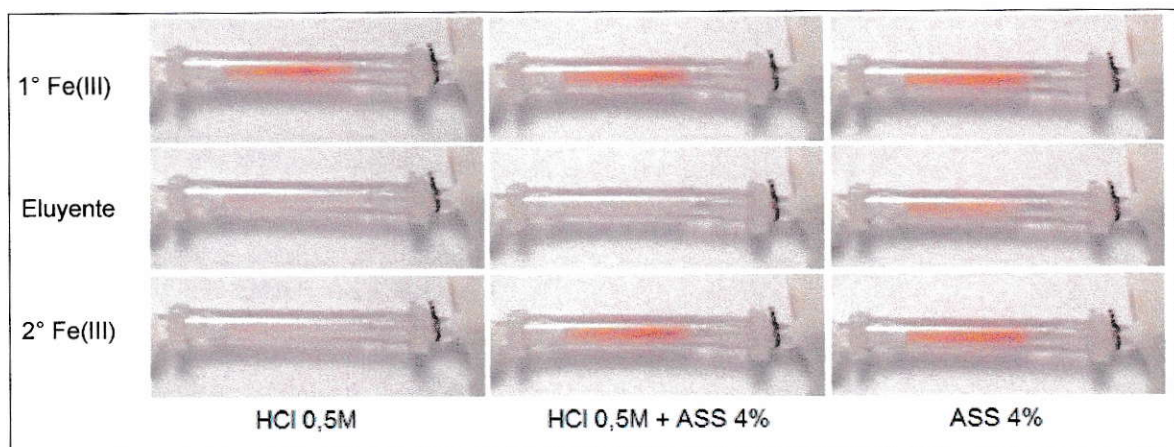


Figura 8: Evaluación de la capacidad de elución y recarga de la columna. La primera fila corresponde a la inyección secuencial de ASS y Fe(III) para formar el complejo coloreado. La segunda fila corresponde a la comparación de la capacidad de elución entre HCl 0,5M, HCl 0,5M + ASS 4% y ASS 4% y la última fila presenta la capacidad de carga de cada una de las soluciones. Experimento representativo de tres mediciones independientes.

Luego de la inyección del eluyente es posible observar que los tratamientos con HCl y la mezcla de los ácidos presentan una buena liberación de la muestra, mientras que al utilizar ASS es posible observar metal aún retenido debido a la menor capacidad de elución de este ácido.

Al evaluar la capacidad de retención de la resina luego de la segunda inyección de muestra, se encuentra que tanto el ASS como la mezcla de ácidos presentan una completa retención de la muestra, observándose una recuperación del color inicial producto de la formación del complejo.

La mezcla de ambos ácidos eluye eficientemente la muestra y a su vez carga correctamente la columna, haciendo de esta mezcla el eluyente más adecuado. El uso de la mezcla HCl + ASS como eluyente permite realizar el proceso de elución y recarga de la columna en un sólo paso, simplificando en gran medida el sistema FIA. Con esto es posible disminuir el tiempo de preparación de la columna para una nueva medición lo que aumenta la frecuencia de muestreo.

### **3.5 Evaluación de la solución Medio o corriente portadora que será utilizada para la determinación de hierro en condición ácida.**

Se evalúa la posibilidad de utilizar HCl diluido como corriente portadora o solución Medio para la generación del pH ácido necesario para la determinación de Fe(III). Para esto se analizó cualitativamente la elución del complejo ASS-Fe(III) cuando es sometido al paso de soluciones de HCl entre 0,3 M y 0,001 M, y se midió el efecto producido luego de 1, 10 y 20 minutos de circulación de la solución. Se consideraron estas soluciones debido a que la determinación ácida debe realizarse entre pH 1 y 4 (Puig, E. y col. 2007.). Por otra parte, se observó que concentraciones superiores a 0,3 M eluyen la muestra retenida (Figura 7), por lo tanto no pueden ser utilizadas como solución medio o corriente portadora.

Para realizar el estudio de generación del pH se inyectó de forma secuencial 100  $\mu$ L de ASS y 100  $\mu$ L de Fe(III) 30 mg/L para formar el sensor y posteriormente se hace circular cada una de las soluciones en estudio.

En la Figura 9 se muestran los efectos producidos por cada una de las concentraciones analizadas sobre la retención del analito en el sensor evaluado a distintos tiempos de estudio.

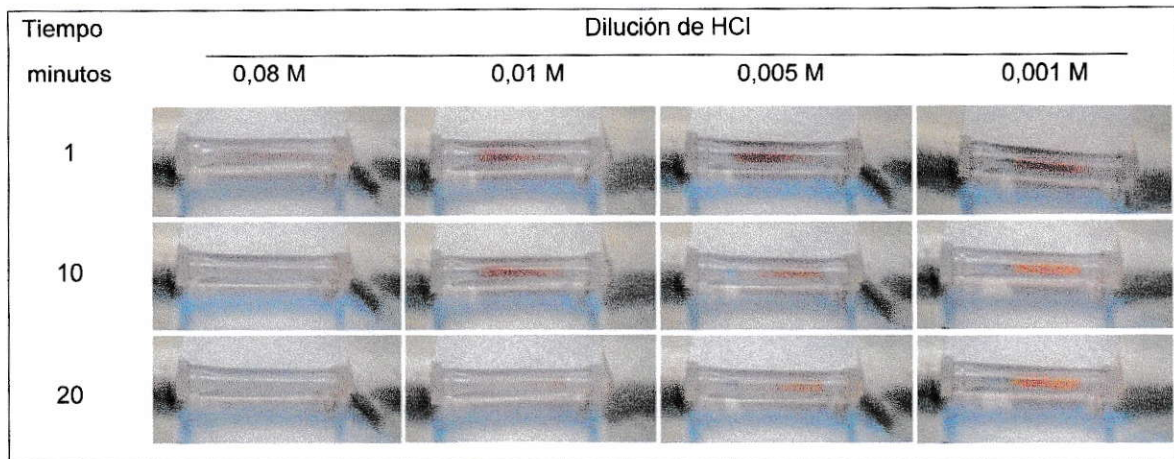


Figura 9: Efecto de la solución Medio sobre la muestra retenida en la columna. En las filas se presentan los distintos tiempos a los que fue sometido el sensor a las diferentes soluciones de HCl mostradas en las columnas. Experimento representativo de tres mediciones independientes.

En la Figura 9 se observa que concentraciones de 5 mM o superiores de HCl disminuye considerablemente la coloración de la columna a medida que transcurre el tiempo, lo que implica que a estas concentraciones no es posible usar HCl como solución Medio. De manera contraria concentraciones menores a ésta no eluyen la muestra luego de 20 minutos pudiendo ser utilizadas como solución Medio.

Fue posible encontrar que a concentraciones igual o mayores que 0,08 M de HCl eluyen la muestra eficientemente y en muy poco tiempo (resultado no mostrado) lo cual descarta la posibilidad de usarlas como solución Medio.

### **3.6 Relación entre la concentración del ASS y la contracción de la columna.**

El paso de ASS por la columna produce una contracción de la resina luego de cada inyección del eluyente (Figura 6), generando una disminución del flujo que puede incluso tapar la columna. Este efecto se debe principalmente al paso de ASS y no a la acidez de este compuesto, ya que al eluir con HCl no se produce contracción del sensor.

