

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**



**FACULTADE DE QUÍMICA**

**Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía**

**SISTEMAS AUTOMÁTICOS DE FLUXO CONTINUO PARA A  
EXTRACCIÓN, PRECONCENTRACIÓN E DETECCIÓN DE METAIS  
TRAZA EN MOSTRAS SÓLIDAS POR ESPECTROMETRÍA DE  
ABSORCIÓN ATÓMICA CON CHAMA**

**SHEILA CANCELA PÉREZ**

**Memoria para optar ó grao de Doutora en Química**

**Santiago de Compostela, Xaneiro de 2007.**







**Alberto Cepeda Sáez, Catedrático de Universidade e Director do Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía da Universidade de Santiago de Compostela**

**INFORMA:**

Que a Licenciada Dna. **Sheila Cancela Pérez** realizou neste Departamento, baixo a dirección da Dra. M<sup>a</sup> del Carmen Yebra Biurrun, Profesora Titular de Universidade, o traballo titulado: “**Sistemas automáticos de fluxo continuo para a extracción, preconcentración e detección de metais traza en mostras sólidas por espectrometría de absorción atómica con chama**”, que presenta para optar ó grao de Doutora en Química.

E para que así conste, asino o presente informe en Santiago de Compostela, Xaneiro de 2007.

Alberto Cepeda Sáez



**M<sup>a</sup> del Carmen Yebra Biurrun, Profesora Titular de Universidade do Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía da Universidade de Santiago de Compostela**

**AUTORIZA:**

Á licenciada Dna. Sheila Cancela Pérez, a presentación da memoria do traballo titulado: **“Sistemas automáticos de fluxo continuo para a extracción, preconcentración e detección de metais traza en mostras sólidas por espectrometría de absorción atómica con chama”** que realizou baixo a súa dirección no Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía da Facultade de Química, para optar ó grao de Doutora en Química.

E para que así conste, asino o presente informe en Santiago de Compostela, Xaneiro de 2007.

A Directora

M<sup>a</sup> del Carmen Yebra Biurrun

A Doutoranda

Sheila Cancela Pérez



Quero dar as grazias:

- Á miña directora de Tese, a Dra. M<sup>a</sup> del Carmen Yebra Biurrun, por darme a oportunidade de realizar este traballo de investigación, por todo o que me ensinou durante estes anos e por axudarme nos bos e nos malos momentos.
- A Amada Moreno-Cid, por ser, ademais da miña mestra nos primeiros anos de laboratorio, unha boa amiga.
- A Beatriz Crujeiras, pola súa axuda e compañía.
- A Darío L. Guzmán e a Natalia, a miña segunda familia.
- A Charo e a Monchito, porque son parte da miña vida.
- A Iván, por guiarme nos meus comezos universitarios e por toda unha vida exercendo de irmán maior.
- A Ruth e a Miguel, por abrireme as portas da súa casa e facerme sentir coma na miña propia durante tantos anos. Por todos os bos momentos que compartimos. A Olalla, a miña favorita. Por facerme sempre compañía. Grazias ós tres; sodes magníficos.
- A Darío. Pola túa inagotable paciencia conmigo e por acompañarme durante todo este tempo. Porque estes dez anos contigo foron os mellores da miña vida e por todo o que aínda nos queda por vivir.
- E moi especialmente, a meus pais. Grazias por darme, ademais do voso constante apoio e amor, todo o necesario para que puidera facer o meu camiño. Sen vós non podería estar hoxe aquí.



*Á miña familia.*



# **ÍNDICE**



# ÍNDICE

## INTRODUCCIÓN

<b>1. OS METAIS .....</b>	<b>3</b>
1.1 Os metais no medio ambiente e nos alimentos .....	3
1.2 O papel dos metais nos humanos .....	4
1.3 Función e toxicidade do cadmio, chumbo, cobalto, cromo e níquel para o home .....	8
1.3.1 Cadmio .....	8
1.3.2 Chumbo .....	10
1.3.3 Cobalto .....	12
1.3.4 Cromo .....	13
1.3.4 Níquel .....	15
<b>2. PROCEDEMENTOS DE PRECONCENTRACIÓN .....</b>	<b>17</b>
Utilización de reactivos quelantes ou de cambio iónico .....	18
<b>3. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MOSTRAS SÓLIDAS .....</b>	<b>23</b>
3.1 Tratamento da mostra sólida empregando queamento convencional: dixestión húmida .....	25
3.2 Calcinação .....	26
3.2.1 Combustión nun forno a elevadas temperaturas.....	27
3.2.2 Combustión en presenza de osíxeno .....	28
3.2.3 Combustión con osíxeno activado por un campo de frecuencia magnética de alta frecuencia: plasma frio .....	29
3.3 Tratamento da mostra sólida empregando a enerxía de microondas .....	30

3.4	Tratamento da mostra sólida empregando a enerxía de ultrasóns .....	33
3.5	Tratamento da mostra sólida sen utilizar enerxía .....	36
3.5.1	Extracción con fluidos supercríticos .....	36
<b>4.</b>	<b>DETERMINACIÓN DE METAIS .....</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>INTRODUCCIÓN DIRECTA DA MOSTRA SÓLIDA NAS TÉCNICAS DE ABSORCIÓN ATÓMICA .....</b>	<b>42</b>
<b>6.</b>	<b>ANÁLISE POR INYECCIÓN EN FLUXO .....</b>	<b>44</b>
6.1	Compoñentes dun sistema FIA .....	45
6.2	Técnicas de separación e preconcentración en continuo ...	48
6.2.1	Técnicas de separación e preconcentración en continuo empregando resinas quelantes .....	50
6.2.2	Consideracións prácticas no deseño e operación dos sistemas FIA de preconcentración en columna ...	51
6.2.2.1	Tipos de columnas .....	51
6.2.2.2	Carga da columna .....	51
6.2.2.3	Elución .....	51
6.2.2.4	Materiais de empacquetamento .....	52
6.3	Métodos continuos de preparación de mostras sólidas .....	55
6.3.1	Tratamento da mostra en continuo empregando a enerxía de ultrasóns .....	55
6.4	Acoplamento FIA-AAS .....	60
<b>7.</b>	<b>TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN DO PROCESO ANALÍTICO: DISEÑOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>62</b>

7.1	Introducción .....	62
7.2	Métodos de optimización .....	62
7.3	Diseño factorial .....	63
7.3.1	Diseños factoriais de Screening, Diseños de Plackett-Burman .....	64

## **XUSTIFICACIÓN E OBXECTIVOS**

<b>XUSTIFICACIÓN E OBXECTIVOS .....</b>	<b>69</b>
---	-----------

## **PARTE EXPERIMENTAL**

<b>1. DESCRIPCIÓN DOS SISTEMAS DE FLUXO CONTINUO PARA OS PROCESOS DE PRECONCENTRACIÓN E EXTRACCIÓN DOS METAIS DAS MOSTRAS SÓLIDAS ASISTIDOS POR ENERXÍA DE ULTRASÓNS ....</b>	<b>75</b>
1.1 Instrumentación e reactivos .....	78
1.2 Preparación das mostrás .....	81
1.3 Procedemento .....	81
<b>2. OPTIMIZACIÓN DOS PARÁMETROS QUE AFECTAN Á PRECONCENTRACIÓN DOS METAIS NO SISTEMA FIA .....</b>	<b>87</b>
2.1 Preconcentración do cadmio .....	91
2.1.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial ....	94
2.1.2 Experimentos realizados fóra do marco do deseño ....	96
2.2 Preconcentración do chumbo .....	109
2.2.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial ....	113
2.2.2 Experimentos realizados fóra do marco do deseño ....	114
2.3 Preconcentración do cobalto .....	121
2.3.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial ....	125

2.3.2	Experimentos realizados fóra do marco do deseño ....	126
2.4	Preconcentración do cromo .....	134
2.4.1	Análise dos resultados obtidos co deseño factorial ....	138
2.4.2	Experimentos realizados fóra do marco do deseño ....	139
2.5	Preconcentración do níquel .....	147
2.5.1	Análise dos resultados obtidos co deseño factorial ....	151
2.5.2	Experimentos realizados fóra do marco do deseño ....	152
2.6	Obtención do pH óptimo en liña .....	160
<b>3.</b>	<b>OPTIMIZACIÓN DOS PARÁMETROS QUE AFECTAN Á EXTRACCIÓN</b>	
	<b>DOS METAIS DAS MOSTRAS SÓLIDAS NOS SISTEMAS FIA .....</b>	<b>162</b>
3.1	Extracción do cadmio .....	167
3.1.1	Análise dos resultados obtidos co deseño factorial ....	173
3.1.2	Experimentos realizados fóra do marco do deseño ....	176
3.1.3	Estudio da cantidade de mostra .....	198
3.1.4	Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra .....	198
3.2	Extracción do chumbo .....	200
3.2.1	Análise dos resultados obtidos co deseño factorial ....	206
3.2.2	Experimentos realizados fóra do marco do deseño ....	209
3.2.3	Estudio da cantidade de mostra .....	227
3.2.4	Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra .....	228
3.3	Extracción do cobalto .....	230
3.3.1	Análise dos resultados obtidos co deseño factorial ....	236
3.3.2	Experimentos realizados fóra do marco do deseño ....	239

---

3.3.3	Estudio da cantidade de mostra .....	255
3.3.4	Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra .....	255
3.4	Extracción do cromo .....	256
3.4.1	Análise dos resultados obtidos co deseño factorial ....	263
3.4.2	Experimentos realizados fóra do marco do deseño ....	266
3.4.3	Estudio da cantidade de mostra .....	282
3.4.4	Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra .....	282
3.5	Extracción do níquel .....	284
3.5.1	Análise dos resultados obtidos co deseño factorial ....	290
3.5.2	Experimentos realizados fóra do marco do deseño ....	293
3.5.3	Estudio da cantidade de mostra .....	310
3.5.4	Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra .....	311
<b>4.</b>	<b>OPTIMIZACIÓN DOUTROS PARÁMETROS DO SISTEMA FIA .....</b>	<b>313</b>
4.1	Lonxitude dos reactores de mestura .....	313
4.2	Caudal de aspiración do nebulizador do espectrofotómetro de absorción atómica .....	314
<b>5.</b>	<b>CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DAS METODOLOXÍAS PROPOSTAS PARA A DETERMINACIÓN DOS METAIS DAS MOSTRAS SÓLIDAS DE NATUREZA ALIMENTICIA .....</b>	<b>315</b>
5.1	Cadmio .....	315
5.1.1	Curvas de calibrado .....	315

5.1.2	Características analíticas das resinas de preconcentración .....	316
5.1.3	Características analíticas das metodoloxías propostas .....	317
5.1.4	Precisión .....	319
5.1.5	Exactitude .....	321
5.1.5.1	Recuperación das metodoloxías propostas .....	321
5.1.5.2	Análise de materiais de referencia .....	324
5.1.6	Frecuencia de mostraxe .....	326
5.2	Chumbo .....	327
5.2.1	Curvas de calibrado .....	327
5.2.2	Características analíticas das resinas de preconcentración .....	328
5.2.3	Características analíticas das metodoloxías propostas .....	328
5.2.4	Precisión .....	329
5.2.5	Exactitude .....	330
5.2.5.1	Recuperación das metodoloxías propostas .....	330
5.2.5.2	Análise de materiais de referencia .....	334
5.2.6	Frecuencia de mostraxe .....	335
5.3	Cobalto .....	336
5.3.1	Curvas de calibrado .....	336
5.3.2	Características analíticas das resinas de preconcentración .....	337

---

5.3.3	Características analíticas das metodoloxías propostas .....	337
5.3.4	Precisión .....	338
5.3.5	Exactitude .....	338
5.3.5.1	Recuperación das metodoloxías propostas .....	339
5.3.6	Frecuencia de mostraxe .....	342
5.4	Cromo .....	342
5.4.1	Curvas de calibrado .....	342
5.4.2	Características analíticas das resinas de preconcentración .....	343
5.4.3	Características analíticas das metodoloxías propostas .....	343
5.4.4	Precisión .....	344
5.4.5	Exactitude .....	345
5.4.5.1	Recuperación das metodoloxías propostas .....	345
5.4.5.2	Análise de materiais de referencia .....	347
5.4.6	Frecuencia de mostraxe .....	348
5.5	Níquel .....	349
5.5.1	Curvas de calibrado .....	349
5.5.2	Características analíticas das resinas de preconcentración .....	350
5.5.3	Características analíticas das metodoloxías propostas .....	350
5.5.4	Precisión .....	351
5.5.5	Exactitude .....	351

5.5.5.1	Recuperación das metodoloxías propostas .....	351
5.5.5.2	Análise de materiais de referencia .....	354
5.5.6	Frecuencia de mostraxe .....	355
<b>6.</b>	<b>APLICACIÓN DAS METODOLOXÍAS PROPOSTAS: Análise de mostras reais dos diferentes tipos de matrices alimenticias estudiadas aplicando os sistemas FIA propostos .....</b>	<b>356</b>
6.1	Determinación do cadmio .....	357
6.2	Determinación do chumbo .....	371
6.3	Determinación do cobalto .....	385
6.4	Determinación do cromo .....	399
6.5	Determinación do níquel .....	413
<b>CONCLUSIÓNS</b>		
	<b>CONCLUSIÓNS .....</b>	<b>429</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>435</b>
	<b>ANEXO A. LISTADO DE ACRÓNIMOS .....</b>	<b>449</b>
	<b>ANEXO B. PUBLICACIÓNS CIENTÍFICAS .....</b>	<b>453</b>





# **INTRODUCCIÓN**



# 1. OS METAIS

## 1.1 Os metais no medioambiente e nos alimentos

Aproximadamente, uns 80 dos 104 elementos que contén a Táboa Periódica actual son metais. A análise dos tecidos do corpo humano mostra a presenza de moitos elementos metálicos, algúns en concentracións razoables e outros a niveis traza. Isto é debido a que os alimentos que consumimos conteñen a miúdo concentracións similares de ditos metais, reflexando a súa distribución no medioambiente. O chan no cal medran as plantas contén metais procedentes de diferentes fontes, principalmente das rochas a partir das cales se forma, fertilizantes, lixo e outros materiais procedentes das actividades do home (actividades industriais, queima de combustibles fósiles e outras formas de contaminación). Na Táboa 1 recóllense as concentracións dalgúns metais no chan [1].

A concentración na cal se atopan os metais nos alimentos é moi variada e depende de moitos factores, que abarcan dende as condicións medioambientais ata os métodos de produción e procesado. No caso dos alimentos de orixe vexetal, o contido metálico está condicionado pola natureza do chan e polo uso de pesticidas, fertilizantes, etc. Nos alimentos de orixe animal, a concentración de metais presente nos mesmos está relacionada coa alimentación dos animais e co medio que os rodea.

**Táboa 1.** Contido dalgúns metais no chan

<b>Metal</b>	<b>Contido (mg/Kg)</b>
Ferro (Fe)	7000-55000
Manganeso (Mn)	200-5000
Cromo (Cr)	5-3000
Niquel (Ni)	10-800
Cinc (Zn)	10-300
Cobre (Cu)	2-100
Cobalto (Co)	1-5
Cadmio (Cd)	0,06
Chumbo (Pb)	10

Na etapa de procesado dos alimentos, aparte de comprobar que os produtos están libres de metais tóxicos, ou que os metais esenciais non están en concentracións tales que poidan provocar danos por envenenamento, é preciso verificar que os metais que conteñen os alimentos non alteren as características propias dos mesmos. Ademais, hai que eliminar a posibilidade de que os alimentos conteñan metais procedentes de fontes non alimenticias, como poden ser os envases.

## **1.2 O papel dos metais nos humanos**

Non é de extrañar que o corpo humano presente unha extensa variedade de metais en diferentes concentracións, posto que o medioambiente no cal vivimos, o aire que respiramos, a auga que bebemos e os alimentos que inxerimos conteñen unha gran cantidade deses elementos metálicos nun amplo rango de concentración [2]. A maior parte dos elementos metálicos do corpo humano proceden dos alimentos. A concentración de metais que absorbe o corpo no tracto gastrointestinal depende en gran medida do tipo de dieta, así como da nosa saúde e da xenética. A fibra presente nos

alimentos, por exemplo, pode inhibir a absorción de certos elementos metálicos, mentras que o ácido ascórbico, algúns compostos orgánicos, axentes quelantes ou ácidos a facilitan. Certos metais compiten por ser absorbidos, como é o caso do cobre co ferro e co cinc, o selenio co mercurio ou o molibdeno co cobre. A acumulación de metais no corpo humano non é uniforme. O ril, por exemplo, acumula cadmio con máis facilidade que chumbo, o cal se retén preferentemente no sangue. O cromo, non obstante, concéntrase principalmente no tecido muscular, mentras que só unha pequena fracción se almacena no ril. Non obstante, non tódolos metais que inxerimos se reteñen. A pesar de que a maioría se absorben nun primeiro momento, elimínanse posteriormente por medio da súa, urina, excreción biliar, pelo ou pel. A Táboa 2 recolle a concentración dalgúns elementos metálicos nos fluidos e tecidos corporais [1].

A pesar da gran cantidade de metais presentes no corpo humano, só un pequeno número deles teñen interés dende o punto de vista do correcto funcionamento do metabolismo humano. A deficiencia nalgúns deses nutrintes metálicos esenciais pode causar lesións bioquímicas específicas nas células do corpo e o desenvolvemento de síntomas clínicos específicos. A maior parte dos restantes elementos metálicos presentes, non teñen ningunha significancia dende o punto de vista nutricional e poden causar danos nas funcións corporais.

**Táboa 2.** Concentración de elementos traza nos fluidos e tecidos corporais

<b>Metal</b>	<b>Dieta (mg/día)</b>	<b>Urina (mg/día)</b>	<b>Súor (mg/día)</b>	<b>Pelo (µg/g)</b>	<b>Leite (µg/L)</b>
Cromo (Cr)	0,025-0,050	0,008	0,059	0,69-0,96	10-29
Manganeso (Mn)	2,0-9,0	0,225	0,097	1,0	7-120
Zinc (Zn)	13,0-25,0	0,5	5,08	167-172	316-5300
Cobalto (Co)	0,15-0,60	0,26	0,017	0,17-0,28	1-8,6
Niquel (Ni)	0,15-0,2	0,011	0,083	-	20-83
Cadmio (Cd)	0,010-0,080	0,03	-	-	2-19
Chumbo (Pb)	0,070-0,300	0,03	0,256	2,8-4,8	12-30
Mercurio (Hg)	0,002-0,030	0,015	0,0009	18-19	1-6
Arsénico (As)	0,055-0,090	0,195	-	-	36
Aluminio (Al)	9,0-14,0	0,1	6,24	5	< 5-45

Os metais que teñen interés dende o punto de vista nutricional divíndense en dous grupos, dependendo da cantidade dos mesmos que é precisa para o correcto funcionamento do metabolismo humano. Así, denomínanse *macronutrintes* o calcio, potasio, sodio e magnesio e *micronutrintes*, o ferro, cinc, manganeso, cobre, molibdeno, cobalto, cromo, silicio, níquel e selenio. Con respecto ós metais para os cales a esencialidade no metabolismo humano aínda non foi establecida, hai que dicir que existen tamén dous grupos, un dos cales está constituído por aqueles metais involucrados nalgunhas reaccións celulares, como son o cadmio, arsénico, estroncio, vanadio e estaño e un segundo grupo composto por aqueles metais que non teñen ningunha función metabólica coñecida, como son o chumbo, mercurio, antimonio e litio entre outros [3]. A Táboa 3 recolle a clasificación de ditos elementos [1].

**Táboa 3.** Clasificación dos metais no corpo humano

<b>Grupo</b>	<b>Metal</b>	<b>Grupo</b>	<b>Metal</b>
<b>Macronutrintes</b>	Calcio (Ca)	<b>Metais non esenciais que participan en reaccións celulares</b>	Bario (Ba)
	Potasio (K)		Arsénico (As)
	Sodio (Na)		Estroncio (Sr)
	Magnesio (Mg)		Cadmio (Cd)
<b>Micronutrintes</b>	Ferro (Fe)		Estaño (Sn)
	Cinc (Zn)		Vanadio (V)
	Manganeso (Mn)		<b>Metais sen función metabólica coñecida</b>
	Cobre (Cu)	Mercurio (Hg)	
	Molibdeno (Mo)	Bismuto (Bi)	
	Cobalto (Co)	Antimonio (Sb)	
	Cromo (Cr)	Berilio (Be)	
	Niquel (Ni)	Litio (Li)	
Selenio (Se)	Titanio (Ti) e outros		

En canto á toxicidade dos elementos metálicos, non sempre é posible realizar unha distinción entre esenciais e tóxicos, posto que tódolos metais son probablemente tóxicos se son inxeridos en elevadas concentracións. Nalgunha ocasión, a marxe entre toxicidade e deficiencia é lixeira, como no caso do selenio. Ademais, non resulta sinxelo considerar a toxicidade dun elemento metálico ailladamente, posto que en condicións normais tódolos metais interaccionan entre si.

Así é o caso do cadmio, cuxos efectos fisiolóxicos e toxicidade está intrínscamente relacionada coa concentración de cinc presente. A función celular do cinc vese afectada pola presenza de cobre e cobalto, ou incluso do molibdeno e cinc. A pesar disto, é posible diferenciar entre elementos que se coñece con certeza que son esenciais e aqueles que dan lugar a síntomas de toxicidade severa incluso a concentracións moi baixas e que non teñen

ningunha función beneficiosa para o organismo humano. O cadmio, mercurio e chumbo son incluídos a miúdo neste último grupo, a pesar de que o cadmio podería ser incluído algún día dentro do grupo dos metais esenciais. Hoxe en día, son os tres metais tóxicos máis frecuentemente atopados nos alimentos, e foron os responsables de graves episodios de envenenamento [1].

### **1.3 Función e toxicidade do cadmio, chumbo, cobalto, cromo e níquel para o home.**

#### **1.3.1 Cadmio**

##### **O cadmio nos alimentos**

A pesar de que o cadmio se atopa na maior parte dos alimentos, a súa concentración é moi baixa, excepto nos casos de contaminación. As concentracións de cadmio presentes nos diferentes tipos de alimentos móstranse na Táboa 4 [1]. O contido máximo de cadmio en produtos alimenticios está regulado pola Unión Europea, e móstrase na Táboa 5 [4].

**Táboa 4.** Concentración de cadmio presente nos diferentes tipos de alimentos

<b>Alimento</b>	<b>[Cd] (µg/g)</b>
Carne	0,002-2,000
Peixe	0,017-0,913
Cereais	0,002-0,043
Vexetais	0,002-0,051

**Táboa 5.** Niveis máximos permitidos de cadmio en productos alimenticios

<b>Producto alimenticio</b>	<b>Contido máximo (µg/g peso fresco)</b>
Carne de vaca, ovellas, porcos e aves de curral	0,05
Carne de cabalo	0,2
Fígado de vaca, ovella, porco e aves de curral	0,5
Riles de vaca, ovella, porco e aves de curral	1,0
Peixe	0,05-0,1
Moluscos bivalvos	1,0
Crustáceos	0,5
Cefalópodos	1,0
Cereais (excluídos o salvado e o xerme)	0,1
Salvado, xerme, trigo e arroz	0,2
Hortalizas (excepto hortalizas de follas)	0,05
Hortalizas de follas, herbas aromáticas e setas	0,2
Hortalizas de raíz e patacas (peladas)	0,1

### **Función e toxicidade do cadmio no ser humano**

Aproximadamente, un 6 % do cadmio ingerido en bebidas e alimentos é absorbido polo corpo en condicións normais. Unha vez no corpo, o cadmio é transportado cara o fígado polo sangue. Alí únese a proteínas, entre elas á metalotionina, unha proteína de baixo peso molecular que está involucrada no transporte e almacenamento selectivo dunha gran variedade de metais. Pequenas cantidades deste complexo proteína-cadmio pasan de xeito continuo do fígado ó torrente sanguíneo, para ser transportado ós riles e filtrado a través dos glomérulos, causando danos no mecanismo de filtración. Posteriormente é reabsorbido e almacenado nas células tubulares dos riles [5].

Unha pequena fracción é expulsado a través dos riles ou en forma de feces, pero a maioría permanece no corpo. Polo tanto, a vida media biolóxica do cadmio é longa, en torno a uns 40 anos. A inxesta de cadmio por medio

dos alimentos provoca náuseas, vómitos, calambres abdominais, dor de cabeza e diarrea. Unha inxesta prolongada deste metal causa danos no sistema renal e enfermidades óseas que poden derivar en debilidade ou derrumbamento do esqueleto. A pesar de que aínda non hai evidencia de que unha inxesta de niveis elevados de cadmio poida derivar en cancro, unha exposición prolongada, como o caso de traballadore expostos a vapores de óxido de cadmio, pode ter este efecto. A toxicidade do cadmio pode ser reducida mediante a inxesta simultánea doutros metais, como cinc, ferro, mercurio, cobalto, cobre e selenio, debido á competencia entre eles por enlazarse á metalotionina [6].

### 1.3.2 Chumbo

#### Chumbo en alimentos

O chumbo é un ingrediente normal da nosa dieta. Está presente en tódolos alimentos e bebidas, nalgún dos casos como un compoñente natural e noutros como un aditivo añadido durante o procesado dos alimentos. As concentracións de chumbo presentes nos diferentes tipos de alimentos refléxanse na Táboa 6 [1]. Na Táboa 7 recóllense os niveis máximos de chumbo permitidos en alimentos según a Unión Europea [4].

**Táboa 6.** Concentración de chumbo presente nos diferentes tipos de alimentos

Alimento	[Pb] (µg/g)
Leite	0,01-0,08
Carne	0,01-0,70
Peixe	0,01-0,70
Cereais	0,01-0,81
Vexetais	0,01-1,5

**Táboa 7.** Niveis máximos permitidos de chumbo en productos alimenticios

<b>Producto alimenticio</b>	<b>Contido máximo (µg/g peso fresco)</b>
Carne de vaca, ovellas, porcos e aves de curral	0,1
Desfeitos comestibles de vaca, ovellas, porcos e aves	0,5
Peixe	0,2-0,4
Moluscos bivalvos	1,5
Crustáceos (excepto a carne oscura de cangrexo)	0,5
Cefalópodos (sen vísceras)	1,0
Cereais, verduras e legumes secas	0,2
Hortalizas (excepto herbas frescas e setas) e patacas	0,1
Hortalizas e setas cultivadas	0,3
Froitas (excepto baías e froitas pequenas)	0,1
Froitas pequenas e baías	0,2

### **Función e toxicidade do chumbo no ser humano**

Só arredor do 10 % do chumbo ingerido é absorbido polos adultos, mentras que os nenos ata 8 anos poden absorber ata un 25-53 %. Entre os factores que inflúen na absorción poden citarse a forma química na cal se atopa o chumbo nos alimentos, a presenza doutros metais ou o contido en graxa da dieta. Así, unha deficiencia de calcio ou ferro, incrementa a absorción do chumbo, do mesmo xeito que o fai unha dieta rica en carbohidratos e pobre en proteínas.

Os efectos do chumbo no corpo humano están relacionados con catro sistemas de órganos: hemohepático, nervioso, gastrointestinal e renal. O envenenamento agudo por este metal maniféstase principalmente con efectos gastrointestinais como anorexia, dispepsia e estreñimento seguidos de ataques cólicos cunha intensa dor abdominal. Con respecto ó sistema nervioso, pode provocar deterioro mental ou conducta agresiva. Non

obstante, resulta de gran dificultade establecer unha relación directa entre os niveis de chumbo no sangue e os efectos neurofisiolóxicos [1,5].

### 1.3.3 Cobalto

#### O cobalto nos alimentos

Os niveis de cobalto en alimentos son moi baixos. Niveis maiores atópanse en bebidas como a cervexa, onde se utilizan as súas sales como aditivos para mellorar as propiedades espumosas da mesma. Na Táboa 8 recóllense as concentracións de cobalto atopadas nos diferentes tipos de alimentos [1].

**Táboa 8.** Concentración de cobalto presente nos diferentes tipos de alimentos

Alimento	[Co] ( $\mu\text{g/g}$ )
Carne	$7,8 \times 10^{-3}$
Peixe	0,032
Cereais	0,025
Vexetais	0,046

#### Función e toxicidade do cobalto no ser humano

O cobalto forma parte da cobalamina ou vitamina B<sub>12</sub>, que ten gran importancia na formación dos tecidos da médula ósea. O corpo humano contén aproximadamente uns 5 mg desta vitamina e unha deficiencia da mesma pode provocar anemia ou incluso afectar ó sistema nervioso [3]. En tales casos, a inxesta do metal non é suficiente, posto que só os microorganismos son capaces de incorporar o metal á vitamina. A presenza do metal no organismo en cantidades elevadas resulta tóxica.

### 1.3.4 Cromo

#### O cromo nos alimentos

Actualmente non se dispón de moitos datos fiables en relación ó contido en cromo de alimentos e bebidas, debido á dificultade que presenta a determinación deste elemento en tales matrices. Contaminación durante a etapa de preparación da mostra, corrección de fondo inadecuada durante a medida de absorción atómica ou o uso de materiais de referencia certificados non adecuados foron a causa do descarte de resultados publicados sobre a determinación de cromo en mostras de alimentos. Na Táboa 9 recóllense as concentracións de cromo nalgúns tipos de alimentos [1].

**Táboa 9.** Concentración de cromo presente nos diferentes tipos de alimentos

Alimento	[Cr] ( $\mu\text{g/g}$ )
Leite	<0,02
Carne	0,05-0,95
Peixe	0,05-0,15
Cereais	0,02-0,30
Vexetais	0,05-0,20

Aínda que non existen cantidades dietéticas específicas recomendadas para o consumo do cromo, a inxesta diaria do cromo adecuada e segura mostrase na Táboa 10 [1].

**Táboa 10.** Inxesta diaria de cromo adecuada e segura para a saúde

<b>Idade (anos)</b>	<b>Cantidade de cromo (µg/día)</b>
0-1	0,1-0,5
1-13	11-25
14-18	24-35
19-50	25-35
> 50	20-30

### **Función e toxicidade do cromo no ser humano**

O mecanismo mediante o cal o cromo que conteñen os alimentos é absorbido polo intestino non se coñece con total certeza. Só arredor dun 0,5-1,0 % do cromo trivalente e aproximadamente un 2 % dos cromatos se incorporan ó fluxo sanguíneo. A cantidade de metal absorbida depende da forma química na cal se atope presente e a presenza doutros metais, entre os cales se poden citar o ferro, manganeso, vanadio ou incluso o cinc, inhibe a absorción do mesmo. O cromo acumúlase principalmente nos riles, bazo, ósos e outros órganos, e é expulsado por medio da urina ou incluso da bilis ou feces. O contido en cromo dos tecidos diminúe coa idade, salvo no caso dos pulmóns en zonas onde a contaminación ambiental por cromo é elevada [1].

O cromo é un nutriente traza esencial no home. A súa esencialidade non se descubriu ata 1960 e aínda hoxe se coñece relativamente pouco acerca das súas funcións biolóxicas. O cromo intervéen no metabolismo da glucosa, posto que forma parte do factor de tolerancia á glucosa, o cal potencia a acción da insulina, encargada de posibilitar a entrada dos hidratos de carbono sinxelos nas células para poder ser utilizados e transformados en enerxía. Se a insulina é escasa ou non funciona de xeito adecuado, a glucosa acumúlase no sangue, producindo o que se denomina hiperglucemia (niveis por enriba

do normal da glucosa no sangue) [3]. Tamén participa no metabolismo dos lípidos e atribúeselle a propiedade de poder controlar os niveis de colesterol no sangue e impedir a formación de placas nas paredes das arterias. Contémplase a posibilidade de que o cromo sexa capaz de inhibir a acción da enzima encargada de regular a velocidade de formación do colesterol. Algúns estudos afirman que dependendo da concentración do cromo éste sexa capaz de inhibir ou estimular a acción de dita enzima. Polo tanto, unha deficiencia do mesmo pode causar danos cardíacos. O cromo (III) é capaz de enlazarse ós ácidos nucleicos, de maneira que pode provocar a síntese de material xenético anormal nas células.

### 1.3.5 Níquel

#### O níquel nos alimentos

As concentracións de níquel presentes nos diferentes tipos de alimentos, refléxanse na Táboa 11 [1].

**Táboa 11.** Concentración de níquel presente nos diferentes tipos de alimentos

Alimento	[Ni] (µg/g)
Leite	<0,02
Carne	0,05-1,1
Peixe	0,05-1,1
Cereais	0,10-0,30
Vexetais	0,05-0,30

#### Función e toxicidade do níquel no ser humano

O níquel é un metal que apenas se absorbe a través dos alimentos e só entre o 3 e o 6 % do metal inxerido se retén no corpo. A excreción do mesmo prodúcese principalmente a través das feces, e unha pequena parte por

medio da urina. Non se acumula en ningún órgano en particular, senon que se distribúe do mesmo xeito por tódolos tecidos do corpo. É un metal dos que se consideran esenciais para o home, posto que forma parte e activa diferentes enzimas, como é o caso da ureasa, carboxilasa ou acetil coenzima A [3]. A pesar de que aparentemente non é un metal tóxico para o home, a aparición de casos de cancro no tracto respiratorio e dermatites en traballadores das refinerías de níquel, fixo que cobrara gran importancia o estudio dos posibles efectos tóxicos deste metal [1,2].

## 2. PROCEDIMENTOS DE PRECONCENTRACIÓN

O nivel de concentración no cal moitos analitos de interés se atopan nas mostras (orde de  $\mu\text{g/g}$  ou menor) fai imposible a determinación directa dos mesmos polas técnicas máis habituais. Este feito obriga a introducir unha etapa previa de preparación da mostra na cal o analito se concentra con respecto á concentración que presenta na mostra orixinal. Esta etapa xeralmente implica unha separación do analito do resto da matriz .

A inclusión da etapa de preconcentración no método de análise permite o emprego de técnicas sinxelas e asequibles a tódolos laboratorios.

Os procedementos máis frecuentemente empregados para a preconcentración de analitos inorgánicos, clasifícanse distinguindo entre aqueles métodos nos cales a matriz se transfere a outra fase e aqueles nos cales o que se transfere a outra fase son os elementos traza a determinar [7].

- Transferencia da matriz a outra fase
  - Evaporación do disolvente
  - Diálise
- Transferencia dos analitos a outra fase
  - Destilación
  - Extracción líquido-líquido
  - Precipitación
  - Utilización de reactivos quelantes ou de cambio iónico
  - Atrapamento en adsorbentes
  - Atrapamento crioxénico
  - Deposición electroquímica

Neste traballo de investigación, o procedemento de preconcentración que se vai empregar é a utilización dunha resina quelante.

## 2.1 Utilización de reactivos quelantes ou de cambio iónico

O emprego de intercambiadores aniónicos ou catiónicos é un procedemento que permite a preconcentración dos compostos inorgánicos cargados [8-10]. Existen diferentes tipos de resinas de intercambio iónico, según o grupo funcional:

- **Resinas catiónicas de ácido forte:** xenéranse por sulfonación do polímero con ácido sulfúrico. O grupo funcional é o ácido sulfónico.
- **Resinas catiónicas de ácido débil:** o grupo funcional é un ácido carboxílico, presente nun dos compoñentes do copolímero, principalmente o ácido acrílico ou metacrílico.
- **Resinas aniónicas de base forte:** obtéñense a partir da reacción de copolímeros de estireno-divinilbenceno (DVB) clorometilados con aminas terciarias. O grupo funcional é unha sal de amonio cuaternaria.
- **Resinas aniónicas de base débil:** son resinas funcionalizadas con grupos de amina primaria, secundaria ou terciaria.

As resinas quelantes poden considerarse un tipo de resina de intercambio iónico na cal o grupo funcional ten as propiedades dun reactivo específico. Estas resinas diferéncianse das resinas de intercambio iónico convencionais pola súa gran selectividade e pola fortaleza coa cal forman quelatos cos diferentes ions metálicos. Os átomos máis frecuentes a través dos cales forman enlaces de coordinación cos metais son xofre, nitróxeno, osíxeno e fósforo. As

propiedades selectivas das resinas quelantes baséanse fundamentalmente na natureza do grupo quelante e na disposición dos mesmos na matriz da resina, así como no tamaño, carga e outras propiedades físicas dos ions. O proceso de retención nunha resina quelante é máis lento que nunha resina de intercambio iónico, posto que a velocidade á cal se reteñen os ions depende non só da difusión, senon tamén da cinética das reaccións de formación de complexos. As mellores características cinéticas son as que mostran os adsorbentes basados en polímeros con estruturas macroporosas ou macrorreticulares (MR) [11].

As resinas quelantes prepáranse a partir da inmovilización do ligando na matriz polimérica da resina e é preciso que o axente complexante a incorporar na matriz polimérica forme un sistema estable con dita matriz, que dita estabilidade se manteña nun amplo rango de pH e que o soporte sólido sexa químicamente estable e posúa unha estrutura compacta, ó igual que o grupo quelante, de xeito que a formación do quelato metálico cos diferentes ions non esté impedida pola matriz polimérica.

O procedemento de preconcentración conleva unha etapa de retención do analito ou analitos sobre o material intercambiador ou quelante a través de mecanismos de cambio iónico ou de formación de quelatos, seguida dunha segunda etapa de elución do analito da columna mediante disolucións ácidas ou complexantes adecuadas.

Este procedemento de preconcentración, en principio, proporciona factores de preconcentración elevados. A relación entre os volumes de retención e elución, permite o cálculo do factor de preconcentración teórico, pero existen dous factores que impiden que se acadese dito valor: a capacidade da columna e o efecto lavado. *A capacidade da columna*

defínese como a cantidade máxima de analito ou analitos que é capaz de reter a fase reactiva. Esta capacidade depende da cantidade de grupos activos da fase intercambiadora ou quelante e da relación estequiométrica grupo activo-analito, no equilibrio que ten lugar sobre o sólido. O efecto lavado, por outra parte, provoca que a eficiencia do sistema preconcentrador diminúa a medida que aumenta o volume de disolución que pasa ó seu través. Isto débese a unha debilitación das forzas de unión entre os sitios activos do soporte e os analitos, pola solvatación co disolvente. Este factor ten unha maior influencia sobre o factor de preconcentración que a capacidade da columna, posto que o baixo nivel de concentración dos analitos fai moi difícil chegar a saturala [7].

Existen unha gran variedade de resinas quelantes comerciais, aínda que a síntese das mesmas no laboratorio por modificación doutras resinas ou adsorbentes tamén foi moi empregada [12-18]. As resinas quelantes de maior aplicabilidade analítica son as que posúen os grupos quelantes iminodiacetato, ditiocarbamato, 8-quinolinol e grupos poliéter cíclicos.

- **Grupos iminociacetato**

As resinas que conteñen o grupo ácido iminodiacético como grupo funcional son as máis empregadas á hora de separar os metais de transición doutros elementos [19-24]. Existen comercialmente baixo diferentes nomes, entre eles: Chelex 100, Dowex A-1, IRC-718(XE-318), Amberlita IRC748, Serdolit Chelite Che, Duolite ES-466, Diaion CR-11, Ligandex 1, Lewatit TP-207, Permutit S-1005, Muromac A-1, etc.

- **Grupos ditiocarbamato**

O amplo emprego desta resina débese a que é capaz de reter selectivamente por formación de complexos ata un total de 52 elementos [25]. Algunhas resinas comerciais que posúen este grupo funcional son Sumichelate Q-10 ou ALM-125.

- **Grupos 8-Quinolinol**

Entre as resinas quelantes que conteñen o grupo 8-quinolinol (oxina), a máis coñecida comercialmente é a Spheron Oxine-1000 [26]. Esta resina fundaméntase nunha matriz polimérica de hidroximetacrilato e etilendimetilacrilato, e o grupo funcional enlázase a dita matriz a través dos grupos azo.

- **Grupos poliéter cíclicos**

Este tipo de resinas quelantes prepáranse a partir da incorporación de éteres coroa, críptatos e poliéteres non cíclicos en matrices poliméricas, como o estireno-divinilbenceno, sílica ou formaldehído policondensado. O enlace entre o metal e a resina ten lugar a través do dipolo C-O e coñécense comercialmente as resinas Kryptofix 221B e 222B.

Na Táboa 12 móstranse as propiedades dalgunhas resinas quelantes.

**Táboa 12.** Propiedades dalgunhas resinas quelantes

Grupo funcional	Matriz	Selectividade
Ácido iminodiacético	Poliestireno-DVB	Cu(II)>Pb(II)>Fe(III)>Al(III)> >Cr(III)>Ni(II)>Zn(II)>Ag(I)> >Co(II)>Cd(II)>Fe(II)>Mn(II)> >Ba(II)>Ca(II)>>Na(I)
Ditiocarbamato	Poliestireno- DVB	Cu(II)>Ni(II)>Co(II)>Zn(II) Fe(III), Cu(II), U(VI) a pH 2,8; Hg(II), Ni(II), Co(II) a pH 4,0;
8-Quinolínol	Poliestireno- DVB	Al(III), Zn(II) a pH 4,8; Cd a pH 6,1; Mg(II) a pH 10,0
Poliéter cíclico (dibenzo-24-coroa-8)	Poliestireno- DVB	Cs <sup>+</sup> >Rb <sup>+</sup> >K <sup>+</sup> >Na <sup>+</sup> >>Li <sup>+</sup> >I <sup>-</sup> >Br <sup>-</sup>
Ácido aminofosfórico	Poliestireno- DVB	Pb(II)>Cu(II)>Zn(II)>Ca(II)> >Cd(II)>Ni(II)>Co(II)
Poliditiocarbamato	Poliamina-poliurea	Ag(I)>Hg(II)>Cu(II)>Sb(III)> >Pb(II)>Cd(II)>Ni(II)>Zn(II)>Co(II)
Tíol	Poli(glicidilmetacrilato)	Hg(II)>Sb(III)>Ag(I)>Cu(II)>Pt(IV)
Cisteína	Poliacrilonitrilo	Au(III)>Ag(I)>Hg(II)>Pt(IV)>Mo
Aminometilfosfónico	Poliestireno- DVB	Pb(II)>Cu(II)>Zn(II)>Mg(II)>Ca(II)> >Cd(II)>Ni(II)>Co(II)>Sr(II)>Ba(II)

---

### 3. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MOSTRAS SÓLIDAS

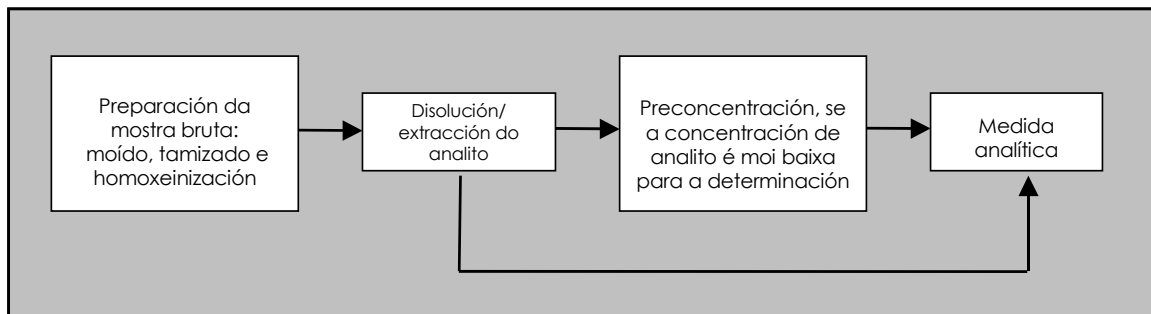
O proceso analítico está constituido por diferentes etapas. Mentras que algunhas delas, como a medida e transducción do sinal instrumental ou a recollida e procesado dos datos, son comúns a tódolos procesos analíticos, as que preceden á inserción da mostra no instrumento de medida, como a disolución, preconcentración, separación ou derivatización, varían de proceso a proceso.

A maior parte das técnicas analíticas para a determinación de metais en produtos de natureza alimenticia requiren a preparación da mostra antes da súa inserción no instrumento de medida. Certas bebidas, entre elas a auga, constitúen unha excepción, posto que se pode determinar o contido dalgúns elementos metálicos nas mesmas aplicando directamente colorimetría ou outras técnicas analíticas, sen tratamento previo. A etapa de tratamento ou preparación da mostra, é a etapa que máis dificultade e erros acarrea ó proceso global. A maioría destes procesos lévanse a cabo de xeito manual e son tratamentos complexos, tediosos e difíciles de controlar sistemáticamente, resultando así a fonte de erros e problemas de contaminación máis frecuente no proceso analítico.

A preparación das mostras para a determinación do contido metálico presente nas mesmas pode levarse a cabo de diferentes maneiras en función do tipo de mostra e do tipo de análise que se queira realizar. Os principais procedementos a seguir na preparación das mostras para a análise de metais nas mesmas son os seguintes [27]:

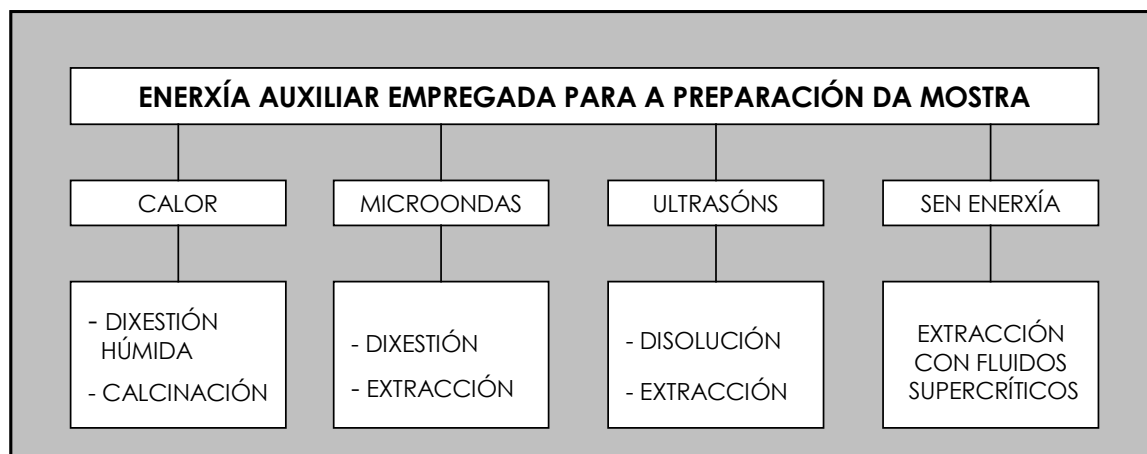
- Degradar e disolver a matriz da mostra, liberando os metais da mesma para a súa posterior determinación (disolución).
- Destrucción da matriz da mostra (dixestión).
- Separar o analito ou analitos doutras especies que poidan interferir na análise (separación)
- Enriquecer a mostra con respecto ós analitos que se atopan en moi baixa concentración, para obter así a concentración adecuada dos mesmos para a análise (preconcentración).

Na preparación da mostra para a análise non sempre é preciso levar a cabo todos estes procedementos, senon que habitualmente só se precisan un ou dous. Na Figura 1 móstrase un esquema do procedemento a seguir na preparación da mostra sólida para a determinación do contido metálico da mesma.



**Figura 1.** Esquema da preparación da mostra sólida para a determinación de metais

Os diferentes métodos para levar a cabo a preparación da mostra sólida poden clasificarse en función da enerxía utilizada, e recóllense na Figura 2.



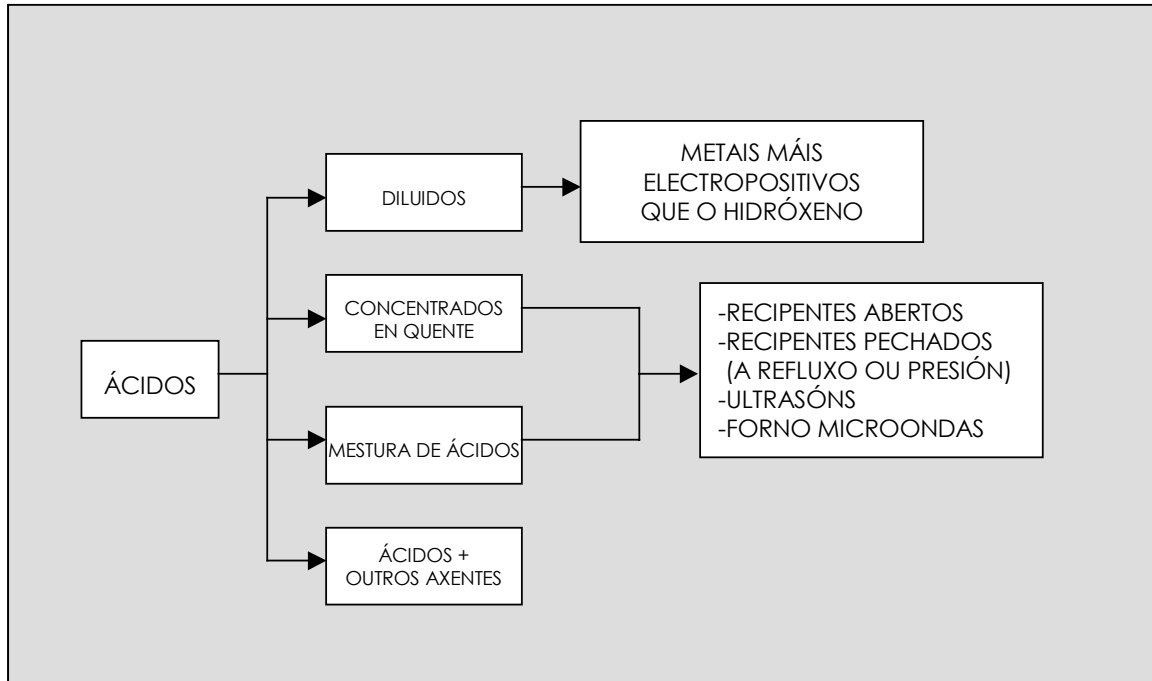
**Figura 2.** Métodos para a preparación da mostra sólida, en función da enerxía empregada

### 3.1 Tratamento da mostra sólida empregando quentamento convencional:

#### **dixestión húmida**

O proceso de transformación dunha mostra sólida en fase líquida pode realizarse con ou sen cambio químico. Dado o escaso número de sustancias que se poden poñer en disolución sen ter que recurrir á reacción química, o máis habitual é empregar ácidos en orde crecente de complexidade: ácidos diluídos (en frío ou en quente), ácidos concentrados (en frío ou en quente) e mesturas dos mesmos entre sí ou con outros compoñentes de características oxidantes, complexantes, etc. A figura 3 ilustra a sistemática a seguir no tratamento da mostra con ácidos. O ácido elixido para levar a cabo a dixestión húmida depende da natureza da mostra, do analito a determinar e do método de determinación proposto. O ácido nítrico é o reactivo case universal empregado nas dixestións [28], posto que non dá lugar a interferencias na maioría das determinacións e atópase dispoñible comercialmente nun elevado grao de pureza. Nos casos nos que este ácido non é suficiente, adoita empregarse combinado con peróxido de hidróxeno

e/ou ácido clorhídrico ou perclórico [29-32] para mellorar a calidade da dixestión.



**Figura 3.** Tipos de ácidos en orde crecente de reactividade que se empregan no tratamento da mostra

### 3.2 Calcinación

A vía seca constitúe un dos métodos máis importantes para a eliminación da materia orgánica e posterior posta en disolución do residuo por tratamento con ácidos diluídos inorgánicos ou orgánicos. Os procedementos de calcinación máis empregados son os que se indican a continuación [7]:

- Combustión nun forno a elevadas temperaturas
- Combustión en presenza de osíxeno
- Combustión con osíxeno activado por un campo de frecuencia magnética de alta frecuencia: plasma frío

Se se comparan as vantaxes e desvantaxes que proporcionan a vía seca e a vía húmida, cabe destacar que, polo xeral, a vía húmida require unha maior adicación por parte do operador, mentras que o tempo requerido para o proceso global é menor. Na vía húmida utilízanse pequenas cantidades de mostra e relativamente grandes volumes de reactivos mineralizantes, o que implica que se estes conteñen impurezas, a contaminación da mostra pode ser un dos problemas máis graves. No caso da vía seca, o tempo que o operador adica ó proceso adoita ser mínimo, mentras que as cantidades de mostra utilizadas acostuman ser relativamente elevadas. A perda de analitos volátiles, a posible interacción das cinzas formadas coas paredes do recipiente empregado e a contaminación da mostra por partículas suspendidas no aire orixinadas polos compoñentes do forno son os riscos de erro máis habituais no tocante á mineralización por vía seca [33-35].

### **3.2.1 Combustión nun forno a elevadas temperaturas**

A forma máis convencional de levar a cabo este tipo de tratamento consiste en someter a mostra, debidamente pesada e situada nun recipiente adecuado, a temperatura elevada controlada coa axuda dun forno ou mufla [36-39]. As temperaturas que se aplican xeralmente oscilan entre os 500-550 °C. Os analitos de maior risco de perda por volatilidade neste proceso son S, Se, P, As, Sb, Ge, Te, Hg, Cd, Pb e Zn. En moitos casos o risco de perda por volatilidade non depende unicamente das características do analito, senon tamén dos compoñentes da matriz [7]. Un exemplo disto constitúeo o chumbo, cuxa perda en ausencia de cloruros non se produce se non se aplican temperaturas de mineralización superiores a 700-750 °C, mentras que se a

matriz e rica en cloruros (alimentos salados, etc) os riscos de perda por formación de  $PbCl_2$  teñen lugar a partir de 450-500 °C.

O recipiente que se emprega para levar a cabo a calcinación é o crisol de porcelana, platino, cuarzo, etc. Recoméndase tapar o crisol para evitar que as cinzas voen. A forma máis habitual de comprobar se a mineralización foi cuantitativa consiste en avaliar a variación do peso da mostra co tempo. Cando o peso da mostra permanece constante, considérase que o proceso rematou. O osíxeno da atmósfera actúa como axente oxidante e as cinzas residuais están constituídas xeralmente por óxidos de metais, sulfatos, fosfatos, silicatos e outras sales pouco volátiles.

### **3.2.2 Combustión en presenza de osíxeno**

A combustión en presenza de osíxeno é un procedemento de descomposición que elimina moitos dos problemas potenciais en canto á contaminación da mostra, posto que o único reactivo que se emprega é o osíxeno gaseoso, que está dispoñible comercialmente nun elevado grao de pureza. Este tipo de combustión pode levarse a cabo a presión atmosférica (en recipientes abertos) ou a elevada presión (nun recipiente pechado). A combustión a presión atmosférica é relativamente sinxela de levar a cabo, pero ten a desvantaxe de que se pode producir a perda de elementos volátiles. Este risco de perda por volatilización elimínase no caso da combustión a elevada presión, posto que neste caso, a combustión ten lugar nun recipiente pechado no cal se introduce o osíxeno ata unha determinada presión. A mostra é sometida a combustion coa axuda dun dispositivo de detonación (alambre de ignición) [27].

### **3.2.3 Combustión con osíxeno activado por un campo de frecuencia magnética de alta frecuencia: plasma frío**

Moitos dos problemas de perdas inherentes ó emprego da mineralización a temperatura elevada poden evitarse facendo uso do osíxeno activado. O osíxeno activado consiste nunha mestura de átomos, ions e moléculas nun estado electrónico fundamental e/ou excitado. Posúe un tempo de vida da orde de un segundo, a partir do cal se convirte en osíxeno molecular. O aspecto de maior importancia é a súa alta reactividade, que provoca unha reacción de oxidación máis uniforme que o osíxeno normal, permitindo a eliminación da materia orgánica a temperaturas da orde de 120 °C, en contraste coa temperatura de 500 °C requirida cando se emprega osíxeno non activado.

As vantaxes desta técnica son a diminución drástica dos riscos de perda por volatilización e por interacción mostra-recipiente, que tamén son menores debido á baixa temperatura do proceso. Unha limitación importante deste tipo de mineralización é o tratamento de pequenas cantidades de mostra, posto que do contrario, o osíxeno activado non ten tempo de penetrar no interior da mostra, sendo difícil a oxidación cuantitativa da materia orgánica da mesma. Outras desvantaxes importantes son o elevado tempo de mineralización requirido e o número limitado de mostras que se poden mineralizar simultaneamente, que unidas ó elevado custo do equipo, provocan a dificultade da implementación desta técnica na análise de rutina [7].

### **3.3 Tratamento da mostra sólida empregando a enerxía de microondas**

A utilización dos microondas é de gran utilidade tanto nos fogares como nos laboratorios analíticos, ben para o queentamento da comida nos primeiros ou ben para a preparación dunha mostra para a súa análise, nos segundos.

A radiación de microondas está situada no espectro electromagnético entre a luz infrarroxa e as radiofrecuencias, e o seu intervalo de frecuencias oscila entre 300 MHz e 300 GHz, que corresponde a lonxitudes de onda entre 1 m e 1 cm. Neste intervalo a radiación interacciona coa materia provocando o desprazamento dos ions e tránsitos nos niveis enerxéticos de rotación das moléculas. Caracterízase por unha elevada penetrabilidade nos materiais, así como pola súa rapidez, doada manipulación e rápida transferencia á totalidade da mostra sen sobrequeentamento da superficie [40].

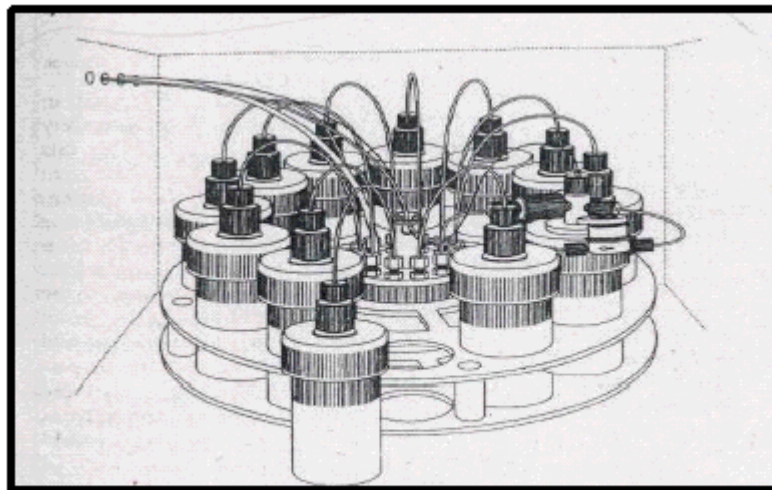
O uso do microondas revolucionou a etapa de preparación da mostra para a posterior determinación mediante absorción atómica, ICP ou outras técnicas, logrando maior velocidade e permitindo traballar en condicións máis limpas.

Os procesos máis importantes levados a cabo utilizando a enerxía de microondas son a extracción (extracción asistida por microondas, MAE) e a dixestión. No primeiro caso, faise uso de disolventes orgánicos para extraer os compoñentes orgánicos da mostra, mentras que na dixestión se empregan ácidos para disolver a mostra, destruindo a parte orgánica para a análise instrumental [41].

O sistema para a dixestión da mostra empregando a enerxía de microondas consta dos seguintes compoñentes [7]:

- Xenerador de microondas (magnetron), que produce a radiación de microondas que se canaliza a través da guía de microondas
- Cavidade de microondas, onde se distribúe a radiación
- Axitador da radiación, cuxa misión é distribuir a enerxía de microondas que recibe en tódalas direccións, de maneira que teña unha distribución homoxénea.

Co fin de evitar os problemas derivados da falta de homoxeneidade na distribución da radiación ó longo da cavidade, os recipientes sitúanse nun plato xiratorio (Figura 4).



**Figura 4.** Cavidade de microondas, coas 12 bombas de dixestión en liña e as sondas de presión e temperatura.

Existen dous sistemas sustancialmente diferentes: un deles fai uso de recipientes abertos de vidro ou de cuarzo (ocasionalmente de PTFE) e o outro

emprega recipientes pechados de PTFE, polietileno ou outros materiais e realiza as dixestións a alta presión. Neste caso, cada bomba ten unha válvula de presión que dá saída ós fumes ácidos a través dun tubo que debe conectarse a unha cambota extractora. A gran vantaxe que presentan os sistemas pechados é que, ó traballar a alta presión, incrementase en gran medida a temperatura de ebulición e o poder de oxidación dos ácidos, o que permite dixerir a maior parte das mostras empregando tan só  $\text{HNO}_3$  ou  $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$  (evitando a utilización de  $\text{HClO}_4$  ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e a moi alta velocidade. Ademais, evítase totalmente a contaminación externa e recupéranse o 100 % dos volátiles [42]. As desvantaxes principais fronte ós sistemas abertos son que non se pode dixerir, en xeral, máis de 1 gramo de mostra e o control dos diferentes vasos non é independente.

Os fornos de microondas deben estar deseñados tendo moi en conta as medidas de seguridade. Así, a cavidade do microondas debe ser capaz de eliminar os vapores que se xeneran para evitar danos na electrónica do dispositivo. As portas deben ser resistentes a explosións. Os reactores deben ser transparentes á radiación de microondas e levar incorporada unha válvula de seguridade para eliminar o exceso de presión que se poida xerar no seu interior [7].

A dixestión asistida por microondas foi moi empregada como método de preparación da mostra nos últimos anos [43-49], debido ás vantaxes que presenta sobre a dixestión ácida convencional [50-54]:

- O tempo da dixestión redúcese de xeito significativo (de 2 a 5 veces menos)
- Redúcese a contaminación da mostra
- Redúcese a cantidade de mostra e reactivos a empregar

- Redúcese significativamente a perda de volátiles (totalmente nos sistemas pechados)
- Maior seguridade para o analista.

### **3.4 Tratamento da mostra sólida utilizando a enerxía de ultrasóns**

A Química Analítica é unha das áreas químicas onde a radiación ultrasónica apenas foi usada.

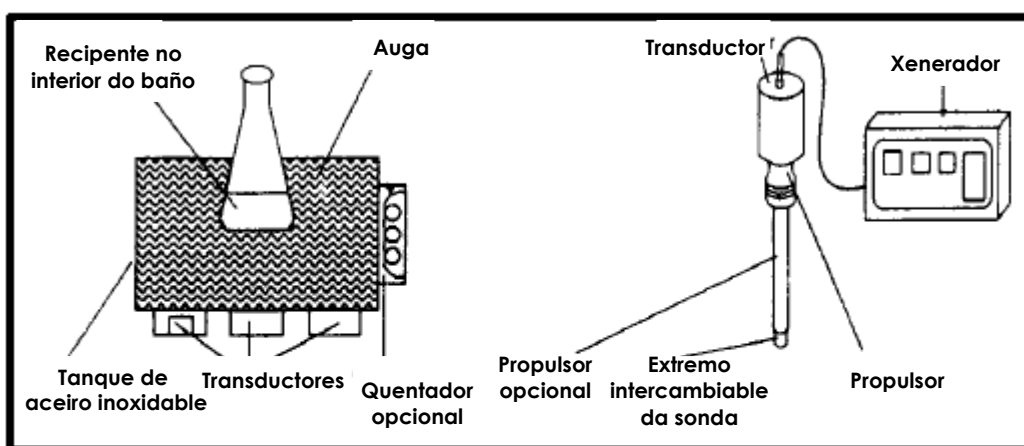
Os ultrasóns son ondas sonoras que posúen unha frecuencia maior que o intervalo de frecuencias audible polos homes (dende 1 Hz a 16 KHz). De feito, a menor frecuencia ultrasónica é de 20 KHz (20000 ciclos por segundo). Mentras que as ondas electromagnéticas (ondas de radio, luz ultravioleta, raios X, etc.) se propagan no baleiro, as ondas sonoras precisan dun medio para propagarse, provocando ciclos de compresión e expansión a través dese medio [55]. A enerxía de ultrasóns é de gran axuda no pretratamento das mostras sólidas, posto que acelera e facilita procesos como a extracción de compostos orgánicos e inorgánicos, dispersión en suspensións, homoxeneización e outras operacións como a nebulización, lavado e a derivatización [56].

Os métodos expostos ata agora para o tratamento das mostras baséanse na disolución completa das mesmas. Non obstante, existen numerosos casos nos cales a información requerida (por exemplo, o contido en metais unidos á matriz) non xustifica a necesidade de disolver totalmente a mostra.

A lixiviación asistida por ultrasóns é un procedemento adecuado para extraer analitos de diferentes tipos de mostras. A influencia de elevadas temperaturas (que melloran a solubilidade e a difusividade) e presións (que favorecen a penetración e o transporte) incrementan o poder de extracción

do extractante empregado. En moitas ocasións, a lixiviación asistida por ultrasóns é unha alternativa rápida, barata e eficiente ás técnicas de extracción convencionais, ou incluso á extracción asistida por microondas ou con fluidos supercríticos [41].

Os ultrasóns poden aplicarse a sistemas químicos mediante baños ou sondas (Figura 5). Ambos sistemas están basados nun transductor electromagnético como fonte da enerxía de ultrasóns, normalmente operando á frecuencia fixa de 20 KHz. Un factor importante que condiciona a eficacia da extracción é a posición do recipiente onde ten lugar a extracción dentro do baño de ultrasóns. Así, no caso de que o baño teña un único transductor situado na súa base, a máxima eficacia da extracción terá lugar cando o recipiente se coloque xusto enriba do transductor, é dicir, os efectos da radiación son maiores canto máis preto se sitúe o recipiente de extracción do transductor de enerxía.



**Figura 5.** Esquema dun baño e dunha sonda de ultrasóns.

A pesar de que os baños de ultrasóns son máis empregados, as sondas proporcionan mellores resultados debido á uniformidade na transmisión dos ultrasóns, posto que a enerxía se aplica directamente no recipiente onde ten lugar a extracción (non se propaga do medio ó recipiente) e a que non sufren fenómenos de “agotamento” da enerxía. Aínda así, en moitos casos, o pretratamento da mostra para a extracción de metais sigue levándose a cabo empregando baños de ultrasóns, posto que ofrecen resultados satisfactorios, son menos custosos e máis simples [57].

A determinación de metais en mostras alimenticias é unha parte moi importante da Química Analítica, posto que moitos deles teñen efectos tóxicos. É preciso establecer un intervalo de concentración de seguridade para ditos metais e aclarar o seu papel como parte da cadea alimenticia [1]. Os metais poden ser encapsulados polas paredes celulares, e éstas poden romperse pola acción combinada de ácidos diluídos e enerxía de ultrasóns, transportando os metais en cuestión ó líquido extractante. Moitos autores empregaron os ultrasóns para levar a cabo a extracción de metais en mostras biolóxicas [58,59], medioambientais [60-66] ou alimenticias [67-74]. Neste tipo de mostras, a eficiencia da extracción depende fundamentalmente de catro variables: a concentración do ácido ou ácidos empregados, o tamaño de partícula da mostra, o tempo de sonicación e a amplitude. Nalgúns casos, a temperatura de extracción é unha variable importante a ter en conta [41].

### 3.5 Tratamento da mostra sólida sen utilizar enerxía

#### 3.5.1 Extracción con fluidos supercríticos

A extracción con fluidos supercríticos é unha técnica de separación continua non cromatográfica que se basa no establecemento dun equilibrio entre a mostra e o propio fluido supercrítico.

Dise que un fluido está en estado supercrítico cando se atopa a temperatura e presión por enriba dos seus valores críticos. Na figura 6 obsérvase que a curva que representa o equilibrio líquido-gas se interrompe de forma brusca nun punto chamado *punto crítico*, definido por unha temperatura  $T_c$  e unha presión  $P_c$ , denominadas temperatura e presión críticas. A partir de dito punto, non ten lugar a licuefacción aínda que aumente a presión, nin se forma un gas aínda que aumente a temperatura.

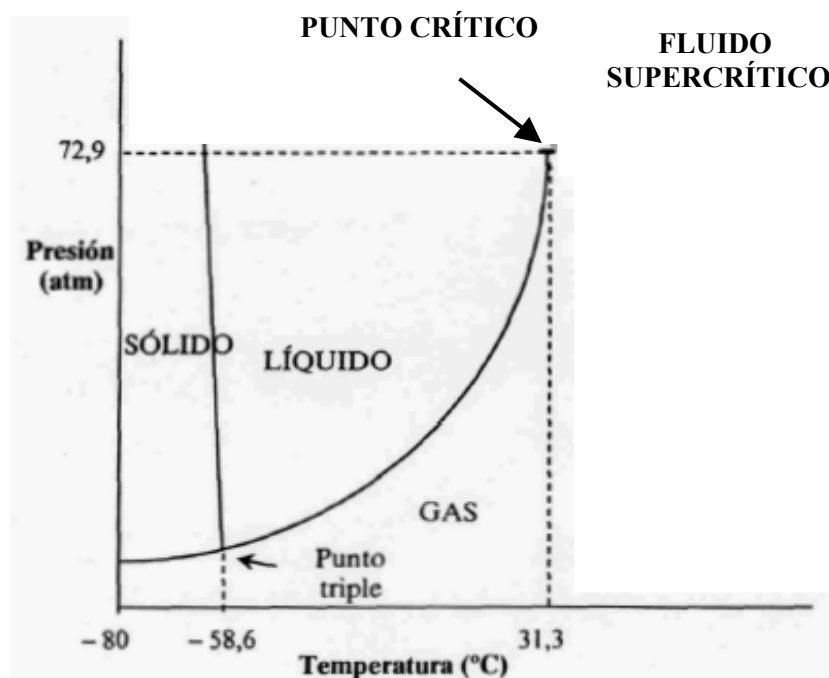


Figura 6. Curva do equilibrio líquido-gas do CO<sub>2</sub>

Un fluido en condicións supercríticas ten unhas características intermedias entre un gas e un líquido [75]. A densidade dun fluido supercrítico aproxímase á dos líquidos, sendo entre 100 e 1000 veces máis alta que a dos gases, o que lle confire un poder de solvatación similar á dos líquidos. Nun fluido supercrítico, a densidade está moi influída polos valores da presión e temperatura, de maneira que pequenos incrementos na presión ocasionan grandes incrementos na densidade, sobre todo nas proximidades do punto crítico. O poder de disolución que ten un fluido está moi relacionado coa súa densidade. Por iso, nun fluido supercrítico resulta máis doado modificar o seu poder disolvente variando a presión que nun líquido, onde a variación de presión apenas ten influencia. A gran facilidade para modificar a densidade na zona supercrítica fai que esta propiedade físico-química resulte clave. Ademais, inflúe directamente sobre a viscosidade e a constante dieléctrica do fluido, e á súa vez todas estas propiedades afectan ó poder de disolución e ós fenómenos de transporte de materia a través do mesmo [7].

O fluido supercrítico máis utilizado é o CO<sub>2</sub>, posto que é químicamente inerte, inocuo, non é inflamable e o seu punto crítico é doadamente accesible (31,1 °C e 71,8 atm). A súa principal limitación é o seu marcado carácter apolar, polo cal o seu emprego está limitado á extracción de analitos de baixa polaridade unidos débilmente á mostra. Este problema pode resolverse mediante a adición dunha pequena cantidade de disolvente orgánico polar (metanol, acetonitrilo, etc) coñecido como *modificador*. O modificador varía as propiedades solubilizantes do fluido supercrítico ó variar a súa polaridade, evita reabsorcións do analito na matriz ó ocupar espazos na mesma, modifica a matriz permitindo que o fluido supercrítico teña unha maior accesibilidade á mesma e interacciona co sistema analito-matriz provocando que a enerxía de

activación de desorción sexa menor. Así, o emprego adecuado de modificadores mesturados en pequena proporción co fluido supercrítico abre un amplo abanico de posibilidades de mellora na extracción e amplía o seu campo de aplicación [76].

## 4. DETERMINACIÓN DE METAIS

Hai unha gran variedade de técnicas que permiten levar a cabo a determinación de metais, pero a máis empregada é, con diferencia, a Espectrometría de Absorción Atómica.

A Espectrometría de Absorción Atómica (AAS) é unha técnica de determinación moi sensible, rápida, segura e versátil. A AAS permite a detección do elemento de interese en concentracións de parte por millón (atomización con chama) ou de partes por billón (atomización electrotérmica), independentemente da forma na cal se atope o metal na mostra.

Normalmente, a análise pode levarse a cabo en presenza doutros elementos sen ter que separar o analito de interese, o que supón unha gran vantaxe no tocante á simplicidade do método, tempo de análise e erros no proceso analítico global [77]. A precisión que se acada con estas metodoloxías para absorbancias maiores de 0,1 ou 0,2 é de 0,3-10% con atomización con chama e de 1-5% con atomización electrotérmica. A exactitude atópase entre un 0,5-5%, posto que ven limitada polo erro aleatorio e o ruído [78].

Na AAS existen dous tipos de interferencias [79]:

- Espectrais. Este tipo de interferencias poden ser debidas a:
  - A absorción doutro elemento diferente ó elemento de interese á lonxitude de onda empregada na determinación. Este tipo de interferencia é moi pouco habitual, posto que as liñas de emisión das lámpadas de cátodo oco son tan estreitas que só absorbe radiación o elemento de interese.

- Absorción de fondo. Este tipo de interferencia ten lugar cando se produce unha atomización incompleta da mostra e se teñen partículas que disipan parte da enerxía procedente da lámpada de cátodo oco que debería de chegar ó detector. Este tipo de interferencia pode eliminarse aumentando a temperatura da chama, asegurando así unha completa atomización da mostra. Non obstante, a tendencia máis actual consiste na incorporación na instrumentación de diferentes correctores de fondo.
- Químicas. Este tipo de interferencias poden clasificarse en tres grupos:
  - Interferencias de transporte. Este tipo de interferencia ten lugar cando se ven afectados os caudais de aspiración, nebulización ou de transporte na chama. Non adoitan ter lugar en instrumentos con cámara de grafito, ó contrario que no caso dos instrumentos que incorporan unha chama, onde este tipo de interferencia pode causar erros de gran importancia. Factores como a viscosidade, a tensión superficial, a presión de vapor e a densidade da disolución da mostra poden influir na velocidade de transporte da mostra na chama. A concentración de ácidos, os disolventes orgánicos ou os sólidos disoltos poden afectar á absorbancia do analito. Para eliminar este tipo de interferencia, lévase a cabo o método da adición.
  - Interferencias por formación de compostos térmicamente moi estables. Estas interferencias son debidas á presenza de reactivos que se combinan co elemento de interés formando un composto térmicamente moi estable. Isto dá lugar a un resultado erróneo, xa que parte do elemento de interés se atopa formando parte deste

compuesto. Así, a poboación atómica existente na chama é menor, posto que parte do analito de interés non se atomizou, dando lugar a unha absorbancia errónea máis baixa que a correcta.

- Interferencias por ionización. A ionización dos átomos do analito de interés na chama pode causar unha interferencia moi significativa, posto que hai que ter en conta que as liñas de absorción e emisión dos átomos e dos ions do mesmo elemento son diferentes. A ionización aumenta a medida que aumenta a temperatura da chama. Normalmente este tipo de interferencias non teñen lugar en chamas aire-acetileno, posto que a temperatura deste tipo de chamas non é moi elevada. Non obstante, adoitan ser problemáticas en chamas óxido nitroso-acetileno con elementos cuxos potenciais de ionización son menores ou iguais a 7,5 eV. A ionización do elemento de interés elimínase añadiendo á mostra elementos doadamente ionizables, como é o caso do potasio, chamados *supresores da ionización*. Así, cando estes elementos se ionizan, aumenta a concentración de electróns na chama desplazando o equilibrio de ionización dos demais elementos cara a forma atómica.

En xeral, estas interferencias son máis importantes no caso da atomización electrotérmica que no caso da atomización con chama. Por iso, a pesar de que os límites de detección obtidos coa atomización electrotérmica son 10-1000 veces menores que los obtidos coa atomización con chama, se prefiere a utilización desta última para la determinación dos metais [78].

## 5. INTRODUCCIÓN DIRECTA DA MOSTRA SÓLIDA NAS TÉCNICAS DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Un dos principais obxectivos da Química Analítica é mellorar as operacións previas á análise minimizando a participación humana e a manipulación da mostra nas mesmas. Así, están cobrando gran interese aqueles procesos analíticos nos cales se evita a dixestión da mostra, e no seu lugar considéranse principalmente dúas formas de mostraxe:

- Mostraxe directa do sólido
- Mostraxe en forma de suspensión

Na mostraxe directa do sólido, a mostra é directamente introducida no atomizador e atomizada no seu estado sólido. As principais vantaxes que presenta esta forma de mostraxe son a pouca cantidade e manipulación da mostra (evita riscos de contaminación da mesma e perda de analitos), o pouco tempo requerido para a obtención de resultados e a non utilización de reactivos perigosos como son os ácidos fortes, o que supón un beneficio tanto económico como medioambiental. Como resultado, o proceso analítico é máis sinxelo e os límites de detección son baixos [80,81]. Non obstante, esta técnica leva asociadas algunhas limitacións como a incapacidade de lograr calibracións cos patróns, a presenza de interferencias de matriz, a non homoxeneidade da mostra ou do tamaño de partícula, a pobre precisión dos resultados e a necesidade de deseñar atomizadores especiais [82-85].

A mostraxe en forma de suspensión consiste en introducir a mostra como unha alícuota dunha suspensión estable no atomizador. Este método non

presenta ningún risco no tocante a perdas da mostra durante a preparación da mesma, posto que se trata dun método moi sinxelo, non se precisan reactivos agresivos e permite facer calibracións con simples disolucións acuosas ás cales se lles pode añadir modificadores en estado líquido [86]. A principal desvantaxe que presenta este tipo de mostraxe é conservar a homoxeneidade da suspensión mentras a mostra se introduce no atomizador do detector analítico [87]. Para que unha suspensión sexa homoxénea hai que estudar o diluente, o tamaño de partícula da mostra e, no seu caso, o axente estabilizante axeitado [88,89]. Para solucionar o problema da homoxeneidade da suspensión empregáronse diferentes dispositivos, dende axitadores magnéticos e ultrasónicos [87,90-92] ata a adición de axentes estabilizadores [93].

## 6. ANÁLISE POR INXECCIÓN EN FLUXO

A Análise por Inxección en Fluxo (FIA) foi unha importante innovación metodolóxica na automatización de procesos analíticos [94]. Os métodos de inxección en fluxo, na súa forma actual, foron descritos por primeira vez a mediados dos anos setenta por Ruzicka e Hansen [95-97].

A metodoloxía FIA caracterízase porque o fluxo non está segmentado por burbullas de aire, a diferenza dos métodos clásicos de análise de fluxo continuo. A mostra líquida é inxectada ou insertada directamente nunha corrente de fluxo portador, e realízase un transporte da "porción" inxectada a través do sistema. Ademais do transporte, tamén poden ter lugar diferentes procesos físico-químicos (reacción química, diálise, extracción líquido-líquido, etc). A dispersión ou dilución parcial do analito no transporte pode ser perfectamente manipulada mediante un control das características xeométricas e hidrodinámicas do sistema. Prodúcese unha mestura incompleta pero reproducible, que dá lugar a un gradiente de concentración variable co tempo ó longo do sistema [95].

O sistema FIA pode acoplarse a un sistema de detección continuo que proporciona un sinal transitorio que é convintemente rexistrado. No momento da detección do sinal non se acadou o equilibrio físico (homoxeneización dunha porción do fluxo) nin o equilibrio químico (reacción incompleta). Debido a isto, o tempo de operación debe ser moi reproducible, posto que as medidas se realizan en condicións de non estabilidade, de maneira que, pequenas variacións do mesmo poden producir graves alteracións dos resultados.

Esta metodoloxía ten un fundamento simple, un dispositivo barato, unha sinxela maneira de operar e unha gran capacidade para lograr resultados exactos e precisos. A súa extremada versatilidade distingue este tipo de metodoloxía da maior parte das novas metodoloxías analíticas, xa que por unha parte pode adaptarse a numerosos métodos de detección e tratamentos de mostras sen cambios técnicamente complexos, e por outra, resulta enormemente sinxelo para un investigador analítico intervir directamente no seu funcionamento, lográndose así unha optimización do sistema técnico [94]. Ademais, a FIA presenta como vantaxes un gran incremento no número de mostras analizadas debido á diminución no tempo de análise, o emprego de volumes pequenos (da orde de  $\mu\text{L}$ ) e a eliminación de moitas interferencias.

### **6.1 Compoñentes dun sistema FIA**

Un sistema FIA componse principalmente dun sistema de bombeo, un sistema de inxección, un sistema de transporte/reacción, e un detector (Figura 7)[98,99].

- **Sistema de bombeo.** Establece o caudal o máis constante posible dunha ou varias disolucións de reactivos ou que actúan como simples portadores, ausente de impulsos e perfectamente reproducible. O máis habitual é traballar con bombas peristálticas, aínda que tamén se pode empregar un sistema de presión por gas ou simplemente a forza da gravidade.

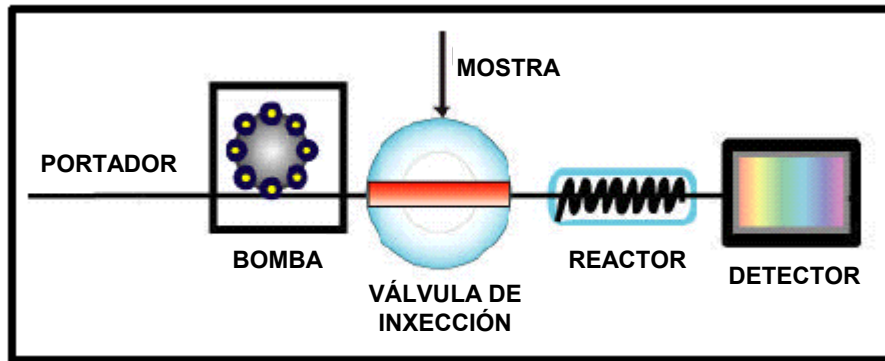
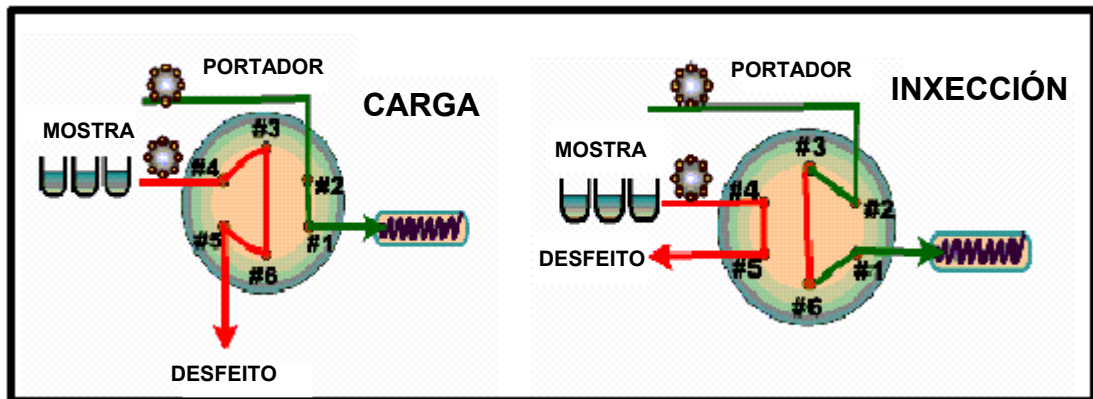


Figura 7. Esquema básico dun sistema FIA

- **Sistema de inxección.** Ten como misión situar unha cantidade perfectamente definida de mostra na corrente continua de fluxo. É importante que o volume introducido sexa exacto, reproducibile e variable dentro dunha ampla marxe. A entrada da mostra no fluxo portador ha de ser de xeito que non se creen perturbacións no mesmo. O manexo do sistema de inxección ha de ser doado, cómodo e rápido, de modo que permita unha elevada frecuencia de mostraxe. O sistema de inxección máis comúnmente empregado é a válvula hexagonal, que ten seis orificios, tres de entrada e tres de saída. Este sistema ten dúas posicións (Figura 8): a posición de carga e a posición de inxección. Na posición de carga, o bucle atópase comunicado coa entrada do fluxo que leva a mostra. A válvula debe manterse nesta posición ata asegurar que todo o bucle se enche, sen que existan no seu interior burbullas de aire. Mentras, o portador pasa pola válvula sen entrar en contacto coa mostra. Cando se cambia a posición da válvula a inxección, o portador queda conectado co bucle de xeito que arrastra o contido do mesmo, introducíndoo no sistema de fluxo onde se levarán a cabo as distintas etapas de tratamento da mostra de forma

automática. Nesta posición, a mostra pasa pola válvula sen entrar en contacto co bucle.



**Figura 8.** Esquema básico dunha válvula hexagonal nas súas posicións de carga e inyección

- **Sistema de transporte/reacción.** É unha zona de tubo onde ten lugar o transporte, con ou sen proceso adicional. Pode ser un tubo recto, en forma de serpentín, empacotado con materiais químicamente activos que transforman a mostra, ou ben incluír mesturadores ou módulos de separación nos que se produce un transporte de masa a través de interfases de tipo gas-líquido, líquido-líquido ou sólido-líquido. Constrúense con tubos flexibles, de materiais de alta inercia química e inalterables a cambios de temperatura nun amplo rango, de diámetro interno entre 0,3-0,8 mm.
- **Sistema de detección.** O detector adquire o sinal e transdúceo cando o analito pasa a través del. Poden ser detectores non destructivos (fluorímetros, fotómetros, potenciómetros, etc.) ou destructivos

(espectroscopía atómica). Un detector, para poder acoplarse a un sistema FIA, debe ter pequeno volume, baixo nivel de ruído, resposta rápida e lineal nunha ampla marxe de concentración e elevada sensibilidade.

Este sistema básico pode incluír outras configuracións con modificacións ou añadir outros elementos para conseguir obxectivos concretos.

## **6.2 Técnicas de separación e preconcentración en continuo**

Un dos obxectivos da Química Analítica é o desenvolvemento de procedementos en liña de separación e preconcentración, xa que a maioría destes procesos se realizan de forma manual, constituíndo unha importante fonte de erro no proceso analítico global. Pouco despois do desenvolvemento da análise por inxección en fluxo, os procesos de separación foron incorporados nos sistemas FIA. As primeiras técnicas de separación empregadas na análise por inxección en fluxo foron a diálise e a extracción con disolventes, seguidas da difusión gaseosa, o intercambio iónico e a electrodeposición. O emprego da inxección en fluxo para a preconcentración, concretamente, a precipitación en liña, foi introducido moito máis tarde. As técnicas FIA de separación e preconcentración resultaron ser un campo de gran interese, renovando a práctica tradicional nos laboratorios analíticos, posto que os procesos tradicionais de separación son tediosos e requiren moito tempo, implican numerosas etapas de operación coidadosa, con trasvases de disolucións duns recipientes a outros e a consecuente exposición da mostra á contaminación, especialmente na análise de trazas. A secuencia de separación constitúe habitualmente o

principal obstáculo do proceso analítico, e polo tanto, é o que máis urxentemente require a renovación.

Os métodos FIA de separación e preconcentración presentan un gran número de vantaxes con respecto ós seus análogos manuais [100]:

- Unha elevada frecuencia de mostraxe, entre 1 e 2 ordes de magnitude maior, con tempos de operación entre 10-200 segundos por determinación (incluíndo separacións).
- Un elevado factor de preconcentración, de 5 a 50 veces maior que os obtidos mediante os procedementos de preconcentración manuais.
- Baixo consumo de mostra, entre 1 e 2 ordes de magnitude menor, o que resulta de gran interés no caso de mostras valiosas, como o sangue, ou no caso de mostras que se recollen lonxe do laboratorio, e polo tanto han de ser transportadas ata o mesmo.
- Baixo consumo de reactivos, entre 1 e 2 ordes de magnitude menor. Esta característica é especialmente importante no caso da utilización de reactivos custosos.
- Reproducibilidade elevada, normalmente no rango 1-3 % (desviación estándar relativa).
- Baixo risco de contaminación, debido ó emprego de sistemas pechados e inertes na separación, o que resulta de gran interés no caso da análise de trazas.
- Non se precisa dun gran espacio no laboratorio nin se require o emprego de moitos utensilios. Excluíndo o detector, en moitos casos os sistemas FIA de separación e preconcentración apenas ocupan máis espacio que unha máquina de escribir.

### **6.2.1 Técnicas de separación e preconcentración en continuo empregando resinas quelantes**

As técnicas FIA de concentración basadas na adsorción, intercambio iónico ou formación de quelatos constituen un campo de gran interese e foron extensamente empregadas para aumentar a sensibilidade dos métodos analíticos. Na análise por inxección en fluxo, estas técnicas estiveron sempre ligadas ó emprego de minicolumnas. En 1980, publicouse o primeiro traballo no cal se insertaba unha minicolumna de intercambio iónico nun sistema FIA para a preconcentración e determinación de ions amonio [101]. A partir dese momento, abriuse un novo campo de investigación e desenvolvemento de técnicas FIA en columna.

Ademais de tódalas vantaxes descritas anteriormente para as técnicas FIA de separación e preconcentración, as técnicas FIA de retención en columna presentan unha gran versatilidade, debido á ampla gama de axentes quelantes e eluentes. Non obstante, tamén mostran unha serie de limitacións, entre as cales se poden citar as seguintes:

- Xeneración de diferentes graos de impedancia nas columnas, debido ás súas dimensións xeométricas, ó material que se introduza nas mesmas e á velocidade dos líquidos a través da columna.
- Necesidade de acondicionar o material de recheo da columna despois de cada elución.
- Cambios na composición do fluxo entre a etapa de retención e elución dos analitos, que pode causar problemas nalgúns detectores.

## **6.2.2 Consideracións prácticas no deseño e operación dos sistemas FIA de preconcentración en columna.**

### **6.2.2.1 Tipos de columnas**

O deseño da minicolumna inflúe no funcionamento e rendemento dos sistemas de preconcentración. O volume das minicolumnas empregadas na preconcentración en liña varía entre 15 e 400  $\mu\text{L}$ , mentras que o diámetro das mesmas oscila dende 1 a 7,5 mm. Para acadar gran eficiencia e baixos índices de consumo, o deseño óptimo da minicolumna depende de factores como o volume e caudal de paso de mostra, a capacidade do adsorbente para reter o analito, a especificidade e o tamaño de partícula do material de recheo e as posibles interferencias.

### **6.2.2.2 Carga da columna**

A velocidade de paso de mostra a través da minicolumna está limitada polas características cinéticas do material quelante e pola capacidade do sistema de manter estable o fluxo de disolución da mostra baixo presións elevadas. A pesar destas limitacións, a velocidade de paso de mostra a través da minicolumna nun sistema continuo é moito maior que nun sistema manual, onde as mostras pasan a través da minicolumna pola acción da gravidade. Unha excesiva velocidade de paso de mostra pode provocar unha retención incompleta dos analitos, debido ó tempo de contacto insuficiente entre os mesmos e o material quelante.

### **6.2.2.3 Elución**

A velocidade de elución é un factor crucial nalgúns sistemas de preconcentración, onde o fluxo de eluente se conecta directamente co

detector. Nestes casos, dita velocidade axústase xeralmente para obter a máxima sensibilidade. Ignorando os posibles requerimentos do detector con respecto ó fluxo de eluente, a velocidade óptima de elución dependerá da fortaleza coa que os analitos estean retidos no axente quelante, e da capacidade do eluente para arrastrar os analitos retidos. Outro factor importante na etapa de elución é a dirección do fluxo de eluente.

Os eluentes empregados na elución en continuo deben cumprir unha serie de requisitos: [100]

- Os eluentes débiles, que requiren un período longo de equilibrio, non poden ser empregados na elución en liña, posto que as elucións lentas provocan un decrecemento na sensibilidade.
- O eluente elexido non debe reaccionar nin degradar o material quelante ó menos durante 100 elucións.
- Os ácidos e bases concentrados, a pesar de que poden ser eluentes efectivos e non danar o material quelante, poden crear problemas nalgúns partes dos detectores. O sistema de nebulización dos equipos de absorción atómica, por exemplo, é sensible á corrosión, de xeito que a utilización de tales eluentes non é recomendada. Podería ser factible a dilución ou modificación en continuo do eluato, pero a expensas dunha perda na sensibilidade.

#### **6.2.2.4 Materiais de empaquetamento**

Os materiais de empaquetamento das columnas empregados satisfactoriamente nos procedementos de preconcentración convencionais non sempre se poden adaptar ós sistemas FIA de preconcentración en

columna. Ditos materiais, cando se queren aplicar á preconcentración en continuo, deben cumprir unha serie de requerimentos [100]:

- O inchamiento e encollemento do material de recheo cando cambia dunha forma a outra debe ser pequeno.
- As propiedades mecánicas do material deben ser axeitadas para resistir velocidades de fluxo lineais elevadas a través da columna, e para que a vida da columna sexa o mais longa posible. Os materiais fibrosos, por exemplo, son mecánicamente insatisfactorios.
- As propiedades cinéticas deben permitir tanto a doada retención do analito como a súa elución, cando se emprega o eluente axeitado. Os materiais que reteñen o analito tan fortemente que é preciso a destrucción de dito material para poder recuperalo non son axeitados para os sistemas de preconcentración FIA.

A aplicación da preconcentración en liña facendo uso de resinas quelantes está suficientemente demostrada. A Táboa 13 recolle unha revisión bibliográfica a partir do ano 2000 (para a cal se empregou a base de datos Chemical Abstract), da aplicación da preconcentración en continuo facendo uso de resinas quelantes.

**Táboa 13.** Técnicas de preconcentración de metais empregando resinas quelatantes

Ref.	Metal	Muestra	Técnica instrumental <sup>a</sup>	Resina	Eluente	Límite de detección (ng/l)	Factor de preconcentración	Frecuencia de mostraxe (mostras/h)
102	Cd, Cu, Pb	Auga de mar	ICP-AES	Chelex-100 <sup>a</sup>	2 M HNO <sub>3</sub>	-	5	-
103	Cr	Auga de mar	ICP-MS	Muromac Al <sup>a</sup>	0,7 M HNO <sub>3</sub>	20	11,5	12
104	Mn, Ni, Cu, Cd, Pb	Auga	ICP-MS	Toyopearl AF Chelate 650M <sup>b</sup>	1 M HNO <sub>3</sub>	0,06-1,1	-	-
105	Co, Ni, Cd, Pb, etc	Auga de mar	ICP-MS	Muromac Al <sup>a</sup>	0,7 M HNO <sub>3</sub>	10-29	3,2-6,7	7
106	Cd	Auga	GFAAS	Muromac Al <sup>a</sup>	2 M HNO <sub>3</sub>	0,2	-	7
107	Cd	Auga	GFAAS	Silica xel <sup>b</sup>	2 M HNO <sub>3</sub>	60	2	33
108	Cd, Cu, Ni, Zn, Mn	Auga	ICP-MS	Toyopearl AF Chelate 650M <sup>b</sup>	1,5 M HNO <sub>3</sub>	1,4-86	-	6
109	V	Auga de mar	ICP-AES	Chelex 100 <sup>a</sup> Chelamina <sup>c</sup>	HNO <sub>3</sub> -HCl (2 M-0,5 M)	-	20 (Chelex-100) 50 (Chelamina)	-
110	Cd	Mexillón, leite	FAAS	Pelita de vidro <sup>d</sup>	2 M HNO <sub>3</sub>	7 x 10 <sup>5</sup>	27	63
111	Cd	Auga	ICP-AES	DPTH-xel <sup>b</sup> TS-xel <sup>b</sup>	1% HNO <sub>3</sub> , 1% HCl 2,5 % tiourea	1100 4300	86 62	40 24
112	Bi, Cd, Pb	Oirina	GFAAS	Muromac Al <sup>a</sup>	HNO <sub>3</sub> , 20% (v/v)	2-13	-	10
113	Cd, Pb, Mn, Cu, Fe	Auga	ICP-OES GFAAS	IC-Chelate <sup>e</sup>	1 M HNO <sub>3</sub>	3,4-122 1-53	-	50-60
114	Co	Auga, vitamina B12	FAAS	Alúmina <sup>f</sup>	Etolol	20	125	-
115	Co	Auga	FAAS	XAD-2 <sup>g</sup>	1 M HCl	1250-390	79-223	51-18
116	Pt	Auga, chan, plantas	GFAAS	Dowex 1x8-200 <sup>h</sup>	2 M HNO <sub>3</sub>	1000	14	29
117	Fe	Auga, peixe	UV-VIS	3M Empore <sup>e</sup>	2 M HCl	-	-	9
118	Cu	Auga	FAAS	Estireno-divinilbenceno	2 M HCl	1100	21	25

Ver anexo A

<sup>a</sup> Grupos iminodiacetato

<sup>b</sup> sílica xel funcionalizada con 1,5-bis (di-2-piril) imetilien tiocarbhidrazida

<sup>c</sup> inmovilización do ligando pentaamina nun polímero orgánico

<sup>d</sup> inmovilización de 8-hidroxiquinolina sobre pente de vidro

<sup>e</sup> sílica xel funcionalizada con metilfosfocelato

<sup>f</sup> alúmina funcionalizada con 2-nitroso-1-naftol

<sup>g</sup> XAD-2 funcionalizada con sal 8-Nitroso

<sup>h</sup> funcionalización con 1,5-bis(2-pirilil)-3 sulfonilmetilien tiocarbhidrazida

<sup>i</sup> polímero estireno-divinilbenceno funcionalizado

### **6.3 Métodos continuos de preparación de muestras sólidas**

A pesar de todo o progreso no cal se viu inmersa a Química Analítica nas últimas décadas, a etapa de preparación da mostra segue a ser un dos maiores obstáculos do proceso analítico. A maior parte dos procedementos de tratamento da mostra lévanse a cabo de forma manual, resultando laboriosos, complexos, difíciles de controlar sistemáticamente e susceptibles á contaminación, particularmente cando o número de mostras implicado é elevado. Constitúen, polo tanto, unha importante fonte de erro no proceso analítico global. Os sistemas de fluxo continuo, e en concreto, a análise por inxección en fluxo, demostraron resultar de gran utilidade na automatización e aceleración do tratamento previo da mostra [119].

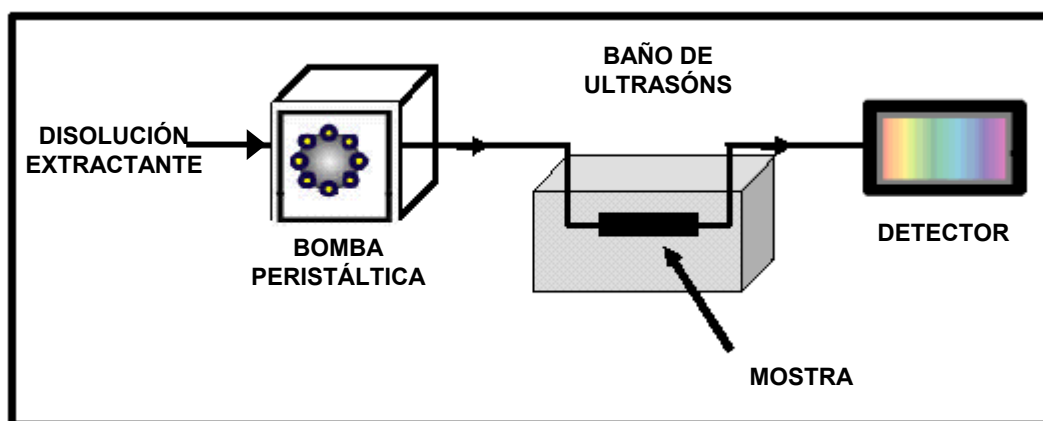
#### **6.3.1 Tratamento da mostra en continuo empregando a enerxía de ultrasóns**

O emprego dos ultrasóns como enerxía auxiliar para a lixiviación foi extensamente aplicado á extracción dun gran número de analitos de diferentes matrices sólidas. A pesar de que este tipo de enerxía se empregou satisfactoriamente fronte a outros métodos para acelerar a lixiviación manual das mostras sólidas, apenas se utilizou para dito pretratamento en sistemas continuos, a pesar de acelerar o proceso de tratamento da mostra de xeito considerable.

O recipiente da mostra empregado na lixiviación continua asistida por enerxía de ultrasóns debe permitir o paso da disolución lixivante e evitar fugas da mesma, que se ven favorecidas pola acción dos ultrasóns. Existen fundamentalmente dous tipos de recipientes para a mostra. Un deles consiste nunha cela pequena dunha soa peza, con orificios de entrada e saída equipados con conectores para permitir a inserción de dito recipiente no

sistema de inxección en fluxo. A introducción da mostra sólida neste tipo de cela é lenta e laboriosa, debido ó pequeno tamaño da mesma. O outro tipo de recipiente consiste nunha cela desmontable, similar á primeira, pero en dúas partes. Unha destas partes emprégase para pesar a mostra, e únese despois á outra por medio duns parafusos que actúan como conectores. O material que se emprega habitualmente para a fabricación destas celas adoita ser aceiro inoxidable ou metacrilato [41].

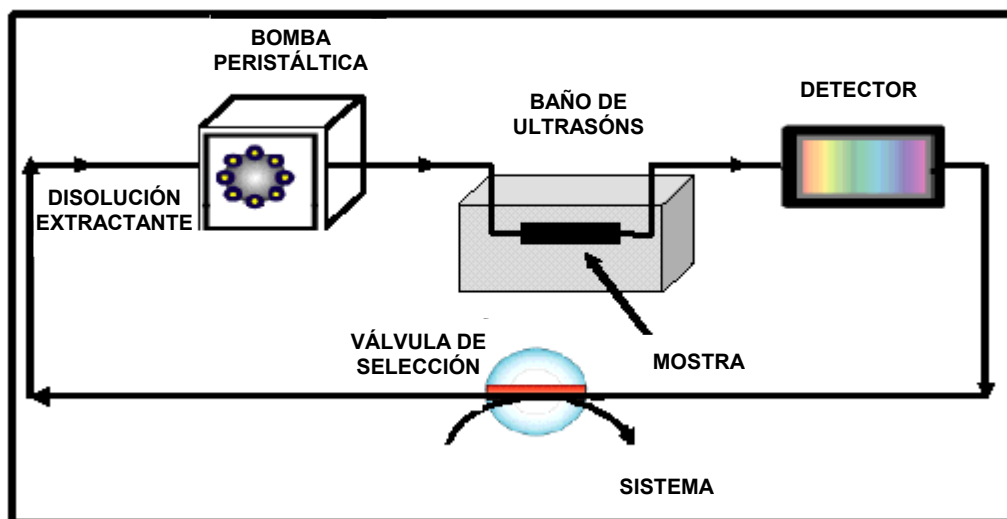
O deseño do sistema FIA para a lixiviación en continuo da mostra sólida facendo uso da enerxía de ultrasóns depende da cinética da extracción. Poden plantexarse tres tipos de configuración [120]. Cando a cinética de extracción é rápida pode empregarse un sistema aberto, posto que non se precisa de tanto tempo para levar a cabo a extracción do analito. A disolución lixivante pasa a través da cela da mostra a un caudal baixo, o analito extraído é insertado no fluxo de portador da disolución extractante e transportado cara o detector (Figura 9).



**Figura 9.** Sistema FIA de extracción continua empregando enerxía de ultrasóns para extraccións de cinética rápida.

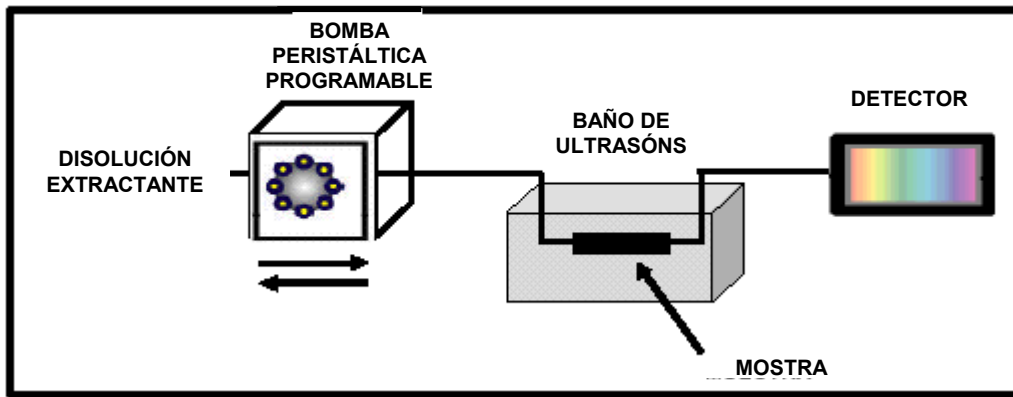
Cando a cinética da extracción é lenta, a disolución lixivante debe pasar a través da cela que contén a mostra sólida repetidas veces, co cal o caudal debe ser elevado. O paso repetido da disolución lixivante a través da mostra pode levarse a cabo de dúas maneiras diferentes:

- Empregando un circuito pechado e unha bomba peristáltica para propulsar a mesma porción de lixivante a través da cela. Despois do tempo requerido para a extracción, a válvula de selección permite a inserción do extracto que contén o analito no sistema de fluxo que o vai conducir ó detector (Figura 10).



**Figura 10.** Sistema FIA pechado de extracción continua empregando enerxía de ultrasóns para extraccións de cinética lenta.

- Empregando unha bomba peristáltica programable que permita o cambio da dirección do fluxo cada certo tempo, de xeito que se poida empregar un pequeno volume de disolución extractante, que circulará en ambos sentidos (Figura 11). Con esta configuración acádase unha maior eficacia na extracción, posto que o cambio na dirección do fluxo evita a compactación da mostra dentro da cela.



**Figura 11.** Sistema FIA de flujo bidireccional para a extracción continua empregando enerxía de ultrasóns para reaccións de cinética lenta.

A pesar de tódalas vantaxes que proporciona a enerxía de ultrasóns no tratamento da mostra sólida, hai que ter en conta unha serie de limitacións, como a necesidade de empregar mostras en pó ou a aparición de sinais do branco elevadas, debido á extracción total ou parcial doutros analitos presentes na mostra. Non obstante, os dous inconvintes máis importantes da extracción con ultrasóns son [120]:

- Resultados non reproducibles en mostras do mesmo tipo, debido a diferencias no tamaño de partícula ou na composición da superficie.
- Escasez de materiais de referencia con diferentes concentracións de analito, o que dificulta o traballo nos laboratorios de control rutinario.