La resina al ser contraída por el paso del ASS presenta dos áreas: un segmento sin resina ubicado a la entrada del flujo y una segunda área donde se encuentra la resina concentrada. Para estudiar el efecto que presenta el ASS sobre la contracción de la resina se realizaron tres series de inyecciones de ASS seguido de hierro 30 mg/L evaluándose concentraciones entre 2%(p/v) y 6%(p/v) de este reactivo.

Para obtener el porcentaje de contracción de la columna se comparó la longitud del segmento donde se encuentra concentrada la resina en relación al largo total de ésta.

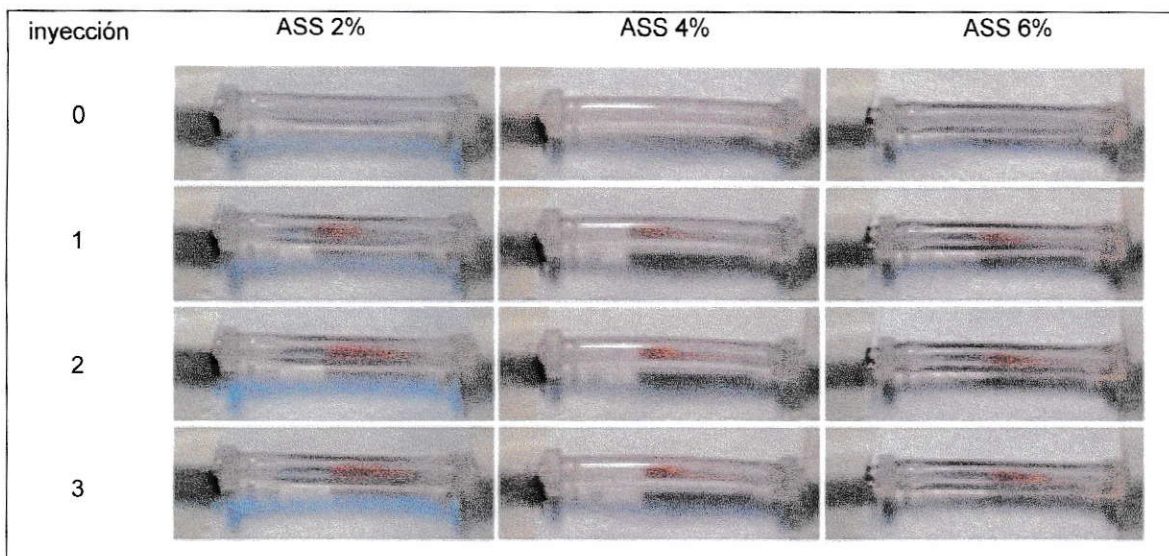


Figura 10: Efecto de la concentración del ASS y el número de inyecciones realizadas sobre la contracción de la columna. Las filas indican tres inyecciones sucesivas de ASS y Fe siendo 0 la condición inicial. En las columnas se presentan las tres concentraciones de ASS evaluadas (2%(p/v), 4%(p/v) y 6%(p/v)). Experimento representativo de tres mediciones independientes.

Se consideró la longitud de la resina para la inyección 0 como 100%. En la Figura 11 se observa que a medida que se inyecta la solución de ASS la columna se contrae. Este efecto se determinó para las 3 concentraciones de ASS siendo mayor la contracción de la columna en el caso de inyección de ASS 6%(p/v).

Con este resultado se realizó un gráfico que muestra el porcentaje de contracción de la resina luego de las inyecciones de ASS en cada caso.

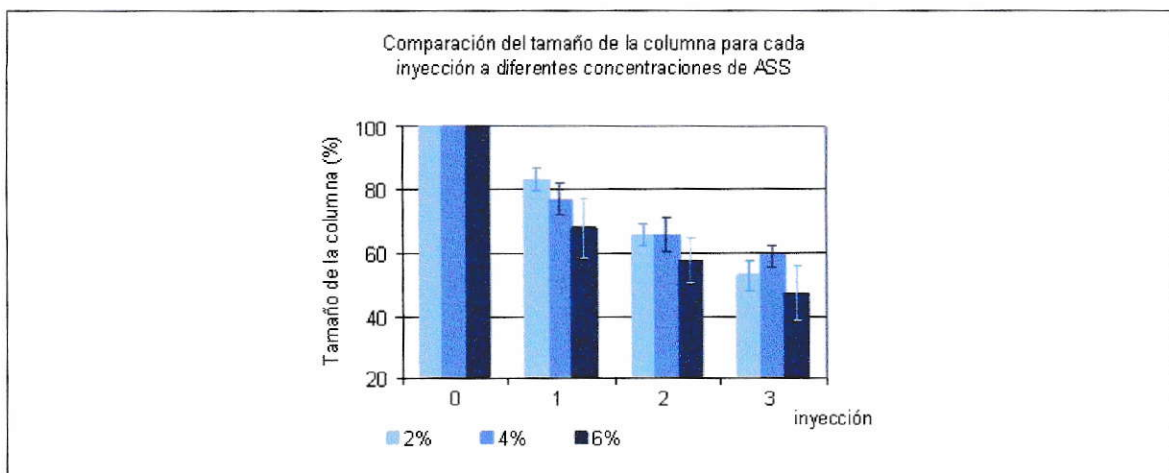


Figura 11: Comparación de la longitud de la resina para 3 inyecciones sucesivas de ASS a concentraciones de 2%(p/v), 4%(p/v) y 6%(p/v). Se grafican tres secuencias de inyecciones de 100  $\mu$ L de ASS seguidas de 100  $\mu$ L de Fe(III) 30 mg/L representadas en el eje de las abscisas. Se realizaron 3 mediciones independientes y se grafica la desviación estándar.

De la figura 11 se obtuvo que luego de la primera inyección de ASS, para las 3 concentraciones estudiadas, se observa una contracción de la columna estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ). Al comparar las inyecciones sucesivas de ASS para cada una de las concentraciones usadas, se obtuvo que existe una diferencia significativa entre la primera inyección y la tercera inyección ( $p < 0,001$ ). Sin embargo, no se observan diferencias significativas al comparar entre cada una de las concentraciones usadas, lo que indicaría que la contracción de la columna depende del número de veces que es inyectado el ASS y no de la concentración de éste.

Como la capacidad de carga es prácticamente la misma a partir de 1,2%(p/v) de ASS (Puig, E. y col. 2007.) y la contracción de la columna no depende de la concentración, se decide trabajar a 1,2%(p/v) de ASS para aplicar la menor cantidad de reactivo y disminuir así los costos.



### 3.7 Evaluación de la formación de los complejos y la capacidad de retención de la resina dependiendo del pH.

Se realizó un estudio acabado de la formación de los complejos para cada uno de los estados de oxidación del Fe, estudiando la retención del complejo en la resina a diferentes pH. Para esto se realizaron 12 soluciones a diferentes pH que contienen ASS y Fe(III), y se les agregó resina (Figura 12a). Luego se empaquetaron diferentes columnas con la resina de cada uno de los vasos (Figura 12b).