A aplicación dos sistemas continuos de extracción asistidos por enerxía de ultrasóns foi demostrada con estudos realizados en diferentes mostras sólidas, como mostra a revisión bibliográfica dos últimos 5 anos que recolle a Táboa 14 (base de datos Chemical Abstract). Pode concluirse que os sistemas FIA de extracción continua asistida por ultrasóns resultaron ser de gran axuda no tratamento de mostras sólidas, proporcionando uns excelentes resultados.

**Táboa 14.** Aplicación dos sistemas continuos de extracción asistidos por enerxía de ultrasóns

Referencia	Análito	Mostra	Técnica Instrumental*	Extractante	Tempo de sonicación (min)
121	Fe	Mexillón	FAAS	HNO <sub>3</sub> -HCl (3M-3M)	5
122	Cu	Mexillón	FAAS	HNO <sub>3</sub> -HCl (3M-3M)	5
123	Cr	Chan	Espectrofotometría	0,04 M NH <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub>	10
124	N-metilcarbamatos	Chan e alimentos	Fluorescencia	H <sub>2</sub> O	2
125	NPAH <sup>a</sup>	Chan	CG-MS-MS	Diclorometano	10
126	Herbicidas	Chan e sedimentos	CG (detección UV)	H <sub>2</sub> O	13
127	Fe	Carne	FAAS	HNO <sub>3</sub> -HCl (3M-3M)	5
128	Cd, Pb	Plantas	GFAAS	8 % HNO <sub>3</sub>	5
129	Mn	Moluscos e peixes	FAAS	1,5 M HNO <sub>3</sub>	0,5
130	Ca, Mg, Fe, Cu, Zn	Alimento de animais	FAAS	10 % HNO <sub>3</sub>	18
131	Ca	Moluscos e peixes	FAAS	3 M HNO <sub>3</sub>	0,5
132	Fe	Leite en pó	FAAS	H <sub>2</sub> O	0,5
133	Colistín	Alimentos	HPLC (detección flourimétrica)	H <sub>2</sub> O	7
134	Zn	Carne	FAAS	0,75 M (HNO <sub>3</sub> ou HCl)	0,5
135	NH <sub>3</sub>	Cigarillos	Espectrofotometría	1 M NaOH	7

\* Ver anexo A.

<sup>a</sup> Hidrocarburos aromáticos nitropolíedicos

#### 6.4 Acoplamento FIA-AAS

En principio, calquera sistema de detección podería adaptarse para unha detección en continuo, e polo tanto, podería empregarse como un detector en FIA. Non obstante, algúns detectores son inherentemente máis axeitados que outros, sendo, polo tanto, máis frecuentemente empregados.

O acoplamento entre os sistemas de inxección en fluxo coas técnicas de absorción atómica foi moi utilizado. O esquema básico dun sistema deste tipo é moi sinxelo. O portador, bombeado de maneira continua, é aspirado ata o nebulizador. A inserción da mostra no portador dá lugar ó seu transporte cara o nebulizador. Non se require dunha cela de fluxo, característica doutros sistemas de detección.

Entre as vantaxes que proporciona o acoplamento da inxección en fluxo coas técnicas de absorción atómica poden citarse as seguintes [136]:

- A dispersión á hora da introducción da mostra nun espectrofotómetro de absorción atómica é menor cando se acopla ó mesmo un sistema de inxección en fluxo.
- Empréganse pequenos volumes de mostra. En xeral, o volume de mostra inxectado oscila entre 10 e 200  $\mu\text{L}$ . Isto confirelle ás técnicas FIA-absorción atómica unha maior sensibilidade.
- O problema da viscosidade das mostras no nebulizador redúcese considerablemente. Poden introducirse na corrente de portador mostras con elevado contido salino, sen ningún tipo de problemas.
- Durante a aspiración, o sistema lávase continuamente.
- Poden minimizarse as interferencias modificando as características físicas e hidrodinámicas do sistema.

- Pode empregarse calquera tipo de reactivo, debido á facilidade coa cal se introducen os mesmos no sistema. A inserción de reactivos pode levarse a cabo de tres maneiras diferentes: por disolución do mesmo na corrente de portador; a través dunha canle, anterior ou posterior á inxección da mostra; ou a través de zonas de unión en calquera punto do sistema.
- O sistema FIA permite a mostraxe repetitiva a unha velocidade considerable.

O caudal de portador determina o tempo de resposta, sensibilidade, precisión e contaminación entre mostras no nebulizador. Os estudos realizados ata o momento demostraron que a velocidade do caudal a través do sistema FIA non pode ser maior que o caudal de aspiración do nebulizador, posto que pode conducir a resultados erróneos.

O primeiro traballo que introduciu no título as palabras “inxección en fluxo” e que empregou a absorción atómica apareceu en 1979 [137]. A partir dese momento, apareceron moitos outros traballos nos cales se empregaba esta técnica de detección incorporando a metodoloxía FIA. Vidal e col. [138] empregaron esta metodoloxía na determinación de cobre, calcio e ferro en alimentos de animais. A aplicación das técnicas de inxección en fluxo acopladas á absorción atómica tamén foi empregada na determinación de cromo, cobre, níquel e cobalto en auga [139], cadmio e chumbo en mostras biolóxicas e ambientais [140], cobalto e níquel en mostras de chan e pelo [141], cobre e níquel en mostras biolóxicas e ambientais [142], cadmio en alimentos [143] e cromo en auga [144].

## 7. TÉCNICAS DE OPTIMIZACIÓN DO PROCESO ANALÍTICO: DESEÑOS EXPERIMENTAIS

### 7.1 Introducción

O proceso de deseño e optimización experimental consta de tres etapas fundamentais [145]:

1. Selección das variables que van influir de forma significativa sobre o sistema.
2. Selección da función de resposta ou función obxectivo para a avaliación da superficie de resposta.
3. Optimización experimental, que pode ser de dous tipos:
  - **Tipo Analítico** (Tipo Simultáneo): están representados principalmente polo deseño factorial e permiten avaliar a localización do óptimo pola derivación da ecuación "superficie de resposta".
  - **Tipo Caixa Negra** (Tipo Secuencial): están representados principalmente polo Método Simplex Xeométrico e permiten un descoñecemento total do sistema a estudar, xa que cada experimento se establece a partir da avaliación dos resultados dos experimentos anteriores.

### 7.2 Métodos de optimización

A optimización con deseños experimentais presenta unha vantaxe con respecto á optimización variable a variable [146]. Este último método consiste en manter fixas tódalas variables que afectan ó sistema, excepto unha, nuns valores de partida elexidos en base ó noso coñecemento do sistema, ou no caso de non ter ese coñecemento, en base á intuición. Unha vez establecidos

os valores de partida das variables, realízanse unha serie de experimentos cambiando o valor da variable que non se fixou, e elíxese para esa variable o valor que proporciona o mellor resultado. A continuación repítase a operación para cada unha das outras variables, ata que o proceso de búsqueda nos conduza a un resultado óptimo.

Os inconvenientes da optimización variable a variable foron a causa do plantexamento doutras técnicas de optimización, como é o caso dos deseños experimentais, que proporcionan un resultado excelente evitando tódalas desvantaxes.

### **7.3 Deseño factorial**

O deseño factorial é un tipo de deseño experimental moi coñecido que se adoita empregar na investigación das superficies de resposta multifactor.

Para realizar un deseño factorial completo, o investigador selecciona un número fixo de niveis para cada unha das variables do sistema (factores), para realizar a continuación os experimentos tendo en conta tódalas combinacións posibles de ditas variables.

Para coñecer un sistema é preciso establecer as características da superficie de resposta representadas fronte a un ou máis factores. Estes deseños, ademais de permitir variar simultaneamente de forma sistemática varios factores en cada experimento, revelan a existencia de interacción entre eles cando están presentes nun sistema.

Históricamente, os deseños factoriais foron introducidos por R.A. Fisher, que demostrou que tódolos factores de interés podían ser variados simultaneamente, ademais de poder ser estimados os efectos dos factores individuais e as súas interaccións, por tratamentos matemáticos.

Os parámetros que describen un deseño son o número de factores involucrados ( $k$ ) e o número de niveis de cada factor ( $m$ ), sendo  $m^k$  o número de combinacións de factores xerado para un deseño factorial completo. Os deseños máis empregados son os deseños factoriais completos a dous niveis, nos cales se lles dá a cada variable dous valores a ambos lados dun valor central ou básico. A maior limitación dos deseños factoriais completos é o elevado número de experimentos que é preciso realizar. Por exemplo, para un deseño de 10 factores a dous niveis, sería preciso levar a cabo  $2^{10}$  experimentos, é dicir, 1024 experimentos, o que converte este deseño en impracticable. Non obstante, existen diferentes maneiras de reducir o número de experimentos considerablemente [146].

### **7.3.1 Deseños factoriais de Screening. Deseños de Plackett-Burman**

Cando un sistema é pouco coñecido resulta moi difícil decidir cales son as variables que se deben considerar á hora de optimizalo. Algunhas destas variables poden resultar indiscutibles, aínda que tampouco se poden descartar outras que aparentemente sexan menos evidentes, posto que non se coñece a súa influencia na resposta do sistema. A solución máis obvia sería consideralas todas, pero deste xeito, o número de experimentos a realizar faría inviable a aplicación dun deseño factorial completo. Os deseños factoriais de Screening teñen como obxectivo distinguir entre un número de factores aqueles que son influíntes no sistema [147].

Dentro dos deseños factoriais de Screening os máis empregados son os deseños de Plackett-Burman. Estes deseños permiten reducir considerablemente o número de experimentos a realizar e proporcionan datos

de gran utilidade, como o coñecemento das variables que afectan significativamente ó sistema.

A matriz de deseño constrúese a partir dunha primeira fila dada no traballo orixinal de Plackett-Burman [148,149] no cal están dispoñibles os experimentos para 8,12,16... variables en bloques de 4 ata 100, é dicir, combinacións de factores que son múltiplos de 4. Esta fila vaise desplazando cíclicamente nunha posición,  $N-2$  veces, ata completar a matriz cuxa última fila está formada polos niveis inferiores de tódolas variables.

Para manter a ortogonalidade é preciso que o número de veces que aparecen os niveis altos sexa igual ó número de veces que aparecen os niveis baixos. Dispoñendo da primeira fila, a construción da matriz é sinxela, aínda que non é aplicable a calquera número de variables, por cuestións de ortogonalidade. Cando o número de variables é inferior a 7 e se quere aplicar un deseño de Plackett-Burman (o número de variables mínimo nestes deseños é 7) é preciso considerar que as variables sobrantes son "falsas" ou "postizas". Estas variables darán uns coeficientes na ecuación do modelo moi pequenos ou nulos. Como se reduce o número de experimentos, en relación ó deseño factorial completo, tamén se perden graos de liberdade, feito que provoca un efecto de confusión para cada variable respecto dos termos de interacción. Isto mesmo ocorre para as variables "falsas", e polo tanto, os seus coeficientes inclúen efectos de interacción dos demais. Estes efectos van proporcionar información de dous tipos:

- Saber ata que punto as interaccións son despreziables
- Se non existen interaccións, é unha maneira de avaliar os erros puramente experimentais

Polo tanto, a partir das variables "falsas" vaise obter información sobre os efectos de confusión das variables verdadeiras. Se se incluiu máis dunha variable "falsa", terase coñecemento acerca da existencia ou non de interaccións [150].

Neste traballo de investigación, o paquete estatístico Statgraphics Plus versión 5.1 é quen proporciona a matriz do deseño[151].

Unha vez coñecidas as variables que afectan ó sistema pode definirse o deseño factorial. Este deseño aforrará tempo e cartos, xa que gracias a el se reduce considerablemente o número de experimentos a realizar para a resolución do sistema.

# **XUSTIFICACIÓN E OBXECTIVOS**



## XUSTIFICACIÓN E OBXECTIVOS

O interese da determinación dos metais en mostras de alimentos ten importancia dende o punto de vista nutricional e tóxico. Para poder diferenciar entre o carácter nutricional ou tóxico dun metal é preciso coñecer a concentración na cal se atopa o mesmo nos alimentos, posto que, probablemente todos os metais son tóxicos se se inxiren en concentracións elevadas. Nalgúns casos, ademais, é posible obter información de carácter medioambiental a través do coñecemento da concentración de metais en alimentos, como é o caso dos moluscos e peixes e vexetais, coñecidos como bioindicadores ambientais. Estas razóns xustifican a necesidade dun control riguroso do contido de metais en alimentos.

A maior parte das técnicas analíticas para a determinación de metais en mostras sólidas requiren a obtención dunha disolución adecuada das mesmas antes da súa inserción no instrumento de medida. A maioría destes procesos lévanse a cabo de xeito manual e son tratamentos complexos, tediosos e difíciles de controlar sistemáticamente, resultando así a fonte de erros e problemas de contaminación máis frecuente no proceso analítico. Por outra parte, o nivel de concentración no cal moitos analitos de interese se atopan nas mostras (orde de  $\mu\text{g/g}$  ou menor) fai imposible a determinación directa dos mesmos polas técnicas máis habituais. Este feito obriga a introducir unha etapa de preparación da mostra na cal o analito se concentra con respecto á concentración que presenta na mostra orixinal.

A análise por inxección en fluxo demostrou ser unha ferramenta moi útil na automatización e miniaturización dos procesos incluídos na primeira etapa do

proceso analítico. A metodoloxía FIA caracterízase por ter un fundamento simple e un dispositivo económico e doado de manexar, que proporciona resultados exactos e precisos, posto que a manipulación da mostra é mínima. Trátase dunha técnica rápida na cal o consumo de mostra e reactivos é moito menor que nas metodoloxías discontinuas.

Neste traballo de investigación preténdese optimizar, desenvolver e propoñer metodoloxías analíticas automáticas basadas na análise por inxección en fluxo (FIA), que permitan realizar o tratamento de diferentes tipos de mostras sólidas de natureza alimenticia empregando a enerxía de ultrasóns, preconcentrar o extracto ácido facendo uso de resinas quelantes e determinar os metais (cadmio, chumbo, cobalto, cromo e níquel) mediante espectrometría de absorción atómica con chama (FAAS). A principal innovación que aportan estes sistemas é a automatización do tratamento previo da mostra e da preconcentración. A automatización do tratamento previo da mostra permite evitar gran cantidade de inconvenientes derivados dos procesos de dixestión e extracción ácida levados a cabo de forma manual, como son o elevado tempo que require o proceso e o emprego de ácidos concentrados. Con respecto á automatización da preconcentración, a metodoloxía FIA permite obter factores de preconcentración de 5 a 50 veces maiores que os obtidos mediante os procedementos manuais. A mostra sólida introdúcese nunha columna de vidro comercial, que se conecta ó sistema continuo e se sumerxe no baño de ultrasóns. A disolución extractante circula a través da columna que contén a mostra, impulsada por unha bomba peristáltica. Unha vez extraído o metal, o extracto ácido mestúrase cunha disolución tampón que permite regular o seu pH e faise pasar a través dunha minicolumna de vitón, fabricada no laboratorio e empaquetada cunha resina

quelante, onde se vai reter o metal. Finalmente, o metal retido elúese cun determinado volume de ácido clorhídrico que é transportado cara o detector (FAAS) onde se monitoriza de forma continua.

Os **obxectivos** plantexados para a realización deste traballo de investigación foron os seguintes:

- Diseñar e optimizar dispositivos en continuo que permitan extraer cuantitativamente o cadmio, chumbo, cobalto, cromo e níquel das mostras sólidas empregando a enerxía de ultrasóns. Os tipos de matrices sólidas nas que se estudia a extracción destes metais son:
  - Moluscos e peixes
  - Vexetais
  - Carnes
  - Froitos secos
  - Legumes
  - Cereais e derivados
  - Queixos e derivados
  
- Diseñar e optimizar dispositivos en continuo que permitan levar a cabo a preconcentración dos metais contidos no extracto ácido da mostra, empregando resinas quelantes. As resinas quelantes comerciais nas que se estudia a preconcentración dos metais son:
  - Chelite P, con grupos aminometilfosfónico
  - Serdolif Che, con grupos iminodiacetato
  - Duolite GT-73, con grupos tiol

- Diseñar e optimizar sistemas FIA que incorporen os dispositivos de extracción e preconcentración e que permitan a detección por FAAS de maneira continua de cada metal extraído das mostras anteriormente citadas.
- Establecer e propoñer novas metodoloxías analíticas automáticas que permitan a determinación rutinaria do cadmio, chumbo, cobalto, cromo e níquel en mostras sólidas de natureza alimenticia.
- Aplicar os métodos propostos á determinación de cadmio, chumbo, cobalto, cromo e níquel en mostras sólidas reais de natureza alimenticia.

## **PARTE EXPERIMENTAL**



---

# 1. DESCRIPCIÓN DOS SISTEMAS DE FLUXO CONTINUO PARA OS PROCESOS DE PRECONCENTRACIÓN E EXTRACCIÓN DOS METAIS DAS MOSTRAS SÓLIDAS ASISTIDOS POR ENERXÍA DE ULTRASÓNS.

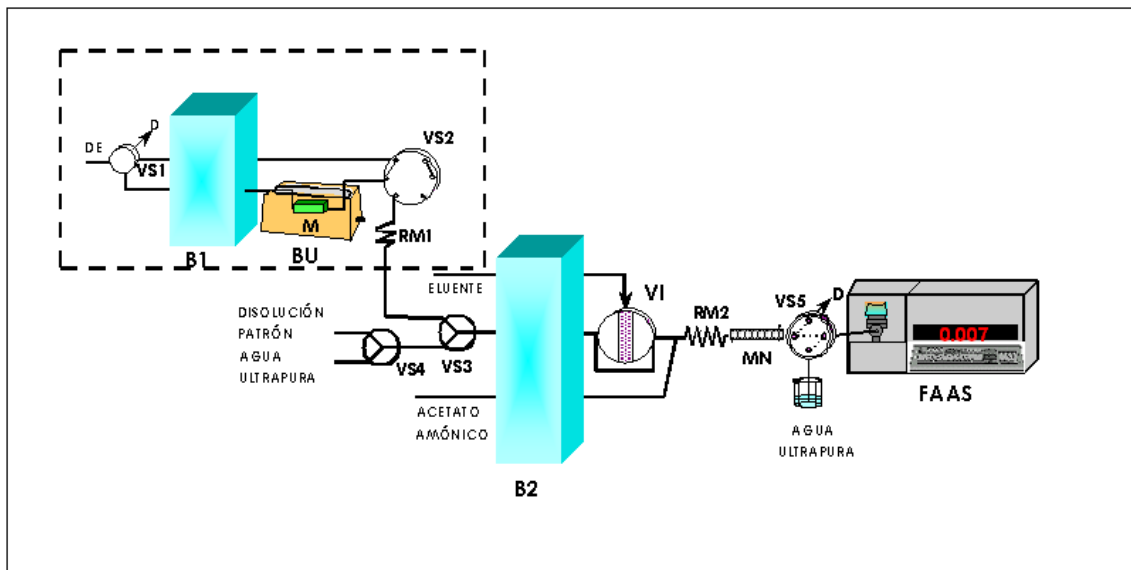
Este traballo de investigación está enfocado no estudio da extracción do cadmio, chumbo, cobalto, cromo e níquel de mostras sólidas de natureza alimenticia e preconcentración de ditos metais empregando para tal fin resinas quelantes comerciais, para a posterior determinación por Espectrometría de Absorción Atómica con Chama. Para isto, deseñáronse dispositivos FIA nos que se poden distinguir tres etapas fundamentais:

- Extracción continua dos metais da mostra sólida asistida por enerxía de ultrasóns.
- Preconcentración dos metais contidos no extracto mediante o emprego dunha resina quelante.
- Elución dos metais retidos na resina e conducción dos mesmos ó sistema de detección (FAAS) mediante un líquido portador.

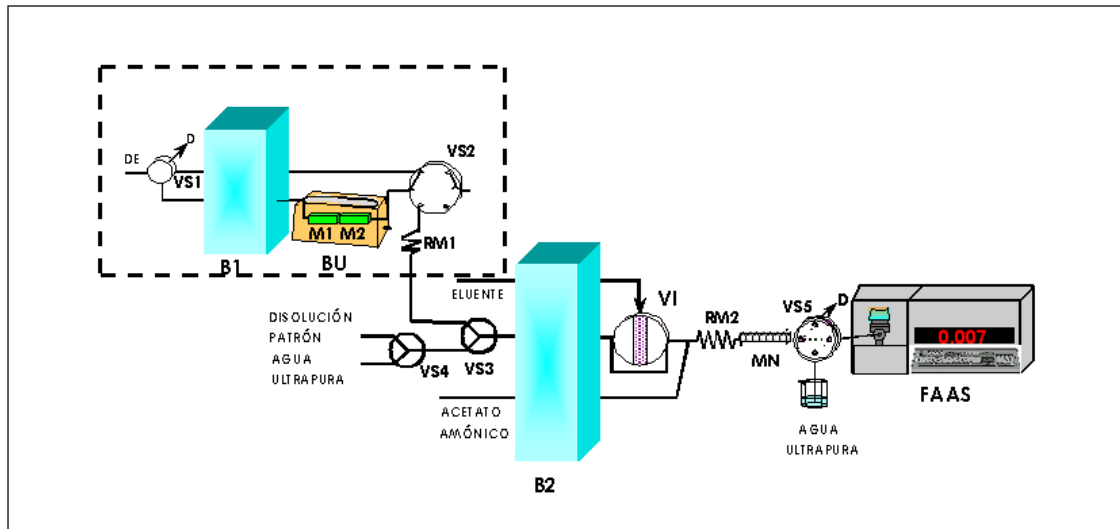
Deseñáronse dous tipos de dispositivos FIA que se diferencian na incorporación de unha ou dúas minicolumnas conectadas en serie no baño de ultrasóns. O sistema FIA máis sinxelo, é dicir, aquel que contén unha única minicolumna, empregouse na determinación de cadmio, cobalto, cromo e níquel nas diferentes matrices sólidas, e na determinación de chumbo en mostras de peixes e moluscos (Figura 12). A necesidade de incorporar outra

minicolumna de extracción conectada en serie débese á baixa concentración do chumbo no resto das mostras obxecto de estudo, excepto moluscos e peixes (Figura 13).

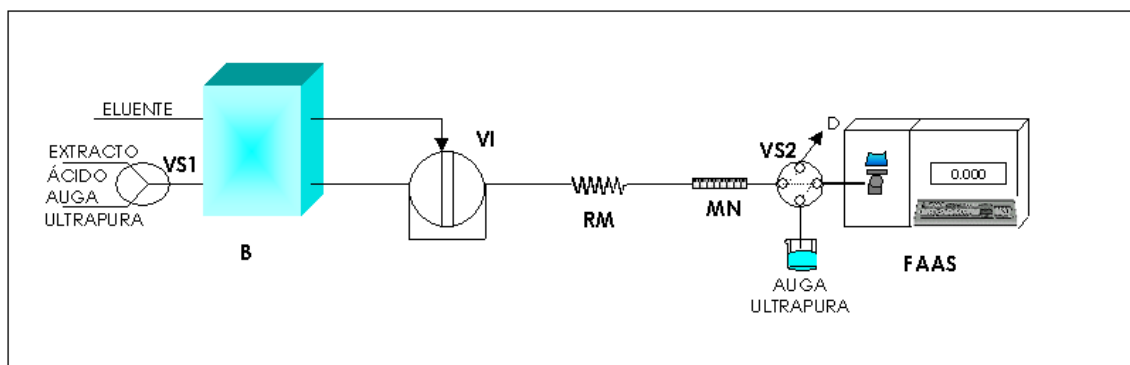
Para levar a cabo a optimización da etapa de preconcentración deseñouse o sistema FIA que se describe na Figura 14.



**Figura 12.** Sistema FIA empregado para a determinación de cadmio, cobalto, cromo e níquel en mostras sólidas de natureza alimenticia e chumbo en peixes e moluscos. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.



**Figura 13.** Sistema FIA empleado para la determinación de chumbo nas diferentes mostrás de naturaleza alimenticia, agás na matriz de peixes e moluscos. DE, disolución extractante; DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1 e M2, minicolumnas que conteñen a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inyección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chapa.



**Figura 14.** Sistema FIA empleado para la preconcentración en continuo dos diferentes metais. B, bomba peristáltica; VS1 e VS2, válvulas de selección; VI, válvula de inyección; RM, reactor de mestura; MN, minicolumna que contén a resina quelante; D, desfeito e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chapa.

## 1.1 Instrumentación e reactivos

### Extracción continua dos metais da mostra sólida

#### Aparatos

- Bomba peristáltica GILSON MINIPULS-3, con oito canles e selector de velocidade.
- Válvulas de baixa presión Rheodyne modelo 5041.
- Tubos para bomba peristáltica de vitón de 43,5 cm x 1,422 mm d.i.
- Tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm d.i. para o circuito FIA.
- Minicolumna de vidro OMNIFIT de 100 mm x 3 mm d.i., con dous terminais fixos e 700  $\mu$ L de volume de leito.
- Baño de ultrasóns SELECTA de 550 W de potencia, con temperatura e tempo programable e unha frecuencia de 40 KHz.

#### Reactivos

- Auga ultrapura de 18,2  $M\Omega \cdot \text{cm}$  de resistividade específica, obtida polo sistema Milli-Q (Millipore Corp.).
- $\text{HNO}_3$  (Scharlau Chemie, Barcelona): 70%,  $d=1,40 \text{ g/mL}$ ,  $P_m=63,01 \text{ g/mol}$ .
- $\text{HCl}$  (Scharlau Chemie, Barcelona): 37%,  $d=1,19 \text{ g/mL}$ ;  $P_m=36,46 \text{ g/mol}$ .

### Preconcentración dos metais contidos no extracto

#### Aparatos

- Bomba peristáltica GILSON MINIPULS-3, con oito canles e selector de velocidade.
- Válvulas de baixa presión Rheodyne modelos 5041
- Tubos para bomba peristáltica de vitón, de 43,5 cm x 1,422 mm i.d.

- Tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm d.i., para o reactor de mestura e as conexións do sistema.
- Minicolumna que contén a resina quelante, construída de tubos de vitón, de 43,5 cm x 1,016 mm i.d., 43,5 cm x 1,524 mm i.d. e 43,5 cm x 2,057 mm i.d.

### **Reactivos**

- Resina quelante CHELITE P, con grupos aminometilfosfónicos (Serva Electrophoresis GmbH, Alemania).
- Resina quelante SERDOLIT CHE, con grupos iminodiacético (Serva Electrophoresis GmbH, Alemania).
- Resina quelante DUOLITE GT-73, con grupos tiol (Supelco, Madrid).
- Acetato amónico (Merck, Alemania):  $M_r=77,08$  g/mol.
- Cloruro amónico (Merck, Alemania): 53,49 g/mol.

### **Elución dos metais contidos no extracto e condución do eluato ó sistema de detección**

#### **Aparatos e instrumentación analítica**

- Bomba peristáltica GILSON MINIPULS-3, con oito canles e selección de velocidade.
- Tubos para bomba peristáltica de vitón, de 43,5 cm x 1,422 mm i.d.
- Tubo de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm de d.i. para o circuito FIA.
- Válvulas de baixa presión Rheodyne modelos 5041 e 5020 (válvulas de selección e inxección, respectivamente).

- Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer, modelo 5000, con chama aire-acetileno, sistema de nebulización de bola de impacto, isqueiro de 10 cm e unha lámpada de deuterio como corrector de fondo. O espectrofotómetro está conectado a un rexistrador de sinal cun rango de 50 mV.
- Lámpadas de cátodo oco para cada metal.

As condicións de medida no espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 5000, recóllense na Táboa 15.

**Táboa 15.** Condicións de medida no espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer, modelo 5000, para cada metal.

Elemento	$\lambda$ (nm)	Rendixa (nm)	Tipo de chama aire-acetileno	Tipo de lámpada	Intensidade (mA)
Cd	228,8	0,7	Oxidante	Cátodo oco	8
Pb	283,3	0,7	Oxidante	Cátodo oco	15
Co	240,7	0,2	Oxidante	Cátodo oco	30
Cr	357,9	0,7	Reductora	Cátodo oco	30
Ni	232,0	0,2	Oxidante	Cátodo oco	30

### Reactivos

- Auga ultrapura de 18,2 M $\Omega$ ·cm de resistividade específica, obtida polo sistema Milli-Q (Millipore Corp.).
- HCl (Scharlau Chemie, Barcelona): 37%, d=1,19 g/mL; Pm=36,46 g/mol.
- Disolución patrón de cadmio 1 mg/mL (0,5 N HNO<sub>3</sub>). Acros Organics, New Jersey, USA.
- Disolución patrón de chumbo 1 mg/mL (2 % HNO<sub>3</sub>). Acros Organics, New Jersey, USA.

- Disolución patrón de cobalto 1 mg/mL (2 % HNO<sub>3</sub>). Acros Organics, New Jersey, USA.
- Disolución patrón de cromo 1 mg/mL (2 % HCl). Acros Organics, New Jersey, USA.
- Disolución patrón de níquel 1 mg/mL (2 % HNO<sub>3</sub>). Acros Organics, New Jersey, USA.

### **1.2 Preparación das mostrás**

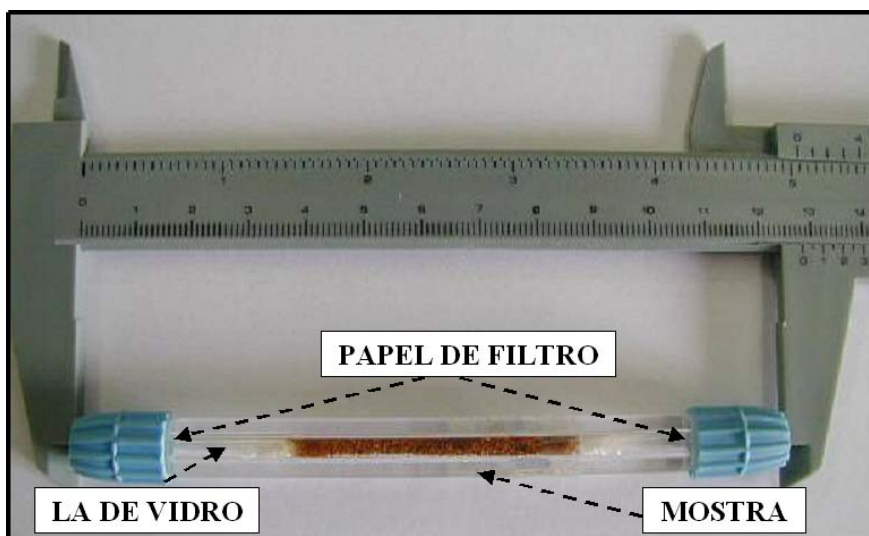
Para poder levar a cabo a análise, as mostrás foron trituradas e homoxeneizadas, e secáronse nunha estufa a  $60 \pm 5$  °C, ata peso constante. Unha vez eliminada a humidade das mostrás, tamizáronse e separáronse as fraccións con tamaño de partícula menor a 30 µm e entre 30 e 100 µm.

### **1.3 Procedemento**

O esquema de traballo do método para levar a cabo a determinación de cadmio, chumbo, cobalto, cromo e níquel baséase en tres etapas.

Na primeira etapa realízase a extracción continua dos metais contidos nas mostrás sólidas. Para levar a cabo esta etapa, o sistema FIA consta dun circuito que contén unha columna de pequenas dimensións na cal se vai introducir a mostra sólida (da orde de mg). A preparación desta minicolumna é un factor de gran importancia no proceso de extracción, posto que a compactación da mostra dentro da mesma pode xerar grandes presións no sistema FIA, ocasionando perdas do analito. Antes de introducir a mostra na minicolumna vaise crear un "leito" de la de vidro, para facilitar o paso da disolución extractante a través da mesma. Ademais, para evitar calquera obturación do sistema pola saída da mostra sólida da minicolumna durante o proceso,

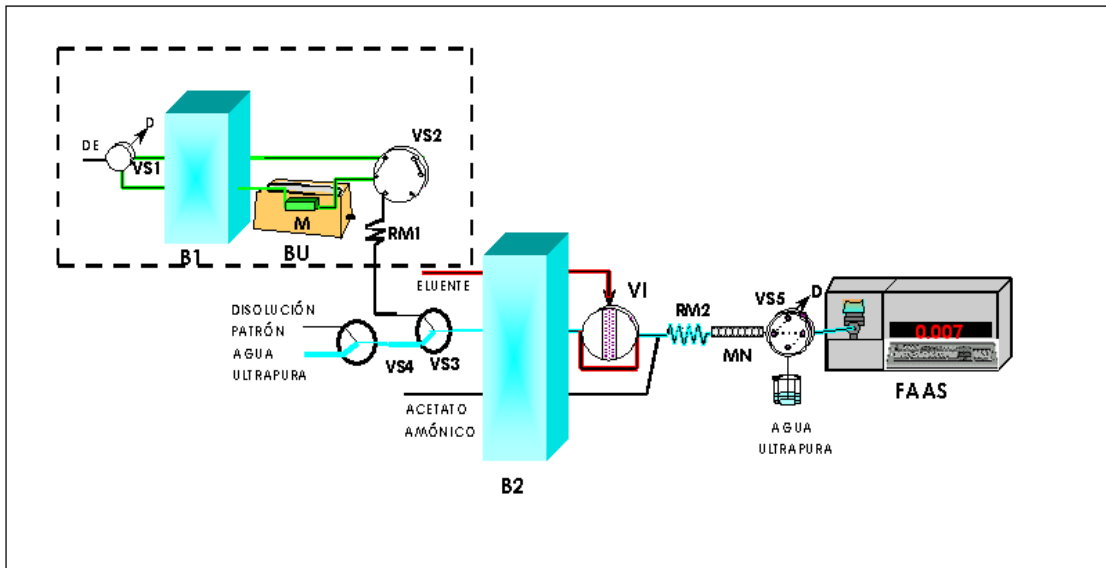
colócanse nos extremos da mesma filtros de papel (Whatman 541). Na Figura 15 pode verse unha das minicolumnas empregadas para levar a cabo a extracción continua asistida por ultrasóns.



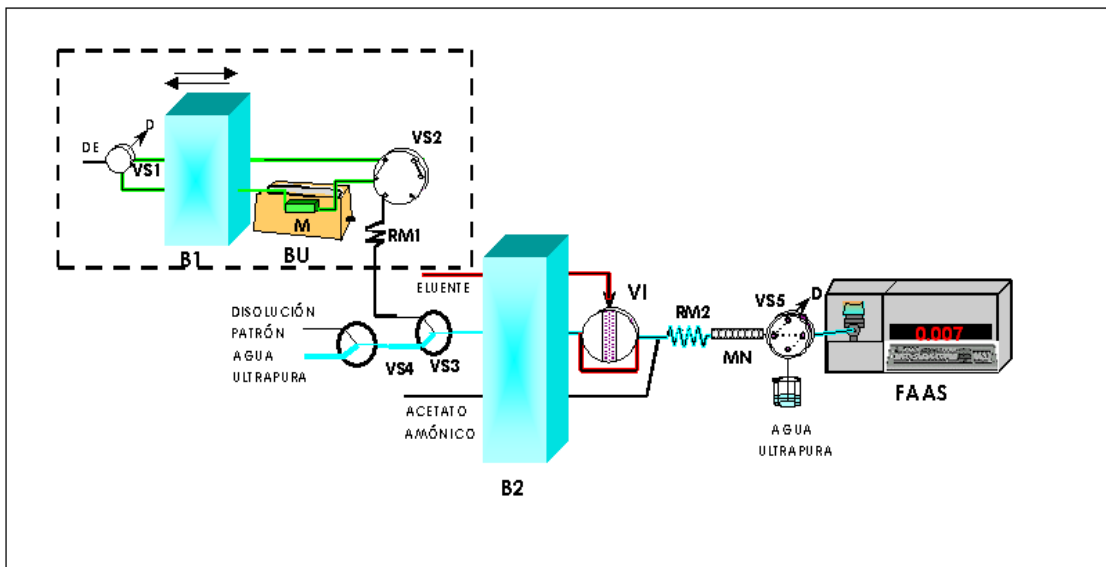
**Figura 15.** Fotografía da minicolumna na cal se introduce a mostra sólida no sistema continuo de extracción.

Unha vez preparada a minicolumna insértase no sistema FIA. A bomba peristáltica impulsa a disolución extractante cara o circuito que unha vez cheo, se pecha, xirando a válvula de selección VS1 (Ver Figura 16A).

A disolución extractante mantense en contacto coa mostra durante un certo tempo e a unha certa temperatura baixo a acción da enerxía dos ultrasóns (Figura 17). O bombeo altermase en ambos sentidos, para evitar as obstrucións no sistema por compactación da mostra. Durante a extracción, na outra parte do sistema, a disolución do branco é medida no detector (Figura 16B).



**Figura 16A.** O circuito de extracción éncchese coa disolución extractante.



**Figura 16B.** Proceso de extracción continua e medida da disolución do branco.

**Figura 16 (A, B).** Sistema FIA simple empregado indicando as etapas do proceso. 16A, O circuito de extracción éncchese coa disolución extractante; 16B, Proceso de extracción continua e medida da disolución do branco. DE, disolución extractante; VS1-VS5, válvulas de selección; B1 e B2, bombas peristálticas; BU, baño de ultrasonidos; M, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, deshecho; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica.

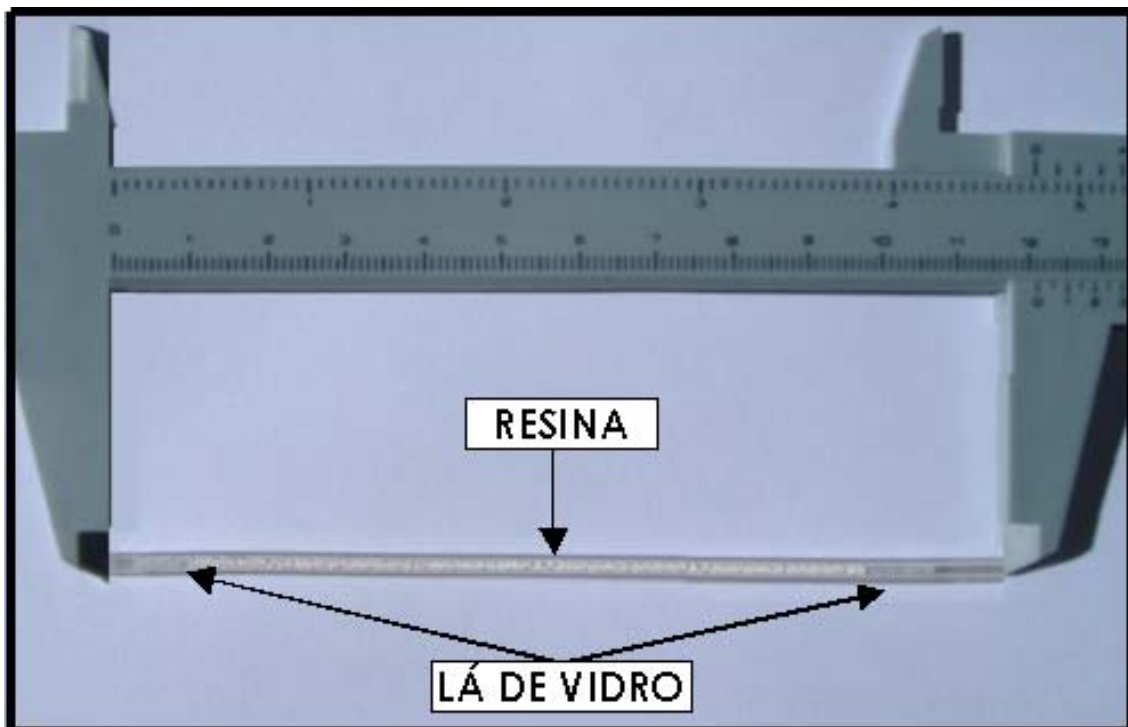
Unha vez transcorrido o tempo de extracción, xírase a válvula de selección VS2 e o extracto ácido pasa á parte do sistema FIA onde vai ter lugar a preconcentración.



**Figura 17.** Fotografía da minicolumna que contén a mostra, sometida á acción da enerxía dos ultrasóns.

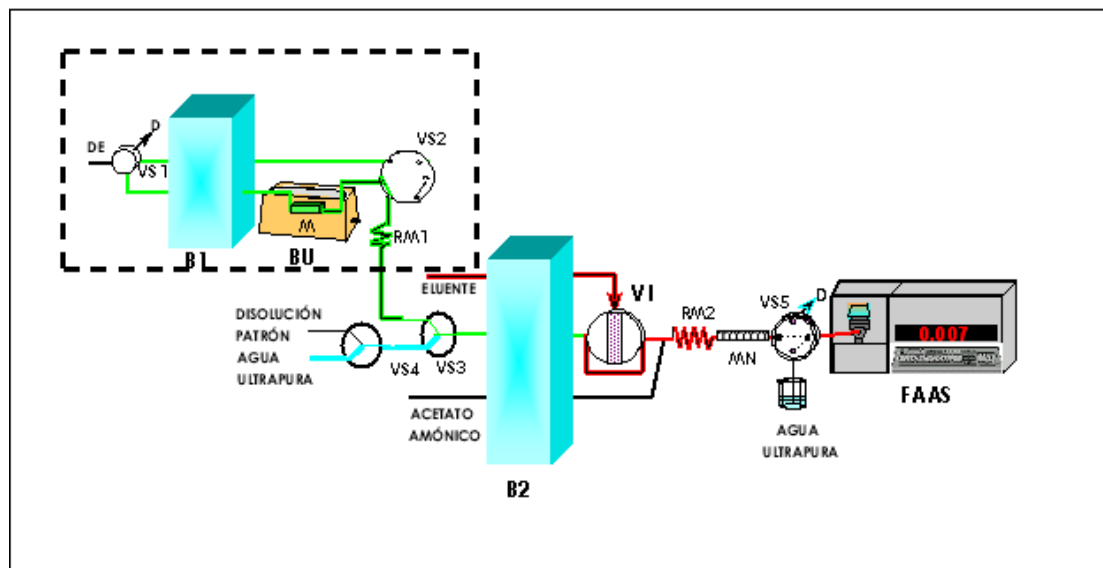
Na segunda etapa o extracto ácido mestúrase cunha disolución de acetato amónico de concentración axeitada, para axustar o valor do pH no intervalo de retención óptimo. Esta mestura atravesa un reactor, cuxa función é homoxeneizala. A continuación a mestura homoxeneizada é conducida a través dunha minicolumna empacitada cunha resina quelante, que retén o metal de interese mediante a formación dun quelato estable. Mentras tanto, ó detector chega auga ultrapura a través da válvula de selección VS5. Para

preparar as minicolumnas de preconcentración córtanse tubos de vitón para bomba peristáltica de 12 cm de lonxitude e diferentes diámetros internos (1,016 mm, 1,524 mm e 2,057 mm). A continuación, pésanse 50 mg de cada unha das resinas e introdúcense nas minicolumnas coa axuda dunha xeringa, fixándose nas mesmas con lá de vidro. A Figura 18 recolle unha fotografía dunha das minicolumnas empregadas para a preconcentración. Para que a retención dos metais teña lugar de maneira efectiva na resina Chelite P, é preciso acondionala facendo pasar a través da mesma unha disolución de cloruro amónico de 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (a un caudal de 0,5 mL/min, durante 5 minutos), posto que nesta resina o cambio amonio-metal funciona mellor que o cambio protón-metal.



**Figura 18.** Fotografía da minicolumna empacotada coa resina quelante, empregada para levar a cabo a preconcentración.

Na última etapa, o metal retido elúese cun determinado volume de ácido clorhídrico (bucle da válvula de inxección), detectándose no espectrofotómetro de absorción atómica (Figura 16C).



**Figura 16C (continuación A, B).** Sistema FIA simple empregado indicando as etapas do proceso: determinación do metal contido no eluente. DE, disolución extractante; VS1-VS5, válvulas de selección; B1 e B2, bombas peristálticas; BU, baño de ultrasóns; M, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante; FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica.

Co obxectivo de poder estudar os resultados obtidos ó aplicar o procedemento descrito para o sistema FIA proposto, levouse a cabo paralelamente a análise das mostras seguindo un método de referencia, baseado na dixestión convencional das mesmas con  $\text{HNO}_3$  concentrado baixo a acción calorífica e posterior preconcentración na resina quelante, axustando previamente o pH con acetato amónico. A determinación de cada metal realizouse por FAAS.

---

## 2. OPTIMIZACIÓN DOS PARÁMETROS QUE AFECTAN Á PRECONCENTRACIÓN DOS METAIS NO SISTEMA FIA

Estudouse a preconcentración dos metais empregando para tal fin tres resinas quelantes comerciais diferentes:

- Chelite P, con grupos aminometilfosfónicos
- Serdolit Che, con grupos iminodiacético
- Duolite GT-73, con grupos tiol

Para realizar a optimización dos parámetros que afectan á preconcentración dos metais empregouse un deseño factorial debido a que o número de variables potencialmente implicado é elevado (6 variables). Foi preciso aplicar un deseño factorial de Screening, para reducir de maneira significativa o número de experimentos a realizar na optimización. Un dos deseños de Screening máis empregados é o deseño de Plackett-Burman. Este deseño permite fraccionar un deseño factorial completo proporcionando números de combinacións de factores que son múltiplos de catro. Así, se se aplicara un deseño factorial completo para seis variables a dous niveis ( $2^6$ ) o número de experimentos a realizar sería de 64. Non obstante, a aplicación do deseño de Plackett-Burman cun punto central, como o que se aplica neste traballo, implica a realización de tan só 13 experimentos.

As variables a optimizar no proceso de preconcentración dos metais son as seguintes:

- pH da mostra
- Caudal de mostra
- Concentración de eluente (HCl)
- Volume de eluente
- Caudal de elución
- Diámetro da minicolumna

Para poder aplicar este deseño factorial foi preciso fixar previamente os valores máximos e mínimos que pode tomar cada unha destas variables. Estes valores foron seleccionados en función de experimentos realizados en estudos previos, en tódolos casos.

O deseño factorial aplicado é o deseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  de resolución tipo III e con VI graos de liberdade, cun punto central (Statgraphic Plus v.5.1), que implica a realización de 13 experimentos non randomizados. Neste deseño considerouse un punto central, no cal as variables toman un valor intermedio entre os límites superior e inferior. A Táboa 16 mostra a matriz correspondente a este deseño factorial cos 13 experimentos que foi preciso realizar para a optimización do proceso. Nesta matriz indícase como +1 cando a variable toma o valor máximo, -1 cando o valor que toma é o mínimo e 0 cando toma o valor medio. Como pode observarse, a última fila da matriz está constituída polos valores mínimos de cada unha das variables. Ademais, mantense a ortogonalidade, posto que o número de veces que aparecen os niveis altos (+1) é igual ó número de veces que aparecen os niveis baixos (-1).

**Táboa 16.** Matriz de Plackett-Burman  $2^{6*3}/16$ , no cal se obteñen 13 experimentos para as 6 variables citadas.

Experimento	A	B	C	D	E	F
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1
7	0	0	0	0	0	0
8	-1	1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	+1	-1	-1	-1	+1	+1
12	-1	+1	-1	-1	-1	+1
13	-1	-1	-1	-1	-1	-1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, Caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Unha vez obtida a matriz en función das variables implicadas e dos seus valores máximos e mínimos, realizáronse os experimentos fixados pola mesma empregando o dispositivo FIA indicado na Figura 14. Para realizar ditos experimentos, empregáronse disolucións patrón de cada un dos metais. A concentración das disolucións patrón fixouse en función do contido habitual do metal atopado na bibliografía en referencia ás diferentes mostras sólidas.

A variable resposta é o % Recuperación do metal en cada experimento proposto polo deseño, como se indica na seguinte ecuación:

$$(\%) \text{Recuperación} = \frac{A}{B} \times 100$$

A: concentración do metal na disolución patrón obtida utilizando o sistema FIA proposto

B: concentración coñecida do metal, contido na disolución patrón

Os experimentos da matriz de Plackett-Burman realizáronse por duplicado, de maneira que o % Recuperación indicado é a media dos dous experimentos.

Unha vez obtidos os datos experimentais, procédese, en cada caso, á análise correspondente do deseño.

## 2.1 Preconcentración do cadmio

A optimización deste proceso de preconcentración levouse a cabo empregando o dispositivo FIA indicado na Figura 14.

O deseño factorial de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  de resolución tipo III con 6 graos de liberdade e un punto central foi o utilizado para a optimización, tal e como se indicou anteriormente. As variables que afectan ó proceso de preconcentración, así como os valores máximos e mínimos fixados para as mesmas, dacordo con experimentos realizados previamente, recóllense na Táboa 17.

**Táboa 17.** Valores máximos e mínimos establecidos para cada unha das variables no deseño de Plackett-Burman.

VARIABLE	NOTACIÓN	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
<b>pH da mostra</b>	<b>A</b>	1	7
<b>Caudal de mostra</b>	<b>B</b>	0,5 mL/min	4,0 mL/min
<b>[HCl] (eluyente)</b>	<b>C</b>	0,1 M	3,0 M
<b>Volume de eluyente</b>	<b>D</b>	70,4 $\mu$ L	190,0 $\mu$ L
<b>Caudal de eluyente</b>	<b>E</b>	3 mL/min	5 mL/min
<b>Díámetro da minicolumna</b>	<b>F</b>	1 mm	2 mm

Unha vez obtida a matriz do deseño realizáronse os 13 experimentos indicados na mesma, utilizando o dispositivo FIA indicado na Figura 14. Este deseño aplicouse a unha disolución patrón cadmio de 0,04  $\mu$ g/mL, facéndose pasar a través de cada minicolumna de preconcentración 2 mL da mesma. A matriz de Plackett-Burman cos valores que toma cada unha das variables en cada un dos experimentos, xunto co % Recuperación obtido en cada un deles para cada unha das resinas, recóllese na Táboa 18. Os experimentos

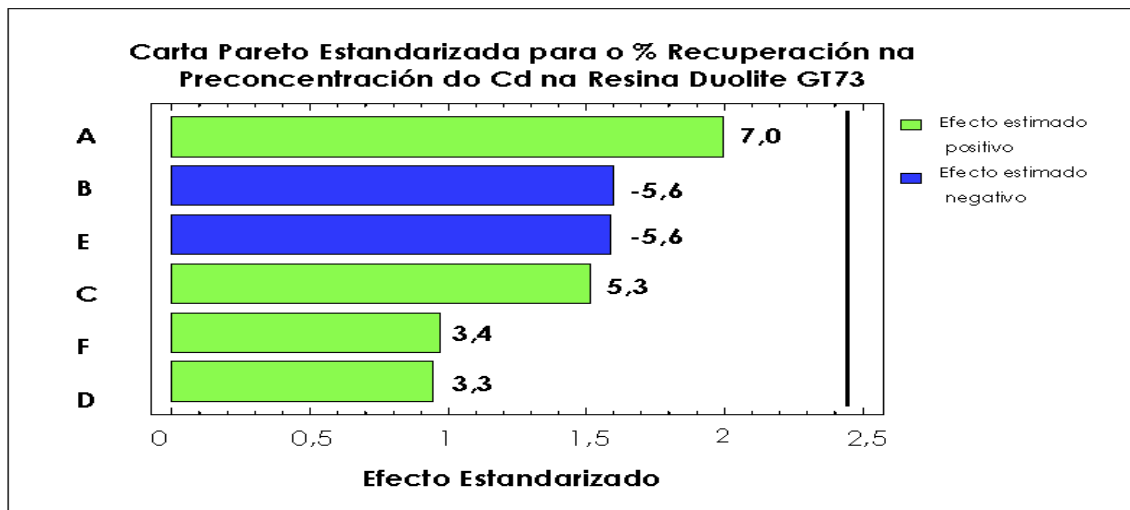
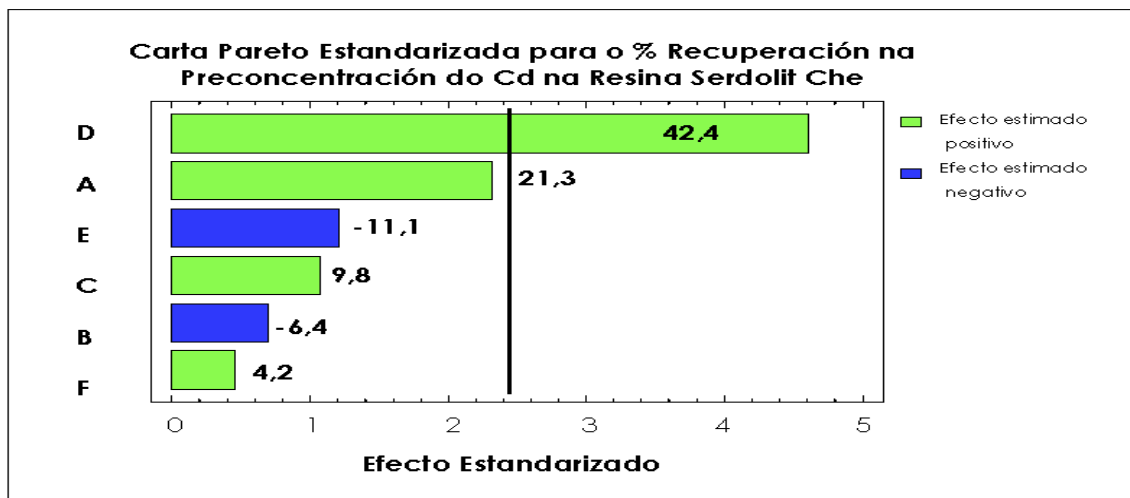
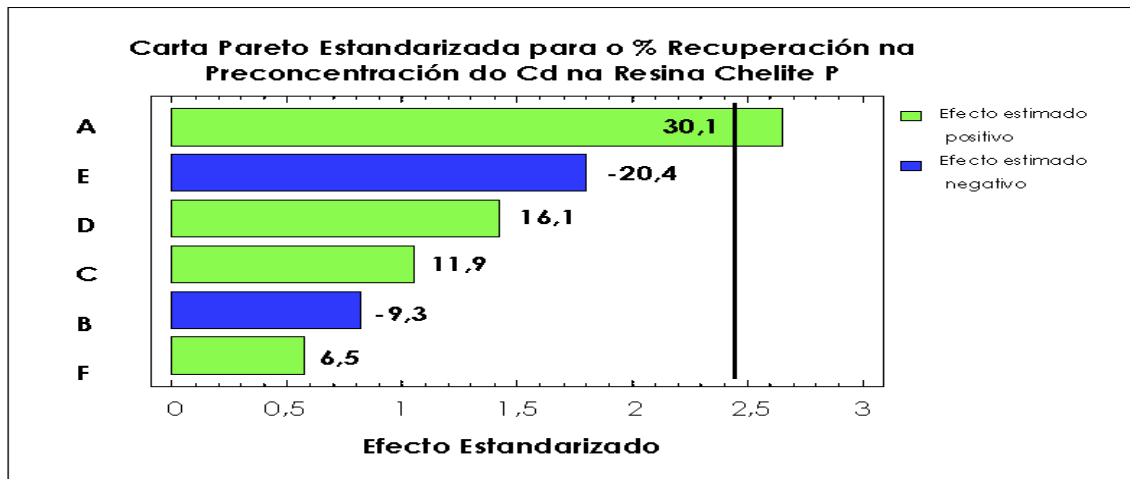
realizáronse por duplicado, polo cal o % Recuperación é a media dos dous resultados obtidos.

**Táboa 18.** Matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores de cada variable en cada experimento e % Recuperación obtido en cada experimento para cada resina.

NE	A	B	C	D	E	F	% Recuperación		
							Chelite P	Serdolit Che	Duolite GT73
1	7	0,5	3	70,4	3	1	22,1	19,7	7,8
2	7	4	0,1	190	3	1	39,4	62,1	2,0
3	1	4	3	70,4	5	1	0,0	8,5	0,0
4	7	0,5	3	190	3	2	90,1	104,5	27,9
5	7	4	0,1	190	5	1	9,2	52,0	1,0
6	7	4	3	70,4	5	2	13,9	23,0	1,2
7	4	2,25	1,55	130,2	4	1,5	26,8	54,5	1,5
8	1	4	3	190	3	2	0,0	40,7	0,0
9	1	0,5	3	190	5	1	0,0	45,5	0,0
10	1	0,5	0,1	190	5	2	0,0	34,9	0,0
11	7	0,5	0,1	70,4	5	2	6,0	15,0	2,1
12	1	4	0,1	70,4	3	2	0,0	6,8	0,0
13	1	0,5	0,1	70,4	3	1	0,0	12,0	0,0

NE, número de experimento; A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, Caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Unha vez obtidos os datos experimentais, procedeuse á análise do deseño. En primeiro lugar é preciso coñecer aquelas variables que son significativas para o cal se recorre ás **Cartas Pareto Estandarizadas** (Figura 19). Nestes gráficos represéntase o valor absoluto do efecto estimado de cada variable no proceso mediante barras, o cal nos permite visualizar a importancia relativa das mesmas.



**Figura 19.** Carta pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial. A liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, Caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

### 2.1.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial

Nos resultados obtidos ó aplicar o deseño factorial de Screening á preconcentración do cadmio, obsérvase que o pH da mostra e o volume de eluente son, respectivamente, as variables estatisticamente significativas para as resinas Chelite P e Serdolit Che, mentras que para a resina Duolite GT73 non hai ninguna variable que supere o nivel de significación estatístico establecido (95 % de confianza, representado pola liña vertical).

Os dous factores presentan un efecto estimado positivo e elevado, é dicir, unha gran influencia positiva no proceso. Así, un incremento nestas variables implica unha maior eficacia no proceso de preconcentración.

As demais variables presentan unha maior ou menor influencia no proceso, pero sen superar o nivel de significación estatística establecido. O diámetro da minicolumna, a concentración de eluente e o volume de eluente (para a resina Chelite P) e o diámetro da minicolumna, a concentración de eluente e o pH da mostra (para a resina Serdolit Che) son variables estatisticamente non significativas que presentan un efecto estimado positivo. O efecto positivo da concentración de eluente explícase tendo en conta que o eluente debe romper o quelato formado polo metal e os grupos activos da resina, e polo tanto, canto maior sexa a súa concentración, máis doado será romper dito enlace. No caso do pH da mostra hai que ter en conta que canto maior é a concentración de protóns, máis difícil é o cambio protón-metal necesario para a retención deste último. O volume de eluente tamén ten un efecto estimado positivo, posto que un volume pequeno do mesmo non sería capaz de arrastrar todo o metal retido na resina. No que respecta ó diámetro da minicolumna, obsérvase que ten un efecto positivo na preconcentración, pero este efecto non é de gran valor analítico. Isto débese a que a

preconcentración é cuantitativa no intervalo de diámetros de minicolumna estudiado, afectando apenas ó proceso.

Por outra parte, obsérvase que os efectos estimados dos caudais de mostra e elución son negativos, o que indica que a eficacia da preconcentración é inversamente proporcional a ditos factores no intervalo estudiado; é dicir, canto menor sexan os valores destas variables, máis favorecido se verá o proceso de preconcentración. Isto pode xustificarse tendo en conta que os caudais de mostra e elución están limitados polas características cinéticas do material quelante e pola capacidade do sistema de manter o fluxo constante baixo grandes presións. Un excesivo caudal de mostra pode provocar a retención incompleta do metal debido ó tempo de contacto insuficiente entre a mostra e o material de empaquetamento. A velocidade óptima de elución depende da fortaleza coa que os analitos estean retidos no axente quelante, e da capacidade do eluente para arrastralos ata o detector.

No caso da resina Duolite GT73 non hai ningunha variable estatisticamente significativa, e aínda que se manteñen as mesmas tendencias das variables que nas outras dúas resinas, os efectos estimados dos factores son moi baixos.

Unha vez analizados os resultados obtidos tras aplicar o deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos según o deseño de Screening para cada unha das variables son os indicados na Táboa 19.

**Táboa 19.** Valores óptimos dacordo co deseño de Plackett-Burman para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cadmio nas diferentes resinas.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES DACORDO CO DESEÑO DE PLACKETT-BURMAN		
	Chelite p	Serdolit che	Duolite GT73
	<b>A</b>	7	7
<b>B (mL/min)</b>	0,5	0,5	0,5
<b>C (M)</b>	3	3	3
<b>D (µL)</b>	190,0	190,0	190,0
<b>E (mL/min)</b>	3	3	3
<b>F (mm)</b>	2	2	2

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Dado que o deseño de Plackett-Burman nos proporciona as tendencias das variables cara o óptimo, e non o valor óptimo das variables en sí, leváronse a cabo unha serie de experimentos fóra do marco do deseño, dacordo cos resultados obtidos no mesmo, para obter os valores máis adecuados das variables que nos proporcionen unha boa recuperación; é dicir, o valor óptimo das mesmas.

### 2.1.2 Experimentos realizados fóra do marco do deseño

A realización destes experimentos ten como obxectivo obter o valor óptimo das variables, posto que, como xa se comentou anteriormente, o deseño de Plackett-Burman tan só nos proporciona as tendencias das variables cara o valor óptimo dentro do intervalo de valores establecido previamente para cada variable. Non se aplicou outro deseño factorial para afinar estes valores posto que un deseño que proporcione o valor óptimo preciso implica a realización dun elevado número de experimentos. Ademais, neste momento,

xa se posúe bastante información sobre o comportamento de cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración como para poder axustar o valor óptimo das variables realizando un número pequeno de experimentos.

Esta optimización levouse a cabo mediante unha serie de experimentos que se realizaron por triplicado, mediante un estudio variable a variable, partindo dos valores óptimos proporcionados polo deseño.

▪ **Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do cadmio empregando a resina quelante Chelite P**

En primeiro lugar estudiáronse as variables con menor peso ou importancia no proceso de preconcentración. Dentro das variables non significativas con efecto estimado positivo están o diámetro da minicolumna (efecto estimado=6,5), a concentración de eluente (efecto estimado=11,9) e o volume de eluente (efecto estimado=16,1). O **diámetro da minicolumna** estúdiouse entre 1 e 2 mm. Según os resultados proporcionados polo deseño, o valor óptimo sería 2 mm, pero estúdiouse a posibilidade de traballar con minicolumnas de 1 mm de diámetro, para evitar a necesidade de facer axustes nas conexións entre a minicolumna e o sistema FIA. Na Táboa 20 móstrase o resultado deste experimento: o emprego de minicolumnas con diámetro interno de 1 mm proporciona resultados cuantitativos.

**Táboa 20.** Experimento realizado para a optimización do diámetro da minicolumna.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,5	3	190	3	1	99,7

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Con respecto á **concentración de eluente** e según os resultados proporcionados polo deseño, o valor óptimo desta variable sería 3 M. A posibilidade de empregar concentracións maiores a 3 M non se estudiou, posto que se poderían ver afectadas partes do nebulizador do equipo de absorción atómica. Estudouse, non obstante, a posibilidade de diminuír este valor. Tal e como se pode ver na Táboa 21, dita diminución non foi posible.

**Táboa 21.** Experimento realizado para a optimización da concentración de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,5	2	190	3	1	74,9

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **volume de eluente** é a variable non significativa co efecto estimado positivo máis elevado. Según o deseño de Plackett-Burman, o valor óptimo desta variable sería 190  $\mu$ L. O estudo da diminución deste valor resulta de gran interese, posto que implica a obtención dun maior factor de preconcentración. Como se pode observar na Táboa 22, comprobouse que o menor volume de eluente capaz de proporcionar unha recuperación cuantitativa foi de 92  $\mu$ L. Este bucle é o de menor tamaño que se pode construír, debido ás

características xeométricas da válvula de inxección. Diminuír aínda máis o volume de eluente implicaría o emprego solamente do bucle interno da válvula (70,4  $\mu\text{L}$ ), que según o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 18) non proporciona un resultado cuantitativo.

**Táboa 22.** Experimento realizado para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu\text{L}$ )	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,5	3	92	3	1	99,7

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **caudal de mostra** e o **caudal de elución** son as variables non significativas con efecto estimado negativo. Según o deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos destas variables serían 0,5 e 3 mL/min, respectivamente. Estudiouse a posibilidade de aumentar ditos valores co obxectivo de conseguir así unha maior frecuencia de mostraxe e unha maior sensibilidade (posto que a velocidade de aspiración do nebulizador e o caudal de elución han de ser similares). O caudal de mostra aumentouse ata 2 mL/min, mentras que valores do caudal de elución maiores a 3 mL/min non proporcionaron recuperacións cuantitativas, tal e como se recolle na Táboa 23.

**Táboa 23.** Experimentos realizados para a optimización dos caudais de mostra e elución.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	2	3	92	3	1	96,1
7	3	3	92	3	1	56,0
7	2	3	92	4	1	44,3

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **pH da mostra** é a única variable significativa e ten un efecto estimado positivo. Levouse a cabo un estudio para coñecer o intervalo de pH no cal a retención do cadmio na resina é efectiva. Os resultados deste estudio poden observarse na Táboa 24.

**Táboa 24.** Experimentos realizados para establecer o intervalo de pH no cal a retención do cadmio na resina é efectivo.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
2	2	3	92	3	1	72,0
3	2	3	92	3	1	99,7
8	2	3	92	3	1	106,1
9	2	3	92	3	1	46,2

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Como pode observarse na Táboa 24, a retención do cadmio na resina Chelite P é efectiva no intervalo de pH 3-8. A pH 2 a concentración de protóns é demasiado elevada para que teña lugar de forma efectiva o cambio protón-metal. A pH 9 ten lugar a precipitación parcial do cadmio como hidróxido, diminuindo así a súa retención.

Unha vez optimizadas tódalas variables, tendo en conta os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na preconcentración do cadmio na resina Chelite P son os que se recollen na Táboa 25.

**Táboa 25.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do cadmio na resina Chelite P.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
pH da mostra	3-8
Caudal de mostra	2 mL/min
Concentración de eluente (HCl)	3 M
Volume de eluente	92 $\mu$ L
Caudal de eluente	3 mL/min
Diámetro da minicolumna	1 mm

▪ **Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do cadmio empregando a resina quelante Serdolit Che**

No caso da preconcentración do cadmio na resina Serdolit Che, a única variable estatisticamente significativa resultou ser o volume de eluente.

A optimización fóra do marco do deseño comezouse por aquelas variables non significativas. Entre estas variables están, con efecto estimado positivo o diámetro da minicolumna (efecto estimado=4,2), a concentración de eluente (efecto estimado=9,8) e o pH (efecto estimado=21,3), e con efecto negativo os caudais de mostra e elución (efectos estimados de -6,4 e -11,1, respectivamente).

O **diámetro da minicolumna** é a variable que ten a menor influencia no proceso de preconcentración. Estudouse a posibilidade de traballar con minicolumnas de diámetro 1 mm, para evitar así a necesidade de realizar

axustes nas conexións entre a minicolumna e o sistema FIA, precisas cando o diámetro da minicolumna é maior. Na Táboa 26 móstrase o resultado deste experimento.

**Táboa 26.** Experimento realizado para a optimización do diámetro da minicolumna.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,5	3	190	3	1	103,3

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

A **concentración de eluente** é outra variable non significativa con efecto estimado positivo, e polo tanto, o seu valor según o deseño de Plackett-Burman sería 3 M. A utilización de ácido clorhídrico menos concentrado non proporciona resultados cuantitativos, de xeito que esta diminución non se puido levar a cabo, tal e como se mostra na Táboa 27.

**Táboa 27.** Experimento realizado para a optimización da concentración de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,5	2	190	3	1	90,0

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **pH da mostra** resultou ser a variable non significativa con maior efecto estimado, próximo á liña que sinala a significación estatística ó 95 %. Non obstante, estúdiouse a posibilidade de diminuír o valor dado polo deseño de Plackett-Burman (pH=7), que proporciona resultados cuantitativos según o

experimento 4 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 18) e estableceuse o intervalo de pH efectivo para a retención do cadmio na resina Serdolit Che. Os resultados deste estudio móstranse ná Táboa 28.

**Táboa 28.** Experimentos realizados para establecer o intervalo de pH no cal a retención do cadmio na resina é efectiva.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
2	0,5	3	190	3	1	62,2
3	0,5	3	190	3	1	100,2
8	0,5	3	190	3	1	84,2

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Á vista destes resultados pode concluirse que a retención do cadmio na resina Serdolit Che é efectiva no intervalo de pH 3-7.

No que respecta ó **caudal de mostra** e ó **caudal de elución**, estudiouse a posibilidade de aumentar os valores óptimos según o deseño de Plackett-Burman (0,5 e 3 mL/min), co obxectivo de diminuír o tempo da preconcentración e polo tanto, de aumentar a frecuencia de mostraxe, e aumentar a sensibilidade, posto que a velocidade de aspiración do nebulizador ha de ser similar ó caudal de elución. Os resultados obtidos móstranse na Táboa 29. O caudal de mostra pode aumentarse ata 3 mL/min, posto que este valor proporciona recuperacións cuantitativas, mentras que o caudal de elución debe manterse no nivel mínimo estudiado: 3 mL/min.

**Táboa 29.** Experimentos realizados para a optimización dos caudais de mostra e elución.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	3	3	190	3	1	103,5
7	4	3	190	3	1	54,7
7	3	3	190	4	1	59,8

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **volume de eluente** é a variable estatisticamente significativa no proceso de preconcentración do cadmio na resina Serdolit Che e ten un efecto estimado positivo (42,4). Non obstante, estúdiouse a posibilidade de diminuír o valor óptimo proporcionado polo deseño de Plackett-Burman, 190  $\mu$ L, co obxectivo de aumentar o factor de preconcentración. A Táboa 30 mostra o resultado deste estudo. O menor valor de volume de eluente que proporcionou unha recuperación do metal cuantitativa foi o de 150,8  $\mu$ L.

**Táboa 30.** Experimentos realizados para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	3	3	140,8	3	1	88,4
7	3	3	150,8	3	1	96,7

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Os valores óptimos das variables implicadas na preconcentración do cadmio na resina Serdolit Che, unha vez estudadas cada unha delas fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 31.

**Táboa 31.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do cadmio na resina Serdolit Che.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
pH da mostra	3-7
Caudal de mostra	3 mL/min
Concentración de eluente (HCl)	3 M
Volume de eluente	150,8 $\mu$ L
Caudal de eluente	3 mL/min
Diámetro da minicolumna	1 mm

▪ **Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do cadmio empregando a resina quelante Duolite GT73**

Neste caso, ninguna das variables é estatisticamente significativa e os efectos estimados das mesmas, a pesar de manter as mesmas tendencias que nas outras resinas, son moi baixos. A matriz de Plackett-Burman (Táboa 18) permite observar que en ningún dos experimentos se obteñen recuperacións cuantitativas, é máis, nin sequera se supera o 30 % de recuperación do metal.

Mantendo os valores das variables nos óptimos según o deseño de Plackett-Burman, modificáronse os valores dos caudais de mostra e elución, que despois do pH son as variables con maior peso estatístico no proceso. Neste caso, non se estudiou a posibilidade de aumentalos para obter unha maior rapidez na análise, senon que se estudiou a posibilidade de diminuílos, para intentar obter recuperacións cuantitativas. Os resultados deste estudio recóllense na Táboa 32.

**Táboa 32.** Experimentos realizados para a optimización dos caudais de mostra e elución.

<b>A</b>	<b>B (mL/min)</b>	<b>C (M)</b>	<b>D (<math>\mu</math>L)</b>	<b>E (mL/min)</b>	<b>F (mm)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
7	0,30	3	190	3	2	28,5
7	0,20	3	190	3	2	27,9
7	05	3	190	2	2	61,8
7	0,5	3	190	1,5	2	77,2

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Á vista dos resultados obtidos, pode concluírse que diminuíndo o caudal de elución por debaixo dos valores iniciais considerados no deseño se consegue aumentar o % Recuperación ata un 77,2 %. Con valores desta variable inferiores a 1,5 mL/min, seguramente se obterían valores maiores de recuperación, ou incluso recuperacións cuantitativas. Non obstante, esta diminución é totalmente inviable, posto que a minicolumna de preconcentración se conecta directamente ó nebulizador do espectrofotómetro de absorción atómica, o que implicaría unha velocidade de aspiración inferior ou igual a 1,5 mL/min, o que provocaría unha diminución considerable na sensibilidade. A diminución do caudal de mostra por debaixo do valor mínimo considerado no deseño, non provoca un aumento significativo no % Recuperación. Realizouse un último experimento aumentando o volume de eluente por enriba do límite superior do deseño, a pesar de ser esta a variable con menor efecto estimado. O resultado obtido recóllese na Táboa 33.

**Táboa 33.** Experimento realizado para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,3	3	242,8	1,5	1	78,4

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O aumento no volume de eluente, a pesar de ser considerable, non supón un aumento significativo no % Recuperación.

Tendo en conta os resultados obtidos e facendo unha pequena revisión bibliográfica, pode concluirse que o caudal de elución é unha variable importante na elución dos metais retidos na resina Duolite GT73, sendo preciso empregar valores moi baixos desta variable para obter recuperacións cuantitativas dos metais, como 0,36 mL/min [152] ou 0,5 mL/min [153,154]. Como xa se comentou anteriormente, a utilización dun caudal de elución tan baixo en técnicas de preconcentración acopladas en continuo á Espectroscopía de Absorción Atómica con Chama é inviable, de maneira que se descarta a preconcentración dos metais facendo uso da resina Duolite GT73.

- **Elección da resina para levar a cabo a preconcentración do cadmio**

Na Táboa 34, recóllense os valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cadmio en cada resina. Nos resultados obtidos obsérvase que o diámetro da minicolumna, o caudal de elución e a concentración de eluente toman o mesmo valor óptimo nas dúas resinas, mentras que o intervalo de pH, o caudal de mostra e o volume de eluente son diferentes para cada unha delas. A elección da resina máis

axeitada para a preconcentración do cadmio farase, polo tanto, en función destas últimas variables.

**Táboa 34.** Valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cadmio en cada resina.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA UNHA DAS VARIABLES IMPLICADAS NA PRECONCENTRACIÓN DO CADMIO EN CADA RESINA	
	CHELITE P	SERDOLIT CHE
<b>A</b>	2-8	3-7
<b>B (mL/min)</b>	2	3
<b>C (M)</b>	3	3
<b>D (µL)</b>	92	150,8
<b>E (mL/min)</b>	3	3
<b>F (mm)</b>	1	1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna

O intervalo de pH efectivo para a retención do metal é amplo en calquera das dúas resinas. Ademais, se se ten en conta que o pH do extracto ácido a preconcentrar vai ser moi baixo, esta variable non resulta determinante na elección da resina. Con respecto ó caudal de mostra, hai que dicir que a diferenza entre unha e outra resina é de 1 mL/min, que resultaría de gran importancia no caso de preconcentrar un volume de mostra elevado (da orde de 50 mL ou maior). O volume do extracto ácido vaise estudar entre 2 e 5 mL, de maneira que esta variable tampouco resulta determinante na elección da resina. O volume de eluente vai determinar o factor de preconcentración da resina. A diferenza entre unha ou outra resina implica a obtención de factores de preconcentración 1,6 veces maiores, empregando a

resina Chelite P. Tendo en conta que a concentración de cadmio nas mostras de natureza alimenticia é moi baixa, aumentar o factor de preconcentración resultará enormemente vantaxoso. Polo tanto, a resina que se vai empregar para levar a cabo a preconcentración do cadmio é a **Chelite P**.

## 2.2 Preconcentración do chumbo

A optimización da preconcentración do chumbo realizouse aplicando o deseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  de resolución tipo III e con 6 graos de liberdade e un punto central, cuxa matriz de experimentos se recolle na Táboa 16. As variables que afectan á extracción do chumbo, así como os seus valores máximos e mínimos, seleccionados en base a experimentos previos, recóllense na Táboa 35.

Unha vez obtida a matriz de Plackett-Burman leváronse a cabo os experimentos obtidos na mesma, empregando dispositivo FIA indicado na Figura 14. Este deseño aplicouse a unha disolución patrón de chumbo de 0,2  $\mu\text{g/mL}$ , facéndose pasar a través de cada minicolumna de preconcentración 2 mL da mesma.

**Táboa 35.** Valores máximos e mínimos establecidos para cada unha das variables no deseño de Plackett-Burman.

VARIABLE	NOTACIÓN	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
pH	A	1	7
Caudal de mostra	B	0,5 mL/min	4,0 mL/min
[HCl] (eluyente)	C	0,1 M	3,0 M
Volume de eluyente	D	70,4 $\mu\text{L}$	190,0 $\mu\text{L}$
Caudal de eluyente	E	3 mL/min	5 mL/min
Díámetro da minicolumna	F	1 mm	2 mm

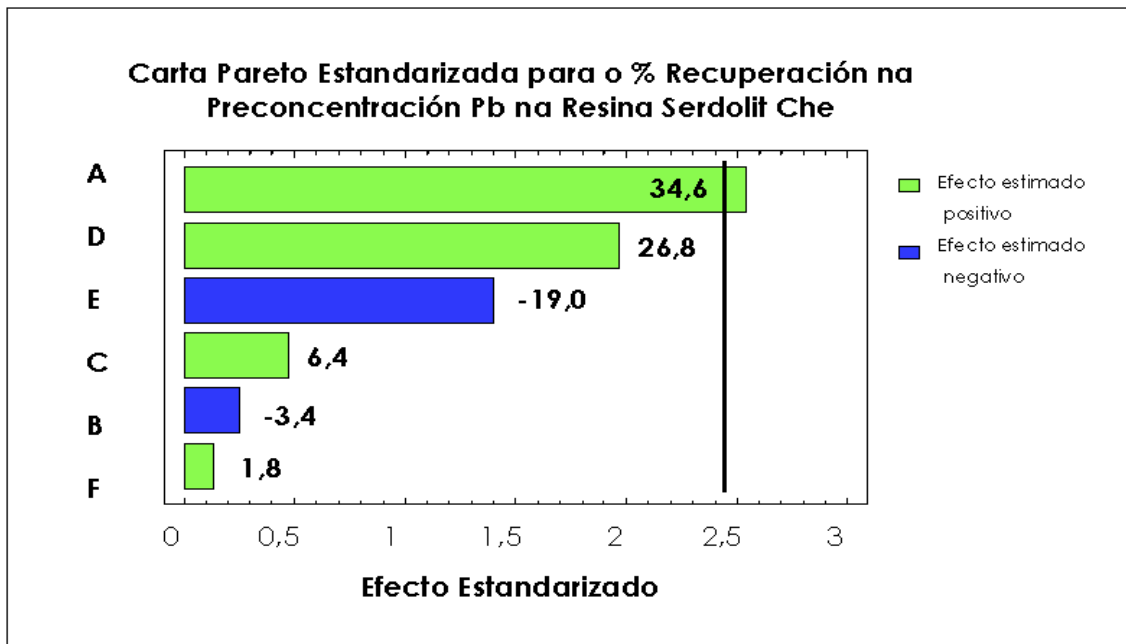
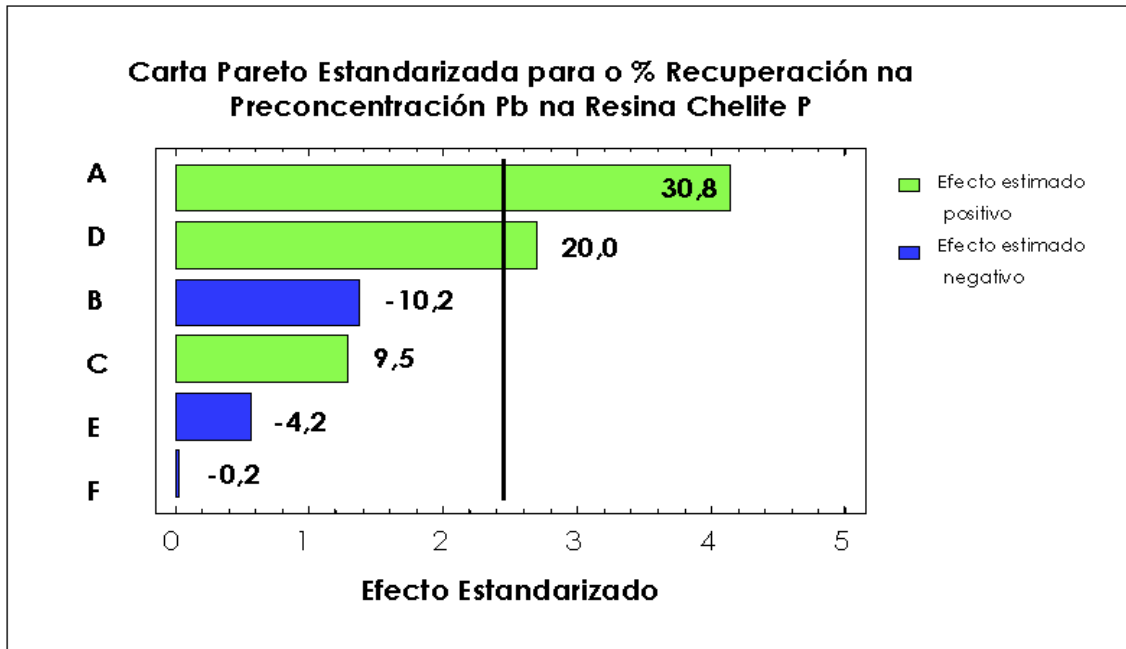
A matriz de Plackett-Burman cos valores que toma cada unha das variables en cada un dos experimentos, xunto co % Recuperación obtido en cada un deles para cada unha das resinas, recóllese na Táboa 36. Os experimentos realizáronse por duplicado, polo cal o % Recuperación é a media dos dous resultados obtidos.

Unha vez realizados os experimentos, procedeuse á análise dos datos. Para coñecer que variables son estatisticamente significativas, recórrese ás **Cartas Pareto Estandarizadas** que se recollen na Figura 20.

**Táboa 36.** Matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores de cada variable en cada experimento e % Recuperación obtido en cada experimento para cada resina.

NE	A	B	C	D	E	F	% Recuperación	
							Chelite P	Serdolit Che
1	7	0,5	3	70,4	3	1	59,3	20,2
2	7	4	0,1	190	3	1	55,0	61,3
3	1	4	3	70,4	5	1	29,0	6,1
4	7	0,5	3	190	3	2	98,7	103,2
5	7	4	0,1	190	5	1	70,0	38,1
6	7	4	3	70,4	5	2	39,7	18,9
7	4	2,25	1,55	130,2	4	1,5	64,5	51,0
8	1	4	3	190	3	2	38,7	9,1
9	1	0,5	3	190	5	1	44,6	10,8
10	1	0,5	0,1	190	5	2	34,4	6,9
11	7	0,5	0,1	70,4	5	2	51,0	11,1
12	1	4	0,1	70,4	3	2	18,2	5,2
13	1	0,5	0,1	70,4	3	1	24,1	7,2

NE, número de experimento; A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, Caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.



**Figura 20.** Carta pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial. A liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, Caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

### 2.2.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial

Nos resultados obtidos ó aplicar o deseño de Plackett-Burman á preconcentración do chumbo coas dúas resinas, obsérvase que o pH da mostra e o volume de eluente son as variables estatisticamente significativas para a resina Chelite P, mentras que o pH da mostra é a única variable estatisticamente significativa para a resina Serdolit Che.

As demais variables teñen unha maior ou menor importancia no proceso de preconcentración, pero sen superar o nivel de significación establecido polo método para un 95 % de confianza (representado pola liña vertical). O comportamento das variables nas dúas resinas é similar. En ambos casos, o pH da mostra e o volume de eluente son as variables de máis peso no proceso de preconcentración, e ademais, a influencia das mesmas é positiva. Os caudais de mostra e elución teñen en ambos casos un efecto estimado negativo, e o diámetro da minicolumna é a variable menos importante no proceso de preconcentración.

Unha vez analizados os resultados proporcionados polo deseño, os valores óptimos para cada unha das variables según o mesmo son as que se recollen na Táboa 37.

Como o deseño de Plackett-Burman só nos proporciona as tendencias das variables cara o óptimo, e non o valor óptimo das mesmas, realizáronse unha serie de experimentos fóra do marco do deseño, dacordo cos valores obtidos no mesmo, para determinar o valor óptimo de cada unha destas variables que afectan á preconcentración do chumbo nas diferentes resinas quelantes.

**Táboa 37.** Valores óptimos dacordo co deseño de Plackett-Burman para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do chumbo nas diferentes resinas.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES DACORDO CO DESEÑO DE PLACKETT-BURMAN	
	Chelite P	Serdolit Che
<b>A</b>	7	7
<b>B (mL/min)</b>	0,5	0,5
<b>C (M)</b>	3	3
<b>D (µL)</b>	190	190
<b>E (mL/min)</b>	3	3
<b>F (mm)</b>	1	2

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, Caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

### 2.2.2 Experimentos realizados fóra do marco do deseño

#### ▪ Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do chumbo empregando a resina quelante Chelite P

En primeiro lugar estudiáronse as variables estatisticamente non significativas. Dentro das variables non significativas, teñen efecto estimado positivo a concentración de eluente (efecto estimado=9,5) e efecto estimado negativo o diámetro da minicolumna (efecto estimado=-0,2) e os caudais de mostra (efecto estimado=-10,2) e elución (efecto estimado=-4,2).

No que respecta ó **diámetro da minicolumna**, estúdiouse a posibilidade de traballar con diámetros de 1 mm, para evitar facer axustes nas conexións das minicolumnas co sistema FIA. O resultado deste estudio mostrase na Táboa 38.

**Táboa 38.** Experimento realizado para a optimización do diámetro da minicolumna.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,5	3	190	3	1	98,8

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

A **concentración de eluente** é unha variable que afecta positivamente ó proceso de preconcentración. Non obstante, estúdiouse a posibilidade de utilizar ácido clorhídrico máis diluído. Como recolle a Táboa 39, o emprego de ácido clorhídrico 2 M non proporcionou resultados cuantitativos. Polo tanto, o valor óptimo desta variable é 3 M.

**Táboa 39.** Experimento realizado para a optimización da concentración de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,5	2	190	3	1	84,3

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **caudal de mostra** e o **caudal de elución** son variables con efecto estimado negativo, é dicir, canto menor sexa o valor destas variables, dentro do intervalo estudiado, maior será o % Recuperación obtido. Non obstante, e co obxectivo de lograr un menor tempo de análise e aumentar a sensibilidade, posto que a velocidade de aspiración do nebulizador ha de ser similar ó caudal de elución, estúdiouse a posibilidade de aumentar o valor destas variables. O resultado deste estudio recóllese na Táboa 40.

**Táboa 40.** Experimentos realizados para a optimización dos caudais de mostra e elución.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	3	3	190	3	1	97,9
7	4	3	190	3	1	75,5
7	3	3	190	4	1	56,2

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Con respecto ás variables estatisticamente significativas, **pH da mostra** (efecto estimado=30,8) e **volume de eluente** (efecto estimado=20,0), estableceuse o intervalo de pH efectivo de retención e estúdiouse a posibilidade de diminuír o volume de eluente, co obxectivo de aumentar o factor de preconcentración. As Táboas 41 e 42 mostran os resultados destes estudos.

**Táboa 41.** Experimentos realizados para establecer o intervalo de pH no cal a retención do cadmio na resina é efectiva.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
8	3	3	190	3	1	35,3
2	3	3	190	3	1	100,2
1	3	3	190	3	1	34,8

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Como pode observarse, a retención do chumbo na resina Chelite P é efectiva no intervalo de pH 2-7 (A pH 7, a recuperación obtida é cuantitativa, como demostra o experimento 4 da matriz de Plackett-Burman).

**Táboa 42.** Experimentos realizados para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	3	3	150,8	3	1	64,4
7	3	3	160,9	3	1	101,3

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Os valores óptimos das variables implicadas na preconcentración do chumbo na resina Chelite P, unha vez estudias cada unha delas fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 43.

**Táboa 43.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do chumbo na resina Chelite P.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
pH da mostra	2-7
Caudal de mostra	3 mL/min
Concentración de eluente (HCl)	3 M
Volume de eluente	160,9 $\mu$ L
Caudal de eluente	3 mL/min
Diámetro da minicolumna	1 mm

▪ **Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do chumbo empregando a resina quelante Serdolit Che**

No caso da preconcentración do chumbo empregando a resina quelante Serdolit Che, a única variable estatisticamente significativa é o pH da mostra.

Os experimentos fóra do marco do deseño comezáronse polas variables non significativas. O **diámetro da minicolumna** é a variable que ten o menor efecto estimado (efecto estimado=1,8). Estudouse a posibilidade de diminuír

este valor, e, tal e como se mostra na Táboa 44, o diámetro da minicolumna fixouse en 1 mm.

**Táboa 44.** Experimento realizado para a optimización do diámetro da minicolumna.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,5	3	190	3	1	103,3

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Con respecto á **concentración de eluente**, estudiouse a posibilidade de empregar unha concentración menor ó valor optimizado polo deseño. Tal e como mostra a Táboa 45 esta diminución non foi posible, co cal o valor óptimo para esta variable é 3 M.

**Táboa 45.** Experimento realizado para a optimización da concentración de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,5	2	190	3	1	90,1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

A variable estatisticamente non significativa con maior efecto estimado é o **volume de eluente** (efecto estimado=26,8). Estudiouse a posibilidade de diminuír este valor, para aumentar así o factor de preconcentración. O menor volume de eluente capaz de proporcionar unha recuperación cuantitativa foi 160,9  $\mu$ L. A Táboa 46 mostra o resultado desta análise.

**Táboa 46.** Experimentos realizados para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	0,5	3	160,9	3	1	100,3
7	0,5	3	150,8	3	1	88,4

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **caudal de mostra** e o **caudal de elución** teñen efecto estimado negativo, de maneira que os valores óptimos según o deseño de Plackett-Burman para estas variables son 0,5 e 3 mL/min, respectivamente. Estudiouse a posibilidade de aumentar estes valores. O resultado deste estudio recóllese na Táboa 47.

**Táboa 47.** Experimentos realizados para a optimización dos caudais de mostra e elución.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
7	3	3	160,9	3	1	96,7
7	4	3	160,9	3	1	69,7
7	3	3	160,9	4	1	54,7

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

No que respecta á variable estatisticamente significativa, o **pH da mostra**, realizáronse unha serie de experimentos fóra do marco do deseño co obxectivo de establecer o intervalo de retención efectivo. No experimento 4 da matriz de Plackett-Burman pode observarse que a pH 7 a retención do chumbo é efectiva. Na Táboa 48 recóllese o resultado desta análise.

**Táboa 48.** Experimentos realizados para establecer o intervalo de pH no cal a retención do chumbo na resina é efectiva.

<b>A</b>	<b>B</b> (mL/min)	<b>C</b> (M)	<b>D</b> ( $\mu$ L)	<b>E</b> (mL/min)	<b>F</b> (mm)	<b>Recuperación</b> (%)
4	3	3	160,9	3	1	92,1
4,5	3	3	160,9	3	1	101,2
8	3	3	160,9	3	1	38,3

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Como pode observarse, a retención do chumbo na resina é efectiva no intervalo de pH 4,5-7.

Os valores óptimos para cada unha das variables implicadas na preconcentración do chumbo na resina Serdolit Che móstranse na Táboa 49.

**Táboa 49.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do chumbo na resina Serdolit Che.

<b>VARIABLE</b>	<b>VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE</b>
<b>pH da mostra</b>	4,5-7
<b>Caudal de mostra</b>	3 mL/min
<b>Concentración de eluente (HCl)</b>	3 M
<b>Volume de eluente</b>	160,9 $\mu$ L
<b>Caudal de eluente</b>	3 mL/min
<b>Diámetro da minicolumna</b>	1 mm

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

#### ▪ Elección da resina para levar a cabo a preconcentración do chumbo

Na Táboa 50, recóllense os valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do chumbo en cada resina. Nos resultados obtidos obsérvase que tódalas variables teñen o mesmo valor,

excepto o intervalo de pH. Posto que o intervalo de pH efectivo de retención é máis amplo no caso da resina Chelite P, e tendo en conta que o pH do extracto ácido a preconcentrar cando se leve a cabo a extracción deste metal nas mostras sólidas de natureza alimenticia será moi baixo, a resina **Chelite P** será a empregada na preconcentración do chumbo.

**Táboa 50.** Valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do chumbo en cada resina.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA UNHA DAS VARIABLES IMPLICADAS NA PRECONCENTRACIÓN DO CHUMBO EN CADA RESINA	
	CHELITE P	SERDOLIT CHE
<b>A</b>	2-7	4,5-7
<b>B (mL/min)</b>	3	3
<b>C (M)</b>	3	3
<b>D (µL)</b>	160,9	160,9
<b>E (mL/min)</b>	3	3
<b>F (mm)</b>	1	1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

### 2.3 Preconcentración do cobalto

A optimización deste proceso realizouse aplicando o deseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  de resolución tipo III e con 6 graos de liberdade e un punto central, cuxa matriz de experimentos se recolle na Táboa 16. As variables que afectan á extracción do cobalto, así como os seus valores máximos e mínimos, seleccionados en base a experimentos previos, refléxanse na Táboa 51.

**Táboa 51.** Valores máximos e mínimos establecidos para cada unha das variables no deseño de Plackett-Burman.

VARIABLE	NOTACIÓN	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
<b>pH</b>	<b>A</b>	1	7
<b>Caudal de mostra</b>	<b>B</b>	0,5 mL/min	4,0 mL/min
<b>[HCl] (eluyente)</b>	<b>C</b>	0,1 M	3,0 M
<b>Volume de eluyente</b>	<b>D</b>	70,4 $\mu$ L	190,0 $\mu$ L
<b>Caudal de eluyente</b>	<b>E</b>	3 mL/min	5 mL/min
<b>Diámetro da minicolumna</b>	<b>F</b>	1 mm	2 mm

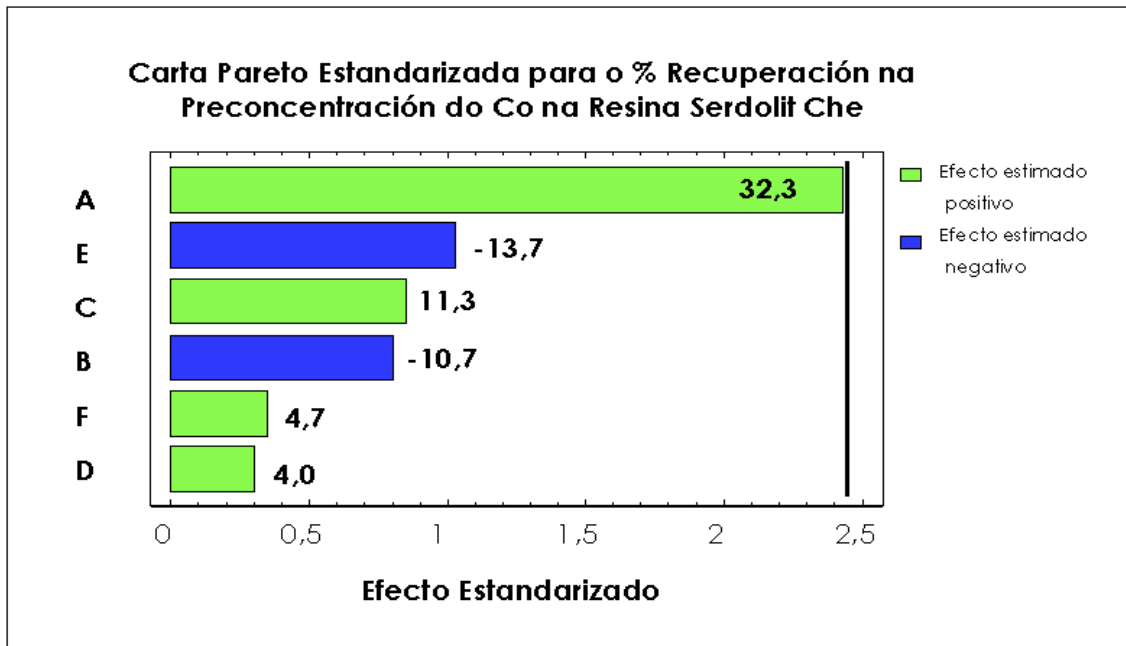
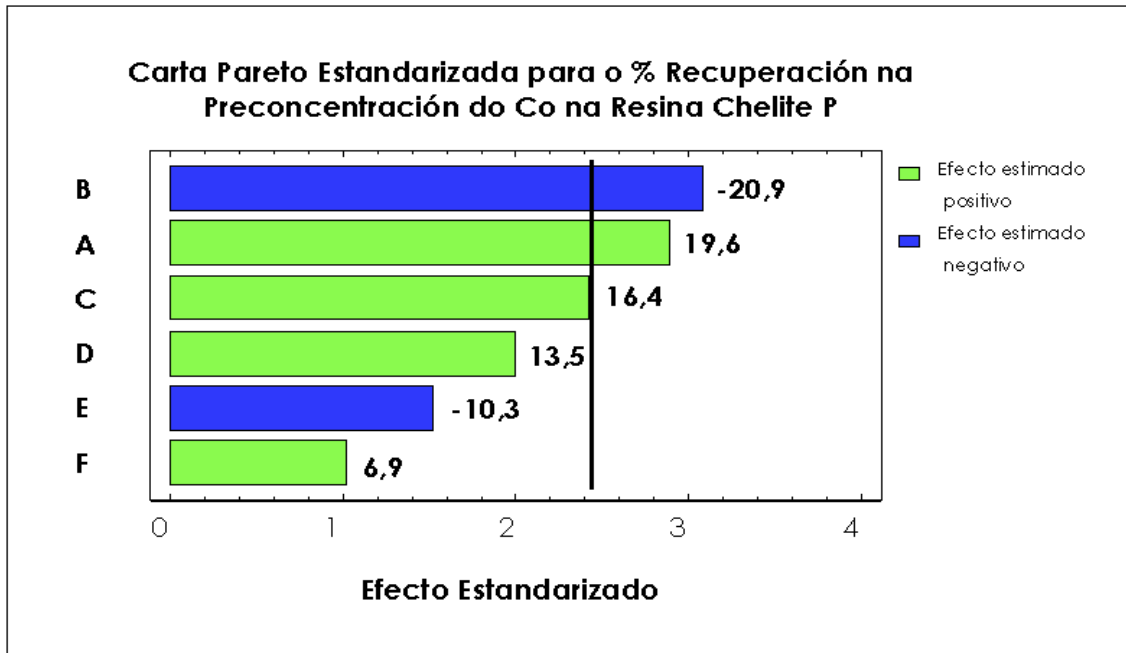
Unha vez obtida a matriz de Plackett-Burman leváronse a cabo os experimentos obtidos na mesma, empregando dispositivo FIA indicado na Figura 14. Este deseño aplicouse a unha disolución patrón de cobalto de 0,04  $\mu$ g/mL, facéndose pasar a través de cada minicolumna de preconcentración 2 mL da mesma. A matriz de Plackett-Burman cos valores que toma cada unha das variables en cada un dos experimentos, xunto co % Recuperación obtido en cada un deles para cada unha das resinas, recóllese na Táboa 52. Os experimentos realizáronse por duplicado, polo cal o % Recuperación é a media dos dous resultados obtidos.

**Táboa 52.** Matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores de cada variable en cada experimento e % Recuperación obtido en cada experimento para cada resina.

NE	A	B	C	D	E	F	% Recuperación	
							Chelite P	Serdolit Che
1	7	0,5	3	70,4	3	1	45,1	41,2
2	7	4	0,1	190	3	1	24,3	30,7
3	1	4	3	70,4	5	1	9,3	0,0
4	7	0,5	3	190	3	2	84,6	67,2
5	7	4	0,1	190	5	1	18,5	12,4
6	7	4	3	70,4	5	2	22,1	23,8
7	4	2,25	1,55	130,2	4	1,5	45,8	70,7
8	1	4	3	190	3	2	20,0	0,0
9	1	0,5	3	190	5	1	30,1	0,0
10	1	0,5	0,1	190	5	2	25,0	0,0
11	7	0,5	0,1	70,4	5	2	26,1	21,1
12	1	4	0,1	70,4	3	2	4,9	0,0
13	1	0,5	0,1	70,4	3	1	13,9	0,0

NE, número de experimento; A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Unha vez realizados os experimentos, procedeuse á análise dos datos. Para coñecer que variables son estatisticamente significativas, recórrase ás **Cartas Pareto Estandarizadas** que se recollen na Figura 21.



**Figura 21.** Carta pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial. A liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, Caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

### **2.3.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial**

Nos resultados obtidos ó aplicar o deseño de Plackett-Burman á preconcentración do cobalto empregando as dúas resinas quelantes, obsérvase unha tendencia similar en tódalas variables. Os caudais de mostra e elución teñen efectos estimados negativos, mentras que o resto das variables afectan positivamente ó proceso de preconcentración. Non obstante, para a resina Chelite P hai dúas variables estatisticamente significativas, o caudal e o pH da mostra, mentras que para a resina Serdolit Che ningunha das variables afecta significativamente ó proceso de preconcentración, se ben a variable pH da mostra se atopa próxima á liña que indica o nivel de significación, establecido polo método para un 95 % de confianza.

Polo tanto, os valores óptimos de cada unha das variables tendo en conta os resultados obtidos ó aplicar o deseño de Plackett-Burman, son os que se mostran na Táboa 53.

Posto que o deseño de Plackett-Burman nos indica a tendencia das variables cara o valor óptimo, pero non dito valor, realizáronse unha serie de experimentos fóra do marco do deseño e dacordo cos resultados obtidos no mesmo, para determinar o valor óptimo de cada unha das variables que afectan ó proceso de preconcentración de cobalto nas diferentes resinas.

**Táboa 53.** Valores óptimos dacordo co deseño de Plackett-Burman para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cobalto nas diferentes resinas.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES DACORDO CO DESEÑO DE PLACKETT-BURMAN	
	Chelite P	Serdolit Che
<b>A</b>	7	7
<b>B (mL/min)</b>	0,5	0,5
<b>C (M)</b>	3	3
<b>D (µL)</b>	190	190
<b>E (mL/min)</b>	3	3
<b>F (mm)</b>	2	2

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

### 2.3.2 Experimentos fóra do marco do deseño

#### ▪ Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do cobalto empregando a resina quelante Chelite P

Neste caso en concreto, e posto que en ningún dos experimentos da matriz de Plackett-Burman (Táboa 52) se obtiveron resultados cuantitativos, estudiáronse en primeiro lugar as variables estatisticamente significativas, é dicir, o caudal de paso de mostra e o pH da mesma.

O **pH da mostra** estivo entre 4 e 6,5, posto que a pH 7, tal e como mostra o experimento 4 da matriz de Plackett-Burman, a retención do cobalto non é efectiva. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 54.

**Táboa 54.** Experimentos realizados para establecer o intervalo de pH no cal a retención do cobalto na resina é efectiva.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
6,5	0,5	3	190	3	2	101,3
4,5	0,5	3	190	3	2	101,0
4	0,5	3	190	3	2	85,1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **caudal de mostra** é a outra variable estatisticamente significativa e ten un efecto estimado negativo (efecto estimado=-20,9). Non obstante, estúdiouse a posibilidade de aumentar o valor proporcionado polo deseño de Plackett-Burman, para aumentar así a frecuencia de mostraxe. A Táboa 55 mostra o resultado desta análise. A preconcentración é cuantitativa a un caudal de paso de mostra de 2 mL/min.

**Táboa 55.** Experimentos realizados para a optimización do caudal de mostra.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	2	3	190	3	2	101,0
5	3	3	190	3	2	81,1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Con respecto ás variables non significativas, é dicir, aquelas con menos importancia no proceso de preconcentración, teñen efecto estimado positivo o diámetro da minicolumna (efecto estimado=6,9), o volume de eluente (efecto estimado=13,5) e a concentración de eluente (efecto estimado=16,4).

O caudal de elución é a única variable non significativa con efecto estimado negativo (efecto estimado=-10,3).

No que respecta ó **diámetro da minicolumna**, estúdiouse a posibilidade de traballar con minicolumnas de 1 mm de diámetro, para evitar ter que facer axustes nas conexións entre a minicolumna e o sistema FIA. O resultado desta análise recóllese na Táboa 56.

**Táboa 56.** Experimento realizado para a optimización do diámetro da minicolumna.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	2	3	190	3	1	103,0

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **volume de eluente** é unha variable non significativa con efecto estimado positivo. Estúdiouse a posibilidade de reducir o valor proporcionado polo deseño de Plackett-Burman (190  $\mu$ L) ó mínimo valor que permita a obtención dunha recuperación cuantitativa. A Táboa 57 mostra o resultado desta análise. Un volume de eluente de 150,8  $\mu$ L resultou ser suficiente para arrastrar cara o detector todo o metal retido na minicolumna.

**Táboa 57.** Experimentos realizados para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	2	3	140,8	3	1	77,1
5	2	3	150,8	3	1	103,0

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

A **concentración de eluente** é a variable non significativa con maior efecto estimado (efecto estimado=16,4). Estudiouse a posibilidade de empregar ácido clorhídrico máis diluído que o 3 M. O resultado da análise, que se recolle na Táboa 58 demostrou que dita dilución non proporcionaba recuperacións cuantitativas.

**Táboa 58.** Experimento realizado para a optimización da concentración de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	2	2	150,8	3	1	90,4

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Por último, intentouse aumentar o **caudal de elución**, co obxectivo de aumentar a sensibilidade, posto que a velocidade de aspiración do nebulizador ha de ser similar ó caudal de elución. Non obstante e tal e como se indica na Táboa 59, o aumento do caudal de elución a 4 mL/min non proporcionou resultados cuantitativos.