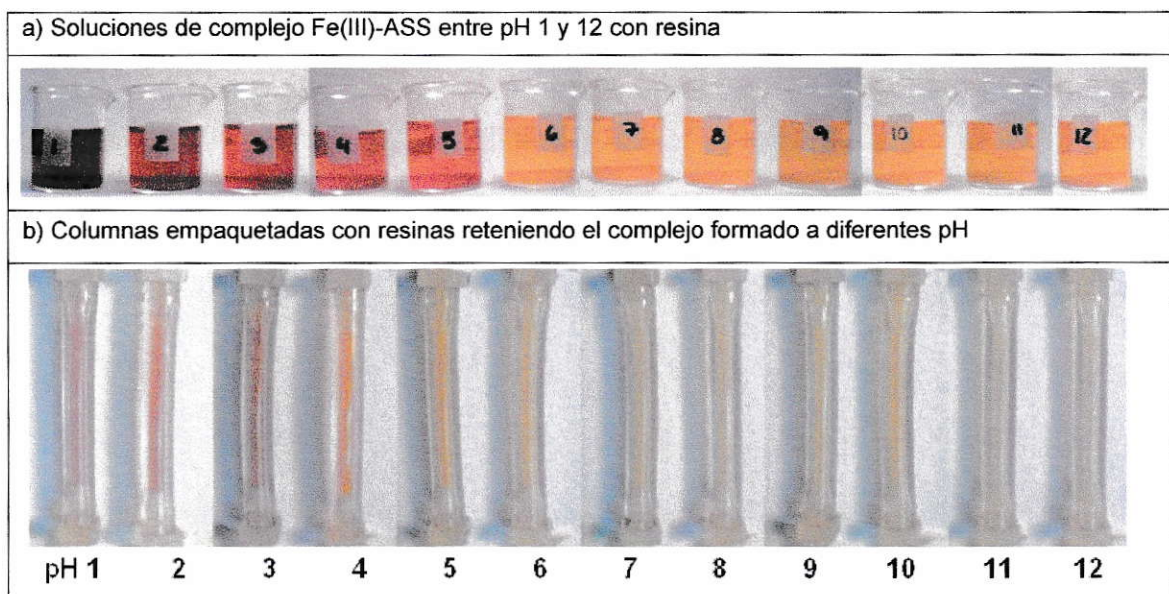


Figura 12: Estudio de pH para complejo ASS-Fe(III) retenido en resina DEAE Shephadex A-25. Presenta el estudio de pH realizado para ASS-Fe(III) mostrando a) las soluciones obtenidas entre pH 1 y 12 y b) la coloración de las columnas empaquetadas con cada una de las resinas. Experimento representativo de dos repeticiones independientes.

En la Figura 12 se pueden diferenciar claramente dos complejos diferentes uno a pH menor que 3 y un segundo complejo a pH superiores a 6 para las soluciones. Sin

embargo, luego de empaquetar las resinas en la columna es posible observar buena retención del complejo ácido entre pH 2 y 3 y para el complejo básico entre pH 7 y 10.

Para realizar el estudio de pH para Fe(II) (Figura 13) fue necesario agregar hidroxilamina para evitar la oxidación del hierro y así asegurar la presencia de Fe(II). Para esto se prepararon 12 soluciones que contienen hidroxilamina como agente reductor, ASS, Fe(II) y se agregó resina (Figura 13a) con las que se empaquetaron las diferentes columnas (Figura 13b).

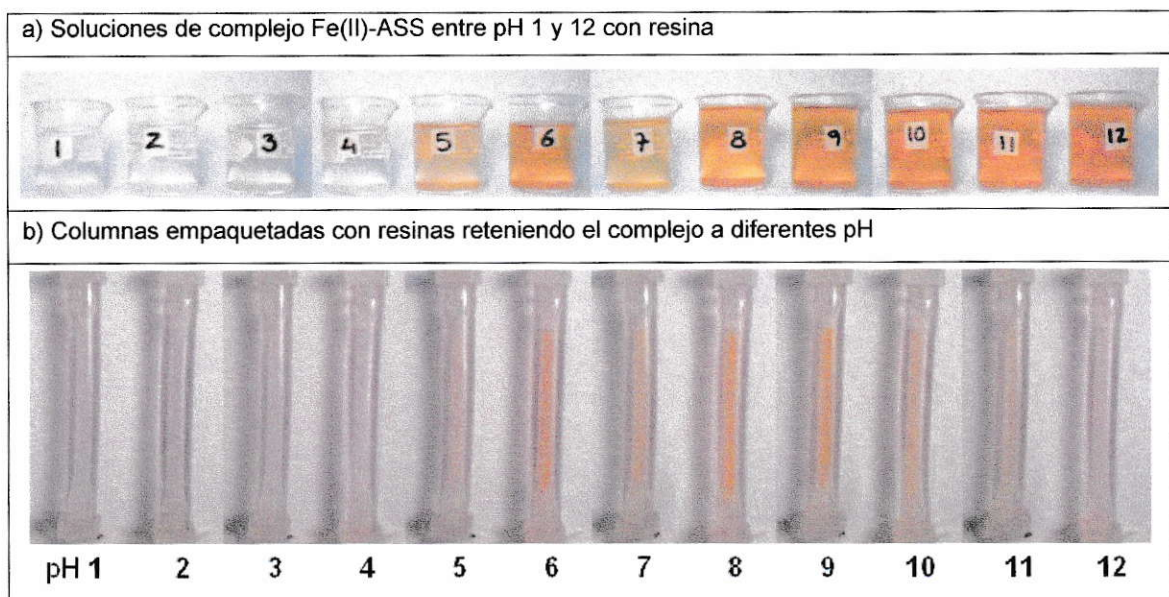


Figura 13: Estudio de pH para complejo ASS-Fe(II) retenido en resina DEAE Shephadex A'25. Presenta el estudio de pH realizado para ASS-Fe(II) mostrando a) las soluciones obtenidas entre pH 1 y 12 y b) la coloración de las columnas empaquetadas con cada una de las resinas. Experimento representativo de dos repeticiones independientes.

En las soluciones es posible distinguir un complejo coloreado a pH superiores a 5, mientras que en las resinas es posible observar buena retención del complejo entre pH 8 y 10 solamente.

Para determinar cada uno de los complejos formados entre Fe y ASS debe realizarse la determinación a un pH óptimo. Para Fe(III) debe corresponder a un pH ácido entre 2 y 3 ya que Fe(II) no presenta complejo coloreado en estas condiciones, decidiendo trabajar a pH 3 debido a que a pH menores la muestra es eluida parcialmente. Por otra parte, la determinación de  $Fe_{total}$  se debe efectuar en medio básico entre pH 8 y 10, decidiendo trabajar a pH 8 ya que el sensor será usado alternativamente para ambos complejos buscando así las menor diferencia de pH entre ambos complejos.

### 3.8 Optimización y elección de la configuración del sistema de determinación

Es importante tener en cuenta que existe más de una forma de ingresar los reactivos al sistema. En este trabajo se utilizó dos: la primera es por medio de una unión en Y y la segunda es por medio de una válvula de inyección. Ambas formas presentan condiciones de mezcla completamente diferente (Figura 14) utilizándose en distintas situaciones.