**Táboa 59.** Experimento realizados para a optimización do caudal de elución.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	2	3	150,8	4	1	64,8

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Os valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración de cobalto na resina Chelite P indícanse na Táboa 60.

**Táboa 60.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do cobalto na resina Chelite P.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
pH da mostra	4,5-6,5
Caudal de mostra	2 mL/min
Concentración de eluente (HCl)	3 M
Volume de eluente	150,8 $\mu$ L
Caudal de eluente	3 mL/min
Diámetro da minicolumna	1 mm

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

▪ **Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do cobalto empregando a resina quelante Serdolit Che**

No caso da preconcentración do cobalto empregando a resina quelante Serdolit Che, non hai ninguna variable estatisticamente significativa. Non obstante, o pH da mostra presenta un efecto estimado elevado (efecto estimado=32,3) e moi próximo á liña vertical que indica o nivel de significación, establecido polo método para un 95 % de confianza. Como en ningún dos experimentos da matriz de Plackett-Burman (Táboa 52) se obtiveron resultados cuantitativos, a optimización fóra do marco do deseño comezouse pola variable con máis peso estatístico, é dicir, o pH da mostra. O **pH da mostra** estulouse entre 4 e 6, tal e como se indica na Táboa 61. Dos resultados obtidos, pode concluirse que o intervalo de pH de retención efectiva é pequeno, concretamente entre 4,5 e 5,5.

**Táboa 61.** Experimentos realizados para establecer o intervalo de pH no cal a retención do cadmio na resina é efectiva.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
6	0,5	3	190	3	2	92,5
5,5	0,5	3	190	3	2	100,6
4,5	0,5	3	190	3	2	101,8
4	0,5	3	190	3	2	85,3

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

A variable **diámetro da minicolumna** ten un efecto estimado positivo (efecto estimado=4,7). Estudiouse a posibilidade de empregar minicolumnas de preconcentración con diámetros de 1 mm. O resultado desta análise mostrase na Táboa 62.

**Táboa 62.** Experimento realizado para a optimización do diámetro da minicolumna.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	0,5	3	190	3	1	101,4

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

No que respecta á **concentración de eluente**, estudiouse a posibilidade de reducir a concentración do ácido clorhídrico. Tal e como mostra a Táboa 63, esta redución non foi posible, posto que a utilización de ácido 2 M proporcionou unha recuperación do 81,8 %.

**Táboa 63.** Experimento realizado para a optimización da concentración de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	0,5	2	190	3	1	81,8

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **volume de eluente** é a variable con menor efecto estimado (efecto estimado=4,0). Estudiouse a posibilidade de reducir este volume, co obxectivo de obter un maior factor de preconcentración. A Táboa 64 recolle o resultado deste estudio.

**Táboa 64.** Experimentos realizados para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	0,5	3	140,8	3	1	93,0
5	0,5	3	150,8	3	1	101,4

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Por último, estudiáronse as variables con efecto estimado negativo, é dicir, o **caudal de mostra** (efecto estimado=-10,7) e o **caudal de elución** (efecto estimado=-13,7). Co obxectivo de lograr análises rápidas e aumentar a sensibilidade, estudiouse a posibilidade de aumentar o valor destas variables. Na Táboa 65 recóllese o resultado deste estudio: non foi posible aumentar o valor de ningunha destas variables.

**Táboa 65.** Experimentos realizados para a optimización dos caudais de mostra e elución.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	1	3	150,8	3	2	74,3
5	0,5	3	150,8	4	2	60,8

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Os valores óptimos das variables implicadas no proceso de preconcentración do cobalto na resina Serdolit Che indícanse na Táboa 66.

**Táboa 66.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do cobalto na resina Serdolit Che.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
pH da mostra	4,5-5,5
Caudal de mostra	0,5 mL/min
Concentración de eluente (HCl)	3 M
Volume de eluente	150,8 $\mu$ L
Caudal de eluente	3 mL/min
Diámetro da minicolumna	1 mm

▪ **Elección da resina para levar a cabo a preconcentración do cobalto**

A Táboa 67 recolle os valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cobalto en cada resina.

Como pode observarse na táboa, só hai dúas variables que presentan un valor óptimo diferente para as dúas resinas: o intervalo de pH efectivo para a retención e o caudal de mostra. Ambos resultados demostran que a resina máis axeitada para a retención do cobalto é a resina Chelite P, posto que presenta un intervalo óptimo de pH máis amplo para a retención e un caudal

de mostra 4 veces maior. Esta última variable é a decisiva á hora da elección da resina, posto que implica que o proceso de preconcentración terá lugar 4 veces máis rápido. Polo tanto, a resina elixida para levar a cabo a preconcentración do cobalto é a resina **Chelite P**.

**Táboa 67.** Valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cobalto en cada resina.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA UNHA DAS VARIABLES IMPLICADAS NA PRECONCENTRACIÓN DO COBALTO EN CADA RESINA	
	CHELITE P	SERDOLIT CHE
<b>A</b>	4,5-6,5	4,5-5,5
<b>B (mL/min)</b>	2	0,5
<b>C (M)</b>	3	3
<b>D (µL)</b>	150,8	150,8
<b>E (mL/min)</b>	3	3
<b>F (mm)</b>	1	1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

#### 2.4 Preconcentración do cromo

Este proceso optimizouse aplicando o deseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  de resolución tipo III e con 6 graos de liberdade e un punto central, cuxa matriz de experimentos se recolle na Táboa 16. As variables que afectan á extracción do cromo, así como os seus valores máximos e mínimos, seleccionados en base a experimentos previos, recóllense na Táboa 68.

**Táboa 68.** Valores máximos e mínimos establecidos para cada unha das variables no deseño de Plackett-Burman.

VARIABLE	NOTACIÓN	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
pH	A	1	7
Caudal de mostra	B	0,5 mL/min	4,0 mL/min
[HCl] (eluente)	C	0,1 M	3,0 M
Volume de eluente	D	70,4 $\mu$ L	190,0 $\mu$ L
Caudal de eluente	E	3 mL/min	5 mL/min
Diámetro da minicolumna	F	1 mm	2 mm

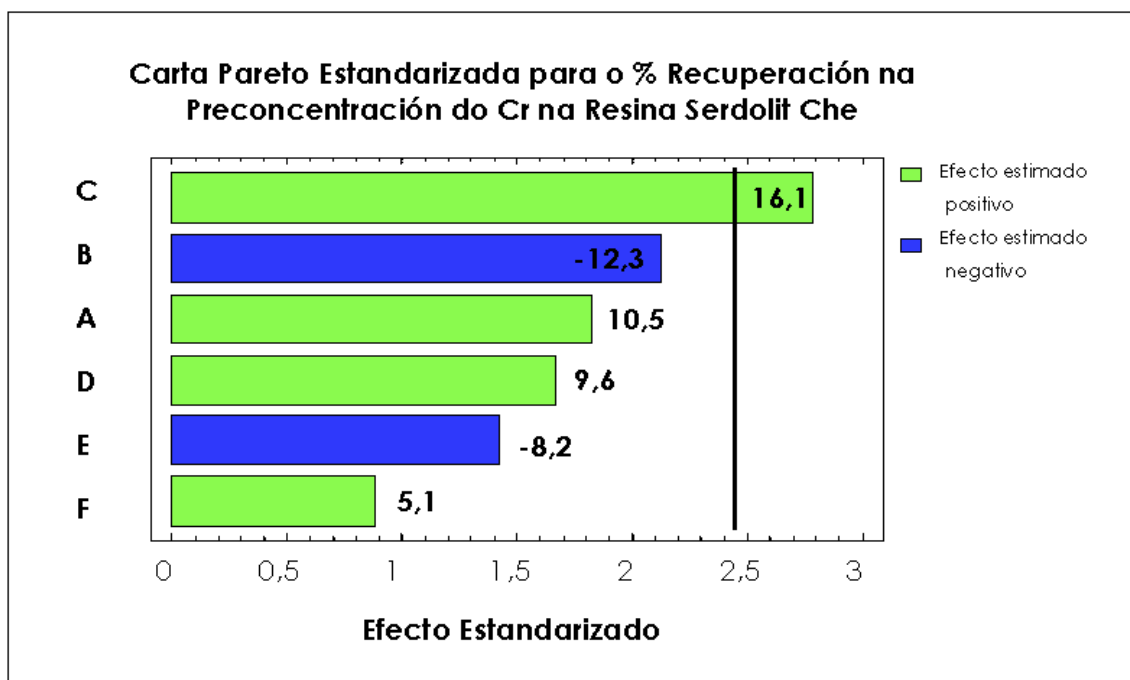
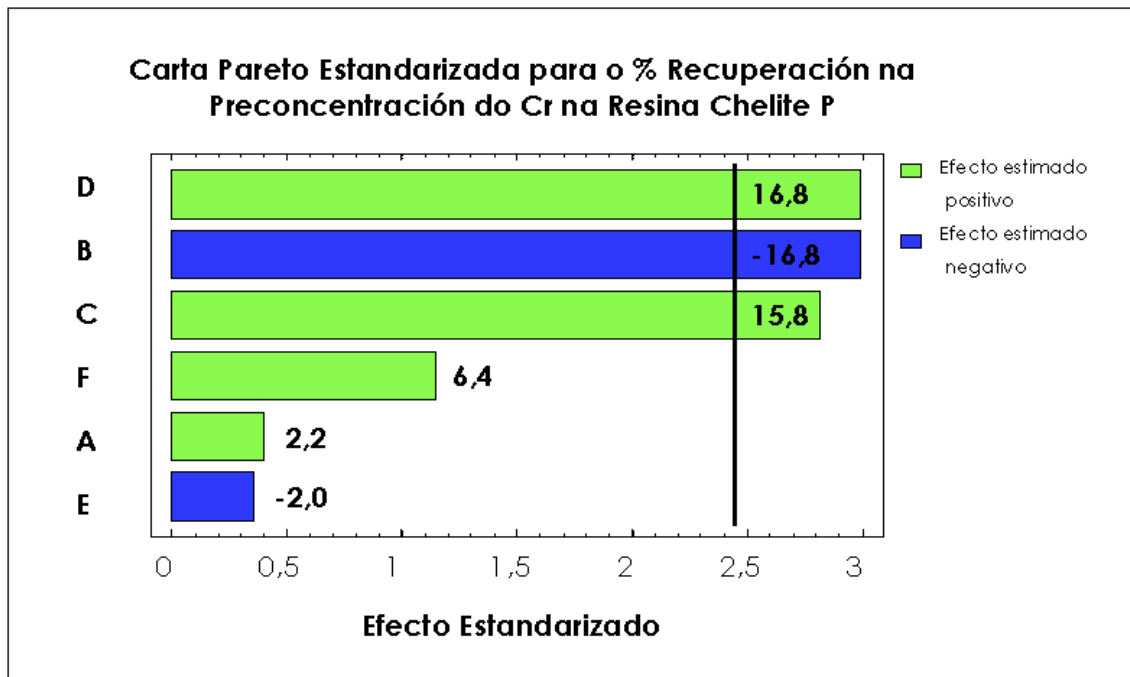
A matriz de Plackett-Burman cos valores que toma cada unha das variables en cada experimento e o % Recuperación obtido en cada caso recóllese na Táboa 69. Os experimentos realizáronse por duplicado e cunha disolución patrón de cromo de 0,075  $\mu$ g/mL, facéndose pasar a través de cada minicolumna 2 mL da mesma.

Unha vez realizados os experimentos da matriz, empregando para tal fin o dispositivo FIA indicado na Figura 14, procedeuse á análise dos datos proporcionados polo deseño. É preciso coñecer que variables son significativas e como afectan ó proceso de extracción, para o cal se recorre ás **Cartas Pareto Estandarizadas**, que se recollen na Figura 22.

**Táboa 69.** Matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores de cada variable en cada experimento e % Recuperación obtido en cada experimento para cada resina.

NE	A	B	C	D	E	F	% Recuperación	
							Chelite P	Serdolit Che
1	7	0,5	3	70,4	3	1	23,6	30,6
2	7	4	0,1	190	3	1	12,7	15,3
3	1	4	3	70,4	5	1	10,3	13,0
4	7	0,5	3	190	3	2	59,0	63,4
5	7	4	0,1	190	5	1	10,8	12,3
6	7	4	3	70,4	5	2	11,1	17,8
7	4	2,25	1,55	130,2	4	1,5	36,1	36,7
8	1	4	3	190	3	2	25,8	20,5
9	1	0,5	3	190	5	1	48,0	25,8
10	1	0,5	0,1	190	5	2	24,5	14,4
11	7	0,5	0,1	70,4	5	2	19,9	15,0
12	1	4	0,1	70,4	3	2	9,5	7,1
13	1	0,5	0,1	70,4	3	1	5,8	10,5

NE, número de experimento; A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.



**Figura 22.** Carta pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial. A liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, Caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

### 2.4.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial

Nos resultados obtidos ó aplicar o deseño de Plackett-Burman á preconcentración do cromo coas dúas resinas, obsérvase que no caso da resina Chelite P hai tres variables estatisticamente significativas, o volume de eluente (efecto estimado=16,8), o caudal de mostra (efecto estimado=-16,8) e a concentración de eluente (efecto estimado=15,8), mentras que a concentración de eluente é a única variable estatisticamente significativa para a resina Serdolit Che. As demais variables non superan o nivel de significación establecido polo método para un 95 % de confianza (representado pola liña vertical). O comportamento das variables é similar nas dúas resinas: os caudais de mostra e elución afectan ó sistema de forma negativa, mentras que o pH da mostra, a concentración de eluente, o volume de eluente e o diámetro da minicolumna o fan positivamente.

Unha vez analizados os resultados obtidos co deseño de Plackett-Burman, os valores establecidos como óptimos según o deseño factorial de Screening para cada unha das variables son os que se indican na Táboa 70.

Tendo en conta que o deseño de Plackett-Burman non proporciona o valor óptimo das variables, senon a tendencia das mesmas cara o valor óptimo, realizáronse unha serie de experimentos fóra do marco do deseño e dacordo cos resultados obtidos no mesmo, para determinar o valor óptimo de cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cromo nas resinas Chelite P e Serdolit Che.

**Táboa 70.** Valores óptimos dacordo co deseño de Plackett-Burman para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cromo nas diferentes resinas.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES DACORDO CO DESEÑO DE PLACKETT-BURMAN	
	Chelíte P	Serdolit Che
<b>A</b>	7	7
<b>B (mL/min)</b>	0,5	0,5
<b>C (M)</b>	3	3
<b>D (µL)</b>	190	190
<b>E (mL/min)</b>	3	3
<b>F (mm)</b>	2	2

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

#### 2.4.2 Experimentos fóra do marco do deseño

- **Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do cromo empregando a resina quelante Chelíte P**

Neste caso, ó igual que na preconcentración do cobalto, non hai ningún experimento da matriz de Plackett-Burman onde se obteñan resultados cuantitativos. Da mesma maneira, a optimización fóra do marco do deseño comezouse polo estudo do **pH da mostra** óptimo para a retención, mantendo as outras variables nos valores proporcionados polo deseño. O pH estúdiouse entre 2,5 e 5, e os resultados obtidos recóllense na Táboa 71.

**Táboa 71.** Experimentos realizados para establecer o intervalo de pH no cal a retención do cromo na resina é efectiva.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
2,5	0,5	3	190	3	2	89,9
3	0,5	3	190	3	2	101,6
4,5	0,5	3	190	3	2	96,8
5	0,5	3	190	3	2	73,6

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Como se pode observar na táboa, o intervalo de pH efectivo para a retención do cromo é entre 3 e 4,5.

O **diámetro da minicolumna** é a outra variable non significativa con efecto estimado positivo (efecto estimado=6,4). Estudiouse a posibilidade de empregar minicolumnas con 1 mm de diámetro interno, para evitar facer axustes nas conexións entre a minicolumna e o sistema FIA. O resultado deste estudio mostrase na Táboa 72.

**Táboa 72.** Experimento realizado para a optimización do diámetro da minicolumna.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	0,5	3	190	3	1	101,6

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **caudal de elución** é a variable non significativa con menor efecto estimado (efecto estimado=-2,0). Estudiouse a posibilidade de aumentar o seu valor, co obxectivo de conseguir unha maior sensibilidade, posto que o caudal

de elución e a velocidade de aspiración do nebulizador han de ser parellas. Este aumento non foi posible, tal e como recolle a Táboa 73.

**Táboa 73.** Experimento realizados para a optimización do caudal de elución.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	0,5	3	190	4	1	82,1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

No referente á **concentración de eluente**, a variable estatisticamente significativa con menor efecto estimado, estídiouse a posibilidade de diminuír o seu valor. Non obstante, a utilización de ácido clorhídrico 2 M non proporcionou resultados cuantitativos. O resultado deste estudio móstrase na Táboa 74.

**Táboa 74.** Experimento realizado para a optimización da concentración de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	0,5	2	190	3	1	87,5

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O volume de eluente e o caudal de mostra son as variables estatisticamente significativas con maior peso no proceso de preconcentración, se ben a tendencia das mesmas é oposta. O **caudal de mostra** afecta negativamente ó proceso. Estídiouse a posibilidade de aumentalo, co obxectivo de lograr unha maior frecuencia de mostraxe. Tal e

como se indica na Táboa 75, nin sequera o aumento de 0,5 a 1 mL/min foi posible.

**Táboa 75.** Experimentos realizados para a optimización do caudal de mostra.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	1	3	190	3	1	74,9

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Por último optimizouse fóra do marco do deseño o **volume de eluente**. Co obxectivo de lograr un maior factor de preconcentración, estudiouse a posibilidade de diminuír o valor desta variable proporcionado polo deseño de Plackett-Burman (190  $\mu$ L). O resultado deste estudio móstrase na Táboa 76. O menor volume de eluente capaz de proporcionar resultados cuantitativos foi 160,9  $\mu$ L.

**Táboa 76.** Experimentos realizados para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	0,5	3	160,9	3	1	101,6
4	0,5	3	150,8	3	1	88,5

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Os valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do cromo na resina Chelite P indícanse na Táboa 77.

**Táboa 77.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do cromo na resina Chelite P.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
pH da mostra	3-4,5
Caudal de mostra	0,5 mL/min
Concentración de eluente (HCl)	3 M
Volume de eluente	160,9 $\mu$ L
Caudal de eluente	3 mL/min
Diámetro da minicolumna	1 mm

▪ **Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do cromo empregando a resina quelante Serdolit Che**

Neste caso só a concentración de eluente é unha variable estatisticamente significativa. Do mesmo xeito que na preconcentración do cromo na resina Chelite P, non se obtivo ningún valor cuantitativo nos experimentos proporcionados pola matriz de Plackett-Burman. A optimización fóra do marco do deseño comezouse polo **pH da mostra**, realizándose unha serie de experimentos para establecer o intervalo de pH no cal a retención do metal na resina é efectiva. Os resultados deste estudio recóllense na Táboa 78.

**Táboa 78.** Experimentos realizados para establecer o intervalo de pH no cal a retención do cromo na resina é efectiva.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
3	0,5	3	190	3	2	80,8
3,5	0,5	3	190	3	2	98,4
4,5	0,5	3	190	3	2	102,9
5	0,5	3	190	3	2	82,7

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Como se pode observar na táboa, o intervalo de pH no cal a retención do cromo é efectiva é entre 3,5 e 4,5.

Entre as outras variables que non superan o nivel de significación establecido polo método para un 95 % de confianza están o volume de eluente e o diámetro da minicolumna, con efectos estimados positivos, e os caudais de mostra e elución, con efectos estimados negativos.

O **diámetro da minicolumna** é a variable con menos peso estatístico no proceso de preconcentración do cromo (efecto estimado=5,1). Estudouse a posibilidade de traballar con minicolumnas de diámetro 1mm, para evitar facer conexións entre o sistema FIA e a propia minicolumna. O resultado desta análise recóllese na Táboa 79.

**Táboa 79.** Experimento realizado para a optimización do diámetro da minicolumna.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	0,5	3	190	3	1	102,9

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **volume de eluente** é a outra variable non significativa con efecto estimado positivo (efecto estimado=9,6). Co obxectivo de aumentar o factor de preconcentración, estudouse a posibilidade de diminuír o valor proporcionado polo deseño (190  $\mu$ L). A Táboa 80 recolle o resultado deste estudio. O mínimo valor de volume de eluente capaz de proporcionar un valor cuantitativo do % Recuperación foi 133,2  $\mu$ L.

**Táboa 80.** Experimentos realizados para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	0,5	3	133,2	3	1	102,9
4	0,5	3	123,2	3	1	85,8

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **caudal de mostra** e o **caudal de elución** son as únicas variables que teñen un efecto estimado negativo. Estudiouse a posibilidade de aumentar o valor destas dúas variables, co obxectivo de aumentar a frecuencia de mostraxe e a sensibilidade. Os experimentos realizados e os seus resultados, recóllense na Táboa 81. O caudal de mostra puido aumentarse ata 1,5 mL/min, mentras que o caudal de elución se tivo que manter en 3 mL/min.

**Táboa 81.** Experimentos realizados para a optimización dos caudais de mostra e elución.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	2	3	133,2	3	1	90,6
4	1,5	3	133,2	3	1	95,2
4	1,5	3	133,2	4	1	89,5

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Con respecto á única variable estatisticamente significativa, a **concentración de eluente**, estudiouse a posibilidade de empregar ácido clorhídrico máis diluído. Tal e como se recolle na Táboa 82, esta dilución non foi posible.

**Táboa 82.** Experimento realizado para a optimización da concentración de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	1,5	2	133,2	3	1	88,8

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Os valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do cromo na resina Serdolit Che, son os que se indican na Táboa 83.

**Táboa 83.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do cromo na resina Serdolit Che

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
pH da mostra	3,5-4,5
Caudal de mostra	1,5 mL/min
Concentración de eluente (HCl)	3 M
Volume de eluente	133,2 $\mu$ L
Caudal de eluente	3 mL/min
Diámetro da minicolumna	1 mm

▪ **Elección da resina para levar a cabo a preconcentración do cromo**

A Táboa 84 recolle os valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cromo en cada resina.

Como pode observarse na táboa, o diámetro da minicolumna, o caudal de elución e a concentración de eluente teñen o mesmo valor óptimo para cada unha das resinas. A elección dunha ou outra farase, polo tanto, en base ós valores das outras variables. O intervalo de pH efectivo para a retención é similar en ambas resinas. O caudal de mostra é maior no caso da resina

Serdolit Che. Concretamente, nesta resina a preconcentración levarase a cabo 3 veces máis rápido que coa resina Chelite P, o que contribuirá a mellorar a frecuencia de mostraxe. A resina Serdolit Che tamén ten menor volume de eluente, o que permitirá a obtención dun factor de preconcentración maior. Á vista destes resultados, a resina elexida para levar a cabo a preconcentración do cromo será a **Serdolit Che**.

**Táboa 84.** Valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cromo en cada resina.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA UNHA DAS VARIABLES IMPLICADAS NA PRECONCENTRACIÓN DO CROMO EN CADA RESINA	
	CHELITE P	SERDOLIT CHE
<b>A</b>	3-4,5	3,5-4,5
<b>B (mL/min)</b>	0,5	1,5
<b>C (M)</b>	3	3
<b>D (µL)</b>	160,9	133,2
<b>E (mL/min)</b>	3	3
<b>F (mm)</b>	1	1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

## 2.5 Preconcentración do níquel

A optimización deste proceso realizouse aplicando o deseño de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  de resolución tipo III e con 6 graos de liberdade e un punto central, cuxa matriz de experimentos se recolle na Táboa 16. As variables que afectan á extracción do níquel, así como os seus valores máximos e mínimos, non difiren das anteriores e móstranse na Táboa 68 (páxina 135).

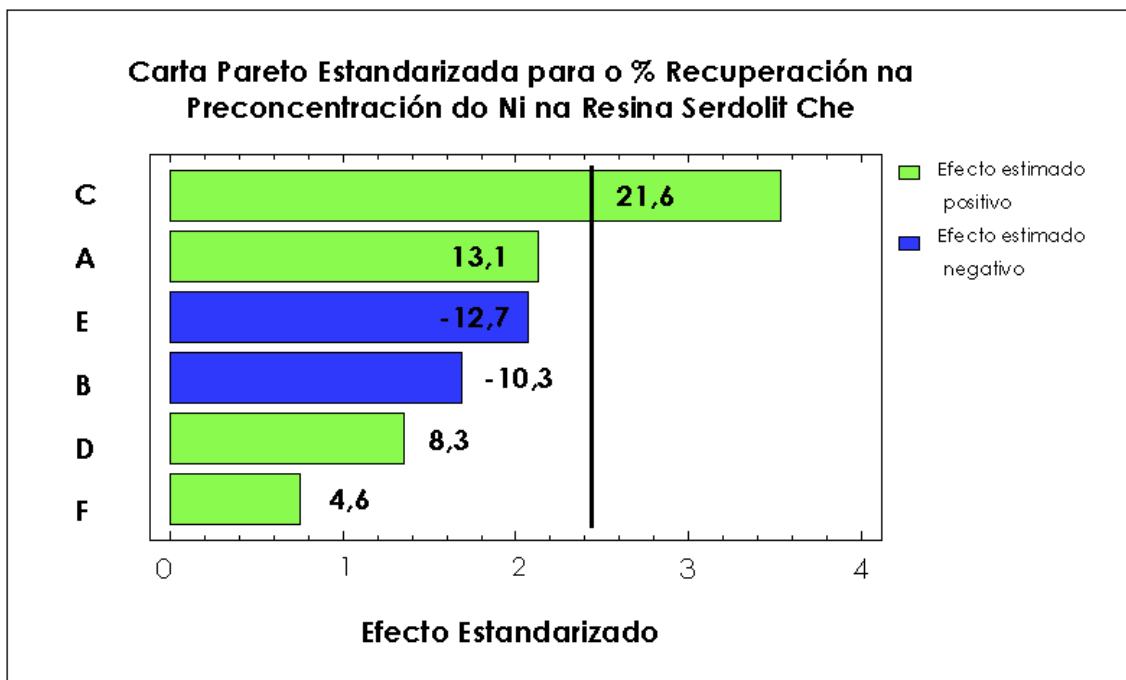
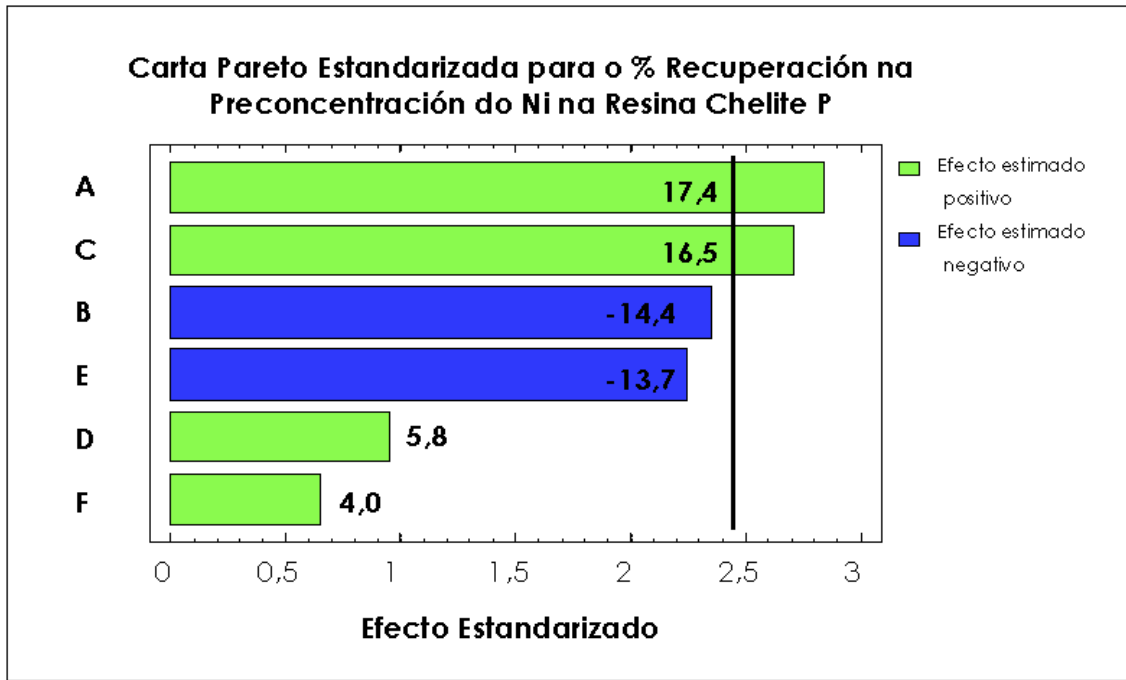
Unha vez obtida a matriz do deseño realizáronse os experimentos recollidos na mesma empregando o dispositivo FIA indicado na Figura 14. O deseño aplicouse a unha disolución patrón de níquel de 0,04 µg/mL, facéndose pasar a través das minicolumnas de preconcentración 2 mL desta disolución. A matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores que toma cada variable en cada experimento e o % Recuperación obtido en cada caso, móstrase na Táboa 85. Os experimentos realizáronse por duplicado, de xeito que o % Recuperación indicada e a media dos dous experimentos.

Unha vez realizados os 13 experimentos, procedeuse á análise dos datos proporcionados polo deseño. Para coñecer que variables son significativas e como afectan ó proceso de preconcentración, recórrese ás **Cartas Pareto Estandarizadas** para cada resina, que se recollen na Figura 23.

**Táboa 85.** Matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores de cada variable en cada experimento e % Recuperación obtido en cada experimento para cada resina.

NE	A	B	C	D	E	F	% Recuperación	
							Chelite P	Serdolit Che
1	7	0,5	3	70,4	3	1	37,7	37,1
2	7	4	0,1	190	3	1	10,0	11,6
3	1	4	3	70,4	5	1	3,0	8,8
4	7	0,5	3	190	3	2	62,6	61,8
5	7	4	0,1	190	5	1	6,0	7,5
6	7	4	3	70,4	5	2	11,0	18,1
7	4	2,25	1,55	130,2	4	1,5	27,2	38,6
8	1	4	3	190	3	2	8,0	22,5
9	1	0,5	3	190	5	1	10,5	19,5
10	1	0,5	0,1	190	5	2	3,5	4,9
11	7	0,5	0,1	70,4	5	2	8,0	6,0
12	1	4	0,1	70,4	3	2	2,0	3,4
13	1	0,5	0,1	70,4	3	1	4,0	4,5

NE, número de experimento; A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.



**Figura 22.** Carta pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial. A liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, Caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

### 2.5.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial

Nos resultados obtidos ó aplicar o deseño factorial de Plackett-Burman á preconcentración do níquel coas resinas Chelite P e Serdolit Che, pode observarse un comportamento bastante similar para as dúas resinas. En ambos casos, a concentración de eluente e o pH da mostra son as variables con maior importancia no proceso de preconcentración, e a influencia que teñen no mesmo é positiva. Non obstante, para a resina Chelite P son significativas as variables pH da mostra e concentración de eluente, mentras que para a resina Serdolit Che só a concentración de eluente é significativa.

As demais variables non superan o nivel de significación establecido polo método para un 95 % de confianza, representado nas Cartas Pareto pola liña vertical. O comportamento destas variables non significativas é similar para as dúas resinas. Os caudais de mostra e elución son únicas variables con efecto estimado negativo e o volume de eluente e o diámetro da minicolumna, as variables con menor importancia no proceso de preconcentración.

Unha vez analizados os datos obtidos ó aplicar o deseño de Plackett-Burman, os valores establecidos como óptimos según o deseño factorial de Screening para cada unha das variables son os que figuran na Táboa 86.

Como o deseño aplicado só nos proporciona a tendencia das variables cara o seu valor óptimo, pero non dito valor óptimo en sí mesmo, procedeuse a realizar unha serie de experimentos fóra do marco do deseño, dacordo cos resultados obtidos no mesmo, para determinar o valor óptimo de cada unha das variables que afectan ó proceso de preconcentración do níquel.

**Táboa 86.** Valores óptimos dacordo co deseño de Plackett-Burman para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do cromo nas diferentes resinas.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES DACORDO CO DESEÑO DE PLACKETT-BURMAN	
	Chelite P	Serdolit Che
<b>A</b>	7	7
<b>B (mL/min)</b>	0,5	0,5
<b>C (M)</b>	3	3
<b>D (µL)</b>	190	190
<b>E (mL/min)</b>	3	3
<b>F (mm)</b>	2	2

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

### 2.5.2 Experimentos fóra do marco do deseño

#### ▪ Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do níquel empregando a resina quelante Chelite P

Neste caso, ó igual que na preconcentración do cobalto e cromo, non hai ningún experimento da matriz de Plackett-Burman no cal se obteñan resultados cuantitativos, tal e como indica a Táboa 86. Da mesma maneira, a optimización fóra do marco do deseño comezouse polo estudo do **pH da mostra** óptimo para a retención, mantendo as outras variables nos valores proporcionados polo deseño. Esta variable estídiouse entre 4 e 6,5 (a pH 7, según o experimento 4 da matriz de Plackett-Burman non se obtén unha recuperación cuantitativa). O resultado deste estudio recóllese na Táboa 87.

**Táboa 87.** Experimentos realizados para establecer o intervalo de pH no cal a retención do níquel na resina é efectiva.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	0,5	3	190	3	2	82,0
4,5	0,5	3	190	3	2	96,8
6,5	0,5	3	190	3	2	97,9

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Como pode observarse na táboa, a retención do níquel na resina é efectiva no intervalo 4,5-6,5.

Con respecto á outra variable estatisticamente significativa, a **concentración de eluente**, estúdiouse a posibilidade de diminuír o valor proporcionado polo deseño (3 M). Tal e como se mostra na Táboa 88, dita diminución non foi posible.

**Táboa 88.** Experimento realizado para a optimización da concentración de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	0,5	1,5	190	3	2	55,7

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Entre as variables non significativas, o **diámetro da minicolumna** é a que presenta o menor efecto estimado (efecto estimado=4,0). Estúdiouse a posibilidade de empregar minicolumnas cun diámetro interno de 1mm, co obxectivo de evitar facer axustes nas conexións entre a propia minicolumna e o sistema FIA. O resultado deste estudio recóllese na Táboa 89.

**Táboa 89.** Experimento realizado para a optimización do diámetro da minicolumna.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	0,5	3	190	3	1	96,6

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Con respecto ó **volume de eluente**, a outra variable estatisticamente non significativa con efecto estimado positivo (efecto estimado=5,8), levouse a cabo un estudo co obxectivo de diminuír o valor desta variable, para lograr así un maior factor de preconcentración. A Táboa 90 mostra o resultado desta análise. O menor valor desta variable capaz de proporcionar unha recuperación cuantitativa foi 140,8  $\mu$ L, que se tomou como valor óptimo.

**Táboa 90.** Experimentos realizados para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	0,5	3	133,2	3	1	83,1
5	0,5	3	140,8	3	1	96,8

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Por último estudiáronse as variables non significativas con efecto estimado negativo, o caudal de mostra (efecto estimado=-14,4) e o caudal de elución (efecto estimado=-13,7). O **caudal de mostra** logrouse aumentar dende 0,5 ata 2 mL/min, incrementando así a rapidez da preconcentración 4 veces. Con respecto ó **caudal de elución**, estídiouse a posibilidade de aumentar o seu valor a 4 mL/min, co cal se melloraría a sensibilidade do método. Non obstante, e tal e como mostra a Táboa 91, este incremento non foi posible.

**Táboa 91.** Experimentos realizados para a optimización dos caudais de mostra e elución.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	2	3	140,8	3	1	96,6
5	3	3	140,8	3	1	62,3
5	2	3	140,8	4	1	83,1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Tendo en conta os estudos realizados, os valores óptimos das variables implicadas no proceso de preconcentración do níquel na resina Chelite P indícanse na Táboa 92.

**Táboa 92.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do níquel na resina Chelite P.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
pH da mostra	4,5-6,5
Caudal de mostra	2 mL/min
Concentración de eluente (HCl)	3 M
Volume de eluente	140,8 $\mu$ L
Caudal de eluente	3 mL/min
Diámetro da minicolumna	1 mm

▪ **Experimentos realizados para a optimización da preconcentración do níquel empregando a resina quelante Serdolit Che**

No proceso de preconcentración do níquel empregando a resina Serdolit Che só hai unha variable estatisticamente significativa: a concentración de eluente. Non obstante, tendo en conta que na matriz experimentos non se

obtivo ningunha recuperación cuantitativa (Táboa 86), o estudo fóra do marco do deseño comezouse polo pH da mostra.

O **pH da mostra** é unha variable estatisticamente non significativa con efecto estimado positivo (efecto estimado=13,1) e estudiouse no intervalo 4-6. A pH 7, tal e como mostra o experimento 4 da matriz de Plackett-Burman, a recuperación obtida non é cuantitativa. O estudio do intervalo de pH efectivo para a retención recóllese na Táboa 93. Como pode observarse, a retención do níquel na resina Serdolit Che resulta efectiva no intervalo de pH 4,5-5,5.

**Táboa 93.** Experimentos realizados para establecer o intervalo de pH no cal a retención do níquel na resina é efectiva.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	0,5	3	190	3	2	85,4
4,5	0,5	3	190	3	2	97,4
5,5	0,5	3	190	3	2	100,6
6,0	0,5	3	190	3	2	89,7

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **diámetro da minicolumna** é a variable con menos influencia no proceso de preconcentración. O seu efecto estimado é positivo (4,6) e levouse a cabo un experimento para estudar a posibilidade de empregar minicolumnas con 1 mm de diámetro, co fin de evitar facer axustes nas conexións entre a minicolumna e o sistema FIA. O resultado deste experimento móstrase na Táboa 94.

**Táboa 94.** Experimento realizado para a optimización do diámetro da minicolumna.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	0,5	3	190	3	1	97,4

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O **volume de eluente** é a outra variable non significativa que ten unha influencia positiva no proceso de preconcentración (efecto estimado=8,3). Estudouse a posibilidade de diminuír o valor proporcionado polo deseño, co obxectivo de conseguir un maior factor de preconcentración. O resultado deste estudio indícase na Táboa 95.

**Táboa 95.** Experimentos realizados para a optimización do volume de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
4	0,5	3	123,2	3	1	79,9
4	0,5	3	133,2	3	1	97,4

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Como se observa na táboa, o menor volume de eluente que proporciona un valor do % Recuperación cuantitativo é 133,2  $\mu$ L, co cal este valor será o elixido como óptimo.

O **caudal de mostra** e o **caudal de eluente** son variables non significativas con efecto estimado negativo (-10,3 e -12,7, respectivamente). Realizáronse unha serie de experimentos para intentar aumentar o valor destas variables, para lograr unha maior frecuencia de mostraxe e unha maior sensibilidade. A Táboa 96 mostra o resultado destes experimentos.

**Táboa 96.** Experimentos realizados para a optimización dos caudais de mostra e elución.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	2	3	133,2	3	1	98,7
5	3	3	133,2	3	1	87,4
5	2	3	133,2	4	1	77,8

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

O caudal de mostra máis elevado capaz de proporcionar unha recuperación cuantitativa foi 2 mL/min. Estudíose a posibilidade de aumentar o caudal de elución ata 4 mL/min, pero a recuperación obtida foi de 77,8 %.

Por último, estudíose fóra do marco do deseño a única variable estatisticamente significativa: a **concentración de eluente**. A influencia desta variable no proceso de preconcentración é positiva (efecto estimado=21,6). Intentouse reducir a concentración de eluente de 3 M a 1,5 M. A recuperación obtida neste experimento foi do 64,3 %, de maneira que dita redución non foi posible. O resultado deste experimento recóllese na Táboa 97.

**Táboa 97.** Experimento realizado para a optimización da concentración de eluente.

A	B (mL/min)	C (M)	D ( $\mu$ L)	E (mL/min)	F (mm)	Recuperación (%)
5	2	1,5	133,2	3	2	64,3

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

Os valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do níquel empregando a resina Serdolit Che indícanse na Táboa 98.

**Táboa 98.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de preconcentración do níquel na resina Serdolit Che.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
pH da mostra	4,5-5,5
Caudal de mostra	2 mL/min
Concentración de eluente (HCl)	3 M
Volume de eluente	133,2 $\mu$ L
Caudal de eluente	3 mL/min
Diámetro da minicolumna	1 mm

▪ **Elección da resina para levar a cabo a preconcentración do níquel**

A Táboa 99 recolle os valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do níquel en cada resina.

Tódalas variables presentan o mesmo valor óptimo para as dúas resinas, excepto o pH da mostra e o volume de eluente. Polo tanto, a elección da resina máis axeitada para a preconcentración do níquel farase en base a estas variables.

O intervalo de pH efectivo para a retención é máis amplo no caso da resina Chelite P (4,5-6,5 fronte 4,5-5,5). Non obstante, o límite inferior de ditos intervalos é o mesmo. Tendo en conta que o extracto ácido a preconcentrar vai presentar un valor de pH moito máis baixo de 4,5, esta variable non resulta de gran relevancia á hora da elección da resina. O volume de eluente é a variable que vai determinar o factor de preconcentración. Posto que o volume de eluente na resina Serdolit Che é menor que na resina Chelite P,

empregando a primeira obterase un factor de preconcentración maior. Polo tanto, a resina elixida para levar a cabo a preconcentración do níquel será a resina **Serdolit Che**.

**Táboa 99.** Valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de preconcentración do níquel en cada resina.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA UNHA DAS VARIABLES IMPLICADAS NA PRECONCENTRACIÓN DO NÍQUEL EN CADA RESINA	
	CHELITE P	SERDOLIT CHE
<b>A</b>	4,5-6,5	4,5-5,5
<b>B (mL/min)</b>	2	2
<b>C (M)</b>	3	3
<b>D (µL)</b>	140,8	133,2
<b>E (mL/min)</b>	3	3
<b>F (mm)</b>	1	1

A, pH da mostra; B, caudal de mostra; C, concentración de eluente (HCl); D, volume de eluente; E, caudal de elución; F, diámetro da minicolumna.

## 2.6 Obtención do pH óptimo en liña

Unha vez optimizado o pH de retención dos diferentes metais en cada unha das resinas, estídiouse a maneira de levar a cabo o axuste desta variable en liña.

O medio elixido para levar a cabo dito axuste foi unha disolución de acetato amónico, que se incorpora mediante unha canle adicional ó sistema FIA. Realizouse un estudio do caudal e concentración óptimos para esta disolución.

Tendo en conta que o caudal de preconcentración a través da minicolumna (suma dos caudais do extracto ácido e da disolución de acetato

amónico) non pode ser maior a 2 mL/min para o cadmio, níquel, cobalto, 3 mL/min no caso do chumbo e 1,5 mL/min no caso do cromo, resulta de gran interés empregar o caudal mínimo para a canle de acetato amónico e manter o caudal do extracto no valor máis alto posible, para non incrementar excesivamente o tempo da análise. O volume da disolución de acetato amónico queda fixado unha vez seleccionados ambos caudais e establecido o tempo requerido para a preconcentración do extracto. O estudio da concentración necesaria da disolución de acetato amónico para levar a cabo o incremento do pH en liña realizouse considerando 2 mL de extracto 3 M de HNO<sub>3</sub> e tendo en conta o pH óptimo de retención de cada un dos metais na resina. Unha vez realizados os experimentos correspondentes e tendo en conta os resultados dos mesmos, os valores óptimos para o caudal e concentración da disolución de acetato amónico móstranse na Táboa 100.

**Táboa 100.** Valores óptimos para o caudal e concentración da disolución de acetato amónico

<b>Metal</b>	<b>[AcNH<sub>4</sub>] (M)</b>	<b>Caudal de AcNH<sub>4</sub> (mL/min)</b>	<b>Caudal de extracto (mL/min)</b>	<b>Caudal de preconcentración (mL/min)</b>
<b>Cadmio</b>	16	0,4	1,6	2
<b>Chumbo</b>	16	0,6	2,4	3
<b>Cobalto</b>	16	0,4	1,6	2
<b>Cromo</b>	16	0,3	1,2	1,5
<b>Níquel</b>	16	0,4	1,6	2

### **3. OPTIMIZACIÓN DOS PARÁMETROS QUE AFECTAN Á EXTRACCIÓN DOS METAIS DAS MOSTRAS SÓLIDAS NOS SISTEMAS FIA**

Estudíouse a extracción e determinación de cadmio, chumbo, cobalto, cromo e níquel nas seguintes matrices sólidas:

- Moluscos e peixes
- Vexetais
- Carnes
- Froitos secos
- Legumes
- Cereais e derivados
- Queixos e derivados lácteos

A optimización dividiuse á súa vez en tres partes:

- A optimización mediante un deseño factorial dos parámetros que afectan á extracción do metal da mostra sólida de natureza alimenticia.
- A optimización das características propias da mostra sólida de natureza alimenticia empregada, é dicir, a cantidade de mostra e o tamaño de partícula da mesma.
- A optimización dos parámetros FIA que veñen determinados polas características físicas do sistema, que á súa vez, veñen determinadas polos valores óptimos dos parámetros que afectan á extracción do metal da mostra sólida de natureza alimenticia.

Para realizar a optimización dos parámetros que afectan á extracción do metal da mostra sólida de natureza alimenticia, empregouse un deseño factorial debido a que o número de variables potencialmente implicado é elevado (6 variables). Foi preciso aplicar un deseño factorial de Screening para reducir de maneira significativa o número de experimentos a realizar na optimización, concretamente, o deseño de Plackett-Burman. Este deseño permite fraccionar un deseño factorial completo proporcionando números de combinacións de factores que son múltiplos de catro. Así, se se aplicara un deseño factorial completo para seis variables a dous niveis ( $2^6$ ) o número de experimentos a realizar sería de 64. Non obstante, a aplicación do deseño de Plackett-Burman cun punto central, como o que se aplica neste traballo, implica a realización de tan só 13 experimentos.

As variables a optimizar no proceso de extracción dos metais das mostras sólidas de natureza alimenticia, son as seguintes:

- Concentración de  $\text{HNO}_3$
- Concentración de  $\text{HCl}$
- Tempo de sonicación
- Volume de disolución extractante
- Caudal de extracción
- Temperatura de extracción

Os ácidos nítrico e clorhídrico empregáronse como disolución extractante. Aínda que nun principio se considerou tamén como compoñente desta disolución extractante o peróxido de hidróxeno, estudos previos realizados no grupo de investigación conduciron ó descarte deste reactivo, debido a que

producía moitas burbullas baixo a acción da enerxía dos ultrasóns (desprendemento de osíxeno), que por unha parte, dificultaba o coñecemento do volume exacto de extractante, e por outra, daba lugar a presións dentro do sistema, dificultando a extracción do metal.

Para poder aplicar este deseño factorial foi preciso fixar previamente os valores máximos e mínimos que pode tomar cada unha destas variables. Estes valores foron seleccionados en función de experimentos realizados en estudos previos, en tódolos casos.

O deseño factorial aplicado é o deseño de Plackett-Burman  $2^{6*3}/16$  de resolución tipo III e con VI graos de liberdade, cun punto central (Statgraphic Plus v.5.1), que implica a realización de 13 experimentos non randomizados. Neste deseño considerouse un punto central, no cal as variables toman un valor intermedio entre os límites superior e inferior. A Táboa 101 mostra a matriz correspondente a este deseño factorial cos 13 experimentos que foi preciso realizar para a optimización do proceso. Nesta matriz indícase como +1 cando a variable toma o valor máximo, -1 cando o valor que toma é o mínimo e 0 cando toma o valor medio.

**Táboa 101.** Matriz de Plackett-Burman  $2^{6*3}/16$ , no cal se obteñen 13 experimentos para as 6 variables citadas.

Experimento	G	H	I	J	K	L
1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
2	+1	+1	-1	+1	-1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1
4	+1	-1	+1	+1	-1	+1
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1
6	+1	+1	+1	-1	+1	+1
7	0	0	0	0	0	0
8	-1	1	+1	+1	-1	+1
9	-1	-1	+1	+1	+1	-1
10	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	+1	-1	-1	-1	+1	+1
12	-1	+1	-1	-1	-1	+1
13	-1	-1	-1	-1	-1	-1

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.

Unha vez obtida a matriz en función das variables implicadas e dos seus valores máximos e mínimos, realizáronse os experimentos fixados pola mesma empregando os dispositivos FIA indicados nas Figuras 12 e 13, en función do metal e da mostra sólida obxecto de estudio. Para realizar estes experimentos sobre as diferentes matrices sólidas, empregáronse mostras das cales se determinou por triplicado a concentración polo método de referencia descrito anteriormente (páxina 86), ou materiais de referencia, nos casos nos cales a concentración do metal obxecto de estudio se atopaba certificada. A cantidade de mostra ou material de referencia utilizada para levar a cabo a optimización dos procesos de extracción ácida fixouse en base á concentración do metal obxecto de estudio. A cantidade de 60 mg resultou ser axeitada en tódolos estudos.

A variable resposta é o %Eficacia na extracción do metal en cada experimento proposto polo deseño, como se indica na seguinte ecuación:

$$(\%)Eficacia\ na\ extracción = \frac{A}{B} \times 100$$

A: concentración do metal obxecto de estudio obtida utilizando o sistema FIA proposto

B: concentración do metal obxecto de estudio obtida mediante o método de referencia indicado na páxina 86.

Os experimentos da matriz de Plackett-Burman realizáronse por duplicado, de maneira que o %Eficacia na extracción indicado é a media dos dous experimentos.

Unha vez obtidos os datos experimentais, procedeuse, en cada caso, á análise correspondente do deseño.

A optimización das características da mostra sólida (cantidade de mostra e tamaño de partícula) e dos parámetros FIA, realizouse de maneira univariante.

### 3.1 Extracción do cadmio

A optimización deste proceso de extracción levouse a cabo empregando o dispositivo FIA indicado na Figura 12.

O deseño factorial de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  de resolución tipo III con 6 graos de liberdade e un punto central foi o utilizado para a optimización, tal e como se indicou anteriormente. As variables que afectan ó proceso de extracción ácida do cadmio, así como os valores máximos e mínimos fixados para as mesmas, dacordo con experimentos realizados previamente, recóllense na Táboa 102.

**Táboa 102.** Valores máximos e mínimos establecidos para cada unha das variables no deseño de Plackett-Burman.

VARIABLE	NOTACIÓN	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
[HNO <sub>3</sub> ]	G	0 M	3 M
[HCl]	H	0 M	3 M
Tempo de sonicación	I	0,5 min	5 min
Volume de disolución extractante	J	2 mL	5 mL
Caudal de extracción	K	3,5 mL/min	6 mL/min
Temperatura de extracción	L	20 °C	70 °C

Unha vez obtida a matriz do deseño realizáronse os 13 experimentos indicados na mesma, utilizando o dispositivo FIA indicado na Figura 12. Para realizar ditos experimentos sobre as diferentes matrices, empregáronse materiais de referencia e mostras cuxa concentración se determinou previamente por triplicado, facendo uso do método de referencia descrito anteriormente (páxina 86). A cantidade de mostra empregada para levar a cabo a optimización do proceso de extracción (60 mg), fixouse dacordo coa

concentración de cadmio presente na mesma. A Táboa 103 recolle as diferentes mostras empregados para levar a cabo a optimización, así como a concentración de cadmio existente nas mesmas.

**Táboa 103.** Mostras e materiais de referencia empregados na optimización do proceso continuo de extracción ácida e concentración de cadmio presente nas mesmas.

Tipo de matriz	Mostra coa que se realizou a optimización	[Cd] ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón CRM 278R <sup>a</sup>	$0,348 \pm 0,008^b$
<b>Vexetais</b>	Repolo	$0,39 \pm 0,01$
<b>Carnes</b>	Fígado de coello	$0,17 \pm 0,01$
<b>Froitos secos</b>	Cacahuetes	$0,24 \pm 0,01$
<b>Legumes</b>	Fabas	$0,20 \pm 0,01$
<b>Cereais e derivados</b>	Pan relado	$0,17 \pm 0,01$
<b>Queixos e derivados lácteos</b>	Queixo relado	$0,10 \pm 0,01$

<sup>a</sup> CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

<sup>b</sup> Concentración certificada

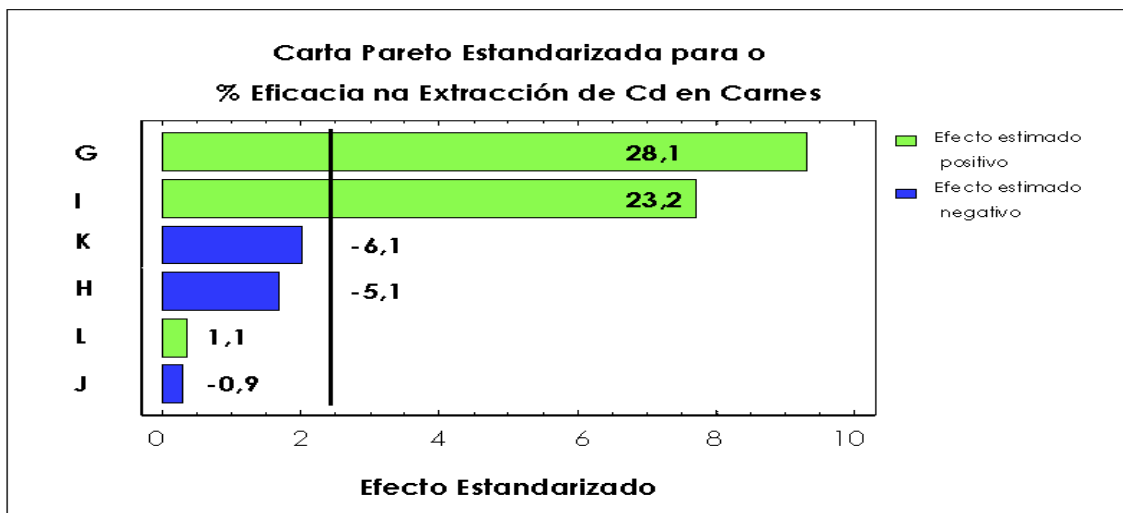
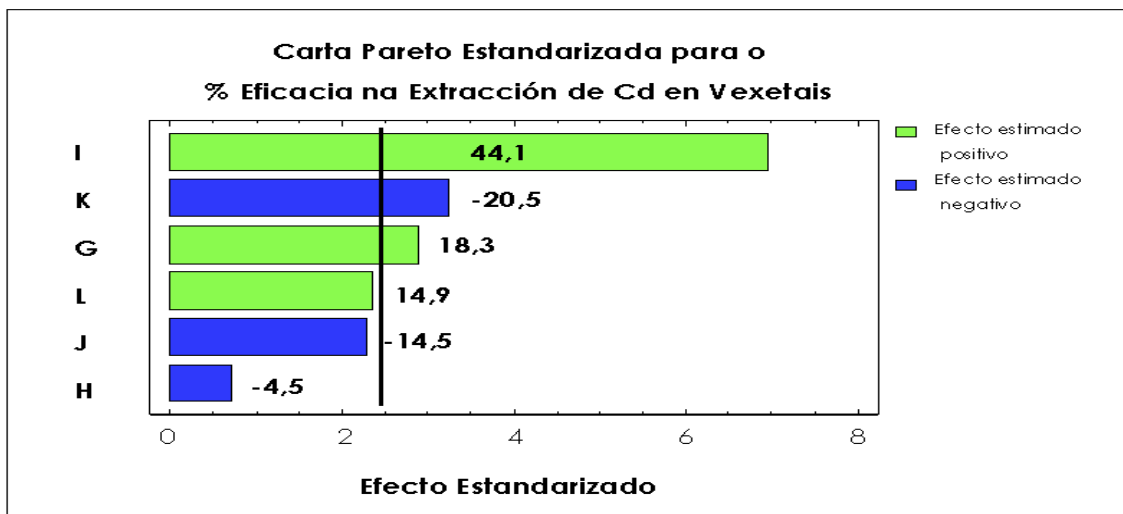
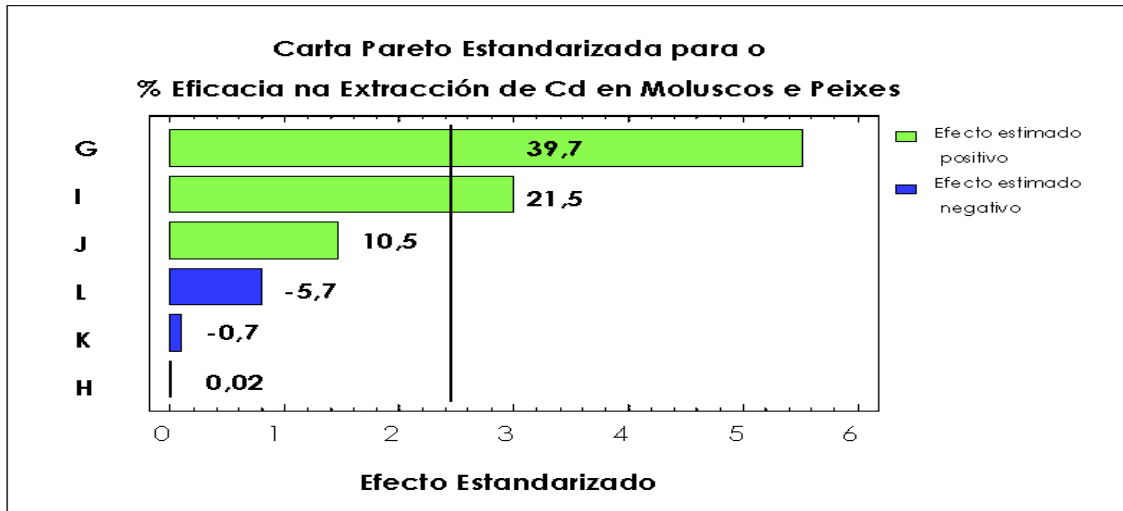
A matriz de Plackett-Burman cos valores que toma cada unha das variables en cada un dos experimentos, xunto co %Eficacia na extracción obtido en cada un deles, recóllese na Táboa 104. Os experimentos realizáronse por duplicado, polo cal o %Eficacia na extracción indicado é a media dos dous resultados obtidos.

Unha vez obtidos os datos experimentais, procedeuse á análise do deseño. En primeiro lugar é preciso coñecer aquelas variables que son significativas, é dicir, aquelas variables que van ter unha gran importancia no proceso de extracción ácida do cadmio, para o cal se recorre ás **Cartas Pareto Estandarizadas** (Figura 24).

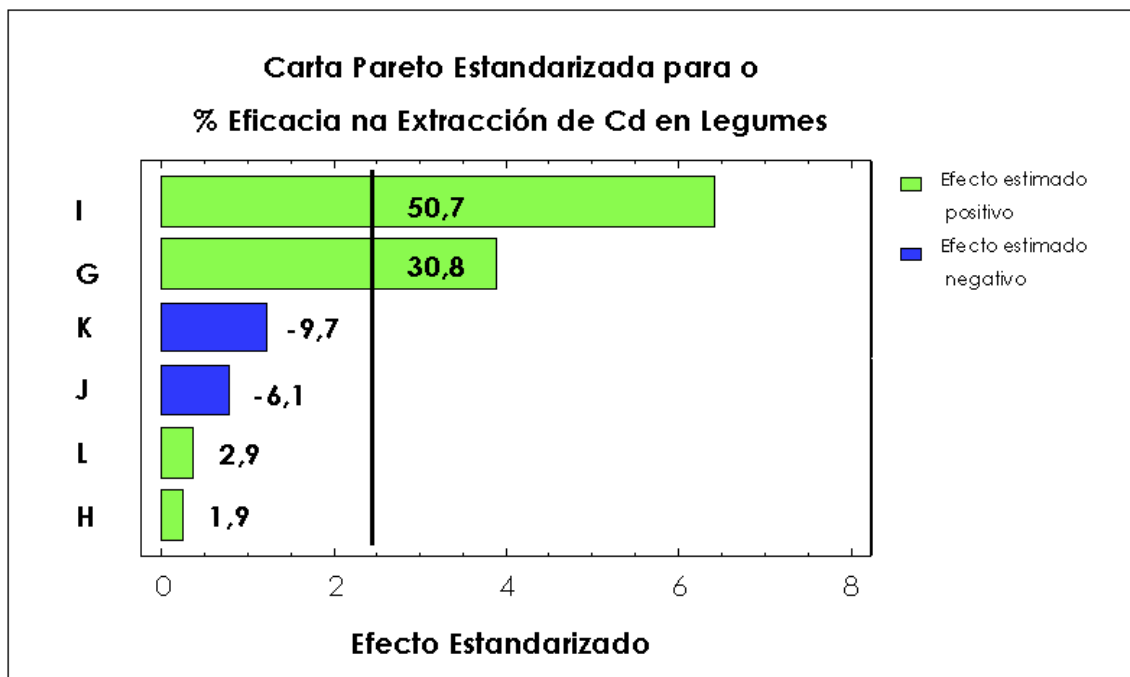
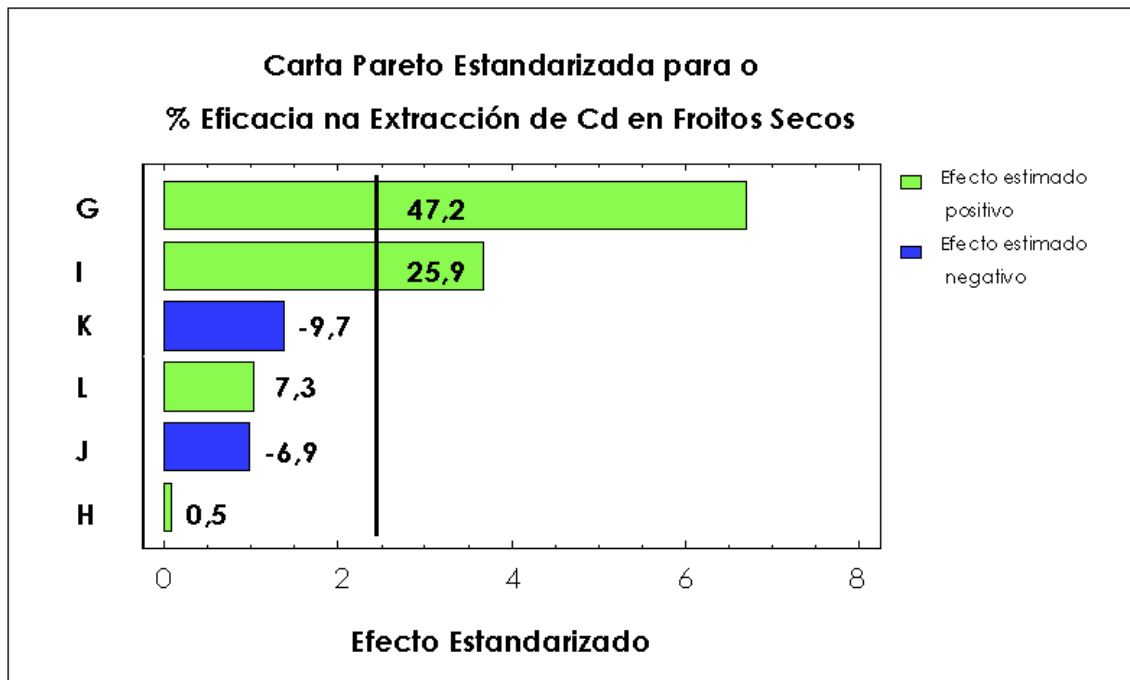
**Táboa 104.** Matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores de cada variable en cada experimento e co % Eficacia na extracción do cadmio obtido en cada un deles para cada tipo de mostra.

NE	% Eficacia na extracción												
	G	H	I	J	K	L	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
1	3	0	5	2	3,5	20	101,0	105,0	102,0	101,1	101,2	103,1	101,4
2	3	3	0,5	5	3,5	20	75,5	31,0	69,0	61,4	41,0	34,1	98,5
3	0	3	5	2	6	20	60,0	49,5	59,5	39,1	58,1	68,9	58,3
4	3	0	5	5	3,5	70	97,0	102,0	98,0	98,9	96,2	95,2	97,7
5	3	3	0,5	5	6	20	80,0	25,5	65,0	58,7	35,3	37,0	93,1
6	3	3	5	2	6	70	73,0	95,0	93,0	96,3	99,7	99,6	94,6
7	1,5	1,5	2,75	3,5	4,75	45	67,3	40,5	63,0	84,6	81,0	49,0	86,5
8	0	3	5	5	3,5	70	50,0	74,5	67,0	46,2	60,2	41,0	69,1
9	0	0	5	5	6	20	47,0	55,0	59,0	33,4	46,7	38,1	55,1
10	0	0	0,5	5	6	70	45,4	17,0	48,0	18,1	12,1	14,0	52,2
11	3	0	0,5	2	6	70	56,0	45,0	66,0	62,6	28,9	18,9	93,9
12	0	3	0,5	2	3,5	70	25,0	59,7	40,0	37,2	21,5	16,4	65,5
13	0	0	0,5	2	3,5	20	17,0	38,0	51,0	21,6	19,0	28,0	63,5

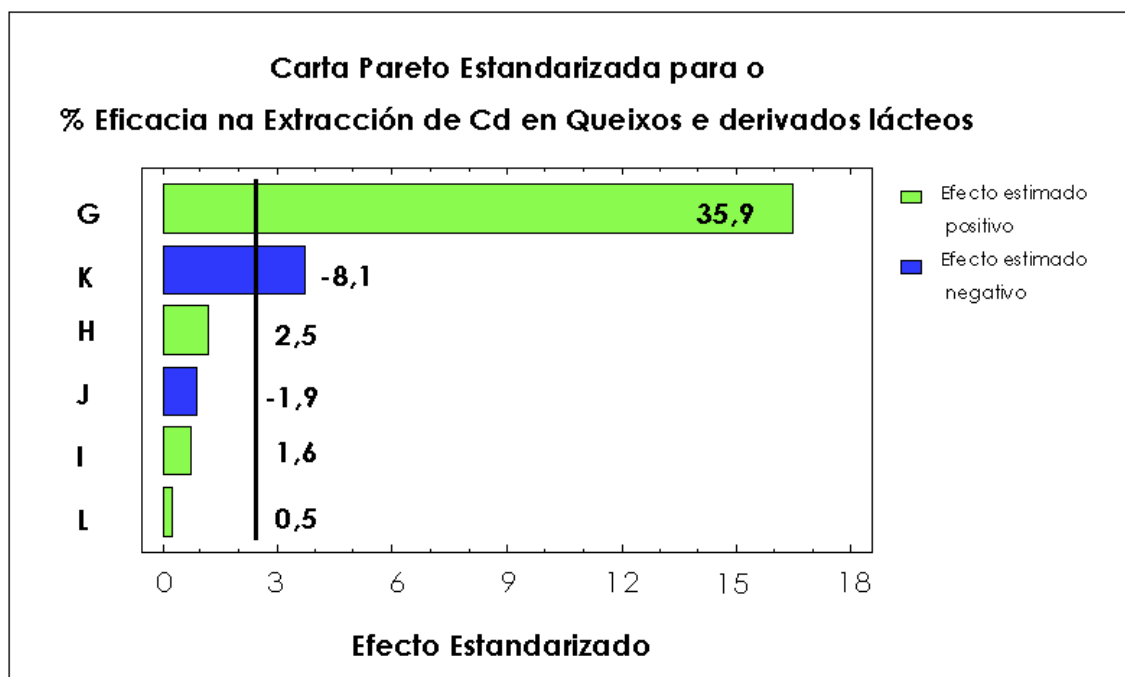
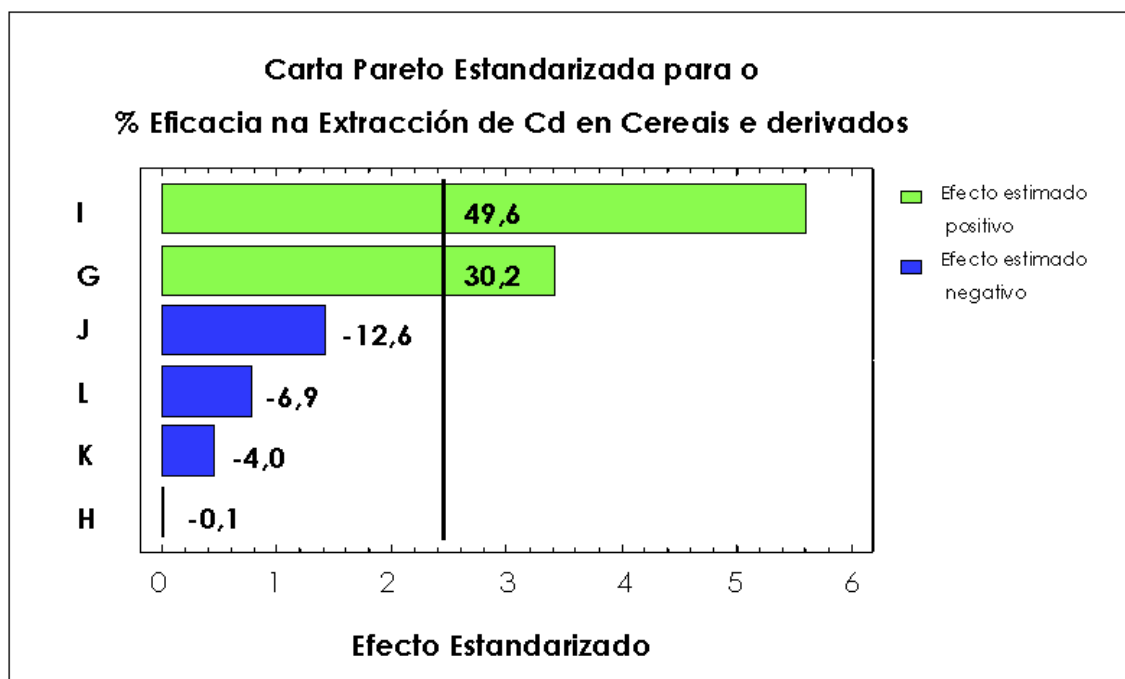
NE, número de experimento; G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



**Figura 24.** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracção; L, Temperatura de extracção.



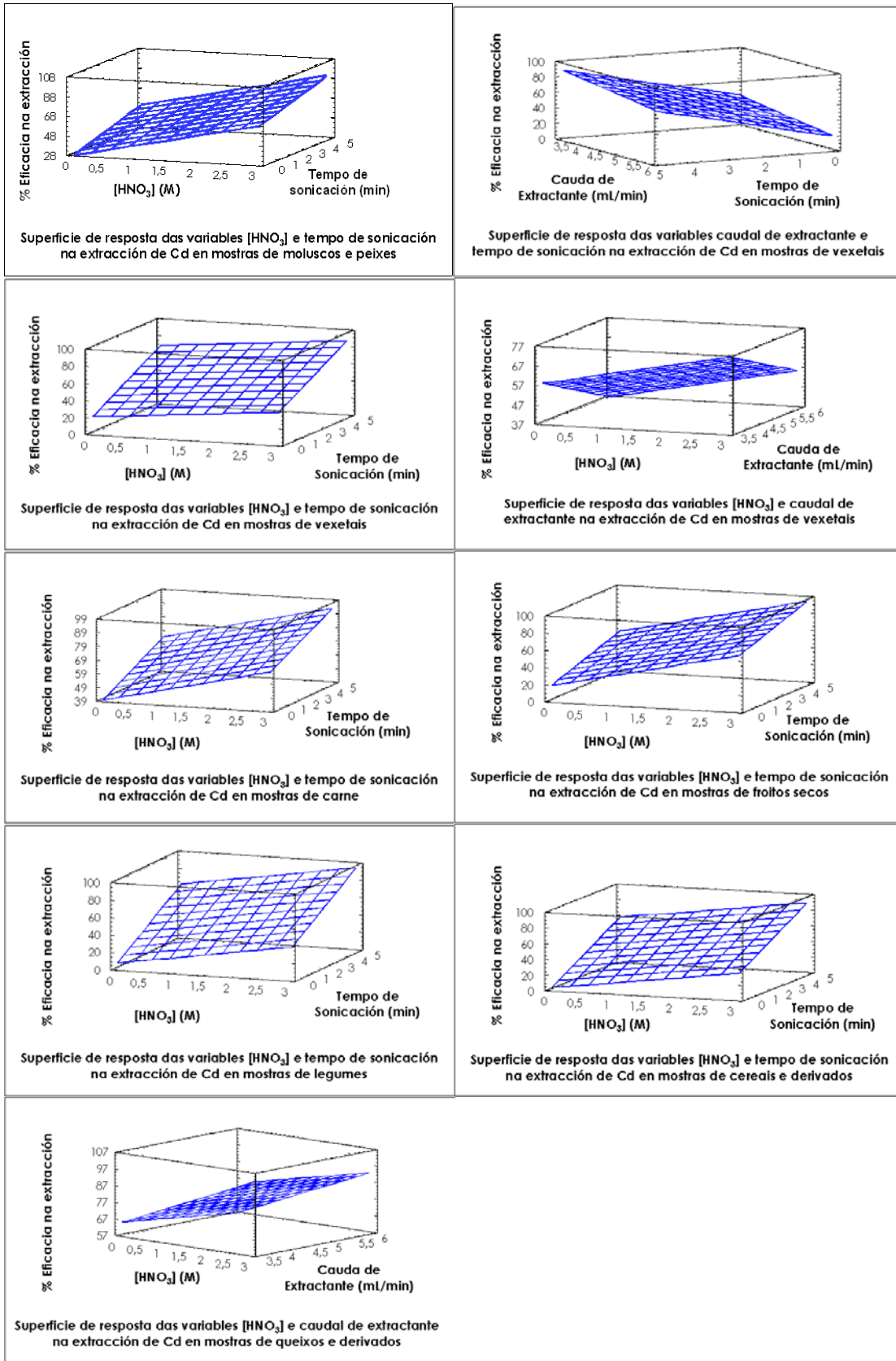
**Figura 24 (Continuación).** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



**Figura 24 (Continuación).** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.

### 3.1.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial

Nos resultados obtidos ó aplicar o deseño de Plackett-Burman á extracción do cadmio nos diferentes tipos de mostras, obsérvase un coportamento das variables bastante similar. Sen considerar o último tipo de mostras, obsérvase que as variables que teñen unha maior importancia no proceso de extracción do cadmio son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación. Estas variables presentan, en tódolos casos, un efecto estimado positivo e elevado, co cal se pode dicir que estas variables afectan positivamente ó proceso de extracción, dentro dos valores estudados. Non obstante, en función do tipo de mostra, as variables estatísticamente significativas son diferentes. No caso dos moluscos e peixes, carnes, froitos secos, legumes e cereais e derivados, obsérvase que as variables estatísticamente significativas son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación. No caso dos vexetais, ademais destas dúas variables, tamén é estatísticamente significativa a variable caudal de extracción, cun efecto estimado negativo. Por último, no caso dos queixos e derivados lácteos, as variables significativas son a concentración de ácido nítrico e o caudal de extracción, afectando este último ó proceso de maneira negativa. Na Figura 25 móstranse as superficies de resposta para as variables significativas en cada caso, onde se observa como varía o %Eficacia na extracción do cadmio en función dos valores que toman estas variables, e mantendo as restantes no valor intermedio do intervalo de estudio proposto para o deseño.



**Figura 25.** Superficies de resposta proporcionadas polo deseño de Plackett-Burman para as variables estatisticamente significativas en cada caso (as demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido polo deseño).

As demais variables teñen unha maior ou menor influencia no proceso de extracción, tal e como se observa na figura 24, pero sen superar o nivel de significación establecido (un 95 % de confianza representado pola liña vertical).

Unha vez analizados os resultados proporcionados polo deseño, os valores óptimos para cada unha das variables según o mesmo son as que se recollen na Táboa 105.

**Táboa 105.** Valores óptimos según o deseño de Plackett-Burman para cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do cadmio das diferentes mostras sólidas.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES DACORDO CO DESEÑO DE PLACKETT-BURMAN						
	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
<b>G (M)</b>	3	3	3	3	3	3	3
<b>H (M)</b>	3	0	0	3	3	0	3
<b>I (min)</b>	5	5	5	5	5	5	5
<b>J (mL)</b>	5	2	2	2	2	2	2
<b>K (mL/min)</b>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
<b>L (°C)</b>	20	70	70	70	70	20	70

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Posto que o deseño de Plackett-Burman só nos proporciona as tendencias das variables cara o óptimo, e non o valor óptimo das mesmas, realizáronse unha serie de experimentos fóra do marco do deseño, dacordo cos valores obtidos no mesmo, para determinar o valor óptimo de cada variable para cada tipo de mostra.

### 3.1.2 Experimentos fóra do marco do deseño

Como xa se comentou previamente, os valores establecidos polo deseño de Plackett-Burman só indican a tendencia da variable cara o valor óptimo dentro do intervalo de valores establecido previamente para cada variable. Polo tanto, leváronse a cabo unha serie de experimentos fóra do marco do deseño para obter o valor óptimo de cada variable. Para afinar estes valores, non se aplicou outro deseño factorial, posto que o emprego dun deseño que proporcione o valor óptimo implica a realización dun gran número de experimentos. Ademais, neste punto, xa se dispón de bastante información acerca do comportamento de cada variable implicada no proceso de extracción, como para poder axustar o valor óptimo de ditas variables realizando un número relativamente pequeno de experimentos.

Polo tanto, para levar a cabo esta optimización realizáronse unha serie de experimentos (por triplicado) mediante un estudio variable a variable.

#### ▪ Experimentos realizados para a optimización da extracción do cadmio en mostras de Moluscos e Peixes

En primeiro lugar, estudiáronse as variables estatisticamente non significativas. Dentro destas variables non significativas, teñen efecto estimado negativo a **temperatura de extracción** (efecto estimado=-5,7) e o **caudal de extracción** (efecto estimado=-0,7). Tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104), onde os valores mínimos destas variables proporcionan unha eficacia na extracción cuantitativa (101,0%), fixéronse os valores destas variables en 20 °C e 3,5 mL/min. Deste xeito, simplifícase o proceso de extracción, posto que se pode traballar a temperatura ambiente, evitándose o quentamento previo da auga do ultrasóns e o traballo co extracto ácido

quente. Ademais, a eficacia da extracción vese favorecida ó traballar ó caudal de extracción mínimo, posto que as compactacións que se producen no sistema son menores.

As variables non significativas con efecto estimado positivo son o volume de disolución extractante e a concentración de ácido clorhídrico. A **concentración de ácido clorhídrico** é a variable con menor influencia no proceso de extracción (efecto estimado=0,02), o que significa que se poden obter eficacias na extracción cuantitativas evitando o emprego deste compoñente da disolución extractante (experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman, Táboa 104).

O **volume da disolución extractante** é a variable non significativa con maior efecto estimado (efecto estimado=10,5). Tendo en conta que o extracto ácido ha de ser preconcentrado posteriormente, pasando a través da minicolumna empacotada coa resina quelante a un caudal máximo de 2 mL/min, resulta de interese empregar o menor volume de disolución extractante posible, xa que dito volume influirá directamente no tempo de preconcentración, e polo tanto, na frecuencia de mostraxe. Tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104), onde o emprego de 2 mL de disolución extractante proporciona unha eficacia na extracción cuantitativa, o valor desta variable fíxase en 2 mL.

As variables que inflúen significativamente no proceso de extracción ácida do cadmio en moluscos e peixes son a **concentración de ácido nítrico** (efecto estimado=39,7) e o **tempo de sonicación** (efecto estimado=21,5). Co obxectivo de aumentar a frecuencia de mostraxe, estúdiouse a posibilidade de diminuír o tempo de sonicación. Por outra parte, intentouse diminuír a concentración de ácido nítrico, para traballar nas condicións ácidas menos

drásticas posibles e simplificar a análise. O resultado destes estudos móstrase na Táboa 106.

**Táboa 106.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	104,3
3	0	1,5	2	3,5	20	90,8
2	0	2	2	3,5	20	85,8

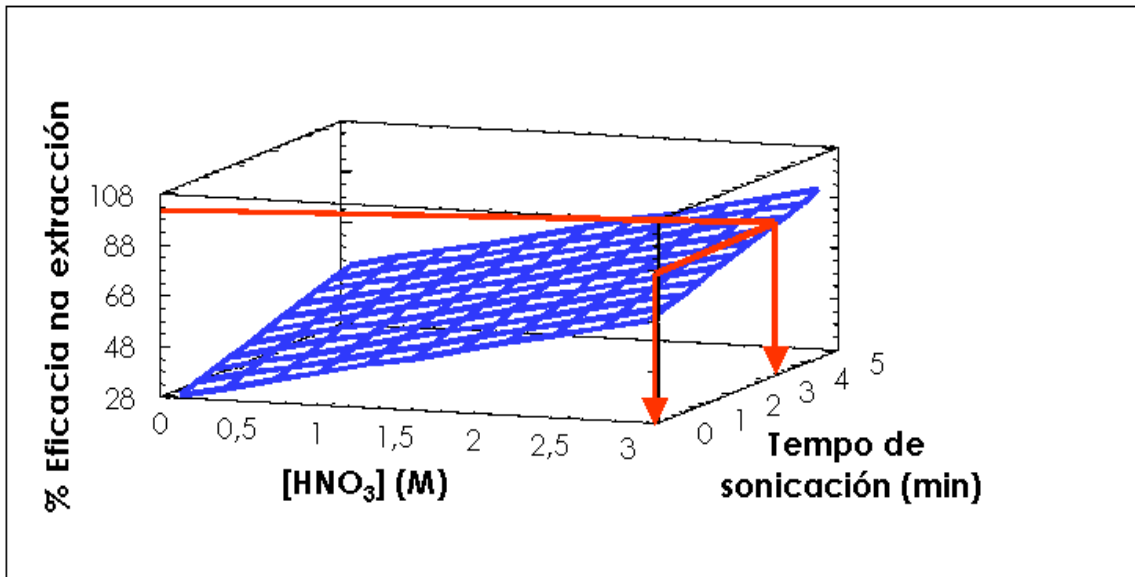
G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os resultados obtidos poden corroborarse ó analizar con profundidade o gráfico de superficie para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación obtido previamente polo deseño de Plackett-Burman para as mostras de moluscos e peixes, que se mostra na figura 26.

Unha vez optimizadas todas as variables, a partir dos resultados obtidos no deseño, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do cadmio nas mostras de moluscos e peixes recóllense na Táboa 107.

**Táboa 107.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cadmio nas mostras de moluscos e peixes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C



**Figura 26.** Superfície de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para as variables significativas do proceso de extracción do Cd das mostras de moluscos e peixes ( $[HNO_3]$  (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido:  $[HCl]$  = 1,5 M; Volume de disolución extractante = 3,5 mL; Caudal de extracción = 4,75 mL/min e Temperatura de extracción = 45 °C.

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cadmio en mostras de Vexetais**

A extracción do cadmio en mostras de vexetais está afectada significativamente por tres variables: o tempo de sonicación, o caudal de extracción e a concentración de ácido nítrico. As demais variables teñen unha maior ou menor importancia no proceso de extracción, pero sen superar o límite de significación estatística.

A optimización fóra do marco do deseño, comezouse por aquelas variables non significativas. A **temperatura de extracción** é a única variable non significativa con efecto estimado positivo (efecto estimado=14,9). No experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104) obsérvase que a eficacia da extracción é cuantitativa a temperatura ambiente (20 °C), de

xeito que se fixa o valor óptimo desta variable en 20 °C. Isto simplifica a análise, posto que evita, por unha parte, ter que quentar previamente a auga do ultrasóns, e por outra, o traballar cun extracto ácido quente.

O **volumen de disolución extractante** é unha variable non significativa con efecto estimado negativo (efecto estimado=-14,5). Se se ten en conta o mesmo experimento da matriz de Plackett-Burman, pode observarse que a utilización de 2 mL de disolución extractante proporciona unha eficacia da extracción cuantitativa. Posto que un menor volumen de disolución extractante implica unha maior frecuencia de mostraxe, xa que o extracto ácido ha de ser preconcentrado a un caudal máximo de 2 mL/min, non se estudiou a posibilidade de traballar con volumes maiores.

A **concentración de ácido clorhídrico** é a variable non significativa con menor efecto estimado (efecto estimado=-4,5). Tendo en conta os resultados obtidos nos experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104), resultou posible eliminar este compoñente da disolución extractante, simplificándose así a análise.

A única variable estatisticamente significativa que ten un efecto estimado negativo é o **caudal de extracción**. A eficacia do proceso de extracción vese favorecida cando esta variable diminúe dentro do intervalo estudiado, posto que se minimiza a compactación da mostra dentro da minicolumna e a presión xenerada dentro do sistema é menor. Posto que caudal de extracción de 3,5 mL/min proporciona unha eficacia na extracción cuantitativa (experimento 1 da matriz de Plackett-Burman, Táboa 104), o valor óptimo desta variable queda fixado en 3,5 mL/min.

Con respecto ó **tempo de sonicación** (efecto estimado=44,1) e á **concentración de ácido nítrico** (efecto estimado=18,3), estúdiouse a

posibilidade de diminuír os valores óptimos proporcionados polo deseño, co obxectivo de aumentar a frecuencia de mostraxe e realizar a extracción nas condicións ácidas menos drásticas posibles. Os resultados deste estudio móstranse na Táboa 108.

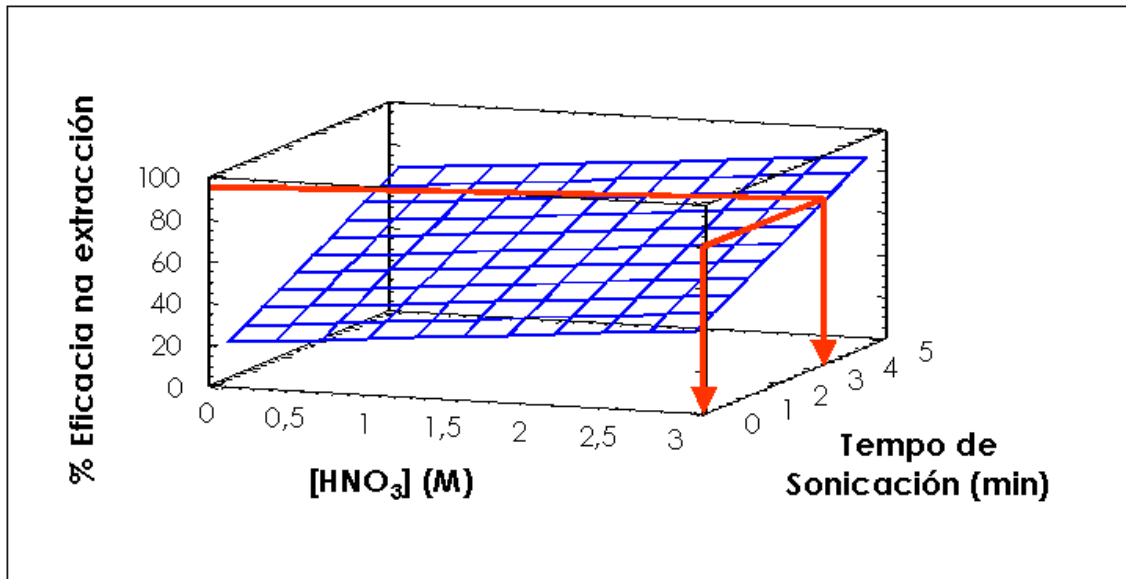
**Táboa 108.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	101,4
3	0	1,5	2	3,5	20	77,5
1,5	0	2	2	3,5	20	51,0

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os resultados obtidos poden corroborarse ó analizar con profundidade o gráfico de superficie para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación obtido previamente polo deseño de Plackett-Burman para as mostras de vexetais, que se mostra na figura 27.

Unha vez optimizadas todas as variables, según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do cadmio nas mostras de vexetais recóllense na Táboa 109.



**Figura 27.** Superficie de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para dúas das variables significativas do proceso de extracción do Cd das mostras de vexetais ([HNO<sub>3</sub>] (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido: [HCl]= 1,5 M; Volume de disolución extractante= 3,5 mL; Caudal de extracción= 4,75 mL/min e Temperatura de extracción= 45 °C.

**Táboa 109.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cadmio nas mostras de vexetais

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

---

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cadmio en mostras de Carnes**

Ó igual que na maioría das matrices sólidas, o proceso de extracción do cadmio en mostras de carnes está afectado significativamente polas variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación.

A optimización fóra do marco do deseño comezouse polas variables estatisticamente non significativas.

A **temperatura de extracción** é a única variable non significativa que inflúe positivamente no proceso de extracción e ten un efecto estimado moi baixo (efecto estimado=1,1). No experimento 1 da matriz de Plackett-Burman, onde a temperatura de extracción toma o valor inferior do intervalo establecido, obtense unha eficacia na extracción cuantitativa (102,0 %). Polo tanto, co obxectivo de simplificar a análise, evitando o traballo cun extracto ácido quente e o quentamento previo da auga do ultrasóns, o valor óptimo para esta variable fíxase en 20 °C (temperatura ambiente).

As restantes variables non significativas teñen efectos estimados negativos: **caudal de extracción** (efecto estimado=-6,1), **concentración de ácido clorhídrico** (efecto estimado=-5,1) e **volumen de disolución extractante** (efecto estimado=-0,9). Tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104) para o caudal de extracción e o volumen de disolución extractante e os experimentos 1 e 4 da mesma matriz para a concentración de ácido clorhídrico, onde estas variables toman os valores mínimos do intervalo establecido, obténdose eficacias na extracción cuantitativas, os valores óptimos para ditas variables fíxanse en 3,5 mL/min, 0 M e 2 mL.

A **concentración de ácido nítrico** e o **tempo de sonicación** son as variables que inflúen de maneira significativa na extracción do cadmio nas mostras de

carne. Ambas variables teñen efecto estimado positivo, é dicir, a eficacia na extracción vese favorecida cando os valores destas variables aumentan dentro do intervalo estudado. Non obstante, co obxectivo de diminuír o tempo de análise, aumentando así a frecuencia de mostraxe, e realizar a extracción co ácido o máis diluído posible, estúdiouse a posibilidade de diminuír o valor destas variables. Na Táboa 110 recóllese o resultado deste estudo.

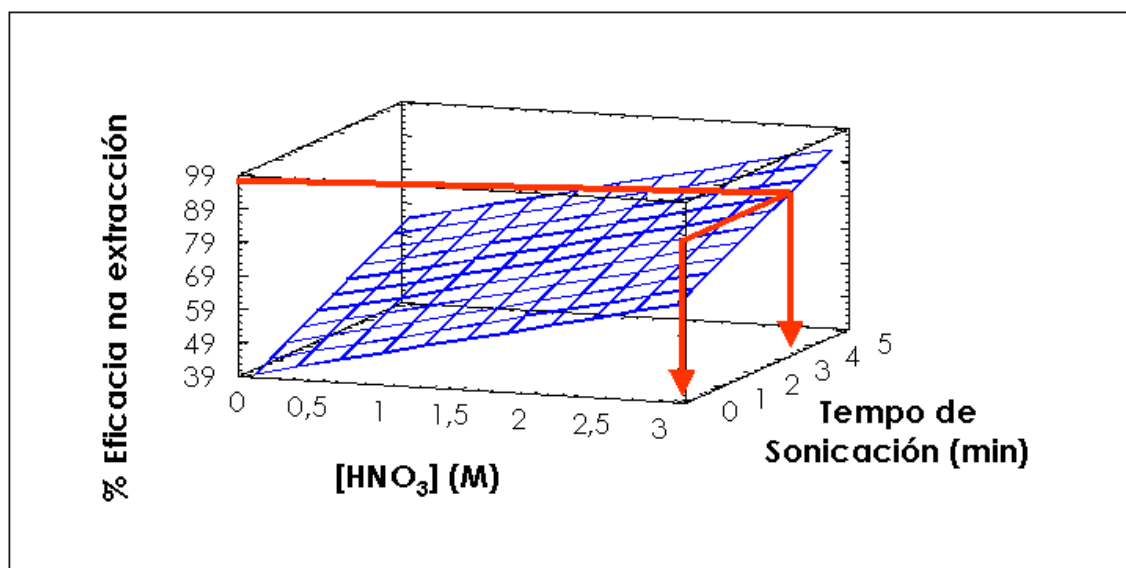
**Táboa 110.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	99,7
3	0	1,5	2	3,5	20	82,3
1,5	0	2	2	3,5	20	70,8

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Como pode observarse na táboa, un tempo de sonicación de 2 minutos é suficiente para obter unha extracción cuantitativa. A concentración de ácido nítrico, non obstante, non se pode reducir.

Os resultados obtidos poden corroborarse ó analizar con profundidade o gráfico de superficie para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación obtido previamente polo deseño de Plackett-Burman para as mostras de carnes, que se mostra na figura 28.



**Figura 28.** Superficie de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para as variables significativas do proceso de extracción do Cd das mostras de carnes ( $[\text{HNO}_3]$  (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido:  $[\text{HCl}] = 1,5$  M; Volume de disolución extractante = 3,5 mL; Caudal de extracción = 4,75 mL/min e Temperatura de extracción = 45 °C.

Unha vez optimizadas todas as variables, según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do cadmio nas mostras de carnes recóllense na Táboa 111.

**Táboa 111.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cadmio nas mostras de carnes

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
$[\text{HNO}_3]$	3 M
$[\text{HCl}]$	0 M
Tempo de sonicación	2 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cadmio en mostras de Froitos Secos**

No caso das mostras dos froitos secos, ó igual que na maioría das mostras, as variables estatisticamente significativas son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación.

Con respecto ás variables que non teñen un peso significativo dende o punto de vista estatístico, teñen efecto estimado positivo a temperatura de extracción (efecto estimado=7,3) e a concentración de ácido clorhídrico (efecto estimado=0,5) e efecto estimado negativo o caudal de extracción (efecto estimado=-9,7) e o volume de disolución extractante (efecto estimado=-6,9). Ó igual que no caso das carnes e moluscos e peixes, a optimización destes parámetros faise tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104) para o caudal e a temperatura de extracción, os experimentos 1 e 4 da mesma matriz para a concentración de ácido clorhídrico e os experimentos 1 e 6 para o volume de disolución extractante. A extracción é cuantitativa en todos estes experimentos, onde cada unha das citadas variables toma o valor inferior dentro do intervalo estudado. Así, o caudal de extracción fíxase en 3,5 mL/min, a temperatura de extracción en 20 °C, a concentración de ácido clorhídrico en 0 M e o volume de disolución extractante en 2 mL. Estes valores óptimos das variables simplifican considerablemente a análise. O **caudal de extracción** de 3,5 mL/min minimiza as compactacións da mostra na minicolumna, co cal se diminúe a presión xenerada no sistema. A elección da **temperatura ambiente** (20 °C) para levar a cabo a análise permite prescindir do quentamento previo da auga do ultrasóns e evita ter que traballar co extracto ácido quente. O valor óptimo da variable **concentración de ácido clorhídrico** fíxase en 0 M, é

dicir, elimínase este compoñente da disolución extractante. Por último, o emprego dun **volumen de disolución extractante** de 2 mL inflúe positivamente na rapidez da análise, e polo tanto, na frecuencia de mostraxe, posto que dito volumen de extracto ha de ser preconcentrado posteriormente a un caudal máximo de 2 mL/min.

As variables estatisticamente significativas son a **concentración de ácido nítrico** e **tempo de sonicación**. Ambas influen positivamente no proceso de extracción, posto que os seus efectos estimados son positivos (47,2 e 25,9, respectivamente). Co obxectivo de realizar a extracción con ácido máis diluído e de aumentar a frecuencia de mostraxe, realizáronse unha serie de experimentos para diminuír os valores destas variables proporcionados polo deseño. Na Táboa 112 recóllese o resultado destes experimentos.

**Táboa 112.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

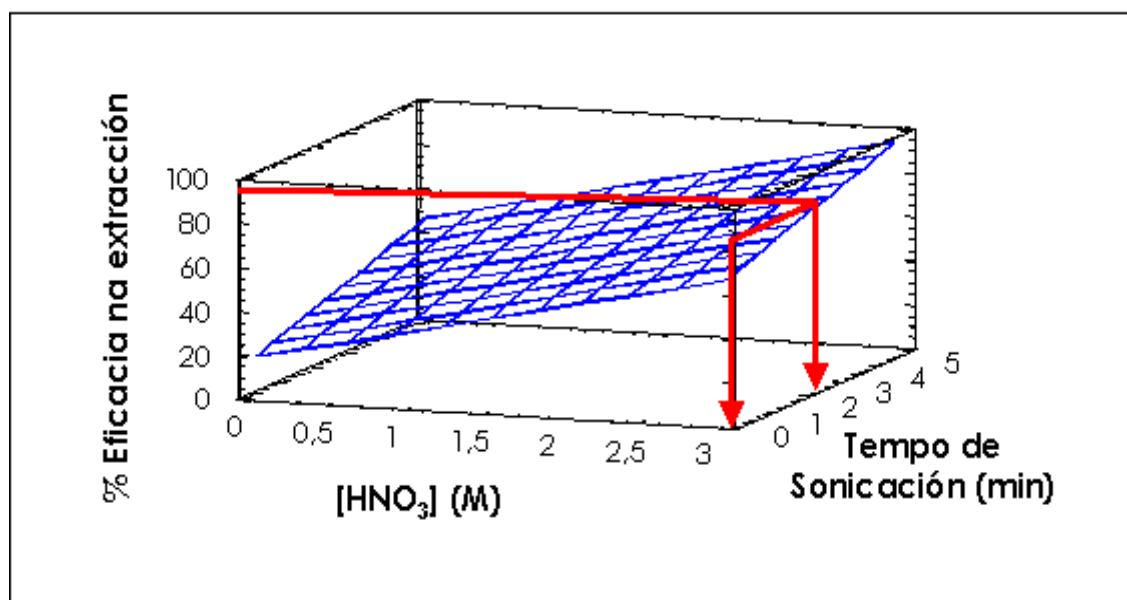
G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	98,9
3	0	1	2	3,5	20	96,9
3	0	0,5	2	3,5	20	75,2
2	0	1	2	3,5	20	84,6

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Tal e como se observa na táboa, para realizar a extracción do cadmio das mostras de froitos secos tan só se precisa dun tempo de sonicación de 1 minuto. A concentración do único compoñente da disolución extractante (ácido nítrico), non se pode reducir con respecto ó valor proporcionado polo deseño (3 M).

Os resultados obtidos poden corroborarse ó analizar con profundidade o gráfico de superficie para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación obtido previamente polo deseño de Plackett-Burman para as mostras de froitos secos, que se mostra na figura 29.

Os valores óptimos obtidos para cada unha das variables implicadas na extracción do cadmio nas mostras de froitos secos, despois da optimización fóra do marco do deseño son os recollidos na Táboa 113.



**Figura 29.** Superficie de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para as variables significativas do proceso de extracción do Cd das mostras de froitos secos ([HNO<sub>3</sub>] (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido: [HCl]= 1,5 M; Volume de disolución extractante= 3,5 mL; Caudal de extracción= 4,75 mL/min e Temperatura de extracción= 45 °C.

**Táboa 113.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cadmio nas mostras de froitos secos

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cadmio en mostras de Legumes**

Na extracción do cadmio neste tipo de mostras obsérvase, ó igual que nas demais matrices, que o valor óptimo para o **volumen de disolución extractante** e o **caudal de extracción**, ambas variables non significativas con efecto estimado negativo (-6,1 e -9,7, respectivamente) se pode fixar en 2 mL e 3,5 mL/min, respectivamente. Estes valores son os menores dentro do intervalo estudado e proporcionan extraccións cuantitativas (experimentos 1 e 6 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104) para o volumen de disolución extractante e experimento 1 para o caudal de extracción). Utilizar como óptimos estes valores mellora a frecuencia de mostraxe e reduce a compactación da mostra na minicolumna.

A pesar de que a **temperatura de extracción** é unha variable con efecto estimado positivo (efecto estimado=2,9), o proceso pode realizarse a temperatura ambiente (20 °C) posto que a eficacia da extracción é cuantitativa, tal e como pode observarse no experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104).

Tendo en conta os experimentos 1 e 4 da mesma matriz, pode eliminarse o **ácido clorhídrico** da disolución extractante, simplificándose deste xeito a análise.

Con respecto ás variables estatisticamente significativas, **tempo de sonicación** (efecto estimado=50,7) e **concentración de ácido nítrico** (efecto estimado=30,8), estúdiouse a posibilidade de reducir os valores de ambas proporcionados polo deseño. Na Táboa 114 recóllense os resultados deste estudio.

**Táboa 114.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	89,8
3	0	2,5	2	3,5	20	101,9
2	0	2,5	2	3,5	20	105,1
1,5	0	2,5	2	3,5	20	81,8

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Pode observarse na táboa que son precisos 2,5 minutos de sonicación para lograr a extracción cuantitativa. Con respecto á concentración do ácido nítrico, pode reducirse a 2 M.

Os valores óptimos obtidos para cada unha das variables implicadas na extracción do cadmio nas mostras de legumes, tras realizar a optimización fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 115.

**Táboa 115.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cadmio nas mostras de legumes

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	2 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2,5 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cadmio en mostras de Cereais e Derivados**

No caso das mostras de cereais e derivados, tódalas variables non significativas dende o punto de vista estatístico teñen efecto estimado negativo; é dicir, canto menor sexa o valor das mesmas, dentro do intervalo estudiado, máis favorecido se verá o proceso de extracción.

Co obxectivo de simplificar a extracción e tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104), pode concluírse que traballando a **temperatura ambiente** (20 °C) e a un **caudal de extracción** de 3,5 mL/min a extracción é cuantitativa (101,2 %).

Os experimentos 1 e 4 da mesma matriz permiten eliminar o **ácido clorhídrico** da disolución extractante.

Con respecto ó **volumen de disolución extractante** e tendo en conta os experimentos 1 e 6 da matriz, conclúese que o valor óptimo para dita variable se pode fixar en 2 mL. Este volumen é o menor volumen do intervalo estudiado e permite mellorar a rapidez da análise, posto que é o volumen de extracto ácido que se deberá preconcentrar posteriormente, a un caudal máximo de 2 mL/min.

A **concentración de ácido nítrico** e o **tempo de sonicación** son as variables estatisticamente significativas. Os seus efectos estimados son positivos e elevados. Co obxectivo de aumentar a frecuencia de mostraxe estúdiouse a posibilidade de reducir o tempo de sonicación por debaixo do valor proporcionado polo deseño. Con respecto á concentración de ácido nítrico, estúdiouse a posibilidade de traballar en condicións máis diluídas. Os resultados deste estudo móstranse na Táboa 116. O menor tempo de sonicación que proporcionou unha eficacia na extracción cuantitativa foi de 4,5 minutos, mentras que a concentración de ácido nítrico non se puido reducir.

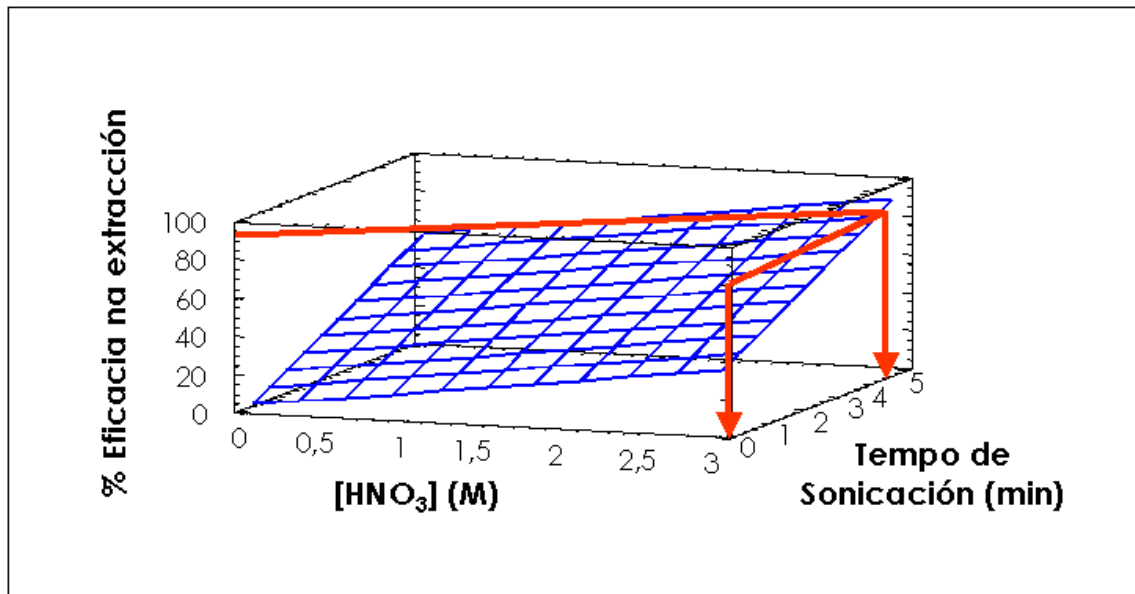
**Táboa 116.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	4	2	3,5	20	91,5
3	0	4,5	2	3,5	20	101,3
2	0	4,5	2	3,5	20	83,4

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os resultados obtidos poden corroborarse ó analizar con profundidade o gráfico de superficie para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación obtido previamente polo deseño de Plackett-Burman para as mostras de cereais e derivados, que se mostra na figura 30.

Os valores óptimos obtidos para cada unha das variables implicadas na extracción do cadmio das mostras de cereais e derivados, unha vez realizada a optimización fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 117.



**Figura 30.** Superficie de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para as variables significativas do proceso de extracción do Cd das mostras de cereais e derivados ( $[\text{HNO}_3]$  (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido:  $[\text{HCl}] = 1,5$  M; Volume de disolución extractante= 3,5 mL; Caudal de extracción= 4,75 mL/min e Temperatura de extracción= 45 °C.

**Táboa 117.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cadmio nas mostras de cereais e derivados

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
$[\text{HNO}_3]$	3 M
$[\text{HCl}]$	0 M
Tempo de sonicación	4,5 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cadmio en mostras de Queixos e Derivados**

No caso da extracción do cadmio en mostras de queixos e derivados lácteos, as variables estatisticamente significativas son a concentración de ácido nítrico e o caudal de extracción.

As variables concentración de ácido clorhídrico, tempo de sonicación e temperatura de extracción teñen efecto estimado positivo, mentras que a variable volume de disolución extractante ten efecto estimado negativo.

O **volume de disolución extractante** fíxase en 2 mL, posto que tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104), cando esta variable toma dito valor, a eficacia do proceso de extracción é cuantitativa (101,4 %).

A **concentración de ácido clorhídrico** e a **temperatura de extracción** fíxanse en 0 M e 20 °C (temperatura ambiente), posto que cando estas variables toman ditos valores (experimentos 1 e 4 e experimento 1 da matriz de Plackett-Burman, respectivamente), a extracción do cadmio é cuantitativa. Polo tanto, é posible eliminar o ácido clorhídrico da disolución extractante e traballar a temperatura ambiente, simplificándose así a análise de forma considerable.

O **tempo de sonicación**, no caso da extracción do cadmio en mostras de queixos e derivados lácteos é unha variable non significativa dende o punto de vista estatístico. O seu efecto estimado é positivo (efecto estimado=1,6), o que significa que a extracción se ve favorecida cando o valor desta variable aumenta, dentro do intervalo estudado. Dende o punto de vista da rapidez da análise resulta de interés levar a cabo a extracción no menor tempo posible. Tal e como mostra o experimento 2 da matriz de Plackett-Burman, 0,5

minutos son suficientes para obter unha eficacia na extracción cuantitativa (98,5 %), de maneira que este valor é o seleccionado como óptimo para esta variable.

As variables estatisticamente significativas son a concentración de ácido nítrico e o caudal de extracción, con efectos estimados de 39,5 e -8,1, respectivamente. Tendo en conta o signo dos efectos estimados pode concluirse que a extracción do cadmio se ve favorecida cando a concentración de ácido nítrico aumenta e o caudal de extracción diminúe, sempre dentro do intervalo estudado. Canto menor sexa o **caudal de extracción**, menor será a compactación da mostra na minicolumna e polo tanto, a presión xenerada no sistema tamén se reducirá. Tendo en conta os experimentos 1 e 2 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 104) o caudal de extracción fíxase en 3,5 mL/min, posto que proporciona eficacias na extracción cuantitativas.

A **concentración de ácido nítrico** é a variable con máis peso estatístico no proceso (efecto estimado=35,9). Realizouse un experimento fóra do marco do deseño co obxectivo de reducir dita concentración. Tal e como se mostra na Táboa 118, dita redución non foi posible.

**Táboa 118.** Experimentos realizados para a optimización da concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
1,5	0	0,5	2	3,5	20	69,0

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos para cada unha das variables implicadas na extracción do cadmio nas mostras de queixos e derivados, unha vez realizados os experimentos fóra do marco do deseño, son os que se recollen na Táboa 119.

**Táboa 119.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cadmio nas mostras de queixos e derivados lácteos

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	0,5 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

A Táboa 120 recolle un resume dos valores óptimos de cada unha das variables implicadas na extracción do cadmio das diferentes mostras de alimentos. Como pode observarse, a concentración de ácido clorhídrico, o volume de disolución extractante, o caudal de extracción e a temperatura de extracción toman o mesmo valor óptimo en cada unha das matrices sólidas. O tempo de sonicación e a concentración de ácido nítrico dependen do tipo de mostra.

Así, requírese unha concentración de ácido nítrico 3 M para realizar a extracción cuantitativa do cadmio en tódolos tipos de mostras de alimentos, agás para as legumes, onde unha concentración 2 M é suficiente.

**Táboa 120.** Valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do cadmio das diferentes mostras de alimentos.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES IMPLICADAS NA EXTRACCIÓN DO CADMIO DAS DIFERENTES MOSTRAS DE ALIMENTOS						
	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
<b>G (M)</b>	3	3	3	3	2	3	3
<b>H (M)</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>I (min)</b>	2	2	2	1	2,5	4,5	0,5
<b>J (mL)</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>K (mL/min)</b>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
<b>L (°C)</b>	20	20	20	20	20	20	20

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Dende o punto de vista do tempo de sonicación, pode observarse que os tipos de mostra que requiren un tempo maior para que se produza a extracción do cadmio son os cereais e derivados (requiren 4,5 minutos de sonicación) e as legumes (requiren 2,5 minutos de sonicación). Para os moluscos e peixes, vexetais e carnes son suficientes 2 minutos para que a extracción do metal sexa cuantitativa. No caso dos froitos secos o tempo de sonicación requerido diminúe ata 1 minuto, e por último, a matriz de queixos e derivados lácteos é a que presenta o menor tempo de sonicación: con tan só 0,5 minutos de sonicación a extracción do cadmio é cuantitativa.

### **3.1.3 Estudio da cantidade de mostra**

Na optimización das distintas variables que afectan ó proceso de extracción continua do cadmio empregouse unha cantidade de mostra de 60 mg. Non obstante, estudiouse a posibilidade de empregar cantidades maiores, co obxectivo de poder utilizar este sistema continuo para mostras que teñan unha concentración menor de cadmio e mellorar así a sensibilidade do método analítico. Estudiouse a posibilidade de aumentar a cantidade de mostra ata un máximo de 100 mg, xa que utilizar cantidades maiores provoca grandes presións no sistema FIA que fan inviable a análise.

O aumento da cantidade de mostra mantendo os valores óptimos das variables implicadas no proceso de extracción do cadmio só foi posible nas mostras de moluscos e peixes e froitos secos, obténdose eficacias na extracción cuantitativas para un máximo de 80 mg de mostra.

### **3.1.4 Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra**

Tódolos estudos descritos ata o momento foron realizados empregando un diámetro de partícula da mostra inferior a 30  $\mu\text{m}$ .

Co obxectivo de estudar se esta variable inflúe no proceso de extracción do cadmio nas mostras de alimentos, tomáronse fraccións dunha mostra representativa de cada matriz con diferente tamaño de partícula:

- diámetro inferior a 30  $\mu\text{m}$
- diámetros comprendidos entre 30 e 100  $\mu\text{m}$

Con cada unha das fraccións das mostras levouse a cabo a determinación do cadmio, empregando o método de referencia descrito anteriormente (páxina 86) e mediante as metodoloxías continuas propostas. Os resultados obtidos xunto coas mostras representativas elixidas recóllense na Táboa 121.

**Táboa 121.** Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra utilizando o método de referencia e as metodoloxías continuas propostas. Indícase tamén a eficacia na extracción do sistema FIA.

Tipo de mostra	Mostra analizada	Tamaño de partícula	[Cd] <sub>A</sub> (µg/g)	[Cd] <sub>B</sub> (µg/g)	% Eficacia na extracción
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón	< 30 µm	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,01	100,0
		30-100 µm	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,02	96,9
<b>Vexetais</b>	Repolo	< 30 µm	0,39 ± 0,02	0,40 ± 0,01	102,6
		30-100 µm	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,01	102,7
<b>Carnes</b>	Fígado de coello	< 30 µm	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	100,0
		30-100 µm	0,14 ± 0,02	0,14 ± 0,01	100,0
<b>Froitos secos</b>	Castañas	< 30 µm	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,01	104,3
		30-100 µm	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	104,8
<b>Legumes</b>	Fabas	< 30 µm	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01	105,0
		30-100 µm	0,18 ± 0,01	0,18 ± 0,01	100,0
<b>Cereais e derivados</b>	Pan relado	< 30 µm	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	100,0
		30-100 µm	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	92,9
<b>Queixos e derivados</b>	logurt natural	< 30 µm	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	100,0
		30-100 µm	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	100,0

<sup>A</sup> [Cd] obtida mediante o método de referencia

<sup>B</sup> [Cd] obtida mediante os métodos continuos propostos

Pode concluírse, polo tanto, que o tamaño de partícula da mostra non inflúe na extracción do cadmio das diferentes mostras de alimentos dentro do intervalo estudado.

### 3.2 Extracción do chumbo

A optimización deste proceso de extracción levouse a cabo empregando o dispositivo FIA indicado na Figura 13, agás para a matriz sólida de moluscos e peixes, para a cal se empregou o dispositivo FIA indicado na figura 12.

Para optimizar o proceso utilizouse o deseño factorial de Plackett-Burman  $2^{6*3}/16$  de resolución tipo III con 6 graos de liberdade e un punto central. As variables que afectan á extracción do chumbo, así como os seus valores máximos e mínimos, seleccionados en función de estudos previos, son as mesmas que para o cadmio (Táboa 102).

Unha vez obtida a matriz do deseño (Táboa 101) realizáronse os 13 experimentos indicados na mesma, utilizando os dispositivos FIA indicados nas Figuras 12 e 13. Para realizar ditos experimentos sobre as diferentes matrices, empregáronse materiais de referencia e mostras cuxa concentración se determinou previamente por triplicado, facendo uso do método de referencia descrito anteriormente (páxina 86) (Táboa 122). A cantidade de mostra empregada para levar a cabo a optimización do proceso de extracción foi de 60 mg por minicolumna.

Debido á baixa concentración de chumbo nas mostras de alimentos, foi necesario realizar en cada experimento unha adición de 0,2  $\mu\text{g}$  do metal na disolución extractante; é dicir, a disolución extractante contiña chumbo en concentración de 0,1 e 0,04  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para os volumes de disolución extractante de 2 e 5 mL, respectivamente, no caso dos moluscos e peixes. Nas restantes matrices de alimentos, debido a unha concentración de chumbo existente aínda menor que nos moluscos e peixes, foi necesario realizar dúas extraccións sucesivas empregando o dispositivo FIA indicado na figura 13, de xeito que a

concentración de chumbo na disolución extractante foi de 0,05 e 0,02  $\mu\text{g/mL}$  para os volumes de disolución extractante de 2 e 5 mL, respectivamente.

**Táboa 122.** Mostras e materiais de referencia empregados na optimización do proceso continuo de extracción ácida e concentración de chumbo presente nas mesmas.

Tipo de matriz	Mostra coa que se realizou a optimización	[Pb] ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón CRM 278R <sup>a</sup>	2,00 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>
<b>Vexetais</b>	Grelas	0,26 $\pm$ 0,01
<b>Carnes</b>	Riles de carneiro	0,22 $\pm$ 0,01
<b>Froitos secos</b>	Cacahuetes	0,26 $\pm$ 0,01
<b>Legumes</b>	Garbanzos	0,32 $\pm$ 0,01
<b>Cereais e derivados</b>	Pan relado	0,21 $\pm$ 0,01
<b>Queixos e derivados</b>	Queixo relado	0,40 $\pm$ 0,01

<sup>a</sup> CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

<sup>b</sup> Concentración certificada

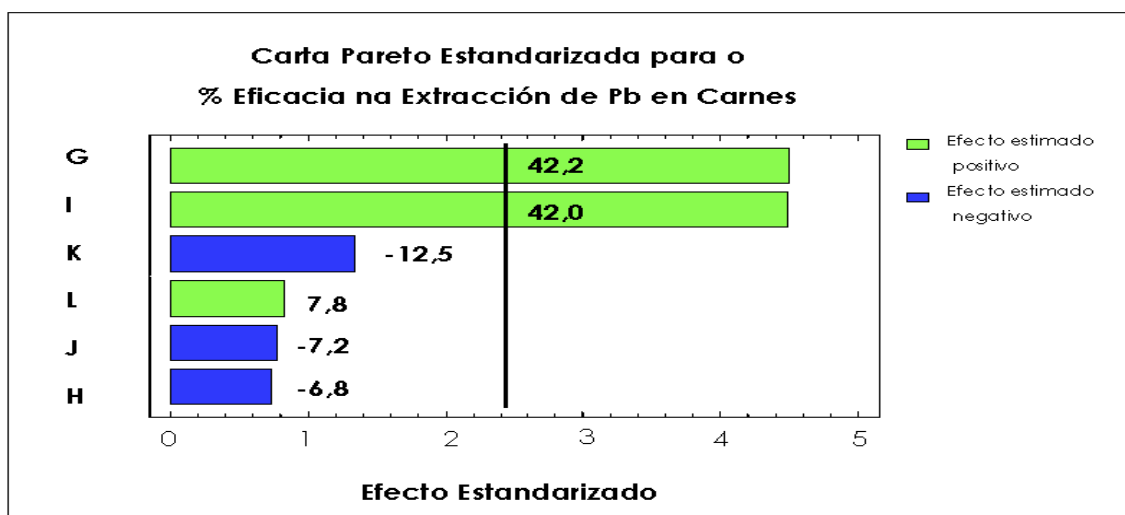
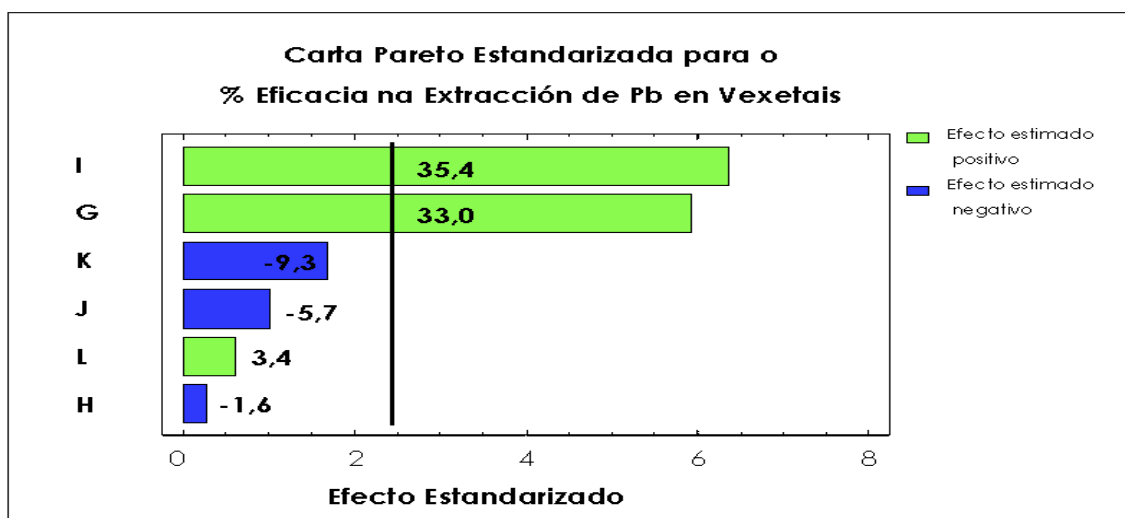
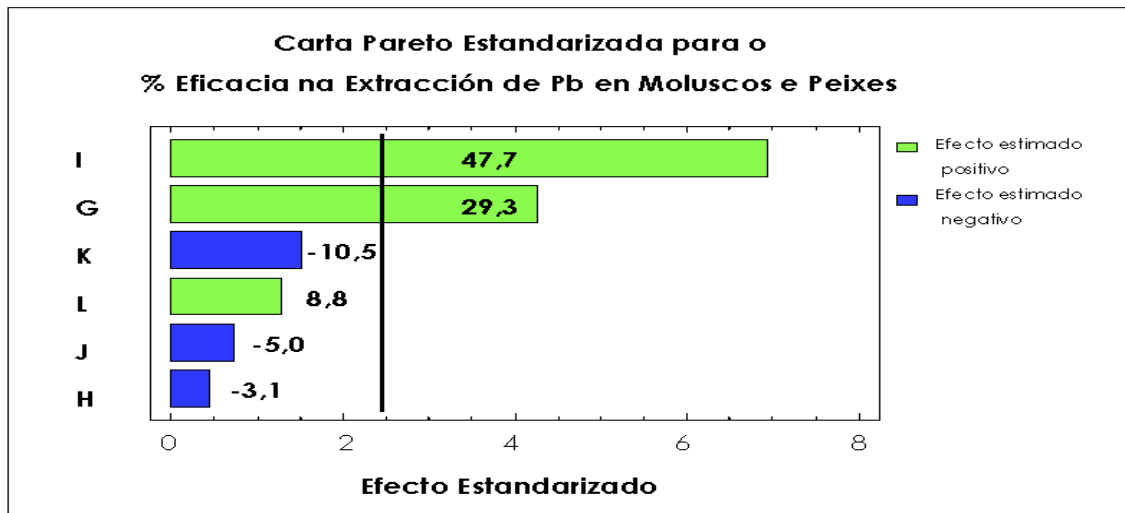
A matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores que toma cada unha das variables en cada experimento e o %Eficacia na extracción obtido en cada caso móstrase na Táboa 123. Os experimentos da matriz realizáronse por duplicado, de xeito que o %Eficacia na extracción indicado é a media de ambos resultados.

Unha vez obtidos os datos experimentais, procedeuse á análise do deseño. En primeiro lugar é preciso coñecer aquelas variables que son significativas, é dicir, aquelas variables que van ter unha gran importancia no proceso de extracción ácida do chumbo, para o cal se recorre ás **Cartas Pareto Estandarizadas** para cada tipo de mostra (Figura 31).

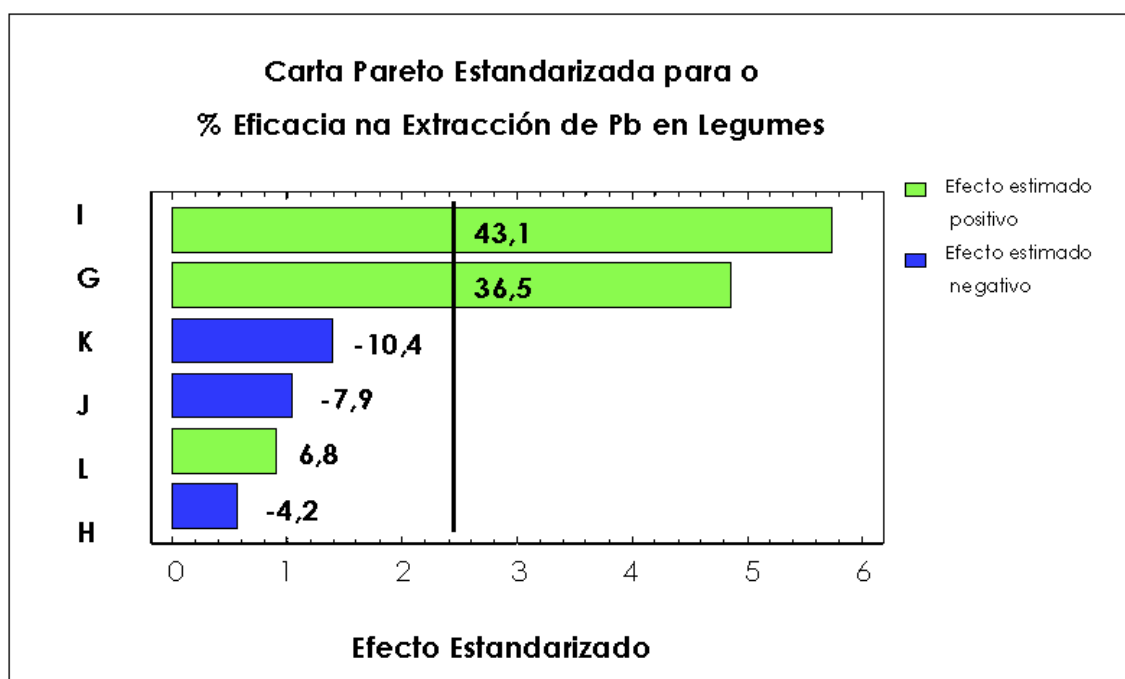
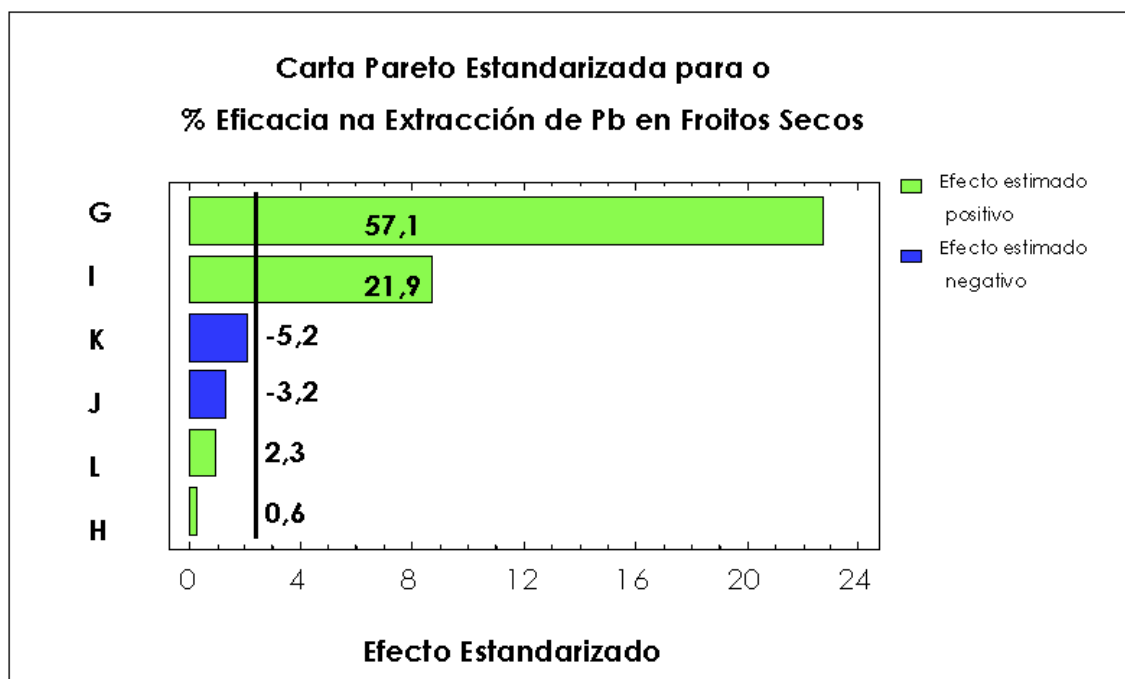
**Táboa 123.** Matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores de cada variable en cada experimento e co % Eficacia na extracción do chumbo obtido en cada un deles para cada tipo de mostra.

		% Eficacia na extracción												
NE	G	H	I	J	K	L	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados	
1	3	0	5	2	3,5	20	98,3	105,0	101,3	102,3	101,3	98,3	101,3	
2	3	3	0,5	5	3,5	20	34,1	58,0	35,7	76,1	39,3	37,4	82,4	
3	0	3	5	2	6	20	52,4	55,0	33,0	39,0	43,5	46,1	58,6	
4	3	0	5	5	3,5	70	101,2	97,5	99,7	99,8	99,7	97,4	98,7	
5	3	3	0,5	5	6	20	31,3	49,7	31,8	72,0	34,8	35,2	81,9	
6	3	3	5	2	6	70	92,2	98,3	92,1	100,3	100,1	97,9	100,5	
7	1,5	1,5	2,75	3,5	4,75	45	73,0	81,5	76,7	68,9	67,1	52,3	77,8	
8	0	3	5	5	3,5	70	58,8	61,6	39,2	43,5	45,5	48,4	59,8	
9	0	0	5	5	6	20	42,4	51,1	28,4	33,8	38,2	38,1	51,6	
10	0	0	0,5	5	6	70	19,3	27,5	11,2	18,3	17,8	14,9	42,5	
11	3	0	0,5	2	6	70	33,0	52,8	33,5	73,9	33,2	36,7	82,2	
12	0	3	0,5	2	3,5	70	24,0	35,0	15,3	24,1	23,0	21,1	49,3	
13	0	0	0,5	2	3,5	20	17,1	33,3	14,0	23,0	21,4	19,5	44,2	

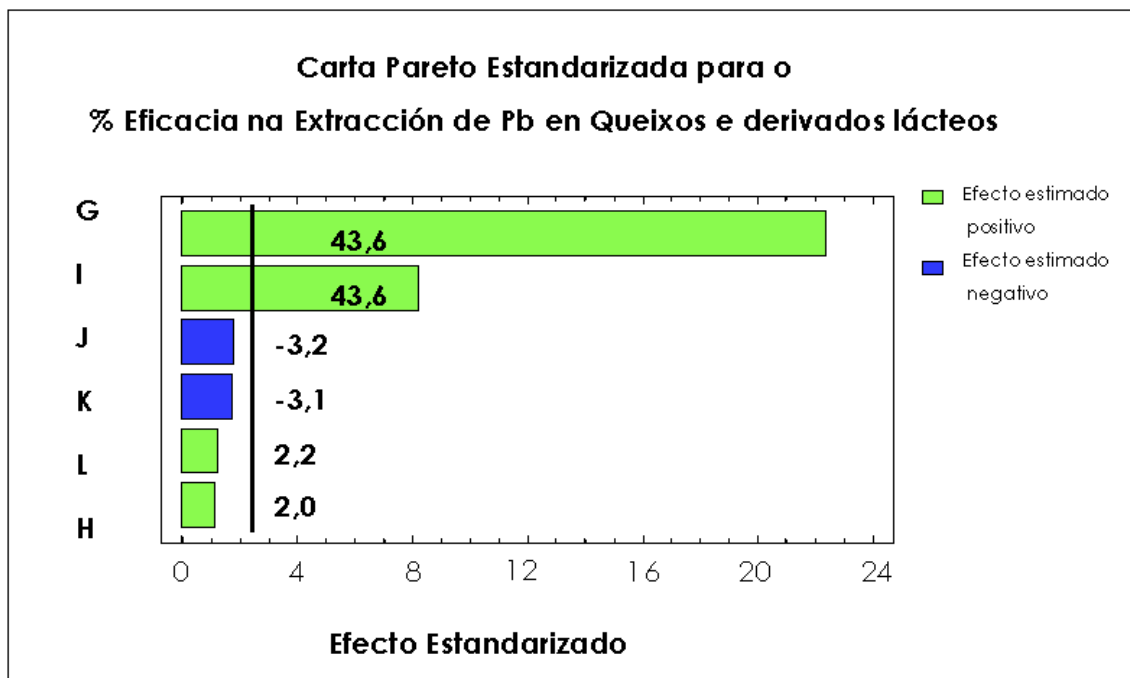
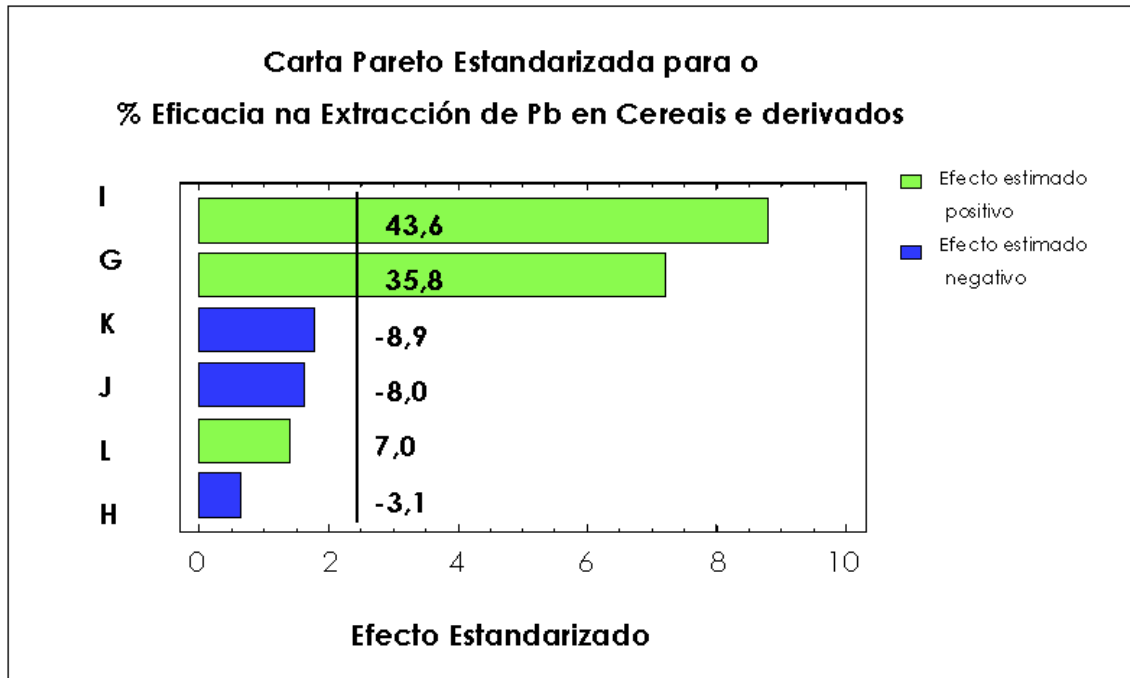
NE, número de experimento; G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



**Figura 31.** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



**Figura 31 (Continuación).** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



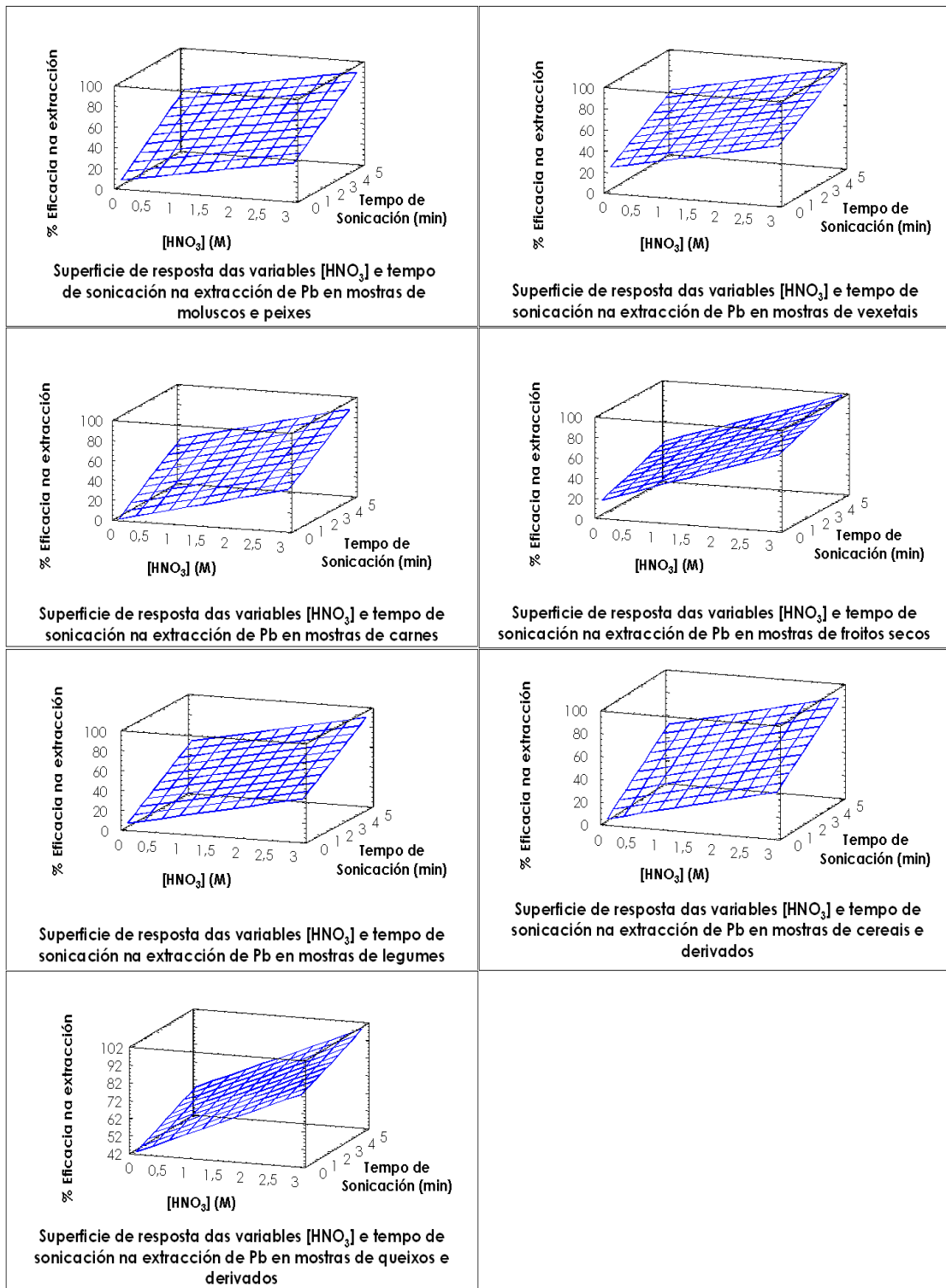
**Figura 31 (Continuación).** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.

### 3.2.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial

Nos resultados obtidos ó aplicar o deseño de Plackett-Burman á extracción do chumbo nos diferentes tipos de mostras, obsérvase un coportamento das variables moi similar. Como pode verse nas diferentes Cartas Pareto (Figura 31), as variables estatisticamente significativas no proceso de extracción son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación. Estas variables presentan, en tódolos casos, un efecto estimado positivo, co cal se pode decir que estas variables afectan positivamente ó proceso de extracción, dentro dos valores estudados.

Na figura 32 móstranse as superficies de resposta para as variables significativas, isto é, concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación. Nestes gráficos pode observarse como varía o %Eficacia na extracción do chumbo en función dos valores que toman estas dúas variables, manténdose o resto constantes no valor intermedio do intervalo proposto para o deseño.

As demais variables teñen unha maior ou menor importancia no proceso de extracción, pero sen superar o nivel de significación establecido polo método para un 95 % de confianza, representado gráficamente pola liña vertical. Dentro destas variables non significativas o comportamento tamén segue unha tendencia similar. O caudal de extracción e o volume de disolución extractante presentan efectos estimados negativos no proceso de extracción do chumbo nas diferentes mostras de alimentos, mentras que a temperatura de extracción inflúe positivamente no mesmo. A concentración de ácido clorhídrico é a variable con menor importancia na extracción do chumbo e presenta un efecto estimado negativo en tódalos tipos de mostras agás nos froitos secos e nos queixos e derivados lácteos.



**Figura 32.** Superficies de resposta proporcionadas polo deseño de Plackett-Burman para as variables estatisticamente significativas en cada caso (as demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido polo deseño).

Unha vez analizados os resultados obtidos ó aplicar o deseño factorial de Plackett-Burman, os valores establecidos como óptimos según o mesmo son os que se recollen na Táboa 124.

**Táboa 124.** Valores óptimos según o deseño de Plackett-Burman para cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do chumbo das diferentes mostras sólidas.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES DACORDO CO DESEÑO DE PLACKETT-BURMAN						
	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
<b>G (M)</b>	3	3	3	3	3	3	3
<b>H (M)</b>	0	0	0	3	0	0	3
<b>I (min)</b>	5	5	5	5	5	5	5
<b>J (mL)</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>K (mL/min)</b>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
<b>L (°C)</b>	70	70	70	70	70	70	70

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Como xa se comentou previamente, o deseño de Plackett-Burman non proporciona o valor óptimo das variables en sí, senon a tendencia cara o óptimo das mesmas. Así pois, realizáronse unha serie de experimentos fóra do marco do deseño e dacordo cos resultados obtidos polo mesmo, para determinar o valor óptimo de cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do chumbo das diferentes mostras de alimentos.

### 3.2.2 Experimentos fóra do marco do deseño

- **Experimentos realizados para a optimización da extracción do chumbo en mostras de Moluscos e Peixes**

En primeiro lugar estudíronse as variables non significativas, é dicir, aquelas variables con menor influencia no proceso de extracción do chumbo. Dentro destas variables teñen efecto estimado negativo o caudal de extracción (efecto estimado=-10,5), o volume de disolución extractante (efecto estimado=-5,0) e a concentración de ácido clorhídrico (efecto estimado=-3,1).

Posto que o extracto ácido resultante ha de ser preconcentrado posteriormente a un caudal máximo de 3 mL/min, interesa fixar o valor da variable **volume de disolución extractante** no menor valor posible.

Con respecto á variable **concentración de ácido clorhídrico**, interesa eliminala da disolución extractante, posto que así se simplificaría a análise, empregando como único compoñente de dita disolución o ácido nítrico.

A variable **caudal de extracción** é a variable non significativa con maior influencia no proceso de extracción do chumbo. Intentar aumentar o valor desta variable provocaría maiores compactacións da mostra dentro da minicolumna, e polo tanto, maiores presións no sistema FIA.

Tendo en conta isto e o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 123) para o caudal de extracción e o volume de disolución extractante e os experimentos 1 e 4 da mesma matriz para a concentración de ácido clorhídrico, onde os valores inferiores destas variables proporcionan %Eficacia na extracción cuantitativos, poden fixarse os valores óptimos para ditas variables en 3,5 mL/min, 2 mL e 0 M.

A **temperatura de extracción** é a única variable non significativa con efecto estimado positivo (efecto estimado=8,8). A pesar de que a influencia

da mesma no proceso de extracción do chumbo é positiva, de maneira que o %Eficacia na extracción aumenta ó aumentar o valor da variable dentro do intervalo estudado, hai que dicir que traballar a 20 °C (temperatura ambiente) simplificaría a análise, posto que sería innecesario o quentamento previo da auga do ultrasóns e non habería que traballar cun extracto ácido quente. Tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 123), onde se obtivo unha extracción cuantitativa a temperatura ambiente, o valor óptimo desta variable fíxase en 20 °C.

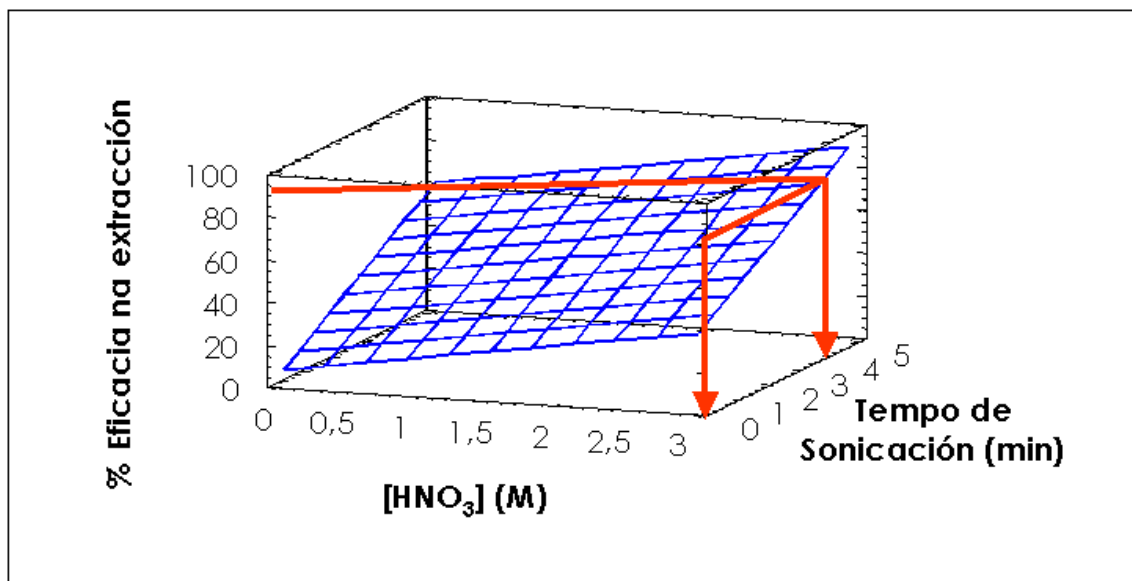
As variables estatisticamente significativas son o **tempo de sonicación** e a **concentración de ácido nítrico**. Co obxectivo de simplificar a análise e realizar a extracción nas condicións ácidas máis diluídas posibles, estúdiouse a posibilidade de diminuír a concentración de ácido nítrico. Por outra parte, posto que o tempo de sonicación inflúe directamente na rapidez da análise, e polo tanto, na frecuencia de mostraxe, tamen se estudou a posibilidade de diminuír esta variable. Os resultados deste estudio recóllense na Táboa 125. Como pode observarse, son necesarios 3 minutos de sonicación e unha concentración de ácido nítrico 3 M para que a extracción do chumbo nas mostras de moluscos e peixes sexa cuantitativa.

**Táboa 125.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2,5	2	3,5	20	87,4
3	0	3	2	3,5	20	96,6
1,5	0	3	2	3,5	20	65,2

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os resultados obtidos poden corroborarse ó analizar con profundidade o gráfico de superficie para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación obtido previamente polo deseño de Plackett-Burman para as mostras de moluscos e peixes, que se mostra na figura 33.



**Figura 33.** Superficie de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para as variables significativas do proceso de extracción do Pb das mostras de moluscos e peixes ([HNO<sub>3</sub>] (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido: [HCl]= 1,5 M; Volume de disolución extractante= 3,5 mL; Caudal de extracción= 4,75 mL/min e Temperatura de extracción= 45 °C.

Unha vez optimizadas todas as variables, según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do chumbo nas mostras de moluscos e peixes recóllense na Táboa 126.

**Táboa 126.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do chumbo nas mostras de moluscos e peixes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	3 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do chumbo en mostras de Vexetais**

No caso da extracción do chumbo en mostras de vexetais, igual que na extracción de dito metal en moluscos e peixes, as variables estatisticamente significativas son o tempo de sonicación e a concentración de ácido nítrico. Ademais, a influencia das variables non significativas no proceso de extracción segue tamén a mesma tendencia: influen negativamente no proceso o caudal de extracción, o volume de disolución extractante e a concentración de ácido clorhídrico e positivamente, a temperatura de extracción.

Tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 123), onde un **caudal de extracción** de 3,5 mL/min e unha **temperatura de extracción** de 20 °C conducen a un %Eficacia na extracción do 105,0 %, os óptimos destas variables fíxanse en ditos valores.

Nos experimentos 1 e 6 da mesma matriz, onde o **volumen de disolución extractante** toma o valor inferior do intervalo establecido, obtivéronse % Eficacia na extracción cuantitativos, de xeito que o valor óptimo desta variable se fixa en 2 mL.

Con respecto á **concentración de ácido clorhídrico**, hai que dicir que se pode eliminar dito compoñente da disolución extractante, posto que nos experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman, onde só o ácido nítrico formaba parte de dita disolución se obtiveron extraccións cuantitativas.

No referente ás variables estatisticamente significativas, isto é, **tempo de sonicación** e **concentración de ácido nítrico**, que influen positivamente no proceso de extracción (efectos estimados de 35,4 e 33,0, respectivamente), hai que dicir que se realizaron unha serie de experimentos fóra do marco do deseño co obxectivo de reducir os valores óptimos destas variables según o deseño. O resultado destes experimentos mostrase na Táboa 127.

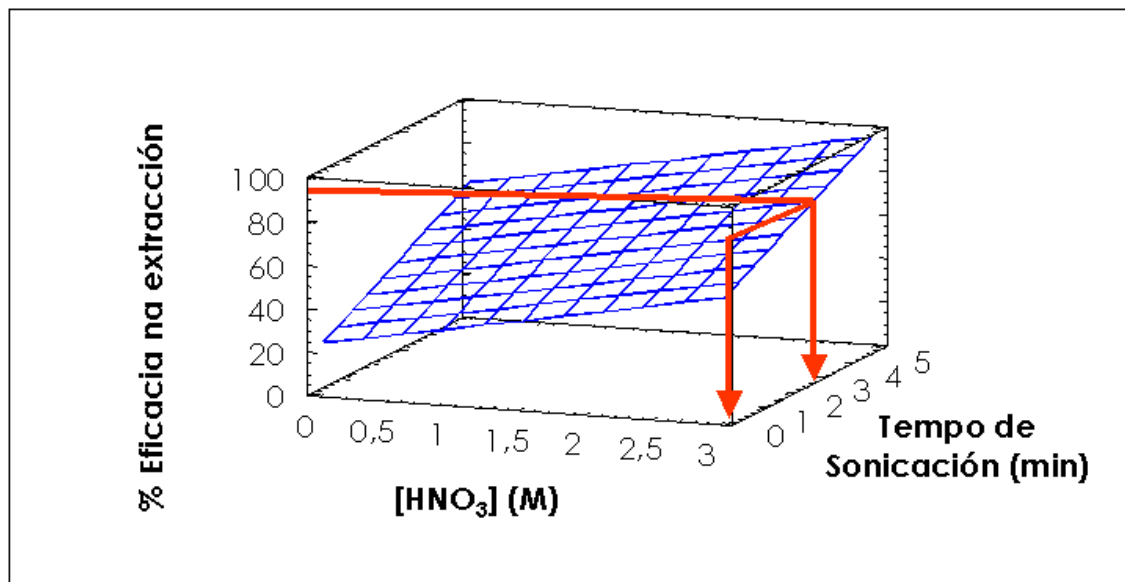
**Táboa 127.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	105,0
3	0	1,5	2	3,5	20	102,7
3	0	1	2	3,5	20	58,0
2	0	1,5	2	3,5	20	81,5

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Se se analiza con profundidade o gráfico de superficie para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación obtido previamente

polo deseño de Plackett-Burman para as mostras de vexetais, poden corroborarse os resultados obtidos (Figura 34).



**Figura 34.** Superficie de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para as variables significativas do proceso de extracción do Pb das mostras de vexetais ([HNO<sub>3</sub>] (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido: [HCl]= 1,5 M; Volume de disolución extractante= 3,5 mL; Caudal de extracción= 4,75 mL/min e Temperatura de extracción= 45 °C.

Unha vez optimizadas todas as variables según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do chumbo nas mostras de vexetais recóllense na Táboa 128.

**Táboa 128.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do chumbo nas mostras de vexetais.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1,5 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do chumbo en mostras de Carnes**

A Carta Pareto obtida para a extracción de chumbo en mostras de carne é similar á obtida para as mostras de moluscos e peixes e vexetais. Os efectos estimados das variables significativas (concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación) son positivos e similares (42,2 e 42,0, respectivamente). As variables non significativas seguen a mesma tendencia que nos casos anteriores.

Tendo en conta os resultados obtidos no experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 123), onde se obtén un %Eficacia na extracción do 101,3 %, o **caudal de extracción** fíxase en 3,5 mL/min, o **volume de disolución extractante** en 2 mL e a **temperatura de extracción** en 20 °C.

Con respecto á **concentración de ácido clorhídrico** e tendo en conta que nos experimentos 1 e 4 da mesma matriz, onde este reactivo non forma parte da disolución extractante se obteñen extraccións cuantitativas (101,3 e 99,7 %), pode fixarse a concentración do mesmo en 0 M.

No referente ás variables estatisticamente significativas, a **concentración de ácido nítrico** e o **tempo de sonicación**, estúdiouse a posibilidade de reducir

o valor das mesmas proporcionado polo deseño (3 M e 5 minutos, respectivamente, Táboa 124). O resultado deste estudio recóllese na Táboa 129. Como pode observarse, son necesarios 2,5 minutos de sonicación e a concentración máxima de ácido nítrico (3 M) para extraer cuantitativamente o chumbo das mostras de carne.

**Táboa 129.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	85,6
3	0	2,5	2	3,5	20	98,5
2	0	2,5	2	3,5	20	78,9

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Unha vez optimizadas todas as variables, según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do chumbo nas mostras de carnes recóllense na Táboa 130.

**Táboa 130.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do chumbo nas mostras de carnes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2,5 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

---

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do chumbo en mostras de Froitos secos**

Novamente, as variables estatisticamente non significativas son o caudal de extracción, o volume de disolución extractante, a temperatura de extracción e a concentración de ácido clorhídrico.

Tendo en conta os experimentos 1, 4 e 6 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 123), onde se obteñen %Eficacia na extracción de 102,3, 99,8 e 100,3, respectivamente, pode concluírse o seguinte: o **caudal de extracción** fíxase en 3,5 mL/min, para reducir as compactacións da mostra na minicolumna e a consecuente presión no sistema FIA; o **volume de disolución extractante** fíxase en 2 mL, para reducir o tempo da posterior preconcentración, que se vai realizar a un caudal máximo de 3 mL/min; a **temperatura de extracción** fíxase en 20 °C (temperatura ambiente), para evitar o quecemento previo da auga de ultrasóns e elimínase o **ácido clorhídrico** da disolución extractante, para simplificar a análise.

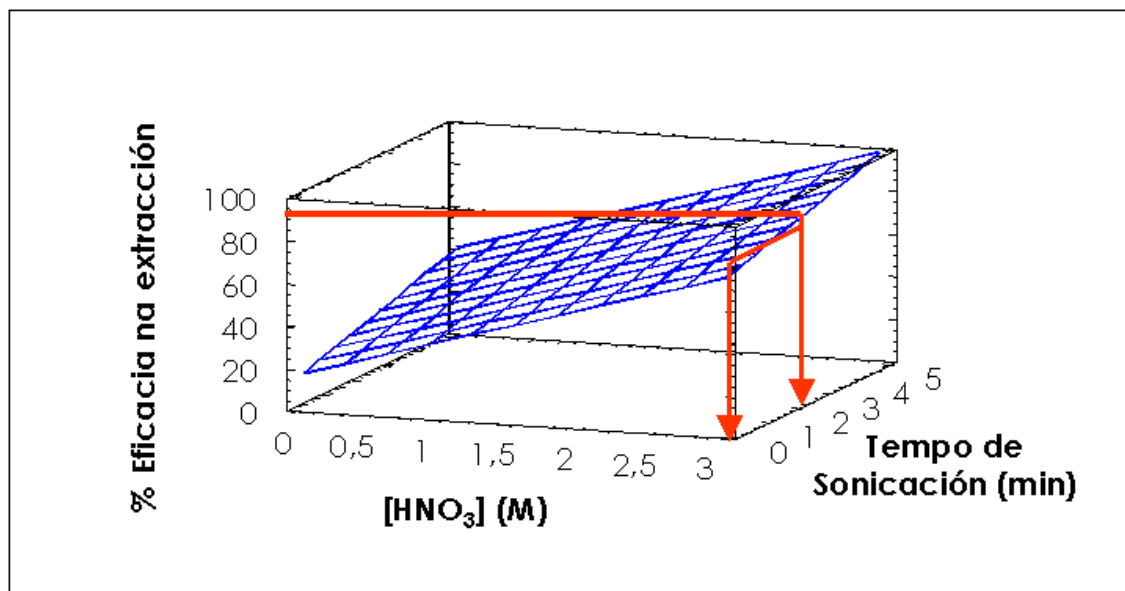
Con respecto ás variables estatisticamente significativas, isto é, a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación, realizáronse unha serie de experimentos co obxectivo de reducir os valores óptimos proporcionados polo deseño para estas variables. Tal e como se observa na Táboa 131, é posible reducir o **tempo de sonicación** a 1 minuto, mentras que a **concentración de ácido nítrico** se debe manter no valor máximo estudado: 3 M.

Os resultados obtidos poden corroborarse co gráfico de superficie para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación obtido previamente polo deseño de Plackett-Burman para as mostras de froitos secos, que se mostra na Figura 35.

**Táboa 131.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	1,5	2	3,5	20	102,9
3	0	1	2	3,5	20	95,1
3	0	0,5	2	3,5	20	73,9
1,5	0	1	2	3,5	20	62,0

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.



**Figura 35.** Superficie de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para as variables significativas do proceso de extracción do Pb das mostras de froitos secos ([HNO<sub>3</sub>] (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudio establecido: [HCl]= 1,5 M; Volume de disolución extractante= 3,5 mL; Caudal de extracción= 4,75 mL/min e Temperatura de extracción= 45 °C.

Unha vez optimizadas todas as variables, os valores óptimos para cada unha delas, despois de realizar os experimentos fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 132.

**Táboa 132.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do chumbo nas mostras de froitos secos.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do chumbo en mostras de Legumes**

No caso das mostras de legumes, igual que nos moluscos e peixes, vexetais e carnes, as variables estatisticamente significativas e o signo dos efectos estimados de tódalas variables son os mesmos.

Tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 123), onde o %Eficacia na extracción é cuantitativo (101,3 %) poden fixarse os valores das variables **caudal de extracción** e **temperatura de extracción** en 3,5 mL/min e 20 °C (temperatura ambiente). Estes valores óptimos simplifican a análise, ó evitar a compactación da mostra na minicolumna e o quecemento previo da auga do ultrasóns.

A **concentración de ácido clorhídrico** é a variable que menos influe no proceso de extracción do chumbo nas mostras de legumes (efecto estimado=-4,2). De feito, pode eliminarse este compoñente da disolución extractante, obténdose aínda así valores do %Eficacia na extracción cuantitativos, tal e como indican os experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 123).

Con respecto á variable **volumen de disolución extractante**, o que interesa é reducir ó máximo o valor da mesma, posto que o volume de extracto ácido deberá ser preconcentrado posteriormente a un caudal máximo de 3 mL/min. Posto que empregando un volume de disolución extractante de 2 mL (límite inferior do intervalo proposto para o deseño) se obteñen extraccións cuantitativas (experimentos 1 e 6 da matriz de Plackett-Burman), o valor óptimo desta variable fíxase en 2 mL.

As variables estatisticamente significativas son o **tempo de sonicación** (efecto estimado=43,1) e a **concentración de ácido nítrico** (efecto estimado=36,5). Tal e como indican os valores dos efectos estimados, a influencia de ditas variables no proceso de extracción é positiva; é dicir, a eficacia na extracción aumenta a medida que aumentan os valores das variables, dentro do intervalo estudado. Non obstante, estúdiouse a posibilidade de reducir o valor destas variables con respecto ós valores óptimos proporcionados polo deseño (Táboa 124). Os experimentos realizados para tal fin e os resultados dos mesmos móstranse na Táboa 133. Como pode observarse, requírense 3,5 minutos de sonicación e unha concentración de ácido nítrico 1 M para que a extracción do chumbo nas mostras de legumes sexa cuantitativa. A redución do valor destas variables con respecto ó valor óptimo das mesmas proporcionado polo deseño permite aumentar a frecuencia de mostraxe e realizar a extracción con ácido máis diluído.

**Táboa 133.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	3	2	3,5	20	66,9
3	0	3,5	2	3,5	20	97,1
1	0	3,5	2	3,5	20	104,2
0,5	0	3,5	2	3,5	20	73,0

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do chumbo nas mostras de legumes son os indicados na Táboa 134.

**Táboa 134.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do chumbo nas mostras de legumes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	3,5 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do chumbo en mostras de Cereais e derivados**

A optimización fóra do marco do deseño comézase, ó igual que nos casos anteriores, polas variables estatisticamente non significativas.

Co obxectivo de evitar a compactación da mostra e a xeneración de presión no sistema FIA, o **caudal de extracción** fíxase en 3,5 mL/min. A

realización da extracción a temperatura ambiente (20 °C) evita a necesidade de quentar a auga do ultrasóns antes da extracción, de maneira que a **temperatura de extracción** se fixa en 20 °C. O experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 123) corrobora que no referente a estas dúas variables, ditos valores conducen a un %Eficacia na extracción cuantitativo (98,3 %).

Según os experimentos 1 e 6 da mesma matriz, se se elixe un **volume de disolución extractante** de 2 mL, a extracción do chumbo das mostras de cereais e derivados é cuantitativa. Tendo en conta que o extracto ácido se preconcentrará posteriormente a un caudal máximo de 3 mL/min, convén que o valor da variable volume de disolución extractante sexa o máis pequeno posible. Así pois, o volume de 2 mL é o elixido como óptimo para esta variable.

A **concentración de ácido clorhídrico** é a variable con menor influencia no proceso de extracción. Se se teñen en conta os experimentos 1 e 4 da matriz do deseño (Táboa 123), onde se obteñen %Eficacia na extracción cuantitativos cando esta variable toma o valor inferior do intervalo estudado, pode concluírse que é posible eliminar este compoñente da disolución extractante.

Para lograr unha maior rapidez nas análises e realizar a extracción nas condicións ácidas menos drásticas posibles, estúdiouse a posibilidade de reducir o valor óptimo proporcionado polo deseño das variables estatisticamente significativas (Táboa 124). O resultado deste estudio móstrase na Táboa 135.

**Táboa 135.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	4	2	3,5	20	100,3
3	0	3	2	3,5	20	79,9
3	0	3,5	2	3,5	20	101,5
1,5	0	3,5	2	3,5	20	66,5

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Tal e como se mostra na táboa, é posible reducir o **tempo de sonicación** dende 5 a 3,5 minutos, mentras que unha **concentración de ácido nítrico** inferior a 3 M non permite extraer cuantitativamente o chumbo das mostras de cereais e derivados.

Unha vez optimizadas todas as variables, según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do chumbo nas mostras de cereais e derivados son os indicados na Táboa 136.

**Táboa 136.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do chumbo nas mostras de cereais e derivados.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
<b>Tempo de sonicación</b>	3,5 min
<b>Volume de disolución extractante</b>	2 mL
<b>Caudal de extracción</b>	3,5 mL/min
<b>Temperatura de extracción</b>	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do chumbo en mostras de Queixos e derivados**

Neste caso, as variables estatisticamente significativas tamén son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación, mentras que as variables estatisticamente non significativas teñen efectos estimados moi baixos. Dentro destas últimas, teñen efecto estimado negativo o caudal de extracción (efecto estimado=-3,1) e o volume de disolución extractante (efecto estimado=-3,2), e efecto estimado positivo a temperatura de extracción (efecto estimado=2,2) e a concentración de ácido clorhídrico (efecto estimado=2,0).

Seguindo o mesmo razoamento que nos outros tipos de mostras e tendo en conta os experimentos 1, 4 e 6 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 123), os valores óptimos das variables non significativas fíxanse en 3,5 mL/min para o **caudal de extracción**, 2 mL para o **volume de disolución extractante**, 20 °C para a **temperatura de extracción** e 0 M para a **concentración de ácido clorhídrico**.

Con respecto ás variables que inflúen estatisticamente na extracción do chumbo nas mostras de queixos e derivados, realizáronse unha serie de experimentos co obxectivo de diminuír o **tempo de sonicación** e a **concentración de ácido nítrico**. O resultado destes experimentos recóllese na Táboa 137.

**Táboa 137.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	1	2	3,5	20	96,7
3	0	0,5	2	3,5	20	82,4
2	0	1	2	3,5	20	77,8

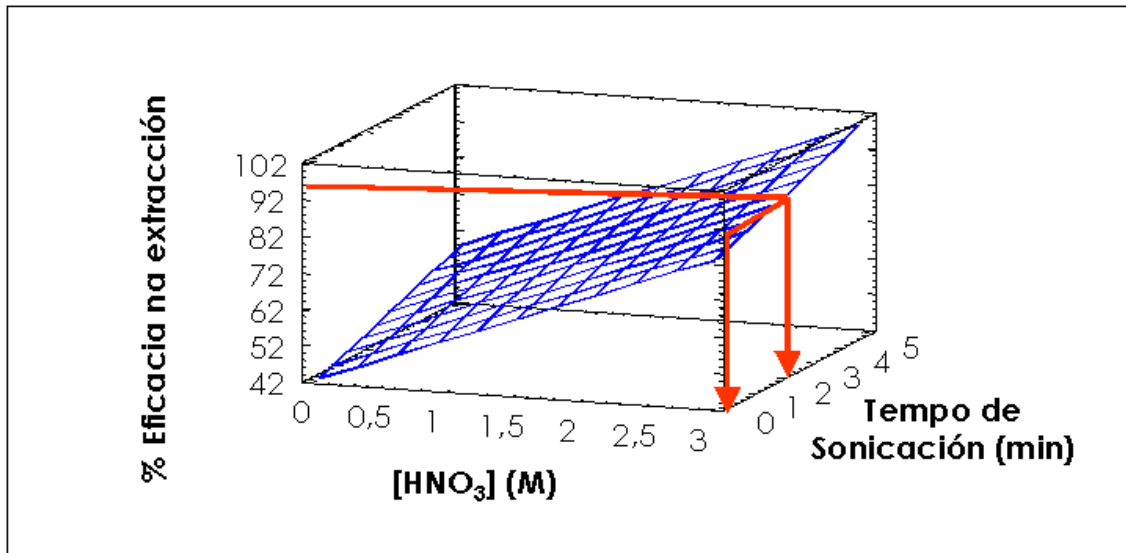
G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Obsevando o gráfico de superficie de resposta para as variables estatisticamente significativas proporcionado polo deseño para as mostras de queixos e derivados (Figura 36), poden corroborarse os resultados obtidos.

Os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do chumbo nas mostras de queixos e derivados son os indicados na Táboa 138.

**Táboa 138.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do chumbo nas mostras de queixos e derivados

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C



**Figura 36.** Superficie de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para as variables significativas do proceso de extracción do Pb das mostras de queixos e derivados ( $[\text{HNO}_3]$  (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido:  $[\text{HCl}] = 1,5$  M; Volume de disolución extractante = 3,5 mL; Caudal de extracción = 4,75 mL/min e Temperatura de extracción = 45 °C.

A Táboa 139 recolle un resumo dos valores óptimos para tódalas variables implicadas no proceso de extracción do chumbo nos diferentes tipos de mostras de alimentos.

Tendo en conta estes valores, pode concluirse que no proceso de extracción do chumbo dos diferentes tipos de mostras de alimentos se pode eliminar o ácido clorhídrico da disolución extractante, mentras que se precisa unha concentración de ácido nítrico 3 M para que a extracción sexa cuantitativa en tódolos casos excepto para as legumes, onde é suficiente unha concentración de dito ácido 1 M.

As variables volume de disolución extractante, caudal de extracción e temperatura de extracción toman o mesmo valor óptimo en cada unha das matrices sólidas.

Con respecto ó tempo de extracción, obsérvase que as matrices que requiren un maior tempo de sonicación para que a extracción sexa cuantitativa son as legumes e os cereais e derivados (3,5 minutos). As mostras de moluscos e peixes requiren de 3 minutos de sonicación, as carnes, de 2,5 minutos e os vexetais, de tan só 1,5 minutos. As mostras de froitos secos e queixos e derivados precisan únicamente de 1 minuto de extracción para que o proceso teña lugar de forma cuantitativa.

**Táboa 139.** Valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do chumbo das diferentes mostras de alimentos.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES IMPLICADAS NA EXTRACCIÓN DO CHUMBO DAS DIFERENTES MOSTRAS DE ALIMENTOS						
	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
<b>G (M)</b>	3	3	3	3	1	3	3
<b>H (M)</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>I (min)</b>	3	1,5	2,5	1	3,5	3,5	1
<b>J (mL)</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>K (mL/min)</b>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
<b>L (°C)</b>	20	20	20	20	20	20	20

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

### 3.2.3 Estudio da cantidade de mostra

Na optimización das distintas variables que afectan ó proceso de extracción continua do chumbo empregouse unha cantidade de mostra de 60 mg por minicolumna (unha minicolumna para os moluscos e peixes (Figura 12) e dúas minicolumnas conectadas en serie para o resto de mostras de alimentos (Figura 13)). Non obstante, estúdiouse a posibilidade de empregar cantidades maiores, co obxectivo de poder utilizar estes sistemas continuos para mostras que teñan unha concentración menor de chumbo e mellorar así a

sensibilidade do método analítico. Estudouse a posibilidade de aumentar a cantidade de mostra ata un máximo de 100 mg por minicolumna, xa que utilizar cantidades maiores provoca grandes presións no sistema FIA que fan inviable a análise. O aumento da cantidade de mostra mantendo os valores óptimos das variables implicadas no proceso de extracción do chumbo só foi posible nas mostras de moluscos e peixes e queixos e derivados, obténdose eficacias na extracción cuantitativas para un máximo de 80 mg de mostra por minicolumna.

#### **3.2.4 Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra**

Ata o momento, tódolos estudos levados a cabo se realizaron con mostras de diámetro de partícula inferior a 30  $\mu\text{m}$ . Posto que resulta de interés coñecer se o tamaño de partícula da mostra influe no proceso de extracción, tomáronse fraccións de mostras representativas de cada matriz alimenticia dos seguintes tamaños: inferior a 30  $\mu\text{m}$  e intermedios entre 30 e 100  $\mu\text{m}$ .

Para cada fracción de cada mostra, realizouse a análise seguindo o método de referencia descrito anteriormente (páxina 86) e mediante as diferentes metodoloxías propostas. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 140.

Pode concluirse, polo tanto, que o tamaño de partícula da mostra non influe na extracción do chumbo das diferentes mostras de alimentos, dentro do intervalo estudado.

**Táboa 140.** Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra utilizando o método de referencia e as metodoloxías continuas propostas. Indícase tamén a eficacia na extracción do sistema FIA.

Tipo de mostra	Mostra analizada	Tamaño de partícula	[Pb] <sub>A</sub> (µg/g)	[Pb] <sub>B</sub> (µg/g)	% Eficacia na extracción
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón	< 30 µm	0,98 ± 0,03	1,01 ± 0,03	103,1
		30-100 µm	0,94 ± 0,04	0,95 ± 0,03	101,1
<b>Vexetais</b>	Grelas	< 30 µm	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	100,0
		30-100 µm	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	100,0
<b>Carnes</b>	Riles de carneiro	< 30 µm	0,22 ± 0,01	0,22 ± 0,01	100,0
		30-100 µm	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,01	104,5
<b>Froitos secos</b>	Castañas	< 30 µm	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	100,0
		30-100 µm	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,01	103,8
<b>Legumes</b>	Garbanzos	< 30 µm	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01	103,1
		30-100 µm	0,32 ± 0,01	0,33 ± 0,01	103,1
<b>Cereais e derivados</b>	Pan relado	< 30 µm	0,21 ± 0,01	0,22 ± 0,01	104,8
		30-100 µm	0,21 ± 0,01	0,21 ± 0,02	100,0
<b>Queixos e derivados</b>	logurt	< 30 µm	0,51 ± 0,01	0,53 ± 0,02	103,9
	natural	30-100 µm	0,49 ± 0,01	0,50 ± 0,01	102,0

<sup>A</sup> [Pb] obtida mediante o método de referencia

<sup>B</sup> [Pb] obtida mediante os métodos continuos propostos

### 3.3 Extracción do cobalto

A optimización deste proceso de extracción levouse a cabo empregando o dispositivo FIA indicado na Figura 12.

Para a optimización, empregouse o deseño factorial de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  de resolución tipo III con 6 graos de liberdade e un punto central. As variables que afectan ó proceso de extracción ácida do cobalto, así como os valores máximos e mínimos fixados para as mesmas, dacordo con experimentos realizados previamente, recóllense na Táboa 102.

Unha vez obtida a matriz do deseño (Táboa 101) realizáronse os 13 experimentos indicados na mesma, utilizando o dispositivo FIA indicado na Figura 12. Para realizar os experimentos sobre as diferentes matrices, empregáronse mostras cuxa concentración se determinou previamente por triplicado, facendo uso do método de referencia descrito anteriormente (páxina 86) (Táboa 141). A cantidade de mostra empregada para levar a cabo a optimización do proceso de extracción foi de 60 mg por minicolumna.

A matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores que toma cada unha das variables en cada experimento e o %Eficacia na extracción obtido en cada caso móstrase na Táboa 142. Os experimentos da matriz realizáronse por duplicado, de xeito que o %Eficacia na extracción indicado é a media de ambos resultados.

**Táboa 141.** Mostras empregadas na optimización do proceso continuo de extracción ácida e concentración de cobalto presente nas mesmas.

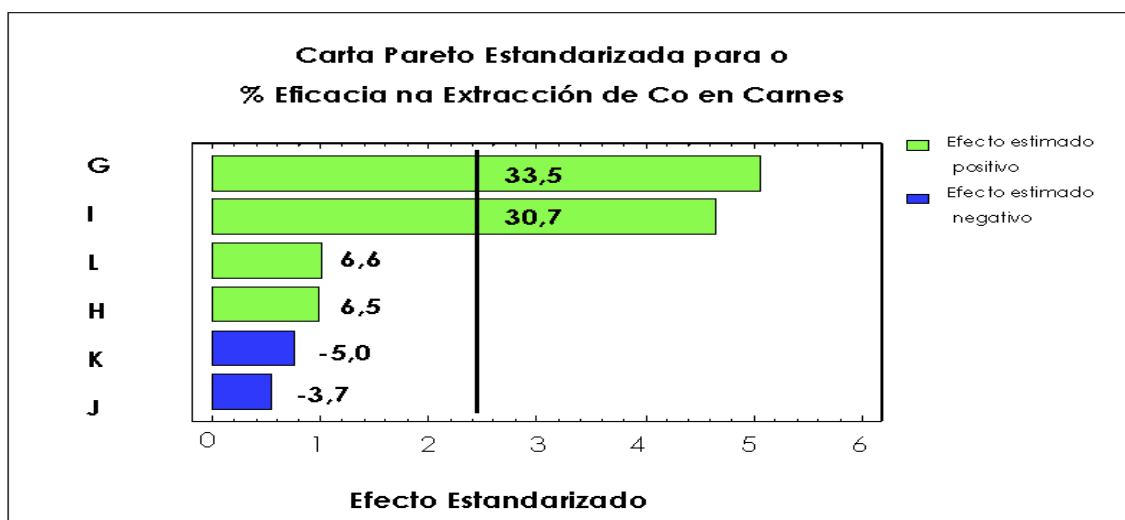
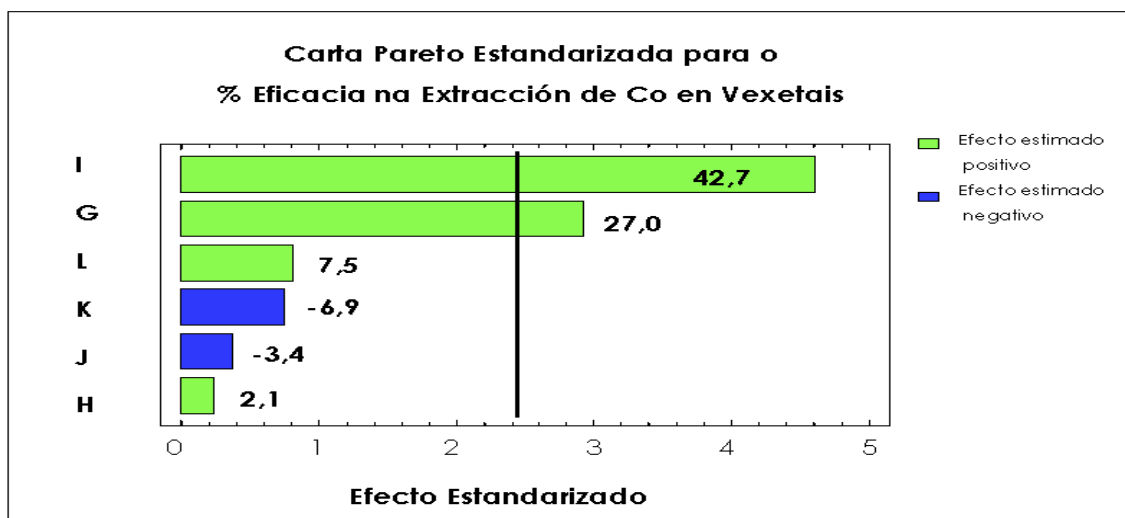
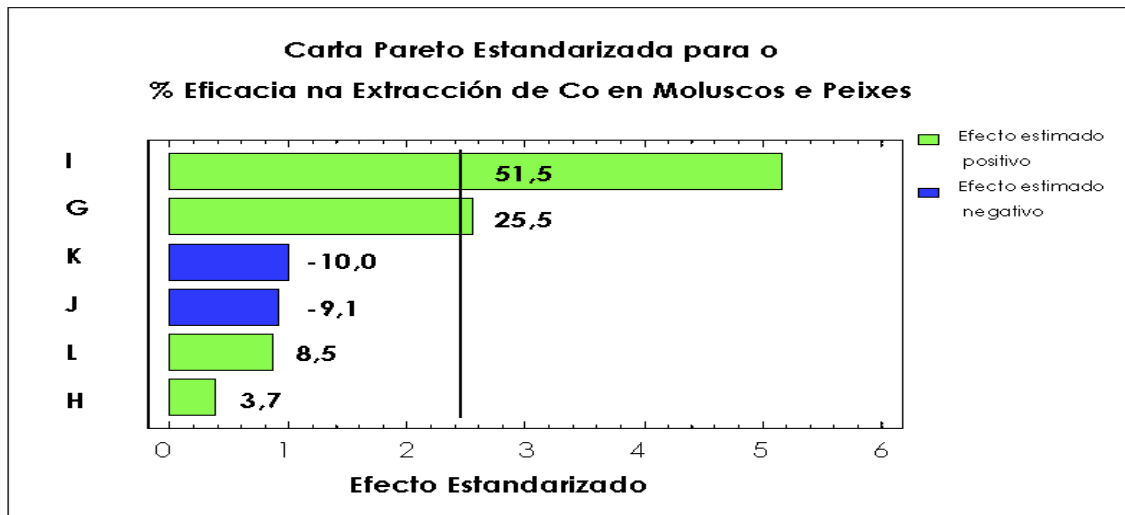
Tipo de matriz	Mostra coa que se realizou a optimización	[Co] ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón	$0,93 \pm 0,01$
<b>Vexetais</b>	Acelga	$0,80 \pm 0,01$
<b>Carnes</b>	Polo	$0,88 \pm 0,02$
<b>Froitos secos</b>	Cacahuetes	$0,77 \pm 0,01$
<b>Legumes</b>	Lentellas	$0,75 \pm 0,01$
<b>Cereais e derivados</b>	Arroz	$0,86 \pm 0,02$
<b>Queixos e derivados lácteos</b>	Quesitos	$0,87 \pm 0,01$

Unha vez realizados os experimentos procedeuse á análise dos datos proporcionados polo deseño. Para iso é preciso coñecer que variables son estatisticamente significativas e como afectan ó proceso de extracción ácida do cobalto, para o cal se recorre ás **Cartas Pareto estandarizadas** para cada tipo de mostra (Figura 37).

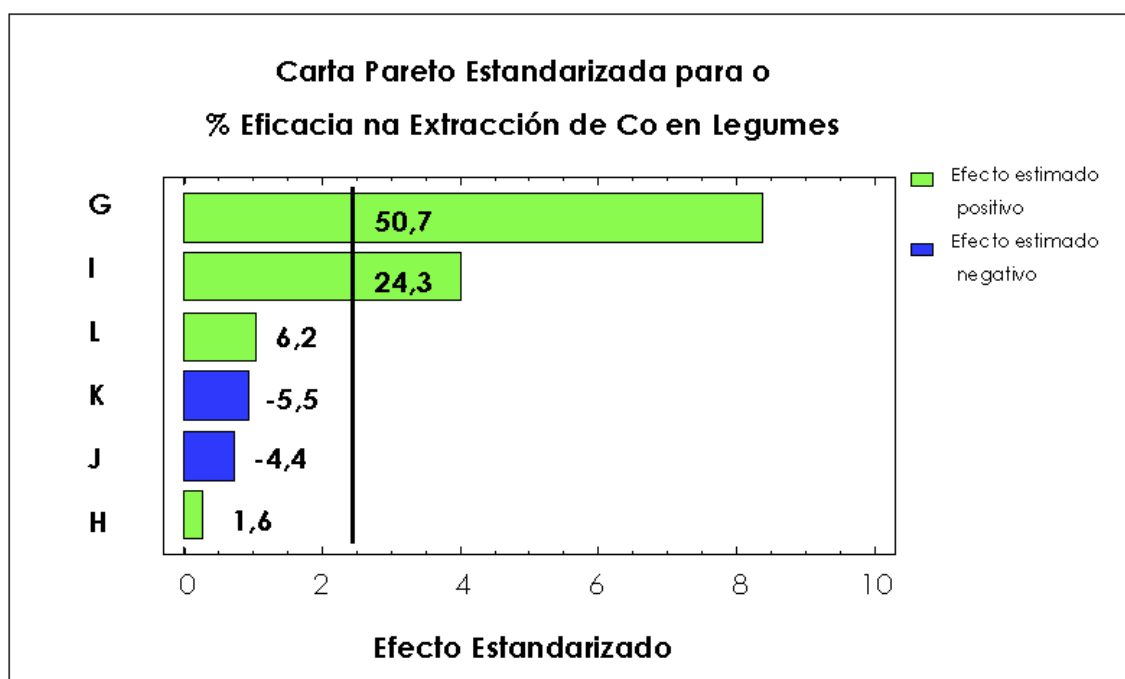
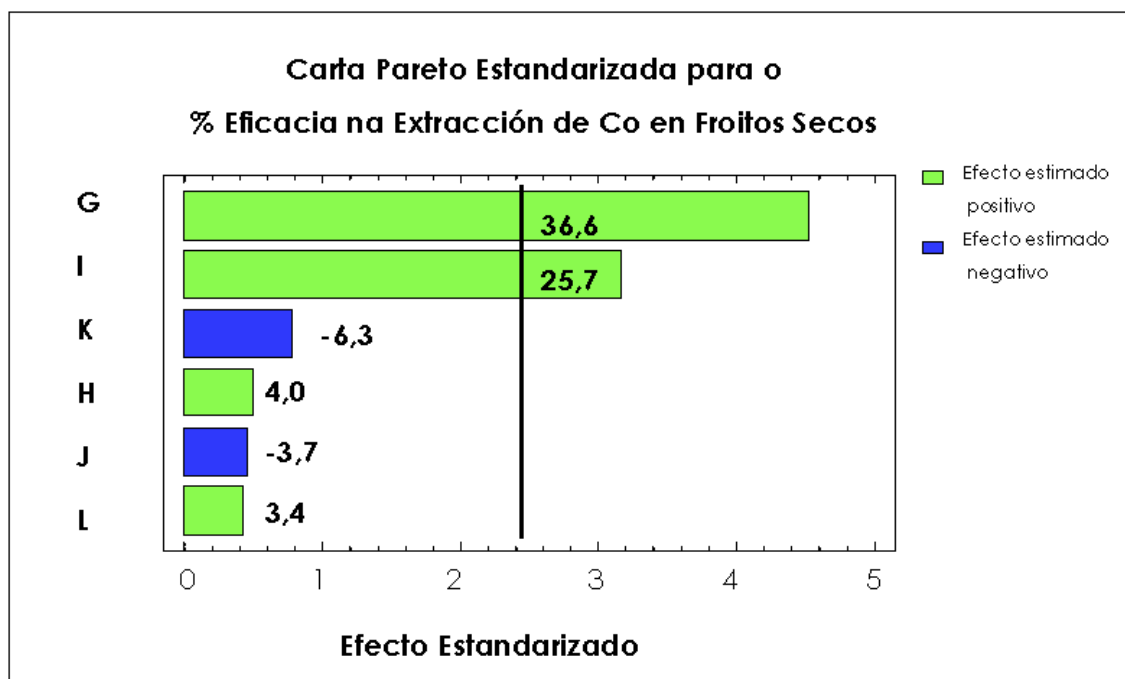
**Táboa 142.** Matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores de cada variable en cada experimento e co % Eficacia na extracción do cobalto obtido en cada un deles para cada tipo de mostra.

NE	% Eficacia na extracción												
	G	H	I	J	K	L	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
1	3	0	5	2	3,5	20	101,2	97,8	97,8	101,3	97,7	97,9	101,3
2	3	3	0,5	5	3,5	20	35,0	49,0	66,2	70,9	68,5	53,0	86,7
3	0	3	5	2	6	20	68,1	62,9	70,1	61,2	43,0	38,6	63,2
4	3	0	5	5	3,5	70	98,7	101,0	101,4	99,7	101,0	101,4	99,7
5	3	3	0,5	5	6	20	33,8	46,1	65,1	69,0	65,8	50,6	83,6
6	3	3	5	2	6	70	102,4	100,7	99,6	98,4	103,4	98,4	103,0
7	1,5	1,5	2,75	3,5	4,75	45	90,6	98,6	92,5	100,8	81,9	77,5	102,4
8	0	3	5	5	3,5	70	71,0	69,1	73,4	63,5	46,7	42,3	65,6
9	0	0	5	5	6	20	39,4	55,1	46,7	49,1	31,8	26,2	60,1
10	0	0	0,5	5	6	70	21,0	28,0	33,1	33,0	23,9	21,0	41,9
11	3	0	0,5	2	6	70	31,6	45,1	67,3	66,7	66,4	47,5	81,9
12	0	3	0,5	2	3,5	70	27,2	37,1	42,0	45,1	28,1	30,6	54,6
13	0	0	0,5	2	3,5	20	23,1	25,2	31,1	34,5	25,3	24,8	43,4

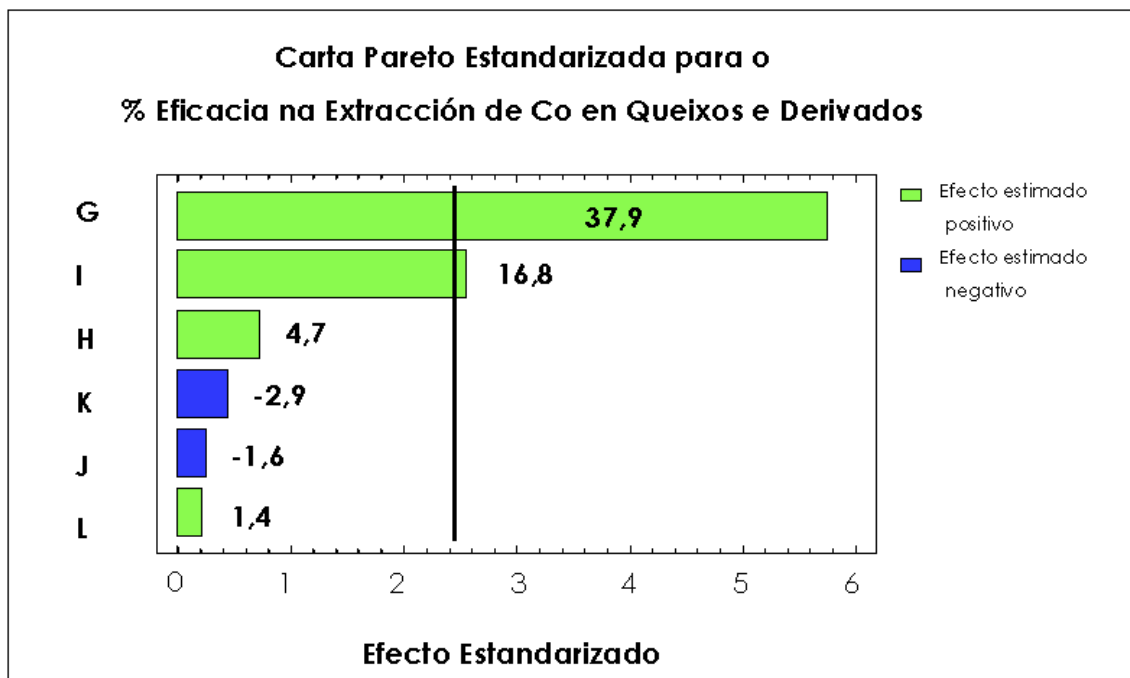
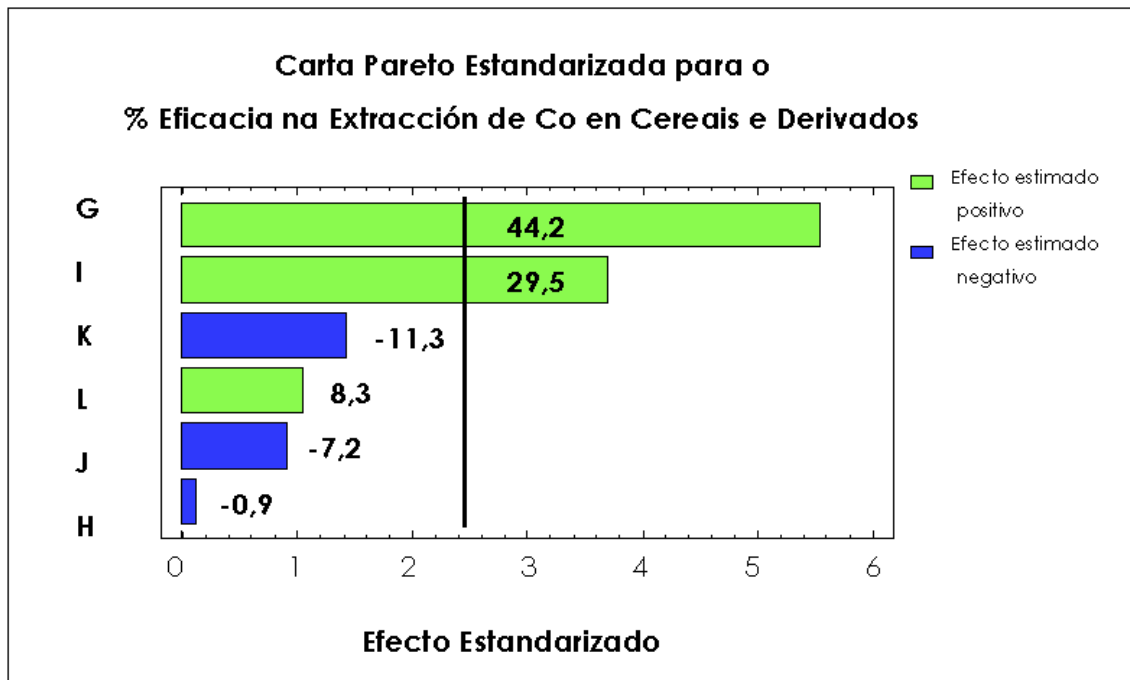
NE, número de experimento; G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



**Figura 37.** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



**Figura 37 (Continuación).** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



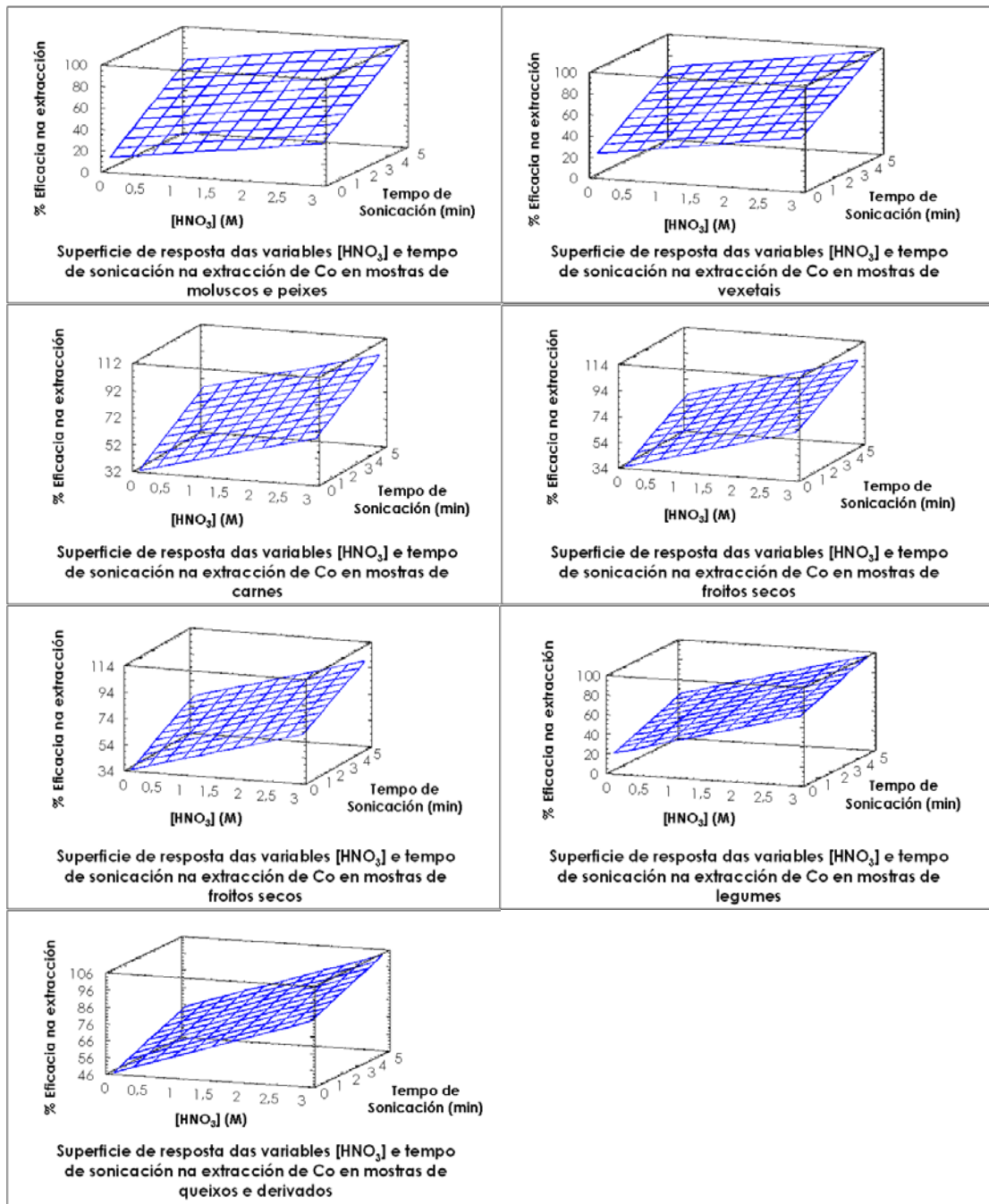
**Figura 37 (Continuación).** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.

### 3.3.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial

Nos resultados obtidos tras aplicar o deseño factorial de Plackett-Burman á extracción do cobalto nos distintos tipos de mostras de alimentos, obsérvase que as variables estatisticamente significativas son as mesmas en tódolos casos: a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación.

A Figura 38 recolle os gráficos de superficie de resposta para estas dúas variables en cada caso, onde se pode observar como varía o %Eficacia na extracción do cobalto en función dos valores que toman ditas variables e mantendo as variables restantes no valor intermedio do intervalo de estudio proposto para o deseño.

As demais variables non superan o nivel de significación establecido polo método para un 95 % de confianza, que se representa nas Cartas Pareto estandarizadas por unha liña vertical. Dentro destas variables non significativas, obsérvase que o volume de disolución extractante e o caudal de extracción afectan negativamente ó proceso de extracción en tódolos casos, mentras que a temperatura de extracción afecta positivamente. A variable concentración de ácido clorhídrico presenta un efecto estimado negativo no caso das mostras de cereais e derivados mentras que nos restantes tipos de mostras este efecto estimado é positivo.



**Figura 38.** Superfícies de resposta proporcionadas polo deseño de Plackett-Burman para as variables estatisticamente significativas en cada caso (as demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido polo deseño).

Unha vez analizados os resultados obtidos ó aplicar o deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos das variables establecidos polo mesmo son os que se indican na Táboa 143.

**Táboa 143.** Valores óptimos según o deseño de Plackett-Burman para cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do cobalto das diferentes mostras sólidas.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES DACORDO CO DESEÑO DE PLACKETT-BURMAN						
	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
<b>G (M)</b>	3	3	3	3	3	3	3
<b>H (M)</b>	3	3	3	3	3	0	3
<b>I (min)</b>	5	5	5	5	5	5	5
<b>J (mL)</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>K (mL/min)</b>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
<b>L (°C)</b>	70	70	70	70	70	70	70

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Tendo en conta que o deseño de Plackett-Burman non proporciona os valores óptimos das variables, senon a tendencia das mesmas cara o óptimo, realizáronse unha serie de experimentos fóra do marco do deseño para determinar os valores óptimos de cada unha das variables que afectan ó proceso de extracción do cobalto nos distintos tipos de mostras.

### 3.3.2 Experimentos fóra do marco do deseño

- **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cobalto en mostras de Moluscos e Peixes**

No estudio das Cartas Pareto estandarizadas (Figura 37) pode observarse que na extracción do cobalto en mostras de moluscos e peixes as variables estatísticamente significativas son o tempo de sonicación e a concentración de ácido nítrico.

O **caudal de extracción** e **volumen de disolución extractante** son as variables non significativas con máis importancia no proceso de extracción e presentan efectos estimados negativos. Tendo en conta os experimentos 1 e 6 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 142), onde se obteñen %Eficacia na extracción cuantitativos, os valores óptimos destas variables fíxanse en 3,5 mL/min e 2 mL.

Os valores óptimos establecidos para a **concentración de ácido clorhídrico** e **temperatura de extracción** son 0 M e 20 °C, respectivamente, posto que se obteñen valores de %Eficacia na extracción cuantitativos cando estas variables toman o valor mínimo do intervalo establecido no deseño (experimentos 1 e 4 para a concentración de ácido clorhídrico e experimento 1 para a temperatura de extracción). Polo tanto, a extracción do cobalto é cuantitativa a temperatura ambiente e eliminando o ácido clorhídrico da disolución extractante.

Con respecto ás variables estatísticamente significativas, **tempo de sonicación** e **concentración de ácido nítrico**, estívese a posibilidade de reducir os valores óptimos das mesmas proporcionados polo deseño. Os experimentos realizados con tal fin e o resultado dos mesmos recóllense na Táboa 144.

**Táboa 144.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	102,7
3	0	1,5	2	3,5	20	86,4
2	0	2	2	3,5	20	92,6

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

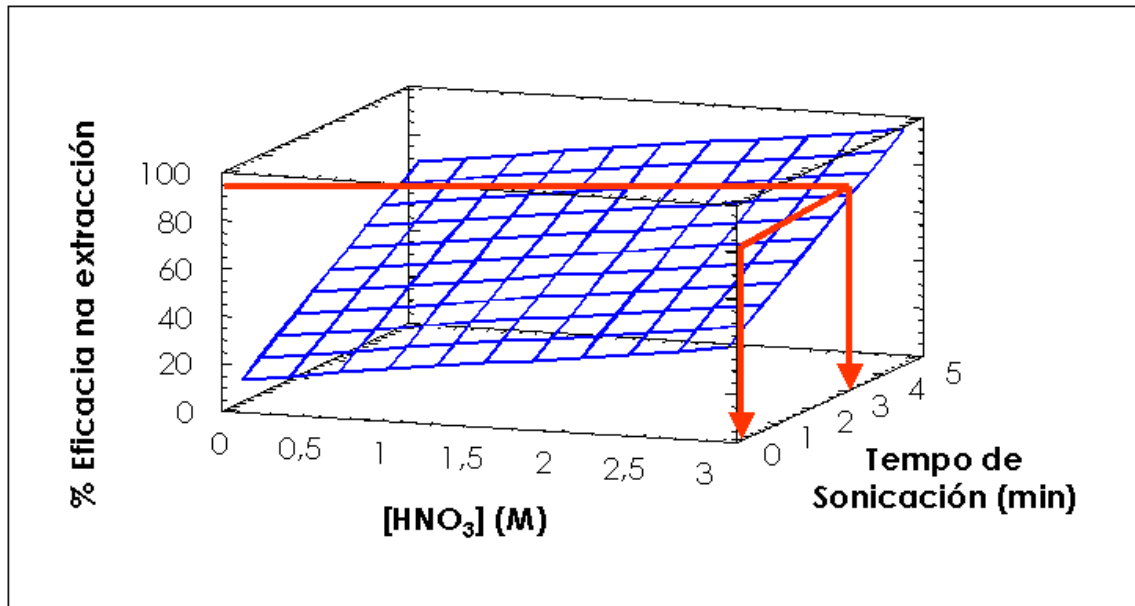
Tal e como se observa na táboa, o tempo de sonicación pode reducirse dende 5 ata 2 minutos, mentras que a concentración de ácido nítrico se debe manter en 3 M para que a extracción sexa cuantitativa.

Os resultados obtidos poden corroborarse ó analizar con profundidade o gráfico de superficie para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación obtido previamente polo deseño de Plackett-Burman para as mostras de moluscos e peixes, que se mostra na figura 39.

Os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do cobalto nas mostras de moluscos e peixes recóllense na Táboa 145.

**Táboa 145.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cobalto nas mostras de moluscos e peixes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C



**Figura 39.** Superfície de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para as variables significativas do proceso de extracción do Co das mostras de moluscos e peixes ( $[HNO_3]$  (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido:  $[HCl]= 1,5$  M; Volume de disolución extractante= 3,5 mL; Caudal de extracción= 4,75 mL/min e Temperatura de extracción= 45 °C.

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cobalto en mostras de Vexetais**

A extracción do cobalto nas mostras de vexetais está afectada significativamente polas variables tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico. As restantes variables teñen unha influencia no proceso baixa, tal e como indican os valores absolutos dos seus efectos estimados (Figura 37).

Os valores óptimos das variables **temperatura de extracción, caudal de extracción e volume de disolución extractante** fíxanse en 20 °C, 3,5 mL/min e 2 mL, respectivamente, posto que nos experimentos 1 (para a temperatura e caudal de extracción) e 1 e 6 (para o volume de disolución extractante), onde ditas variables toman estes valores, se obteñen %Eficácia na extracción cuantitativos.

Con respecto á **concentración de ácido clorhídrico** e tendo en conta os experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 142), pode concluirse que se pode eliminar dito compoñente da disolución extractante e aínda así obter extraccións cuantitativas.

No referente ás variables estatisticamente significativas, estúdiouse a posibilidade de reducir os valores das mesmas, para aumentar así a frecuencia de mostraxe e poder realizar a extracción nas condicións menos drásticas posibles. A Táboa 146 mostra os resultados deste estudo.

**Táboa 146.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	1	2	3,5	20	87,9
3	0	1,5	2	3,5	20	96,9
1,5	0	1,5	2	3,5	20	103,5
1,0	0	1,5	2	3,5	20	102,9
0,5	0	1,5	2	3,5	20	86,4

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do cobalto das mostras de vexetais recóllense na Táboa 147.

**Táboa 147.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cobalto nas mostras de vexetais.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1,5 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cobalto en mostras de Carnes**

En primeiro lugar optimizáronse as variables non significativas.

A **concentración de ácido clorhídrico** presenta un efecto estimado positivo (efecto estimado=6,5), de maneira que canto maior sexa o valor desta variable (dentro do intervalo estudado) máis favorecido se verá o proceso de extracción. Non obstante, tendo en conta os resultados obtidos nos experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 142), onde a extracción é cuantitativa a pesar de que este ácido non forma parte da disolución extractante, o valor óptimo desta variable fíxase en 0 M.

Os valores óptimos da **temperatura de extracción** (efecto estimado=6,6), **caudal de extracción** (efecto estimado=-5,0) e **volumen de disolución extractante** (efecto estimado=-3,7) fíxanse en 20 °C, 3,5 mL/min e 2 mL, posto que os experimentos 1 (para o caudal e temperatura de extracción) e 1 e 6 (para o volumen de disolución extractante) da matriz de Plackett-Burman (Táboa 142) proporcionan %Eficacia na extracción cuantitativas. Desta maneira simplifícase en gran medida a análise, posto que se pode realizar a temperatura ambiente e ó caudal mínimo estudado, reducíndose así a

compactación da mostra na minicolumna e a presión xenerada no sistema FIA. O emprego do menor volume de disolución extractante permite aumentar a frecuencia de mostraxe, ó requirirse menos tempo para levar a cabo a preconcentración, posto que o volume de extracto se vai preconcentrar posteriormente a un caudal máximo de 2 mL/min.

Con respecto ás variables estatisticamente significativas, **concentración de ácido nítrico** (efecto estimado=33,5) e **tempo de sonicación** (efecto estimado=30,7), realizáronse uns experimentos co obxectivo de reducir os valores das mesmas proporcionados polo deseño. Os resultados destes experimentos indícanse na Táboa 148.

**Táboa 148.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	102,4
3	0	1,5	2	3,5	20	86,6
2	0	2	2	3,5	20	91,6

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos das variables implicadas na extracción do cobalto en mostras de carnes, unha vez realizados os experimentos fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 149.

**Táboa 149.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cobalto nas mostras de carnes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cobalto en mostras de Froitos secos**

Novamente, as variables estatisticamente significativas son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación.

O estudo fóra do marco do deseño comézase polas variables non significativas.

O **volumen de disolución extractante** ten un efecto estimado negativo (efecto estimado=-3,7). Tendo en conta os experimentos 1 e 6 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 142), e co obxectivo de reducir o tempo de preconcentración (xa que o volumen de extracto se vai preconcentrar posteriormente a un caudal de 2 mL/min), o valor óptimo desta variable fíxase en 2 mL.

A variable **concentración de ácido clorhídrico** ten un efecto estimado positivo (efecto estimado=4,0), de maneira que a maior valor desta variable, máis favorecido se verá o proceso de extracción. Non obstante, pode eliminarse este compoñente da disolución extractante, obténdose aínda así %Eficacia na extracción cuantitativos (experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman). Polo tanto, o valor óptimo para esta variable fíxase en 0 M.

A **temperatura de extracción** e o **caudal de extracción** fíxanse en 20 °C e 3,5 mL/min, respectivamente, posto que no experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 142), onde estas variables toman o valor inferior do intervalo proposto para o deseño, se obtén un %Eficacia na extracción cuantitativo (101,3 %).

Con respecto á **concentración de ácido nítrico** e **tempo de sonicación**, (variables estatisticamente significativas), estúdiouse a posibilidade de reducir os valores das mesmas proporcionados polo deseño, co obxectivo de realizar a extracción co ácido o máis diluído posible e aumentar a frecuencia de mostraxe. Os resultados deste estudo recóllense na Táboa 150.

**Táboa 150.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	1	2	3,5	20	85,6
3	0	1,5	2	3,5	20	101,3
1,5	0	1,5	2	3,5	20	102,0
1	0	1,5	2	3,5	20	103,0
0,5	0	1,5	2	3,5	20	86,3

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Unha vez optimizadas todas as variables, según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do cobalto nas mostras de froitos secos recóllense na Táboa 151.

**Táboa 151.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cobalto nas mostras de froitos secos.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1,5 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cobalto en mostras de Legumes**

O estudo fóra do marco do deseño comezouse por aquelas variables con menor importancia no proceso de extracción.

A **concentración de ácido clorhídrico** é a variable con menor influencia na extracción (efecto estimado=1,6). A pesar de que o seu efecto estimado é positivo, tendo en conta os experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 142), onde se obteñen %Eficacia na extracción cuantitativos tomando esta variable o valor de 0 M, elíxese dito valor como óptimo; é dicir, elimínase o ácido clorhídrico da disolución extractante.

As variables **temperatura de extracción** e **caudal de extracción** fíxanse en 20 °C e 3,5 mL/min, posto que o experimento realizado con ditos valores (experimento 1 da matriz de Plackett-Burman) proporciona un %Eficacia na extracción cuantitativo.

A variable **volume de disolución extractante** ten un efecto estimado negativo (efecto estimado=-4,4). Co obxectivo de diminuír o tempo de preconcentración, e polo tanto, o tempo da análise, e tendo en conta os

experimentos 1 e 6 da matriz de Plackett-Burman, selecciónase o volume de 2 mL como o valor óptimo para esta variable.

Con respecto ás variables estatisticamente significativas, a **concentración de ácido nítrico** e o **tempo de sonicación**, realizáronse uns experimentos fóra do marco do deseño co obxectivo de reducir os valores das mesmas proporcionados polo deseño. Os resultados destes experimentos recóllense na Táboa 152.

**Táboa 152.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

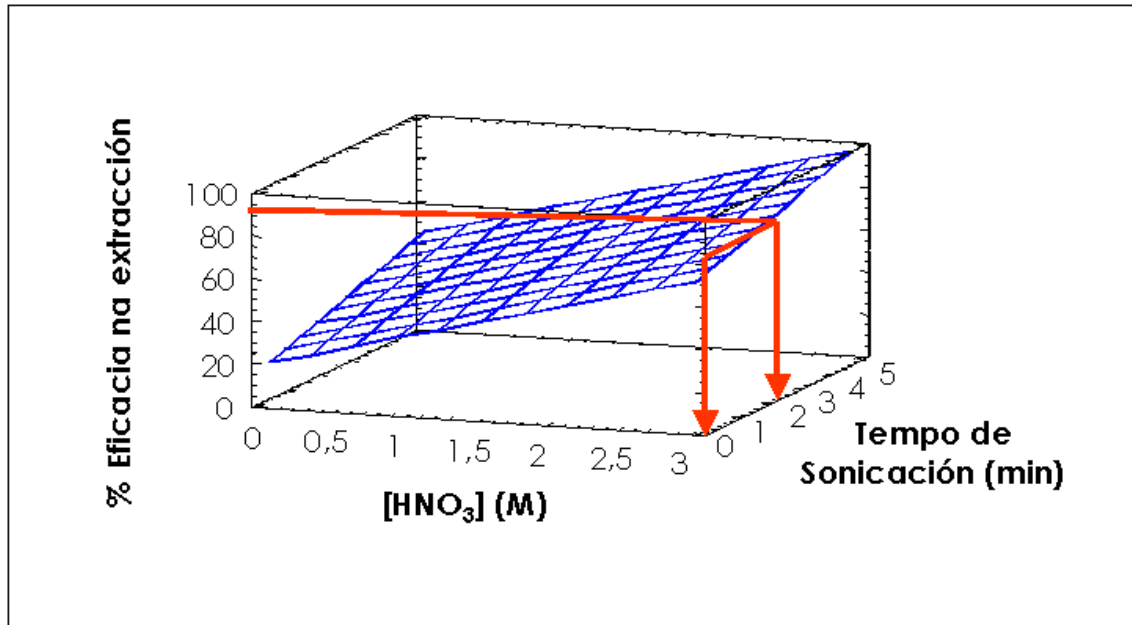
G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	1	2	3,5	20	92,9
3	0	1,5	2	3,5	20	102,7
2	0	1,5	2	3,5	20	81,9

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Tal e como se observa na táboa, un tempo de sonicación de 1,5 minutos é suficiente para lograr unha extracción cuantitativa. Non obstante, a concentración de ácido nítrico requerida é de 3 M.

Estes resultados poden corroborarse ó analizar con profundidade o gráfico de superficie para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación obtido previamente polo deseño de Plackett-Burman para as mostras de legumes, que se mostra na figura 40.

Os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do cobalto nas mostras de legumes recóllense na Táboa 153.



**Figura 40.** Superficie de resposta obtida polo deseño de Plackett-Burman para as variables significativas do proceso de extracción do Co das mostras de legumes ([HNO<sub>3</sub>] (M) e tempo de sonicación (min)). As demais variables toman o valor medio do intervalo de estudio establecido: [HCl]= 1,5 M; Volume de disolución extractante= 3,5 mL; Caudal de extracción= 4,75 mL/min e Temperatura de extracción= 45 °C.