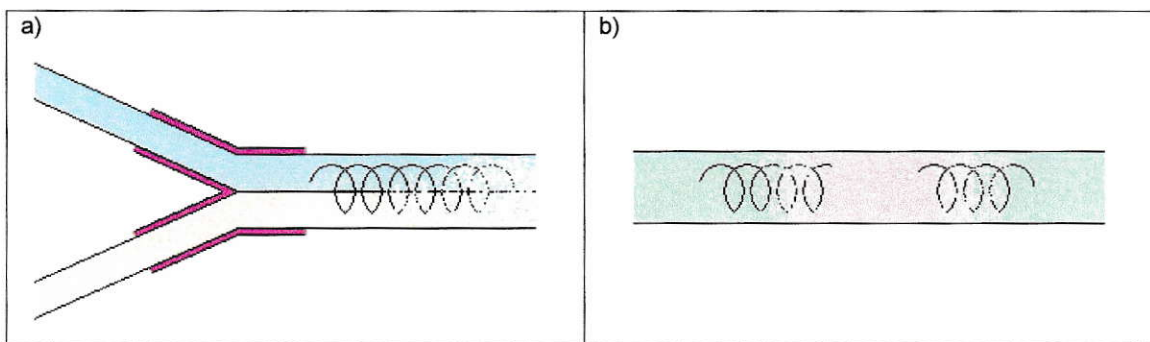


Figura 14: Condiciones de mezcla para diferentes componentes del sistema en estudio. a) Unión en Y: permite una mezcla completa de las soluciones debido al flujo turbulento que se genera por la unión confrontacional, presentando una dilución de los compuestos. b) Válvula de inyección: genera un tren de muestra de volumen definido por el loop utilizado para inyectarla, donde las soluciones se mezclan sólo en los extremos, teniendo que ponerse reactores si se desea la mezcla de los componentes.

La función del eluyente es liberar completamente el metal retenido en la resina y toda la muestra que pueda quedar en el sistema con el menor volumen posible para evitar así contaminación entre una muestra y otra. Para maximizar la eficiencia de este fluido, debe avanzar sin mezclarse ni diluirse con otras soluciones. Para esto se

optimiza el ingreso del eluyente por medio de una válvula de inyección con loop corto, el que permitirá el ingreso de un volumen determinado y en forma de tren de muestra.

Para tener en un corto periodo de tiempo una adecuada limpieza de la columna, lo ideal es que el eluyente llegue lo más concentrado posible sin diluirse ni mezclarse con otros compuestos que puedan variar sus cualidades. Bajo esta expectativa, es que se decide usar reactores lo más corto posibles entre la válvula de inyección del eluyente y la columna, obteniéndose un mínimo óptimo de 20 cm.

De la evaluación del largo del loop de la válvula de inyección, se obtiene que 10 cm de longitud que corresponde a 100  $\mu$ L es suficiente para una liberación completa del analito retenido en la columna al trabajar con concentraciones de muestra hasta 10 mg/L. Esto ocurre en un periodo de tiempo de hasta 8 segundos dependiendo de la concentración de la muestra a eliminar.

Como se requiere que el hierro de la muestra se ligue al ASS a un pH establecido para generar el complejo que se desea determinar, se utiliza una solución medio de HCl a pH 3 para determinar Fe(III) y de  $\text{NH}_3$  a pH 8 para la cuantificación de  $\text{Fe}_{\text{total}}$ . Esta solución medio se hace ingresar al sistema por una unión en Y con la muestra las cuales se mezclan para otorgar las condiciones de pH necesarias. Esta mezcla es rápida debido al flujo turbulento, por lo que los reactores usados antes del ingreso a la válvula de inyección deben ser lo más corto posibles, obteniéndose un mínimo óptimo de 10 cm.

Luego de las pruebas de longitud del loop de la válvula de inyección de muestra, se encuentra que, se requiere un volumen equivalente a un loop de 6 metros de longitud que corresponde aproximadamente a 5 minutos de paso de muestra para tener señal. Esto hace que el método sea lento e ineficiente. Debido a lo anterior, se cambia a trabajo en continuo, donde la muestra ingresa constantemente y el eluyente es inyectado a tiempos definidos para que las mediciones sean a volumen constante.

Se realizaron pruebas utilizando diferentes columnas, tanto en materiales como en longitud de paso óptico o largo de ésta, encontrándose que la columna de vidrio de 2 cm de longitud y paso óptico de 1,5 mm es lo más adecuado para realizar las mediciones, ya que contiene una cantidad reducida de resina con lo cual se disminuye la contracción, es económico y el material no absorbe en las longitudes de medición seleccionadas.

Se evaluó además el caudal desde 0,2 mL/min hasta 2,6 mL/min, encontrándose que a menor flujo hay menor contracción de la resina y mayor tiempo de contacto entre el medio, Fe y ASS, aunque esto conlleva a una disminución en la frecuencia de muestreo.

Luego de unir todas las observaciones anteriores es posible postular como configuración óptima la mostrada en la Figura 15 donde entran en continuo tanto la solución Medio como la muestra que se mezclan por medio de una unión en Y antes de la válvula de inyección del eluyente. Todo pasa por la columna que se encuentra ubicada en forma vertical frente al detector del espectrofotómetro donde es retenido el analito y posteriormente eluido y desechado.

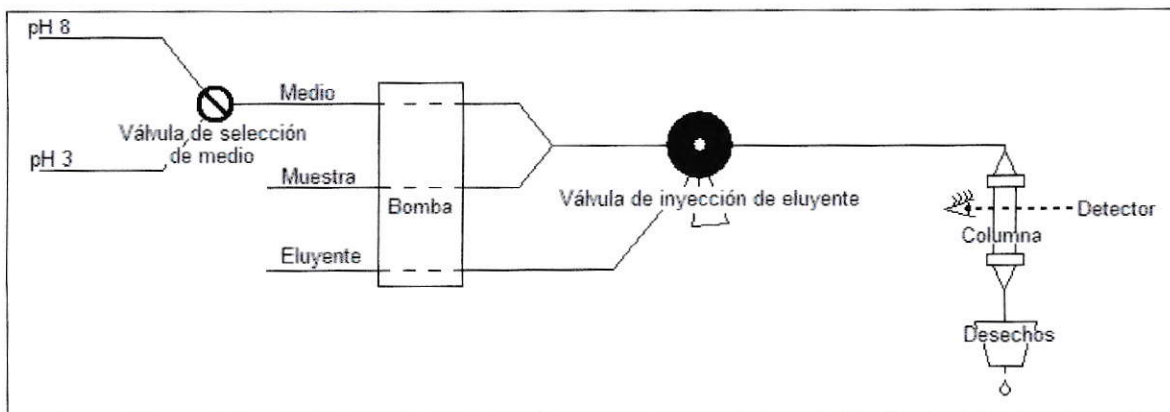


Figura 15: Configuración del sistema en continuo. Compuesta por una bomba peristáltica que genera el flujo necesario para transportar el Medio, Muestra y Eluyente a través de conductos hacia la columna. Consta de una unión en Y donde la muestra obtendrá el pH necesario para generar el complejo que se desea determinar y una válvula de inyección por la cual ingresa el eluyente. La columna, lugar donde se formará el sensor, se ubica frente al detector. La muestra posterior a la elución es desechada.

El sensor utilizado en este trabajo está compuesto por ASS y una resina aniónica (DEAE Sephadex A-25), la cual es un polisacárido de dextrán funcionalizando con 2(dietilamino)etil que retiene el ASS aplicado en la inyección del eluyente. Posteriormente, cuando la muestra ingresa a la columna los analitos son captados por el ASS generando la coloración en la superficie sensible del sensor.

Durante un ciclo de trabajo, es decir, retención del analito e inyección del eluyente para liberar el metal retenido, el sensor presenta diferentes estados (Figura 16) siendo la contracción de la resina la mayor dificultad encontrada. Para obtener una buena medición, el haz debe ser enfocado en la parte superior de la resina, lugar donde se forma complejo en dirección descendente. Sin embargo, como la resina

presenta contracción, la señal obtenida presenta una aguda caída debido a la alta incidencia de luz en el detector.

Para solucionar este problema, se decide ubicar algodón en la entrada del flujo, el cual no reacciona con ninguno de los compuestos y mejora de gran manera las señales obtenidas al moverse junto con la resina, disminuyendo el ruido y aumentando la sensibilidad.

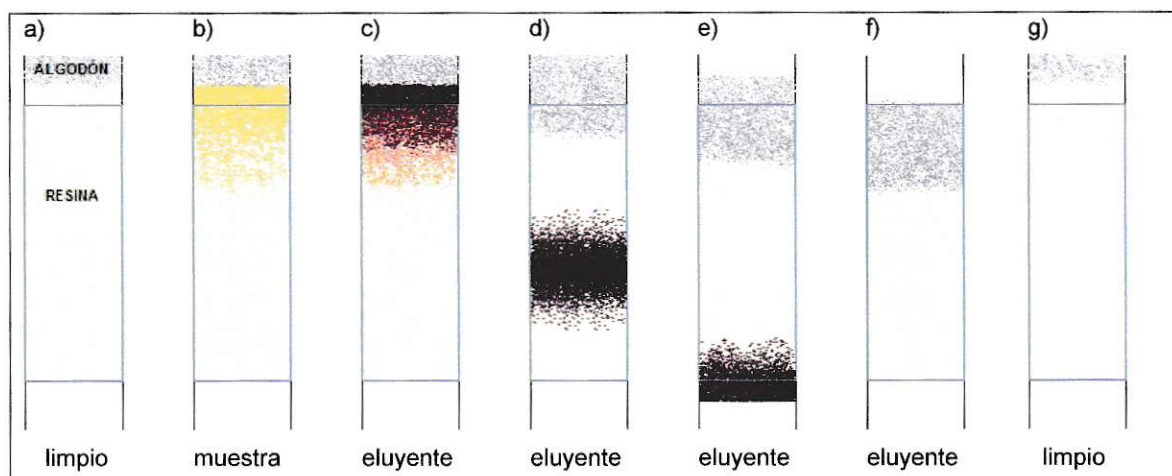


Figura 16: Diagrama del comportamiento del sensor durante un ciclo de trabajo de Fe(III) en medio básico (retención de muestra y limpieza de la columna). a) Sensor listo para una inyección donde se observa la resina de color crema, el algodón de color gris y el área de incidencia del haz de luz delimitado en azul. b) Retención del complejo básico (amarillo) en el sensor. c) Inyección del eluyente el cual cambia a pH ácido distinguiéndose el complejo coloreado (morado). d) Limpieza de la columna por medio de avance de la muestra. Se produce también contracción en la resina (área blanca). e) Fin limpieza de la resina. f) Columna limpia y estado de mayor contracción de la resina g) Descontracción de la resina quedando la columna lista para una nueva inyección.



Se realizan diversas secuencias de inyección, siendo la más adecuada, la aplicación del eluyente cada 700 segundos, con lo que se generan señales claramente diferenciables entre sí.

Luego del estudio acabado de variables y parámetros realizado anteriormente, se resume en la Tabla 10 la configuración optimizada del sistema para la determinación de Fe(II), Fe(III) t Fe<sub>total</sub>.

Tabla 10 : Configuración del sistema optimizado.

Variable	Resultado
Forma de trabajo	– inyección secuencial (Eluyente, Muestra)
Solución medio	– determinación Fe(III): HCl pH 3 – determinación Fe <sub>total</sub> : NH3 pH 8
Ingreso de muestra	– continuo
Generación del medio	– por medio de unión en Y
Caudal	– 0,2 mL/min
Reactores	– cortos en todas las uniones para evitar la mezcla y dilución de los fluidos (menor a 25 cm)
Ingreso de eluyente	– válvula de inyección – loop de 100 µL (10cm)
Columna	– Vidrio – 2 cm de longitud – 1,5 paso óptico – algodón en la entrada del flujo
Resina	– DEAE Shephadex A-25
Eluyente	– HCl 1M + ASS 1,2 %(p/v)
Ciclo de trabajo	– inyección de eluyente cada 700 segundos
LC	– 88,3 µg/L
LD	– 26,5 µg/L
Frecuencia de muestreo	– 5 h <sup>-1</sup>

### 3.9 Evaluación de la posibilidad de determinación simultánea.

Debido a la capacidad del eluyente de cambiar de complejo sólo con la variación del pH (Tabla 2), se evaluó la posibilidad de pasar de un complejo a otro cambiando la solución medio en la cual ocurre la reacción, pudiendo determinar tanto  $Fe_{total}$  como Fe(III) sin necesidad de eluir de la columna el metal retenido ni inyectar muestra nuevamente.

Para esto se le inyectó 100  $\mu$ L de Fe(III) 30 mg/L a una columna cargada con ASS utilizando como solución medio HCl pH 3. Una vez formado el complejo en la resina se cambió el carrier a  $NH_3$  pH 8 verificando el cambio de coloración en la columna atribuible al cambio de complejo. Posteriormente se alterna entre  $NH_3$  y HCl nuevamente para comprobar la reversibilidad del sistema. El mismo procedimiento fue realizado con HCl pH 3 y tampón bórico/borato 0,5 M pH 8, con lo que también se obtiene el cambio del complejo ácido al complejo básico sin eluir la muestra. Sin embargo, no se logra pasar del complejo básico al ácido nuevamente en las condiciones realizadas desistiendo así del trabajo utilizando tampón.

Del estudio se encuentra que es posible la determinación simultánea, pero se debe comenzar con la determinación de  $Fe_{total}$ , debido a que el Fe(II) no se retiene en medio ácido y que la resina aumenta su efecto de contracción al someterla a grandes variaciones de pH. Por lo tanto, hacer un aumento gradual de la acidez favorecería a minimizar este efecto.

### 3.10 Verificación de la determinación especiada.

Para verificar si el método estudiado es capaz de determinar cada uno de los estados de oxidación del hierro de manera independiente, se comparó la señal obtenida en cada uno de los medios para soluciones de igual concentración de Fe(II), de Fe(III) y una mezcla de ambos estados de oxidación. La figura 17 muestra los resultados obtenidos.