**Táboa 153.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cobalto nas mostras de legumes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1,5 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cobalto en mostras de Cereais e derivados**

Neste caso, as variables estatisticamente significativas tamén son a concentración de ácido nítrico (efecto estimado=44,2) e o tempo de sonicación (efecto estimado=29,5).

O **caudal de extracción** (efecto estimado=-11,3) e a **temperatura de extracción** (efecto estimado=8,3) son as variables non significativas con maior influencia no proceso de extracción. Tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 142), fíxanse os valores óptimos destas variables en 3,5 mL/min e 20 °C, respectivamente. Simplifícase así a análise, posto que se pode levar a cabo a temperatura ambiente e ó empregar o caudal mínimo do intervalo proposto para o deseño, minimízase a compactación da mostra na minicolumna e a presión xenerada no sistema FIA.

O **volume de disolución extractante** (efecto estimado=-7,2) fíxase en 2 mL, posto que dito volume proporciona %Eficacia na extracción cuantitativos (experimentos 1 e 6 da matriz de Plackett-Burman) e permite reducir o tempo de preconcentración, que se realizará posteriormente a un caudal máximo de 2 mL/min.

A **concentración de ácido clorhídrico** é a variable con menor efecto estimado (efecto estimado=-0,9). Se se consideran os experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman, pode concurirse que é posible eliminar dito compoñente da disolución extractante e obter aínda así extraccións cuantitativas. Polo tanto, o valor óptimo desta variable é 0 M.

As variables **concentración de ácido nítrico** e **tempo de sonicación** teñen efectos estimados elevados e positivos, de maneira que ó aumentar ditas

variables dentro do intervalo proposto para o deseño, favorécese o proceso de extracción. Non obstante, estulouse a posibilidade de reducir os valores destas variables proporcionados polo deseño. A Táboa 154 recolle os resultados de ditos experimentos.

Como pode observarse na táboa, é posible reducir o tempo de sonicación a 2 minutos, mentras que a concentración de ácido nítrico se debe manter en 3 M para que a extracción sexa cuantitativa.

**Táboa 154.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	101,4
3	0	1,5	2	3,5	20	90,6
2	0	2	2	3,5	20	77,5

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos das variables involucradas na extracción do cobalto en mostras de cereais e derivados indícanse na Táboa 155.

**Táboa 155.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cobalto nas mostras de cereais e derivados.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cobalto en mostras de Queixos e derivados**

Na extracción do cobalto en mostras de queixos e derivados as variables estatisticamente significativas son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación.

O **caudal de extracción**, o **volumen de disolución extractante** e a **temperatura de extracción** son variables que non influen estatisticamente na extracción. Os seus valores fíxanse en 3,5 mL/min, 2 mL e 20 °C, posto que ditos valores simplifican o proceso de extracción e proporcionan resultados de %Eficacia na extracción cuantitativos (experimentos 1 e 6 da matriz de Plackett-Burman, Táboa 142).

A **concentración de ácido clorhídrico** é a variable non significativa con maior efecto estimado (efecto estimado=4,2). A pesar de que a súa influencia no proceso de extracción é positiva, pode eliminarse dito compoñente da disolución extractante e lograr aínda así extraccións cuantitativas. Polo tanto, o valor óptimo para esta variable é 0 M.

Con respecto á **concentración de ácido nítrico** e **tempo de sonicación**, leváronse a cabo unha serie de experimentos co obxectivo de reducir os valores destas variables proporcionados polo deseño. Tal e como se recolle na Táboa 156, é posible reducir o tempo de sonicación dende 5 a 1 minuto e a concentración de ácido nítrico dende 3 a 1 M.

**Táboa 156.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	1	2	3,5	20	100,1
3	0	0,5	2	3,5	20	90,3
1,5	0	1	2	3,5	20	102,6
1	0	2	2	3,5	20	96,7
0,5	0	1	2	3,5	20	84,5

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos para cada unha das variables implicadas na extracción do cobalto das mostras de queixos e derivados recóllense na Táboa 157.

**Táboa 157.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cobalto nas mostras de queixos e derivados.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

A Táboa 158 recolle un resume dos valores óptimos para tódalas variables implicadas no proceso de extracción do cobalto nos diferentes tipos de mostras de alimentos.

**Táboa 158.** Valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do cobalto das diferentes mostras de alimentos.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES IMPLICADAS NA EXTRACCIÓN DO COBALTO DAS DIFERENTES MOSTRAS DE ALIMENTOS						
	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
<b>G (M)</b>	3	1	3	1	3	3	1
<b>H (M)</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>I (min)</b>	2	1,5	2	1,5	1,5	2	1
<b>J (mL)</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>K (mL/min)</b>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
<b>L (°C)</b>	20	20	20	20	20	20	20

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Nos valores óptimos obtidos para cada unha das variables na extracción do cobalto nos distintos tipos de mostras, obsérvase que se pode eliminar o ácido clorhídrico da disolución extractante en tódolos casos. No referente á concentración de ácido nítrico, é necesaria unha concentración de 3 M nos moluscos e peixes, carnes, legumes e cereais e derivados, mentras que nos vexetais, froitos secos e queixos e derivados é suficiente unha concentración 1 M do mesmo ácido para que a extracción sexa cuantitativa.

No que respecta ó tempo de sonicación, obsérvase que as mostras que requiren un maior tempo de extracción son os moluscos e peixes, as carnes e os cereais e derivados (2 minutos). A extracción cuantitativa dos vexetais, froitos secos e legumes require dun tempo de sonicación de 1,5 minutos, mentras que a extracción dos queixos e derivados é cuantitativa con tan só 1 minuto de sonicación.

As variables volume de disolución extractante, caudal de extracción e temperatura de extracción toman o mesmo valor óptimo en cada unha das matrices sólidas (2 mL, 3,5 mL/min e 20 °C, respectivamente).

### **3.3.3 Estudio da cantidade de mostra**

Nas extraccións de cobalto realizadas ata o momento as cantidades de mostra empregadas foron de 60 mg. Non obstante, estudiouse a posibilidade de utilizar cantidades de mostra maiores, para poder mellorar as características analíticas do proceso e analizar mostras con concentracións de cobalto menores. Así, estudiouse a posibilidade de aumentar a cantidade de mostra ata un máximo de 100 mg, xa que utilizar cantidades maiores provoca grandes presións no sistema FIA que fan inviable a análise.

O aumento da cantidade de mostra mantendo os valores óptimos das variables implicadas no proceso de extracción do cobalto non foi posible en ningún dos tipos de mostra estudiaados.

### **3.3.4 Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra**

Ata o momento, tódolos estudos levados a cabo se realizaron con mostras de diámetro de partícula inferior a 30  $\mu\text{m}$ . Posto que resulta de interés coñecer se o tamaño de partícula da mostra influe no proceso de extracción, tomáronse fraccións de mostras representativas de cada matriz alimenticia dos seguintes tamaños: inferior a 30  $\mu\text{m}$  e intermedios entre 30 e 100  $\mu\text{m}$ .

Para cada fracción de cada mostra, realizouse a análise seguindo o método de referencia descrito anteriormente (páxina 86) e mediante as diferentes metodoloxías propostas. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 159.

Pode concluirse, polo tanto, que o tamaño de partícula da mostra non influe na extracción do cobalto das diferentes mostras de alimentos, dentro do intervalo estudiaado.

**Táboa 159.** Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra utilizando o método de referencia e as metodoloxías continuas propostas. Indícase tamén a eficacia na extracción do sistema FIA.

Tipo de mostra	Mostra analizada	Tamaño de partícula	[Co] <sup>A</sup> (µg/g)	[Co] <sup>B</sup> (µg/g)	% Eficacia na extracción
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón	< 30 µm	0,93 ± 0,01	0,92 ± 0,02	98,9
		30-100 µm	0,84 ± 0,01	0,85 ± 0,01	101,2
<b>Vexetais</b>	Acelga	< 30 µm	0,80 ± 0,01	0,81 ± 0,02	101,3
		30-100 µm	0,80 ± 0,01	0,81 ± 0,01	101,3
<b>Carnes</b>	Polo	< 30 µm	0,88 ± 0,01	0,86 ± 0,01	97,7
		30-100 µm	0,85 ± 0,01	0,86 ± 0,01	101,2
<b>Froitos secos</b>	Castañas	< 30 µm	0,81 ± 0,02	0,82 ± 0,01	101,2
		30-100 µm	0,81 ± 0,02	0,80 ± 0,01	98,8
<b>Legumes</b>	Lentellas	< 30 µm	0,75 ± 0,01	0,77 ± 0,02	102,7
		30-100 µm	0,75 ± 0,02	0,72 ± 0,01	96,0
<b>Cereais e derivados</b>	Arroz	< 30 µm	0,86 ± 0,01	0,86 ± 0,01	100,0
		30-100 µm	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,01	98,8
<b>Queixos e derivados</b>	Quesitos	< 30 µm	0,87 ± 0,01	0,89 ± 0,01	102,3
		30-100 µm	0,81 ± 0,02	0,84 ± 0,01	103,7

<sup>A</sup> [Co] obtida mediante o método de referencia

<sup>B</sup> [Co] obtida mediante os métodos continuos propostos

### 3.4 Extracción do cromo

Para a optimización do proceso de extracción do cromo tamén se empregou o deseño factorial de Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  de resolución tipo III con 6 graos de liberdade e un punto central. As variables que afectan ó proceso de extracción ácida do cromo, así como os seus valores máximos e mínimos, non

difiren dos casos anteriores, posto que o obxectivo é coñecer o comportamento das mesmas no mesmo intervalo de estudo (Táboa 102).

Unha vez obtida a matriz do deseño (Táboa 101) realizáronse os 13 experimentos indicados na mesma, utilizando o dispositivo FIA que se mostra na Figura 12. Para realizar os experimentos sobre as diferentes matrices, empregáronse mostras cuxa concentración se determinou previamente por triplicado, facendo uso do método de referencia descrito anteriormente (páxina 86) (Táboa 160). A cantidade de mostra empregada para levar a cabo a optimización do proceso de extracción foi de 60 mg por minicolumna.

**Táboa 160.** Mostras empregadas na optimización do proceso continuo de extracción ácida e concentración de cromo presente nas mesmas.

Tipo de matriz	Mostra coa que se realizou a optimización	[Cr] ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón CRM 278R <sup>a</sup>	$0,78 \pm 0,06^c$
<b>Vexetais</b>	Té NCS DC 73351 <sup>b</sup>	$0,80 \pm 0,02^c$
<b>Carnes</b>	Fígado de coello	$0,92 \pm 0,02$
<b>Froitos secos</b>	Pistachos	$0,76 \pm 0,01$
<b>Legumes</b>	Lentellas	$0,83 \pm 0,01$
<b>Cereais e derivados</b>	Pan relado	$0,85 \pm 0,02$
<b>Queixos e derivados</b>	Queixo relado	$0,86 \pm 0,02$

<sup>a</sup> CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

<sup>b</sup> NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

<sup>c</sup> Concentración certificada

A matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores que toma cada unha das variables en cada experimento e o %Eficacia na extracción obtido en cada caso móstrase na Táboa 161. Os experimentos da matriz realizáronse por duplicado, de xeito que o %Eficacia na extracción indicado é a media de ambos resultados.

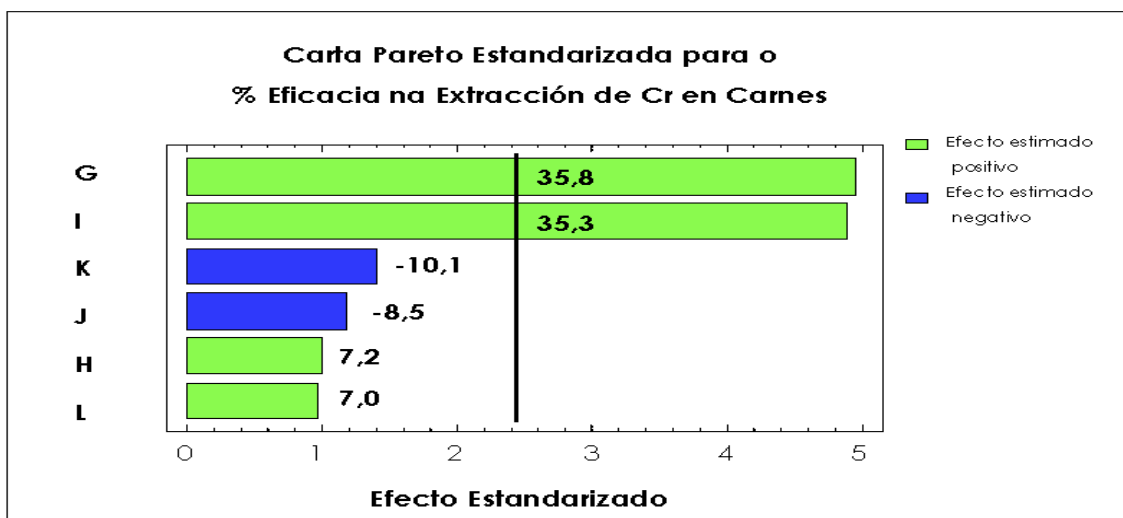
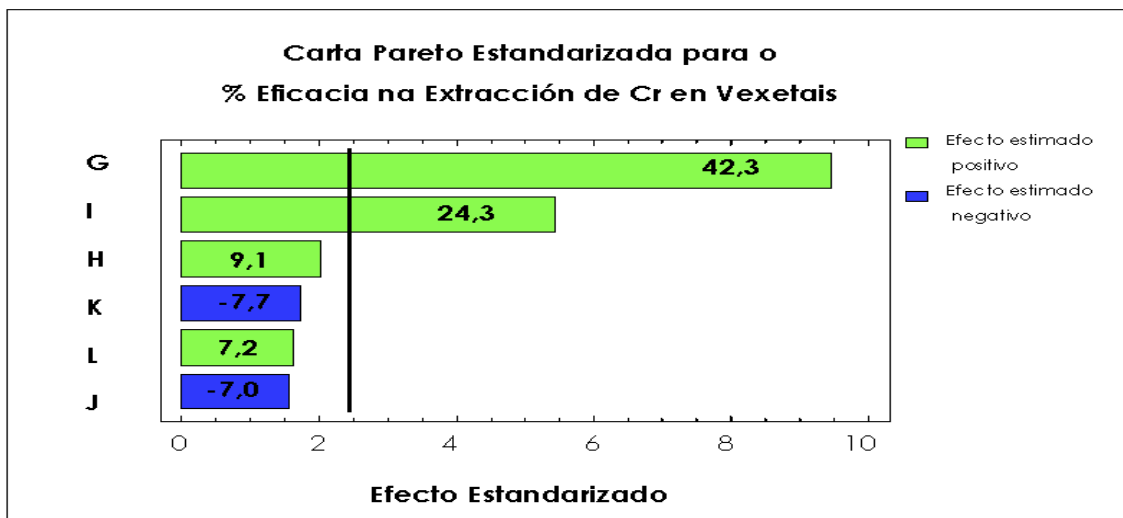
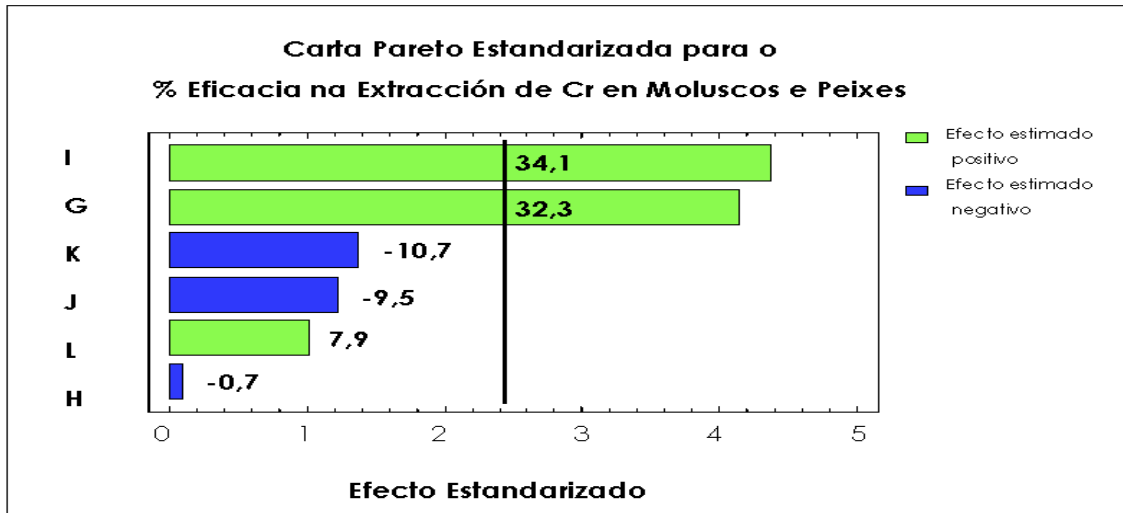
Unha vez realizados os experimentos, procédese á análise dos datos proporcionados polo deseño. Novamente comézase estudiando as **Cartas Pareto Estandarizadas** (Figura 41), para coñecer que variables son estatisticamente significativas e como afectan ó proceso de extracción cromo.

**Táboa 161.** Matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores de cada variable en cada experimento e co % Eficacia na extracción do cromo obtido en cada un deles para cada tipo de mostra.

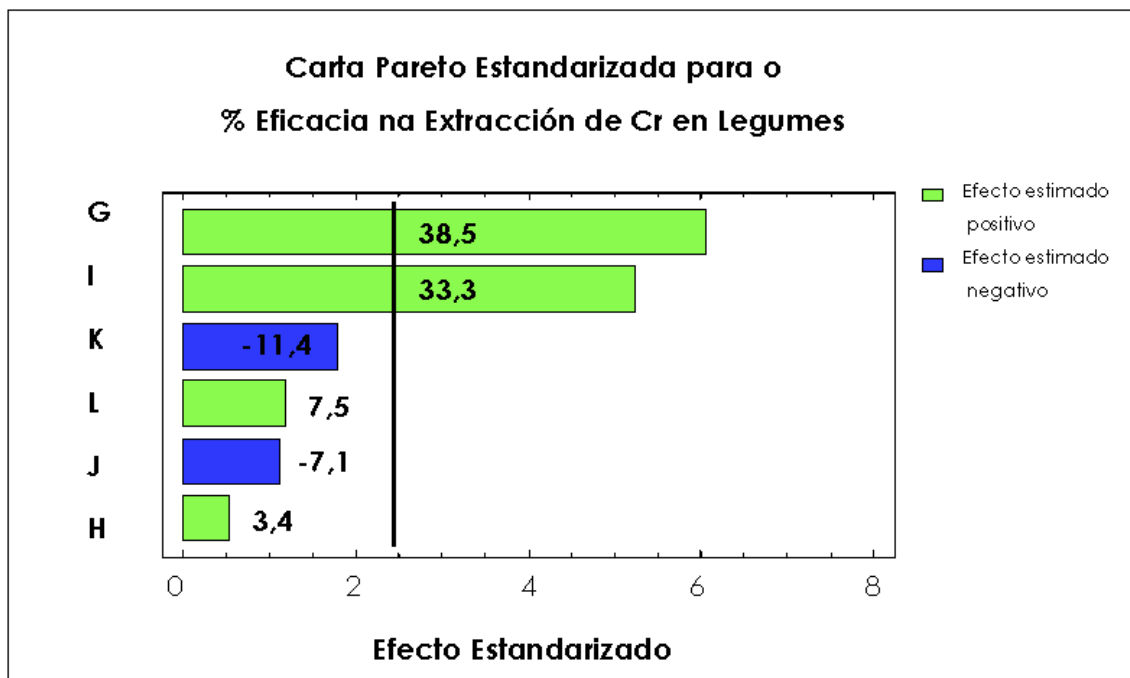
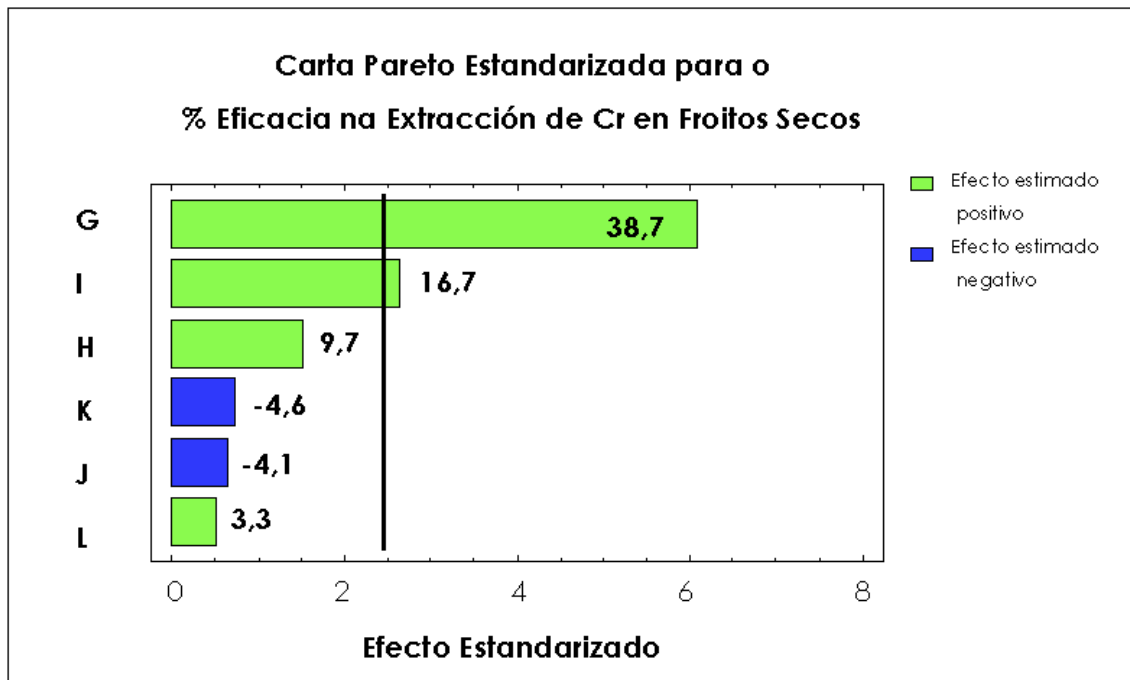
NE	% Eficacia na extracción												
	G	H	I	J	K	L	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
1	3	0	5	2	3,5	20	103,2	99,7	102,4	102,4	103,5	102,4	102,4
2	3	3	0,5	5	3,5	20	49,7	72,7	57,8	87,1	57,4	42,3	99,5
3	0	3	5	2	6	20	53,1	58,9	62,7	70,4	51,9	58,9	65,1
4	3	0	5	5	3,5	70	98,7	101,4	99,8	98,7	102,0	100,8	101,3
5	3	3	0,5	5	6	20	47,3	70,9	55,4	85,6	55,1	39,1	102,0
6	3	3	5	2	6	70	102,4	102,0	101,2	101,5	99,7	98,7	97,8
7	1,5	1,5	2,75	3,5	4,75	45	81,7	81,2	89,1	99,7	82,3	70,0	100,2
8	0	3	5	5	3,5	70	56,8	61,3	65,0	73,6	58,5	65,4	68,3
9	0	0	5	5	6	20	38,6	41,8	38,1	48,7	39,7	30,1	28,9
10	0	0	0,5	5	6	70	31,0	23,2	21,5	39,2	21,5	21,0	23,5
11	3	0	0,5	2	6	70	46,1	72,4	53,9	86,0	53,3	40,3	99,5
12	0	3	0,5	2	3,5	70	39,3	53,6	42,7	55,9	43,0	31,7	33,2
13	0	0	0,5	2	3,5	20	35,0	26,5	25,8	41,1	25,3	24,8	21,6

NE, número de experimento; G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L,

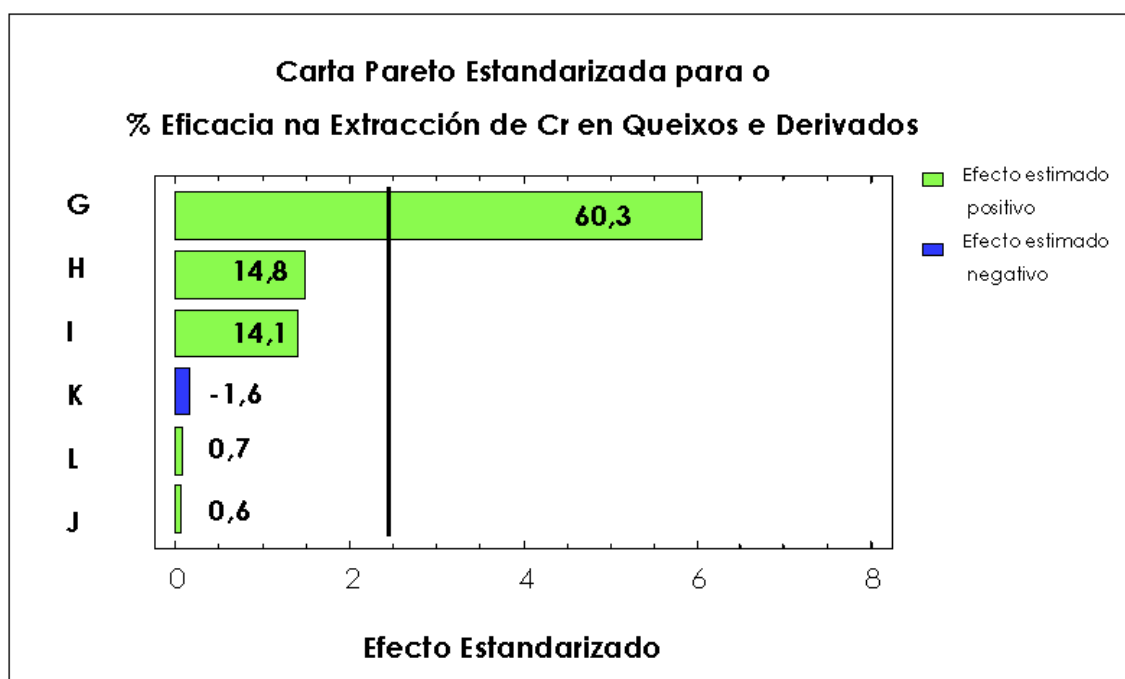
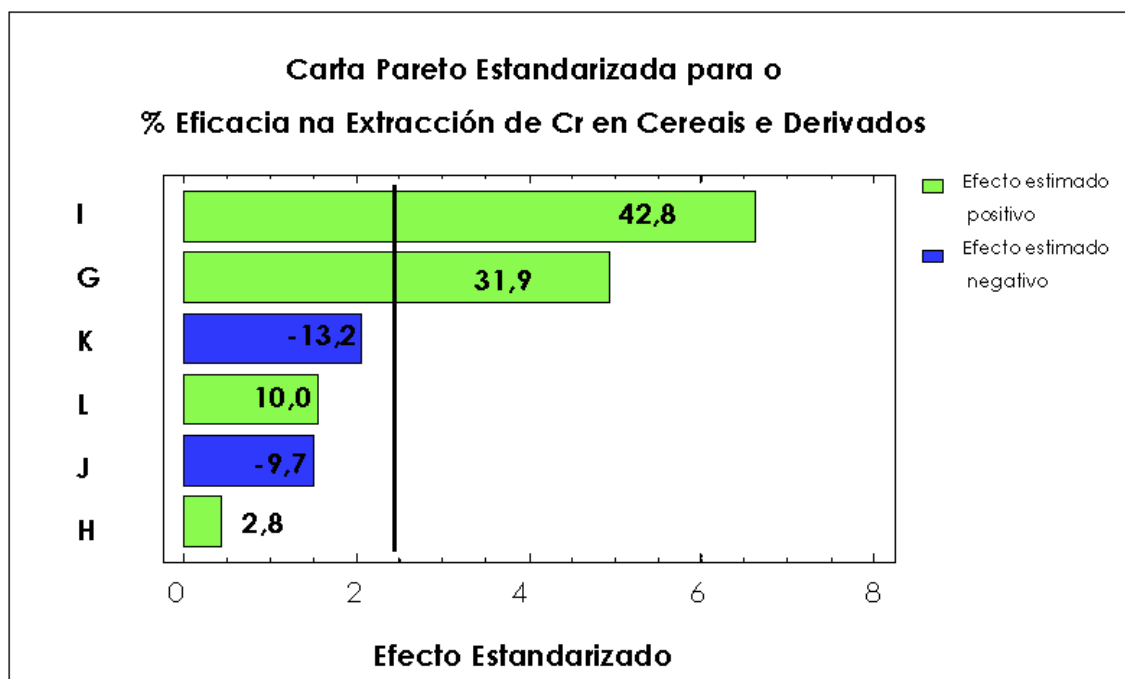
Temperatura de extracción.



**Figura 41.** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



**Figura 41 (Continuación).** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



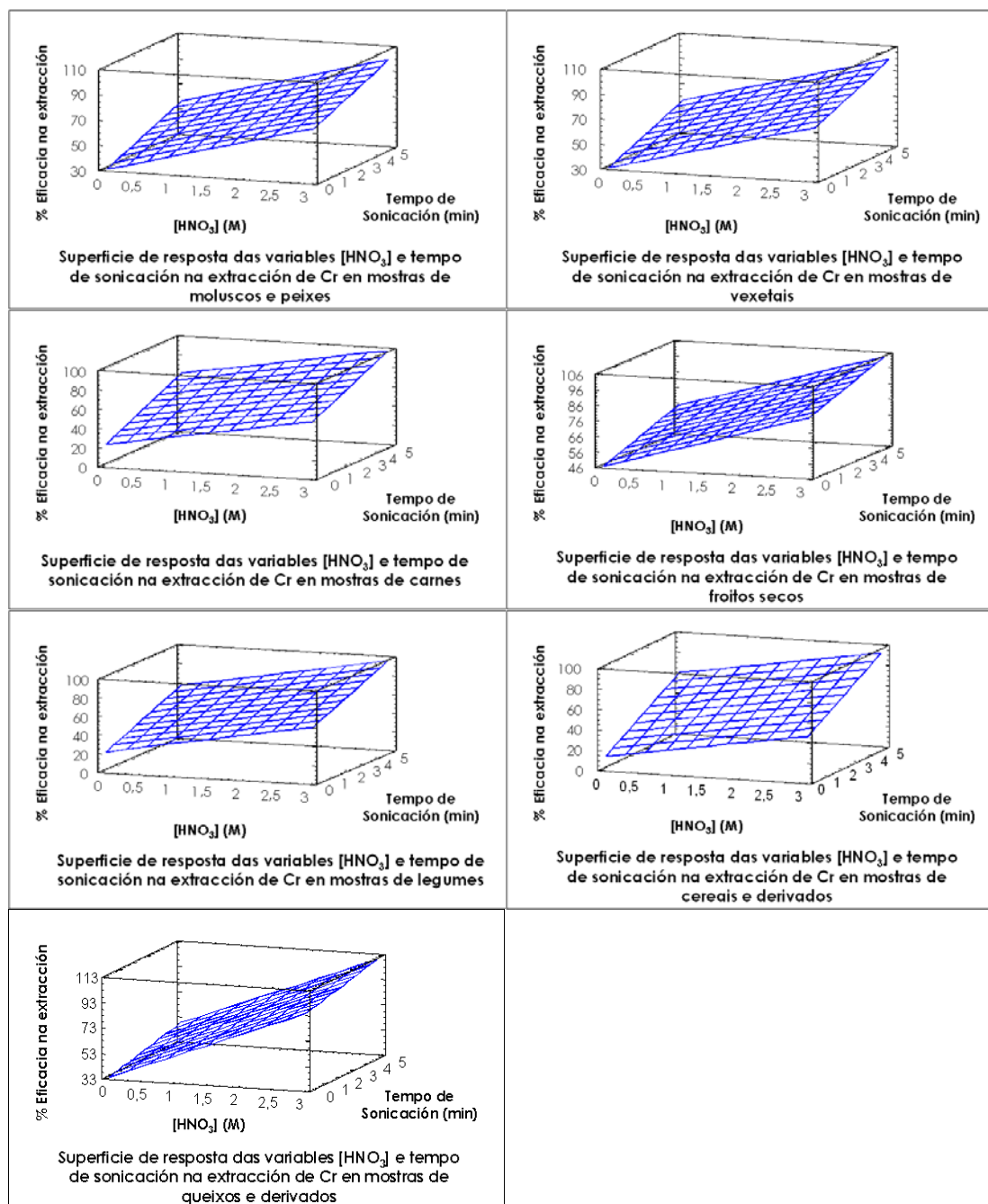
**Figura 41 (Continuación).** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.

### 3.4.1 Análise dos resultados obtidos co deseño factorial

Nos resultados obtidos tras aplicar o deseño factorial de Plackett-Burman á extracción do cromo nos distintos tipos de mostras de alimentos, obsérvase que as variables estatísticamente significativas son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación para tódalas mostras agás para os queixos e derivados, onde só é significativa a variable concentración de ácido nítrico.

As demais variables non son significativas e presentan efectos estimados máis baixos. O comportamento, no referente ó signo dos efectos estimados destas variables non significativas é similar para tódalas mostras. O caudal de extracción afecta negativamente ó proceso de extracción, mentras que a temperatura de extracción o fai de forma positiva. No caso da extracción do cromo en moluscos e peixes, a concentración de ácido clorhídrico presenta un efecto estimado negativo, mentras que no resto de matrices sólidas dito efecto é positivo. O volume de disolución extractante afecta negativamente ó proceso en tódolos casos agás nas mostras de queixos e derivados, onde a súa influencia é positiva.

A Figura 42 recolle os gráficos de superficie de resposta para as variables significativas en cada caso, onde se pode observar como varía o %Eficacia na extracción do cromo en función dos valores que toman ditas variables e mantendo as variables restantes no valor intermedio do intervalo de estudio proposto para o deseño. No caso da extracción do cromo en mostras de queixos e derivados, o gráfico de superficie de resposta que se presenta é o correspondente ás variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación.



**Figura 42.** Superficies de resposta proporcionadas polo deseño de Plackett-Burman para as variables concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación, en cada caso (as demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido polo deseño).

Unha vez analizados os resultados obtidos ó aplicar o deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos das variables establecidos polo mesmo son os que se indican na Táboa 162.

**Táboa 162.** Valores óptimos según o deseño de Plackett-Burman para cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do cromo das diferentes mostras sólidas.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES DACORDO CO DESEÑO DE PLACKETT-BURMAN						
	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
<b>G (M)</b>	3	3	3	3	3	3	3
<b>H (M)</b>	0	3	3	3	3	3	3
<b>I (min)</b>	5	5	5	5	5	5	5
<b>J (mL)</b>	2	2	2	2	2	2	5
<b>K (mL/min)</b>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
<b>L (°C)</b>	70	70	70	70	70	70	70

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Tendo en conta que o deseño de Plackett-Burman non proporciona o valor óptimo das variables, senon a tendencia das mesmas cara o valor óptimo, realizáronse unha serie de experimentos fóra do marco do deseño e dacordo cos resultatos obtidos polo mesmo, para determinar o valor óptimo de cada unha das variables que afectan á extracción do cromo nas diferentes mostras de alimentos.

### 3.4.2 Experimentos fóra do marco do deseño

#### ▪ Experimentos realizados para a optimización da extracción do cromo en mostras de Moluscos e Peixes

A extracción do cromo nas mostras de moluscos e peixes está afectada significativamente por dúas variables: o tempo de sonicación e a concentración de ácido nítrico, tal e como se observou na correspondente Carta Pareto (Figura 41).

En primeiro lugar, estudiáronse as variables con menor importancia no proceso de extracción. Dentro destas variables atópanse o **caudal de extracción**, o **volumen de disolución extractante** e a **concentración de ácido clorhídrico**, con efectos estimados negativos e a **temperatura de extracción**, con efecto estimado positivo. Cando estas variables toman o valor máis baixo do intervalo de estudo establecido no deseño obtéñense %Eficacia na extracción cuantitativos (experimento 1 para o caudal e temperatura de extracción; experimentos 1 e 4 para a concentración de ácido clorhídrico e experimentos 1 e 6 para o volumen de disolución extractante, Táboa 161). Polo tanto, os valores óptimos para estas variables son 3,5 mL/min, 2 mL, 0 M e 20 °C, respectivamente, xa que minimizando estes valores obtéñense resultados satisfactorios e mellóranse as características do proceso.

O **tempo de sonicación** (efecto estimado=34,1) e a **concentración de ácido nítrico** (efecto estimado=32,3) son as variables que afectan significativamente ó proceso de extracción. Co obxectivo de aumentar a frecuencia de mostraxe e diminuír ó máximo a concentración do ácido compoñente da disolución extractante, realizáronse os experimentos que se recollen na Táboa 163. Como pode observarse, para extraer

cuantitativamente o metal son suficientes 2,5 minutos de sonicación. Non obstante, a concentración de ácido nítrico debe manterse en 3 M.

**Táboa 163.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	3	2	3,5	20	98,0
3	0	2	2	3,5	20	84,8
3	0	2,5	2	3,5	20	104,4
2	0	2,5	2	3,5	20	78,6

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos das variables implicadas na extracción do cromo en mostras de moluscos e peixes, unha vez realizados os experimentos fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 164.

**Táboa 164.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cromo nas mostras de moluscos e peixes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2,5 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cromo en mostras de Vexetais**

O estudo fóra do marco do deseño comézase por aquelas variables non significativas. Dentro destas variables, a **concentración de ácido clorhídrico** e a **temperatura de extracción** teñen efectos estimados positivos. Tendo en conta os experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 161), pode concluírse que é posible eliminar o ácido clorhídrico da disolución extractante, posto que se obteñen %Eficacia na extracción cuantitativos. Isto mesmo ocorre cando a extracción se realiza a temperatura ambiente (experimento 1, Táboa 161), de maneira que o valor óptimo para a temperatura de extracción se fixa en 20 °C.

O **caudal de extracción** e o **volumen de disolución extractante** son variables non significativas con efectos estimados negativos. Cando o volumen de disolución extractante toma o valor máis baixo do intervalo de estudio establecido no deseño obtéñense %Eficacia na extracción cuantitativos (experimentos 1 e 6 da matriz de Plackett-Burman, Táboa 161). Tendo en conta que o volumen de extracto se preconcentrará posteriormente a un caudal máximo de 1,5 mL/min, resulta convinte seleccionar o volumen de 2 mL como valor óptimo para esta variable. Con respecto ó caudal de extracción hai que dicir que canto maior sexa o valor desta variable, maior será a compactación da mostra dentro da minicolumna, e polo tanto, xenerarase unha maior presión no sistema FIA. Posto que un caudal de 3,5 mL/min proporciona extraccións cuantitativas (experimento 1 da matriz de Plackett-Burman, Táboa 161), elíxese dito valor como valor óptimo para esta variable.

As variables significativas son, como no caso anterior, a **concentración de ácido nítrico** (efecto estimado=42,3) e o **tempo de sonicación** (efecto

estimado=24,3). Realizáronse unha serie de experimentos co obxectivo de reducir os valores destas variables proporcionados polo deseño, para lograr así unha maior frecuencia de mostraxe e suavizar as condicións ácidas da extracción. A Táboa 165 recolle os resultados deste estudo.

**Táboa 165.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	102,8
3	0	1	2	3,5	20	104,6
3	0	0,5	2	3,5	20	72,6
2	0	1	2	3,5	20	85,2

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Unha vez optimizadas todas as variables, según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do cromo nas mostras de vexetais recóllense na Táboa 166.

**Táboa 166.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cromo nas mostras de vexetais.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cromo en mostras de Carnes**

Novamente, as variables estatísticamente significativas son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación.

O estudio fóra do marco do deseño comezouse polas variables con menor importancia no proceso de extracción. O **caudal de extracción** e o **volumen de disolución extractante** son as variables non significativas con maior efecto estimado (-10,1 e -8,5). A influencia das mesmas na extracción é negativa, é dicir, canto menor sexa o valor destas variables, dentro do intervalo estudado, máis favorecido se verá o proceso de extracción. Dende o punto de vista de mellorar as características de dito proceso, interesa minimizar os valores destas variables, posto que se producirá unha menor presión no sistema FIA e se aumentará a frecuencia de mostraxe. Tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 161), onde estas variables toman o valor máis baixo do intervalo proposto para o deseño e se obtén un %Eficacia na extracción cuantitativo, os valores óptimos para estas dúas variables fíxanse en 3,5 mL/min e 2 mL.

A variable **concentración de ácido clorhídrico** ten un efecto estimado positivo (efecto estimado=7,2). Tendo en conta os experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 161), onde se obteñen %Eficacia na extracción cuantitativos cando esta variable toma o valor de 0 M, pode concluirse que é posible eliminar este compoñente da disolución extractante.

A variable **temperatura de extracción** é a variable con menor importancia dende o punto de vista estatístico e ten un efecto estimado positivo (efecto estimado=7,0). No experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 161) onde se realiza a extracción a temperatura ambiente, obtense un %Eficacia

na extracción cuantitativo, de xeito que se elixe como temperatura óptima de extracción o valor de 20 °C.

Con respecto ás variables **concentración de ácido nítrico** e **tempo de sonicación**, ambas variables significativas e con efectos estimados positivos e similares (35,8 e 35,3, respectivamente) estúdiouse fóra do marco do deseño a posibilidade de minimizar os seus valores. Na Táboa 167 recóllese o resultado deste estudio.

**Táboa 167.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	100,8
3	0	1,5	2	3,5	20	81,1
2	0	2	2	3,5	20	92,4

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Como se observa na táboa, é posible reducir o tempo de sonicación a 2 minutos mentras que a concentración de ácido nítrico se ten que manter no valor máis alto do intervalo proposto para o deseño, para que a extracción sexa cuantitativa.

Os valores óptimos das variables implicadas na extracción do cromo en mostras de carnes, unha vez realizados os experimentos fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 168.

**Táboa 168.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cromo nas mostras de carnes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cromo en mostras de Froitos secos**

A extracción de cromo en mostras de froitos secos tamén está afectada significativamente pola concentración de ácido nítrico e polo tempo de sonicación.

Con respecto ás variables non significativas **concentración de ácido clorhídrico** e **temperatura de extracción**, observouse que eliminando o ácido clorhídrico da disolución extractante e realizando a extracción a temperatura ambiente o %Eficacia na extracción resultou cuantitativo (experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman, Táboa 161). Debido a que os resultados son satisfactorios e que ó minimizar os valores destas variables se simplifica o proceso de extracción, xa que se pode realizar a temperatura ambiente e sen ácido clorhídrico, os valores destas variables fíxanse en 0 M e 20 °C.

O **caudal de extracción** e o **volume de disolución extractante** son as outras variables non significativas. Os efectos estimados das mesmas son negativos (-4,6 e -4,1, respectivamente). Dende o punto de vista de mellorar as características do proceso, interesa minimizar os valores destas variables, xa que así se produce unha menor presión no sistema FIA e se incrementa a

frecuencia de mostraxe. Tendo en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 161), onde se realiza a extracción a un caudal de 3,5 mL/min, e os experimentos 1 e 6 da mesma matriz, onde se emprega un volume de disolución extractante de 2 mL, poden seleccionarse estes valores como os valores óptimos de ditas variables, xa que o %Eficacia na extracción obtido en cada caso é cuantitativo.

As variables estatisticamente significativas, **concentración de ácido nítrico** e **tempo de sonicación**, teñen efectos estimados positivos (38,7 e 16,7). A pesar disto, estúdiouse a posibilidade de diminuír os valores destas variables proporcionados polo deseño. Dos resultados obtidos e recollidos na Táboa 169 pode concluirse que unha concentración de ácido nítrico 1 M e un tempo de sonicación de 1 minuto son suficientes para realizar a extracción de forma cuantitativa.

**Táboa 169.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	1	2	3,5	20	102,9
3	0	0,5	2	3,5	20	90,1
1,5	0	1	2	3,5	20	103,2
1	0	1	2	3,5	20	100,3
0,5	0	1	2	3,5	20	87,5

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos das variables implicadas na extracción do cromo en mostras de froitos secos, unha vez realizados os experimentos fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 170.

**Táboa 170.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cromo nas mostras de froitos secos.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cromo en mostras de Legumes**

A extracción de cromo en mostras de legumes está afectada significativamente pola concentración de ácido nítrico e polo tempo de sonicación, tal como se pode observar na Carta Pareto correspondente (Figura 41).

Con respecto ás variables non significativas **caudal de extracción e volume de disolución extractante**, obsérvase nos experimentos da matriz do deseño 1 e 1 e 6, respectivamente (Táboa 161) que establecendo os valores destas variables nos límites inferiores do intervalo estudado (3,5 mL/min e 2 mL) se obteñen %Eficacia na extracción cuantitativos. Polo tanto, estes serán os valores óptimos considerados para estas variables.

A **temperatura de extracción** é outra das variables non significativas e ten un efecto estimado positivo (efecto estimado=7,5). Tendo en conta o

experimento 1 da matriz do deseño (Táboa 161), onde se realiza a extracción a temperatura ambiente e se obtén un %Eficacia na extracción cuantitativo, o valor óptimo desta variables fíxase en 20 °C. Deste xeito, simplifícase a análise, xa que se evita a necesidade de quentar previamente a auga do equipo de ultrasóns.

A **concentración de ácido clorhídrico** é a variable con menor importancia no proceso de extracción. A pesar de que súa influencia no proceso é positiva (efecto estimado=3,4), é posible eliminar este compoñente da disolución extractante, como pode observarse nos experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 161).

Con respecto ás variables estatisticamente significativas, **concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación**, estudiouse a posibilidade de minimizar os valores das mesmas. Como pode observarse na Táboa 171, onde se recollen os resultados dos experimentos fóra do marco do deseño, é posible realizar a extracción do cromo das mostras de legumes de forma cuantitativa con tan só 2 minutos de sonicación. O valor da concentración de ácido nítrico non se pode reducir.

**Táboa 171.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	99,2
3	0	1,5	2	3,5	20	62,6
1,5	0	2	2	3,5	20	75,5

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos das variables implicadas na extracción do cromo en mostras de legumes, unha vez realizados os experimentos fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 172.

**Táboa 172.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cromo nas mostras de legumes

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cromo en mostras de Cereais e derivados**

Na extracción do cromo nas mostras de cereais e derivados obsérvase, ó igual que nos outros casos, que as variables estatisticamente significativas son o tempo de sonicación (efecto estimado=42,8) e a concentración de ácido nítrico (efecto estimado=31,9).

Dentro das variables non significativas, o **caudal de extracción** e a **temperatura de extracción** son as que teñen os maiores efectos estimados, negativo e positivo, respectivamente. No experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 161) obsérvase que cando estas variables toman o valor máis baixo do intervalo de estudo proposto para o deseño, 3,5 mL/min e 20 °C, respectivamente, os %Eficacia na extracción son cuantitativos. Estes valores permiten mellorar as características do proceso, posto que a extracción se pode realizar a temperatura ambiente e a presión xenerada no sistema FIA é

mínima, de maneira que se elixen ditos valores como os valores óptimos para estas variables.

O **volumen de disolución extractante** ten efecto estimado negativo (efecto estimado=-9,7). Posto que o extracto ácido será preconcentrado posteriormente a un caudal máximo de 1,5 mL/min, interesa minimizar o valor desta variable. Tendo en conta os experimentos 1 e 6 da matriz do deseño (Táboa 161), onde se obteñen %Eficacia na extracción cuantitativos, cando esta variable toma o valor inferior do intervalo de estudio proposto para o deseño, selecciónase como valor óptimo o volumen de disolución extractante de 2 mL.

A **concentración de ácido clorhídrico** é a variable con menor influencia no proceso de extracción e ten un efecto estimado positivo (efecto estimado=2,8). A pesar disto e tendo en conta os experimentos 1 e 4 da matriz do deseño (Táboa 161), pode eliminarse este compoñente da disolución extractante.

Con respecto ás variables estatísticamente significativas, **tempo de sonicación** e **concentración de ácido nítrico**, estúdiouse a posibilidade de reducir o valor das mesmas proposto polo deseño (5 minutos e 3 M, respectivamente). A Táboa 173 recolle o resultado de dito estudio. Como pode observarse, son necesarios 2,5 minutos de extracción e unha concentración de ácido nítrico 3 M para que a extracción sexa cuantitativa.

Os valores óptimos das variables implicadas na extracción do cromo en mostras de cereais e derivados, unha vez realizados os experimentos fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 174.

**Táboa 173.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	3	2	3,5	20	102,6
3	0	2	2	3,5	20	59,3
3	0	2,5	2	3,5	20	102,0
1,5	0	2,5	2	3,5	20	70,0

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

**Táboa 174.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cromo nas mostras de cereais e derivados.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2,5 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do cromo en mostras de Queixos e derivados**

Neste caso a única variable estatisticamente significativa é a concentración de ácido nítrico, cun efecto estimado moi elevado (60,3).

Dentro das variables non significativas, a **concentración de ácido clorhídrico** e o **tempo de sonicación** son as que teñen unha maior importancia no proceso de extracción do cromo. No experimento 11 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 161), onde ambas variables toman o menor valor do intervalo de estudio proposto para o deseño, obtense un %Eficacia na extracción

cuantitativo, de maneira que se poden fixar os valores óptimos destas variables en 0 M e 0,5 minutos. Conséguese simplificar a análise ó eliminar un compoñente da disolución extractante e obter a maior frecuencia de mostraxe, posto que a extracción se realiza en tan só medio minuto.

O **caudal de extracción** é a única variable que inflúe negativamente no proceso de extracción. Tendo en conta que ó caudal de extracción de 3,5 mL/min se obtiveron %Eficacias na extracción cuantitativos (experimentos 1, 2 e 4 da matriz do deseño), selecciónase dito valor como óptimo para esta variable.

As variables **temperatura de extracción** e **volumen de disolución extractante** son as variables que teñen menor importancia no proceso de extracción do cromo das mostras de queixos e derivados. Ambas teñen efectos estimados positivos (0,7 e 0,6, respectivamente). Dende o punto de vista da simplificación da análise, interesa traballar a temperatura ambiente, evitándose así a necesidade de quentar a auga do ultrasóns e de operar cun extracto ácido quente. Dende o punto de vista da rapidez da análise, interesa traballar co menor volumen de disolución extractante, xa que así se diminuírá o tempo da preconcentración. Tendo en conta os experimentos 1, 2 e 5 da matriz do deseño (para a temperatura de extracción) e os experimentos 1, 6 e 11 da mesma matriz (para o volumen de disolución extractante) onde se obtiveron % Eficacias na extracción cuantitativas, os valores óptimos destas variables poden fixarse en 20 °C e 2 mL.

Con respecto á **concentración de ácido nítrico**, a única variable estatisticamente significativa, estúdiouse a posibilidade de reducir o valor da mesma proporcionado polo deseño (3 M). A Táboa 175 recolle o resultado deste estudio. Como pode observarse, é suficiente unha concentración de

ácido nítrico 1 M para extraer cuantitativamente o cromo das mostras de queixos e derivados.

**Táboa 175.** Experimentos realizados para a optimización da concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
1,5	0	0,5	2	3,5	20	97,4
1	0	0,5	2	3,5	20	104,1
0,5	0	0,5	2	3,5	20	48,0

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos das variables implicadas na extracción do cromo en mostras de queixos e derivados, unha vez realizados os experimentos fóra do marco do deseño, recóllense na Táboa 176.

**Táboa 176.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do cromo nas mostras de queixos e derivados.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	0,5 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

A Táboa 177 recolle un resume dos valores óptimos para tódalas variables implicadas no proceso de extracción do cromo nos diferentes tipos de mostras de alimentos.

**Táboa 177.** Valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do cromo das diferentes mostras de alimentos.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES IMPLICADAS NA EXTRACCIÓN DO CROMO DAS DIFERENTES MOSTRAS DE ALIMENTOS						
	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
<b>G (M)</b>	3	3	3	1	3	3	1
<b>H (M)</b>	0	0	0	0	0	0	0
<b>I (min)</b>	2,5	1	2	1	2	2,5	0,5
<b>J (mL)</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>K (mL/min)</b>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
<b>L (°C)</b>	20	20	20	20	20	20	20

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Á vista dos valores óptimos obtidos para a extracción do cromo nos diferentes tipos de mostras, pode concluírse que é posible eliminar o ácido clorhídrico da disolución extractante en tódolos casos, sendo suficiente para extraer o metal o ácido nítrico, en diferentes concentracións: 3 M para tódalas mostras, excepto para os froitos secos e os queixos e derivados, onde a concentración requirida é menor (1 M).

Con respecto ó tempo de sonicación, obsérvase que para as mostras de vexetais e froitos secos é necesario tan só 1 minuto para extraer o cromo. No caso das mostras de carnes e legumes, requírense 2 minutos de sonicación, e para os moluscos e peixes e cereais e derivados, 2,5 minutos. As mostras que requiren do menor tempo de sonicación son os queixos e derivados, lográndose a extracción cuantitativa do metal en tan só 0,5 minutos.

No referente ás variables volume de disolución extractante, caudal de extracción e temperatura de extracción, pode observarse que toman o mesmo valor óptimo en tódolos tipos de mostras: 2 mL, 3,5 mL/min e 20 °C.

### **3.4.3 Estudio da cantidade de mostra**

Nas extraccións de cromo realizadas ata o momento as cantidades de mostra empregadas foron de 60 mg. Non obstante, estúdiouse a posibilidade de utilizar cantidades de mostra maiores, para poder mellorar as características analíticas do proceso e analizar mostras con concentracións de cromo menores. Así, estúdiouse a posibilidade de aumentar a cantidade de mostra ata un máximo de 100 mg, xa que utilizar cantidades maiores provoca grandes presións no sistema FIA que fan inviable a análise.

O aumento da cantidade de mostra mantendo os valores óptimos das variables implicadas no proceso de extracción do cromo non foi posible en ningún dos tipos de mostra.

### **3.4.4 Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra**

Ata o momento, tódolos estudos levados a cabo se realizaron con mostras de diámetro de partícula inferior a 30  $\mu\text{m}$ . Posto que resulta de interés coñecer se o tamaño de partícula da mostra inflúe no proceso de extracción, tomáronse fraccións de mostras representativas de cada matriz alimenticia dos seguintes tamaños: inferior a 30  $\mu\text{m}$  e intermedios entre 30 e 100  $\mu\text{m}$ .

Para cada fracción de cada mostra, realizouse a análise seguindo o método de referencia descrito anteriormente (páxina 86) e mediante as diferentes metodoloxías propostas. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 178.

Pode concluirse, polo tanto, que o tamaño de partícula da mostra non inflúe na extracción do cromo das diferentes mostras de alimentos, dentro do intervalo estudiado.

**Táboa 178.** Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra utilizando o método de referencia e as metodoloxías continuas propostas. Indícase tamén a eficacia na extracción do sistema FIA.

Tipo de mostra	Mostra analizada	Tamaño de partícula	[Cr] <sub>A</sub> (µg/g)	[Cr] <sub>B</sub> (µg/g)	% Eficacia na extracción
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón	< 30 µm	0,77 ± 0,02	0,80 ± 0,01	103,9
		30-100 µm	0,71 ± 0,03	0,74 ± 0,04	104,2
<b>Vexetais</b>	Grelas	< 30 µm	0,70 ± 0,05	0,67 ± 0,01	95,7
		30-100 µm	0,67 ± 0,03	0,67 ± 0,04	100,0
<b>Carnes</b>	Fígado de coello	< 30 µm	0,92 ± 0,02	0,90 ± 0,01	97,8
		30-100 µm	0,82 ± 0,02	0,83 ± 0,02	101,2
<b>Froitos secos</b>	Pistachos	< 30 µm	0,76 ± 0,01	0,76 ± 0,01	100,0
		30-100 µm	0,75 ± 0,03	0,76 ± 0,02	101,3
<b>Legumes</b>	Lentellas	< 30 µm	0,83 ± 0,01	0,82 ± 0,01	98,8
		30-100 µm	0,78 ± 0,02	0,77 ± 0,01	98,7
<b>Cereais e derivados</b>	Pan relado	< 30 µm	0,85 ± 0,02	0,86 ± 0,01	101,2
		30-100 µm	0,85 ± 0,02	0,87 ± 0,01	102,4
<b>Queixos e derivados</b>	logurt natural	< 30 µm	0,73 ± 0,02	0,71 ± 0,02	97,3
		30-100 µm	0,70 ± 0,01	0,70 ± 0,01	100,0

<sup>A</sup> [Cr] obtida mediante o método de referencia

<sup>B</sup> [Cr] obtida mediante os métodos continuos propostos

### 3.5 Extracción do níquel

Para optimizar o proceso de extracción do níquel empregouse o deseño factorial de Plackett-Burman  $2^{6*3/16}$  de resolución tipo III con 6 graos de liberdade e un punto central. Na Táboa 102 recóllense as variables que afectan ó proceso de extracción ácida do níquel, así como os valores máximos e mínimos fixados para as mesmas, dacordo con experimentos realizados previamente.

Unha vez obtida a matriz do deseño (Táboa 101) realizáronse os 13 experimentos indicados na mesma, utilizando o dispositivo FIA que se mostra na Figura 12. Para realizar os experimentos sobre as diferentes matrices, empregáronse mostras cuxa concentración se determinou previamente por triplicado, facendo uso do método de referencia descrito anteriormente (páxina 86) (Táboa 141). A cantidade de mostra empregada para levar a cabo a optimización do proceso de extracción foi de 60 mg por minicolumna.

**Táboa 179.** Mostras empregadas na optimización do proceso continuo de extracción ácida e concentración de níquel presente nas mesmas.

Tipo de matriz	Mostra coa que se realizou a optimización	[Ni] ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón	$0,80 \pm 0,01$
<b>Vexetais</b>	Leituga	$0,97 \pm 0,02$
<b>Carnes</b>	Fígado de coello	$0,91 \pm 0,01$
<b>Froitos secos</b>	Castañas	$0,90 \pm 0,01$
<b>Legumes</b>	Lentellas	$0,86 \pm 0,01$
<b>Cereais e derivados</b>	Cereais de cacao	$0,78 \pm 0,01$
<b>Queixos e derivados</b>	Tranchetes	$0,61 \pm 0,01$

A matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores que toma cada unha das variables en cada experimento e o %Eficacia na extracción obtido en

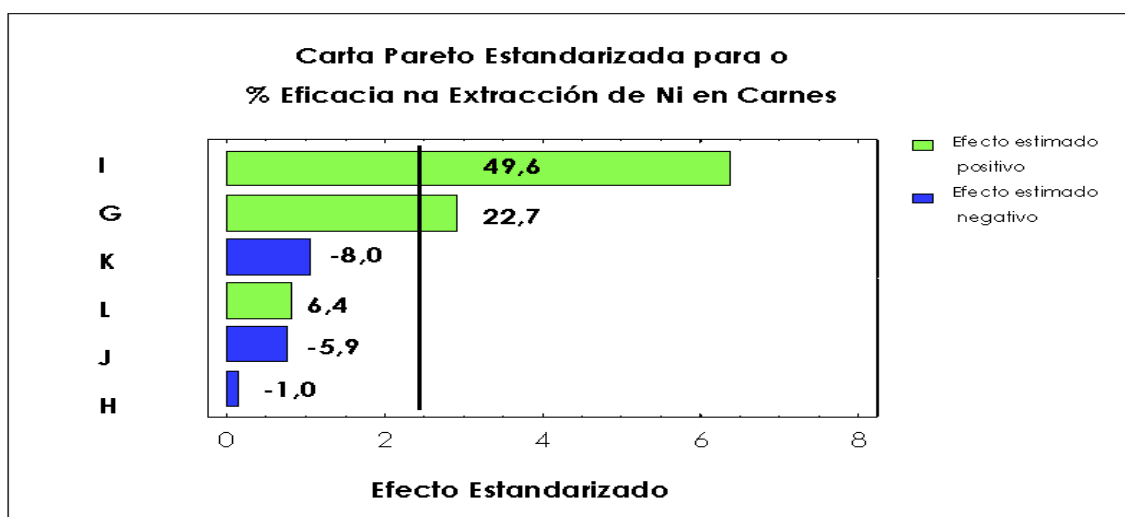
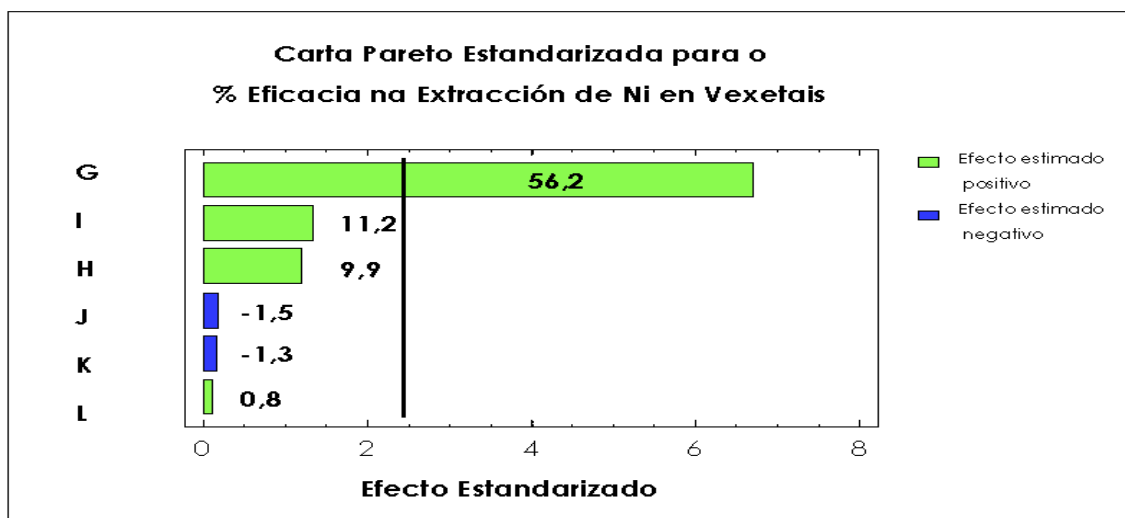
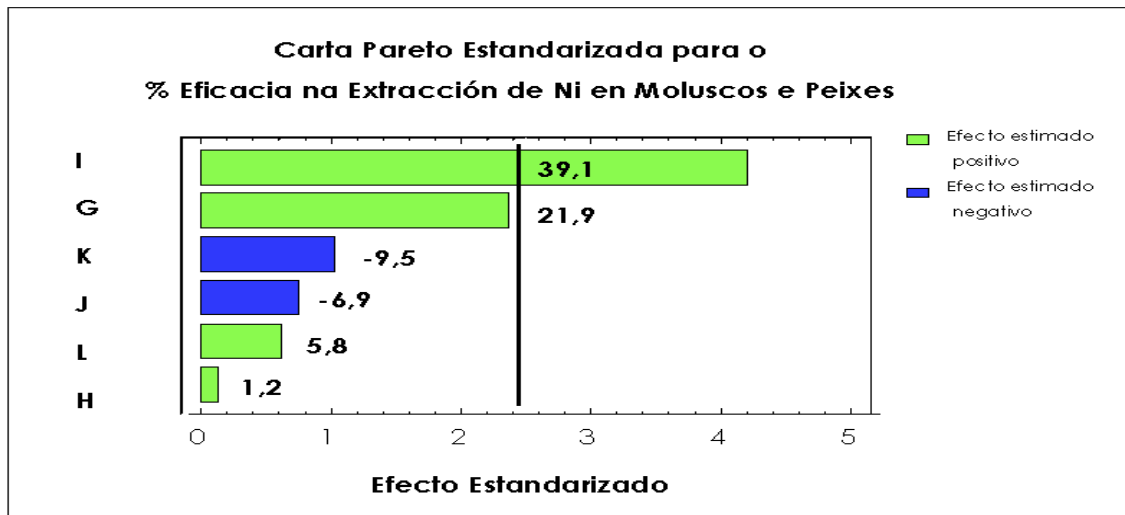
cada caso móstrase na Táboa 180. Os experimentos da matriz realizáronse por duplicado, de xeito que o %Eficacia na extracción indicado é a media de ambos resultados.

Unha vez realizados os experimentos procedeuse á análise dos datos proporcionados polo deseño. Para iso, é preciso coñecer que variables son estatisticamente significativas e como afectan ó proceso de extracción, para o cal se recorre ás **Cartas Pareto estandarizadas** para cada tipo de mostra, que se recollen na Figura 43.

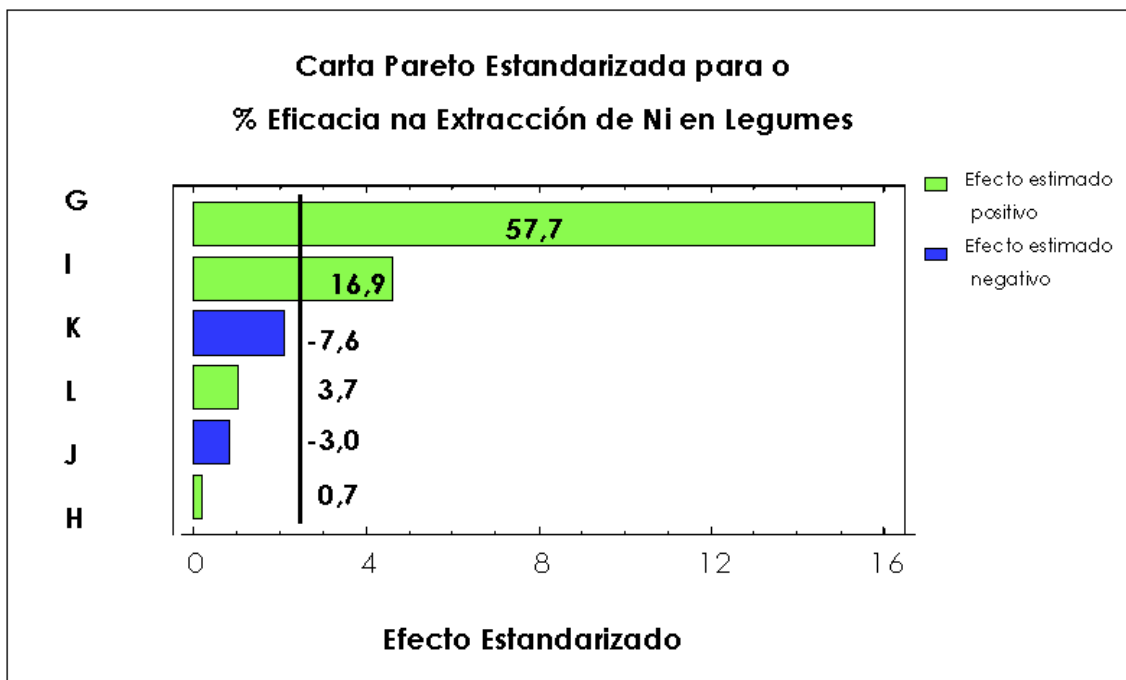
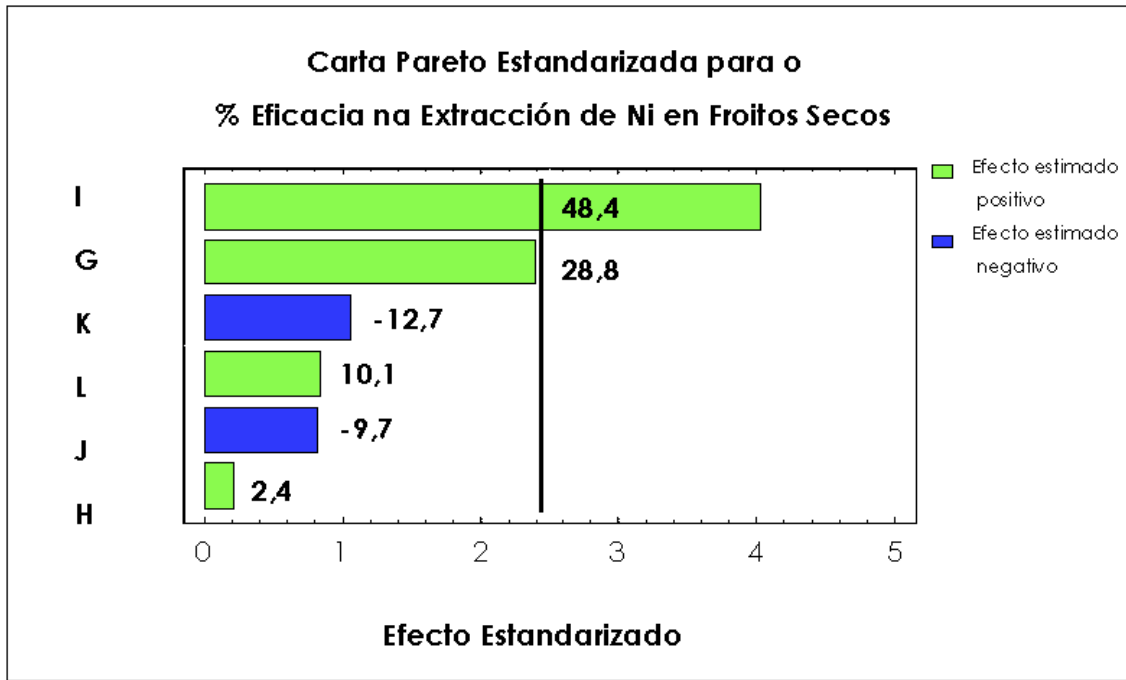
**Táboa 180.** Matriz do deseño de Plackett-Burman cos valores de cada variable en cada experimento e co % Eficacia na extracción do níquel obtido en cada un deles para cada tipo de mostra.

NE	% Eficacia na extracción												
	G	H	I	J	K	L	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e Queixos e derivados	
1	3	0	5	2	3,5	20	101,3	102,1	101,2	101,3	103,2	102,2	103,1
2	3	3	0,5	5	3,5	20	49,8	99,5	39,6	37,2	79,4	41,0	99,4
3	0	3	5	2	6	20	68,5	61,2	68,1	64,2	36,2	59,7	58,4
4	3	0	5	5	3,5	70	98,9	99,8	102,0	102,1	103,9	101,1	101,3
5	3	3	0,5	5	6	20	46,2	97,8	36,1	33,0	76,3	38,7	102,0
6	3	3	5	2	6	70	100,2	100,5	99,8	100,1	99,7	99,6	98,7
7	1,5	1,5	2,75	3,5	4,75	45	97,7	101,3	87,8	98,4	71,3	85,2	100,1
8	0	3	5	5	3,5	70	71,1	64,8	70,1	68,1	39,5	62,4	62,3
9	0	0	5	5	6	20	51,1	39,5	55,8	31,0	30,6	48,0	49,5
10	0	0	0,5	5	6	70	36,0	28,3	26,7	21,1	23,8	26,4	41,9
11	3	0	0,5	2	6	70	43,3	103,1	37,5	34,1	73,1	37,5	97,9
12	0	3	0,5	2	3,5	70	41,7	40,1	31,3	26,2	33,5	31,7	46,2
13	0	0	0,5	2	3,5	20	39,7	31,9	28,1	24,6	25,7	28,8	47,0

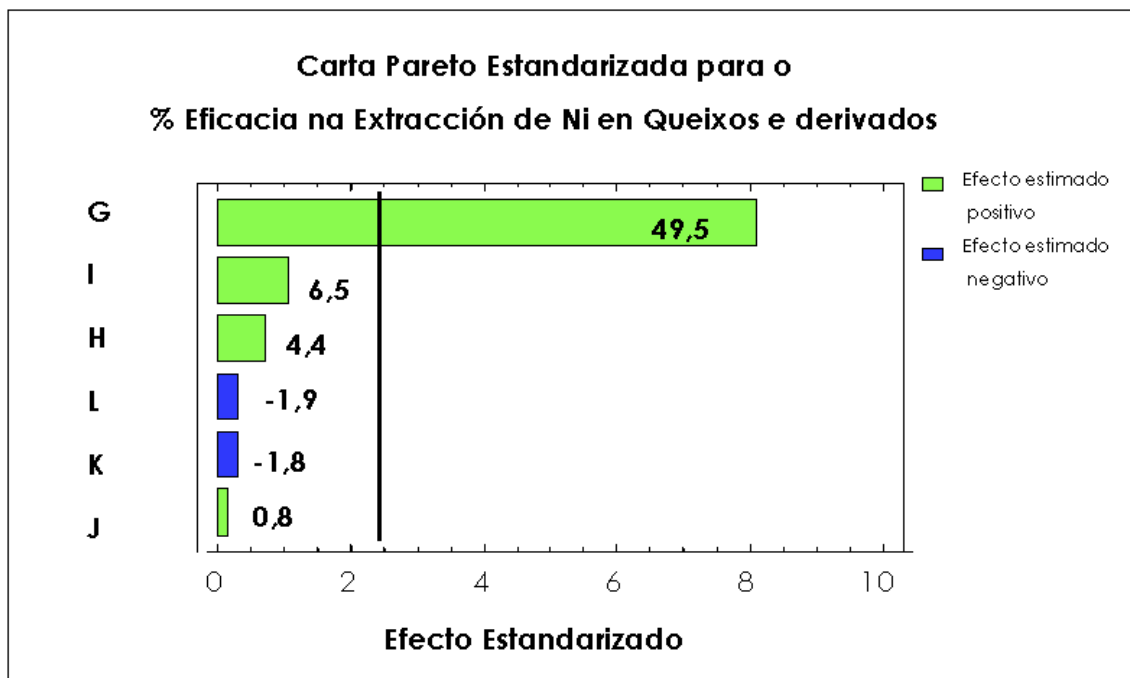
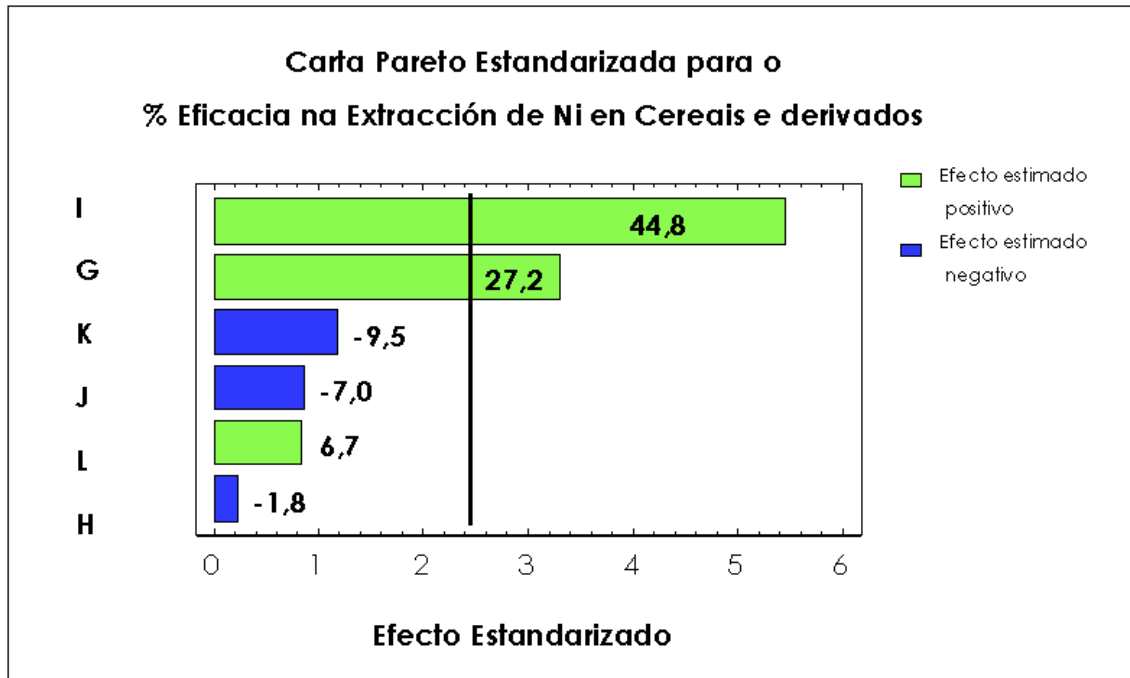
NE, número de experimento; G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



**Figura 43.** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estadística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



**Figura 43 (Continuación).** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.



**Figura 43 (Continuación).** Carta Pareto estandarizada dos efectos principais estandarizados no deseño factorial; a liña vertical indica o límite de significación estatística para os efectos. G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, Tempo de sonicación; J, Volume de disolución extractante; K, Caudal de extracción; L, Temperatura de extracción.

### 3.5.1 Análise dos datos obtidos co deseño factorial

Nos resultados obtidos tras aplicar o deseño factorial de Plackett-Burman á extracción do níquel nos diferentes tipos de mostras, obsérvase que as variables de maior influencia no proceso son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación. Ambas variables influen no mesmo de forma positiva. Non obstante, como se pode ver nas Cartas Pareto proporcionadas polo deseño para cada tipo de mostra (Figura 43), estas dúas variables só son estatisticamente significativas nas extracción do metal nas mostras de carnes, legumes e cereais e derivados. No caso das mostras de vexetais e queixos e derivados, a única variable estatisticamente significativa é a concentración de ácido nítrico, mentras que no caso dos moluscos e peixes e froitos secos, só é significativa a variable tempo de sonicación. Na Figura 44 móstranse as superficies de resposta para as variables de maior influencia estatística en cada caso, onde se pode observar como varía o %Eficacia na extracción do níquel en función de ditas variables (o resto mantéñense no valor intermedio do intervalo de estudio proposto para o deseño).

As demais variables teñen unha maior ou menor importancia no proceso de extracción, pero sen superar o nivel de significación establecido polo método para un 95 % de confianza (representado nas Cartas Pareto pola liña vertical). Dentro destas variables non significativas, o caudal de extracción e o volume de disolución extractante presentan efectos estimados negativos en tódolos casos excepto nos queixos e derivados, onde a variable volume de disolución extractante toma un valor positivo. A concentración de ácido clorhídrico presenta un efecto estimado negativo no caso das mostras de carnes e cereais e derivados, e positivo no resto das mostras de alimentos. Con respecto á temperatura de extracción, hai que dicir que afecta ó proceso de

forma positiva en tódolos casos, excepto nos queixos e derivados, onde dita influencia é negativa.

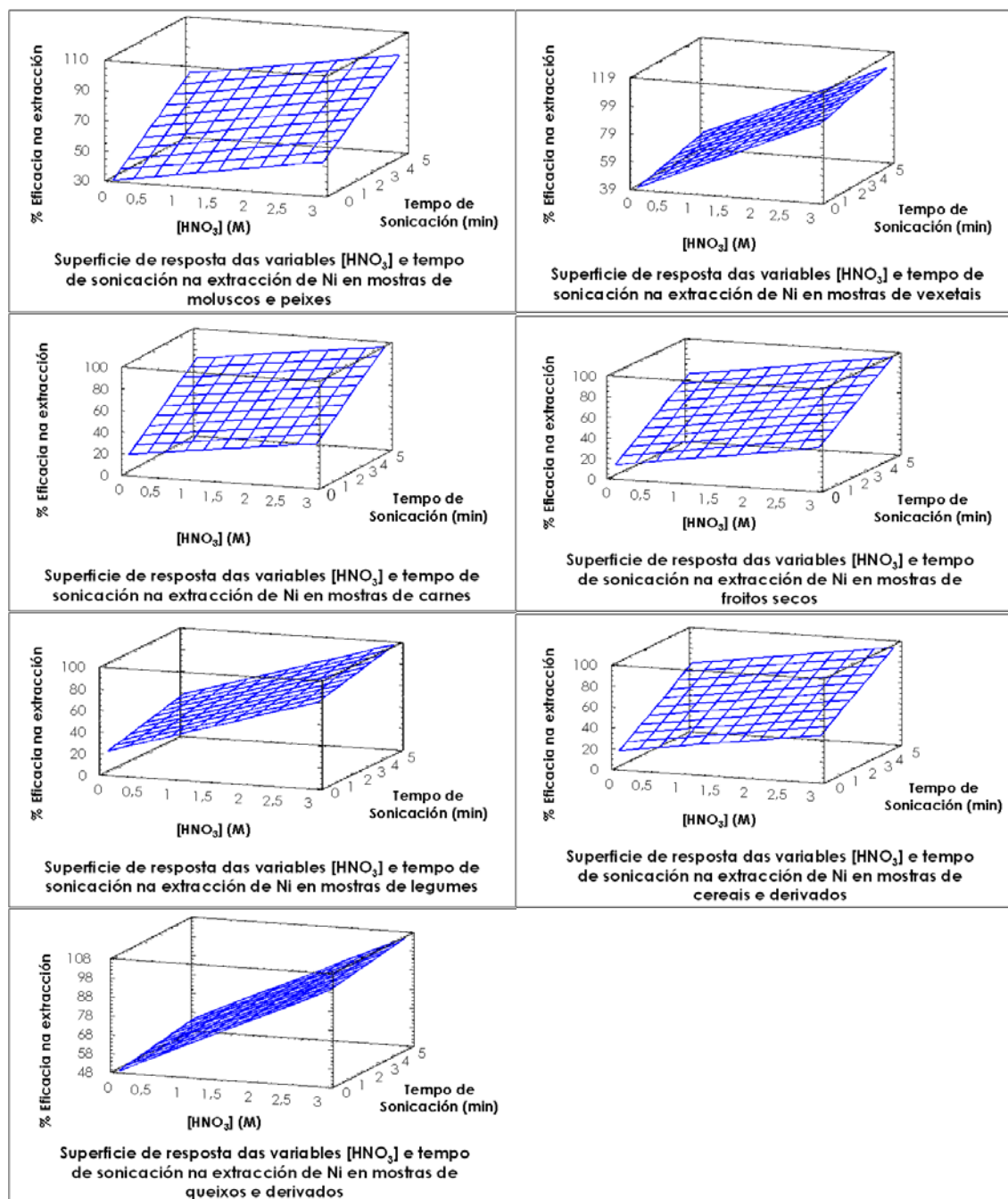
Unha vez analizados os resultados obtidos ó aplicar o deseño de Plackett-Burman, os valores establecidos como óptimos según o mesmo son os que se recollen na Táboa 181.

**Táboa 181.** Valores óptimos según o deseño de Plackett-Burman para cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do níquel das diferentes mostras sólidas.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES DACORDO CO DESEÑO DE PLACKETT-BURMAN						
	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
<b>G (M)</b>	3	3	3	3	3	3	3
<b>H (M)</b>	3	3	0	3	3	0	3
<b>I (min)</b>	5	5	5	5	5	5	5
<b>J (mL)</b>	2	2	2	2	2	2	5
<b>K (mL/min)</b>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
<b>L (°C)</b>	70	70	70	70	70	70	20

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Como o deseño de Plackett-Burman non proporciona os valores óptimos das variables, senon a tendencia das mesmas cara o valor óptimo, realizáronse unha serie de experimentos fóra do marco do deseño e dacordo cos resultados obtidos no mesmo, para determinar o valor óptimo de cada unha das variables que afectan á extracción do níquel nos diferentes tipos de mostras.



**Figura 44.** Superficies de resposta proporcionadas polo deseño de Plackett-Burman para as variables de maior peso estatístico (concentración de ácido nítrico e tempo de sonicación) en cada caso (as demais variables toman o valor medio do intervalo de estudo establecido polo deseño).

### 3.5.2 Experimentos fóra do marco do deseño

#### ▪ Experimentos realizados para a optimización da extracción do níquel en mostras de Moluscos e Peixes

A extracción do níquel nas mostras de moluscos e peixes está afectada significativamente pola variable tempo de sonicación, tal e como se observou na correspondente Carta Pareto (Figura 43).

En primeiro lugar, estudiáronse as variables non significativas. O **caudal de extracción** e o **volumen de disolución extractante** afectan negativamente ó proceso de extracción. Tendo en conta que o %Eficacia na extracción é cuantitativo no experimento 1 da matriz do deseño (Táboa 180), onde se realiza a extracción a un caudal de 3,5 mL/min e empregando 2 mL de disolución extractante, estes valores son os elexidos como óptimos para estas variables.

A **temperatura de extracción** ten un efecto estimado positivo (efecto estimado=5,8). Tendo en conta que no experimento 1 da mesma matriz, onde se realiza a extracción a temperatura ambiente, se obtén un %Eficacia na extracción cuantitativo, fíxase o valor desta variable en 20 °C. Deste xeito, non é preciso quentar previamente a auga do ultrasóns, e evítase ter que traballar cun extracto ácido quente.

A **concentración de ácido clorhídrico** afecta positivamente ó proceso de extracción. Non obstante, posto que nos experimentos 1 e 4 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 180) se obteñen %Eficacia na extracción cuantitativos cando esta variable toma o valor de 0 M, pode eliminarse este compoñente da disolución extractante.

A **concentración de ácido nítrico** é a variable non significativa con maior efecto estimado (efecto estimado=21,9), próximo á liña de significación estatística. Co obxectivo de realizar a extracción en condicións ácidas máis diluídas, realizáronse uns experimentos para intentar reducir a concentración de dito ácido. O resultado deste estudo recóllese na Táboa 182 e permite concluir que a extracción do níquel en moluscos e peixes se pode realizar de forma cuantitativa empregando ácido nítrico 1,5 M.

**Táboa 182.** Experimentos realizados para a optimización da concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
1,5	0	5	2	3,5	20	105,7
1,0	0	5	2	3,5	20	87,9

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

O **tempo de sonicación** é a única variable estatisticamente significativa e a súa influencia no proceso de extracción é positiva. Co obxectivo de reducir o tempo da análise e aumentar así a frecuencia de mostraxe, realizáronse uns experimentos para minimizar o valor desta variable. O resultado dos mesmos recóllese na Táboa 183. Como pode observarse, son suficientes 2,5 minutos para lograr unha extracción cuantitativa.

**Táboa 183.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
1,5	0	2	2	3,5	20	65,6
1,5	0	2,5	2	3,5	20	102,9

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos para cada unha das variables implicadas na extracción do níquel das mostras de moluscos e peixes móstranse na Táboa 184.

**Táboa 184.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do níquel nas mostras de moluscos e peixes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1,5 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	2,5 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do níquel en mostras de Vexetais**

No caso das mostras de vexetais, a única variable que afecta significativamente ó proceso de extracción do níquel é a concentración do ácido nítrico.

En primeiro lugar, estudiáronse as variables non significativas. O **caudal de extracción** e a **temperatura de extracción** teñen efectos estimados negativo e positivo, respectivamente. Na a matriz de Plackett-Burman (Táboa 180) pode

observarse que cando a extracción se realiza a temperatura ambiente e ó caudal mínimo do intervalo de estudio proposto para o deseño, o %Eficacia na extracción é cuantitativo (experimentos 1 e 2). Polo tanto, selecciónanse os valores de 3,5 mL/min e 20 °C como os óptimos para estas variables, respectivamente.

O **volumen de disolución extractante** ten un efecto estimado negativo (efecto estimado=-1,5). Posto que o volume de 2 mL conduce a resultados de %Eficacia na extracción cuantitativos (experimentos 1, 6 e 11 da matriz do deseño, Táboa 180), elíxese este valor como o volume de disolución extractante óptimo. Isto permite aumentar a rapidez da análise, posto que o volume de extracto será preconcentrado posteriormente a un caudal máximo de 2 mL/min.

A **concentración de ácido clorhídrico** afecta positivamente ó proceso de extracción do níquel das mostras de vexetais. Non obstante, posto que é posible extraer cuantitativamente o metal cando se emprega únicamente ácido nítrico como extractante (experimentos 1, 4 e 11 da matriz de Plackett-Burman, Táboa 180), elimínase o ácido clorhídrico da disolución extractante.

Con respecto ó **tempo de sonicación**, a variable non significativa con maior efecto estimado e positivo (efecto estimado=11,2), levouse a cabo un experimento para intentar reducir o valor da mesma a 0,25 minutos, xa que o valor máis baixo do intervalo de estudio proposto para o deseño proporciona resultados cuantitativos (experimentos 2, 5 e 11 da matriz do deseño, Táboa 180). Como pode observarse na Táboa 185, dita redución non foi posible, de maneira que o valor óptimo para a variable tempo de sonicación é 0,5 minutos.

**Táboa 185.** Experimento realizado para a optimización do tempo de sonicación.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	0,25	2	3,5	20	81,1

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Por último, con respecto á variable estatisticamente significativa, a **concentración de ácido nítrico**, estúdiouse a posibilidade de reducir o valor da mesma proporcionado polo deseño. O resultado deste estudio recóllese na Táboa 186. Como pode observarse, é posible reducir a concentración de dito ácido a 1,5 M.

**Táboa 186.** Experimentos realizados para a optimización da concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
1,5	0	0,5	2	3,5	20	101,9
1,0	0	0,5	2	3,5	20	89,3

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos para cada unha das variables implicadas na extracción do níquel das mostras de vexetais móstranse na Táboa 187.

**Táboa 187.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do níquel nas mostras de vexetais.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1,5 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	0,5 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do níquel en mostras de Carnes**

Na extracción do níquel nas mostras de carnes hai dúas variables estatisticamente significativas: o tempo de sonicación e a concentración de ácido nítrico. As demais variables teñen unha maior ou menor importancia no proceso, pero sen superar o nivel de significación establecido polo deseño.

Neste caso, tres das variables non significativas teñen efecto estimado negativo: o **caudal de extracción** (efecto estimado=-8,0), o **volume de disolución extractante** (efecto estimado=-5,9) e a **concentración de ácido clorhídrico** (efecto estimado=-1,0). Tendo en conta, respectivamente, os experimentos 1, 1 e 6, e 1 e 4 da matriz do deseño (Táboa 180), onde estas variables toman o valor máis baixo do intervalo de estudio proposto para o deseño, poden fixarse os valores óptimos de ditas variables en 3,5 mL/min, 2 mL e 0 M, xa que o %Eficacia na extracción obtido en cada un dos citados experimentos é cuantitativo.

A **temperatura de extracción** é a única variable non significativa con efecto estimado positivo (efecto estimado=6,4). A pesar de que a influencia da mesma no proceso é positiva, pode fixarse o seu valor en 20 °C,

(experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 180)). Así, simplifícase a análise, posto que a extracción se pode realizar a temperatura ambiente.

Con respecto ás variables **tempo de sonicación** e **concentración de ácido nítrico**, ambas variables estatisticamente significativas, leváronse a cabo uns experimentos co obxectivo de reducir o valor das mesmas proposto polo deseño. Como pode observarse na Táboa 188, son suficientes 3 minutos de sonicación e unha concentración 1,5 M de ácido nítrico para extraer cuantitativamente o metal.

**Táboa 188.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	3	2	3,5	20	102,7
3	0	2,5	2	3,5	20	87,0
1,5	0	1	2	3,5	20	102,8
1,0	0	1	2	3,5	20	70,0

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Unha vez optimizados todos os valores, según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do níquel nas mostras de carnes recóllense na Táboa 189.

**Táboa 189.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do níquel en mostras de carnes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1,5 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	3 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do níquel en mostras de Froitos secos**

Neste caso, só hai unha variable estatisticamente significativa: o tempo de sonicación.

O estudio fóra do marco do deseño comezouse por aquelas variables non significativas. O **caudal de extracción** e o **volume de disolución extractante** teñen efectos estimados negativos. Posto que no experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 180), realizado con 2 mL de disolución extractante e a un caudal de 3,5 mL/min se obtén un %Eficacia na extracción cuantitativo, selecciónanse estes valores como os óptimos para estas dúas variables.

A **temperatura de extracción** influe no proceso de forma positiva. Non obstante, obtense un %Eficacia na extracción cuantitativo cando se realiza a extracción a temperatura ambiente (experimento 1 da matriz do deseño, Táboa 180). Polo tanto, elíxese o valor de 20 °C como valor óptimo para esta variable.

A **concentración de ácido clorhídrico** é a variable con menos peso estatístico no proceso de extracción. Posto que eliminando este compoñente da disolución extractante é posible extraer cuantitativamente o metal, como

pode observarse nos experimentos 1 e 4 da matriz do deseño (Táboa 180), o valor óptimo para esta variable fíxase en 0 M.

A variable non significativa con maior efecto estimado é a **concentración de ácido nítrico**. Realizáronse uns experimentos co obxectivo de reducir a concentración de dito ácido por debaixo do valor proporcionado polo deseño. Tal e como se recolle na Táboa 190, foi posible diminuír dita concentración ata 1,5 M.

**Táboa 190.** Experimentos realizados para a optimización da concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
1,5	0	5	2	3,5	20	101,8
1,0	0	5	2	3,5	20	82,4

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

No referente ó **tempo de sonicación**, a única variable estatisticamente significativa (efecto estimado=48,4), estívese a posibilidade de minimizar o valor da mesma proporcionado polo deseño (5 minutos), e aumentar así a frecuencia de mostraxe. Na Táboa 191 pode observarse que 1,5 minutos é o menor tempo de sonicación que proporciona unha extracción do metal cuantitativa.

**Táboa 191.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
1,5	0	1	2	3,5	20	88,6
1,5	0	1,5	2	3,5	20	104,9

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Unha vez realizada a optimización fóra do marco do deseño, os valores óptimos das variables implicadas no proceso de extracción do níquel das mostras de froitos secos, móstranse na Táboa 192.

**Táboa 192.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do níquel en mostras de froitos secos.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1,5 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1,5 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do níquel en mostras de Legumes**

No caso da extracción do níquel nas mostras de legumes, as variables estatisticamente significativas son a concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación.

A **concentración de ácido clorhídrico** e a **temperatura de extracción** son variables que influen positivamente no proceso de extracción. Non obstante,

cando estas variables toman o valor máis baixo do intervalo de estudo proposto para o deseño (0 M e 20 °C, respectivamente), a extracción do metal é cuantitativa, tal e como o indican os experimentos 1 e 4 ou experimento 1 da matriz do deseño, respectivamente (Táboa 180). Polo tanto, escóllense ditos valores como óptimos para estas variables. Así, simplifícase enormemente a análise, xa que é posible eliminar o ácido clorhídrico da disolución extractante e a extracción pode levarse a cabo a temperatura ambiente.

O **caudal de extracción** e o **volumen de disolución extractante** son variables con efecto estimado negativo. Se se ten en conta o experimento 1 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 180), onde a extracción do metal é cuantitativa cando os valores destas variables son 3,5 mL/min e 2 mL, respectivamente, poden elixirse ditos valores como óptimos para ditas variables. O caudal de extracción de 3,5 mL/min evita compactacións da mostra na minicolumna e non xenera presións elevadas no sistema FIA. O volumen de disolución extractante (e polo tanto, de extracto ácido) deberá ser preconcentrado posteriormente a un caudal máximo de 2 mL/min, de maneira que o baixo valor desta variable favorece a rapidez da análise.

Con respecto ás variables estatisticamente significativas, **concentración de ácido nítrico** e **tempo de sonicación**, estúdiouse fóra do marco do deseño a posibilidade de minimizar o valor das mesmas proporcionado polo deseño (3 M e 5 minutos). O resultado destes experimentos recóllese na Táboa 193, onde se observa que 1,5 minutos son suficientes para extraer cuantitativamente o metal. A concentración de ácido nítrico, non obstante, non se pode reducir.

**Táboa 193.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	2	2	3,5	20	100,5
3	0	1	2	3,5	20	93,3
3	0	1,5	2	3,5	20	102,7
1,5	0	1,5	2	3,5	20	70,9

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Unha vez optimizadas todas as variables, según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do níquel nas mostras de legumes recóllense na Táboa 194.

**Táboa 194.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do níquel en mostras de legumes.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	3 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	1,5 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do níquel en mostras de Cereais e derivados**

Neste caso, ó igual que na extracción do níquel en mostras de legumes e carnes, as variables estatisticamente significativas son o tempo de sonicación e a concentración de ácido nítrico.

As variables non significativas que teñen un efecto estimado negativo son o **caudal de extracción**, o **volumen de disolución extractante** e a **concentración de ácido clorhídrico**. Tendo en conta os experimentos 1, 1 e 6, e 1 e 4 da matriz do deseño (Táboa 180), onde o %Eficacia na extracción é cuantitativo, fíxanse os valores destas variables en 3,5 mL/min, 2 mL e 0 M.

A **temperatura de extracción** afecta positivamente ó proceso de extracción do níquel en mostras de cereais e derivados. Non obstante, a extracción é cuantitativa cando se realiza a temperatura ambiente (experimento 1 da mesma matriz, Táboa 180), de xeito que se elixe o valor de 20 °C como o óptimo para esta variable.

O **tempo de sonicación** e a **concentración de ácido nítrico** teñen efectos estimados elevados (son variables estatisticamente significativas) e positivos (44,8 e 27,2, respectivamente). A pesar de que canto maior sexa o valor destas variables, dentro do intervalo estudado, máis favorecido se verá o proceso de extracción, realizáronse uns experimentos fóra do marco do deseño co obxectivo de minimizar o seu valor. Como pode observarse na Táboa 195, onde se recollen ditos experimentos e os seus resultados, os menores valores destas variables que permiten extraer cuantitativamente o metal son 3 minutos e 1,5 M.

**Táboa 195.** Experimentos realizados para a optimización do tempo de sonicación e concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	3	2	3,5	20	99,5
3	0	2,5	2	3,5	20	83,6
1,5	0	3	2	3,5	20	105,7
1,0	0	3	2	3,5	20	92,1

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Unha vez optimizadas todas as variables, según os resultados obtidos no deseño de Plackett-Burman, os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do níquel nas mostras de cereais e derivados recóllense na Táboa 196.

**Táboa 196.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do níquel en mostras de cereais e derivados.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1,5 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	3 min
Volume de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

▪ **Experimentos realizados para a optimización da extracción do níquel en mostras de Queixos e derivados**

Neste caso, só a concentración de ácido nítrico é unha variable estatisticamente significativa. As demais variables teñen moi pouca influencia no proceso de extracción, tal e como demostran os valores tan baixos dos efectos estimados (Figura 43).

Os experimentos 1 e 2 da matriz do deseño (Táboa 180), onde as variables **caudal de extracción** e **temperatura de extracción** toman os valores de 3,5 mL/min e 20 °C, respectivamente, proporcionan %Eficacia na extracción cuantitativos, de maneira que se fixan ditos valores como óptimos para estas variables.

A concentración de ácido clorhídrico e o volume de disolución extractante afectan positivamente ó proceso de extracción. Con respecto á **concentración de ácido clorhídrico**, se se teñen en conta os experimentos 1, 4 e 11 da matriz de Plackett-Burman (Táboa 180) pode concluírse que a extracción é cuantitativa cando se elimina este compoñente da disolución extractante. No referente ó **volume de disolución extractante**, e tendo en conta os experimentos 1, 6 e 11 da mesma matriz, pode elixirse o valor de 2 mL como valor óptimo desta variable.

O **tempo de sonicación** tamén afecta positivamente ó proceso de extracción; é dicir, canto maior sexa o valor desta variable, máis favorecido se verá o proceso. Posto que con 0,5 minutos de sonicación (o valor máis baixo para esta variable dentro do intervalo de estudio proposto para o deseño) a extracción é cuantitativa (experimentos 2, 5 e 11 da matriz do deseño, Táboa 180) realizouse un experimento fóra do marco do deseño para comprobar se se podía reducir aínda máis o valor desta variable. A Táboa 197 recolle este

experimento e o seu resultado. Como pode observarse, esta redución non foi posible.

**Táboa 197.** Experimento realizado para a optimización do tempo de sonicación.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
3	0	0,25	2	3,5	20	75,7

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

No referente á variable estatisticamente significativa, a **concentración de ácido nítrico**, estúdiouse a posibilidade de minimizar o valor da mesma proporcionado polo deseño (3 M). Como pode observarse na Táboa 198, foi posible reducir a concentración ata 1,5 M.

**Táboa 198.** Experimentos realizados para a optimización da concentración de ácido nítrico.

G (M)	H (M)	I (min)	J (mL)	K (mL/min)	L (°C)	Eficacia na extracción (%)
1,5	0	5	2	3,5	20	104,6
1,0	0	5	2	3,5	20	78,7

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Os valores óptimos para cada variable implicada na extracción do níquel nas mostras de queixos e derivados recóllense na Táboa 199.

**Táboa 199.** Valores óptimos para cada variable implicada no proceso de extracción do níquel en mostras de queixos e derivados.

VARIABLE	VALOR ÓPTIMO PARA CADA VARIABLE
[HNO <sub>3</sub> ]	1,5 M
[HCl]	0 M
Tempo de sonicación	0,5 min
Volumen de disolución extractante	2 mL
Caudal de extracción	3,5 mL/min
Temperatura de extracción	20 °C

A Táboa 200 mostra un resume dos valores óptimos de tódalas variables implicadas na extracción do níquel das diferentes mostras de alimentos.

**Táboa 200.** Valores óptimos para cada unha das variables implicadas no proceso de extracción do níquel das diferentes mostras de alimentos.

Variable	VALORES ÓPTIMOS PARA CADA UNHA DAS VARIABLES IMPLICADAS NA EXTRACCIÓN DO NÍQUEL DAS DIFERENTES MOSTRAS DE ALIMENTOS						
	Moluscos e peixes	Vexetais	Carnes	Froitos secos	Legumes	Cereais e derivados	Queixos e derivados
G (M)	1,5	1,5	1,5	1,5	3	1,5	1,5
H (M)	0	0	0	0	0	0	0
I (min)	2,5	0,5	3	1,5	1,5	3	0,5
J (mL)	2	2	2	2	2	2	2
K (mL/min)	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
L (°C)	20	20	20	20	20	20	20

G, [HNO<sub>3</sub>]; H, [HCl]; I, tempo de sonicación; J, volumen de disolución extractante; K, caudal de extracción; L, temperatura de extracción.

Como pode observarse na táboa, catro das variables teñen o mesmo valor óptimo en tódolos casos: a concentración de ácido clorhídrico (0 M), o volumen de disolución extractante (2 mL), o caudal de extracción (3,5 mL/min) e a temperatura de extracción (20 °C).

A concentración de ácido nítrico e o tempo de sonicación, as dúas variables con máis importancia dende o punto de vista estatístico na extracción do níquel nas diferentes mostras de alimentos, varían dependendo do tipo de mostra. As mostras de carnes e cereais son as que precisan dun maior tempo de sonicación (3 minutos), mentras que a extracción do níquel das mostras de vexetais e queixos e derivados se leva a cabo en tan só 0,5 minutos. As mostras de legumes e froitos secos necesitan 1,5 minutos de sonicación e as de moluscos e peixes, 2,5.

Con respecto á concentración de ácido nítrico, tódalas extraccións se levan a cabo con ácido 1,5 M, excepto a extracción de níquel en legumes, que require dunha concentración 3M.

### **3.5.3 Estudio da cantidade de mostra**

Nas extraccións de níquel realizadas ata o momento as cantidades de mostra empregadas foron de 60 mg. Non obstante, estúdiouse a posibilidade de utilizar cantidades de mostra maiores, para poder mellorar as características analíticas do proceso e analizar mostras con concentracións de níquel menores. Así, estúdiouse a posibilidade de aumentar a cantidade de mostra ata un máximo de 100 mg, xa que utilizar cantidades maiores provoca grandes presións no sistema FIA que fan inviable a análise.

O aumento da cantidade de mostra mantendo os valores óptimos das variables implicadas no proceso de extracción do níquel non foi posible en ningún dos tipos de mostra.

### **3.5.4 Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra**

Ata o momento, tódolos estudos levados a cabo se realizaron con mostras de diámetro de partícula inferior a 30  $\mu\text{m}$ . Posto que resulta de interés coñecer se o tamaño de partícula da mostra influe no proceso de extracción, tomáronse fraccións de mostras representativas de cada matriz alimenticia dos seguintes tamaños: inferior a 30  $\mu\text{m}$  e intermedios entre 30 e 100  $\mu\text{m}$ .

Para cada fracción de cada mostra, realizouse a análise seguindo o método de referencia descrito anteriormente (páxina 86) e mediante as diferentes metodoloxías propostas. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 201.

Pode concluirse, polo tanto, que o tamaño de partícula da mostra non influe na extracción do níquel das diferentes mostras de alimentos, dentro do intervalo estudado.

**Táboa 201.** Estudio da influencia do tamaño de partícula da mostra utilizando o método de referencia e as metodoloxías continuas propostas. Indícase tamén a eficacia na extracción do sistema FIA.

Tipo de mostra	Mostra analizada	Tamaño de partícula	[Ni] <sub>A</sub> (µg/g)	[Ni] <sub>B</sub> (µg/g)	% Eficacia na extracción
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón	< 30 µm	0,80 ± 0,02	0,77 ± 0,01	97,1
		30-100 µm	0,72 ± 0,02	0,72 ± 0,01	100,3
<b>Vexetais</b>	Leituga	< 30 µm	0,97 ± 0,02	1,01 ± 0,01	103,6
		30-100 µm	0,93 ± 0,01	0,92 ± 0,01	98,7
<b>Carnes</b>	Fígado de coello	< 30 µm	0,91 ± 0,01	0,94 ± 0,01	102,7
		30-100 µm	0,89 ± 0,01	0,88 ± 0,01	98,9
<b>Froitos secos</b>	Castañas	< 30 µm	0,90 ± 0,01	0,92 ± 0,01	102,1
		30-100 µm	0,90 ± 0,01	0,92 ± 0,02	102,8
<b>Legumes</b>	Lentellas	< 30 µm	0,86 ± 0,01	0,88 ± 0,01	102,6
		30-100 µm	0,83 ± 0,02	0,81 ± 0,01	98,1
<b>Cereais e derivados</b>	Cereais cacao	< 30 µm	0,78 ± 0,01	0,78 ± 0,01	100,1
		30-100 µm	0,77 ± 0,01	0,79 ± 0,01	101,7
<b>Queixos e derivados</b>	Tranchetes	< 30 µm	0,61 ± 0,02	0,61 ± 0,01	100,5
		30-100 µm	0,60 ± 0,02	0,60 ± 0,01	99,2

<sup>A</sup> [Ni] obtida mediante o método de referencia

<sup>B</sup> [Ni] obtida mediante os métodos continuos propostos

---

## 4. OPTIMIZACIÓN DOUTROS PARÁMETROS DO SISTEMA

### FIA

Estudiáronse dúas variables que afectan só ó sistema FIA:

- A lonxitude dos reactores de mestura
- O caudal de aspiración do nebulizador do espectrofotómetro de absorción atómica.

#### 4.1 Lonxitude dos reactores de mestura

Os sistemas FIA propostos conteñen dous reactores de mestura, tal e como se pode observar nas Figuras 12 e 13 (páxinas 76 e 77). A función de tales reactores é a de homoxeneizar o extracto da mostra (reactor de mestura 1) ou o extracto da mostra tamponado coa disolución de acetato amónico (reactor de mestura 2). Demostrouse que para conseguir a homoxeneización completa do extracto ácido, a lonxitude do reactor ha de ser tal que conteña, como mínimo, o volume da disolución extractante empregada (2 mL). Por outra parte, non interesa que a lonxitude do reactor sexa maior, posto que isto prolongaría o tempo da análise e diminuíría a frecuencia de mostraxe. Polo tanto, considerouse a lonxitude de 398 cm (tubos de 0,8 mm de diámetro interno) como valor óptimo do reactor de mestura 1. Con respecto ó reactor de mestura 2, a lonxitude de 50 cm resultou ser suficiente para a homoxeneización do extracto ácido coa disolución de acetato amónico.

#### **4.2 Caudal de aspiración do nebulizador do espectrofotómetro de absorción atómica.**

O caudal de aspiración do nebulizador do espectrofotómetro de absorción atómica está determinado polo caudal de elución. O seu valor non pode ser inferior, posto que provocaría a perda de eluato, nin moito superior, xa que a aspiración podería modificar o caudal de elución. Tendo en conta que o valor óptimo do caudal de elución é de 3 mL/min para tódolos metais, fíxase o valor óptimo do caudal de aspiración do nebulizador do espectrofotómetro de absorción atómica en 3,5 mL/min.

---

## 5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DAS METODOLOXÍAS PROPOSTAS PARA A DETERMINACIÓN DOS METAIS DAS MOSTRAS SÓLIDAS DE NATUREZA ALIMENTICIA

Unha vez realizadas as optimizacións de tódalas variables implicadas no proceso de preconcentración dos metais nas diferentes resinas, establecéronse en cada caso os calibrados cos patróns metálicos e as características analíticas da resina. Posteriormente, tras optimizarse as variables implicadas no proceso de extracción dos metais nas diferentes mostras sólidas de natureza alimenticia, calculáronse as características analíticas das metodoloxías propostas.

Ademais, realizáronse en cada caso, os estudos de precisión e exactitude do método proposto, así como o cálculo das frecuencias de mostraxe obtidas ó aplicar os sistemas continuos de extracción e preconcentración.

### 5.1 Cadmio

#### 5.1.1 Curvas de calibrado

Os calibrados realizáronse cos patróns metálicos indicados na páxina 80. Para cada metal, realizáronse dous tipos de calibrado:

- Un **calibrado directo** por aspiración directa das disolucións patrón de cada metal.
- Un **calibrado FIA** empregando os sistemas de preconcentración propostos.

Para cada un dos calibrados, realizouse un axuste por Mínimos Cadrados. A Táboa 202 recolle ambos calibrados no caso do cadmio.

**Táboa 202.** Calibrados directo e FIA para o cadmio. Axuste dos mesmos mediante o método de Mínimos Cadrados.

CALIBRADO DIRECTO		CALIBRADO FIA	
[Cd] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia	[Cd] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia
0,0	0,000	0,000	0,000
0,5	0,075	0,006	0,020
1,0	0,151	0,012	0,039
1,5	0,227	0,024	0,075
2,0	0,304	0,036	0,113

Axuste por Mínimos Cadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA
Ordenada na orixe (o)	$-6,0 \times 10^{-4}$	$7,8 \times 10^{-4}$
Pendente (m)	0,15	3,12
Coefficiente de correlación (r)	0,999	0,999

### 5.1.2 Características analíticas das resinas de preconcentración

As características analíticas das resinas empregadas na preconcentración, como son o factor de preconcentración e a capacidade da resina, estudiáronse para cada un dos metais en cada resina. O factor de preconcentración calcúlase como o cociente entre as pendentes das rectas de calibrado FIA e directo. Para determinar a capacidade da resina para reter o cadmio, preparouse unha minicolumna de preconcentración con 10 mg de resina, en cada caso. A minicolumna conectouse directamente ó espectrofotómetro de absorción atómica e fíxose pasar a través da mesma, ó caudal óptimo de retención, unha disolución patrón de cadmio. Mentras o metal se retén na minicolumna, no equipo de absorción atómica aparece un

sinal nulo. Cando a resina se satura de cadmio, o metal non se retén na mesma, dando lugar a un sinal no espectrofotómetro de absorción atómica. Tendo en conta a concentración da disolución patrón, o tempo requerido para que a resina se sature e a masa da resina, pode calcularse a capacidade da resina quelante, en cada caso. As características analíticas das resinas recóllense na Táboa 203.

**Táboa 203.** Características analíticas das resinas

Resina	Factor de preconcentración	Capacidade da resina ( $\mu\text{mol Cd/g resina}$ )
Chelite P	20,8	7,1
Serdolit Che	13,1	6,4

### 5.1.3 Características analíticas das metodoloxías propostas

#### ▪ Límite de detección

O límite de detección (LOD) defínese como a menor concentración que pode determinarse sendo estatisticamente distinta dun branco estatístico. Para un nivel de confianza dun 99 %, o límite de detección defínese como:

$$\text{LOD} = 3\sigma$$

$\sigma$  = desviación estándar dunha serie de 30 medidas dun branco

Según a definición da IUPAC, o LOD, expresado como a concentración  $X_d$ , obtense da menor medida  $Y_d$  que pode detectarse con certeza razoable para un procedemento analítico. É necesario, polo tanto:

1. Establecer un sinal de detección
2. Mediante unha curva de calibrado, transformar ese sinal nunha concentración.

O cálculo do LOD realizouse en base á determinación de 30 medidas dun blanco, realizadas nas condicións óptimas. Calculouse o valor de  $3\sigma$  e substituíse na recta de calibrado. Tendo en conta a cantidade de mostra empregada e o volume de disolución extractante, o resultado expresouse en  $\mu\text{g/g}$ .

#### ▪ **Límite de cuantificación (LOQ)**

O límite de cuantificación (LOQ) defínese como o nivel por enriba do cal se poden obter resultados cuantitativos cun nivel de confianza do 99 %.

$$\text{LOQ} = 10\sigma$$

$\sigma$  = desviación estándar dunha serie de 30 medidas dun blanco

O cálculo do LOQ realizouse en base á determinación de 30 medidas dun blanco, realizadas nas condicións óptimas. Calculouse o valor de  $10\sigma$  e substituíse na recta de calibrado. Tendo en conta a cantidade de mostra empregada e o volume de disolución extractante, o resultado expresouse en  $\mu\text{g/g}$ .

#### ▪ **Sensibilidade**

A sensibilidade dun método analítico mide a capacidade do mesmo para diferenciar entre pequenas variacións na concentración de analito. Según a IUPAC, a sensibilidade defínese como a pendente da recta de calibrado do método. Tamén se pode definir a sensibilidade para un 1 % de absorción, no caso de métodos espectroscópicos, é dicir, a concentración correspondente a un sinal de absorbancia de 0,0044.

### ▪ Intervalo lineal

Tamén se calculou o intervalo lineal para cada metal acadado polo método FIA proposto. Para isto, tívose en conta a recta de calibrado do método, o límite de cuantificación e o intervalo lineal de cada metal estudado cando se determina por espectroscopía de absorción atómica con chama.

A Táboa 204 recolle as características analíticas das metodoloxías propostas para a determinación do cadmio nos diferentes tipos de mostras de alimentos.

**Táboa 204.** Características analíticas das metodoloxías propostas para a determinación do cadmio nas mostras de natureza alimenticia.

Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Peixes e moluscos</b>	0,0800	0,01	0,05	0,03	0,05-2,43
<b>Vexetais</b>	0,0600	0,01	0,07	0,04	0,07-3,24
<b>Carnes</b>	0,0600	0,01	0,07	0,04	0,07-3,24
<b>Froitos secos</b>	0,0800	0,01	0,05	0,03	0,05-2,43
<b>Legumes</b>	0,0600	0,01	0,07	0,04	0,07-3,24
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	0,01	0,07	0,04	0,07-3,24
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	0,01	0,07	0,04	0,07-3,24

#### 5.1.4 Precisión

Para estudar a precisión do proceso de extracción, preconcentración e determinación dos metais por Espectroscopía de Absorción Atómica con Chama, levouse a cabo un estudio de repetibilidade de dito proceso. A repetibilidade defínese, dende un punto de vista cualitativo como a concordancia entre os resultados sucesivos obtidos sobre unha mesma mostra,

cando se levan a cabo determinacións seguindo o mesmo método analítico, en idénticas condicións experimentais (instrumentos, operador, laboratorio, etc.) e traballando con pouca diferenza de tempo entre as determinacións. Dende un punto de vista cuantitativo, a repetibilidade pode definirse como a diferenza máxima entre dous resultados calesqueira expresados en valor absoluto obtidos nunhas condicións especificadas para un determinado nivel de significación ( $P= 0,05$ ). Para realizar este estudo levouse a cabo 11 veces a análise de cada un dos metais en cada un dos tipos de mostra nas condicións óptimas (as mostras ou materiais de referencia certificados empregados neste estudio son as mesmas que se utilizaron durante a optimización da extracción, Táboa 103, páxina 168). Unha vez obtidos estes resultados, calculouse a desviación estándar e o coeficiente de variación (Táboa 205).

A **desviación típica media** ou **desviación estándar, ( $\sigma$ )**, ven dada pola expresión:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

sendo:

$x_i$  = valor da concentración atopada na mostra

$\bar{x}$  = media aritmética das concentracións

$x_i - \bar{x}$  = diferenza entre cada valor de concentración e a media aritmética respectiva

$n$  = número de medidas efectuadas en cada caso

O **coeficiente de variación, CV**, ven dado pola expresión:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

sendo:

$\sigma$  = desviación típica media ou desviación estándar

$\bar{x}$  = media aritmética das concentracións

**Táboa 205.** Estudio da precisión das metodoloxías propostas para a determinación do cadmio nos diferentes tipos de mostras de alimentos

<b>Mostra</b>	<b>Cantidade de mostra (g)</b>	<b>Coeficiente de variación (%)</b>
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0800	2,3
<b>Vexetais</b>	0,0600	2,1
<b>Carnes</b>	0,0600	3,0
<b>Froitos secos</b>	0,0800	2,9
<b>Legumes</b>	0,0600	2,4
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	3,2
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	4,4

### 5.1.5 Exactitude

A avaliación da exactitude das metodoloxías propostas levouse a cabo realizando dous tipos de estudos:

- Recuperación das metodoloxías propostas
- Análise de materiais de referencia

#### 5.1.5.1 Recuperación das metodoloxías propostas

Para realizar este estudio analizouse unha mostra de cada tipo de matriz (as mesmas mostras e cantidades empregadas na optimización). As análises realizáronse por duplicado, empregando unha disolución extractante

contendo diferentes concentracións de cadmio en cada caso. Unha vez obtidos os resultados, calculouse o % Recuperación da seguinte maneira:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{A - B}{C} \times 100$$

sendo:

A: concentración de cadmio na mostra + concentración de cadmio añadida (valor experimental)

B: concentración de cadmio na mostra (valor experimental)

C: concentración de cadmio añadida

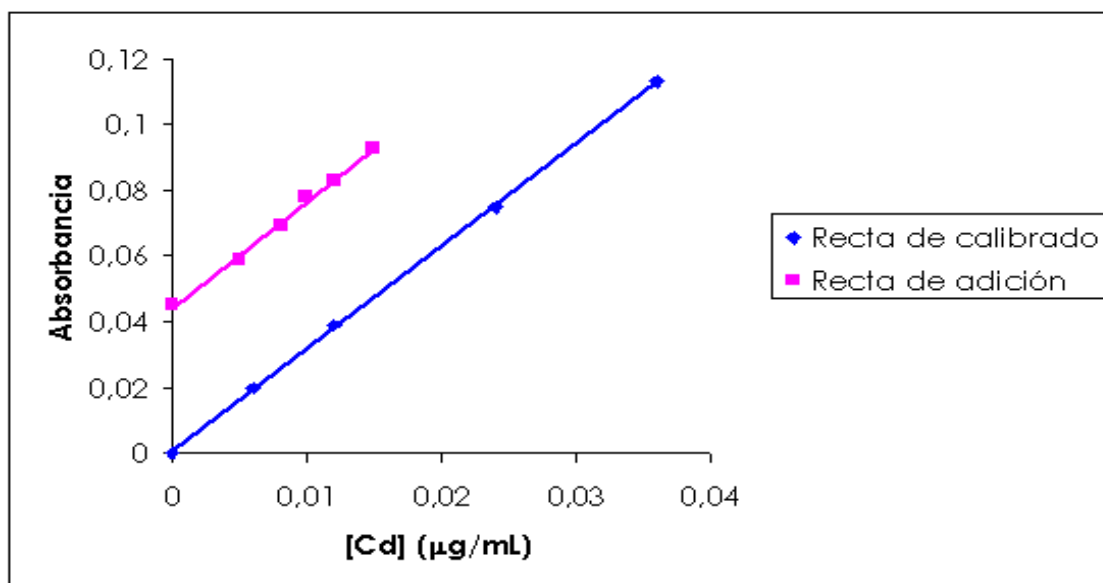
Os datos obtidos para cada unha das mostras e o % Recuperación obtido en cada caso recóllense na Táboa 206.

Realizouse un axuste das rectas de adición por Mínimos Cadrados, e observouse que son totalmente paralelas á recta de calibrado do método, para tódolos tipos de mostras. O paralelismo destas rectas comprobouse estatisticamente mediante o programa ULC (Univariate Linear Calibration) [155]. Este paralelismo indica que non hai efecto matriz nas determinacións de cadmio realizadas. A Figura 45 recolle as rectas de calibrado e adición para as mostras de moluscos e peixes.

**Táboa 206.** Estudio de recuperación das metodoloxías propostas para a determinación de cadmio en mostras de natureza alimenticia

Mostra	Adición ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia	Recuperación <sup>a</sup> (%)	Recta de adición		
				Ordenada	Pendente	r
<b>Moluscos e peixes</b>	0	0,045	102,2	$44,1 \times 10^{-3}$	3,25	0,998
	0,005	0,059	94,0			
	0,008	0,069	95,0			
	0,010	0,078	103,0			
	0,012	0,083	98,3			
	0,015	0,093	99,3			
<b>Vexetais</b>	0	0,038	97,5	$38,4 \times 10^{-3}$	3,24	0,999
	0,005	0,054	96,0			
	0,008	0,065	97,5			
	0,010	0,072	100,0			
	0,012	0,077	96,7			
	0,015	0,086	95,3			
<b>Carnes</b>	0	0,015	102,5	$15,3 \times 10^{-3}$	3,22	0,999
	0,005	0,031	99,2			
	0,008	0,042	103,1			
	0,010	0,048	101,5			
	0,012	0,054	98,8			
	0,015	0,063	97,7			
<b>Froitos secos</b>	0	0,031	104,3	$30,5 \times 10^{-3}$	3,29	0,999
	0,005	0,046	96,0			
	0,008	0,057	102,5			
	0,010	0,063	100,0			
	0,012	0,070	101,7			
	0,015	0,080	100,7			
<b>Legumes</b>	0	0,020	100,0	$19,8 \times 10^{-3}$	3,25	0,999
	0,005	0,035	94,0			
	0,008	0,046	98,7			
	0,010	0,053	102,0			
	0,012	0,059	99,2			
	0,015	0,068	97,3			
<b>Cereais e derivados</b>	0	0,016	104,2	$15,9 \times 10^{-3}$	3,29	0,999
	0,005	0,032	100,0			
	0,008	0,043	105,0			
	0,010	0,049	101,0			
	0,012	0,054	99,2			
	0,015	0,066	102,0			
<b>Queixos e derivados</b>	0	0,009	100,0	$9,2 \times 10^{-3}$	3,16	0,999
	0,005	0,026	100,0			
	0,008	0,034	95,0			
	0,010	0,040	95,0			
	0,012	0,047	95,8			
	0,015	0,057	97,3			

<sup>a</sup> A análise fíxose por duplicado, de maneira que o resultado indicado é a media dos dous resultados obtidos.



**Figura 45.** Recta de calibrado do cadmio e recta de adición deste metal sobre as mostras de moluscos e peixes.

#### 5.1.5.2 Análise de materiais de referencia

Para calcular a exactitude do método proposto, ademais do estudio de recuperación, levouse a cabo a determinación do cadmio nos materiais de referencia para os tipos de matrices nos cales se atopaba certificada a concentración do metal. Neste caso, atópase certificada a concentración do cadmio nas mostras de moluscos e peixes, vexetais, carnes e cereais e derivados. Para realizar este estudio, levouse a cabo a análise por triplicado dos materiais de referencia, nas condicións óptimas. No caso dos vexetais e dos cereais e derivados, a concentración do material de referencia atópase por debaixo ou moi próxima ó LOQ, de maneira que se realizan dúas extraccións sucesivas baixo as condicións óptimas.

Na Táboa 207 recóllense os resultados obtidos. Como pode observarse, a concentración de cadmio obtida polo método proposto atópase dentro do intervalo certificado. Pode concluirse, polo tanto, que as metodoloxías propostas son exactas.

**Táboa 207.** Estudio da exactitude empregando materiais de referencia

Mostra	Material de referencia	Cantidad de mostra (g)	[Cd] <sub>certificada</sub> (µg/g)	[Cd] <sub>obtida</sub> (µg/g)
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón CRM 278R <sup>a</sup>	0,0800	0,348 ± 0,008	0,36 ± 0,01
<b>Vexetais</b>	Té NCS DC 73351 <sup>b</sup>	0,1200	0,057 ± 0,008	0,06 ± 0,00
<b>Carnes</b>	Riñón de porco BCR-186 <sup>c</sup>	0,0050	2,71 ± 0,15	2,76 ± 0,05
<b>Cereais e derivados</b>	Fariña integral BCR-189 <sup>c</sup>	0,1200	0,071 ± 0,003	0,07 ± 0,01

<sup>a</sup> CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

<sup>b</sup> NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

<sup>c</sup> BCR: Community Bureau of Reference

Por último, calculouse o intervalo de confianza para cada un dos tipos de mostra.

O **intervalo de confianza** defínese como:

$$[Me]_{media} \pm \sigma_m t$$

onde:

[Me]<sub>media</sub>= concentración media do metal

$\sigma_m$ = desviación media

$t$ = valor  $t$  do Test  $t$ -Student ó 95 % de probabilidade

A **desviación media**,  $\sigma_m$ :

$$\sigma_m = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

sendo:

$\sigma$ = desviación típica media ou desviación estándar

$n$ = número de medidas efectuadas en cada caso

**Táboa 208.** Intervalo de confianza obtido para cada un dos tipos de mostra

Mostra	Cantidade de mostra (g)	[Cd] ± $\sigma^a$ ( $\mu\text{g/g}$ )	[Cd] ± $\sigma_{mt}$ ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0800	0,348 ± 0,008 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,01
<b>Vexetais</b>	0,0600	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,01
<b>Carnes</b>	0,0600	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01
<b>Froitos secos</b>	0,0800	0,24 ± 0,01	0,23 ± 0,01
<b>Legumes</b>	0,0600	0,20 ± 0,01	0,21 ± 0,01
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01

<sup>a</sup> [Cd] certificada nos casos nos que se emprega un material de referencia ou determinada mediante o método de referencia (páxina 86)

<sup>b</sup> Concentración certificada

t: valor do Test t-Student para 11 mostras (2,23)

### 5.1.6 Frecuencia de mostraxe

Calculouse a frecuencia de mostraxe das metodoloxías propostas para cada tipo de mostra, tendo en conta o proceso global.

O tempo requerido para a preconcentración é o mesmo en tódolos casos de maneira que a frecuencia de mostraxe vai depender do tempo de extracción. Os resultados recóllense na Táboa 209.

**Táboa 209.** Frecuencia de mostraxe obtida coas diferentes metodoloxías propostas para cada tipo de mostra

Tipo de mostra	Tempo de sonicación (min)	Frecuencia de mostraxe (mostras/h)
<b>Moluscos e peixes</b>	2	16
<b>Vexetais</b>	2	16
<b>Carnes</b>	2	16
<b>Froitos secos</b>	1	23
<b>Legumes</b>	2,5	14
<b>Cereais e derivados</b>	4,5	9
<b>Queixos e derivados</b>	0,5	28

## 5.2 Chumbo

### 5.2.1 Curvas de calibrado

Os calibrados directo e FIA e o axuste por Mínimos Cadrados dos mesmos móstranse na Táboa 210. Para realizar estes calibrados, empregáronse os patróns metálicos indicados na páxina 80. Hai que distinguir entre o sistema proposto para a determinación de chumbo en moluscos e peixes (1 única minicolumna, Figura 12) e o sistema proposto para a determinación do chumbo no resto de matrices sólidas de natureza alimenticia, (dúas minicolumnas conectadas en serie (Figura 13) e onde se realizan dúas extraccións sucesivas).

**Táboa 210.** Calibrados directo e FIA para o chumbo. Axuste dos mesmos mediante o método de Mínimos Cadrados.

CALBRADO DIRECTO		CALBRADO FIA <sup>a</sup>		CALBRADO FIA <sup>b</sup>	
[Pb] (µg/mL)	Absorbancia	[Pb] (µg/mL)	Absorbancia	[Pb] (µg/mL)	Absorbancia
0	0,000	0,00	0,000	0,000	0,000
5	0,055	0,05	0,007	0,025	0,007
10	0,109	0,10	0,013	0,050	0,013
15	0,165	0,15	0,020	0,075	0,020
20	0,220	0,20	0,026	0,100	0,026

Axuste por Mínimos Cadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA <sup>a</sup>	Calibrado FIA <sup>b</sup>
Ordenada na orixe (o)	$-2,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$	$2,0 \times 10^{-4}$
Pendente (m)	0,01	0,13	0,26
Coefficiente de correlación (r)	0,999	0,999	0,999

<sup>a</sup> Metodoloxía proposta para a determinación de chumbo en moluscos e peixes

<sup>b</sup> Metodoloxía proposta para a determinación de chumbo no resto de matrices sólidas de natureza alimenticia

### 5.2.2 Características analíticas das resinas de preconcentración

As características analíticas propias das resinas quelantes, como son a capacidade da resina e o factor de preconcentración, recóllense na Táboa 211. Como pode verse na táboa, o factor de preconcentración varía da metodoloxía proposta para a determinación de chumbo en mostras de moluscos e peixes á metodoloxía proposta para a determinación do metal no resto das matrices sólidas de natureza alimenticia.

**Táboa 211.** Características analíticas das resinas

Resina	Factor de preconcentración		Capacidade da resina ( $\mu\text{mol Pb/g resina}$ )
	Sistema A	Sistema B	
<b>Chelíte P</b>	13,0	26,0	32,9
<b>Serdolit Che</b>	14,0	28,0	14,3

A: sistema proposto para a determinación de chumbo en mostras de moluscos e peixes

B: sistema proposto para a determinación de chumbo no resto de matrices

### 5.2.3 Características analíticas das metodoloxías propostas

Calculáronse os límites de detección e cuantificación, a sensibilidade para un 1 % de absorción e o intervalo lineal tendo en conta a cantidade de mostra empregada e o volume de disolución extractante, indicados nas diferentes metodoloxías para a determinación do chumbo en mostras de natureza alimenticia. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 212.

**Táboa 212.** Características analíticas das metodoloxías propostas para a determinación de chumbo en cada tipo de mostra.

Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0800	0,25	0,92	0,81	0,92-42,27
<b>Vexetais</b>	0,2400	0,08	0,31	0,27	0,31-14,09
<b>Carnes</b>	0,2400	0,08	0,31	0,27	0,31-14,09
<b>Froitos secos</b>	0,2400	0,08	0,31	0,27	0,31-14,09
<b>Legumes</b>	0,2400	0,08	0,31	0,27	0,31-14,09
<b>Cereais e derivados</b>	0,2400	0,08	0,31	0,27	0,31-14,09
<b>Queixos e derivados</b>	0,3200	0,06	0,23	0,20	0,23-10,57

#### 5.2.4 Precisión

Unha vez optimizados os procesos de extracción do chumbo nas diferentes mostras de alimentos, realizouse un estudio da precisión dos mesmos. Para realizar este estudio levouse a cabo 11 veces a análise do chumbo en cada un dos tipos de mostra nas condicións óptimas. As mostras ou materiais de referencia certificados empregados neste estudio son as mesmas que se utilizaron durante a optimización da extracción (Táboa 122, páxina 201). Excepto no caso das mostras de moluscos e peixes, realizouse a adición de 0,2  $\mu\text{g}$  de Pb.

A partir dos resultados obtidos calculouse a desviación estándar e o coeficiente de variación, que se recollen na Táboa 213.

**Táboa 213.** Estudo da precisión das metodoloxías propostas para a determinación do chumbo nos diferentes tipos de mostras de alimentos

<b>Mostra</b>	<b>Cantidade de mostra (g)</b>	<b>Coefficiente de variación (%)</b>
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0800	2,4
<b>Vexetais</b>	0,2400	2,1
<b>Carnes</b>	0,2400	2,9
<b>Froitos secos</b>	0,2400	2,7
<b>Legumes</b>	0,2400	2,6
<b>Cereais e derivados</b>	0,2400	3,6
<b>Queixos e derivados</b>	0,3200	2,5

### 5.2.5 Exactitude

A avaliación da exactitude das metodoloxías propostas levouse a cabo realizando dous tipos de estudos:

- Recuperación das metodoloxías propostas
- Análise de materiais de referencia

#### 5.2.5.1 Recuperación das metodoloxías propostas

Para realizar este estudio analizouse unha mostra de cada tipo de matriz (as mesmas mostras empregadas na optimización e a cantidade máxima das mesmas). As análises realizáronse por duplicado, empregando unha disolución extractante contendo diferentes concentracións de chumbo en cada caso. Unha vez obtidos os datos experimentais calculouse o % Recuperación en cada caso (páxina 322).

Os datos obtidos para cada unha das mostras e os % Recuperación obtidos recóllense na Táboa 214.

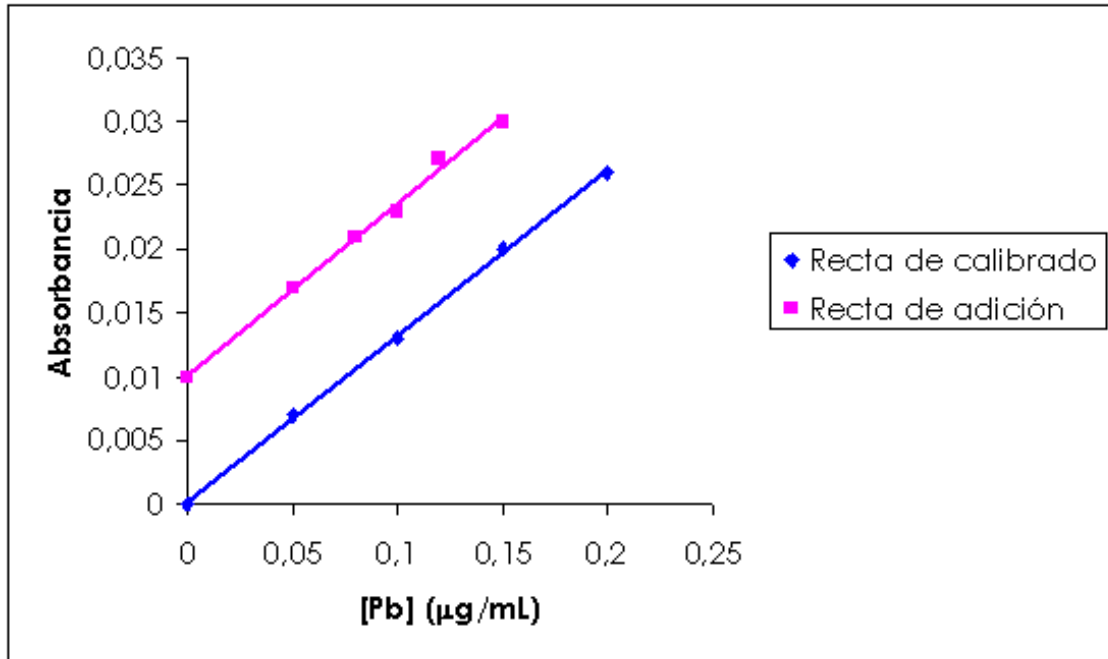
Realizouse un axuste das rectas de adición por Mínimos Cadrados, e observouse que son totalmente paralelas á recta de calibrado do método,

para tódolos tipos de mostras, como se pode ver nas Figuras 46 e 47, para o caso das mostras de moluscos e peixes e vexetais (sistemas con 1 ou 2 minicolumnas, respectivamente). O paralelismo destas rectas comprobouse estatísticamente mediante o programa ULC (Univariate Linear Calibration) [155]. Este paralelismo indica que non hai efecto matriz nas determinacións de chumbo realizadas.

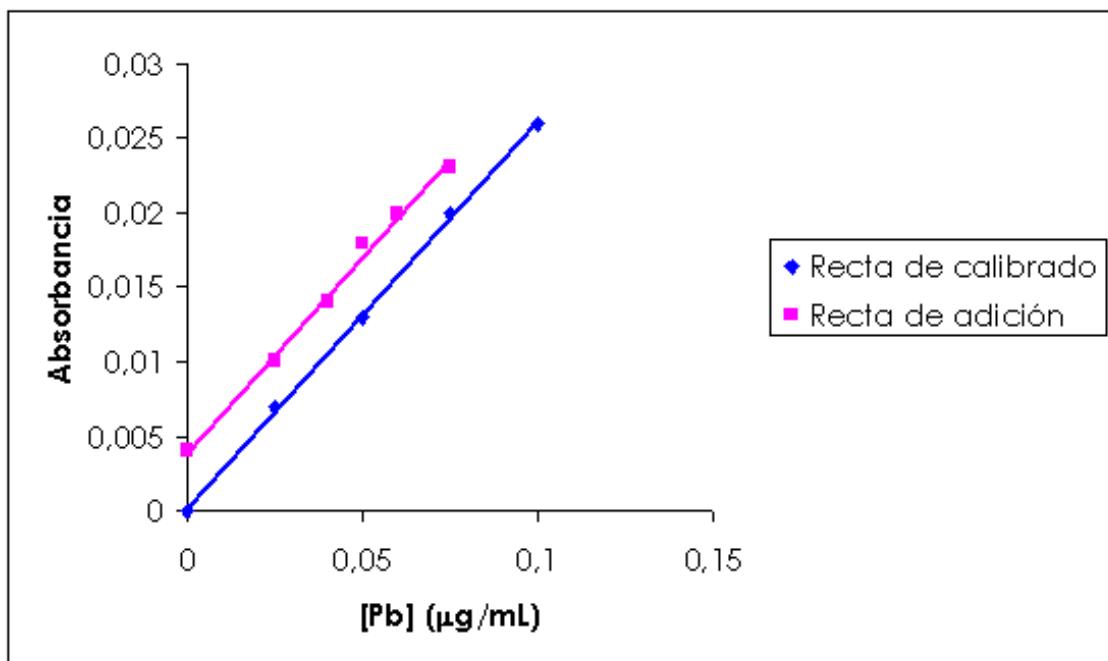
**Táboa 214.** Estudo de recuperación das metodoloxías propostas para a determinación de chumbo en mostras de natureza alimenticia

Mostra	Adición (µg/mL)	Absorbancia	Recuperación <sup>a</sup> (%)	Recta de adición		
				Ordenada	Pendente	r
Moluscos e peixes	0	0,010	101,3	10,1 x10 <sup>-3</sup>	0,13	0,998
	0,05	0,017	102,0			
	0,08	0,021	102,5			
	0,10	0,023	97,0			
	0,12	0,027	104,2			
	0,15	0,030	97,3			
Vexetais	0	0,004	106,0	3,9 x10 <sup>-3</sup>	0,26	0,996
	0,025	0,010	96,4			
	0,040	0,014	94,8			
	0,050	0,018	100,0			
	0,060	0,020	96,2			
	0,075	0,023	94,9			
Carnes	0	0,004	101,5	3,6 x10 <sup>-3</sup>	0,27	0,999
	0,025	0,010	93,2			
	0,040	0,014	99,5			
	0,050	0,017	98,4			
	0,060	0,020	98,5			
	0,075	0,024	100,9			
Froitos secos	0	0,004	102,6	4,2 x10 <sup>-3</sup>	0,27	0,999
	0,025	0,011	99,6			
	0,040	0,015	101,5			
	0,050	0,018	102,6			
	0,060	0,021	101,3			
	0,075	0,024	97,9			
Legumes	0	0,005	103,7	5,2 x10 <sup>-3</sup>	0,28	0,998
	0,025	0,012	98,8			
	0,040	0,017	106,5			
	0,050	0,019	100,0			
	0,060	0,021	98,7			
	0,075	0,026	100,8			
Cereais e derivados	0	0,003	104,2	3,1 x10 <sup>-3</sup>	0,26	0,999
	0,025	0,010	104,0			
	0,040	0,014	102,3			
	0,050	0,016	95,8			
	0,060	0,019	96,0			
	0,075	0,023	99,1			
Queixos e derivados	0	0,008	102,0	8,2 x10 <sup>-3</sup>	0,27	0,999
	0,025	0,015	103,6			
	0,040	0,019	102,0			
	0,050	0,022	101,6			
	0,060	0,025	104,7			
	0,075	0,028	98,9			

<sup>a</sup> A análise fíxose por duplicado, de maneira que o resultado indicado é a media dos dous resultados obtidos.



**Figura 46.** Retta de calibrado do chumbo e retta de adição deste metal sobre as mostras de moluscos e peixes .



**Figura 47.** Retta de calibrado do chumbo e retta de adição deste metal sobre as mostras de vexetais (sistema com dúas minicolumnas e dúas extracções sucesivas).

### 5.2.5.2 Análise de materiais de referencia

Para calcular a exactitude do método proposto, ademais do estudio de recuperación, empregáronse materiais de referencia para os tipos de matrices nos cales se atopaba certificada a concentración do chumbo: moluscos e peixes, vexetais, carnes e cereais e derivados. Para realizar este estudio, levouse a cabo a análise por triplicado dos materiais de referencia, nas condicións óptimas. No caso do material de referencia para os vexetais, debido á elevada concentración de chumbo no mesmo, en referencia á concentración do metal nas mostras, realizouse unha única extracción co sistema proposto e sen adición de chumbo.

Na Táboa 215 recóllense os resultados obtidos. Como pode observarse, a concentración de chumbo obtida polo método proposto atópase dentro do intervalo certificado. Pode concluírse, polo tanto, que as metodoloxías propostas son exactas.

**Táboa 215.** Estudio da exactitude empregando materiais de referencia

Mostra	Material de referencia	Cantidade de mostra (g)	Adición de Pb ( $\mu\text{g}$ )	[Pb] <sub>certificada</sub> ( $\mu\text{g/g}$ )	[Pb] <sub>obtida</sub> ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón CRM 278R <sup>a</sup>	0,0800	0	$2,00 \pm 0,04$	$1,99 \pm 0,06$
	<b>Vexetais</b>	Té NCS DC 73351 <sup>b</sup>	0,1200	0	$4,4 \pm 0,2$
<b>Carnes</b>	Riñón de porco BCR-186 <sup>c</sup>	0,2400	0,2	$0,306 \pm 0,011$	$0,30 \pm 0,01$
<b>Cereais e derivados</b>	Fariña integral BCR-189 <sup>c</sup>	0,2400	0,2	$0,379 \pm 0,012$	$0,39 \pm 0,02$

<sup>a</sup> CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

<sup>b</sup> NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

<sup>c</sup> BCR: Community Bureau of Reference

Por último, calculouse a desviación media e estableceuse o intervalo de confianza para cada tipo de mostra, que se recolle na Táboa 216.

**Táboa 216.** Intervalo de confianza obtido para cada tipo de mostra

Mostra	Cantidade de mostra (g)	[Pb] $\pm \sigma^a$ ( $\mu\text{g/g}$ )	[Pb] $\pm \sigma_{mf}$ ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0800	2,00 $\pm$ 0,04 <sup>b</sup>	1,94 $\pm$ 0,06
<b>Vexetais</b>	0,2400	0,26 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01
<b>Carnes</b>	0,2400	0,22 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01
<b>Froitos secos</b>	0,2400	0,26 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01
<b>Legumes</b>	0,2400	0,32 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,01
<b>Cereais e derivados</b>	0,2400	0,21 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01
<b>Queixos e derivados</b>	0,3200	0,34 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01

<sup>a</sup> [Pb] certificada nos casos nos que se emprega un material de referencia ou determinada mediante o método de referencia (páxina 86)

<sup>b</sup> Concentración certificada

t: valor do Test t-Student para 11 mostrax (2,23)

### 5.2.6 Frecuencia de mostraxe

Calculouse a frecuencia de mostraxe das metodoloxías propostas para cada tipo de mostra, considerando o proceso global, dende a extracción á detección do chumbo.

O tempo requerido para a preconcentración é de 0,83 minutos para as mostrax de moluscos e peixes e de 1,67 minutos para o resto de matrices sólidas. Excepto para os moluscos e peixes, para o resto de matrices e debido á baixa concentración do chumbo nas mesmas, é preciso realizar dúas extraccións consecutivas, de maneira que as frecuencias de mostraxe obtidas para este metal serán moito máis baixas que as obtidas para o cadmio. Na Táboa 217 recóllense as frecuencias de mostraxe obtidas en cada caso.

**Táboa 217.** Frecuencia de mostraxe obtida coas diferentes metodoloxías propostas para cada tipo de mostra

Tipo de mostra	Tempo de sonicación (min)	Frecuencia de mostraxe (mostras/h)
<b>Moluscos e peixes</b>	3	14
<b>Vexetais</b>	1,5	11
<b>Carnes</b>	2,5	8
<b>Froitos secos</b>	1	14
<b>Legumes</b>	3,5	6
<b>Cereais e derivados</b>	3,5	6
<b>Queixos e derivados</b>	1	14

### 5.3 Cobalto

#### 5.3.1 Curvas de calibrado

Os calibrados directo e FIA e o axuste por Mínimos Cadrados dos mesmos móstranse na Táboa 218. Para realizar estes calibrados, empregáronse os patróns metálicos indicados na páxina 81.

**Táboa 218.** Calibrados directo e FIA para o cobalto. Axuste dos mesmos mediante o método de Mínimos Cadrados.

CALIBRADO DIRECTO		CALIBRADO FIA	
[Co] (µg/mL)	Absorbancia	[Co] (µg/mL)	Absorbancia
<b>0,0</b>	0,000	<b>0,000</b>	0,000
<b>0,5</b>	0,016	<b>0,010</b>	0,004
<b>1,0</b>	0,032	<b>0,020</b>	0,008
<b>2,0</b>	0,065	<b>0,030</b>	0,012
<b>3,5</b>	0,115	<b>0,035</b>	0,014

Axuste por Mínimos Cadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA
<b>Ordenada na orixe (o)</b>	-4,5 x10 <sup>-4</sup>	0
<b>Pendente (m)</b>	0,03	0,40
<b>Coeficiente de correlación (r)</b>	0,999	0,999

### 5.3.2 Características analíticas das resinas de preconcentración

As características analíticas propias das resinas quelantes, a capacidade da resina e o factor de preconcentración, recóllense na Táboa 219.

**Táboa 219.** Características analíticas das resinas

Resina	Factor de preconcentración	Capacidade da resina ( $\mu\text{mol Co/g resina}$ )
Chelite P	13,3	17,7
Serdolit Che	14,3	12,6

### 5.3.3 Características analíticas das metodoloxías propostas

Calculáronse os límites de detección, cuantificación, sensibilidade para o 1 % de absorción e intervalo lineal tendo en conta a cantidade de mostra empregada e o volume de disolución extractante. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 220.

**Táboa 220.** Características analíticas das metodoloxías propostas para a determinación de cobalto en cada tipo de mostra.

Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD	LOQ	Sensibilidade ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
		( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )		
Peixes e moluscos	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58
Vexetais	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58
Carnes	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58
Froitos secos	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58
Legumes	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58
Cereais e derivados	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58
Queixos e derivados	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58

### 5.3.4 Precisión

Estudouse a precisión do proceso global. Para realizar este estudio levouse a cabo 11 veces a análise do cobalto en cada un dos tipos de mostra nas condicións óptimas. As mostras ou materiais de referencia certificados empregados neste estudio son as mesmas que se utilizaron durante a optimización da extracción (Táboa 141, páxina 231).

A partir dos resultados obtidos calculouse a desviación estándar e o coeficiente de variación, que se recollen na Táboa 221.

**Táboa 221.** Estudio da precisión das metodoloxías propostas para a determinación do cobalto nos diferentes tipos de mostras de alimentos

<b>Mostra</b>	<b>Cantidade de mostra (g)</b>	<b>Coeficiente de variación (%)</b>
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0600	2,0
<b>Vexetais</b>	0,0600	3,2
<b>Carnes</b>	0,0600	2,7
<b>Froitos secos</b>	0,0600	2,3
<b>Legumes</b>	0,0600	2,9
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	3,5
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	3,1

### 5.3.5 Exactitude

No caso do cobalto e debido a que non se dispón de materiais de referencia que certifiquen a concentración do metal, a avaliación da exactitude das metodoloxías propostas levouse a cabo realizando únicamente o estudio de recuperación.

### 5.3.5.1 Recuperación das metodoloxías propostas

Para realizar este estudio analizouse unha mostra de cada tipo de matriz. Empregáronse as mesmas mostras da optimización. Tendo en conta que a preconcentración do cobalto se optimizou para unha cantidade máxima do metal de 0,08  $\mu\text{g}$  e a concentración de cobalto nas mostras, a cantidade máxima de mostra que se utilizou para este estudio foi de 50 mg para as mostras de froitos secos e legumes e 40 mg para as restantes mostras. As análises realizáronse por duplicado, empregando unha disolución extractante contendo diferentes concentracións de cobalto en cada caso. Unha vez obtidos os datos experimentais calculouse o % Recuperación en cada caso (páxina 322).

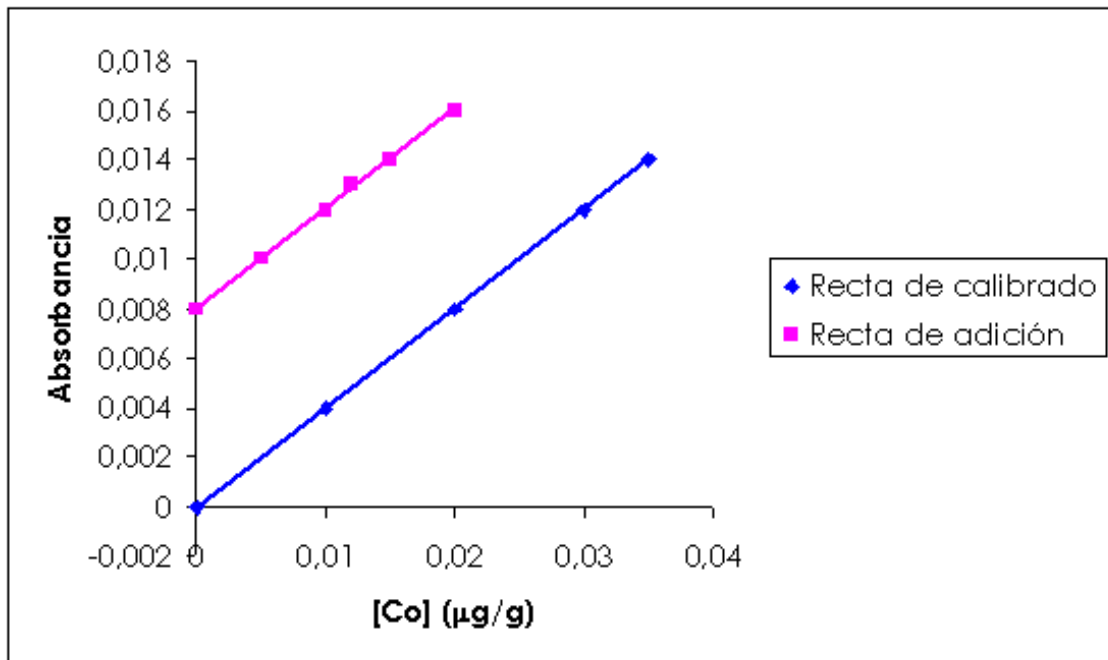
Os datos obtidos para cada unha das mostras e os % Recuperación obtidos recóllense na Táboa 222.

Realizouse un axuste das rectas de adición por Mínimos Cadrados, e observouse que son totalmente paralelas á recta de calibrado do método para tódolos tipos de mostras. Na Figura 48, móstranse ambas rectas para o caso das mostras de legumes. O paralelismo destas rectas comprobouse estatisticamente mediante o programa ULC (Univariate Linear Calibration) [155]. Este paralelismo indica que non hai efecto matriz nas determinacións de cobalto realizadas.

**Táboa 222.** Estudo de recuperación das metodoloxías propostas para a determinación de cobalto en mostras de natureza alimenticia

Mostra	Adición ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia	Recuperación <sup>a</sup> (%)	Recta de adición		
				Ordenada	Pendente	r
Moluscos e peixes	0	0,008	105,6	$7,8 \times 10^{-3}$	0,44	0,996
	0,005	0,010	104,0			
	0,010	0,012	104,0			
	0,012	0,013	105,0			
	0,015	0,014	105,3			
	0,020	0,017	106,5			
Vexetais	0	0,007	103,9	$6,8 \times 10^{-3}$	0,44	0,996
	0,005	0,009	102,0			
	0,010	0,011	103,0			
	0,012	0,012	105,0			
	0,015	0,013	104,7			
	0,020	0,016	107,5			
Carnes	0	0,008	101,1	$7,6 \times 10^{-3}$	0,42	0,991
	0,005	0,009	94,0			
	0,010	0,012	97,0			
	0,012	0,013	98,3			
	0,015	0,014	101,3			
	0,020	0,016	97,5			
Froitos secos	0	0,008	103,6	$8,0 \times 10^{-3}$	0,42	0,992
	0,005	0,010	104,0			
	0,010	0,012	104,0			
	0,012	0,013	102,5			
	0,015	0,015	102,7			
	0,020	0,016	98,0			
Legumes	0	0,008	95,5	$8,0 \times 10^{-3}$	0,40	0,999
	0,005	0,010	98,0			
	0,010	0,012	95,0			
	0,012	0,013	95,0			
	0,015	0,014	94,7			
	0,020	0,016	94,0			
Cereais e derivados	0	0,007	101,8	$7,0 \times 10^{-3}$	0,42	0,992
	0,005	0,009	102,0			
	0,010	0,011	104,0			
	0,012	0,012	100,8			
	0,015	0,014	103,3			
	0,020	0,015	99,0			
Queixos e derivados	0	0,008	101,0	$7,6 \times 10^{-3}$	0,42	0,991
	0,005	0,009	94,0			
	0,010	0,012	96,0			
	0,012	0,013	98,3			
	0,015	0,014	98,7			
	0,020	0,016	96,5			

<sup>a</sup> A análise fíxose por duplicado, de maneira que o resultado indicado é a media dos dous resultados obtidos.



**Figura 48.** Retra de calibrado do cobalto e retra de adição deste metal sobre as mostras de legumes.

Por último, calculouse a desviación media e estableceuse o intervalo de confianza para cada tipo de mostra, que se recolle na Táboa 223.

**Táboa 223.** Intervalo de confianza obtido para cada un dos tipos de mostra

Mostra	Cantidade de mostra (g)	[Co] ± $\sigma^a$ (µg/g)	[Co] ± $\sigma_{mf}$ (µg/g)
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0600	0,93 ± 0,01	0,94 ± 0,01
<b>Vexetais</b>	0,0600	0,80 ± 0,01	0,80 ± 0,02
<b>Carnes</b>	0,0600	0,88 ± 0,02	0,85 ± 0,02
<b>Froitos secos</b>	0,0600	0,77 ± 0,01	0,78 ± 0,01
<b>Legumes</b>	0,0600	0,75 ± 0,01	0,74 ± 0,02
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	0,86 ± 0,02	0,87 ± 0,03
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	0,87 ± 0,01	0,86 ± 0,02

<sup>a</sup> [Co] determinada mediante o método de referencia (páxina 86)

t: valor do Test t-Student para 11 mostras (2,23)

### 5.3.6 Frecuencia de mostraxe

Calculouse a frecuencia de mostraxe do método proposto para cada tipo de mostra, considerando o proceso global, dende a extracción á detección do cobalto. Como o tempo requerido para a preconcentración é o mesmo en tódolos casos, a frecuencia de mostraxe dependerá do tempo de sonicación. Os resultados recóllense na Táboa 224. Como pode observarse, é posible realizar ata 23 análises por hora.

**Táboa 224.** Frecuencia de mostraxe obtida coas diferentes metodoloxías propostas para cada tipo de mostra

<b>Tipo de mostra</b>	<b>Tempo de sonicación (min)</b>	<b>Frecuencia de mostraxe (mostras/h)</b>
<b>Moluscos e peixes</b>	2	16
<b>Vexetais</b>	1,5	19
<b>Carnes</b>	2	16
<b>Froitos secos</b>	1,5	19
<b>Legumes</b>	1,5	19
<b>Cereais e derivados</b>	2	16
<b>Queixos e derivados</b>	1	23

## 5.4 Cromo

### 5.4.1 Curvas de calibrado

Os calibrados directo e FIA e o axuste por Mínimos Cadrados dos mesmos móstranse na Táboa 225. Para realizar estes calibrados, empregáronse os patróns metálicos indicados na páxina 81.

**Táboa 225.** Calibrados directo e FIA para o cromo. Axuste dos mesmos mediante o método de Mínimos Cadrados.

CALIBRADO DIRECTO		CALIBRADO FIA	
[Cr] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia	[Cr] ( $\mu\text{g/mL}$ )	Absorbancia
0,0	0,000	0,000	0,000
1,0	0,026	0,020	0,008
2,0	0,052	0,040	0,016
3,5	0,090	0,060	0,024
5,0	0,130	0,075	0,029

Axuste por Mínimos Cadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA
Ordenada na orixe (o)	$-2,5 \times 10^{-5}$	$1,9 \times 10^{-4}$
Pendente (m)	0,03	0,39
Coefficiente de correlación (r)	0,999	0,999

#### 5.4.2 Características analíticas das resinas de preconcentración

As características analíticas propias das resinas quelantes, a capacidade da resina e o factor de preconcentración, recóllense na Táboa 226.

**Táboa 226.** Características analíticas das resinas

Resina	Factor de preconcentración	Capacidade da resina ( $\mu\text{mol Cr/g resina}$ )
Chelite P	10,7	18,2
Serdolit Che	13,0	13,9

#### 5.4.3 Características analíticas das metodoloxías propostas

Calculáronse os límites de detección, cuantificación, sensibilidade para o 1 % de absorción e intervalo lineal tendo en conta a cantidade de mostra empregada e o volume de disolución extractante indicados nas diferentes metodoloxías propostas para a determinación do cromo nas mostras de alimentos obxecto de estudo. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 227.

**Táboa 227.** Características analíticas das metodoloxías propostas para a determinación de cromo en cada tipo de mostra.

Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD	LOQ	Sensibilidade	Intervalo lineal
		( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09
<b>Vexetais</b>	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09
<b>Carnes</b>	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09
<b>Froitos secos</b>	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09
<b>Legumes</b>	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09

#### 5.4.4 Precisión

Estudouse a precisión do proceso global. Para iso, realizáronse 11 análises para cada tipo de mostra. Empregáronse as mesmas mostras e cantidades que durante a optimización (Táboa 160, páxina 257). Calculouse a desviación estándar e o coeficiente de variación (Táboa 228).

**Táboa 228.** Estudio da precisión das metodoloxías propostas para a determinación do cromo nos diferentes tipos de mostras de alimentos

Mostra	Cantidade de mostra	Coefficiente de variación
	(g)	(%)
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0600	2,7
<b>Vexetais</b>	0,0600	2,0
<b>Carnes</b>	0,0600	2,2
<b>Froitos secos</b>	0,0600	2,0
<b>Legumes</b>	0,0600	3,1
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	3,5
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	3,4

### **5.4.5 Exactitude**

A avaliación da exactitude das metodoloxías propostas levouse a cabo realizando dous tipos de estudos:

- Recuperación das metodoloxías propostas
- Análise de materiais de referencia

#### **5.4.5.1 Recuperación das metodoloxías propostas**

Para realizar este estudio analizouse unha mostra de cada tipo de matriz (as mesmas mostras e cantidade empregadas durante a optimización). As análises realizáronse por duplicado, empregando unha disolución extractante contendo diferentes concentracións de cromo en cada caso. Unha vez obtidos os datos experimentais calculouse o % Recuperación en cada caso (páxina 322).

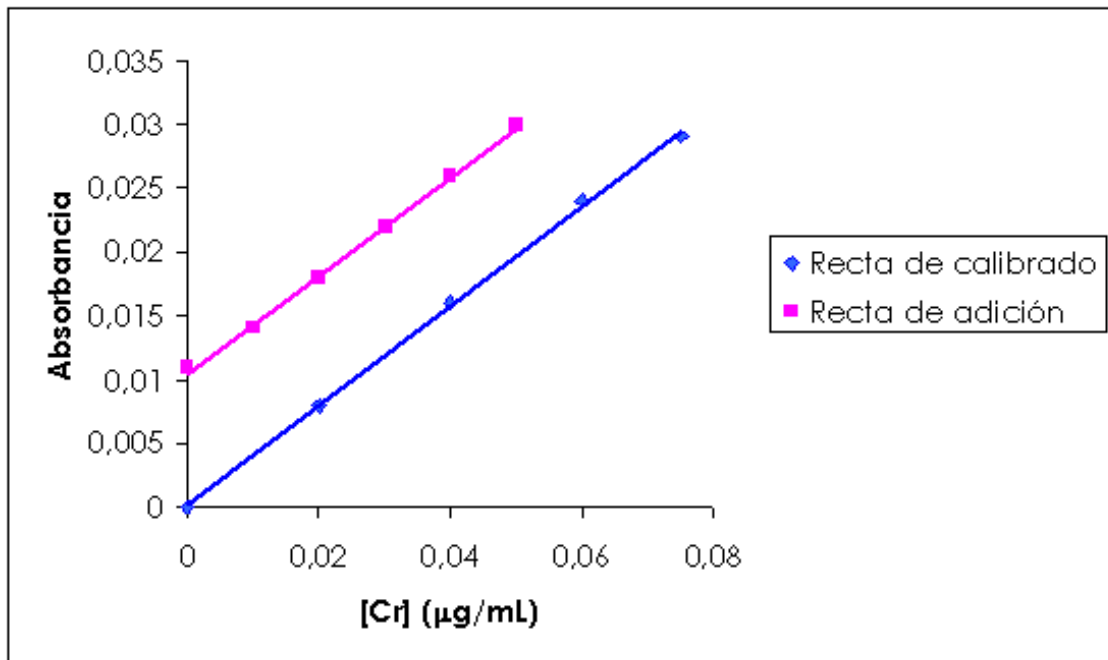
Os datos obtidos para cada unha das mostras e os % Recuperación obtidos recóllense na Táboa 229.

Realizouse un axuste das rectas de adición por Mínimos Cadrados e observouse que son totalmente paralelas á recta de calibrado do método para tódolos tipos de mostras, como se pode ver na Figura 49, para o caso das mostras de carnes. O paralelismo destas rectas comprobouse estatisticamente mediante o programa ULC (Univariate Linear Calibration) [155]. Este paralelismo indica que non hai efecto matriz nas determinacións de cromo realizadas.

**Táboa 229.** Estudo de recuperación das metodoloxías propostas para a determinación de cromo en mostras de natureza alimenticia

Mostra	Adición (µg/mL)	Absorbancia	Recuperación <sup>a</sup> (%)	Recta de adición		
				Ordenada	Pendente	r
Moluscos e peixes	0	0,009	100,9	9,0 x10 <sup>-3</sup>	0,40	0,999
	0,010	0,013	105,0			
	0,020	0,017	104,5			
	0,030	0,021	104,0			
	0,040	0,025	102,5			
	0,050	0,029	103,6			
Vexetais	0	0,009	100,0	8,9 x10 <sup>-3</sup>	0,38	0,999
	0,010	0,013	98,0			
	0,020	0,016	94,0			
	0,030	0,020	96,7			
	0,040	0,024	95,7			
	0,050	0,028	98,6			
Carnes	0	0,011	100,7	10,5 x10 <sup>-3</sup>	0,39	0,999
	0,010	0,014	98,0			
	0,020	0,018	96,0			
	0,030	0,022	96,3			
	0,040	0,026	101,5			
	0,050	0,030	100,2			
Froitos secos	0	0,009	100,0	8,9 x10 <sup>-3</sup>	0,39	0,998
	0,010	0,013	99,0			
	0,020	0,016	96,5			
	0,030	0,021	103,3			
	0,040	0,025	102,7			
	0,050	0,028	97,8			
Legumes	0	0,010	97,3	9,9 x10 <sup>-3</sup>	0,39	0,998
	0,010	0,014	97,0			
	0,020	0,017	95,5			
	0,030	0,021	97,3			
	0,040	0,026	100,5			
	0,050	0,029	96,6			
Cereais e derivados	0	0,010	98,8	10,0 x10 <sup>-3</sup>	0,39	0,998
	0,010	0,014	95,0			
	0,020	0,018	100,0			
	0,030	0,021	98,7			
	0,040	0,025	95,3			
	0,050	0,030	102,2			
Queixos e derivados	0	0,010	102,4	10,0 x10 <sup>-3</sup>	0,40	0,999
	0,010	0,014	99,0			
	0,020	0,018	100,5			
	0,030	0,022	103,0			
	0,040	0,026	104,2			
	0,050	0,030	102,4			

<sup>a</sup> A análise fíxose por duplicado, de maneira que o resultado indicado é a media dos dous resultados obtidos.



**Figura 49.** Recta de calibrado do cromo e recta de adición deste metal sobre as mostras de carnes.

#### 5.4.5.2 Análise de materiais de referencia

Para calcular a exactitude do método proposto, ademais do estudio de recuperación, levouse a cabo a determinación do cromo nos materiais de referencia para os tipos de matrices nos cales se atopaba certificada a concentración do metal. No caso do cromo, atópase certificada a concentración do metal nas mostras de moluscos e peixes e vexetais. Para realizar este estudio, levouse a cabo a análise por triplicado dos materiais de referencia, nas condicións óptimas.

Na Táboa 230 recóllense os resultados obtidos. Como pode observarse, a concentración de cromo obtida polo método proposto atópase dentro do intervalo certificado. Pode concluírse, polo tanto, que as metodoloxías propostas son exactas.

**Táboa 230.** Estudio da exactitude empregando materiais de referencia

Mostra	Material de referencia	Cantidade de mostra (g)	[Cr] <sub>certificada</sub> (µg/g)	[Cr] <sub>obtida</sub> (µg/g)
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón CRM 278R <sup>a</sup>	0,0600	0,78 ± 0,06	0,77 ± 0,03
<b>Vexetais</b>	Té NCS DC 73351 <sup>b</sup>	0,0600	0,80 ± 0,02	0,81 ± 0,03

<sup>a</sup> CRM: Certified Reference Material, from Community Bureau of Reference

<sup>b</sup> NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

Por último, calculouse a desviación media e estableceuse o intervalo de confianza para cada tipo de mostra. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 231.

**Táboa 231.** Intervalo de confianza obtido para cada un dos tipos de mostra

Mostra	Cantidade de mostra (g)	[Cr] ± σ <sup>a</sup> (µg/g)	[Cr] ± σ <sub>m</sub> <sup>t</sup> (µg/g)
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0600	0,78 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,02
<b>Vexetais</b>	0,0600	0,80 ± 0,02 <sup>b</sup>	0,78 ± 0,01
<b>Carnes</b>	0,0600	0,92 ± 0,02	0,89 ± 0,01
<b>Froitos secos</b>	0,0600	0,76 ± 0,01	0,77 ± 0,01
<b>Legumes</b>	0,0600	0,83 ± 0,01	0,84 ± 0,02
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	0,85 ± 0,02	0,84 ± 0,03
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	0,86 ± 0,02	0,85 ± 0,03

<sup>a</sup> [Cr] certificada nos casos nos que se emprega un material de referencia ou determinada mediante o método de referencia (páxina 86)

<sup>b</sup> Concentración certificada

t: valor do Test t-Student para 11 mostrax (2,23)

#### 5.4.6 Frecuencia de mostraxe

Calculouse a frecuencia de mostraxe do método proposto para cada tipo de mostra considerando o proceso global. Os resultados, que se recollen na Táboa 232, indican análises bastante rápidas, de ata 23 mostrax/h.

**Táboa 232.** Frecuencia de mostraxe obtida coas diferentes metodoloxías propostas para cada tipo de mostra

Tipo de mostra	Tempo de sonicación (min)	Frecuencia de mostraxe (mostras/h)
Moluscos e peixes	2,5	13
Vexetais	1	19
Carnes	2	14
Froitos secos	1	19
Legumes	2	14
Cereais e derivados	2,5	13
Queixos e derivados	0,5	23

## 5.5 Níquel

### 5.5.1 Curvas de calibrado

Os calibrados directo e FIA e o axuste por Mínimos Cadrados dos mesmos móstranse na Táboa 233. Para realizar estes calibrados, empregáronse os patróns metálicos indicados na páxina 81.

**Táboa 233.** Calibrados directo e FIA para o níquel. Axuste dos mesmos mediante o método de Mínimos Cadrados.

CALIBRADO DIRECTO		CALIBRADO FIA	
[Ni] (µg/mL)	Absorbancia	[Ni] (µg/mL)	Absorbancia
0,0	0,000	0,000	0,000
0,5	0,016	0,010	0,005
1,0	0,033	0,020	0,010
1,5	0,049	0,030	0,015
2,0	0,065	0,040	0,020

Axuste por Mínimos Cadrados	Calibrado directo	Calibrado FIA
Ordenada na orixe (o)	0	0
Pendente (m)	0,03	0,50
Coefficiente de correlación (r)	0,999	0,999

### 5.5.2 Características analíticas das resinas de preconcentración

As características analíticas propias das resinas quelantes, a capacidade da resina e o factor de preconcentración, recóllense na Táboa 234.

**Táboa 234.** Características analíticas das resinas

Resina	Factor de preconcentración	Capacidade da resina ( $\mu\text{mol Ni/g resina}$ )
Chelite P	15,3	10,0
Serdolit Che	16,6	9,2

### 5.5.3 Características analíticas das metodoloxías propostas

Calculáronse os límites de detección, cuantificación, sensibilidade para o 1 % de absorción e intervalo lineal tendo en conta a cantidade de mostra empregada e o volume de disolución extractante indicados nas diferentes metodoloxías propostas para a determinación do níquel nas mostras sólidas de natureza alimenticia obxecto de estudio e móstranse na Táboa 235.

**Táboa 235.** Características analíticas das metodoloxías propostas para a determinación de níquel en cada tipo de mostra.

Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD	LOQ	Sensibilidade	Intervalo lineal
		( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )	( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33
<b>Vexetais</b>	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33
<b>Carnes</b>	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33
<b>Froitos secos</b>	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33
<b>Legumes</b>	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33

#### 5.5.4 Precisión

Estudouse a precisión do proceso global. Para iso, realizáronse 11 análises para cada tipo de mostra. Empregáronse as mesmas mostras e cantidades que durante a optimización (Táboa 179, páxina 284). Dos resultados obtidos calculouse, ó igual que nos outros metais, a desviación estándar e o coeficiente de variación (Táboa 236).

**Táboa 236.** Estudio da precisión das metodoloxías propostas para a determinación do níquel nos diferentes tipos de mostras de alimentos

<b>Mostra</b>	<b>Cantidad de mostra (g)</b>	<b>Coefficiente de variación (%)</b>
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0600	3,5
<b>Vexetais</b>	0,0600	2,4
<b>Carnes</b>	0,0600	2,9
<b>Froitos secos</b>	0,0600	2,9
<b>Legumes</b>	0,0600	2,0
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	2,2
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	2,0

#### 5.5.5 Exactitude

A avaliación da exactitude das metodoloxías propostas levouse a cabo realizando dous tipos de estudos:

- Recuperación das metodoloxías propostas
- Análise de materiais de referencia

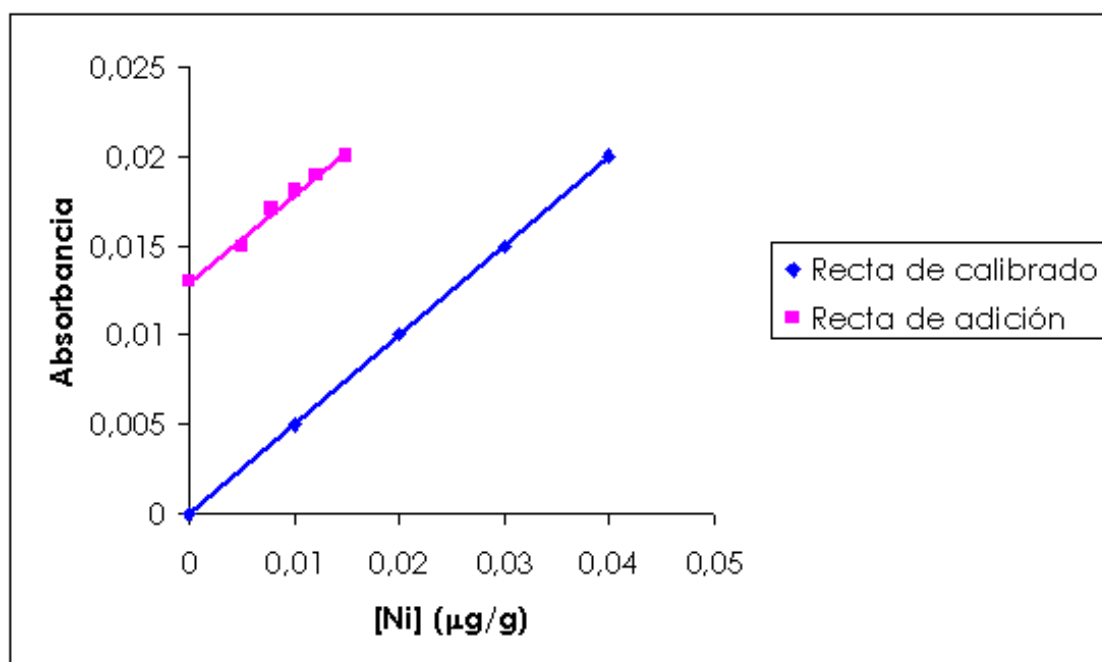
##### 5.5.5.1 Recuperación das metodoloxías propostas

Para realizar este estudio analizouse unha mostra de cada tipo de matriz (as mesmas mostras e cantidade empregadas durante a optimización). As

análises realizáronse por duplicado, empregando unha disolución extractante contendo diferentes concentracións de níquel en cada caso. Unha vez obtidos os datos experimentais calculouse o % Recuperación (páxina 322).

Os datos obtidos para cada unha das mostras e os % Recuperación obtidos recóllense na Táboa 237.

Realizouse un axuste das rectas de adición por Mínimos Cadrados e observouse que son totalmente paralelas á recta de calibrado do método para tódolos tipos de mostras, como se pode ver na Figura 50, para o caso das mostras de froitos secos. O paralelismo destas rectas comprobouse estatisticamente mediante o programa ULC (Univariate Linear Calibration) [155]. Este paralelismo indica que non hai efecto matriz nas determinacións de níquel realizadas.



**Figura 50.** Recta de calibrado do níquel e recta de adición deste metal sobre as mostras de froitos secos.

**Táboa 237.** Estudio de recuperación das metodoloxías propostas para a determinación de níquel en mostras de natureza alimenticia

Mostra	Adición (µg/mL)	Absorbancia	Recuperación <sup>a</sup> (%)	Recta de adición		
				Ordenada	Pendente	r
Moluscos e peixes	0	0,012	100,0	11,9 x10 <sup>-3</sup>	0,49	0,995
	0,005	0,014	104,0			
	0,008	0,016	102,5			
	0,010	0,017	96,0			
	0,012	0,018	104,2			
	0,015	0,019	96,7			
Vexetais	0	0,014	102,8	13,9 x10 <sup>-3</sup>	0,49	0,995
	0,005	0,016	102,0			
	0,008	0,018	98,7			
	0,010	0,019	101,0			
	0,012	0,020	96,7			
	0,015	0,021	101,3			
Carnes	0	0,013	102,6	12,9 x10 <sup>-3</sup>	0,49	0,995
	0,005	0,015	104,0			
	0,008	0,017	103,7			
	0,010	0,018	103,0			
	0,012	0,019	105,0			
	0,015	0,020	102,7			
Froitos secos	0	0,013	100,0	12,9 x10 <sup>-3</sup>	0,49	0,995
	0,005	0,015	102,0			
	0,008	0,017	100,0			
	0,010	0,018	105,0			
	0,012	0,019	100,0			
	0,015	0,020	96,0			
Legumes	0	0,013	97,7	12,9 x10 <sup>-3</sup>	0,49	0,995
	0,005	0,015	100,0			
	0,008	0,017	102,5			
	0,010	0,018	98,0			
	0,012	0,019	95,8			
	0,015	0,020	96,0			
Cereais e derivados	0	0,011	101,3	10,9 x10 <sup>-3</sup>	0,49	0,995
	0,005	0,013	100,0			
	0,008	0,015	105,0			
	0,010	0,016	104,0			
	0,012	0,017	104,2			
	0,015	0,018	100,0			
Queixos e derivados	0	0,009	99,5	8,9 x10 <sup>-3</sup>	0,49	0,995
	0,005	0,011	102,0			
	0,008	0,013	102,5			
	0,010	0,014	98,0			
	0,012	0,015	99,2			
	0,015	0,016	96,0			

<sup>a</sup> A análise fixose por duplicado, de maneira que o resultado indicado é a media dos dous resultados obtidos.

### 5.5.5.2 Análise de materiais de referencia

Para calcular a exactitude do método proposto, ademais do estudio de recuperación, realizouse a análise de materiais de referencia, no caso das matrices para as cales se atopa certificada a concentración do níquel, como é o caso dos vexetais. Debido a que a concentración do metal neste material de referencia é moi elevada, a análise realizouse cunha cantidade máxima de 17 mg. No caso das carnes e cereais, existe unha concentración aproximada de níquel no material de referencia. Nestes casos, e posto que dita concentración é próxima ó límite de cuantificación, realizáronse dúas extraccións sucesivas; é dicir, empregáronse 120 mg de mostra. As análises, en condicións óptimas, realizáronse por triplicado e os resultados recóllense na Táboa 238. Pode concluírse que as metodoloxías propostas son exactas.

**Táboa 238.** Estudio da exactitude empregando materiais de referencia

Mostra	Material de referencia	Cantidade de mostra (g)	[Ni] <sub>certificada</sub>	[Ni] <sub>obtida</sub>
			(µg/g)	(µg/g)
<b>Vexetais</b>	Té NCS DC 73351 <sup>a</sup>	0,0170	4,6 ± 0,3	4,26 ± 0,38
<b>Carnes</b>	Riñón de porco BCR-186 <sup>b</sup>	0,1200	0,420 <sup>c</sup>	0,44 ± 0,01
<b>Cereais e derivados</b>	Fariña integral BCR-189 <sup>b</sup>	0,1200	0,380 <sup>c</sup>	0,38 ± 0,01

<sup>a</sup> NCS: China National Analysis Center for Iron and Steel

<sup>b</sup> BCR: Community Bureau of Reference

<sup>c</sup> Concentración aproximada de níquel

Calculouse tamén a desviación media e o intervalo de confianza obtido para cada tipo de mostra. Os resultados obtidos recóllense na Táboa 239.

**Táboa 239.** Intervalo de confianza obtido para cada un dos tipos de mostra

Mostra	Cantidade de mostra (g)	[Ni] $\pm \sigma^a$ ( $\mu\text{g/g}$ )	[Ni] $\pm \sigma_{mf}$ ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0600	0,80 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,03
<b>Vexetais</b>	0,0600	0,97 $\pm$ 0,02	0,99 $\pm$ 0,02
<b>Carnes</b>	0,0600	0,91 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,02
<b>Froitos secos</b>	0,0600	0,90 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,02
<b>Legumes</b>	0,0600	0,86 $\pm$ 0,01	0,89 $\pm$ 0,01
<b>Cereais e derivados</b>	0,0600	0,78 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,01
<b>Queixos e derivados</b>	0,0600	0,61 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,01

<sup>a</sup> [Ni] determinada mediante o método de referencia (páxina 86)

t: valor do Test t-Student para 11 mostras (2,23)

### 5.5.6 Frecuencia de mostraxe

Calculouse a frecuencia de mostraxe do método proposto para cada tipo de mostra considerando o proceso global, dende a extracción ata a detección do níquel. Os resultados, que se recollen na Táboa 240, indican análises bastante rápidas, de ata 28 mostras/h.

**Táboa 240.** Frecuencia de mostraxe obtida coas diferentes metodoloxías propostas para cada tipo de mostra

Tipo de mostra	Tempo de sonicación (min)	Frecuencia de mostraxe (mostras/h)
<b>Moluscos e peixes</b>	2,5	14
<b>Vexetais</b>	0,5	28
<b>Carnes</b>	3	13
<b>Froitos secos</b>	1,5	19
<b>Legumes</b>	1,5	19
<b>Cereais e derivados</b>	3	13
<b>Queixos e derivados</b>	0,5	28

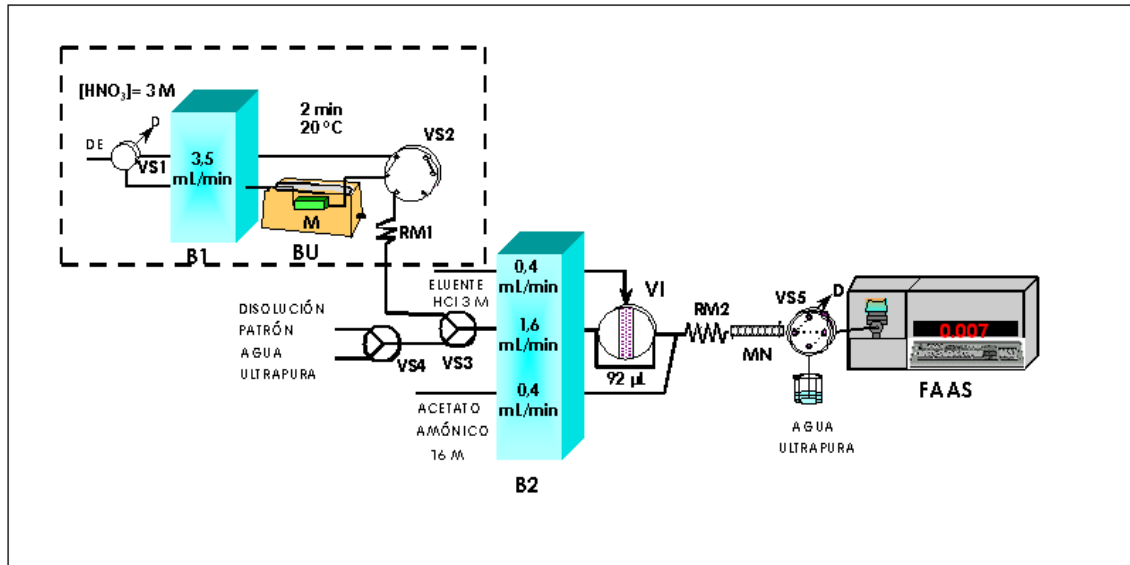
## **6. APLICACIÓN DAS METODOLOXÍAS PROPOSTAS:**

### **Análise de mostras reais dos diferentes tipos de matrices alimenticias estudadas aplicando os sistemas FIA propostos.**

As metodoloxías propostas aplicáronse á análise de mostras reais de tódolos tipos de matrices estudiados. Con ditas mostras realizouse, por unha parte, a determinación dos diferentes metais empregando o método de referencia descrito anteriormente (páxina 86), e por outra, a análise das mesmas facendo uso das metodoloxías propostas. As análises realizáronse por triplicado en tódolos casos e os resultados expresáronse como a media  $\pm$  desviación estándar. Ademais, calculáronse os % Eficacia na extracción obtidos cos métodos propostos con respecto ó método de referencia, que resultaron ser cuantitativos en tódolos casos. Aplicouse o test-t de parellas a estes dous grupos de datos experimentais e os resultados obtidos indican que a un nivel de confianza do 95 %, as diferencias entre ambos grupos de datos experimentais non son estatisticamente significativas, xa que en ningún caso o valor da t calculada excede o valor da t crítica. Polo tanto, as metodoloxías propostas poden ser aplicadas á determinación dos diferentes metais estudiados en mostras reais de maneira satisfactoria.

### 6.1 Determinación do cadmio

#### Determinación do cadmio en mostras de moluscos e peixes



**Figura 51.** Sistema FIA empregado para a determinación de cadmio en mostras de moluscos e peixes indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 241.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cadmio en moluscos e peixes

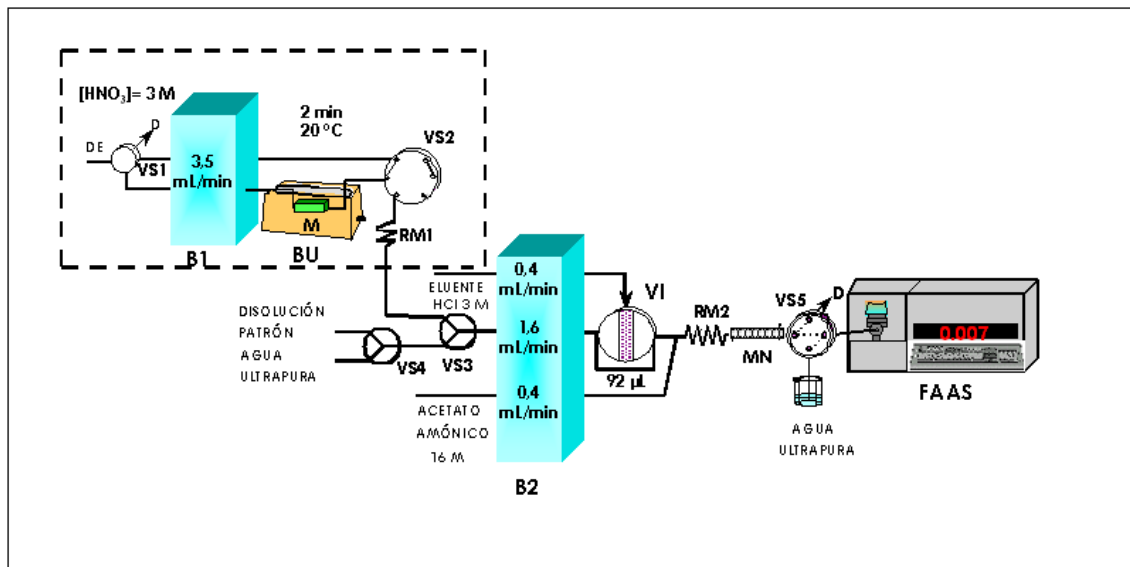
Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Moluscos e peixes	0,0800	0,01	0,05	0,03	0,05-2,43

**Táboa 242.** Resultados obtidos na determinación de cadmio nas mostras reais de moluscos e peixes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cd] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón 1	0,49 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,01	98,0
	Mexillón 2	0,53 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,02	100,0
	Mexillón 3	0,54 $\pm$ 0,02	0,56 $\pm$ 0,01	103,7
	Mexillón 4	0,52 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,01	103,8
	Mexillón 5	0,53 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,02	100,0
	Mexillón 6	0,48 $\pm$ 0,01	0,50 $\pm$ 0,02	104,2
	Mexillón 7	0,38 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,01	100,0
	Mexillón 8	0,66 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,01	98,5
	Mexillón 9	0,41 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,01	97,6
	Mexillón 10	0,59 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,01	98,3
	Ameixas 1	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	100,0
	Ameixas 2	0,18 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,02	100,0
	Atún	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	100,0
	Berberechos	0,11 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	109,1
	Cangrexo	0,13 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	107,7
	Langostinos	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	100,0
	Pescada	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	100,0
	Navallas	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	100,0
	Sardiñas	0,15 $\pm$ 0,01	0,15 $\pm$ 0,01	100,0
	Zamburiñas	0,19 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,01	100,0
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	2,00 $\times 10^{-3}$	9,51 $\times 10^{-3}$	0,94	2,09

<sup>a</sup> [Cd]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación do cadmio en mostras de vexetais



**Figura 52.** Sistema FIA empregado para a determinación de cadmio en mostras de vexetais indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M, micolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, micolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 243.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cadmio en vexetais

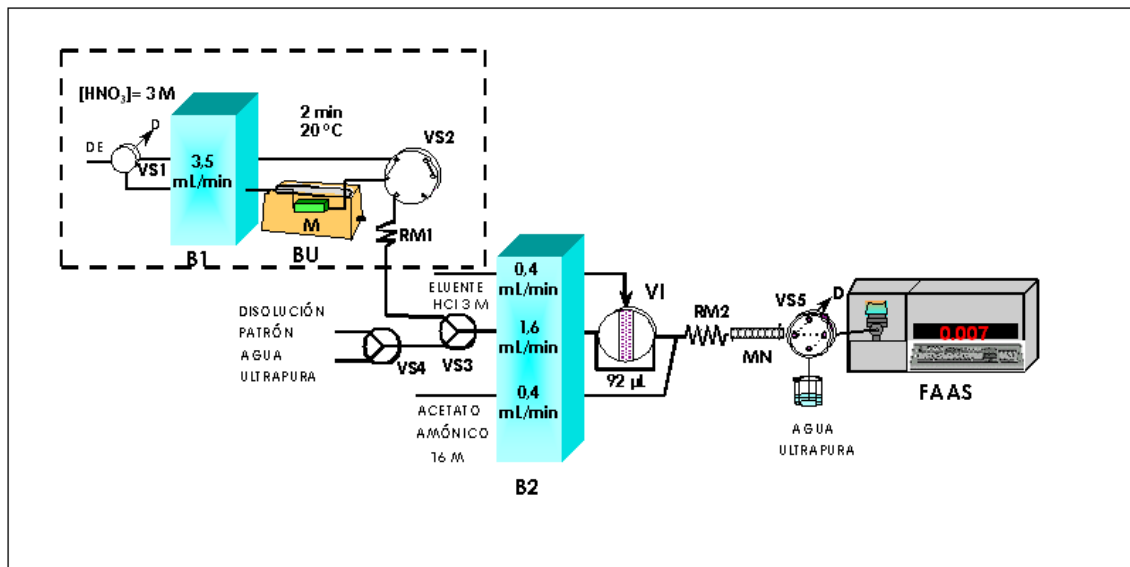
Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Vexetais	0,0600	0,01	0,07	0,04	0,07-3,24

**Táboa 244.** Resultados obtidos na determinación de cadmio nas mostras reais de vexetais. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cd] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Vexetais</b>	Acelga	0,47 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,01	102,1
	Repolo	0,39 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,01	102,6
	Grelos	0,17 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	100,0
	Leituga	0,64 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,01	100,0
	Lombarda	0,18 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	94,4
	Patata	0,27 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,01	96,3
	Calanco	0,40 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,01	100,0
	Cenoria	0,27 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	100,0
	Té	0,23 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	100,0
	Tila	0,35 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	102,9
	Manzanilla	0,23 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	100,0
	Mazán	0,26 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01	96,2
	Pera	0,15 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	93,4
	Plátano	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	100,0
	Pexegos	0,15 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	93,3
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t calculada	t crítica
	-1,33 $\times 10^{-3}$	7,43 $\times 10^{-3}$	0,69	2,15

<sup>a</sup> [Cd]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

### Determinación de cadmio en muestras de carnes



**Figura 53.** Sistema FIA empleado para la determinación de cadmio en muestras de carnes indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. DE, disolución extractante; B1 y B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasonidos; M, minicolumna que contiene a muestra sólida; RM1 y RM2, reactores de mezcla; D, desfeite; VI, válvula de inyección; MN, minicolumna que contiene a resina quelante y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 245.** Características analíticas del método propuesto para la determinación de cadmio en carnes

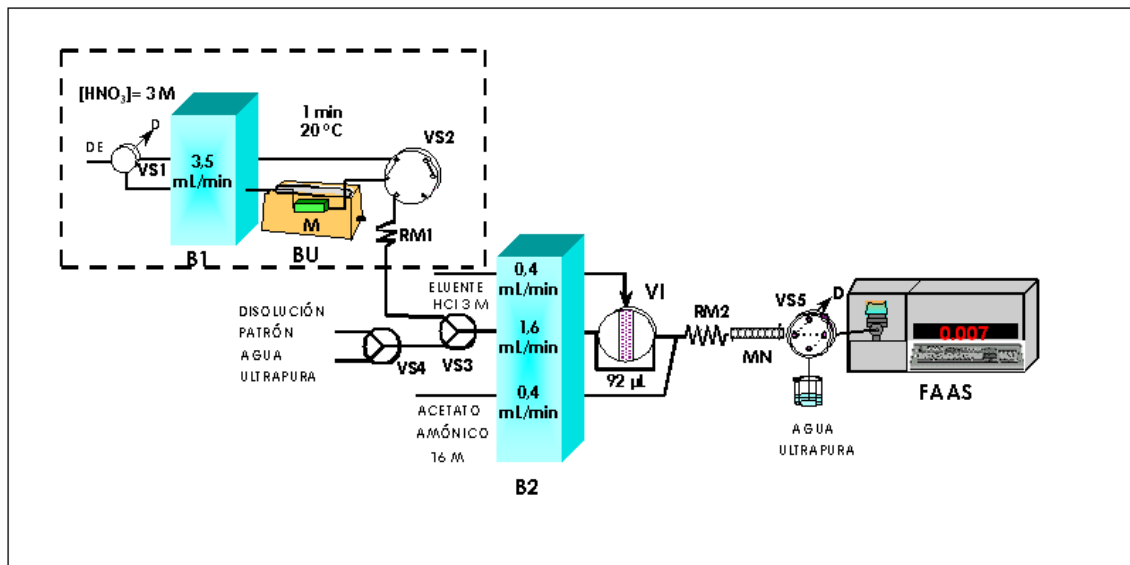
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Carnes	0,0600	0,01	0,07	0,04	0,07-3,24

**Táboa 246.** Resultados obtidos na determinación de cadmio nas mostras reais de carnes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cd] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Carnes</b>	Riles de carneiro	0,41 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01	102,4
	Fígado de coello	0,17 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	100,0
	Polo	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	100,0
	Pavo	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	100,0
	Porco	0,13 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	100,0
	Carneiro	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,01	100,0
	Tenreira	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	100,0
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	1,43 $\times 10^{-3}$	3,78 $\times 10^{-3}$	1,00	2,45

<sup>a</sup> [Cd]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

### Determinación do cadmio en mostras de froitos secos



**Figura 54.** Sistema FIA empregado para a determinación de cadmio en mostras de froitos secos indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 247.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cadmio en froitos secos

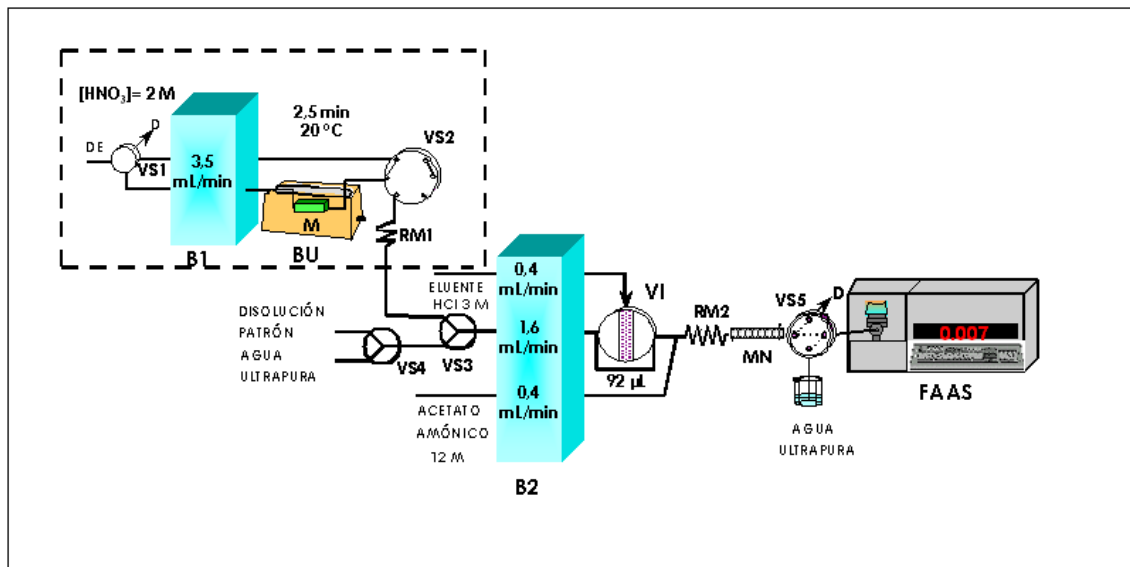
Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Froitos secos	0,0800	0,01	0,05	0,03	0,05-2,43

**Táboa 248.** Resultados obtidos na determinación de cadmio nas mostras reais de froitos secos. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cd] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Froitos secos	Améndoas	0,23 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	95,7
	Avelás	0,23 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	100,0
	Cacahuetes	0,24 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	100,0
	Castañas	0,23 $\pm$ 0,01	0,24 $\pm$ 0,01	104,3
	Noces	0,20 $\pm$ 0,01	0,20 $\pm$ 0,01	100,0
	Pistachos	0,17 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	100,0
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t calculada	t crítica
	0	6,32 $\times 10^{-3}$	0	2,57

<sup>a</sup> [Cd]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación do cadmio en mostras de legumes



**Figura 55.** Sistema FIA empregado para a determinación de cadmio en mostras de legumes indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M, micolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, micolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 249.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cadmio en legumes

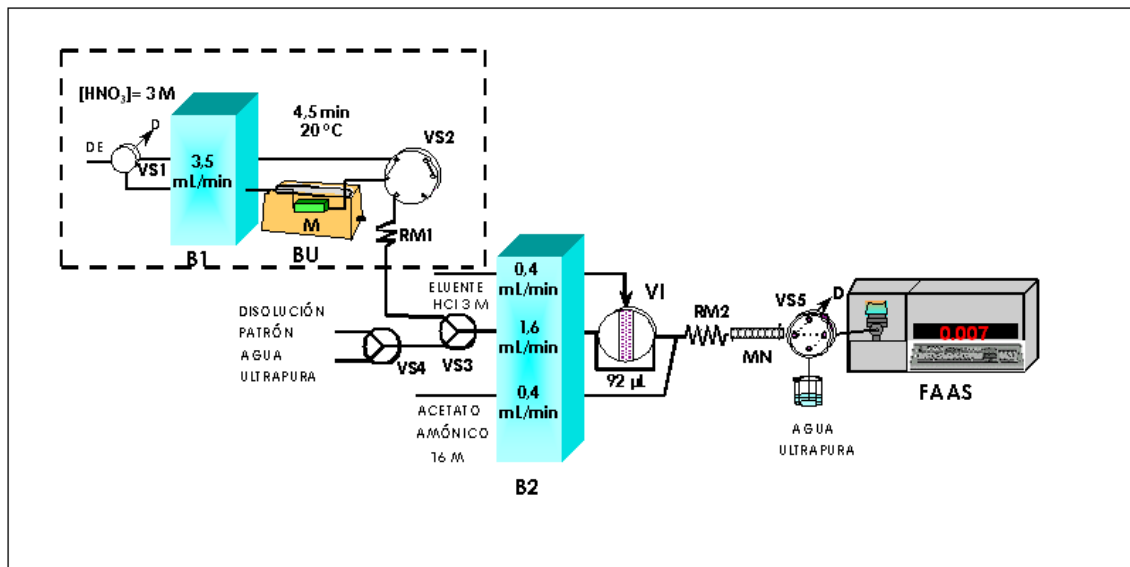
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Legumes	0,0600	0,01	0,07	0,04	0,07-3,24

**Táboa 250.** Resultados obtidos na determinación de cadmio nas mostras reais de legumes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cd] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Legumes	Lentellas	0,24 $\pm$ 0,02	0,24 $\pm$ 0,02	100,0
	Garbanzos 1	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	100,0
	Garbanzos 2	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	100,0
	Fabas	0,20 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	105,0
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
	2,50 x10 <sup>-3</sup>	5,00x10 <sup>-3</sup>	1	3,18

<sup>a</sup> [Cd]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

### Determinación do cadmio en mostras de cereais e derivados



**Figura 56.** Sistema FIA empregado para a determinación de cadmio en mostras de cereais e derivados indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 251.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cadmio en cereais e derivados

Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Cereais e derivados	0,0600	0,01	0,07	0,04	0,07-3,24

**Táboa 252.** Resultados obtidos na determinación de cadmio nas mostras reais de cereais e derivados. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cd] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Cereais e derivados</b>	Fariña de trigo	0,21 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	100,0
	Sémola de trigo	0,17 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01	105,9
	Fariña integral	0,15 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	93,3
	Fariña fina de millo	0,14 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,01	100,0
	Pan relado	0,17 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	100,0
	Obleas xeado	0,22 $\pm$ 0,02	0,22 $\pm$ 0,01	100,0
	Galletas	0,17 $\pm$ 0,01	0,17 $\pm$ 0,01	100,0
	Cereais de almorzo	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,01	100,0
	Cereais de cacao	0,18 $\pm$ 0,01	0,18 $\pm$ 0,01	100,0
	Arroz	0,16 $\pm$ 0,01	0,16 $\pm$ 0,01	100,0
	Espagueti	0,18 $\pm$ 0,02	0,19 $\pm$ 0,01	105,6
	Tallarín	0,22 $\pm$ 0,01	0,22 $\pm$ 0,01	100,0
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	0,83 $\times 10^{-3}$	5,15 $\times 10^{-3}$	0,56	2,20

<sup>a</sup> [Cd]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)



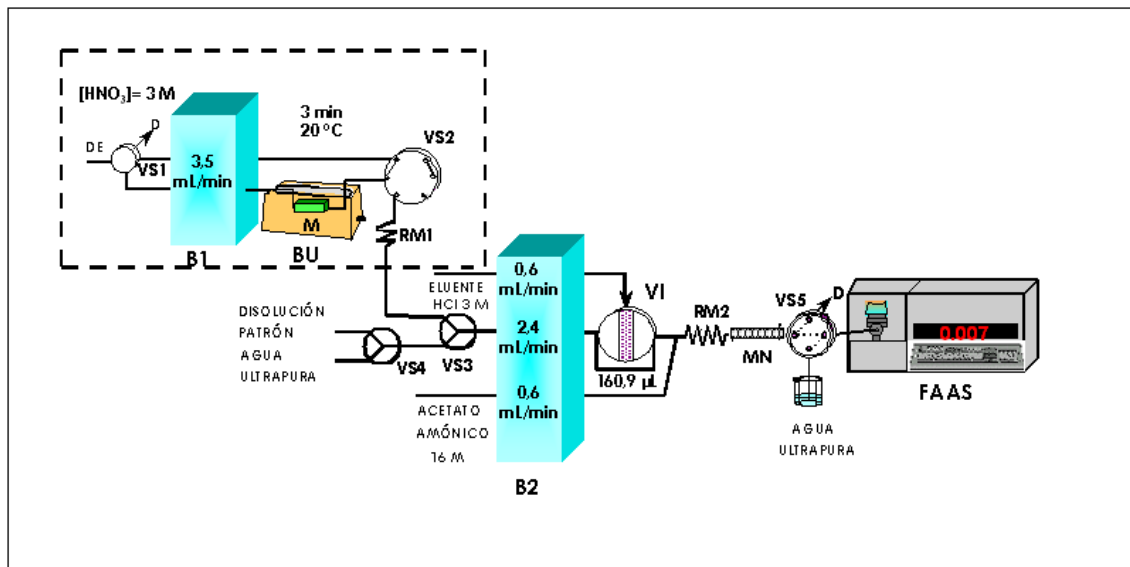
**Táboa 254.** Resultados obtidos na determinación de cadmio nas mostras reais de queixos e derivados. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cd] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Queixos e derivados	Queixo de ovella	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	100,0
	Queixo fresco	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	100,0
	Queixo relado	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	100,0
	Quesitos	0,10 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01	100,0
	Tranchetes	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,02	100,0
	Mozzarella	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	100,0
	logurt natural	0,09 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	100,0
	Callada	0,08 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	100,0
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	-1,25	$3,54 \times 10^{-3}$	1,00	2,36

<sup>a</sup> [Cd]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## 6.2 Determinación do chumbo

### Determinación do chumbo en mostras de moluscos e peixes



**Figura 58.** Sistema FIA empregado para a determinación de chumbo en mostras de moluscos e peixes, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 255.** Características analíticas do método proposto para a determinación do chumbo en moluscos e peixes

Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Moluscos e peixes	0,0800	0,25	0,92	0,81	0,92-42,27

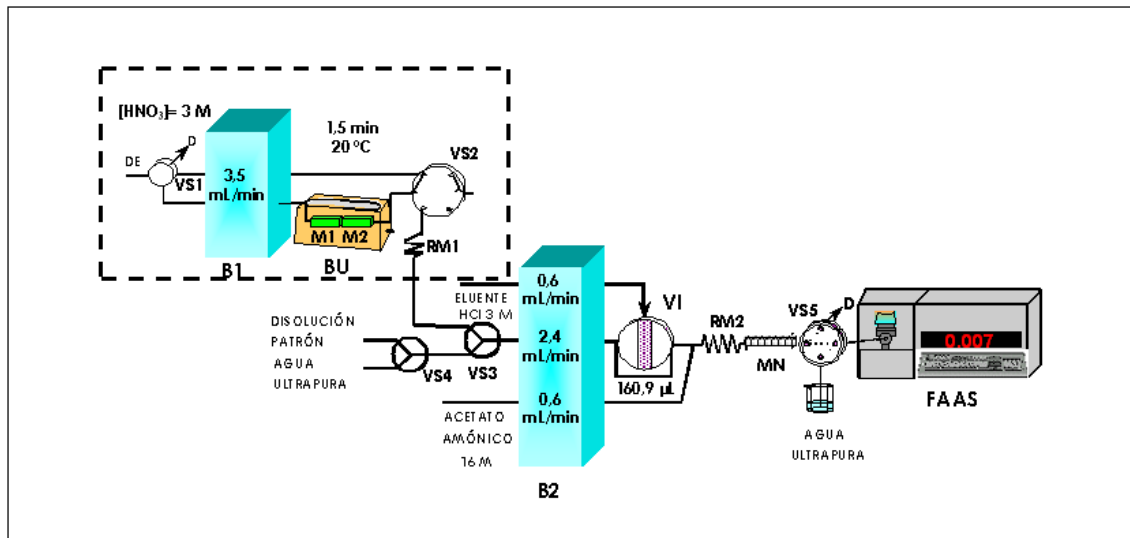
**Táboa 256.** Resultados obtidos na determinación de chumbo nas mostras reais de moluscos e peixes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Pb] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón 1	1,01 $\pm$ 0,03	0,98 $\pm$ 0,03	97,0
	Mexillón 2	ND	ND	-
	Mexillón 3	ND	ND	-
	Mexillón 4	ND	ND	-
	Mexillón 5	ND	ND	-
	Mexillón 6	0,96 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,01	101,0
	Mexillón 7	0,94 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,03	106,4
	Mexillón 8	ND	ND	-
	Mexillón 9	1,03 $\pm$ 0,09	1,10 $\pm$ 0,01	106,8
	Mexillón 10	ND	ND	-
	Ameixas 1	ND	ND	-
	Ameixas 2	ND	ND	-
	Atún	ND	ND	-
	Berberechos	ND	ND	-
	Cangrexo	ND	ND	-
	Langostinos	ND	ND	-
	Pescada	ND	ND	-
	Navallas	ND	ND	-
	Sardiñas	ND	ND	-
	Zamburiñas	ND	ND	-
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	2,75 $\times 10^{-2}$	4,65 $\times 10^{-2}$	1,18	3,18

<sup>a</sup> [Pb]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

ND. Non detectado

**Determinación do chumbo en mostras de vexetais**



**Figura 59.** Sistema FIA empregado para a determinación de chumbo en mostras de vexetais, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1 e M2, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 257.** Características analíticas do método proposto para a determinación do chumbo en vexetais

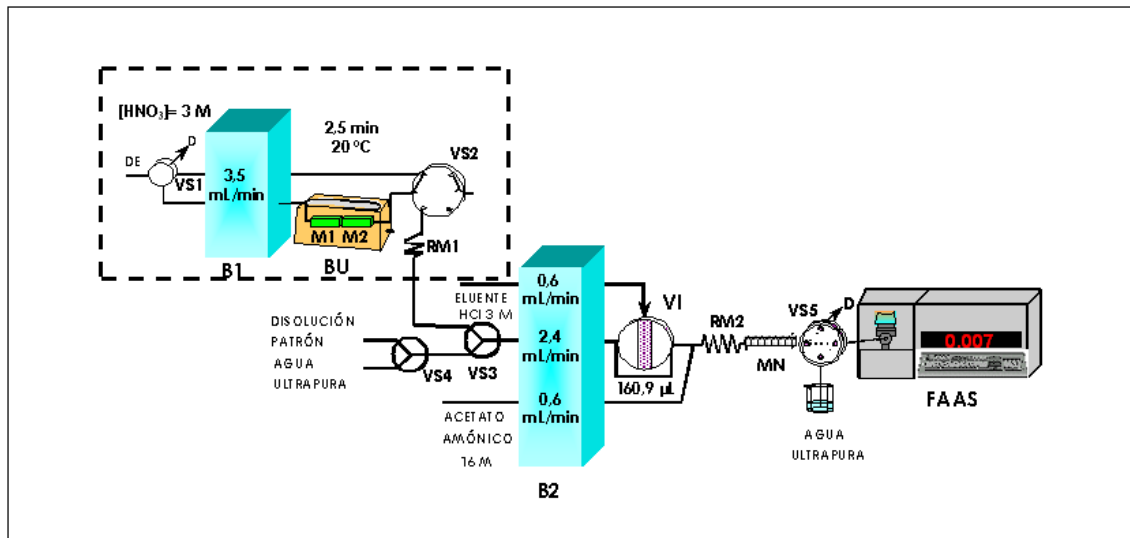
Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Vexetais	0,2400	0,08	0,31	0,27	0,31-14,09

**Táboa 258.** Resultados obtidos na determinación de chumbo nas mostras reais de vexetais. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Pb] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Vexetais</b>	Acelga	ND	ND	-
	Repolo	ND	ND	-
	Grelos	ND	ND	-
	Leituga	ND	ND	-
	Lombarda	ND	ND	-
	Patata	ND	ND	-
	Calanco	ND	ND	-
	Cenoria	ND	ND	-
	Té	ND	ND	-
	Tila	ND	ND	-
	Manzanilla	0,36 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,01	100,0
	Mazán	ND	ND	-
	Pera	ND	ND	-
	Plátano	ND	ND	-
Pexegos	ND	ND	-	
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
	0	0	0	-

<sup>a</sup> [Pb]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)  
 ND. Non detectado

**Determinación do chumbo en mostras de carnes**



**Figura 60.** Sistema FIA empregado para a determinación de chumbo en mostras de carnes, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1 e M2, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 259.** Características analíticas do método proposto para a determinación do chumbo en carnes

Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Carnes	0,2400	0,08	0,31	0,27	0,31-14,09

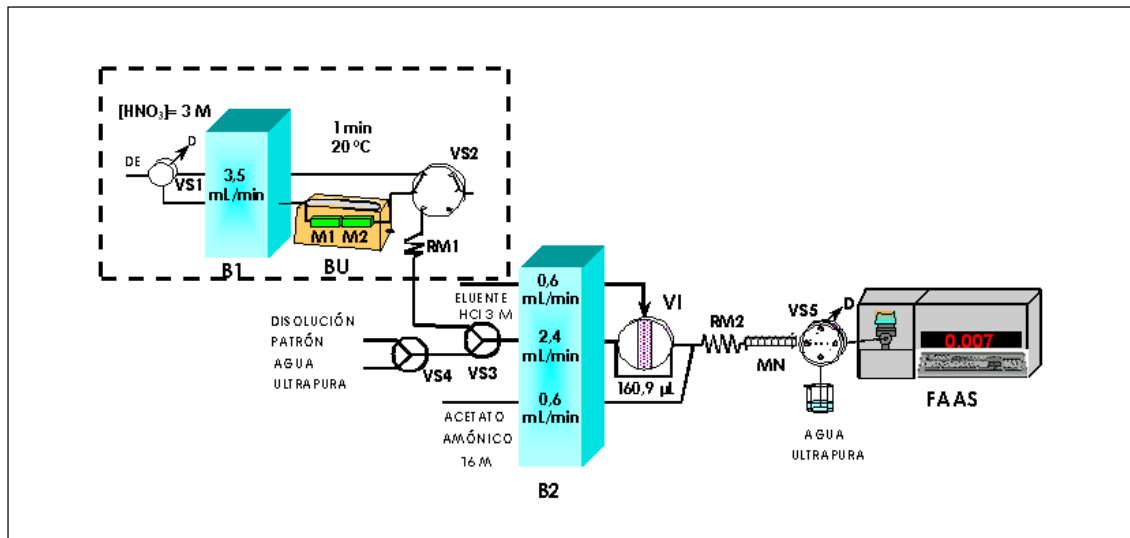
**Táboa 260.** Resultados obtidos na determinación de chumbo nas mostras reais de carnes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Pb] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Carnes</b>	Riles de carneiro	ND	ND	-
	Fígado de coello	ND	ND	-
	Polo	ND	ND	-
	Pavo	ND	ND	-
	Porco	ND	ND	-
	Carneiro	ND	ND	-
	Tenreira	ND	ND	-
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	-	-	-	-