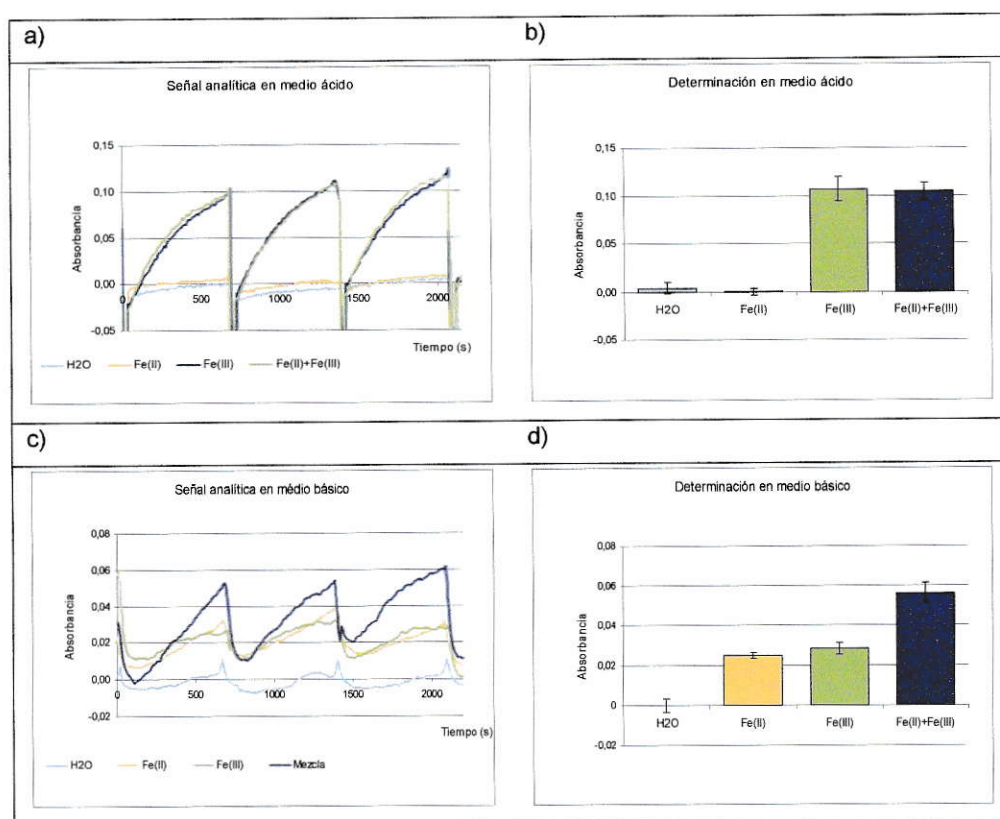


Figura 17: Verificación de la determinación especiada. a) Señal obtenida para tres inyecciones de Fe(II), Fe(III), Fe(II)+Fe(III) y H<sub>2</sub>O en medio ácido b) Absorbancia para cada una de las soluciones estudiadas en medio ácido. c) Señal obtenida para tres inyecciones de Fe(II), Fe(III), Fe(II)+Fe(III) y H<sub>2</sub>O en medio básico. d) Absorbancia para cada una de las soluciones estudiadas en medio básico. Las barras indican la desviación estándar.

Si el método realmente es capaz de especiar en medio ácido debe aparecer la señal de la solución de Fe(III) y la mezcla con igual intensidad y diferentes del blanco. En medio básico en cambio, deben observarse tres señales diferentes del blanco, donde Fe(II) y Fe(III) presenten igual señal y la mezcla presenta una señal mayor ya que determina el  $Fe_{total}$  presente.

Es posible afirmar que el método es capaz de determinar de forma especiada ambos estados de oxidación, ya que al realizar la determinación en medio ácido, las señales obtenidas entre Fe(III) y la mezcla de ambos estados de oxidación (Fe(II)+Fe(III)) no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ), indicando que sólo se está determinando el Fe(III) presente en ambas muestras. De forma similar, el análisis estadístico presentó un  $p>0,05$  para Fe(II) y  $H_2O$  afirmando que Fe(II) no es determinado en este medio.

Por otra parte, al realizar el análisis estadístico para la determinación en medio básico, se obtiene que sólo Fe(II) y Fe(III) presentan un  $p>0,05$  indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas. Los valores de absorbancia obtenidos tanto para Fe(II) como Fe(III) son claramente diferentes de la mezcla ( $p<0,001$ ) que presenta una absorbancia mayor. Se encuentra además que la suma de las absorbancias de ambos estados de oxidación presentan un  $p>0,05$  con respecto a la mezcla, indicando que la mezcla presenta una señal compuesta por la contribución de cada uno de las especies de hierro verificando con esto la capacidad de especiar del método y a su vez la determinación de  $Fe_{total}$ .

### 3.11 Evaluación de los parámetros analíticos

#### Curvas de calibración

Con un stock de soluciones entre 0 y 2000 µg/L de Fe(III) se obtuvo las curvas de calibración tanto en medio ácido como en medio básico, las que se presentan en la figura 18

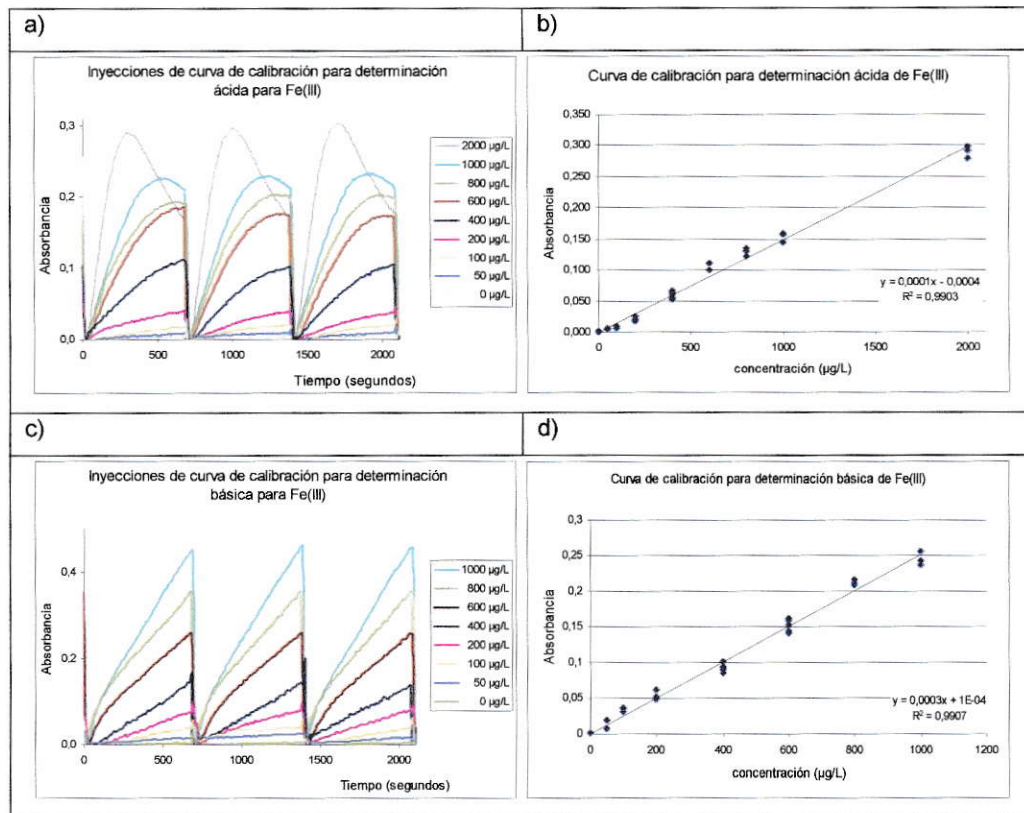


Figura 18: Curvas de calibración para Fe(III). a) Señales obtenidas en medio ácido para concentraciones de Fe(III) entre 0 y 2000 µg/L. b) Curva de calibración en medio ácido c) Señales obtenidas en medio básico para concentraciones de Fe(III) entre 0 y 2000 µg/L. d) Curvas de calibración en medio básico. Se muestra la ecuación de la regresión lineal de los puntos y el valor de  $R^2$ .

Ecuación de la recta en medio ácido

$$\text{Abs} = 0,0001 * \text{Concentración } (\mu\text{g/L}) - 0,0004$$

$$R^2 = 0,9903$$

Ecuación de la recta en medio básico

$$\text{Abs} = 0,0003 * \text{Concentración } (\mu\text{g/L}) + 0,0001$$

$$R^2 = 0,9907$$

Frecuencia de muestreo

Se realiza una inyección de eluyente cada 700 segundos, lo que genera una frecuencia de muestreo de 5 determinaciones en una hora. Es posible aumentar la frecuencia de muestreo al disminuir el tiempo de carga, aunque se tiene como consecuencia una disminución de la sensibilidad del método.

Límite de determinación (LD) y cuantificación (LC)

$$\text{LD} = 3\sigma / m$$

$$\text{LC} = 10\sigma / m$$

Desviación estándar del blanco =  $\sigma$

Pendiente de la curva de calibración =  $m$

*Determinación de Fe(III)*

$$\sigma = 0,00088 \text{ Abs}$$

$$m = 0,0001 \text{ Abs L /}\mu\text{g}$$

$$LD = 3 * 0,00088 \text{ Abs} / 0,0001 \text{ Abs L /}\mu\text{g}$$

$$LD = 26,5 \mu\text{g/L}$$

$$LC = 10 * 0,00088 \text{ Abs} / 0,0001 \text{ Abs L /}\mu\text{g}$$

$$LC = 88,3 \mu\text{g/L}$$

*Determinación de Fe<sub>total</sub>*

$$\sigma = 0,00265 \text{ Abs}$$

$$m = 0,0003 \text{ Abs L /}\mu\text{g}$$

$$LD = 3 * 0,00265 \text{ Abs} / 0,0003 \text{ Abs L /}\mu\text{g}$$

$$LD = 26,5 \mu\text{g/L}$$

$$LC = 10 * 0,00265 \text{ Abs} / 0,0003 \text{ Abs L /}\mu\text{g}$$

$$LC = 88,2 \mu\text{g/L}$$

## Rango de trabajo

El método presenta un rango de trabajo entre el límite de cuantificación y la pérdida de linealidad. La determinación de Fe(III) presenta un rango de trabajo entre 88,3 µg/L y 6000 µg/L y la determinación de Fe<sub>total</sub> entre 88,2 µg/L y 4000 µg/L.

## Principales interferentes

Se verificaron los principales interferentes (Cu(II), Ni(II) y Zn(II)) en razones 1:1 realizándose una mezcla de Fe(III) 300 µg/L y 300 µg/L del interferente, las cuales fueron comparadas con la señal obtenida por una solución control de Fe(III) 300 µg/L (Figura 19). Se comprobó que ninguno de los analitos estudiados presenta variación significativa en la señal ( $p > 0,05$ ).

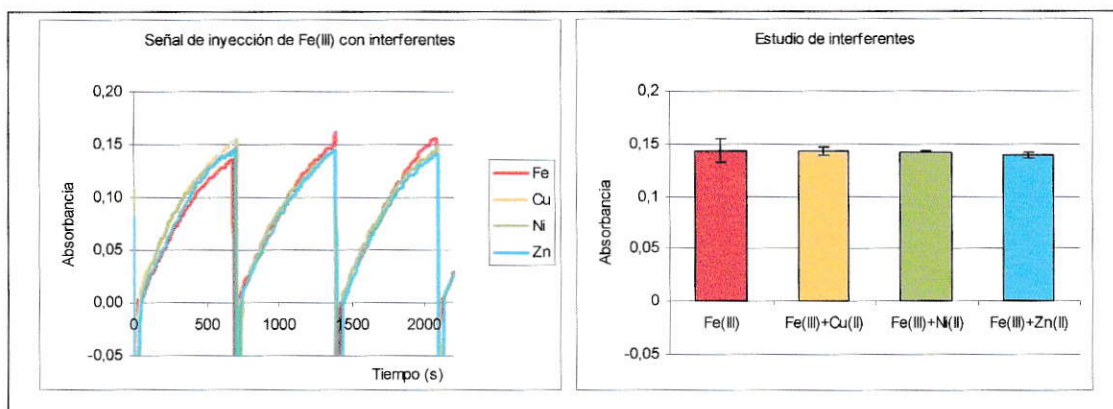


Figura 19: Estudio de interferentes en medio ácido. a) Señal obtenida en el espectrofotómetro de la inyección de Fe(III) con diferentes interferentes (Cu(II), Ni(II) y Zn(II)). b) Comparación del valor de absorbancia obtenido para cada una de las muestras estudiadas. Las barras corresponden a la desviación estándar.



Esta misma prueba fue realizada en medio básico para  $Fe_{total}$ , obteniéndose resultados similares (dato no mostrado). Los datos tanto de la determinación de Fe(III) como de  $Fe_{total}$  fueron analizados presentando  $p > 0,05$  lo cual indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos.

Se evaluó también la posible interferencia producida por el anión  $NO_3^{-2}$  presente en muchas matrices, encontrándose que éste no presenta variación significativa en la señal analítica (dato no mostrado).

### 3.12 Estudio con muestras reales de residuos de procesos mineros.

El método fue aplicado en muestras reales utilizando un rril de un proceso minero, el cual ha sido analizado por diferentes técnicas. Se tomó una alícuota de del desecho minero la cual fue sometida al protocolo usado para todos los puntos de la curva de calibración, obteniendo los resultados de la Tabla 11.

Tabla 11: Señales obtenidas por medio del método estudiado

Determinación	Ecuación de la recta	Señal muestra (Abs)
Fe <sub>total</sub>	$y = 0,0003x + 0,0001$	0,0523
Fe(III)	$y = 0,0001x + 0,0004$	0,1634

La señal obtenida se interpoló entre los puntos de la curva de calibración utilizando la ecuación de la recta, con lo que se obtuvo las concentraciones presentadas en la Tabla 12. Estos valores fueron comparados con los obtenidos para la misma muestra por el método FIA para líquidos (Puig E. 2007).

Tabla 12: Comparación de concentraciones entre el método utilizando el sensor y el mismo método en líquidos.

Especie determinada	Sensor resina-ASS	Método en líquidos
Fe <sub>total</sub>	4,4 mg/L	4,2 mg/L
Fe(III)	4,2 mg/L	3,9 mg/L
Fe(II)	0,2 mg/L	0,3 mg/L

De acuerdo a los datos de la Tabla 12 se encuentran valores similares entre ambos métodos, validándose con esto la aplicabilidad, factibilidad y capacidad de determinación del método.

### **3.13 Aplicación y funcionalidad del método como herramienta de protección al medio ambiente.**

Es posible utilizar el método en el área de protección ambiental ya que el sensor es capaz de distinguir los cambios en la concentración de la muestra que ingresa. En un periodo de 24 horas se pueden realizar 120 mediciones, cantidad muy superior a lo establecido para monitoreo normalmente. Es importante considerar que como método de análisis de rutina, es ineficiente ya que en estas mediciones se busca un sistema con una alta frecuencia de muestreo. Sin embargo, posiblemente modificando algunas variables de trabajo como el tipo de resina utilizada, la forma de la columna o un sistema de detección diferente, podría mejorarse de gran manera la frecuencia de muestreo para lograr su aplicación en análisis rutinarios. Por lo tanto, abre una gran área de investigación para lograr su aplicación, además del área medio ambiental, un uso en laboratorio.

#### IV CONCLUSIONES

Se comprobó que es posible automatizar el método de determinación de Fe(II), Fe(III) y Fe<sub>total</sub> utilizando un sensor resina – (ASS) ya que el sistema es reversible lo que permite la reutilización del sensor.

La mejor forma de trabajo para el sensor estudiado es por medio de una inyección secuencial de ASS y muestra para formar el complejo de forma cuantitativa, más aún si se hace al pH óptimo encontrado.