<sup>a</sup> [Pb]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

ND. Non detectado

**Determinación do chumbo en mostras de froitos secos**



**Figura 61.** Sistema FIA empregado para a determinación de chumbo en mostras de froitos secos, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1 e M2, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 261.** Características analíticas do método proposto para a determinación do chumbo en froitos secos

Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Froitos secos	0,2400	0,08	0,31	0,27	0,31-14,09

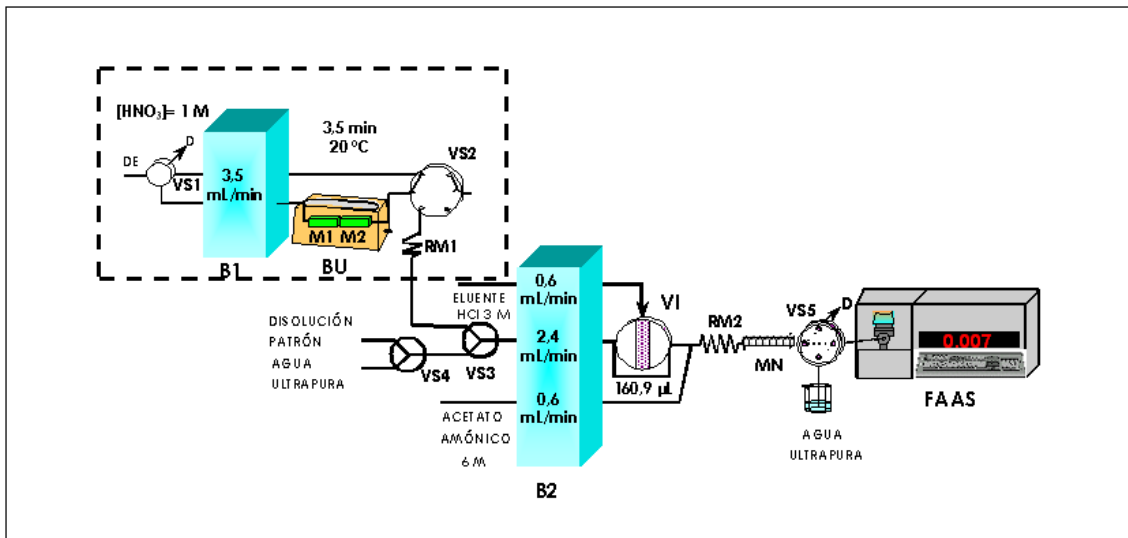
**Táboa 262.** Resultados obtidos na determinación de chumbo nas mostras reais de froitos secos. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Pb] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Froitos secos	Améndoas	ND	ND	-
	Avelás	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,02	100,0
	Cacahuetes	ND	ND	-
	Castañas	ND	ND	-
	Noces	ND	ND	-
	Pistachos	ND	ND	-
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
	0	0	0	-

<sup>a</sup> [Pb]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

ND. Non detectado

**Determinación do chumbo en mostras de legumes**



**Figura 62.** Sistema FIA empregado para a determinación de chumbo en mostras de legumes, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1 e M2, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 263.** Características analíticas do método proposto para a determinación do chumbo en legumes

Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Legumes	0,2400	0,08	0,31	0,27	0,31-14,09

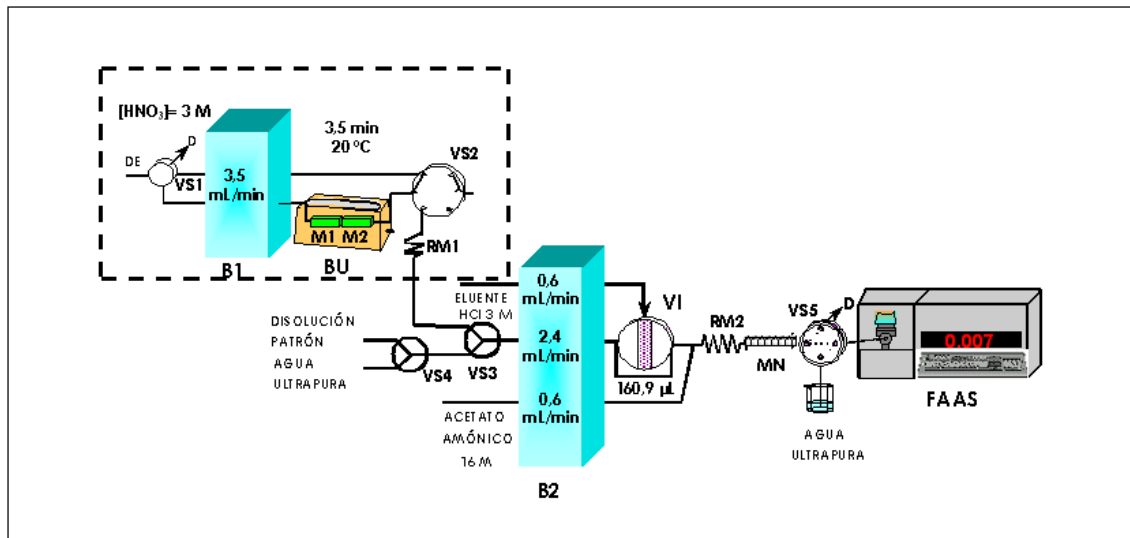
**Táboa 264.** Resultados obtidos na determinación de chumbo nas mostras reais de legumes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Pb] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Legumes	Lentellas	0,38 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01	102,6
	Garbanzos 1	ND	ND	-
	Garbanzos 2	0,38 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01	102,6
	Fabas	0,40 $\pm$ 0,01	0,39 $\pm$ 0,01	97,5
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
	3,33 x10 <sup>-3</sup>	1,15 x10 <sup>-2</sup>	0,5	4,30

<sup>a</sup> [Pb]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

ND. Non detectado

**Determinación do chumbo en mostras de cereais e derivados**



**Figura 63.** Sistema FIA empregado para a determinación de chumbo en mostras de cereais e derivados, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1 e M2, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 265.** Características analíticas do método proposto para a determinación do chumbo en cereais e derivados

Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Cereais e derivados	0,2400	0,08	0,31	0,27	0,31-14,09

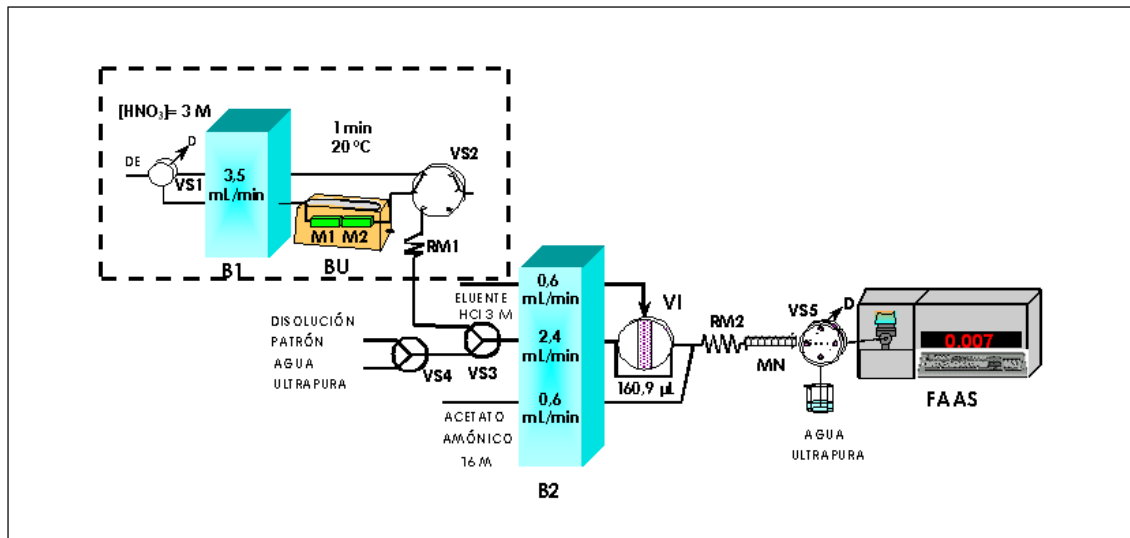
**Táboa 266.** Resultados obtidos na determinación de chumbo nas mostras reais de cereais e derivados. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Pb] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Cereais e derivados</b>	Fariña de trigo	0,43 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,01	100,0
	Sémola de trigo	0,33 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,02	100,0
	Fariña integral	ND	ND	-
	Fariña fina de millo	ND	ND	-
	Pan relado	ND	ND	-
	Obleas xeado	ND	ND	-
	Galletas	0,39 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,02	102,6
	Cereais de almorzo	ND	ND	-
	Cereais de cacao	0,34 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01	102,9
	Arroz	0,37 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,01	100,0
	Espagueti	0,38 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,02	100,0
	Tallarín	ND	ND	-
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	3,33 $\times 10^{-3}$	5,16 $\times 10^{-3}$	1,58	2,57

<sup>a</sup> [Pb]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

ND. Non detectado

**Determinación do chumbo en mostras de queixos e derivados**



**Figura 64.** Sistema FIA empregado para a determinación de chumbo en mostras de queixos e derivados, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1 e M2, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 267.** Características analíticas do método proposto para a determinación do chumbo en queixos e derivados

Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Queixos e derivados	0,3200	0,06	0,23	0,20	0,23-10,57

**Táboa 268.** Resultados obtidos na determinación de chumbo nas mostras reais de queixos e derivados. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

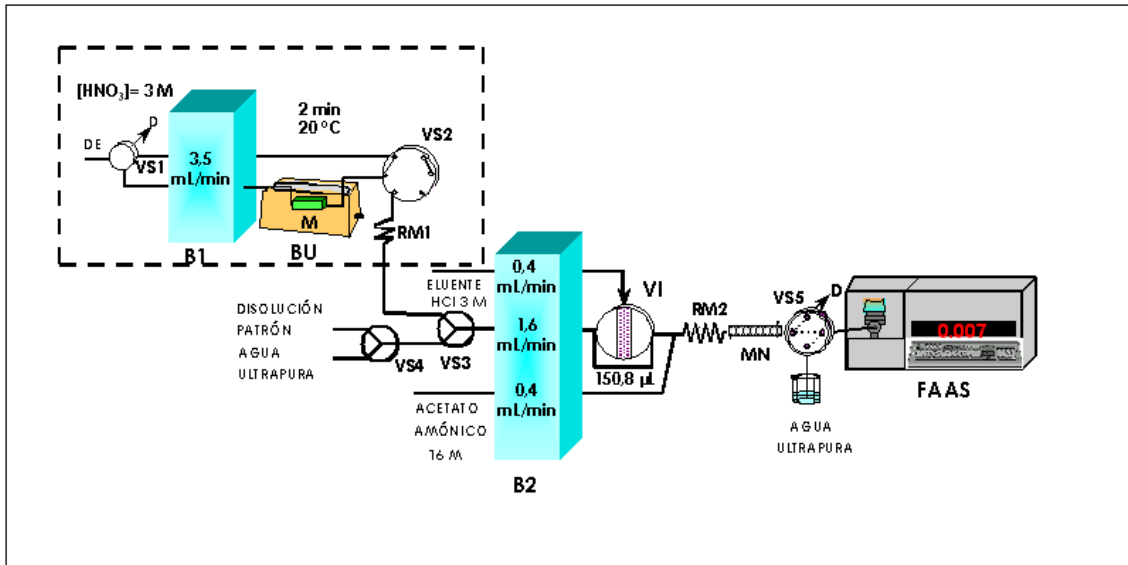
Tipo de mostra	Mostra	[Pb] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Queixos e derivados	Queixo de ovella	0,36 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,01	102,8
	Queixo fresco	0,34 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,02	97,1
	Queixo relado	0,40 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,01	97,5
	Quesitos	0,46 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,02	100,0
	Tranchetes	0,32 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,02	103,1
	Mozzarella	ND	ND	-
	logurt natural	0,51 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,01	102,0
	Callada	0,42 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01	100,0
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	1,43 $\times 10^{-3}$	9,00 $\times 10^{-3}$	0,42	2,45

<sup>a</sup> [Pb]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

ND. Non detectado

### 6.3 Determinación do cobalto

#### Determinación do cobalto en mostras de moluscos e peixes



**Figura 65.** Sistema FIA empregado para a determinación de cobalto en mostras de moluscos e peixes, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 269.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cobalto en moluscos e peixes

Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD	LOQ	Sensibilidade	Intervalo lineal (µg/g)
		(µg/g)	(µg/g)	(µg/g)	
<b>Moluscos e peixes</b>	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58

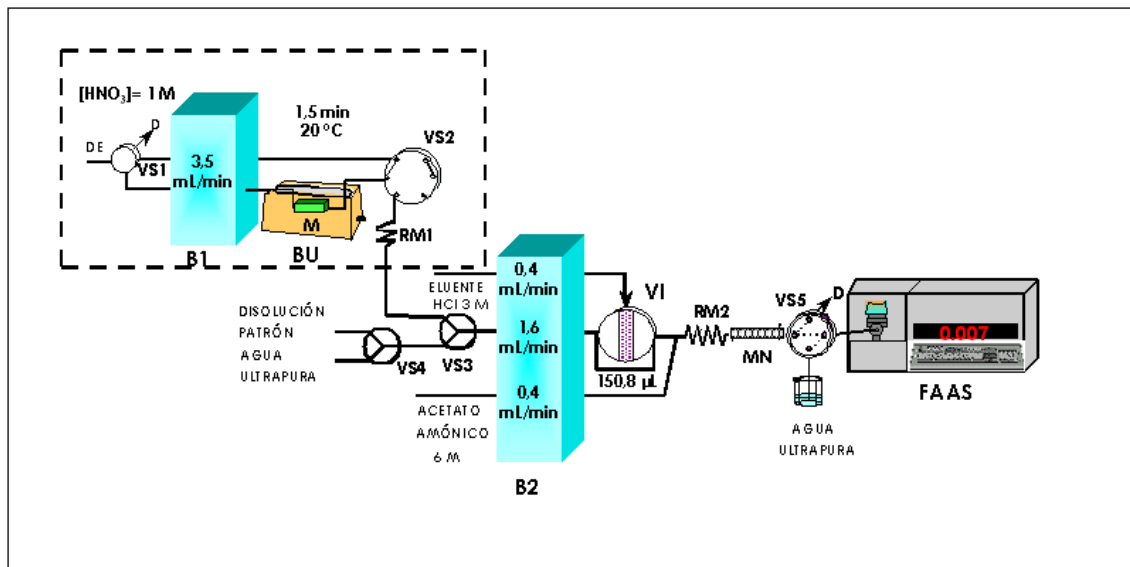
**Táboa 270.** Resultados obtidos na determinación de cobalto nas mostras reais de moluscos e peixes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Co] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón 1	0,60 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,01	103,3
	Mexillón 2	0,93 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,01	101,1
	Mexillón 3	1,00 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,03	100,0
	Mexillón 4	0,94 $\pm$ 0,02	0,93 $\pm$ 0,01	98,9
	Mexillón 5	0,74 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,01	98,6
	Mexillón 6	0,76 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,02	98,7
	Mexillón 7	1,04 $\pm$ 0,02	1,03 $\pm$ 0,01	99,0
	Mexillón 8	1,08 $\pm$ 0,01	1,07 $\pm$ 0,01	99,1
	Mexillón 9	0,93 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,02	98,9
	Mexillón 10	0,60 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,02	100,0
	Ameixas 1	0,54 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01	103,7
	Ameixas 2	0,55 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01	103,6
	Atún	0,47 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01	97,9
	Berberechos	ND	ND	-
	Cangrexo	ND	ND	-
	Langostinos	0,45 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,01	106,7
	Pescada	0,60 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,01	101,7
	Navallas	0,58 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,00	101,7
	Sardiñas	0,57 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01	98,2
	Zamburiñas	0,58 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,01	101,7
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	2,78 $\times 10^{-3}$	1,36 $\times 10^{-2}$	0,86	2,11

<sup>a</sup> [Co]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

ND. Non detectado.

**Determinación do cobalto en mostras de vexetais**



**Figura 66.** Sistema FIA empregado para a determinación de cobalto en mostras de vexetais, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, micolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, micolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 271.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cobalto en vexetais

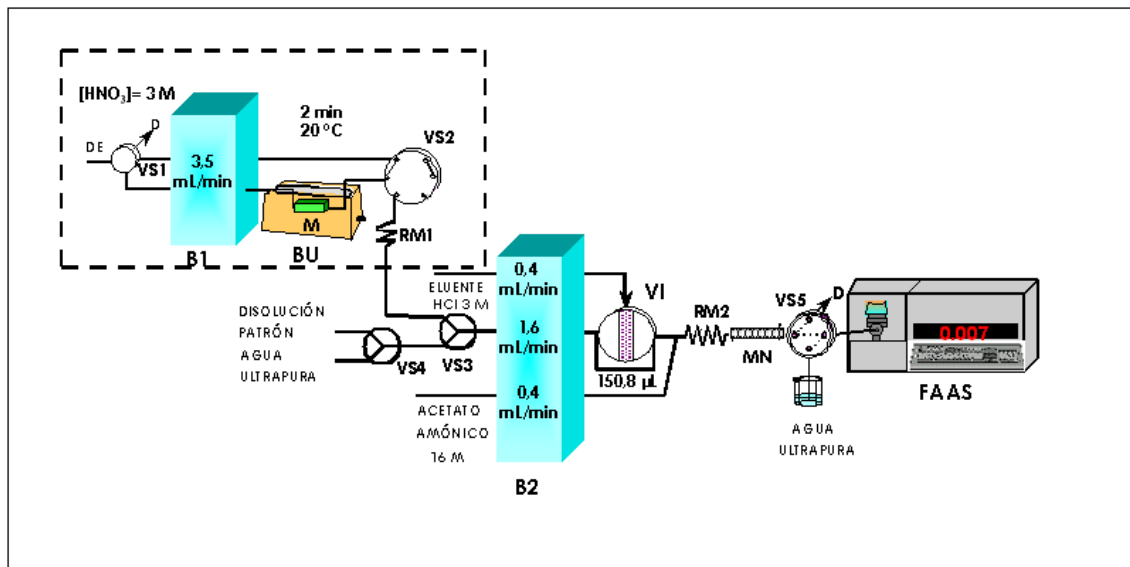
Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Vexetais	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58

**Táboa 272.** Resultados obtidos na determinación de cobalto nas mostras reais de vexetais. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Co] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Vexetais</b>	Acelga	0,80 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,01	101,2
	Repolo	0,76 $\pm$ 0,02	0,75 $\pm$ 0,01	98,7
	Grelos	0,49 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,01	100,0
	Leituga	0,98 $\pm$ 0,01	0,99 $\pm$ 0,01	101,0
	Lombarda	0,72 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,01	97,2
	Patata	0,94 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,01	101,1
	Calanco	0,44 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,01	100,0
	Cenoria	0,85 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,01	101,2
	Té	0,49 $\pm$ 0,00	0,49 $\pm$ 0,02	100,0
	Tila	0,47 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,01	100,0
	Manzanilla	0,59 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,00	101,7
	Mazán	0,54 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01	100,0
	Pera	0,44 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01	95,5
	Plátano	0,44 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,01	97,7
	Pexegos	0,48 $\pm$ 0,01	0,48 $\pm$ 0,01	100,0
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
	6,67 x10 <sup>-4</sup>	1,03 x10 <sup>-2</sup>	0,25	2,15

<sup>a</sup> [Co]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

### Determinación do cobalto en mostras de carnes



**Figura 67.** Sistema FIA empregado para a determinación de cobalto en mostras de carnes, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 273.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cobalto en carnes

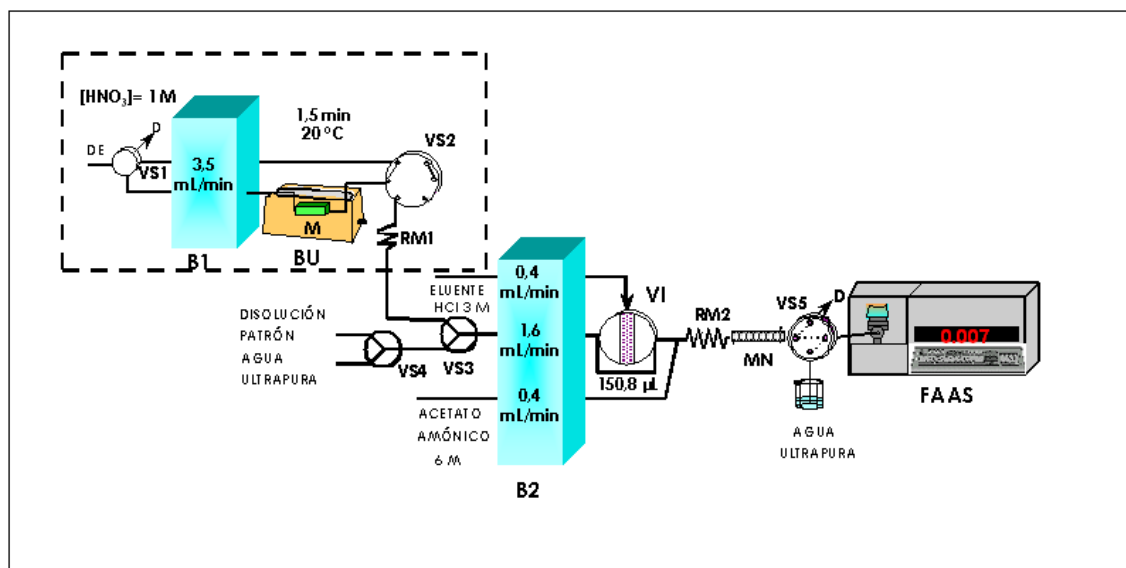
Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Carnes	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58

**Táboa 274.** Resultados obtidos na determinación de cobalto nas mostras reais de carnes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Co] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Carnes</b>	Riles de carneiro	0,67 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,01	100,0
	Fígado de coello	0,75 $\pm$ 0,01	0,74 $\pm$ 0,01	98,7
	Polo	0,88 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,01	100,0
	Pavo	0,80 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,01	98,7
	Porco	0,99 $\pm$ 0,01	0,97 $\pm$ 0,02	98,0
	Carneiro	0,49 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,01	100,0
	Tenreira	0,58 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,01	103,4
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	$-2,86 \times 10^{-3}$	$12,5 \times 10^{-3}$	0,60	2,45

<sup>a</sup> [Co]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

### Determinación do cobalto en mostras de froitos secos



**Figura 68.** Sistema FIA empregado para a determinación de cobalto en mostras de froitos secos, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 275.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cobalto en froitos secos

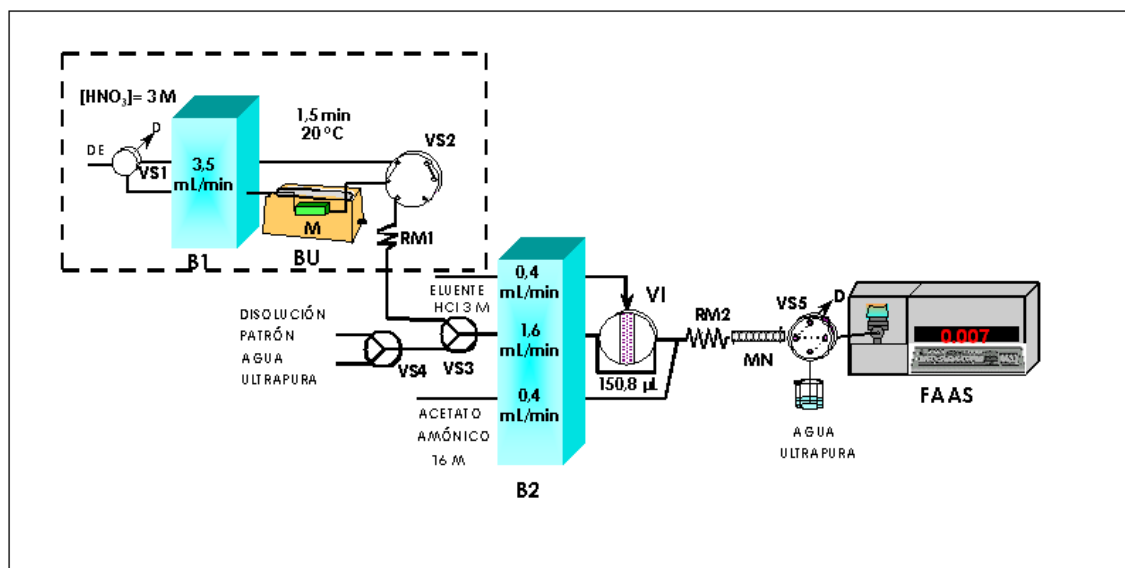
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Froitos secos	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58

**Táboa 276.** Resultados obtidos na determinación de cobalto nas mostras reais de froitos secos. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Co] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Froitos secos	Améndoas	0,61 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,02	103,3
	Avelás	0,63 $\pm$ 0,01	0,60 $\pm$ 0,01	95,2
	Cacahuetes	0,77 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,01	97,4
	Castañas	0,81 $\pm$ 0,01	0,81 $\pm$ 0,01	100,0
	Noces	0,74 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,02	98,6
	Pistachos	0,61 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,01	101,6
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t calculada	t crítica
	-5,00 $\times 10^{-3}$	1,87 $\times 10^{-2}$	0,65	2,57

<sup>a</sup> [Co]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación do cobalto en mostras de legumes



**Figura 69.** Sistema FIA empregado para a determinación de cobalto en mostras de legumes, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 277.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cobalto en legumes

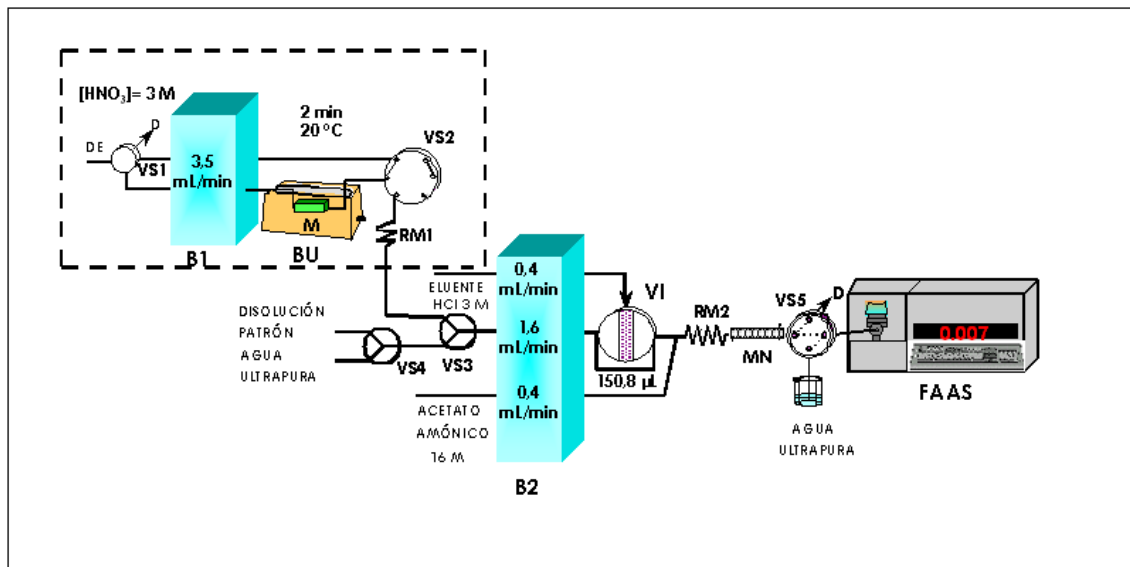
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Legumes	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58

**Táboa 278.** Resultados obtidos na determinación de cobalto nas mostras reais de legumes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Co] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Legumes	Lentellas	0,75 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,01	102,7
	Garbanzos 1	0,66 $\pm$ 0,02	0,64 $\pm$ 0,01	97,0
	Garbanzos 2	0,65 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,01	100,0
	Fabas	0,57 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,02	98,2
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
	-2,50 $\times 10^{-3}$	1,71 $\times 10^{-2}$	0,29	3,18

<sup>a</sup> [Co]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

**Determinación do cobalto en mostras de cereais e derivados**



**Figura 70.** Sistema FIA empregado para a determinación de cobalto en mostras de cereais e derivados, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 279.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cobalto en cereais e derivados

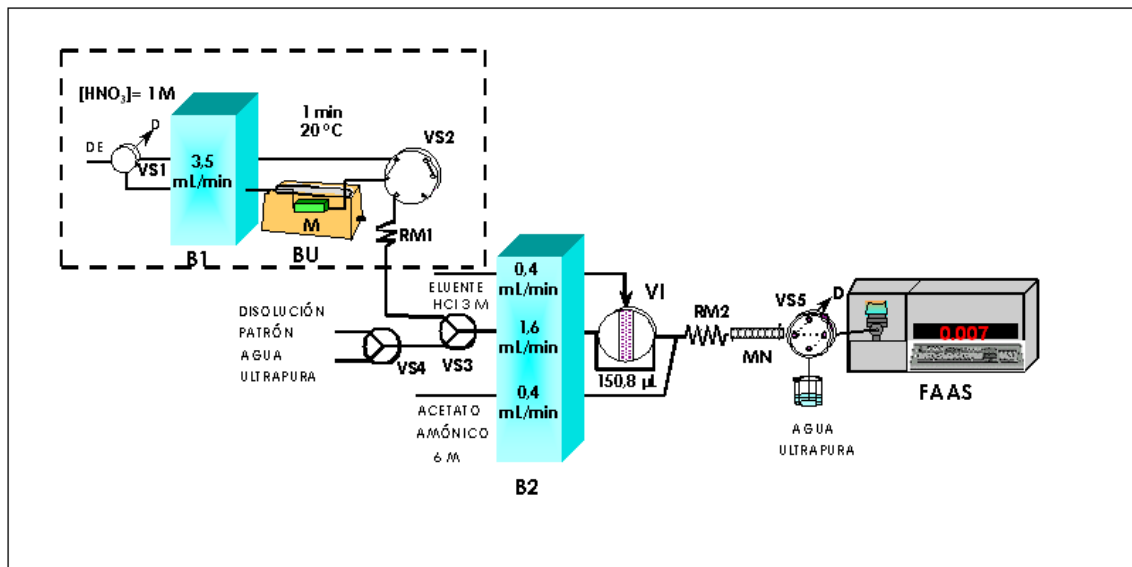
Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Cereais e derivados	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58

**Táboa 280.** Resultados obtidos na determinación de cobalto nas mostras reais de cereais e derivados. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Co] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Cereais e derivados	Fariña de trigo	0,77 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,01	98,7
	Sémola de trigo	0,83 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,01	100,0
	Fariña integral	0,85 $\pm$ 0,01	0,87 $\pm$ 0,01	102,4
	Fariña fina de millo	0,91 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,02	98,9
	Pan relado	0,65 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,01	103,1
	Obleas xeadas	0,61 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,02	98,4
	Galletas	0,66 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,01	98,5
	Cereais de almorzo	0,71 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,02	98,6
	Cereais de cacao	0,63 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,02	100,0
	Arroz	0,86 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,02	100,0
	Espagueti	0,65 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,01	100,0
	Tallarín	0,85 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,01	101,2
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t calculada	t crítica
	0	1,13 $\times 10^{-2}$	0	2,20

<sup>a</sup> [Co]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

### Determinación do cobalto en mostras de queixos e derivados



**Figura 71.** Sistema FIA empregado para a determinación de cobalto en mostras de queixos e derivados, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 281.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cobalto en queixos e derivados

Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Queixos e derivados	0,0600	0,11	0,35	0,37	0,35-9,58

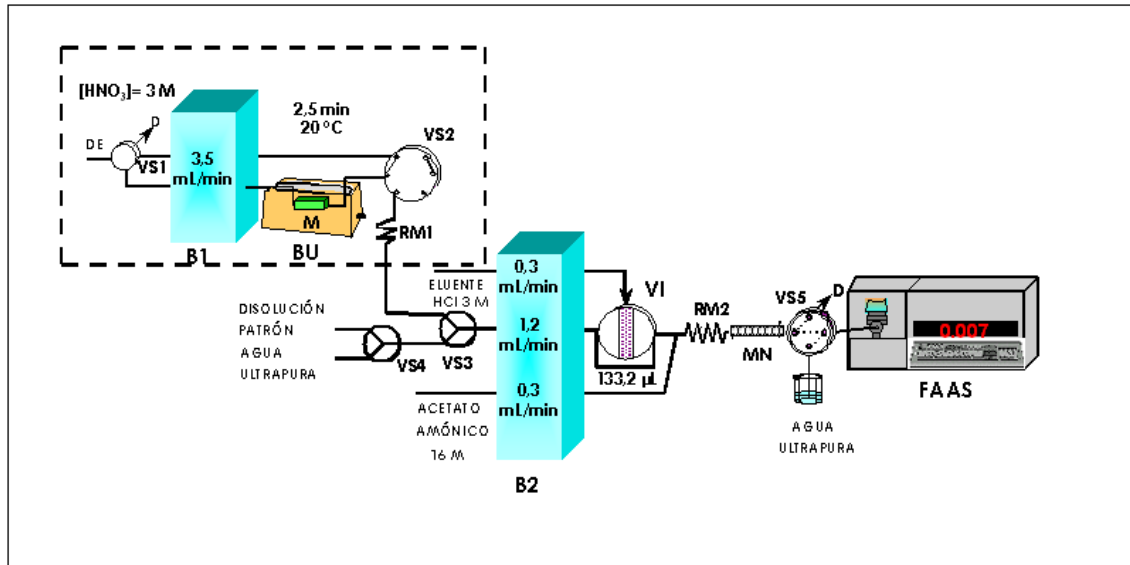
**Táboa 282.** Resultados obtidos na determinación de cobalto nas mostras reais de queixos e derivados. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Co] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Queixos e derivados	Queixo de ovella	0,68 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,02	101,5
	Queixo fresco	0,59 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,01	101,7
	Queixo relado	0,70 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,01	97,1
	Quesitos	0,87 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,02	101,1
	Tranchetes	0,84 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,01	100,0
	Mozzarella	0,92 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,01	98,9
	logurt natural	0,74 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,01	95,9
	Callada	0,85 $\pm$ 0,02	0,86 $\pm$ 0,02	101,2
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
	-2,50 $\times 10^{-3}$	1,58 $\times 10^{-2}$	0,45	2,36

<sup>a</sup> [Co]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## 6.4 Determinación do cromo

### Determinación do cromo en mostras de moluscos e peixes



**Figura 72.** Sistema FIA empregado para a determinación de cromo en mostras de moluscos e peixes, indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 283.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cromo en moluscos e peixes

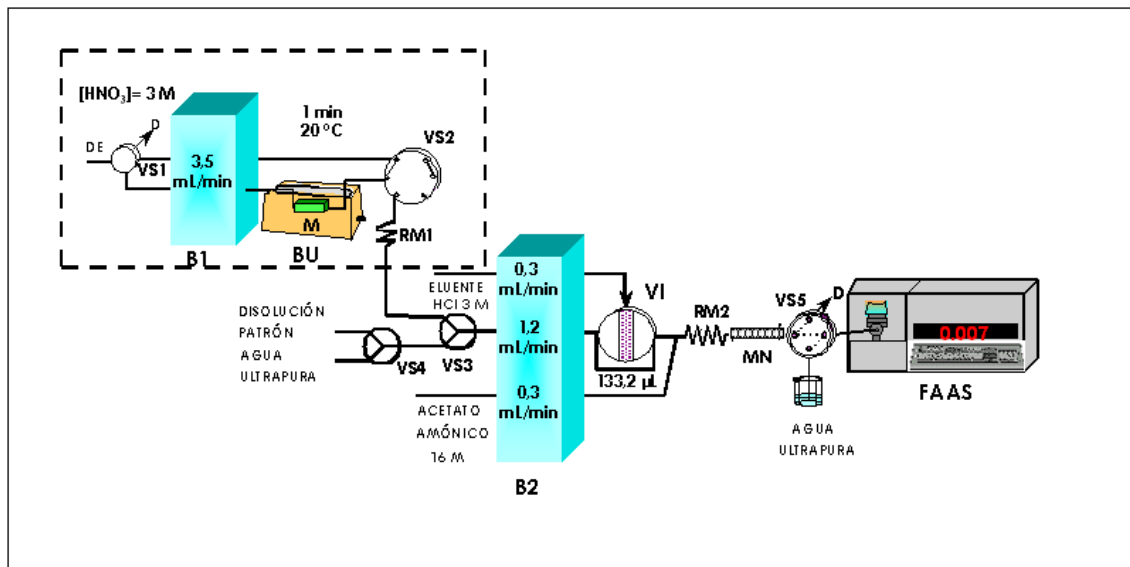
Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Moluscos e peixes	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09

**Táboa 284.** Resultados obtidos na determinación de cromo nas mostras reais de moluscos e peixes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cr] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón 1	0,54 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,01	96,3
	Mexillón 2	0,77 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,01	103,9
	Mexillón 3	0,76 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,03	94,7
	Mexillón 4	0,70 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,03	100,0
	Mexillón 5	0,65 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,01	96,9
	Mexillón 6	0,71 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,01	102,8
	Mexillón 7	0,50 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,02	96,0
	Mexillón 8	0,52 $\pm$ 0,02	0,49 $\pm$ 0,02	94,2
	Mexillón 9	0,48 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,01	106,2
	Mexillón 10	0,53 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,01	103,8
	Ameixas 1	0,77 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,00	101,3
	Ameixas 2	0,61 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,01	100,0
	Atún	0,47 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01	97,9
	Berberechos	0,65 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,01	101,5
	Cangrexo	0,42 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,02	102,4
	Langostinos	0,68 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,01	98,5
	Pescada	0,59 $\pm$ 0,02	0,59 $\pm$ 0,01	100,0
	Navallas	0,55 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01	98,2
	Sardiñas	0,49 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,01	95,9
	Zamburiñas	0,45 $\pm$ 0,02	0,46 $\pm$ 0,01	102,2
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	-2,00 $\times 10^{-3}$	1,91 $\times 10^{-2}$	0,46	2,09

<sup>a</sup> [Cr]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de cromo en muestras de vegetais



**Figura 73** Sistema FIA empregado para a determinación de cromo en mostrás de vexetais indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 285.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cromo en vexetais

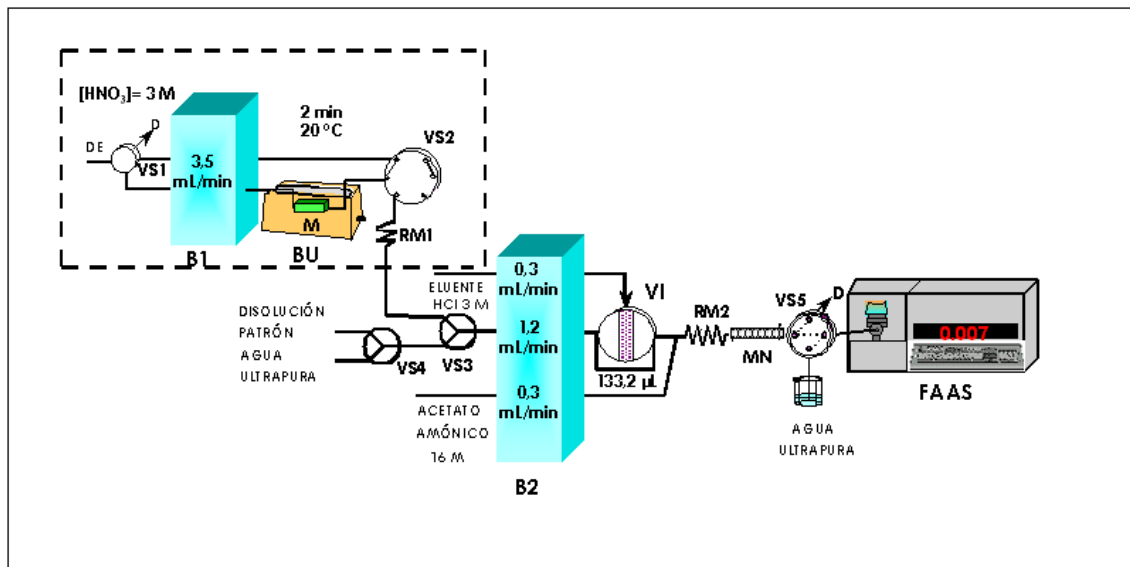
Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Vexetais	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09

**Táboa 286.** Resultados obtidos na determinación de cromo nas mostras reais de vexetais. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cr] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Vexetais</b>	Acelga	0,73 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,01	100,0
	Repolo	0,65 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,01	98,5
	Grelos	0,70 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,01	95,7
	Leituga	0,81 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,02	101,2
	Lombarda	0,65 $\pm$ 0,02	0,64 $\pm$ 0,01	98,5
	Patata	0,73 $\pm$ 0,01	0,72 $\pm$ 0,01	98,6
	Calanco	0,71 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,01	98,6
	Cenoria	0,61 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,02	103,3
	Té	0,76 $\pm$ 0,01	0,77 $\pm$ 0,02	101,3
	Tila	0,67 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,01	101,5
	Manzanilla	0,75 $\pm$ 0,02	0,74 $\pm$ 0,01	98,7
	Mazán	0,78 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,02	97,4
	Pera	0,61 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,01	100,0
	Plátano	0,73 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,01	97,3
	Pexegos	0,65 $\pm$ 0,01	0,66 $\pm$ 0,02	101,5
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
	-4,00 x10 <sup>-3</sup>	1,40 x10 <sup>-2</sup>	1,10	2,15

<sup>a</sup> [Cr]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de cromo en muestras de carnes



**Figura 74** Sistema FIA empleado para la determinación de cromo en muestras de carnes indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. DE, disolución extractante; B1 y B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contiene la muestra sólida; RM1 y RM2, reactores de mezcla; D, detector; VI, válvula de inyección; MN, minicolumna que contiene la resina quelante y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 287.** Características analíticas del método propuesto para la determinación del cromo en carnes

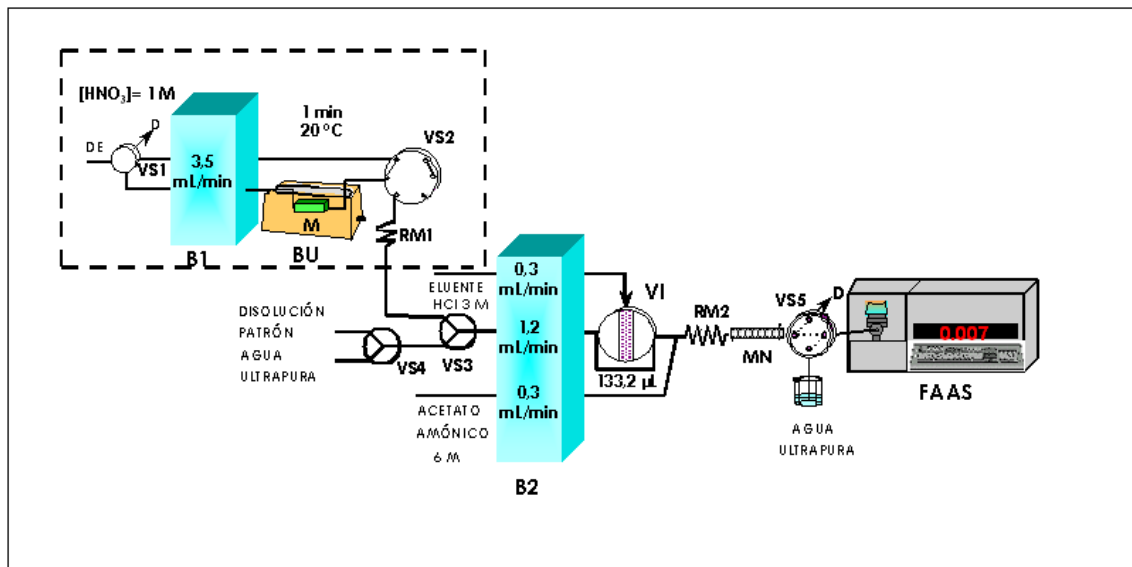
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Carne	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09

**Táboa 288.** Resultados obtidos na determinación de cromo nas mostras reais de carnes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cr] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Carnes</b>	Riles de carneiro	0,97 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,02	97,9
	Fígado de coello	0,92 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,01	97,8
	Polo	0,78 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,01	97,4
	Pavo	0,62 $\pm$ 0,02	0,64 $\pm$ 0,01	103,2
	Porco	0,74 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,02	97,3
	Carneiro	0,90 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01	97,8
	Tenreira	0,70 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,02	101,4
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	-1,00 $\times 10^{-2}$	1,73 $\times 10^{-2}$	1,53	2,45

<sup>a</sup> [Cr]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de cromo en muestras de frutos secos



**Figura 75** Sistema FIA empleado para la determinación de cromo en muestras de frutos secos indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contiene a muestra sólida; RM1 e RM2, reactores de mezcla; D, detector; VI, válvula de inyección; MN, minicolumna que contiene a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chapa.

**Táboa 289.** Características analíticas del método propuesto para la determinación del cromo en frutos secos

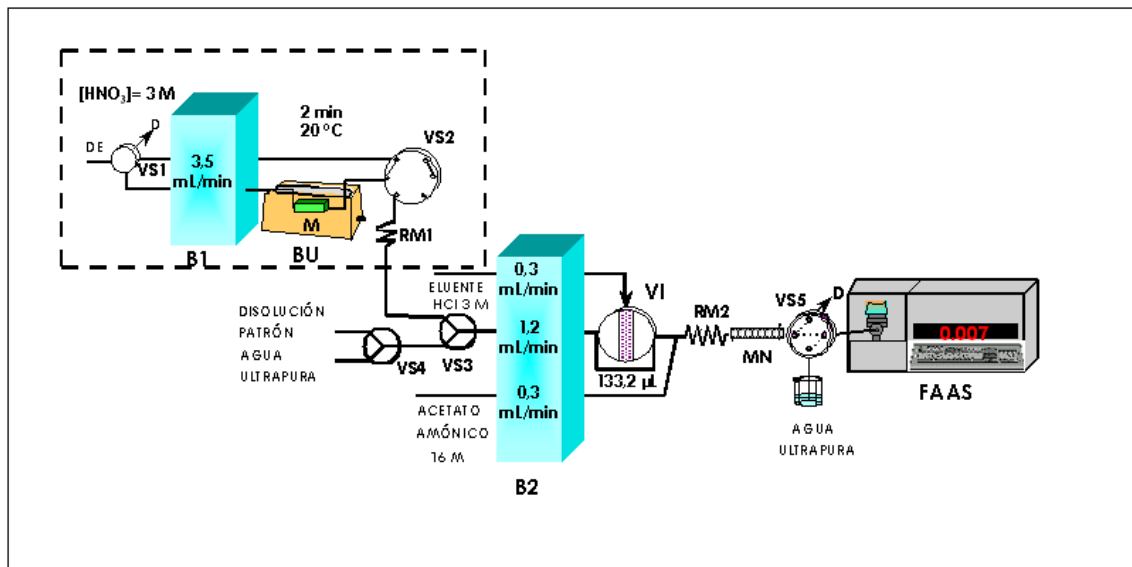
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Frutos secos	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09

**Táboa 290.** Resultados obtidos na determinación de cromo nas mostras reais de froitos secos. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cr] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Froitos secos	Améndoas	0,84 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,01	97,6
	Avelás	0,73 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,02	100,0
	Cacahuetes	0,83 $\pm$ 0,02	0,82 $\pm$ 0,01	98,8
	Castañas	0,90 $\pm$ 0,01	0,90 $\pm$ 0,01	100,0
	Noces	0,68 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,01	101,5
	Pistachos	0,76 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,01	100,0
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t calculada	t crítica
	-3,33 $\times 10^{-3}$	1,03 $\times 10^{-2}$	0,79	2,57

<sup>a</sup> [Cr]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de cromo en muestras de legumes



**Figura 76.** Sistema FIA empleado para la determinación de cromo en muestras de legumes indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. DE, disolución extractante; B1 y B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contiene la muestra sólida; RM1 y RM2, reactores de mezcla; D, desecho; VI, válvula de inyección; MN, minicolumna que contiene la resina quelante y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chapa.

**Táboa 291.** Características analíticas del método propuesto para la determinación del cromo en legumes

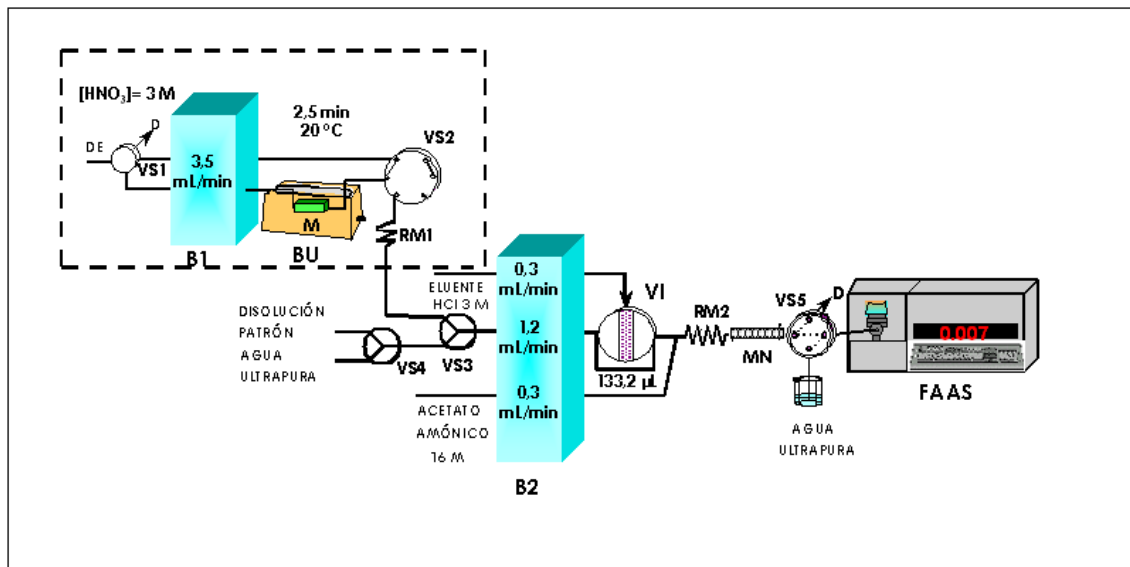
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Legumes	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09

**Táboa 292.** Resultados obtidos na determinación de cromo nas mostras reais de legumes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cr] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Legumes	Lentellas	$0,83 \pm 0,01$	$0,87 \pm 0,01$	104,8
	Garbanzos 1	$0,85 \pm 0,01$	$0,85 \pm 0,02$	100,0
	Garbanzos 2	$0,85 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,01$	102,4
	Fabas	$0,73 \pm 0,01$	$0,70 \pm 0,02$	95,9
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	$7,50 \times 10^{-3}$	$2,99 \times 10^{-2}$	0,50	3,18

<sup>a</sup> [Cr]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de cromo en muestras de cereais e derivados



**Figura 77.** Sistema FIA empregado para a determinación de cromo en mostrás de cereais e derivados indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 293.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cromo en cereais e derivados

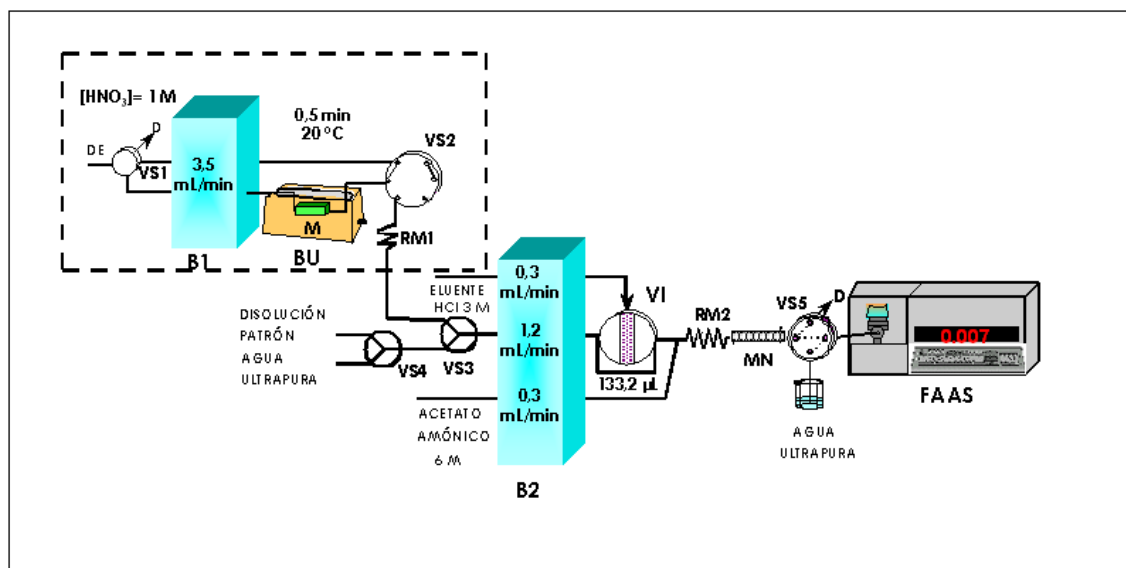
Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Cereais e derivados	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09

**Táboa 294.** Resultados obtidos na determinación de cromo nas mostras reais de cereais e derivados. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cr] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Cereais e derivados</b>	Fariña de trigo	0,71 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,02	95,8
	Sémola de trigo	0,92 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,01	100,0
	Fariña integral	0,85 $\pm$ 0,01	0,85 $\pm$ 0,01	100,0
	Fariña fina de millo	0,86 $\pm$ 0,01	0,85 $\pm$ 0,02	98,8
	Pan relado	0,85 $\pm$ 0,02	0,86 $\pm$ 0,01	101,2
	Obleas xeado	0,79 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,01	100,0
	Galletas	0,78 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,01	103,8
	Cereais de almorzo	0,73 $\pm$ 0,02	0,75 $\pm$ 0,02	102,7
	Cereais de cacao	0,78 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,01	102,6
	Arroz	0,89 $\pm$ 0,02	0,91 $\pm$ 0,02	102,2
	Espagueti	0,82 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,02	102,4
	Tallarín	0,84 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,02	101,2
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	7,50 $\times 10^{-3}$	16,6 $\times 10^{-2}$	1,57	2,20

<sup>a</sup> [Cr]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de cromo en muestras de queixos e derivados



**Figura 78.** Sistema FIA empregado para a determinación de cromo en mostrás de queixos e derivados indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 295.** Características analíticas do método proposto para a determinación do cromo en queixos e derivados

Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Queixos e derivados	0,0600	0,09	0,33	0,36	0,33-11,09

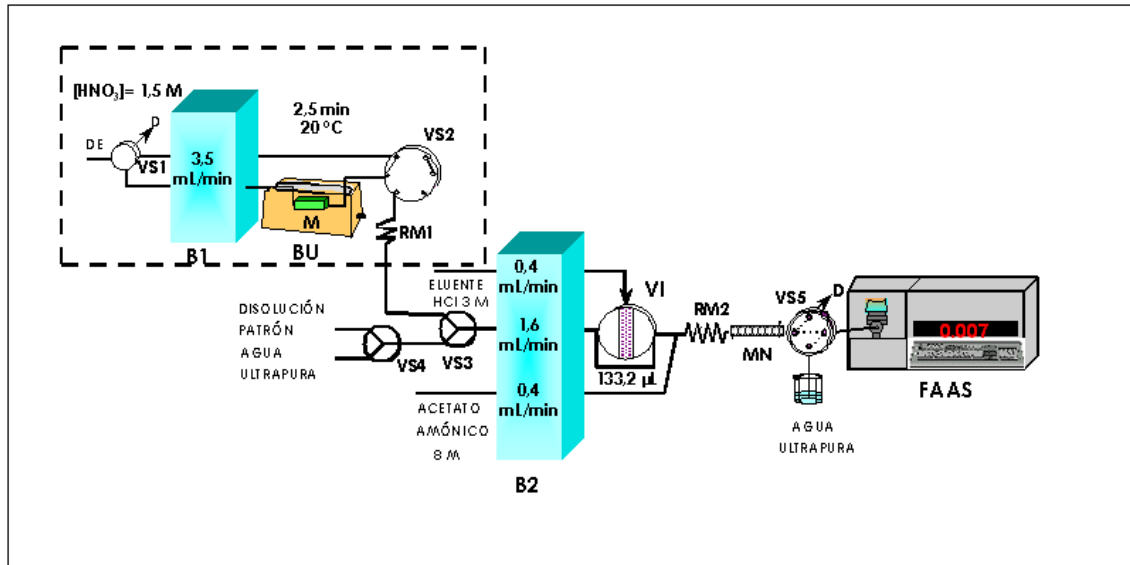
**Táboa 296.** Resultados obtidos na determinación de cromo nas mostras reais de queixos e derivados. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Cr] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Queixos e derivados	Queixo de ovella	0,74 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,01	102,7
	Queixo fresco	0,61 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,01	100,0
	Queixo relado	0,86 $\pm$ 0,02	0,88 $\pm$ 0,01	102,3
	Quesitos	0,91 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,01	98,9
	Tranchetes	0,88 $\pm$ 0,01	0,88 $\pm$ 0,01	100,0
	Mozzarella	0,81 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,02	97,5
	logurt natural	0,73 $\pm$ 0,02	0,71 $\pm$ 0,02	97,3
	Callada	0,72 $\pm$ 0,02	0,69 $\pm$ 0,02	95,8
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
	-5,00 $\times 10^{-3}$	1,85 $\times 10^{-2}$	0,76	2,36

<sup>a</sup> [Cr]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## 6.5 Determinación do níquel

### Determinación do níquel en mostras de moluscos e peixes



**Figura 79.** Sistema FIA empregado para a determinación de níquel en mostras de moluscos e peixes indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 297.** Características analíticas do método proposto para a determinación do níquel en moluscos e peixes

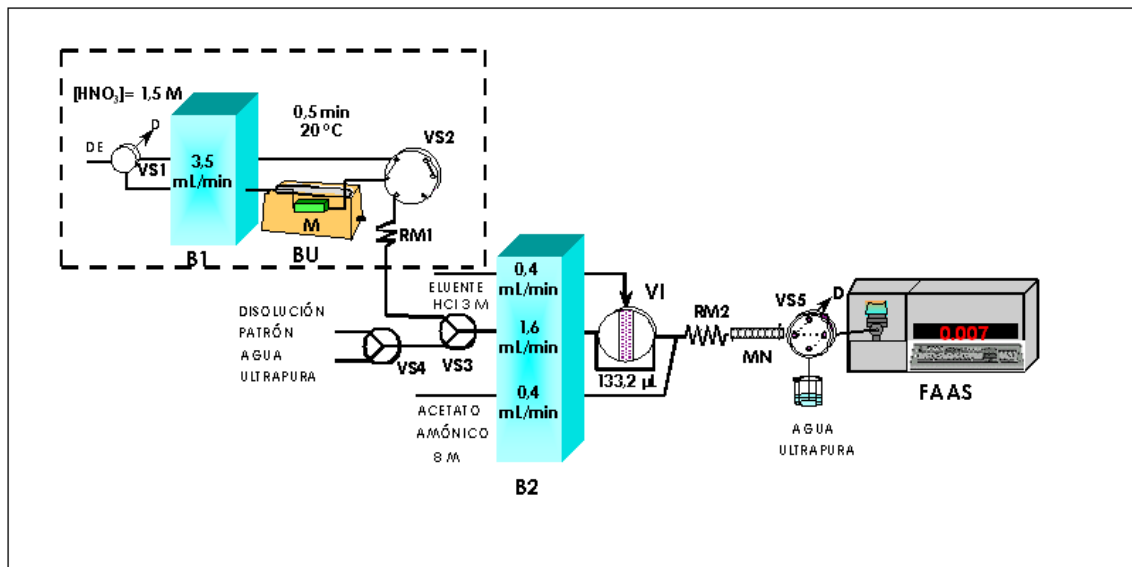
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Moluscos e peixes	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33

**Táboa 298.** Resultados obtidos na determinación de níquel nas mostras reais de moluscos e peixes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Ni] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Moluscos e peixes</b>	Mexillón 1	0,80 $\pm$ 0,00	0,77 $\pm$ 0,01	96,3
	Mexillón 2	0,97 $\pm$ 0,03	1,04 $\pm$ 0,03	107,2
	Mexillón 3	0,74 $\pm$ 0,02	0,75 $\pm$ 0,01	101,4
	Mexillón 4	0,53 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,01	101,9
	Mexillón 5	0,67 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,01	101,5
	Mexillón 6	0,66 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,01	98,5
	Mexillón 7	0,66 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,01	103,0
	Mexillón 8	0,72 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,01	100,0
	Mexillón 9	0,97 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,01	100,0
	Mexillón 10	0,84 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,00	98,8
	Ameixas 1	0,43 $\pm$ 0,01	0,41 $\pm$ 0,01	95,3
	Ameixas 2	0,46 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01	100,0
	Atún	0,50 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,00	102,0
	Berberechos	0,63 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,00	96,8
	Cangrexo	0,57 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,00	101,8
	Langostinos	0,72 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,01	100,0
	Pescada	0,52 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,01	100,0
	Navallas	0,52 $\pm$ 0,02	0,55 $\pm$ 0,01	105,8
	Sardiñas	0,55 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,00	103,6
	Zamburiñas	0,48 $\pm$ 0,01	0,46 $\pm$ 0,01	95,8
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	2,00 $\times 10^{-3}$	2,21 $\times 10^{-2}$	0,40	2,09

<sup>a</sup> [Ni]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de níquel en muestras de vexetais



**Figura 80.** Sistema FIA empregado para a determinación de níquel en mostrás de vexetais indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 299.** Características analíticas do método proposto para a determinación do níquel en vexetais

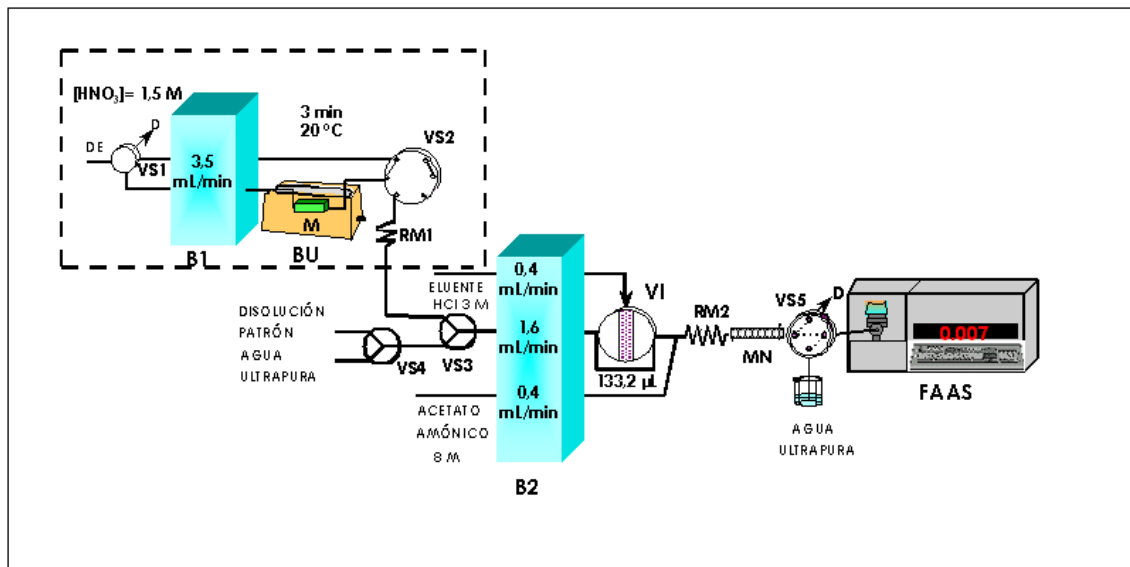
Mostra	Cantidade de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Vexetais	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33

**Táboa 300.** Resultados obtidos na determinación de níquel nas mostras reais de vexetais. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Ni] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Vexetais	Acelga	0,60 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,01	103,3
	Repolo	0,83 $\pm$ 0,02	0,86 $\pm$ 0,00	103,6
	Grelos	1,10 $\pm$ 0,07	1,15 $\pm$ 0,03	104,5
	Leituga	0,97 $\pm$ 0,01	1,01 $\pm$ 0,01	104,1
	Lombarda	0,78 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,01	102,6
	Patata	0,81 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,01	96,3
	Calanco	0,50 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,01	104,0
	Cenoria	0,65 $\pm$ 0,00	0,63 $\pm$ 0,01	96,9
	Té	0,71 $\pm$ 0,01	0,74 $\pm$ 0,01	104,2
	Tila	0,58 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01	96,6
	Manzanilla	0,65 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,01	98,5
	Mazán	0,84 $\pm$ 0,01	0,87 $\pm$ 0,00	103,6
	Pera	0,62 $\pm$ 0,01	0,59 $\pm$ 0,01	95,2
	Plátano	0,70 $\pm$ 0,01	0,68 $\pm$ 0,01	97,1
Pexegos	0,65 $\pm$ 0,02	0,62 $\pm$ 0,01	95,4	
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	t <sub>crítica</sub>
	5,33 $\times 10^{-3}$	2,88 $\times 10^{-2}$	0,72	2,15

<sup>a</sup> [Ni]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de níquel en muestras de carne



**Figura 81.** Sistema FIA empleado para a determinación de níquel en muestras de carnes indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, micolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, micolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 301.** Características analíticas do método proposto para a determinación do níquel en carnes

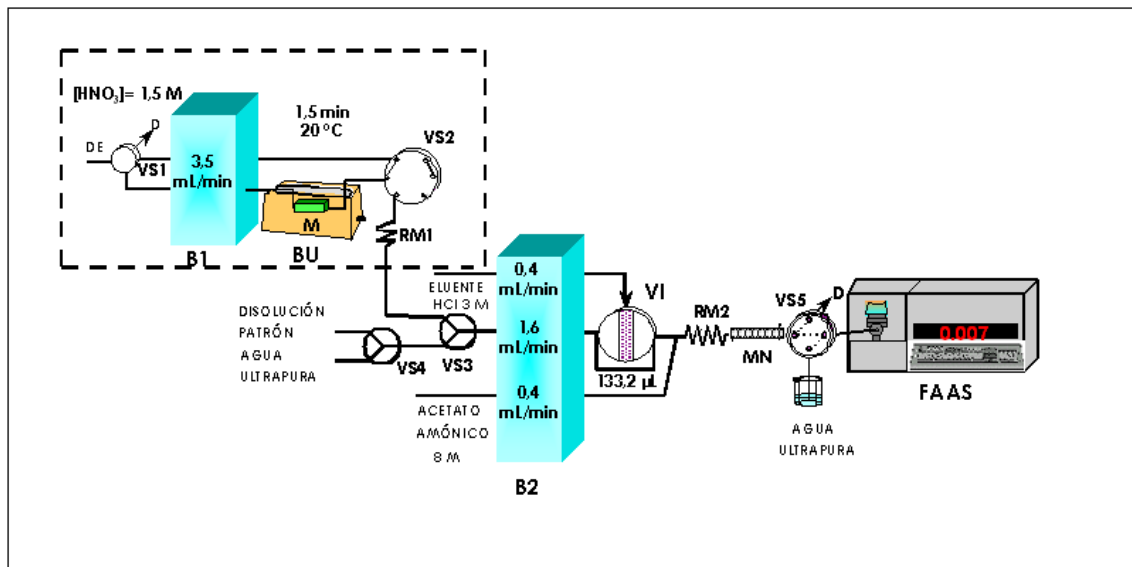
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidad (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Carnes	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33

**Táboa 302.** Resultados obtidos na determinación de níquel nas mostras reais de carnes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Ni] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Carnes</b>	Riles de carneiro	1,10 $\pm$ 0,03	1,08 $\pm$ 0,02	98,2
	Fígado de coello	0,91 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,00	103,3
	Polo	0,63 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,01	101,6
	Pavo	0,74 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,00	102,7
	Porco	0,61 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,01	103,3
	Carneiro	0,72 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,01	98,6
	Tenreira	0,92 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,00	98,9
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	5,71 $\times 10^{-3}$	1,90 $\times 10^{-2}$	0,79	2,45

<sup>a</sup> [Ni]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de níquel en muestras de frutos secos



**Figura 82.** Sistema FIA empleado para la determinación de níquel en muestras de frutos secos indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contiene a muestra sólida; RM1 e RM2, reactores de mezcla; D, desfeite; VI, válvula de inyección; MN, minicolumna que contiene a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 303.** Características analíticas del método propuesto para la determinación del níquel en frutos secos

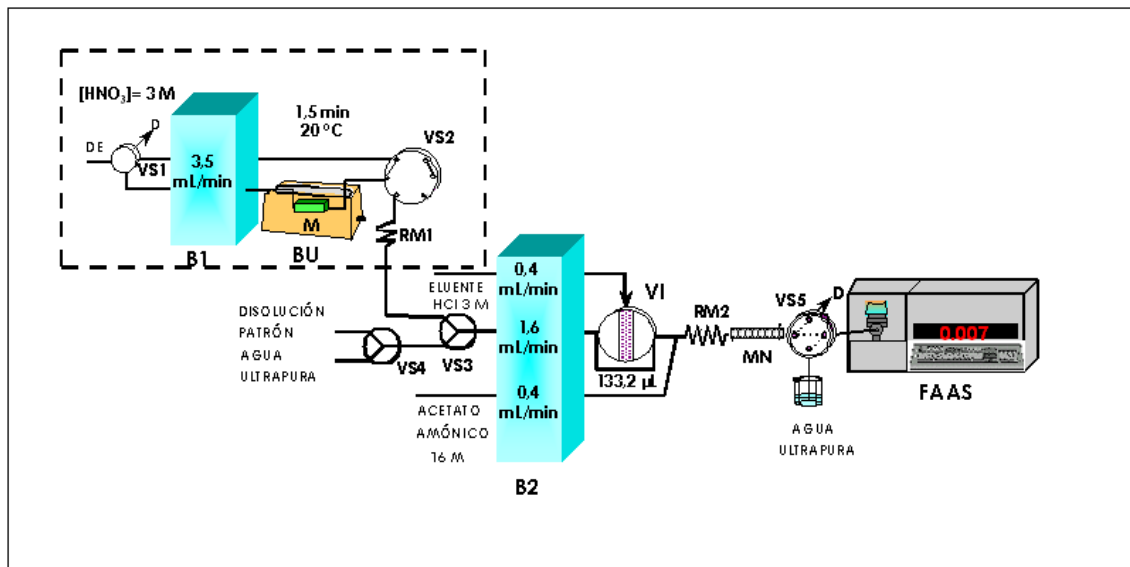
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Fruitos secos	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33

**Táboa 304.** Resultados obtidos na determinación de níquel nas mostras reais de froitos secos. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Ni] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Froitos secos	Améndoas	0,52 $\pm$ 0,01	0,53 $\pm$ 0,01	101,9
	Avelás	0,48 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,01	100,0
	Cacahuetes	0,75 $\pm$ 0,02	0,75 $\pm$ 0,01	100,0
	Castañas	0,90 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 0,00	102,2
	Noces	0,55 $\pm$ 0,01	0,56 $\pm$ 0,01	101,8
	Pistachos	0,63 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,01	98,4
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t calculada	t crítica
	5,00 $\times 10^{-3}$	1,05 $\times 10^{-2}$	1,17	2,57

<sup>a</sup> [Ni]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de níquel en muestras de legumes



**Figura 83.** Sistema FIA empleado para la determinación de níquel en muestras de legumes indicando los valores óptimos de las variables implicadas en el proceso. DE, disolución extractante; B1 y B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contiene la muestra sólida; RM1 y RM2, reactores de mezcla; D, detector; VI, válvula de inyección; MN, minicolumna que contiene la resina quelante y FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chamas.

**Táboa 305.** Características analíticas del método propuesto para la determinación del níquel en legumes

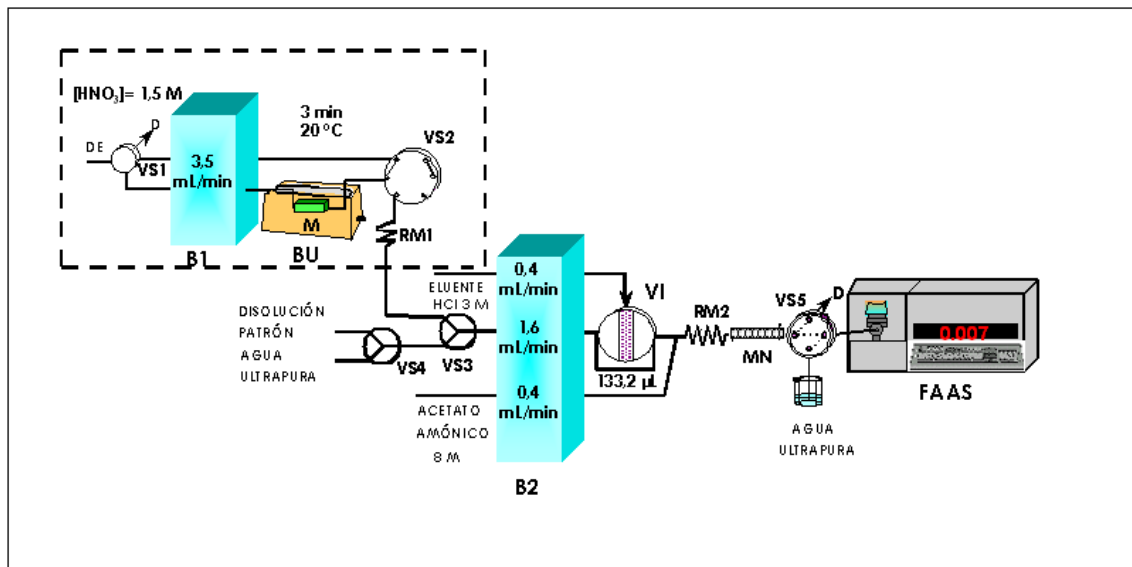
Mostra	Cantidad de muestra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidad ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Legumes	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33

**Táboa 306.** Resultados obtidos na determinación de níquel nas mostras reais de legumes. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Ni] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Legumes	Lentellas	$0,86 \pm 0,01$	$0,88 \pm 0,00$	102,3
	Garbanzos 1	$0,59 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,01$	98,3
	Garbanzos 2	$0,55 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,00$	100,0
	Fabas	$0,49 \pm 0,01$	$0,48 \pm 0,00$	98,0
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	0	$1,41 \times 10^{-2}$	0	3,18

<sup>a</sup> [Ni]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

## Determinación de níquel en muestras de cereais e derivados



**Figura 84.** Sistema FIA empregado para a determinación de níquel en mostras de cereais e derivados indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeite; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 307.** Características analíticas do método proposto para a determinación do níquel en cereais e derivados

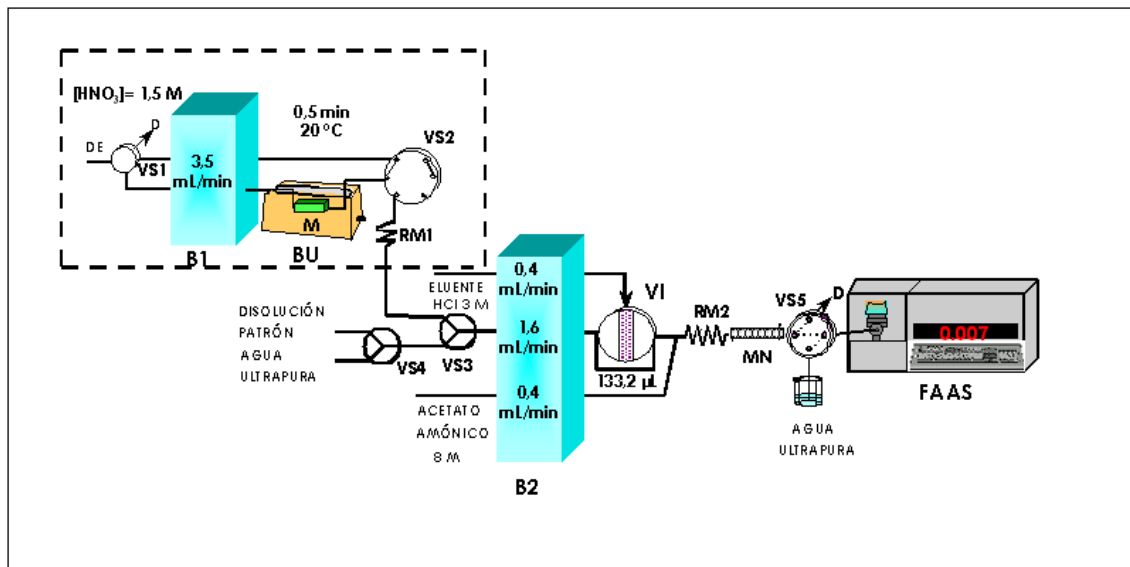
Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD ( $\mu\text{g/g}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/g}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g/g}$ )
Cereais e derivados	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33

**Táboa 308.** Resultados obtidos na determinación de níquel nas mostras reais de cereais e derivados. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Ni] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
<b>Cereais e derivados</b>	Fariña de trigo	0,67 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,01	100,0
	Sémola de trigo	ND	ND	-
	Fariña integral	0,82 $\pm$ 0,03	0,79 $\pm$ 0,02	96,3
	Fariña fina de millo	0,95 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,01	100,0
	Pan relado	0,66 $\pm$ 0,01	0,67 $\pm$ 0,01	101,5
	Obleas xeado	0,51 $\pm$ 0,01	0,52 $\pm$ 0,01	102,0
	Galletas	0,61 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,02	104,9
	Cereais de almorzo	0,61 $\pm$ 0,01	0,62 $\pm$ 0,01	101,6
	Cereais de cacao	0,78 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,01	100,0
	Arroz	0,54 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01	100,0
	Espagueti	0,56 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01	101,8
	Tallarín	0,56 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,01	98,2
<b>Test-t de parellas</b>	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	$t_{\text{calculada}}$	$t_{\text{crítica}}$
	2,73 $\times 10^{-3}$	1,49 $\times 10^{-2}$	0,61	2,23

<sup>a</sup> [Ni]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3)  
ND. Non detectado.

## Determinación de níquel en muestras de queixos e derivados



**Figura 85.** Sistema FIA empregado para a determinación de níquel en mostrás de queixos e derivados indicando os valores óptimos das variables implicadas no proceso. DE, disolución extractante; B1 e B2, bombas peristálticas; VS1-VS5, válvulas de selección; BU, baño de ultrasóns; M1, minicolumna que contén a mostra sólida; RM1 e RM2, reactores de mestura; D, desfeito; VI, válvula de inxección; MN, minicolumna que contén a resina quelante e FAAS, espectrofotómetro de absorción atómica con chama.

**Táboa 309.** Características analíticas do método proposto para a determinación do níquel en queixos e derivados

Mostra	Cantidad de mostra (g)	LOD (µg/g)	LOQ (µg/g)	Sensibilidade (µg/g)	Intervalo lineal (µg/g)
Queixos e derivados	0,0600	0,11	0,38	0,29	0,38-4,33

**Táboa 310.** Resultados obtidos na determinación de níquel nas mostras reais de queixos e derivados. Aplicación do Test-t de parellas ós resultados obtidos.

Tipo de mostra	Mostra	[Ni] ( $\mu\text{g/g}$ , peso seco) <sup>a</sup>		(% Eficacia na extracción)
		Método de referencia	Método proposto	
Queixos e derivados	Queixo de ovella	0,46 $\pm$ 0,01	0,45 $\pm$ 0,01	97,8
	Queixo fresco	0,57 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,00	94,7
	Queixo relado	0,42 $\pm$ 0,01	0,42 $\pm$ 0,01	100,0
	Quesitos	0,57 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,01	100,0
	Tranchetes	0,61 $\pm$ 0,01	0,61 $\pm$ 0,00	100,0
	Mozzarella	0,49 $\pm$ 0,01	0,49 $\pm$ 0,01	100,0
	logurt natural	0,84 $\pm$ 0,01	0,84 $\pm$ 0,00	100,0
	Callada	0,86 $\pm$ 0,00	0,85 $\pm$ 0,00	98,8
Test-t de parellas	$\bar{X}$ das diferencias	$\sigma$ das diferencias	t <sub>calculada</sub>	T <sub>crítica</sub>
	-6,25 x10 <sup>-3</sup>	1,06 x10 <sup>-2</sup>	1,67	2,36

<sup>a</sup> [Ni]= media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

# **CONCLUSIÓN**



## CONCLUSIÓNS

- Diseñáronse e optimizáronse diferentes dispositivos que permitiron a preconcentración dos distintos metais en liña a través dun sistema FIA e empregando para tal fin diferentes resinas quelantes comerciais (Chelite P, con grupos aminometilfosfónicos, Serdolit Che, con grupos iminodiacético e Duolite GT-73, con grupos tiol). O estudo e optimización das variables que inflúen no proceso de preconcentración permitiu a elección da resina máis adecuada para a preconcentración de cada un dos metais.
- Diseñáronse e optimizáronse diferentes dispositivos que permitiron o tratamento dunha mostra sólida en liña a través dun sistema FIA e empregando para tal fin a enerxía dos ultrasóns. Estudouse a extracción continua dos metais cadmio, chumbo, cobalto, cromo e níquel das seguintes mostras de natureza alimenticia: moluscos e peixes, vexetais, carnes, froitos secos, legumes, cereais e derivados e queixos e derivados.
- Diseñouse e optimizouse por primeira vez un sistema de fluxo continuo que incorpora ambos dispositivos, de extracción e preconcentración, e que permitiu a extracción cuantitativa dos distintos metais das mostras sólidas, a preconcentración dos mesmos nas resinas quelantes e a súa detección mediante Espectrometría de Absorción Atómica con Chama (FAAS). Os dous dispositivos que forman parte do sistema FIA final foron optimizados cun deseño multivariable de Plackett-Burman, o que

permittedo diminuír en gran medida o número de experimentos a realizar nesta etapa. Os resultados obtidos indican que este sistema ofrece unha serie de vantaxes adicionais á automatización e miniaturización do proceso:

- Son procedementos rápidos. A maioría dos procesos precisan dun tempo de sonicación entre 0,5 e 3 minutos, excepto no caso da extracción do cadmio en cereais e derivados, que require de 4,5 minutos de sonicación. Ademais, estes procesos realízanse en tódolos casos a temperatura ambiente (20 °C), o que fai que a preparación do sistema para realizar a análise sexa máis rápida.
- O analito de interese extraése cuantitativamente empregando disolucións de ácido nítrico pouco concentradas (1-3 M).
- Os metais extraídos da mostra sólida preconcéntranse nas resinas quelantes a caudais relativamente elevados (1,5–3 mL/min).
- Os metais retidos nas resinas quelantes elúense con volumes pequenos de ácido clorhídrico 3 M (92-160,9 µL), o que permite acadar factores de preconcentración entre 24,4 e 11,8, considerando un volume de extracto ácido de 2 mL.
- Non dan lugar a contaminación das mostras nin a perdas de analitos.

- 
- Non expoñen ó analista a riscos químicos.
  
  - Non requiren instrumentación cara.
  
  - Como se miniaturizou o proceso, emprégase unha cantidade pequena de mostra (60-80 mg) e reactivos (2 mL de disolución extractante) en tódolos casos excepto na determinación de chumbo, onde se requiren 240 mg de mostra e 4 mL de disolución extractante (agás nas mostras de moluscos e peixes). Isto permite realizar as análises con maior rapidez e menor custo.
  
  - Na optimización da cantidade de mostra, observouse que a cantidade da mesma non debe superar os 60 ou 80 mg por minicolumna, dependendo da matriz sólida e do metal en cuestión. Observouse que o tamaño de partícula da mostra non inflúe na eficacia da extracción dentro do intervalo estudiado.
  
  - Os métodos propostos para a extracción, preconcentración e determinación dos metais por FAAS son métodos sensibles, tal e como se reflexa nos límites de detección e cuantificación obtidos en cada caso. Ademais, son métodos exactos e precisos, xa que se obtiveron recuperacións entre o 94,0 e 106,0 %, e coeficientes de variación inferiores ó 5 % en tódolos casos. Tamén son métodos rápidos: as frecuencias de mostraxe oscilan entre 6 e 28 mostrax/h.

- Estas metodoloxías aplicáronse a mostras reais. Os resultados obtidos comparáronse mediante o Test-t de parellas cos obtidos ó empregar un método de referencia, e concluíuse que as metodoloxías propostas se poden aplicar de maneira satisfactoria a mostras reais.

# **BIBLIOGRAFÍA**



---

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] Reilly, C. **“Metal Contamination of Food”** (1991) Elsevier Applied Science, Nueva York, Estados Unidos.
- [2] Merian E. **“Metals and Their Compounds in the Environment”** (1991) VCH, Weinheim, Alemania.
- [3] Berlitz, H.D., Grosch, W. **“Química de los Alimentos”** (1992) Acribia, Zaragoza, España.
- [4] Union Europea. **“Contenidos máximos en metales pesados en productos alimenticios”** (1994). <http://www.mcx.es/plaguicidas/MetalPesaUE.asp>
- [5] Fabre, R., Truhaut, R. **“Tratado de Toxicología”** (1977) Paraninfo, Madrid, España, Vol 2.
- [6] Friberg, L., Piscaton, M., Nordberg, G.F., Kjellstrom, T. **“Cadmium in the Environment”** (1974) CRC Press, Cleveland, Estados Unidos.
- [7] Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Vidal, M. **“Toma y tratamiento de muestras sólidas”** (2002) Síntesis, Madrid, España.
- [8] Wang, J., Hansen, E.H. **Anal. Chim. Acta** (2000), 424, 223-232.
- [9] Kenawy, I.M.M., Hafez, M.A.H., Akl, M.A., Lashein, R.R. **Anal. Sci.** (2000), 16, 493-500.
- [10] Jiang, Z., Yu, J.C., Liu, H. **Anal. Sci.** (2005), 21, 851-854.
- [11] Ohzeki, K. **“Chelation Techniques”**, en **“Enciclopedia of Analytical Sciences”**, Townshend, A. Ed. (1995) Academic Press, Londres, Reino Unido. Vol 4.
- [12] Tewari, P.K., Singh, A.K. Fresenius **J. Anal. Chem.** (2000), 367, 562-567.

- [13] Kumar, M., Rathore, D.P.S., Singh, A.K. **Fresenius J. Anal. Chem.** (2001), 370, 377-382.
- [14] Tewari, P.K., Singh, A.K. **Talanta** (2002), 56, 735-744.
- [15] Gurnani, V., Singh, A.K., Venkataramani, B. **Anal. Bioanal. Chem.** (2003), 377, 1079-1086.
- [16] Maheswari, M.A., Mandakolathur, S.S. **J. AOAC Int.** (2003), 86, 1218-1224.
- [17] Jain, V.K., Pandya, R.A., Pillai, S.G., Agrawal, Y.K., Shrivastav, P.S. **Mikrochim. Acta** (2004), 147, 253-264.
- [18] Liang, P., Chen, X. **Anal. Sci.** (2005), 21, 1185-1188.
- [19] Guéguen, C., Dominik, J., Perret, D. **Fresenius J. Anal. Chem.** (2001), 370, 909-912.
- [20] Malla, M.E., Álvarez, M.B., Batistoni, D.A. **Talanta** (2002), 57, 277-287.
- [21] Gao, Y., Oshita, K., Lee, K., Oshima, M., Motomizu, S. **Analyst** (2002), 127, 1713-1719.
- [22] Malla, M.E., Álvarez, M.B., Batistoni, D.A. **Anal. Bioanal. Chem.** (2004), 378, 438-446.
- [23] Manouchehri, N., Bermond, A. **Anal. Chim. Acta** (2006), 557, 337-343.
- [24] Bowles, K.C., Apte, S.C., Batley, G.E., Hales, L.T., Rogers, N.J. **Anal. Chim. Acta** (2006), 558, 237-245.
- [25] Roy, P.K., Rawat, A.S., Rai, P.K. **Talanta** (2003) 59, 239-246.
- [26] Praveen, R.S., Metilda, P., Daniel, S., Prasada-Rao, T. **Talanta** (2005), 67, 960-967.
- [27] Günzler, H., Williams, A. **"Handbook of Analytical Techniques"** (2001) Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, Vol. 1.
- [28] Bennett, J.P., Chiriboga, E., Coleman, J., Waller, D.M. **Sci. Total Environ.** (2000), 246, 261-269.

- 
- [29] Karadjova, I., Girousi, S., Iliadou, E., Stratis, I. **Mikrochim. Acta** (2000), 134, 185-191.
- [30] Tarley, C.R. T., Coltro, W.K. T., Matsushita, M., De Souza, N.E. **J. Food Compos. Anal.** (2001), 14, 611-617.
- [31] Somer, G., Unal, U. **Talanta** (2004), 62, 323-328.
- [32] Skrbic, B., Cupic, S. **Eur. Food Res. Technol.** (2005), 221, 361-366.
- [33] Poykio, R., Torvela, H., Peramaki, P., Kuokkanen, T., Ronkkomaki, H. **Analisis** (2000), 28, 850-854.
- [34] Fecher, P., Ruhnke, G. **Anal. Bioanal. Chem.** (2002), 373, 787-791.
- [35] Laing, G.D., Tack, F.M.G., Verloo, M.G. **Anal. Chim. Acta** (2003), 497, 191-198.
- [36] Jorhem, L., Sundstrom, B., Engman, J. **J. AOAC Int.** (2001), 84, 1984-1992.
- [37] Demirozu, B., Saldamli, J., Gursel, B., Uçak, A., Çetinyokus, F., Yuzbasi, N. **J. Cereal Sci.** (2003), 37, 171-177.
- [38] Sancho, D., Deban, L., Pardo, R., Valladolid, D. **J. Sci. Food Agric.** (2005), 85, 1021-1025.
- [39] Maiga, A., Diallo, D., Bye, R., Paulsen, B.S. **J. Agric. Food Chem.** (2005), 53, 2316-2321.
- [40] Betinelly M. “**Microwave digestion**”, en “**Encyclopedia of Analytical Science**”, Townshend, A. Ed. (1995) Academic Press, Londres, Reino Unido, Vol. 8.
- [41] Luque de Castro, M.D., Luque García, J.L. “**Acceleration and Automation of Solid Sample Treatment**” (2002) Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- [42] Kingston, H.M., Jassie, L.B. “**Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice**” (1988) American Chemical Society, Washington, Estados Unidos.
-

- [43] Balaram, V., Rao, T.G. **At. Spectrosc.** (2003), 24, 206-212.
- [44] Sandroni, V., Smith, C.M.M., Donovan, A. **Talanta** (2003), 60, 715-723.
- [45] García-Rey, R.M., Quiles-Zafra, R., Luque de Castro, M.D. **Anal. Bioanal. Chem.** (2003), 377, 316-321.
- [46] Turkekul, I., Elmastas, M., Tuzen, M. **Food Chem.** (2004), 84, 389-392.
- [47] Xu, Y., Iwashita, A., Nakajima, T., Yamashita, H., Takanashi, H., Ohki, A. **Talanta** (2005), 66, 58-64.
- [48] Cubadda, F., Raggi, A. **Microchem. J.** (2005), 79, 91-96.
- [49] Mendil, D., Uluozlu, U.D., Hasdemir, E., Tuzen, M., Sari, H., Suiçmez, M. **Food Chem.** (2005), 90, 175-179.
- [50] Sun, D., Waters, J.K., Mawhinney, P. **J. AOAC Int.** (2000), 83, 1218-1224.
- [51] Tuzen, M. **Microchem. J.** (2003), 74, 289-297.
- [52] De Oliveira, E. **J. Braz. Chem. Soc.** (2003), 14, 174-1882.
- [53] Tuzen, M., Sari, H., Soylak, M. **Anal. Lett.** (2004), 37, 1925-1936.
- [54] Narin, I., Tuzen, M., Soylak, M. **Ann. Chim.** (2004), 94, 867-873.
- [55] Bendicho, C., Lavilla, I. "**Applications of Ultrasound Extractions and Ultrasound-assisted Metal Extractions**", en "**Encyclopedia of Separation Science**", Wilson, I.D. Ed. (2000) Academic Press, Londres, Reino Unido, Vol. 9.
- [56] Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. **Trends Anal. Chem.** (2004), 23, 644-653.
- [57] Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. **Trends Anal. Chem.** (2003), 22, 41-47.
- [58] Kumar, S.J., Reddy, M.A., Meeravali, N.N. **J. Anal. At. Spectrom.** (2005), 20, 124-126.

- 
- [59] Maduro, C., Vale, G., Alves, S., Galesio, M., Gomes da Silva, M.D.R., Fernández, C., Catarino, S., Rivas, M.G., Mota, A.M., Capelo, J.L. **Talanta** (2006), 68, 1156-1161.
- [60] Lima, E.C., Barbosa, F.Jr., Krug, F.J., Silva, M.M., Vale, M.G.R. **J. Anal. At. Spectrom.** (2000), 15, 995-1000.
- [61] Väisänen, A., Suontamo, R., Silvonen, J., Rintala, J. **Anal. Bioanal. Chem.** (2002), 373, 93-97.
- [62] Filgueiras, A.V., Lavilla, I., Bendicho, C. **Anal. Bioanal. Chem.** (2002), 374, 103-108.
- [63] Hristozov, D., Domini, C.E., Kmetov, V., Stefanova, V., Georgieva, D., Canals, A. **Anal. Chim. Acta** (2004), 516, 187-196.
- [64] Brasil, J.L., Lima, E.C., Cataluña-Veses, R., Tisott, M. **At. Spectrosc.** (2004), 25, 94-101.
- [65] Brunori, C., Ipolyi, I., Macaluso, L., Morabito, R. **Anal. Chim. Acta** (2004), 510, 101-107.
- [66] Elik, A. **Talanta** (2005), 66, 882-888.
- [67] Filgueiras, A.V., Capelo, J.L., Lavilla, I., Bendicho, C. **Talanta** (2000), 53, 433-441.
- [68] Nascentes, C.C., Korn, M., Arruda, M.A.Z. **Microchem. J.** (2001), 69, 37-43.
- [69] Álvarez, J., Marcó, L.M., Arroyo, J., Greaves, E.D., Rivas, R. **Spectrochim. Acta, Part B** (2003), 58B, 2183-2189.
- [70] Cava-Montesinos, P., Domínguez-Vidal, A., Cervera, M.L., Pastor, A., de la Guardia, M. **J. Anal. At. Spectrom.** (2004), 19, 1386-1390.
- [71] Balarama Krishna, M.V., Arunachalam, J. **Anal. Chim. Acta** (2004), 522, 179-187.
- [72] Meeravali, N.N., Reddy, M.A., Kumar, S.J. **At. Spectrosc.** (2005), 26, 68-72.

- [73] Sánchez-Rodas, D., Gomez-Ariza, J.L., Oliveira, V. **Anal. Bioanal. Chem.** (2006), 385, 1172-1177.
- [74] Maduro, C., Vale, G., Alves, S., Galesio, M., Gomes da Silva, M.D.R., Fernández, C., Catarino, S., Rivas, M.G., Mota, A.M., Capelo, J.L. **Talanta** (2006), 68, 1156-1161.
- [75] Luque de Castro, M.D., Valcárcel, M., Tena, M.T. **“Extracción con Fluidos Supercríticos en el Proceso Analítico”** (1993) Reverté, Barcelona, España.
- [76] Valcárcel Cases, M., Gomez Hens, A. **“Técnicas Analíticas de Separación”** (2003) Reverté, Barcelona, España.
- [77] Alfassi, Z.B. **“Determination of Trace Elements”** (1994) VCH, Weinheim, Alemania.
- [78] Vandecasteele, C. **“Modern Methods for Trace Element Determination”** (1993) John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra.
- [79] Nielsen, S.S. **“Food Analysis”** (1998) Aspen Publishers, Maryland, Estados Unidos.
- [80] Lückner, E., Failing, K., Schmidt, T. **Fresenius J. Anal. Chem.** (2000), 366, 137-141.
- [81] Belarra, M. A., Resano, M., Vanhaecke, F., Moens, L. **Trends Anal. Chem.** (2002), 21, 828-839.
- [82] Marlon de Moraes Flores, E., Ben da Costa, A., Smanioto Barin, J., Luiz Dressler, V., Gottfried Paniz, J., Figueiredo Martins, A. **Spectrochim. Acta, Part B** (2001), 56B, 1875-1882.
- [83] Sahuquillo, A., Rauret, G., Rehnert, A., Muntau, H. **Anal. Chim. Acta** (2003), 476, 15-24.
- [84] Furtado da Silva, A., Borges, D.L.C., Lepri, F.G., Welz, B., Curtius, A.J., Heitmann, U. **Anal. Bioanal. Chem.** (2005), 382, 1835-1841.

- 
- [85] Ben da Costa, A., Paz de Mattos, J.C., Irineu Muller, E., Gottfried Paniz, J.N., Luiz Dressler, V., Marlon de Moraes Flores, E. **Spectrochim. Acta, Part B** (2005), 60B, 583-588.
- [86] Liva, M., Muñoz-Olivas, R., Cámara, C. **Talanta** (2000), 51, 381-387.
- [87] Cal-Prieto, M.J., Felipe-Sotelo, M., Carlosena, A., Andrade, J.M., López-Mahía, P., Muniategui, S., Prada, D. **Talanta** (2002), 56, 1-51.
- [88] Lilleengen, B., Wibetoe, G. **Anal. Bioanal. Chem.** (2002), 372, 187-195.
- [89] Santos Jr, D., Barbosa Jr, F., Tomazelli, A.C., Krug, F.J., Nóbrega, J.A., Arruda, M.A.Z. **Anal. Bioanal. Chem.** (2002), 373, 183-189.
- [90] Moreda-Piñeiro, J., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Fernández-Fernández, E., Prada-Rodríguez, D. **J. Anal. At. Spectrom.** (2002), 17, 721-726.
- [91] Arman, M.A., Kaneco, S., Suzuki, T., Katsumata, H., Ohta, A. **Ann. Chim.** (2005), 95, 325-333.
- [92] Dos Santos, W.N.L., Da Silva, E.G.P., Fernandes, M.S., Araujo, R.G.O., Costa, A.C.S., Vale, M.G.R., Ferreira, S.L.C. **Anal. Bioanal. Chem.** (2005), 382, 1099-1102.
- [93] Anthemidis, A.N., Pliatsika, V.G. **J. Anal. At. Spectrom.** (2005), 20, 1280-1286.
- [94] Valcárcel, M., Luque de Castro, M.D. **"Flow Injection Analysis: Principles and Applications"** (1987) Ellis Horwood, Chichester, West Sussex, Inglaterra.
- [95] Hansen, E.H ; Ruzicka, J. **Anal. Chim. Acta** (1975), 78, 145-157.
- [96] Ruzika, J., Hansen, E.H. **Talanta** (1982), 29, 157.
- [97] Ruzika J., Hansen E.H. **"Flow Injection Analysis"** (1998) J. Wiley & Sons. Nueva York, Estados Unidos.

- [98] Luque de Castro, M.D. "**Flow Injection Analysis**", en "**Encyclopedia of Analytical Sciences**", Townshend, A. Ed. (1995) Academic Press, Londres, Reino Unido, Vol. 5
- [99] Valcárcel, M., Luque de Castro, M.D. "**Automatic Methods of Analysis**" (1998) Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, Holanda.
- [100] Fang, Z. "**Flow injection separation and preconcentration**" (1993) VCH, Weinheim, Alemania.
- [101] Bergamin, H., Reis, B.F., Jacintho, A.O., Zagatto. E.A.G. **Anal. Chim. Acta** (1980), 117, 81.
- [102] Abollino, O., Aceto, M., Sarzanini, C., Mentasti, E. **Anal. Chim. Acta** (2000), 411, 223-237.
- [103] Hirata, S., Honda, K., Shikino, O., Maekawa, N., Aihara, M. **Spectrochim. Acta** (2000), 55B, 1089-1099.
- [104] Warnken, K.W., Tang, D., Gill, G.A., Santschi, P.H. **Anal. Chim. Acta** (2000), 423, 265-276.
- [105] Hirata, S., Ishida, Y., Aihara, M., Honda, K., Shikino, O. **Anal. Chim. Acta** (2001), 438, 205-214.
- [106] Hirano, Y., Nakajima, J., Oguma, K., Terui, Y. **Anal. Sci.** (2001), 17, 1073-1077.
- [107] Vereda-Alonso, E.I., Palomo-Gil, L., Siles-Cordero, M.T., García de Torres, A., Cano-Pavón, J.M. **J. Anal. At. Spectrom.** (2001), 16, 293-295.
- [108] Beck, N.G., Franks, R.P., Bruland, K.W. **Anal. Chim. Acta** (2002), 455, 11-22.
- [109] Abbasse, G., Ouddane, B., Fischer, J.C. **Anal. Bioanal. Chem.** (2002), 374, 873-878.
- [110] Bruhn, C.G., Campos, V.H., Díaz, V.P., Cid, H.J., Nóbrega, J.A. **Bol. Soc. Chil. Quim.** (2002), 47, 123-135.

- 
- [111] Zougagh, M., García de Torres, A., Cano-Pavón, J.M. **Talanta** (2002), 56, 753-761.
- [112] Sung, Y., Huang, S. **Anal. Chim. Acta** (2003), 495, 165-176.
- [113] Grotti, M., Abelmoschi, M.L., Soggia, F., Frache, R. **Anal. Bioanal. Chem.** (2003), 375, 242-247.
- [114] Haji-Shabani, A.M., Dadfarnia, S., Dehghan, K. **Talanta** (2003), 59, 719-725.
- [115] Azevedo-Lemos, V., Silva-Santos, J., Sena-Nunes, L., Bezerra de Carvalho, M., Xavier-Baliza, P., Terumi-Yamaki, R. **Anal. Chim. Acta** (2003), 494, 87-95.
- [116] González-García, M.M., Sánchez-Rojas, F., Bosch-Ojeda, C., García de Torres, A., Cano-Pavón, J.M. **Anal. Bioanal. Chem.** (2003), 375, 1229-1233.
- [117] Pons, C., Forteza, R., Cerdá, V. **Anal. Chim. Acta** (2005), 550, 33-39.
- [118] Cassella, R.J., Magalhaes, O.I.B., Couto, M.T., Lima, E.L.S., Neves, M.A.F.S., Coutinho, F.M.B. **Talanta** (2005), 67, 121-128.
- [119] Zhi, Z., Rios, A., Valcárcel, M. **Crit. Rev. Anal. Chem.** (1996), 26, 239-260.
- [120] Valcárcel, M., Luque de Castro, M.D. **"Non Chromatographic Continuous Separation Techniques"** (1991), The Royal Society of Chemistry, Cambridge, Inglaterra.
- [121] Yebra, M.C., Moreno-Cid, A. **J. Anal. At. Spectrom.** (2002), 17, 1425-1428.
- [122] Moreno-Cid, A., Yebra, M.C. **Spectrochim. Acta, Part B** (2002), 57, 967-974.
- [123] Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. **Analyst** (2002), 127, 1115-1120.
- [124] Caballo-López, A., Luque de Castro, M.D. **J. Chromatogr. A** (2003), 998, 51-59.
- [125] Priego-López, E., Luque de Castro, M.D. **J. Chromatogr. A** (2003), 1018, 1-6.
- [126] Caballo-López, A., Luque de Castro, M.D. **Chromatographia** (2003), 58, 257-262.

- [127] Moreno-Cid, A., Yebra, M.C., Cancela, S., Cespón, R.M. **Anal. Bioanal. Chem.** (2003), 377, 730-734.
- [128] Ruiz-Jiménez, J., Luque-García, J.L., Luque de Castro, M.D. **Anal. Chim. Acta** (2003), 377, 231-237.
- [129] Yebra, M.C., Moreno-Cid, A. **Anal. Chim. Acta** (2003), 477, 149-155.
- [130] Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. **Anal. Bioanal. Chem.** (2004), 378, 1376-1381.
- [131] Moreno-Cid, A., Yebra, M.C. **Anal. Bioanal. Chem.** (2004), 379, 77-82.
- [132] Yebra, M.C., Moreno-Cid, A., Cespón, R., Cancela, S. **Talanta** (2004), 62, 403-406.
- [133] Murales-Muñoz, S., Luque de Castro, M.D. **J. Chromatogr. A** (2005), 1066, 1-7.
- [134] Yebra-Biurrun, M.C., Moreno-Cid, A., Cancela-Pérez, S. **Talanta** (2005), 66, 691-695.
- [135] Caballo-López, A., Luque de Castro, M.D. **Anal. Chem.** (2006), 78, 2297-2301.
- [136] Valcárcel, M., Luque de Castro, M.D. **"Flow Injection Analysis: Principles and Applications"** (1987) Ellis Horwood, Chichester, Inglaterra.
- [137] Zagatto, E.A.G., Krug, F.J., Bergamin, F.H., Jorgensen, S.S., Reis, B.F. **Anal. Chim. Acta** (1979), 104, 279-284.
- [138] Vidal, M.T., Pascual-Martí, M.C., Salvador, A., Llabata, C. **Microchem. J.** (2002), 72, 221-228.
- [139] Li, Y., Jiang, Y., Yan, X. **Talanta** (2004), 64, 758-765.
- [140] Wang, Z., Zhang, Z., Wang, Z., Liu, L., Yan, X. **Anal. Chim. Acta** (2004), 514, 151-157.
- [141] Starvin, A.M., Biju, V.M., Prasada-Rao, T. **At. Spectrosc.** (2004), 25, 238-244.