Es posible utilizar HCl como eluyente, sin embargo este aumenta su capacidad de elución al encontrarse mezclado con ASS, pudiendo con esto cargar la resina y eluir en un sólo paso.

Trabajar con muestra en continuo, hace más eficiente y sensible la determinación, más aun si se trabaja con reactores cortos, caudal lento y columna de vidrio.

El método presenta un rango de trabajo desde 100 µg/L hasta al menos 4000 µg/L tanto para la determinación de Fe<sub>total</sub> como Fe(III), sin presentar interferencia producto de otros iones en razón 1:1 y con una frecuencia de muestreo de 5 determinaciones por hora.

El sensor estudiado puede ser utilizado en muestras reales ya que se encuentran resultados similares a los obtenidos por medio de otras técnicas sirviendo como una herramienta de protección al medio ambiente.

## V BIBLIOGRAFÍA

- Abbaspour, A. Kamyabi, M. A. Khalafi-Nezhad, A. y Soltani, M. N. 2003. Acidity Constants and Thermodynamic Parameters of Some Phenol Derivatives in Methanol + Water Systems Using Potentiometry and Spectrophotometry Methods. *J. Chem. Eng.* 48: 911-915.
- Abbaspour, A. Kamyabi, M. A. Khalafi-Nezhad, A. y Soltani, M. N. 2004. Charge-Transfer Complexometric Study of Ferric Ion with 4-Chloro-2,6-bis(hydroxymethyl)phenol in a Methanol-Water System Using Spectrophotometric and Potentiometric Methods. *J. Chem. Eng.* 49: 907-911.
- APHA, 1998. Standar methods for the examination of water and wastewaters.
- Bubnis, B.P. Straka, M.R. y Pacey, G.E. 1983. Metal speciation by flow-injection analysis. *Talanta* 30: 841–844.
- Burguera, J. L. y Burguera, M. 1984. Flow injection spectrophotometry followed by atomic Absorption spectrometry for the determination of iron(II) and total iron. *Analytica Chimica Acta.* 161: 375-379.
- Camel, V. 2003. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta part B.* 58: 1177-1233.
- Fonseca, O. 2003. Memoria de Doctorado. Desarrollo de un analizador automático para la determinación del ión plomo en muestras medio ambientales. Universitat Autònoma de Barcelona
- Fundación General de la UAM. 90 días de I+D+i. Boletín oficial de CDT de la FGUAM. 1º Edición. 2003. Ciudad universitaria de Cantoblanco. Pabellón C 2º planta. Madrid
- Guo, Y. Din, B. Liu, Y. Chang, X. Meng, S. y Liu, J. 2004. Preconcentration and determination of trace elements with 2-aminoacetylthiophenol functionalized Amberlite XAD-2 by inductively coupled plasma–atomic emission spectrometry. *Talanta.* 62: 207-213.

- Karamanev, D.G. Nikolov, L. N. y Mamatarkova, V. 2002. Rapid simultaneous quantitative determination of ferric and ferrous ions in drainage waters and similar solutions. *Miner. Eng.* 15: 341–346.
- Kuroda, R. Nara, T. y Oguma, K. 1988. Simultaneous determination of iron(III) and total iron by flow injection analysis using kinetic spectrophotometry with tiron. *Analyst* 113: 1557.
- Luque De Castro, M. D. 1986. Speciation studies by flow-injection analysis. *Talanta*. 33: 45-50
- Martin, J.H. y Fritzwater, S.E. 1988. *Nature*. 331: 342
- Muller, H. Muller, V. y Hansen, E.H. 1990. Simultaneous differential rate determination of iron(II) and iron(III) by flow-injection analysis. *Anal. Chim. Acta* 230: 113–123.
- Obata, H. Karatani, H. Matsui, M. y Nakayama, E. 1997. Fundamental studies for chemical speciation of iron in seawater with an improved analytical method. *Mar Chem.* 56: 97-106.
- Öztürk, M. Bizsel, N. y Steinnes, E. 2003. Iron speciation in eutrophic and oligotrophic Mediterranean coastal waters; impact of phytoplankton and protozoan blooms on iron distribution. *Mar Chem.* 81: 19-36.
- Paipa, C. Mateo, M. Godoy, I. Poblete, E. Toral, M.I. y Vargas, T. 2005. Comparative study of alternative methods for the simultaneous determination of Fe<sup>+3</sup> and Fe<sup>+2</sup> in leaching solution and acid mine drainages. *Miner. Eng.* 18: 1116-1119.
- Paipa, C. Poblete, E. y Toral., M. I. 2006. Simultaneous determination of iron and copper in pregnant liquid solutions. *Miner. Eng.* 19: 1465-1468.
- Pehkonen, S. 1995. Determination of the oxidation states of iron in natural waters. A review, *Analyst*. 120: 2655 – 2663.
- Peiteado, E. Piñeiro, R. Martínez, A. 2002. Distribución de algunos elementos mayores (K, Ca, Ti, Fe) y traza (Ga, Rb, Sr, Y, Zr, Br) en dos suelos policíclicos podsólicos. *Edafología*. 9: 61-84,

- Pons, C. Forteza, R. y Cerdà, V. 2005. Optical fibre reflectance sensor for the determination and speciation analysis of iron in fresh and seawater samples coupled to a multisyringe flow injection system. *Anal. Chim. Acta.* 528: 197-203.
- Pozdnyakov, I., Plyusnin, V. Grivin, V. Vorobyev, D. Bazhin, N. y Vauthey, E. 2006. Photolysis of sulfosalicylic acid in aqueous solutions over a wide pH range. *Photochemistry and Photobiology A. Chemistry.* 181: 37-43.
- Pozdnyakov, I. Plyusnin, V. Tkachenko, N. y Lemmetyinen, H. 2007. Photophysics of Fe(III)–sulfosalicylic acid complexes in aqueous solutions. *Chem. Phys.* 445: 203-207.
- Puig, E. y Toral, M.I. 2007. Automatización en continuo y por FIA para la determinación de Fe(II), Fe(III) y Fe<sub>total</sub>. II congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica, Buenos Aires, Argentina.
- Safavi, A. y Abdollahi, H. 1999. Speciation of Fe(II) and Fe(III) with Chromogenic Mixed Reagents by Principal-Component Regression. *Microchemical Journal.* 63: 211-217.
- Safavi, A. y Abdollahi, H. 2001. Application of the H-point standard addition method to the speciation of Fe(II) and Fe(III) with chromogenic mixed reagents. *Talanta.* 54: 727-734.
- Sillen, L.G. y Martell, A.E. 1964. Stability constants of metal-ion complexes. *Chem Society.* 549.
- Skoog, D. A. Holler, F. J. y Nieman, T. A. 2001. Principios de Análisis Instrumental. McGraw-Hill. Quinta Edición. Capítulo 33, Pp 897 – 918.
- Smith, G. Wermuth, U. Young, D. White, J. 2007. Polymeric structures in the metal complexes of 5-sulfosalicylic acid: Therybidium(I), caesium(I) and lead(II) analogues. *Polyhedron* 26: 3645–3652
- Toral, M.I. Ubilla, J. Orellana, R. y Richter, P. 2007. XXVII Jornadas Chilenas de Química. Estudios preliminares para la especiación en continuo de Fe utilizando un sensor de ASS-DEAE sephadex A-25. Laboratorio de Química Analítica. Facultad de ciencias. Universidad de Chile.