- 
- [142] Wang, Z., Wang, Z., Zhang, Z., Liu, L., Yan, X. **At. Spectrosc.** (2005), 26, 34-39.
- [143] Santos, E.J., Herrmann, A.B., Ribeiro, A.S., Curtius, A.J. **Talanta** (2005), 65, 593-597.
- [144] Gil, R.A., Cerutti, S., Gásquez, J.A., Olsina, R.A., Martínez, L.D. **Talanta** (2006), 68, 1065-1070.
- [145] Cela, R., Blanco, M., Boqué, R., Coello, J., Maspoch, S., Ortiz, M.C., Riba, J., Ruis, F.X., Ruiz, A., Sarabia, L.A., Tomás Y.X. "**Avance en Quimiometría Práctica**" (1994), Servicio de publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.
- [146] Brereton, R.G. "**Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**" (2003) John Wiley & Sons, Chichester, Inglaterra.
- [147] Deming, S.N., Morgan, S.L. "**Experimental design: a chemometric approach**" (1993) Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- [148] Plackett, R.L., Burman, H.D. **Biometrika** (1946), 33, 305-325.
- [149] Gardiner, W.P., Gettinby, G. "**Experimental Design Techniques in Statistical Practice-A Practical Software-based Approach**" (1998) Ellis Horwood, Chichester, Sussex, Reino Unido.
- [150] Jones, K. **Int. Lab.** (1986), 32-45.
- [151] **Statgraphic V.5.1 Statistical Package** (1997) Manugistic Inc., Rockville, MD, Estados Unidos.
- [152] Choi, B., Jung, H. **Bull. Korean Chem. Soc.** (2000), 21, 538-540.
- [153] Pohl, P., Prusisz, B. **Anal. Sci.** (2004), 20, 1367-1370.
- [154] Pohl, P., Prusisz, B. **Microchim. Acta** (2005), 150, 159-165.
- [155] **Programa ULC (Calibración Lineal Univariante)**. Departamento de Química Analítica. Universidad de Tarragona.
-



**ANEXO A.**

**LISTADO DE ACRÓNIMOS**



---

## ANEXO A. LISTADO DE ACRÓNIMOS

<b>AAS</b>	Espectrometría de absorción atómica <i>Atomic Absorption Spectrometry</i>
<b>AES</b>	Espectrometría de emisión atómica <i>Atomic Emission Spectrometry</i>
<b>CG</b>	Cromatografía de gases <i>Gas Chromatography</i>
<b>ETAAS/GFAAS</b>	Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica <i>Electrothermal Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
<b>FAAS</b>	Espectroscopía de absorción atómica con atomización por chama <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>ICP</b>	Plasma acoplado por inducción <i>Inductively Coupled Plasma</i>
<b>MS</b>	Espectrometría de masas <i>Mass Spectrometry</i>
<b>OES</b>	Espectrometría de emisión óptica <i>Optical Emission Spectrometry</i>
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible Ultraviolet Visible



**ANEXO B.**

**PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**



---

## ANEXO B. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- **Coupling continuous ultrasound-assisted extraction, preconcentration and flame atomic absorption spectrometric detection for the determination of cadmium and lead in mussel samples.**

M.C. Yebra-Biurrun, S. Cancela-Pérez e A. Moreno-Cid-Barinaga.

*Analytica Chimica Acta*, (2005), 533, 51-56.

- **Continuous ultrasound-assisted extraction of cadmium from vegetable samples with on-line preconcentration coupled to a flow injection-flame atomic spectrometric system.**

M. Carmen Yebra, Sheila Cancela e Amada Moreno-Cid.

*International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, (2005), 305-313.

- **Flow injection determination of Cd in meat samples using a continuous lixiviation/preconcentration system coupled to a Flame AAS.**

S. Cancela-Pérez e M.C. Yebra Biurrun.

*Atomic Spectroscopy*, (2005), 26(3), 110-116.

- **Continuous ultrasound-assisted extraction of cadmium from legumes and dried fruit samples coupled with on-line preconcentration-flame atomic absorption spectrometry.**

M.C. Yebra e S. Cancela.

*Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2005), 382, 1093-1098.

- **Flow-injection flame atomic absorption spectrometric determination of trace amounts of cadmium in solid and semisolid milk products coupling a continuous ultrasound-assisted extraction system with online preconcentration on a chelating aminomethylphosphoric acid resin.**

Sheila Cancela e M.Carmen Yebra.

Journal of AOAC International, (2006), 89, 185-191.

- **Automatic determination of nickel in foods by flame atomic absorption spectrometry**

S. Cancela e M.C. Yebra

Enviado para a súa publicación en Food Chemistry

- **Flow injection flame atomic absorption spectrometric determination of nickel and cobalt in vegetable samples using an automatic sample pretreatment.**

S. Cancela e M.C. Yebra

Enviado para a súa publicación en Food Additives and Contaminants

- **Continuous approach for ultrasound assisted extraction-minicolumn preconcentration of chromium and cobalt from seafood samples prior to flame atomic absorption spectrometry.**

María C. Yebra-Biurrun e Sheila Cancela-Pérez

Enviado para a súa publicación en Analytical Sciences





# Coupling continuous ultrasound-assisted extraction, preconcentration and flame atomic absorption spectrometric detection for the determination of cadmium and lead in mussel samples

M.C. Yebra-Biurrun\*, S. Cancela-Pérez, A. Moreno-Cid-Barinaga

*Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry,  
University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

Received 14 July 2004; received in revised form 1 November 2004; accepted 1 November 2004

Available online 29 December 2004

## Abstract

Continuous ultrasound-assisted extraction has been coupled with preconcentration and flame atomic absorption spectrometry for the determination of cadmium and lead in mussel samples. Experimental designs were used for the optimisation of the leaching and preconcentration steps. The use of diluted nitric acid as extractant in the continuous mode at a flow rate of  $3.5 \text{ ml min}^{-1}$  and room temperature was sufficient for quantitative extraction of these trace metals. A minicolumn containing a chelating resin (Chelite P, with aminomethylphosphoric acid groups) was proved as an excellent material for the quantitative preconcentration of cadmium and lead prior to their flame atomic absorption detection. A flow injection manifold was used as interface for coupling the three analytical steps, which allowed the automation of the whole analytical process. A good precision of the whole procedure (2.0 and 2.3%), high enrichment factors (20.5 and 11.8) and a detection limit of 0.011 and  $0.25 \mu\text{g g}^{-1}$  for cadmium and lead, respectively, were obtained for 80 mg of sample. The sample throughputs were ca. 16 and 14 samples  $\text{h}^{-1}$  for cadmium and lead, respectively. The accuracy of the analytical procedures was verified by using a standard reference material (BCR 278-R, mussel tissue) and the results were in good agreement with the certified values. The method was successfully applied to the determination of trace amounts of cadmium and lead in mussel samples from the coast of Galicia (NW, Spain).

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Ultrasound-assisted acid extraction; Minicolumn preconcentration; Cadmium; Lead; Flame atomic absorption spectrometry; Flow injection analysis

## 1. Introduction

Cadmium and lead can be present in some coastal waters as metal contaminants originating from industrial pollution. Marine organisms can accumulate trace metals from the dissolved phase and ingested foods. Analysis of aquatic organisms has been increasingly used as a direct measure of the abundance and availability of metals in the environment, and has led to the adoption of the bioindicator (bio-monitor) concept. Concentration factors of  $10^6$  and  $4 \times 10^3$  are found for cadmium and lead, respectively in mussel tissue. So, mussels are used as bioindicator organisms to assess bioavailable contaminant concentrations in coastal waters [1]. Inter-

est in the bioaccumulation of trace metals in marine bivalve molluscs systems mainly from their use as bioindicators of coastal contamination and from concern over public health arising from their consumption by humans as seafood. Therefore, the determination of these toxic trace metals in these samples is an important aspect of food and environmental analysis.

The preparation of a solid sample is often the most time consuming step of the analytical process [2]. Furthermore, this analytical stage involves potential drawbacks, such as contamination or losses of analytes because a labour-intensive sample manipulation and several pre-treatments that require to transfer the sample of vessel (in some instances several times) are carried out in the analytical laboratory. Whereas, the conventional method involving a sample acid digestion requires a time period of 2 h [3], the use of a

\* Corresponding author. Tel.: +34 981563100; fax: +34 981595012.

E-mail address: [qncayebi@usc.es](mailto:qncayebi@usc.es) (M.C. Yebra-Biurrun).

microwave-assisted digestion can be carried out within only 12.5 min [4], 7 min [5] or 22 min [6], taking into account in the two last references the microwave energy action and a cooling area to cool the high-pressure bombs in an ice bath before opening. Despite the use of the microwave digestion, which is fast and effective, the digestion operation entails the participation of concentrating acids, which generates carcinogenic nitrous vapours as consequence of the organic matrix destruction, so a safety control have to be taken into account.

Ultrasonic radiation is a powerful aid in the acceleration of various steps of the analytical process [7]. This energy is of great help in the pre-treatment of solid samples because facilitates and accelerates operations such as the extraction of organic and inorganic compounds, slurry dispersion, homogenisation and other analytical stages such as nebulisation, washing and derivatisation. In this sense, ultrasound-assisted leaching is an effective way of extracting a number of analytes from several solid samples [8–13]. This process increases the representative sample mass, and improves the precision and accuracy of slurry sampling. It also avoids total sample matrix introduction into the nebuliser of the spectrometer, which occurs with solid sampling, slurry sampling and digestion procedures.

Cadmium and lead determination by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) can be performed with appreciable sensitivity and accuracy using an air–acetylene flame. Due to its reliability and freedom from interferences it is still the recommended approach in some official analytical methods [14,15]. Nevertheless, the concentration of metal ions in several types of matrix is often below the detection limits attainable with some detectors. Therefore, in order to determine trace levels of metals using an inexpensive and available technique for any laboratory such as FAAS, it is necessary to enrich them firstly by coprecipitation, extraction, and especially by preconcentration on a chelating or ion exchange resin [6,16,17].

In this paper, we describe the coupling between continuous ultrasound-assisted extraction, preconcentration (using a

chelating resin, Chelite P, with aminomethylphosphoric acid groups) and FAAS for the determination of cadmium and lead in mussel samples. A flow injection manifold was used as interface for coupling these three analytical steps, allowing automation of the whole analytical process. Methods were applied to mussel samples from the coast of Galicia (NW, Spain).

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

A Perkin-Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA) fitted with cadmium or lead hollow cathode lamp was used. The instrument was set at 228.8 and 283.3 nm, for cadmium and lead, respectively. The spectrometer output was connected to a Perkin-Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. As can be seen in Fig. 1, the FI system comprises two Gilson Minipuls 3 peristaltic pumps (Gilson, France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath (15 cm × 30 cm × 14 cm) with an ultrasound power of 40 kHz (Selecta, Barcelona, Spain), six Rheodyne injection or switching valves (USA), Models 5041 and 5301, extraction loops of 2.5, 4.5 and 8.0 m (made with 0.8 mm i.d. PTFE tubing, Omnifit, UK), a glass minicolumn (100 mm × 3 mm i.d., bed volume 700  $\mu$ l, Omnifit, UK). The ends of minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541). Minicolumns for the preconcentration step were prepared by filling Viton tubes (10 cm length and 1 mm i.d.) with 50 mg of chelating resin.

### 2.2. Reagents

Ultrapure water of 18.2 M $\Omega$  cm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used for the preparation of the reagents and standards. Hydrochloric acid, nitric acid (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) and 1000  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> cadmium and lead

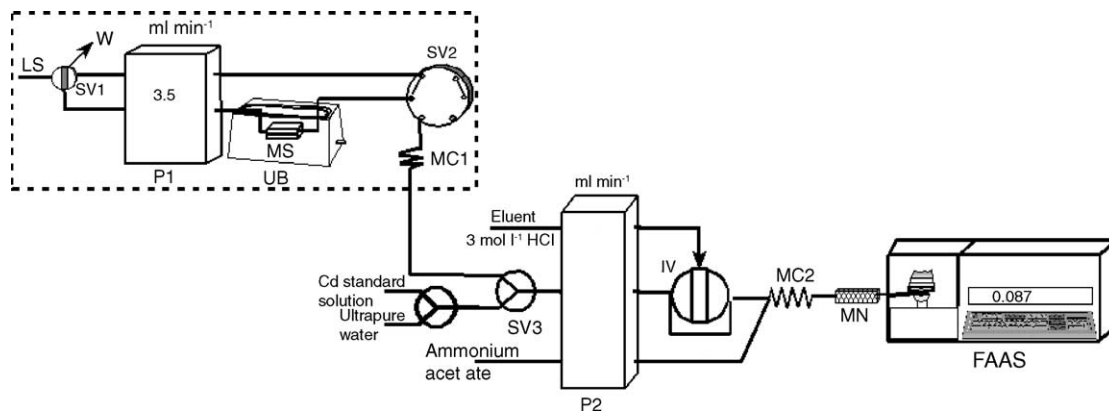


Fig. 1. Flow injection manifold for Cd and Pb determination in mussel samples. P1 and P2, peristaltic pumps; LS, leaching solution; W, waste; UB, ultrasonic bath; MS, minicolumn containing the sample; IV, injection valve; SV1, SV2 and SV3, switching valves; MC1 and MC2, mixing coils; MN, minicolumn containing the chelating resin (Chelite P) and FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

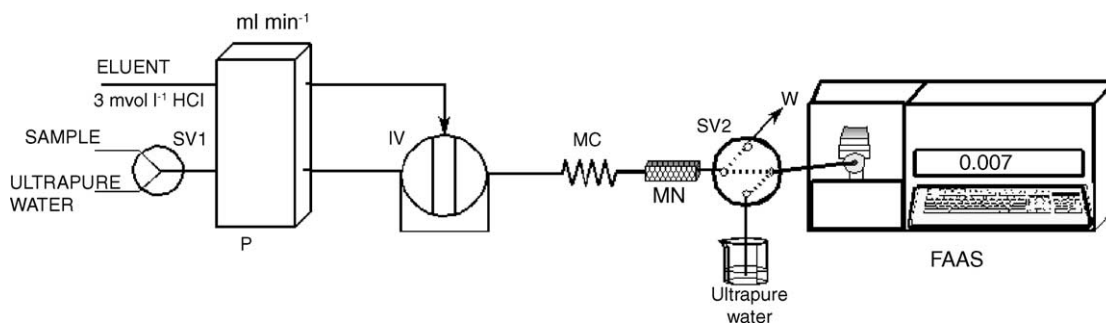


Fig. 2. Flow injection manifold for Cd and Pb pre-concentration. P, peristaltic pump; SV1 and SV2, switching valves; IV, injection valve; MC, mixing coil; MN, minicolumn containing the chelating resin Chelite P; W, waste; FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

standard solutions (Merck, Germany) were reagent grade. Chelating resin (20 mesh) with aminomethylphosphoric acid groups, Chelite P (Serva Electrophoresis GmbH). Ammonium acetate (Merck, Germany). The certified reference material used was 278-R mussel tissue (Community Bureau of Reference, Belgium).

### 2.3. Sample preparation and procedure

The mussels were grinded, homogenised and freeze-dried ( $-40^{\circ}\text{C}$ ). Then were stored in clean, dry containers. The samples were pulverized in a porcelain mortar and after sieving, fractions with a particle size less than  $30\ \mu\text{m}$  were taken.

Mussel samples of 50–80 mg were directly weighed into the glass minicolumn. Then, the minicolumn was connected to the continuous manifold (Fig. 1). First, the extraction circuit (2 ml) was loaded with the acid leaching solution ( $3\ \text{mol l}^{-1}$  nitric acid). Once the extraction circuit was closed by means of SV1, the leaching solution circulates through the minicolumn subjected to ultrasound energy for 2 or 3 min (for Cd and Pb, respectively). The flow rate of the leaching solution was  $3.5\ \text{ml min}^{-1}$ . The direction of the flow was changed each 30 s in order to avoid sample accumulation at the end of the minicolumn. Then, the switching valve (SV2) was switched to its opposite position and the acid extract was homogenised in the mixing coil. After this, the acid extract channel converged with a buffer solution stream ( $16\ \text{mol l}^{-1}$  ammonium acetate) in order to obtain a pH value  $>3$ . The mixture was homogenized in a second mixing coil and then, was passed through the pre-concentration minicolumn, at a flow rate of 2 or  $3\ \text{ml min}^{-1}$  (for cadmium and lead, respectively). Cd and Pb were retained quantitatively by formation a metal chelate. Then were eluted by injection of 92 or  $160.9\ \mu\text{l}$  of  $3\ \text{mol l}^{-1}$  hydrochloric acid into a water carrier stream, which swept them to the detector where were continuously monitored.

Standard solutions containing up to  $0.036\ \mu\text{g ml}^{-1}$  of Cd and  $0.200\ \mu\text{g ml}^{-1}$  of Pb in the same acid medium as the leaching solution were introduced into the flow system as show in Fig. 1.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Optimisation of the cadmium and lead pre-concentration step

Since optimisation of the analytical procedure involves the study of a large number of variables, an experimental design was used to optimise this stage. The use of a complete factorial design does not seem to be very effective due to the large number of experiments or runs required. Plackett–Burman designs were used principally when the number of variables influencing the analytical system was very large, because the number of experimental runs can be reduced due to the designs would provide knowledge about the system tendencies [18]. In this paper, a Plackett–Burman  $2^6 \times 3/16$  factorial type III resolution design with one center point was selected, allowing six degrees of freedom and involving 13 non-randomised runs. To optimise the pre-concentration step, cadmium and lead were measured on-line by FAAS with a flow system similar to that depicted in Fig. 2. Six experimental variables were optimised. The lower and upper levels for each studied variable are listed in Table 1. These values were chosen from experiences developed in previous experiments. From the results of these analytical data it can be concluded that cadmium and lead pre-concentration–elution process appeared to be affected by one and two statistically significant factors, respectively, sample pH for cadmium, and sample pH and eluent volume for lead. Table 2 listed the estimated effects and the optimum value for each variable according to the Plackett–Burman design. As the Plackett–Burman design only provides the tendencies to the optimum values of

Table 1  
Factor levels studied in the Plackett–Burman design ( $2^6 \times 3/16$ ) for the Cd and Pb pre-concentration–elution process

Variable	Key	Low (–)	High (+)
Sample pH	A	1	7
Sample flow rate ( $\text{ml min}^{-1}$ )	B	0.5	4.0
Eluent concentration (HCl, $\text{mol l}^{-1}$ )	C	0.1	3.0
Eluent volume ( $\mu\text{l}$ )	D	70.4	190
Elution flow rate ( $\text{ml min}^{-1}$ )	E	3.0	5.0
Minicolumn diameter (mm)	F	1.0	2.0

Table 2  
Estimated effects and optimum conditions for each variable

Variable	Estimated effect		Optimum value according to the Plackett–Burman design		Optimum value	
	Cadmium	Lead	Cadmium	Lead	Cadmium	Lead
A	30.1167	30.7833	7	7	3–8	2–7
B (ml min <sup>-1</sup> )	-9.2834	-10.25	0.5	0.5	2.0	3.0
C (mol l <sup>-1</sup> )	11.9167	9.55	3	3	3	3
D (μl)	16.1167	20.0167	190.0	190.0	92.0	160.9
E (ml min <sup>-1</sup> )	-20.4167	-4.2167	3.0	3.0	3.0	3.0
F (mm)	6.55	-0.2167	2.0	1.0	1.0	1.0

the variables, these factors were fine-tuned outside the framework of the design. The aims of this study were, decrease the eluent volume and increase the sample flow rate. Table 3 shows the results of these experiments. Finally, a small number of experiments were carried out with the aim of establish the pH range for quantitative retention of cadmium and lead. The results of these experiments showed that cadmium was retained quantitatively in the range of 3–8, and lead in the range of 2–7. This is an important factor because the acid extract containing the trace metals presents a pH value very low (3 mol l<sup>-1</sup> nitric acid medium). An ammonium acetate buffer solution was proposed in order to achieve the optimum pH for Cd and Pb retention. In order to carry out on-line this pH increase, a study of concentration, volume and flow rate of the ammonium acetate buffer solution was developed. So, a 16 mol l<sup>-1</sup> concentration, 0.5 and 0.4 ml (for Cd and Pb, respectively) and 0.6 ml min<sup>-1</sup> were selected as a compromise for the ammonium acetate channel. The optimum conditions for cadmium and lead preconcentration–elution were listed in Table 2.

### 3.2. Optimisation of the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium and lead

It was used the same experimental design that for the previous optimisation (Plackett–Burman 2<sup>6</sup> × 3/16). This factorial design was applied to 50–60 mg of a standard reference material (BCR 278R) with a cadmium and lead content of

Table 4  
Factor levels studied in the Plackett–Burman design (2<sup>6</sup> × 3/16) for the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium and lead from mussel samples

Variable	Key	Low (-)	High (+)
HNO <sub>3</sub> concentration (mol l <sup>-1</sup> )	G	0	3
HCl concentration (mol l <sup>-1</sup> )	H	0	3
Sonication time (min)	I	0.5	5
Leaching volume (ml)	J	2	5
Extraction flow rate (ml min <sup>-1</sup> )	K	3.5	6.0
Leaching temperature (°C)	L	20	70

0.348 ± 0.007 and 2.00 ± 0.04 μg g<sup>-1</sup>, respectively. To optimise the continuous acid extraction, cadmium and lead were measured on-line by FAAS with a flow system similar to that depicted in Fig. 1. Six experimental variables were optimised. In Table 4, the lower and upper levels for each studied variable were listed. From the results of these analytical data, it can be concluded that Cd and Pb extraction from the mussel samples appeared to be affected by two statistically significant factors (positive sign): nitric acid concentration and sonication time. Table 5 listed the estimated effects and the optimum value for each variable according to the Plackett–Burman design. To simplify the analysis, 0 mol l<sup>-1</sup> HCl, room temperature, 2 ml of leaching volume and a flow rate of 3.5 ml min<sup>-1</sup> were selected, since these parameters were not statistically influential factors. In order to increase the sampling frequency, a possible reduction of the sonication time was studied. Thus, 2 min was enough to obtain a quantitative extraction of cad-

Table 3  
Experiments outside the framework of the design to fine-tune the preconcentration–elution process

Run	A (pH)	B (ml min <sup>-1</sup> )	C (mol l <sup>-1</sup> )	D (μl)	E (ml min <sup>-1</sup> )	F (mm)	Cd recovery (%)	Pb recovery (%)
1	7	0.5	3.0	190.0	3.0	1.0	99.7	98.8
2	7	0.5	3.0	70.4	3.0	1.0	65.0	32.1
3	7	0.5	3.0	92.0	3.0	1.0	103.4	46.7
4	7	0.5	3.0	92.0	4.0	1.0	44.3	–
5	7	2.0	3.0	92.0	3.0	1.0	96.1	–
6	7	3.0	3.0	92.0	3.0	1.0	56.0	–
7	7	2.0	2.0	92.0	3.0	1.0	74.9	–
8	7	0.5	3.0	150.8	3.0	1.0	–	64.4
9	7	0.5	3.0	160.9	3.0	1.0	–	101.3
10	7	3.0	3.0	160.9	4.0	1.0	–	56.2
11	7	3.0	3.0	160.9	3.0	1.0	–	97.9
12	7	4.0	3.0	160.9	3.0	1.0	–	75.5
13	3	3.0	2.0	160.9	3.0	1.0	–	84.3

Table 5  
Estimated effects and optimum conditions for each variable

Variable	Estimated effect		Optimum value according to the Plackett–Burman design		Optimum value	
	Cadmium	Lead	Cadmium	Lead	Cadmium	Lead
<i>G</i> (mol l <sup>-1</sup> )	30.7667	29.35	3	3	3	3
<i>H</i> (mol l <sup>-1</sup> )	-0.0667	-3.0833	0	0	0	0
<i>I</i> (min)	21.6	47.75	5	5	2	3
<i>J</i> (ml)	10.4	-4.9833	5	2	2	2
<i>K</i> (ml min <sup>-1</sup> )	-5.7667	-10.4833	3.5	3.5	3.5	3.5
<i>L</i> (°C)	-0.7667	8.8167	20	70	20	20

mium in mussel samples, but 3 min was necessary for lead extraction. Finally, the use of less concentrated nitric acid was studied, but 2 mol l<sup>-1</sup> HNO<sub>3</sub> was not enough to obtain the quantitative extraction of these trace metals. The optimum conditions for continuous ultrasonic acid extraction of Cd and Pb were listed in Table 5.

Other variables that can affect the acid extraction process were studied separately, namely mussel particle size and amount of sample. By using the optimum conditions of the continuous ultrasound-assisted extraction and the preconcentration step, particle sizes between 30 and 100 μm were tested. The result obtained indicated that this variable does not affect the extraction process. In the other hand, the use of sample amounts between 50 and 100 mg were studied. It was observed that amounts greater than 80 mg produced great pressure in the continuous extraction system causing losses of sample. Therefore, the maximum amount of sample that can be used is 80 mg.

### 3.3. Features of the method

The calibration graph was run ( $n=7$ ) under optimum chemical and flow conditions for the whole process. Equations were, absorbance =  $7.8 \times 10^{-4} + 3.12X$  ( $r=0.999$ ) and absorbance =  $2.0 \times 10^{-4} + 0.13X$  ( $r=0.999$ ), where  $X$  is Cd and Pb concentration, respectively, expressed as μg ml<sup>-1</sup>.

The precision of the preconcentration step was verified using standard solutions ( $n=11$ ). The precision of the

whole process was verified using a mussel sample containing 0.344 μg g<sup>-1</sup> Cd and 1.01 μg g<sup>-1</sup> Pb ( $n=11$ ). The results obtained expressed as relative standard deviation were 2.0 and 2.3%, for cadmium and lead, respectively.

Detection limits (LOD) based on three times the standard deviation of the blank ( $n=30$ ) were found to be 0.011 and 0.25 μg g<sup>-1</sup> for cadmium and lead, respectively. Concentration factors of the method based on the rate between the direct calibration graph and FIA calibration graph slopes were found to be 20.5 for cadmium and 11.8 for lead. The resin capacity is 7.1 μmol Cd/g and 32.9 μmol Pb/g resin. The sample throughputs taking into account the global process were ca. 16 and 14 samples h<sup>-1</sup>, for cadmium and lead, respectively.

Validation of the methods was performed by using a certified reference material (BCR 278-R, mussel tissue). The results were in good agreement with the certified values (Table 6).

### 3.4. Analysis of samples

The methodology proposed was applied to determine Cd and Pb in several mussel samples collected from Galicia, Spain. This area is subjected to intensive traffic and waste from industrial activity. The results obtained (for lead a standard addition method was used) were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion method with concentrated nitric acid, preconcentration step previously optimised by using the chelating resin Chelate P and

Table 6  
Determination of cadmium and lead in mussel samples and paired *t*-test

Sample no.	Reference method ( $n=3$ ) <sup>a</sup>		Proposed methodology ( $n=3$ )	
	[Cd] (μg g <sup>-1</sup> )	[Pb] (μg g <sup>-1</sup> )	[Cd] (μg g <sup>-1</sup> )	[Pb] (μg g <sup>-1</sup> )
1	0.493 ± 0.004	1.01 ± 0.03	0.481 ± 0.002	0.98 ± 0.03
2	0.529 ± 0.023	0.60 ± 0.03	0.532 ± 0.018	0.59 ± 0.01
3	0.538 ± 0.017	0.48 ± 0.03	0.559 ± 0.008	0.49 ± 0.02
4	0.483 ± 0.006	0.66 ± 0.02	0.496 ± 0.002	0.70 ± 0.01
5	0.519 ± 0.031	0.88 ± 0.04	0.542 ± 0.008	0.91 ± 0.02
6	0.381 ± 0.021	0.96 ± 0.03	0.383 ± 0.011	0.90 ± 0.01
7	0.405 ± 0.015	0.94 ± 0.03	0.401 ± 0.007	1.0 ± 0.03
8	0.424 ± 0.007	0.93 ± 0.02	0.406 ± 0.006	0.88 ± 0.02
Reference material	Cd certified	Pb certified	Cd obtained	Pb obtained
BCR 278-R	0.348 ± 0.007	2.00 ± 0.04	0.350 ± 0.016	1.99 ± 0.06

Critical value of  $t$  ( $P=0.05$ ) = 2.36; for Cd, experimental value of  $t=0.67$  and for Pb, experimental value of  $t=0.08$ .

<sup>a</sup> Off-line acid digestion, preconcentration with a chelating resin (Chelate P) and FAAS Cd and Pb determination.

determination by FAAS. The results expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  and their standard deviation ( $n=3$ ) obtained by these two methods are shown in Table 6. To compare the results obtained by these both methods, the paired  $t$ -test was applied [19]. As shown the Table 6, both methods do not give significantly different values, thus the agreement between the two methods is satisfactory at 95% confidence level.

#### 4. Conclusions

A fully continuous approach for ultrasound-assisted extraction, preconcentration and flame atomic absorption spectrometry for the determination of cadmium and lead in mussel samples by using a flow injection manifold as interface for coupling these three steps has been developed, allowing the automation of the whole analytical process. This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with the high sensitivity provided by the preconcentration step and the inherent advantages of FI systems. The system proposed presents the advantage of simplicity and avoids the use of expensive and sophisticated instruments. High sample throughput, good accuracy and precision, low detection limits, easy of use and automation, freedom from interferences, safety conditions (concentrated acids and carcinogenic nitrous vapours were avoided) make this methodology very suitable for cadmium and lead determination in solid samples as mussels. This is also the first time that these two separation steps (ultrasound-assisted extraction and preconcentration by using a minicolumn containing a chelating resin) have been sequentially performed in a continuous mode.

#### Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología

Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043).

#### References

- [1] E. Merian, *Metals and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance*, VCH, Weinheim, 1991 (Chapter II.6).
- [2] M. Valcárcel, M. Gallego, *Talanta* 44 (1997) 1509.
- [3] J. Nieuwenhuize, C.H. Poley-Vos, A.H. Van der Akker, W. Van Delft, *Analyst* 116 (1991) 347.
- [4] R. Chakraborty, A.K. Das, M.L. Cervera, M. de la Guardia, *Fresenius J. Anal. Chem.* 355 (1996) 43.
- [5] P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, O. Muñiz-Naveiro, A.M.J. Gomez-Fernández, A. Bermejo-Barrera, *Spectrochim. Acta, Part B* 55 (2000) 1351.
- [6] M.F. Enríquez-Domínguez, M.C. Yebra-Biurrún, M.P. Bermejo-Barrera, *Analyst* 123 (1998) 105.
- [7] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 41.
- [8] A. Moreno-Cid, M.C. Yebra, *Spectrochim. Acta, Part B* 57 (2002) 967.
- [9] M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1425.
- [10] R.M. García-Rey, R. Quiles-Zafra, M.D. Luque de Castro, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 316.
- [11] P.C. Aleixo, D. Santos Júnior, A.C. Tomazelli, I.A. Rufini, H. Berndt, F.J. Krug, *Anal. Chim. Acta* 512 (2004) 329.
- [12] C.C. Nascentes, M. Korn, M.A.Z. Arruda, *Microchem. J.* 69 (2001) 37.
- [13] D. Hristozov, C.E. Domini, V. Kmetov, V. Stefanova, D. Georgieva, A. Canals, *Anal. Chim. Acta* 516 (2004) 187.
- [14] *Official Methods of Analysis (AOAC)*, 17th ed., Sec. 999.17, Arlington, VA, 2002.
- [15] *Official Methods of Analysis (AOAC)*, 17th ed., Sec. 973.34, Arlington, VA, 2002.
- [16] A. Akbar, Y. Xuefeng, S. Hong, Y. Yingxue, G. Xue, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 283.
- [17] M.C. Yebra, M.F. Enríquez, A. García, A. Moreno-Cid, *Fresenius J. Anal. Chem.* 370 (1) (2001) 64.
- [18] S.N. Deming, S.L. Morgan, *Experimental Design: A Chemometric Approach*, Elsevier, Amsterdam, 1993 (Chapter 14).
- [19] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, 1994.





## **Continuous ultrasound-assisted extraction of cadmium from vegetable samples with on-line preconcentration coupled to a flow injection-flame atomic spectrometric system**

M. CARMEN YEBRA\*, SHEILA CANCELA  
and AMADA MORENO-CID

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Chemistry Faculty,  
University of Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

*(Received 21 April 2004; in final form 5 November 2004)*

A fully on-line flow injection method is described for the quantitative acid extraction of cadmium, preconcentration of this trace metal using a minicolumn containing a chelating resin and its determination by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). The on-line acid extraction step was carried out using a continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES). The acid extract was preconcentrated on a minicolumn packed with a chelating resin (CHELITE P, with aminomethylphosphoric acid groups), cadmium elution was carried out with hydrochloric acid, and this trace metal was continuously monitored by FAAS. A Plackett–Burman experimental design was used for optimization of the analytical procedure. The method allowed a total sampling frequency of 16 samples per hour, with a relative standard deviation for the complete procedure of 2.1; the detection and quantification limits were 0.014 µg/g and 0.067 µg/g for 60 mg of sample, respectively. The accuracy was verified using a standard reference material (NCS DC 73351 tea leaves). The analytical procedure was applied to the determination of trace amounts of cadmium in real vegetable and fruit samples.

*Keywords:* Ultrasound-assisted acid extraction; Minicolumn preconcentration; Cadmium; Vegetable samples; Flame atomic absorption spectrometry; Flow injection analysis

### **1. Introduction**

In view of the increase in vegetable consumption in recent years and the concurrent changes in atmospheric pollution levels, the determination of the cadmium content in the most consumed vegetables is of considerable concern from the human health standpoint. The ingestion of high levels of cadmium in foods and drinks can result rapidly in

---

\*Corresponding author. Fax: +34-981595012. E-mail: qncayebi@usc.es

feelings of nausea, vomiting, abdominal cramp and headaches. Long-term ingestion of cadmium causes serious renal damage, as well as bone disease leading to brittleness and even collapse of the skeleton [1]. The soils in which plants grow contain metals from a number of sources, principally the rocks from which the soil was formed, as well as fertilizers, waste and other materials added by man.

The analysis of solid foodstuffs such as fruits and vegetables usually requires rather complicated and time-consuming sample preparation procedures. Both losses of test elements and sample contamination may occur during this step, which deteriorates the reliability of the analysis. Moreover, sample preparation substantially increases the duration and cost of the analysis. Wet digestion is the preferred sample preparation procedure for solid foodstuffs. The Analytical Methods Subcommittee recommends the use of a wet digestion with sulphuric acid and hydrogen peroxide [2]. Thus, a number of methods for cadmium determination in vegetables involving a wet digestion were proposed. The long time involved (overnight at 50°C and 2 h at boiling temperature [3,4]) and the use of concentrated acids (nitric acid [3,4], nitric and perchloric acids [5,6]) are the principal disadvantages of these procedures. Despite the use of the microwave digestion, which is fast and effective, the digestion operation entails the utilization of concentrated acids, hydrogen peroxide or their mixtures ( $\text{HNO}_{3(c)}\text{-H}_2\text{O}_2$  [7,8] and  $\text{HNO}_{3(c)}$ ,  $\text{HNO}_{3(c)}\text{-HClO}_{4(c)}$  or  $\text{HNO}_{3(c)}\text{-H}_2\text{O}_2$  [8]), which generate carcinogenic nitrous vapours as a consequence of the organic matrix destruction, so a safety control has to be taken into account. If dry ashing is used, the temperature must be kept below 500°C to prevent volatilization losses. This procedure takes a long time (18 h [9] and 28 h [10]).

Ultrasonic radiation is a powerful aid in the acceleration of various steps of the analytical process. This energy is of great help in the pretreatment of solid samples. It also obviates total sample matrix introduction into the nebulizer of the spectrometer, which occurs with solid sampling, slurry sampling and digestion procedures.

The content of cadmium in vegetables has been determined by several techniques, including flame atomic absorption spectrometry (FAAS) [6,10–13], electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) [3–5,8,14–16], inductively coupled plasma (ICP) [8] and inductively coupled plasma/mass spectrometry (ICP-MS) [7]. As it is simple and inexpensive, FAAS is a widely used technique for the determination of metallic elements. FAAS, using an air-acetylene flame, has been shown to yield accurate and sensitive results in cadmium determination. Nevertheless, the concentration of metallic ions in samples as fruits and vegetables is often lower than the detection limits attainable with the most sensitive detectors. Therefore, in order to determine trace levels of metals (such as lead, cadmium, chromium and mercury) using FAAS, it is necessary to enrich them first by coprecipitation, extraction or preconcentration on a chelating or ion-exchange resin [6, 12, 13].

In this paper, we describe a simple and continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) connected to an on-line flow injection manifold for acid leaching of cadmium, on-line preconcentration of this trace metal from the acid extract using a chelating resin (CHELITE P, with aminomethylphosphoric acid groups) and its determination by flow injection-flame atomic absorption spectrometry (FI-FAAS). This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction procedures and the high sensitivity achieved by the preconcentration processes with the advantages of an FI system. The method was applied to vegetable and fruit samples for the determination of cadmium.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

A Perkin Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer, Shelton, CT-USA) furnished with a cadmium hollow cathode lamp was used. The instrument was set at 228.8 nm. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. The FI system includes two Gilson Minipuls 3 peristaltic pumps (Gilson, France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath (Selecta, Barcelona), six Rheodyne injection or switching valves (USA), Models 5041 and 5301, a glass minicolumn (100 mm × 3 mm i.d., bed volume 700  $\mu$ L) (Omnifit, UK). The ends of the minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541) and a Viton minicolumn (120 mm × 1 mm i.d.) packed with 50 mg of chelating resin for the preconcentration step. The ends of the minicolumn were plugged with glass wool.

### 2.2. Reagents

Ultrapure water of 18.2 M $\Omega$ cm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA) was used for the preparation of the reagents and standards. Hydrochloric acid, nitric acid (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain) and 1000  $\mu$ g/mL cadmium standard (Merck, Germany) were reagent grade. Chelating resin with aminomethylphosphoric acid groups, Chelate P (Serva Electrophoresis GmbH) and a particle size of 0.3–0.8 mm was used. The certified reference material used was NCS DC 73351 tea leaves (China National Analysis Center for Iron and Steel, Beijing, China).

### 2.3. Sample preparation and procedure

Fruits and some vegetables (carrot, potato and courgette) were peeled. Vegetable and fruits were washed with ultrapure water, cut in small pieces and dried for 5 days at 50°C. Then, the samples were triturated and pulverized in a porcelain mortar, and after sieving, fractions with a particle size less than 30  $\mu$ m were taken.

The continuous cadmium determination system is shown in figure 1. Vegetable and fruit samples (50–60 mg) were directly weighed into the glass minicolumn. Then, the minicolumn was connected to the CUES. First, the CUES circuit (2 mL) was loaded with the acid leaching solution (3 M nitric acid). Once the CUES circuit was closed, the leaching solution circulates through the minicolumn under ultrasonic energy action at a flow rate of 3.5 mL/min for 2 min. The direction of the flow was changed each 10 s to prevent sample accumulation at the minicolumn end. Then, the switching valve (SV2) was switched to its opposite position, and the acid extract was homogenized in the mixing coil. After this, the acid extract channel converged with a buffer solution stream (16 M ammonium acetate) to obtain a pH value > 3. The mixture was homogenized in a second mixing coil and then passed through the preconcentration minicolumn at a flow rate of 2 mL/min. The cadmium was retained quantitatively as its chelate and then eluted by injection of 92  $\mu$ L of 3 M hydrochloric acid into a water carrier stream and swept to the detector where cadmium was continuously monitored.

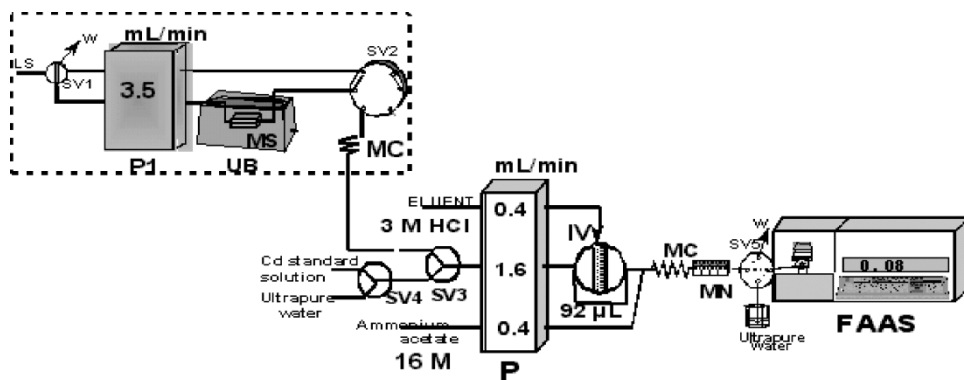


Figure 1. Flow-injection manifold for the whole procedure (CUES and preconcentration devices) for cadmium determination in vegetable and fruit samples. P1 and P2, peristaltic pumps; LS, leaching solution; W, waste; UB, ultrasonic bath; MS, minicolumn containing the sample; IV, injection valve; SV1, SV2, SV3, SV4 and SV5, switching valves; MC1 and MC2, mixing coils; MN, minicolumn containing the chelating resin (Chelite P) and FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

Standard solutions containing 0.000–0.035  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Cd in the same acid medium as the leaching solution were introduced into the flow system. Blank determinations were performed using the acid leaching solution, and in all instances the absorbance was 0.000.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of the cadmium preconcentration step

Plackett–Burman designs were used principally when the number of variables influencing the analytical system was very large, because the number of experimental runs can be reduced (as the designs would provide knowledge about the system tendencies [17]). In this paper, a Plackett–Burman  $2^6 * 3/16$  factorial type III resolution design with one centrepoint was selected, allowing 6 degrees of freedom, which involves 13 non-randomized runs. To optimize the preconcentration step, cadmium was measured on-line. Six experimental variables were optimized: HCl concentration (eluent solution), elution flow rate, sample pH to obtain a quantitative retention of Cd on the chelating resin (Chelite P), sample flow rate, eluent volume and minicolumn diameter. The lower and upper levels for each studied variable are listed in table 1. These values were chosen from experiences developed in previous experiments. The results of the design, expressed as percentage recovery are also shown in table 2. These results can be visualized by a standardized ( $P=95.0\%$ ) main effects Pareto chart (figure 2). It can be seen that the cadmium preconcentration/elution process appeared to be affected by one statistically significant factor: the sample pH. This variable is affected by a positive estimated effect. This means that when the pH value was increased for the levels tested, cadmium preconcentration/elution processes were favoured. This variable was studied at pH 2–9 to obtain the pH range where Cd retention was quantitative. At pH 9, partial precipitation of Cd occurs as  $\text{Cd}(\text{OH})_2$ , so the recovery obtained was 46.2%. At pH 3–8, a quantitative recovery was achieved (>95%), and when the pH value was <3, Cd retention was not complete

Table 1. Factor levels studied in the Plackett–Burman design ( $2^6 * 3/16$ ) for the Cd pre-concentration-elution process.

Variable	Key	Low (-)	High (+)	Optimum
Sample pH	A	1	7	3–8
Sample flow rate (mL/min)	B	0.5	4.0	2.0
Eluent concentration (HCl, M)	C	0.1	3.0	3.0
Eluent volume ( $\mu$ L)	D	70.4	190	92.0
Eluent flow rate (mL/min)	E	3.0	5.0	3.0
Minicolumn diameter (mm)	F	1.0	2.0	1.0

Table 2. Design matrix and response values in the Plackett–Burman design ( $2^6 * 3/16$ ) for the pre-concentration and continuous ultrasonic acid extraction of Cd.

Run No.	<sup>a</sup> A <sup>b</sup> G	B H	C I	D J	E K	F L	% Cd recovery <sup>c</sup>	% Cd recovery <sup>d</sup>
1	+	-	+	-	-	-	22.1	105.0
2	+	+	-	+	-	-	39.4	31.0
3	-	+	+	-	+	-	0	49.5
4	+	-	+	+	-	+	90.1	102.0
5	+	+	-	+	+	-	9.2	25.5
6	+	+	+	-	+	+	13.9	95.0
7	0	0	0	0	0	0	26.8	40.5
8	-	+	+	+	-	+	0	74.5
9	-	-	+	+	+	-	0	55.0
10	-	-	-	+	+	+	0	17.0
11	+	-	-	-	+	+	6	45.0
12	-	+	-	-	-	+	0	59.7
13	-	-	-	-	-	-	0	38.0

<sup>a</sup>Experimental factors for the pre-concentration step.

<sup>b</sup>Experimental factors for the continuous acid extraction step.

<sup>c</sup>Percentage Cd recovery in each experiment of the pre-concentration optimization.

<sup>d</sup>Percentage Cd recovery in each experiment of the acid extraction optimization.

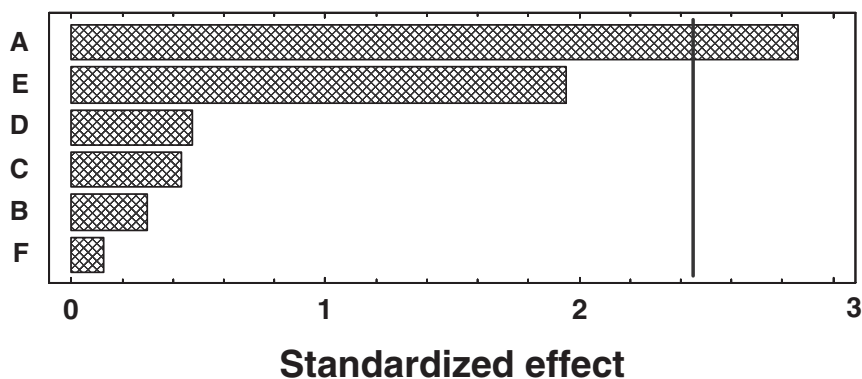


Figure 2. Standardized ( $P=95\%$ ) main effects Pareto chart for the Plackett–Burman design ( $2^6 * 3/16$ ) for on-line pre-concentration of cadmium in vegetable and fruit samples.

(recovery < 95%). All other parameters were not statistically influential factors. As the Plackett–Burman design only provides the tendencies to the optimum values of the variables, these factors were fine-tuned outside the framework of the design. The aims of this study were to decrease the eluent volume and increase the sample flow rate.

In order to achieve a greater concentration factor, eluent volumes of 70, 92 and 190  $\mu\text{L}$  were studied. An eluent volume of 70  $\mu\text{L}$  was not enough to obtain a quantitative Cd recovery (65%), but a volume of 92  $\mu\text{L}$  provides a complete elution of cadmium from the minicolumn, so that 92  $\mu\text{L}$  was selected as the optimum eluent volume. To obtain the greatest sampling frequency, a possible increase in the sample flow rate was studied. This variable was tested at 0.5–3.0 mL/min. A flow rate of 3.0 mL/min provides a 56% recovery, but a flow rate of 2.0 mL/min attains a quantitative recovery (>95%), so this value was selected as the optimum for cadmium retention. To simplify the analysis, an eluent flow rate of 3.5 mL/min, 1 mm minicolumn diameter, and 3 M HCl were selected as optimum values for these variables. The optimum conditions for cadmium preconcentration-elution are listed in table 1.

Since quantitative extraction of Cd in vegetable and fruit samples needs an acid medium, and the optimum pH for Cd retention on the chelating resin is in the range 3–8, an ammonium acetate buffer solution was proposed to achieve the optimum pH for Cd retention. In order to carry out this pH increase on-line, a study of concentration, volume and flow rate of the ammonium acetate buffer solution was developed. Thus, a 16 M concentration, 0.5 mL and 0.4 mL/min were selected as a compromise for the ammonium acetate channel.

### 3.2. Optimization of the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium

A Plackett–Burman  $2^6 \times 3/16$  factorial type III resolution design with one centrepoint was selected for optimization of the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium. This design involved 13 non-randomized runs. This factorial design was applied to 50–60 mg of a cabbage sample with a cadmium content of  $0.391 \pm 0.003 \mu\text{g/g}$  (this Cd concentration was obtained using an off-line acid digestion procedure,  $n = 11$ ). To optimize the CUES, cadmium was measured on-line by FAAS with a flow system that involves the preconcentration step previously optimized. Six experimental variables were optimized:  $\text{HNO}_3$  and HCl concentrations (leaching solution), sonication time, leaching temperature, flow rate of the CUES and leaching volume. Table 3 shows the lower and upper levels for each studied variable and the results of the experimental design. These results can be visualized by a standardized ( $P = 95.0\%$ ) main effects Pareto chart (figure 3). It can be seen that the cadmium extraction from vegetable samples appeared to be affected by three statistically significant factors: sonication time, flow rate of the CUES and nitric acid concentration. Sonication time and nitric acid concentration were affected by a positive estimated effect. In order to increase the sampling frequency, a possible reduction in the sonication time was studied.

Table 3. Factor levels in the Plackett–Burman design ( $2^6 \times 3/16$ ) for the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium from vegetable samples.

Variable	Key	Low (–)	High (+)	Optimum
$\text{HNO}_3$ concentration (M)	G	0	3	3
HCl concentration (M)	H	0	3	0
Sonication time (min)	I	0.5	5	2
Leaching volume (mL)	J	2	5	2
Leaching temperature ( $^\circ\text{C}$ )	K	20	70	20
Flow rate of the CUES (mL/min)	L	3.5	6.0	3.5

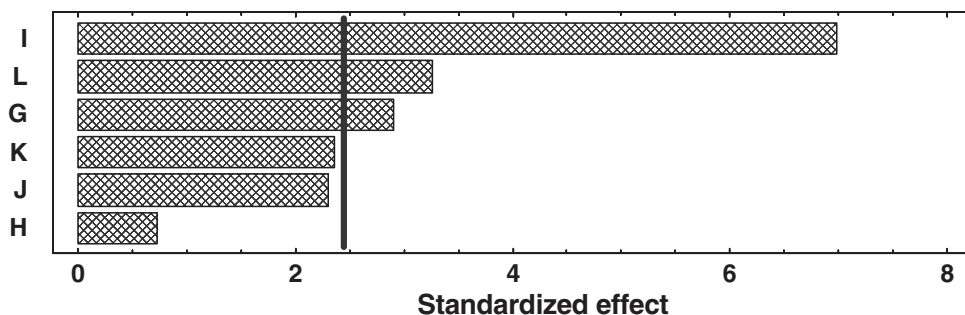


Figure 3. Standardized ( $P=95\%$ ) main effects Pareto chart for the Plackett–Burman design ( $2^6 * 3/16$ ) for continuous ultrasonic acid extraction of cadmium from vegetable and fruit samples.

Thus, the sonication time was studied between 1 and 2 min. The results obtained showed that a sonication time of 1.5 min was not enough to obtain a quantitative Cd extraction, but 2 min provided a 101.4% recovery. Nitric acid concentration, affected by a positive estimated effect, was fixed in 3 M. The flow rate of the CUES was affected by a negative estimated effect, so 3.5 mL/min was fixed as the optimum. To simplify the analysis, 0 M HCl, room temperature and 2 mL of leaching volume were selected, since these parameters were not statistically influential factors. The optimum conditions for continuous ultrasonic acid extraction of Cd are listed in table 3.

Finally, two variables that can affect the acid extraction process were studied. These variables are the sample particle size and the amount of sample. By using the optimum conditions, particle sizes of 30–100  $\mu\text{m}$  were tested. The results obtained showed that this variable does not affect the extraction process. As optimum results were obtained when a sample amount of 60 mg was used to optimize the CUES system, we presumed that smaller quantities would also be suitable. However, it is important to know the maximum amount of sample that is quantitatively leached in order to increase the sensitivity of the method. Therefore, the use of sample amounts higher than 60 mg were studied. The results obtained showed that amounts of sample greater than 60 mg produced pressure in the CUES, causing losses of sample. Thus, the maximum amount of sample that can be used is 60 mg.

#### 4. Analytical figures of merit

The calibration graph was run ( $n=7$ ) under optimum chemical and flow conditions for the whole process, the equation was  $\text{absorbance} = 7.8 \times 10^{-4} + 3.12 X$  ( $r=0.999$ ), where  $X$  is cadmium concentration expressed as  $\mu\text{g/mL}$ . The linear range taking into account 60 mg of sample and 92  $\mu\text{L}$  of eluent volume was 0.067–3.243  $\mu\text{g/g}$ .

The validation of the method was performed using 60 mg of a certified reference material, NCS DC 73351 tea leaves, with a Cd content of  $0.057 \pm 0.008 \mu\text{g/g}$ . Due to the low Cd concentration of reference material, two acid extractions were carried out, and the acid extracts were preconcentrated in the same preconcentration minicolumn. The Cd content obtained (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ) was  $0.059 \pm 0.002 \mu\text{g/g}$ , which agrees with the certified value.

The precision of the preconcentration step was verified using 1 mL Cd standard solution containing 0.024  $\mu\text{g/mL}$  ( $n=11$ ), and the precision of the whole process was

checked using a cabbage sample containing  $0.391 \pm 0.003 \mu\text{g/g}$  Cd ( $n=11$ ). The results obtained, expressed as relative standard deviation were 1.9 and 2.1%, respectively. To evaluate the proposed procedure for possible sample matrix interferences, a standard addition method was carried out. In this way, the reference material (NCS DC 73351) was spiked with several cadmium standard solutions added into the leaching solution (0–0.03  $\mu\text{g/mL}$ ). In these conditions, an addition calibration graph was run ( $n=6$ ) under the optimal chemical and flow conditions for the whole process, the equation was  $\text{absorbance} = 0.03 + 3.26 X$  ( $r=0.999$ ), where  $X$  is Cd concentration expressed as  $\mu\text{g/mL}$ . This equation and the calibration graph have a similar slope, demonstrating that there are no matrix interferences for Cd determination.

The limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation of the blank ( $n=30$ ) was found to be  $0.014 \mu\text{g/g}$ . The quantification limit (LOQ) based on ten times the standard deviation of the blank ( $n=30$ ) was found to be  $0.067 \mu\text{g/g}$ . The preconcentration factor of the method based on the rate between the direct calibration graph and FIA calibration graph slopes was found to be 20.5. The theoretic value of this factor was 21.7. The resin capacity based on maximum amount of cadmium that was able to retain the chelating resin was  $7.1 \mu\text{mol Cd/g}$  resin. The sample throughput taking into account the whole process was about 16 samples/h.

## 5. Analysis of samples

The method was applied to determine Cd in several fruit and vegetable samples, some being crops from Galicia, Spain. The concentration of cadmium in these samples ranged from 0.118 to  $0.640 \mu\text{g/g}$ . The results obtained with the proposed method were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion method with concentrated nitric acid, a preconcentration step using the chelating resin Chelite P and determination by FAAS. To compare the results obtained by both methods, the paired  $t$ -test was applied [18]. As shown in table 4, neither method

Table 4. Determination of cadmium in vegetable and fruit samples and paired  $t$ -test.

Sample	[Cd] <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	[Cd] <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/g}$ )	Recovery (%)
Cabbage	$0.391 \pm 0.003$	$0.396 \pm 0.009$	101.3
Lettuce	$0.643 \pm 0.005$	$0.640 \pm 0.003$	99.5
Turnip tops	$0.169 \pm 0.001$	$0.166 \pm 0.004$	98.2
Red cabbage	$0.181 \pm 0.006$	$0.178 \pm 0.006$	98.3
Silver beet	$0.473 \pm 0.005$	$0.479 \pm 0.002$	101.3
Potato	$0.266 \pm 0.002$	$0.256 \pm 0.001$	96.2
Courgette	$0.398 \pm 0.001$	$0.400 \pm 0.007$	100.5
Carrot	$0.266 \pm 0.007$	$0.268 \pm 0.007$	100.8
Tea	$0.233 \pm 0.002$	$0.233 \pm 0.006$	100.0
Lime tea	$0.354 \pm 0.006$	$0.355 \pm 0.009$	100.3
Camomila	$0.231 \pm 0.010$	$0.230 \pm 0.010$	99.6
Banana	$0.119 \pm 0.004$	$0.118 \pm 0.004$	99.2
Pear	$0.147 \pm 0.003$	$0.143 \pm 0.003$	97.3
Apple	$0.258 \pm 0.009$	$0.259 \pm 0.008$	100.4
Peach	$0.153 \pm 0.004$	$0.143 \pm 0.001$	93.5

<sup>a</sup>Off-line acid digestion, preconcentration with a chelating resin (Chelite P) and FAAS Cd determination.

<sup>b</sup>Cd concentration obtained by the present method. Experimental value of  $t=1.01$ ; Critical value of  $t$  ( $n-1=14$ ,  $P=0.05$ )=2.15.

gives significantly different values, so the agreement between the two methods is satisfactory.

## 6. Conclusions

The continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) combined with FI preconcentration is a rapid, precise and accurate sample pretreatment procedure and an effective approach for improving the sensitivity of the FAAS determination of cadmium in solid samples. The main goals obtained with the proposed method are a reduction in sample contamination as well as analyte losses (because less manipulation of the sample is required), a reduction in the amount of sample and reagent consumption (compared with off-line digestion procedures that involved 2–3 g [3], 2–10 g [6] and 0.5 g [8] of sample and upper volumes of concentrated acids), and a reduction in the sample preparation time (compared with digestion procedures: overnight at 50°C and 2 h at boiling point [3,4]) or dry ashing procedures (18 h [9] and 28 h [10]). These achievements imply an increase in sample throughput. A good match was obtained between off-line digestion and on-line ultrasound-assisted extraction, thus confirming the validity of the whole procedure. The proposed system is simple and obviates the use of expensive and sophisticated instruments.

## Acknowledgements

The authors are grateful to the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043).

## References

- [1] C. Reilly, *Metal Contamination of Food*, Elsevier, London (1991).
- [2] Analytical Methods Subcommittee, Sample preparation, *Analyst*, **100**, 761 (1975).
- [3] R. Tahvonen, J. Kumpulainen, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **340**, 242 (1991).
- [4] R. Tahvonen, J. Kumpulainen, *Food Addit. Contam.*, **12**, 263 (1995).
- [5] R.W. Dabeka, A.D. McKenzie, *J. AOAC Int.*, **75**, 386 (1992).
- [6] D. Zhang, C. Li, L. Yang, H. Sun, *J. Anal. At. Spectrom.*, **13**, 1155 (1998).
- [7] L.A. De Pieri, W.T. Buckley, C.G. Kowalenko, *Can. J. Soil Sci.*, **77**, 51 (1997).
- [8] M.J. McLaughlin, N.A. Maier, G.E. Rayment, L.A. Sparrow, G. Berg, A. McKay, P. Milham, R.H. Merry, M.K. Smart, *J. Environ. Qual.*, **26**, 1644 (1997).
- [9] N.I. Ward, J.M. Savage, *Sci. Total Environ.*, **146/147**, 309 (1994).
- [10] J. Gzyl, *Sci. Total Environ.*, **96**, 199 (1990).
- [11] R. Srikanth, S. Reddy, Raja Papi, *Food Chem.*, **40**, 229 (1991).
- [12] R. Barbera, R. Farre, M.J. Roig, *An. Bromatol.*, **42**, 345 (1990).
- [13] M. Yaman, S. Guecer, *Analyst*, **120**, 101 (1995).
- [14] Y.A. Vil'pan, I.L. Grinshtein, V.A. Kopeikin, S.I. Solov'eva, *J. Anal. Chem.*, **52**, 543 (1997).
- [15] J. Stupar, F. Dolinsek, *Spectrochim. Acta B*, **51**, 665 (1996).
- [16] I.L. Grinshtein, Y.A. Vilpan, A.V. Saraev, L.A. Vasilieva, *Spectrochim. Acta, B*, **56**, 261 (2001).
- [17] S.N. Deming, S.L. Morgan, *Experimental Design: A Chemometric Approach*, Elsevier, Amsterdam (1993).
- [18] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, UK (1994).



# Flow Injection Determination of Cd in Meat Samples Using a Continuous Lixiviation/Preconcentration System Coupled to a Flame AAS

S. Cancela-Pérez and \*M.C. Yebra-Biurrun

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry, University of Santiago de Compostela, 15782-Santiago de Compostela, Spain

## INTRODUCTION

Contamination of the environment by metals is a problem that has become of regional and even global concern. High metal concentrations occur within sites contaminated by atmospheric emissions from point source mining and smelting operations, and from combustion of fossil fuels.

The determination of inorganic elements in foods and biological materials has become of considerable interest because of the importance or toxicity of many of these elements to human health. Cadmium is an important environmental toxicant, having adverse health effects following long-term chronic exposure. This metal can be easily absorbed by plants and accumulates in the tissues of herbivores, mostly in the liver and kidney. Since meat and meat products form an important part of the human diet, cadmium can find its way into the human food chain (1). Therefore, the monitoring of endogenous and exogenous toxic trace elements, such as cadmium, in foods is an important aspect of food analysis.

Inductively coupled plasma (ICP) (2), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (3-4), and differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) (5) have been used for the determination of cadmium in meat samples. Atomic absorption spectrometry [graphite furnace (GFAAS) or flame atomic absorption spectrometry

## ABSTRACT

A simple flow injection method is proposed, which combines continuous acid extraction, preconcentration, and flame atomic absorption spectrometry for the determination of cadmium in meat samples. The dynamic acid extraction step was carried out by using a continuous ultrasound-assisted extraction system. The acid extract was preconcentrated on-line on a mini-column packed with a chelating resin (Chelite P, with amino-methylphosphoric acid groups), and elution was carried out with hydrochloric acid. Once eluted, cadmium was continuously monitored by flame atomic absorption spectrometry. These steps were optimized applying an experimental design.

The method allowed a total sampling frequency of 16 samples per hour. Good precision of the procedure was obtained [2.9%, expressed as relative standard deviation (RSD)], including a high enrichment factor (20.5), and detection and quantification limits of 0.014 and 0.067  $\mu\text{g/g}$  for 60 mg of sample, respectively. The accuracy of the proposed method was verified using CRM 183 Pig Kidney standard reference material; the results were in good agreement with the certified values. The analytical procedure was applied to the determination of trace amounts of cadmium in real meat samples.

(FAAS)] has shown to meet most of the requirements for a reliable and fast determination of this element in meat. GFAAS has greater sensitivity than flame atomic absorption spectrometry and preconcentration

steps are usually not required, but the method is subject to more chemical interferences and some form of matrix modification is required. Flame AAS is simple and inexpensive and therefore widely used for the determination of metallic elements. Flame AAS, using air-acetylene, provides accurate and sensitive results for cadmium determination. Nevertheless, the concentration of metallic ions in different types of matrices (such as cadmium in meat) is often below the detection limits attainable even with the most sensitive detectors. Therefore, in order to determine trace levels of trace metals using FAAS, it is necessary to enrich the sample. Evans et al. (2) used a chelating reagent solution [1.0% (m/v) solution of APDC-DDDC] to form a metal chelate with cadmium; this chelate was then extracted with chloroform. Falandysz (6) preconcentrated cadmium by forming a complex with APDC that was extracted with methyl isobutyl ketone. Gomes Neto et al. (7) proposed a minicolumn packed with a strongly basic anion exchanger (AG-X8 resin) for the spectrometric determination of cadmium in foodstuffs, plants, and similar products based on the formation of a cadmium iodide-Malachite Green (MG) associate.

The analysis of solid foodstuffs usually requires a rather complicated and time-consuming sample preparation. Loss of test elements and sample contamination with these elements may occur during this step, which deteriorates the reliability of the analysis. Moreover, sample preparation substantially adds to the duration and cost of analysis. Wet digestion is the preferred sample preparation procedure

Corresponding author.  
E-mail: qncayebi@usc.es

cedure for the determination of cadmium in foods. The Analytical Methods Subcommittee recommends use of a sulphuric acid-hydrogen peroxide wet digestion with the usual precautions (8). A number of methods for cadmium determination in meat samples based on wet digestion have also been proposed. However, the principal disadvantages of this method are a very time-consuming process [i.e., overnight at room temperature and 1 hour at 120°C (9), 6.5 h at different temperatures (10)] and the use of concentrated acids [nitric acid and hydrogen peroxide (11), a nitric, perchloric and sulphuric acid mixture (10)]. Microwave-assisted digestion was carried out by Crete et al. (11), Cubadda et al. (4), Zhou et al. (3), and Jorhem et al. (12). Despite the use of microwave digestion, which is fast and effective, the digestion operation requires concentrated acids, which generate carcinogenic nitrous vapors as a consequence of the organic matrix destruction, so safety control in the laboratory has to be taken into account. If dry ashing is used, the temperature must be kept below 500°C to prevent volatilization losses. This procedure is also very time-consuming [2 h at 100°C, 1 h at 150°C, 1 h at 300°C, and 15 h at 450°C (13)].

The use of ultrasonic energy is of great help in the pre-treatment of solid samples because it facilitates and accelerates operations such as the extraction of organic and inorganic compounds, slurry dispersion, homogenization, and other analytical stages. It also eliminates total sample matrix introduction into the nebulizer of the spectrometer, which occurs with solid sampling, slurry sampling, and the digestion procedures (14–15).

Since its introduction, flow injection analysis (FIA) has established itself as a very useful and versatile technique (16–17). Some of the

advantages are flexibility, reliability, reproducibility, ease of automation, high sample throughput, small sample volume, and low reagent consumption and interferences.

In this paper, we describe a simple and continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) connected to an on-line flow injection manifold for acid leaching of cadmium, on-line concentration of this trace metal from the acid extract using a chelating resin (Chelite P, with aminomethyl-phosphoric acid groups), and its determination by flow injection-flame atomic absorption spectrometry (FI-FAAS). This procedure combines the benefits of the ultrasound-assisted extraction methods, the high sensitivity of the preconcentration techniques, and the advantages of the FI system. The method was applied to the analysis of meat samples for the determination of cadmium.

## EXPERIMENTAL

### Instrumentation

A PerkinElmer Model 5000 atomic absorption spectrometer was used (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), equipped with a cadmium hollow cathode lamp. The instrument was set at 228.8 nm. The spectrometer output was connected to a PerkinElmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. The FI system was equipped with two Gilson® Minipuls™ 3 peristaltic pumps (Gilson, France) fitted with Viton® tubes, an ultrasonic bath (Selecta, Barcelona, Spain), six Rheodyne® injection or switching valves (USA), Models 5041 and 5301, a glass minicolumn (100 mm x 3 mm i.d., bed volume 700 µL) (Omnifit, UK). The ends of the minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541) and the Viton minicolumn (120 mm x 1 mm i.d.) was packed with 50 mg chelating resin for the

preconcentration step. The ends of the minicolumn were plugged with glass wool.

### Reagents

Ultrapure water of 18.2 MΩ.cm resistivity, obtained from a Milli-Q™ water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA), was used for preparation of the reagents and standards. Hydrochloric acid, nitric acid (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain), and 1000 µg/mL cadmium standard solution (Merck, Darmstadt, Germany) were of reagent grade. The chelating resin used was Chelite P, with aminomethylphosphoric acid groups (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany). The sample particle size was 0.3–0.8 mm and ammonium acetate (Merck) of 16 mol/L in aqueous solution. The certified reference material was CRM 183 Pig Kidney (Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium).

### Sample Preparation and Procedure

The meat, liver, and kidney samples were purchased at a local supermarket. Visible fat, connective tissue, and major blood vessels were excised. The samples were cut into small pieces, dried at 50°C, triturated and pulverized in a porcelain mortar and, after sieving, fractions with a particle size less than 30 µm were taken for analysis.

The continuous cadmium determination system is shown in Figure 1. Meat samples of 50–60 mg were weighed directly into the glass minicolumn. Then, the minicolumn was connected to the CUES. First, the CUES circuit (2 mL) was loaded with the acid leaching solution (3 M nitric acid). Once the CUES circuit was closed, the leaching solution circulated through the minicolumn under ultrasonic energy action at a flow rate of 3.5 mL/min for 2 min. The direction of the flow was changed each 30 s in order to avoid sample accumulation

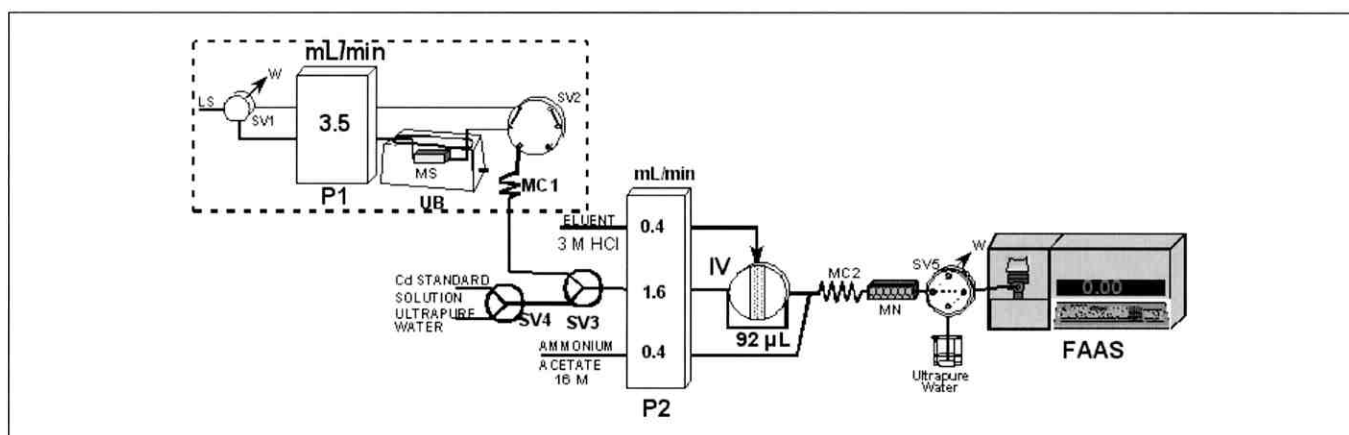


Fig. 1. Flow injection manifold for the whole procedure (CUES and preconcentration device) for cadmium determination in meat samples. P1 and P2, peristaltic pumps; LS, leaching solution; W, waste; UB, ultrasonic bath; MS, minicolumn containing the sample; IV, injection valve; SV1-SV5, switching valves; MC1 and MC2, mixing coils; MN, minicolumn containing the chelating resin (Cbelite P) and FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

at the end of the minicolumn. Then, the switching valve (SV2) was switched to its opposite position and the acid extract was homogenized in the mixing coil. After this, the acid extract channel converged with a buffer solution stream and 16 M ammonium acetate was added in order to obtain a pH value of  $>3$ . The mixture was homogenized in a second mixing coil and then passed through the preconcentration minicolumn at a flow rate of 2 mL/min. The cadmium was retained quantitatively by formation of a metal chelate, eluted by injection of 92  $\mu\text{L}$  of 3 M hydrochloric acid into a water carrier stream, and swept to the detector where cadmium was continuously monitored.

Standard solutions containing between 0.000 and 0.036  $\mu\text{g/mL}$  of Cd in the same acid medium as the leaching solution were introduced into the flow system.

## RESULTS AND DISCUSSION

In the proposed approach, the order used for optimizing the steps involved was as follows: (a) the variables affecting the cadmium preconcentration step and (b) the leaching step.

TABLE I  
Factor Levels Studied in the Plackett-Burman Design ( $2^6$  3/16)  
for the Cd Preconcentration-Elution Process

Variable	Key	Low	High	Optimum
Sample pH	A	1	7	3-8
Sample flow rate (mL/min)	B	0.5	4.0	2.0
Eluent concentration (HCl, M)	C	0.1	3.0	3.0
Eluent volume ( $\mu\text{L}$ )	D	70.4	190	92
Elution flow rate (mL/min)	E	3.0	5.0	3.0
Minicolumn diameter (mm)	F	1.0	2.0	1.0

### Optimization of the Cd Preconcentration Step

The number of variables that affect the cadmium preconcentration step is very large: HCl concentration (eluent solution), elution flow rate, sample pH to obtain a quantitative retention on the chelating resin, flow rate of the sample, eluent volume, and minicolumn diameter. Plackett-Burman designs are principally used when the number of variables that influence the analytical system is very large, because such designs permit the use of a full factorial design and the number of factor combinations can be obtained in multiples of four (18).

In this paper, a Plackett-Burman  $2^6$  (3/16) factorial type III resolu-

tion design with one center point was selected, allowing 6 degrees of freedom and involving 13 non-randomized runs. This factorial design was applied to a standard solution containing 0.04  $\mu\text{g/mL}$  of cadmium. One mL of this solution was passed through the preconcentration minicolumn. The lower and upper levels for each studied variable are listed in Table I. These values were chosen from available data reported in previous experiments.

From the results of these analytical data, it can be concluded that the cadmium preconcentration-elution process appeared to be affected positively by one statistically significant factor, namely the sample pH. This means that the cadmium preconcentration-elution

efficiency is directly proportional to the pH and best responses (cadmium recovery, %) are obtained at the highest tested level of this variable.

All other parameters were not statistically influential. The diameter of the minicolumn, eluent concentration, and eluent volume were affected by a positive estimated effect, while the sample flow rate and eluent flow rate were affected by a negative estimated effect.

In order to improve the analytical characteristics of the method, other experiments outside the framework of the design were carried out. Table II shows the results of these experiments. The minicolumn diameter is affected by the lower positive estimated effect. In order to avoid a system connection fit, a minicolumn with a diameter of 1 mm was chosen as optimum.

The eluent volume is the variable with an upper non-significant estimated effect and was affected by a positive sign. Eluent volumes of 70.4, 92, and 190  $\mu\text{L}$  were studied to obtain a greater concentration factor. An eluent volume of 70.4  $\mu\text{L}$  was not enough to obtain a quantitative recovery (65%), but 92  $\mu\text{L}$  provided the complete elution of cadmium from the minicolumn; and 92  $\mu\text{L}$  was selected as the optimum eluent volume.

Eluent and sample flow rates were affected by a negative estimated effect. In order to achieve the greatest sampling frequency, the upper values of the flow rates were studied. The eluent flow rate was studied between 3–4 mL/min. A flow rate of 4 mL/min provided a 44.3% recovery, while the lower value studied for this variable (3 mL/min) was chosen as the optimum value because a quantitative elution was obtained. On the other hand, a sample flow rate between 2–3 mL/min was also studied. It was found that a flow rate of

**TABLE II**  
**Experiments Outside the Framework of the Design to Fine-tune the Preconcentration-Elution Process**

A	B	C	D	E	F	Cd Recovery (%)
7	0.5	3.0	190	3	1	99.7
7	0.5	3.0	70.4	3	1	65.0
7	0.5	3.0	92	3	1	103.4
7	0.5	3.0	92	4	1	44.3
7	2.0	3.0	92	3	1	96.1
7	3.0	3.0	92	3	1	56
7	2.0	2.0	92	3	1	74.9

**TABLE III**  
**Study of pH Range for Quantitative Retention of Cd**

A	B	C	D	E	F	Cd Recovery (%)
8	2.0	3.0	92	3	1	106.1
9	2.0	3.0	92	3	1	46.2
3	2.0	3.0	92	3	1	98.6
2	2.0	3.0	92	3	1	72

3 mL/min provides a 56% recovery, while a flow rate of 2 mL/min gave a quantitative cadmium recovery of >95%; and this value was selected as the optimum for cadmium retention.

In order to reduce the hydrochloric acid concentration (eluent), one experiment was performed using a lower concentration (2 M). The recovery obtained was not quantitative, so 3 M hydrochloric acid concentration was selected.

Finally, a few experiments were carried out with the aim of establishing the pH range for quantitative retention of cadmium. The results of these experiments are listed in Table III. Cadmium was retained quantitatively in the pH range of 3–8. This is a very important factor because the sample in the acid extract has a very low pH value (3 M nitric acid medium). An ammonium acetate buffer solution was proposed in order to achieve

the optimum pH for cadmium retention. Since quantitative extraction of Cd in meat samples needs an acid medium and the pH optimum for Cd retention on the chelating resin ranges from 3–8, an ammonium acetate buffer solution was proposed. In order to carry out this pH increase on-line, the concentration, volume, and flow rate of the ammonium acetate buffer solution were studied. A 0.61-g amount of ammonium acetate was required to increase the pH from 3–5 for 2–5 mL of acid extract.

The buffer solution concentration was studied between 2.65–16 M. These concentrations implied a buffer solution volume ranging from 0.5–3.0 mL and a buffer solution flow rate from 0.4–1.0 mL/min. The principal aim was to achieve a greater sampling frequency, and the sum of both flow rates (sample flow rate and buffer solution flow rate) could not

exceed a total flow rate of 2 mL/min (maximum flow rate to obtain a quantitative cadmium retention). A 16 M concentration, 0.5 mL buffer solution, and 0.4 mL/min flow rate were selected as a compromise for the ammonium acetate channel. The optimum conditions for the cadmium preconcentration-elution are listed in Table I.

### Optimization of Continuous Ultrasonic Acid Extraction of Cd

In this case, the same experimental design was used: a Plackett-Burman  $2^6$  (3/16) factorial type III resolution design. This factorial design was applied to 60 mg of rabbit liver with a cadmium concentration of 0.165  $\mu\text{g/g}$ . The sample concentration was obtained using an off-line acid digestion procedure. Six experimental variables were optimized: nitric acid and hydrochloric acid concentrations (leaching solution), sonication time, leaching temperature, flow rate of the CUES, and leaching volume. To optimize the CUES, cadmium was measured on-line by FAAS with a flow injection system that involves the preconcentration step previously described. Table IV summarizes the lower and upper levels for each studied variable.

The analytical data show that cadmium extraction appeared to be affected positively by two statistically significant factors: nitric acid concentration and sonication time. The flow rate of the CUES, hydrochloric acid concentration, and leaching volume were affected by a negative estimated effect, which suggests that they inhibit the extraction at the highest levels tested. Thus, a 3.5 mL/min flow rate, 0 M hydrochloric acid concentration, and 2 mL volume were selected as the optimum values.

The sonication temperature was affected by a positive estimated effect but was not a statistically significant factor. In order to simplify

**TABLE IV**  
Factor Levels Studied in the Plackett-Burman Design ( $2^6$  3/16) for the Continuous Ultrasonic Acid Extraction of Cd From Meat Samples

Variable	Key	Low	High	Optimum
HNO <sub>3</sub> concentration (M)	G	0	3	3
HCl concentration (M)	H	0	3	0
Sonication time (min)	I	0.5	5.0	2
Leaching volume (mL)	J	2.0	5.0	2
Leaching temperature (°C)	K	20	70	20
Flow rate of the CUES (mL/min)	L	3.5	6.0	3.5

**TABLE V**  
Experiments Outside the Framework of the Design to Fine-tune the Continuous Ultrasonic Acid Extraction Process

G	H	I	J	K	L	Cd Recovery (%)
3	0	2	2	20	3.5	99.7
3	0	1.5	2	20	3.5	82.3
1.5	0	2	2	20	3.5	70.8

the determination, a room temperature of 20°C was selected as the optimum temperature for cadmium extraction. In this case, only three experiments outside of the framework of this study were carried out and the results are listed in Table V. The aim of this study was to increase the sample frequency and to reduce the nitric acid concentration. The sonication time was studied between 2.0–1.5 min. Since 2 min was enough to extract cadmium quantitatively, but 1.5 min provided an 82.3% recovery, 2 min was selected as the optimum sonication time.

Finally, the possible reduction of nitric acid concentration was studied. A 1.5 M nitric acid concentration was tested but was found not to be enough to obtain a quantitative cadmium extraction. Best results were obtained with 3 M HNO<sub>3</sub> and this value was chosen as the leaching solution. The optimum conditions for continuous ultrasonic acid extraction are listed in Table IV.

Two sample variables that can affect the acid extraction process were studied, namely, meat particle size and amount of sample. Using the optimum CUES and preconcentration conditions, particle sizes between 30–100  $\mu\text{m}$  were tested. The results obtained indicate that this variable does not affect the extraction process. Since optimum results were obtained when a sample amount of 60 mg was used to optimize the CUES system, we supposed that smaller quantities would also be suitable. We also studied the maximum amount of sample that is quantitatively leached in order to increase the sensitivity of the method and selected 80 mg. The results demonstrated that sample amounts greater than 60 mg produce high pressure in the CUES and cause loss of sample. Therefore, the maximum sample amount that can be used is 60 mg.

### Features of the Method

The calibration graph was run (n=7) under optimum chemical and flow conditions for the global process, the equation was  $\text{absorbance} = 7.8 \times 10^{-4} + 3.12 X$  ( $r = 0.999$ ), where X is the Cd concentration expressed as  $\mu\text{g/mL}$ . The linear ranged from 0.067–3.243  $\mu\text{g/g}$ .

The precision of the preconcentration step was verified using 1 mL Cd standard solution containing 0.024  $\mu\text{g/mL}$  Cd (n = 11). The precision for the global process obtained for the real samples was checked on a rabbit liver sample containing 0.165  $\mu\text{g/g}$  Cd (n = 11). The results obtained and expressed as the relative standard deviation were 1.9 and 2.9%, respectively. The limit of detection (LOD), based on three times the standard deviation (n = 30) of the blank, was found to be 0.014  $\mu\text{g/g}$ . The quantification limit (LOQ) based on 10 times the standard deviation (n = 30) of the blank was found to be 0.067  $\mu\text{g/g}$ . The validation of the method was performed using a certified reference material CRM183 Pig Kidney, with a cadmium content of  $2.71 \pm 0.15 \mu\text{g/g}$ . The cadmium content obtained for the certified reference material by the proposed method (mean  $\pm$  SD, n = 3) was  $2.76 \pm 0.05 \mu\text{g/g}$ , which agrees with the certified value.

The concentration factor of the method based on the rate between the direct calibration graph and FIA calibration graph was found to be 20.5. The resin capacity based on the maximum amount of cadmium that was able to retain the chelating resin was 7.07  $\mu\text{mol Cd/g resin}$ . The sample throughput using the proposed method was about 16 samples/h.

### Analysis of the Samples

The method was applied to the determination of cadmium in various meat samples. The concentra-

**TABLE VI**  
**Determination of Cd in Meat Samples and Paired t-Test**

Sample	[Cd] <sub>A</sub> ( $\mu\text{g/g}$ )	[Cd] <sub>B</sub> ( $\mu\text{g/g}$ )	Recovery (%)
Chicken	0.134	0.135	99.3
Turkey	0.157	0.157	100
Pig	0.133	0.130	102.3
Calf	0.101	0.096	105.2
Mutton	0.107	0.106	100.9
Rabbit liver	0.165	0.168	98.2
Mutton kidney	0.408	0.417	97.8

A: Off-line acid digestion, preconcentration with a chelating resin (Chelite P) and FAAS Cd determination.

B: Cd concentration obtained by the present method.

Experimental value of  $t = 0.33$ ; Critical value of ( $t_{n-1}=6, P=0.05$ ) = 2.45

tion of cadmium in these samples ranged from 0.096–0.417  $\mu\text{g/g}$ . The results obtained with the proposed method were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion method with concentrated nitric acid, a preconcentration step previously optimized by using the chelating resin Chelite P, and determination by FAAS. To compare the results obtained by both methods, the paired t-test was applied (19). As shown in Table VI, both methods do not give significantly different values, thus the agreement between the two methods is satisfactory.

### CONCLUSION

The continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) combined with a preconcentration step and coupled with a FI manifold has demonstrated to be a rapid, precise, and accurate sample pretreatment procedure for the acid leaching of cadmium, preconcentration of this trace metal, and its determination by FAAS in solid samples. The main goals obtained with the method proposed are a reduction of sample contamination as well as analyte loss. This is because less manipulation of the sample is required, reduced sample and reagent amounts are needed, and a reduction in the sample prepara-

tion time is achieved which significantly increases sample throughput.

This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with the high sensitivity provided by the preconcentration step and the inherent advantages of the FI systems.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project No. CAL01-043). S.C. acknowledges a grant from the Xunta de Galicia.

*Received July 14, 2004.*

## REFERENCES

1. J.M. Llobet, G. Falco, C. Casas, A. Teixido, and J.L. Domingo, *J. Agric. Food Chem.* 5, 838 (2003).
2. W.H. Evans and D. Dellar, *Analyst* 197, 977 (1982).
3. H. Zhou and J. Liu, *At. Spectrosc.* 18, 115 (1997).
4. F. Cubadda, A. Raggi, A. Testoni, and F. Zanasi, *J. AOAC Int.* 85, 113 (2002).
5. J. Kumpulainen, M. Paakki, and R. Tahvonen, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 338, 423 (1990).
6. J. Falandysz, *Food Addit. Contam.* 8, 71 (1991).
7. J.A. Gomes Neto, H. Bergamin Filho, R.P. Sartini, and E.A.G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta.* 306, 343 (1995).
8. Analytical Methods Subcommittee, *Analyst* 100, 761 (1975).
9. M. Lopez Alonso, J.L. Benedito, M. Miranda, C. Castillo, J. Hernández, and R.F. Shore, *Food Addit. Contam.* 17, 447(2000).
10. C.D.C. Salisbury and W. Chan, *J. AOAC Int.* 74, 587 (1991).
11. M. Crete, F. Potvin, P. Walsh, J.L. Benedetti, M.A. Lefebvre, J.P. Weber, G. Paillard, and J. Gagnon, *Sci. Total Environ.* 66, 45 (1987).
12. L. Jorhem and J. Engman, *J. AOAC Int.* 83, 1189 (2000).
13. N. Ybañez, R. Montoro, and A. Bueso, *Rev. Agroquim. Technol. Aliment.* 23, 510 (1983).
14. A. Moreno-Cid, M.C. Yebra, S. Cancela, and R.M. Cespón, *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 730 (2003).
15. M.C. Yebra, A. Moreno-Cid, R.M. Cespón, and S. Cancela, *At. Spectrosc.* 24, 31(2003).
16. K.K. Stewart, G.R. Beecher, and P.E. Hare, *Fed. Proc.* 33, 1439 (1974).
17. J. Ruzicka and E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta.* 78, 145 (1975).
18. S.N. Deming and S.L. Morgan, *Experimental Design: A Chemometric Approach*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands (1994).
19. J.C. Miller and J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, UK (1994).



M. C. Yebra · S. Cancela

## Continuous ultrasound-assisted extraction of cadmium from legumes and dried fruit samples coupled with on-line preconcentration-flame atomic absorption spectrometry

Received: 9 November 2005 / Revised: 31 January 2005 / Accepted: 7 February 2005 / Published online: 21 May 2005  
© Springer-Verlag 2005

**Abstract** Cadmium was continuously extracted with diluted nitric acid from legumes and dried fruit samples using a simple, rapid and continuous ultrasound-assisted extraction system. A minicolumn packed with a chelating resin (Chelite P, with aminomethylphosphoric acid groups) was placed between the extraction unit and the detector for cadmium preconcentration. The cadmium content in the acid extract was retained into the minicolumn, and elution was carried out with hydrochloric acid, with this trace metal continuously monitored by flame atomic absorption spectrometry. An experimental design (Plackett-Burman  $2^6 \times 3/16$ ) was used to optimize the continuous leaching procedure and the preconcentration step. The method allowed a total sampling frequency of 10 and 14 samples per hour for legumes and dried fruit, respectively. The procedure displayed good precision (2.0 and 2.5%, respectively, expressed as relative standard deviations) for samples containing  $0.202 \pm 0.005 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd (broad bean) and  $0.239 \pm 0.004 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd (peanut). Detection limits of  $0.014 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd for 60 mg of legume samples and  $0.011 \mu\text{g g}^{-1}$  Cd for 80 mg of dried fruit samples were obtained. The method was successfully applied to the determination of trace amounts of cadmium in legumes and dried fruit samples.

**Keywords** Ultrasound-assisted acid extraction · Minicolumn preconcentration · Cadmium · Flame atomic absorption spectrometry · Flow injection analysis · Legumes and dried fruit samples

### Introduction

The popularity and consumption of legumes and dried fruits are growing due to their nutritional properties and beneficial effects. However, such foods can contain trace levels of toxic trace metals such as cadmium, so it is important to monitor the levels of these toxic metals in these foods [1].

Since most analytical instruments (such as atomic spectrometric detectors) handle liquid samples, more attention should be directed into improving solid sample pre-treatment, because it is currently often time-consuming and prone to contamination or analyte losses due to the prolonged sample manipulation. Recently, new sample treatment methods, such as ultrasound-assisted extraction, have been proposed for extracting trace metals from various solid matrices. These methods are based on the use of diluted acids to extract or leach the trace metals from the solid samples. Nevertheless, these procedures are laborious and time-consuming because they involve large sonication times (10–120 min) and a centrifugation step is needed to separate the liquid phase (10–20 min) [2–7]. Our investigation team has, for the first time, developed a CUES coupled to a FI manifold for the determination of Cu, Fe, Ca and Mn in solid samples by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) [8–11]. This flow-injection (FI) system avoids the drawbacks present in their offline counterparts because the extraction time and sample manipulation are reduced considerably. Nevertheless, FAAS cannot generally be used to directly determine cadmium in food samples because of its insufficient detection capabilities. Thus, trace metal preconcentration is used to increase the analyte concentration to measurable levels. The preconcentration and/or separation of trace elements prior to FAAS detection is carried out using several solid-phase extraction procedures (SPE), generally involving chelating resins or metal complexation followed by retention on an adsorbent support [12, 13]. Nevertheless, the preconcentration process inserts addi-

M. C. Yebra (✉) · S. Cancela  
Department of Analytical Chemistry,  
Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry,  
University of Santiago de Compostela,  
15782 Santiago de Compostela, Spain  
E-mail: qncayebi@usc.es  
Fax: +34-98-1595012

tional steps into the analytical process, increasing the analysis time and the risk of contamination or analyte losses, but these problems can be minimized if this step is performed online using a FI manifold.

In this paper, we describe a continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) coupled to a FI manifold for the acid leaching of cadmium, the online preconcentration of this trace metal (achieved using a chelating resin: CHELITE P, with aminomethylphosphoric acid groups), and its determination by FI-FAAS. Thus, the whole manifold combines the three processes (acid extraction, preconcentration and detection). This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction procedures and the high sensitivity of preconcentration techniques with the advantages provided by FI systems. The method was applied to cadmium determination in legume and dried fruit samples.

## Experimental

### Instrumentation

A Perkin-Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer, Shelton, CT-USA) was furnished with a cadmium hollow cathode lamp. The instrument was set at 228.8 nm. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. The FI system included two Gilson Minipuls peristaltic pumps (Gilson, France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath (Selecta, Barcelona, Spain), six Rheodyne injection or switching valves (USA), Models 5041 and 5301, a glass extraction minicolumn (100×3 mm i.d., bed volume 700  $\mu$ L, Omnifit, UK; the ends of minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541)), a Viton preconcentration

minicolumn (120×1 mm i.d.) packed with 50 mg of chelating resin for the preconcentration step; the ends of this minicolumn were plugged with glass wool.

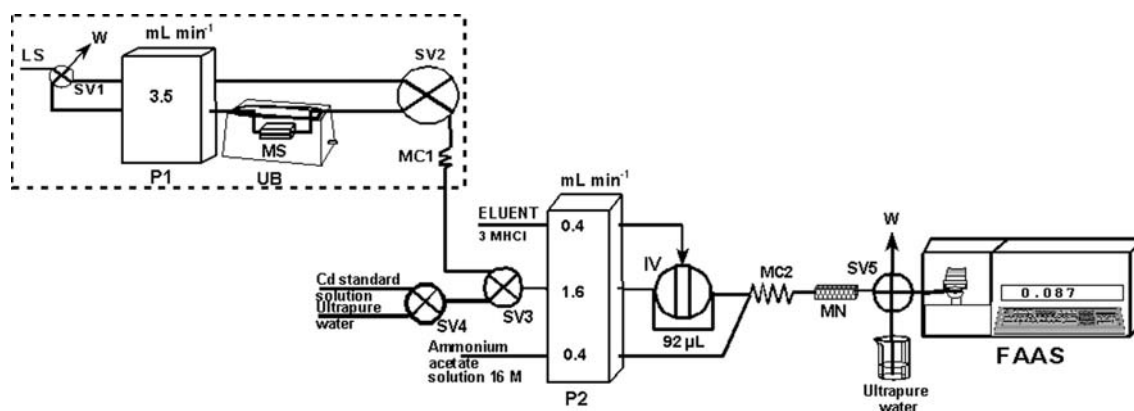
### Reagents

Ultrapure water of 18.2 M $\Omega$  cm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA) was used to prepare the reagents and standards. Hydrochloric acid, nitric acid (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain), ammonium acetate and 1000  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> of cadmium standard (Merck, Germany) were all analytical reagent grade. Chelite P (Serva Electrophoresis GmbH) with aminomethylphosphoric acid groups, particle size between 0.3 and 0.8 mm, was used as chelating resin.

### Sample preparation and procedure

Samples were dried at 50 °C, triturated and pulverized in a porcelain mortar for 1 min, and, after sieving, fractions with a particle size of less than 30  $\mu$ m were taken. The continuous cadmium determination system is shown in Fig. 1. Legume and dried fruit samples (50–60 mg) were directly weighed into the glass minicolumn. Then the minicolumn was connected to the CUES circuit. First, the CUES circuit (2 mL) was loaded with the acid leaching solution (2 or 3 M nitric acid, for legume and dried fruit samples, respectively). Once the CUES circuit was closed, the leaching solution circulated through the minicolumn under the action of ultrasonic energy at a flow rate of 3.5 mL min<sup>-1</sup> for 2.5 min (legumes) or 1 min (dried fruits). The direction of the flow was changed every 10 s in order to avoid sample accumulation at the end of the minicolumn. Then, the switching valve (SV2) was switched to its opposite position and the acid extract was homogenized in the mixing coil. After this, the acid extract channel was mixed with a buffer solution stream (16 M ammonium acetate) in order to obtain a pH value > 3. The mixture was homogenized in a second mixing coil and then passed through the preconcentration minicolumn at a flow rate of 2 mL min<sup>-1</sup>. The cadmium was retained

**Fig. 1** Flow injection manifold for the whole procedure (CUES and preconcentration device) for cadmium determination in legumes and dried fruits sample. *P1* and *P2* peristaltic pumps, *LS* leaching solution, *W* waste, *UB* ultrasonic bath, *MS* minicolumn containing the sample, *IV* injection valve, *SV1-SV5* switching valves, *MC1* and *MC2* mixing coils, *MN* minicolumn containing the chelating resin (Chelite P), and *FAAS* flame atomic absorption spectrometer



quantitatively as its chelate and was then eluted by injection of 92  $\mu\text{L}$  of 3 M hydrochloric acid into a water carrier stream that swept it to the detector, where was continuously monitored. Standard solutions of up to 0.036  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of Cd in the same acid medium as the leaching solution were introduced into the flow system.

## Results and discussion

### Optimization of the cadmium preconcentration/elution step

Six variables that could potentially affect the cadmium preconcentration procedure (sample pH, sample flow rate, eluent concentration (HCl), eluent flow rate, eluent volume and minicolumn diameter) were studied. For this, a Plackett-Burman  $2^6 \times 3/16$  factorial type III resolution design with one centerpoint was selected, allowing six degrees of freedom, which involved 13 non-randomized runs. In order to test the statistical significance of the effects, an ANOVA was performed using the software package Statgraphics Version 4.1. This factorial design was applied to a standard solution containing 0.04  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of cadmium, and for this study, 1 mL of this solution was passed through the preconcentration minicolumn. To optimize this step, cadmium was measured on-line by FAAS. Table 1 summarizes the design matrix, the upper and lower values for each studied variable, and the results of the design, expressed as percent recovery. From these results, it can be concluded that the cadmium preconcentration-elution process is affected positively by one statistically significant factor: sample pH. None of the other factors had a significant

effect. Table 2 lists the estimated effects and the optimum value for each variable according to the Plackett-Burman design. As the Plackett-Burman design only provides the tendencies for the optimum values of the variables, these factors were fine-tuned outside the framework of the design. The aims of this study were to decrease the eluent volume and to increase the sample flow rate. Table 1 shows the results of these experiments. A few experiments (21–24) were carried out in order to establish the pH range for quantitative retention of cadmium. The results showed that cadmium is retained quantitatively in the pH range: 3–8. This is a very important factor because the sample in the acid extract has a very low pH value. Therefore, an ammonium acetate buffer solution was used to achieve the optimum pH for cadmium retention. Thus, to carry out the pH adjustment online, the concentration, volume and flow rate of the ammonium acetate buffer solution were all tested. The principal aim was to achieve a greater sampling frequency, taking into account that the sum of both flow rates (sample and buffer solution flow rates) could not exceed a total flow rate of 2  $\text{mL min}^{-1}$  (maximum flow rate permitted to obtain a quantitative cadmium retention). So, a concentration of 16 M, 0.5 mL and 0.4  $\text{mL min}^{-1}$  were selected as a compromise for the ammonium acetate channel. The optimum conditions for cadmium preconcentration-elution are listed in Table 2.

### Optimization of the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium

To optimize the CUES, a Plackett-Burman  $2^6 \times 3/16$  factorial type III resolution design was used. This fac-

**Table 1** Design matrix and response values in the Plackett-Burman design ( $2^6 \times 3/16$ ) (runs: 1–13), and experiments performed outside the framework to fine-tune the variables involved in the preconcentration-elution process (runs: 14–24)

Run ( $n=2$ )	(i) (ii)	A 1–7	B 0.5–4.0	C 0.1–3	D 70.4–190.0	E 3.0–5.0	F 1.0–2.0	Cd recovery (%)
1		7	0.5	3	70.4	3.0	1.0	22.1 $\pm$ 1.3
2		7	4	0.1	190.0	3.0	1.0	39.4 $\pm$ 0.9
3		1	4	3	70.4	5.0	1.0	0.0 $\pm$ 0.0
4		7	0.5	3	190.0	3.0	2.0	90.1 $\pm$ 1.9
5		7	4	0.1	190.0	5.0	1.0	9.2 $\pm$ 1.7
6		7	4	3	70.4	5.0	2.0	13.9 $\pm$ 1.7
7		4	2.25	1.55	130.2	4.0	1.5	26.8 $\pm$ 2.2
8		1	4	3	190.0	3.0	2.0	0.0 $\pm$ 0.0
9		1	0.5	3	190.0	5.0	1.0	0.0 $\pm$ 0.0
10		1	0.5	0.1	190.0	5.0	2.0	0.0 $\pm$ 0.0
11		7	0.5	0.1	70.4	5.0	2.0	6.0 $\pm$ 1.0
12		1	4	0.1	70.4	3.0	2.0	0.0 $\pm$ 0.0
13		1	0.5	0.1	70.4	3.0	1.0	0.0 $\pm$ 0.0
14		7	0.5	3.0	190.0	3.0	1.0	99.7 $\pm$ 1.9
15	(i)	7	0.5	3.0	70.4	3.0	1.0	65.0 $\pm$ 2.4
16	(i)	7	0.5	3.0	92.0	3.0	1.0	103.4 $\pm$ 1.5
17	(i)	7	0.5	3.0	92.0	4.0	1.0	44.3 $\pm$ 1.8
18	(i)	7	2.0	3.0	92.0	3.0	1.0	96.1 $\pm$ 1.2
19	(i)	7	3.0	3.0	92.0	3.0	1.0	56.0 $\pm$ 2.5
20	(i)	7	2.0	2.0	92.0	3.0	1.0	74.9 $\pm$ 2.6
21	(i)	8	2.0	3.0	92.0	3.0	1.0	106.1 $\pm$ 2.4
22	(i)	9	2.0	3.0	92.0	3.0	1.0	46.2 $\pm$ 1.2
23	(i)	3	2.0	3.0	92.0	3.0	1.0	98.6 $\pm$ 2.2
24	(ii)	2	2.0	3.0	92.0	3.0	1.0	72.0 $\pm$ 1.1

(i) Experimental factors investigated in the preconcentration step: *A* acidity of sample solutions (pH), *B* flow rate of sample ( $\text{mL min}^{-1}$ ), *C* concentration of eluent (M), *D* volume of eluent ( $\mu\text{L}$ ), *E* flow rate of eluent ( $\text{mL min}^{-1}$ ), and *F* minicolumn diameter (mm)  
(ii) Upper and lower values of the range for each variable

**Table 2** Estimated effects and optimum conditions for each variable

Variable	Estimated effect		Optimum value according to the Plackett-Burman design		Optimum value according to fine-tuning	
Preconcentration–elution process						
A	30.12		7		3–8	
B	–9.28		0.5 mL min <sup>–1</sup>		2.0 mL min <sup>–1</sup>	
C	11.92		3 M		3 M	
D	16.12		190.0 µL		92.0 µL	
E	–20.42		3.0 mL min <sup>–1</sup>		3.0 mL min <sup>–1</sup>	
F	6.55		2.0 mm		1.0 mm	
Continuous ultrasonic acid extraction of cadmium						
	(i)	(ii)	(i)	(ii)	(i)	(ii)
G	30.78	47.25	3 M	3 M	2 M	3 M
H	1.95	0.52	3 M	3 M	0 M	0 M
I	50.72	25.92	5 min	5 min	2.5 min	1 min
J	–6.15	–6.89	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
K	2.88	7.32	70°C	70°C	20°C	20°C
L	–9.72	–9.72	3.5 mL min <sup>–1</sup>	3.5 mL min <sup>–1</sup>	3.5 mL min <sup>–1</sup>	3.5 mL min <sup>–1</sup>

Experimental factors in the preconcentration step: *A* acidity of sample solutions (pH), *B* flow rate of sample (mL min<sup>–1</sup>), *C* concentration of eluent (M), *D* volume of eluent (µL), *E* flow rate of eluent (mL min<sup>–1</sup>), and *F* minicolumn diameter (mm). Experimental factors in the continuous ultrasonic acid extraction of

cadmium: *G* nitric acid concentration (M), *H* hydrochloric acid concentration (M), *I* sonication time (min), *J* leaching volume (mL), *K* leaching temperature (°C), and *L* flow rate of the CUES (mL min<sup>–1</sup>). (i) Legumes; (ii) dried fruits

torial design was applied to 60 mg of broad bean and peanut samples as representative samples for legumes and dried fruits, respectively. Cadmium concentrations of  $0.202 \pm 0.005$  and  $0.239 \pm 0.004$  µg g<sup>–1</sup> were obtained, respectively, for these samples by using an offline acid digestion procedure and online FAAS detection with a FI system similar to that depicted in Fig. 1. The variables that affect the CUES system and their low and high values are listed in Table 3. These values were established based on previous studies and data in the literature. From these results, it can be concluded that Cd extraction from legume and dried fruit samples is affected by two statistically significant factors (positive

sign): nitric acid concentration and sonication time. Table 2 lists the estimated effects and the optimum values for each variable according to the Plackett-Burman design. To simplify the analysis, 0 mol L<sup>–1</sup> HCl, room temperature, 2 mL of leaching solution volume and a flow rate of 3.5 mL min<sup>–1</sup> were selected, since these parameters were not statistically influential factors. In order to increase the sampling frequency, a possible reduction of the sonication time was studied. Thus, for dried fruit, 1 min was enough to obtain a quantitative recovery. On the other hand, a time of 2.5 min was necessary to achieve a quantitative extraction of cadmium from legume samples. Finally, the use of more

**Table 3** Design matrix and response values in the Plackett-Burman design (2<sup>6</sup>×3/16) (runs: 1–13), and experiments performed outside the framework to fine-tune the variables involved in the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium (runs: 14–20)

(i) Experimental factors in the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium: *G* nitric acid concentration (M), *H* hydrochloric acid concentration (M), *I* sonication time (min), *J* leaching volume (mL), *K* leaching temperature (°C), and *L* flow rate of the CUES (mL min<sup>–1</sup>); (ii) Upper and lower values of the range for each variable

Run ( <i>n</i> = 2)	(i)	G	H	I	J	K	L	%Cd recovery	
	(ii)	0–3	0–3	0.5–5	2–5	20–70	3.5–6	Legumes	Dried fruits
1		3	0	5	2	20	3.5	101.2 ± 2.7	101.1 ± 3.4
2		3	3	0.5	5	20	3.5	41.0 ± 1.3	61.4 ± 2.1
3		0	3	5	2	70	3.5	58.1 ± 2.5	39.1 ± 1.8
4		3	0	5	5	20	6	96.2 ± 3.1	98.9 ± 2.6
5		3	3	0.5	5	70	3.5	35.3 ± 2.2	58.7 ± 2.6
6		3	3	5	2	70	6	99.7 ± 0.9	96.3 ± 1.9
7		1.5	1.5	2.75	3.5	45	4.75	81.0 ± 1.2	84.6 ± 3.1
8		0	3	5	5	20	6	60.2 ± 1.3	46.2 ± 2.8
9		0	0	5	5	70	3.5	46.7 ± 2.4	33.4 ± 2.1
10		0	0	0.5	5	70	6	12.1 ± 0.7	18.1 ± 1.7
11		3	0	0.5	2	70	6	28.9 ± 1.1	62.6 ± 3.1
12		0	3	0.5	2	20	6	21.5 ± 3.1	37.2 ± 0.9
13		0	0	0.5	2	20	3.5	19.0 ± 1.8	21.6 ± 1.1
14		3	0	2.5	2	20	3.5	101.9 ± 1.2	99.3 ± 0.9
15		3	0	2	2	20	3.5	89.9 ± 1.9	98.9 ± 0.9
16		3	0	1	2	20	3.5	–	96.9 ± 1.4
17		3	0	0.5	2	20	3.5	–	75.2 ± 2.2
18		2	0	2.5	2	20	3.5	105.1 ± 1.1	–
19		1.5	0	2.5	2	20	3.5	81.8 ± 1.9	–
20		2	0	1	2	20	3.5	–	84.6 ± 2.3

**Table 4** Determination of cadmium in legumes and dried fruit samples, and paired *t*-test results

Sample	[Cd] <sub>i</sub> (μg g <sup>-1</sup> )	[Cd] <sub>ii</sub> (μg g <sup>-1</sup> )
Broad bean	0.202 ± 0.005	0.209 ± 0.002
Lentil	0.242 ± 0.011	0.244 ± 0.013
Chickpea 1	0.158 ± 0.004	0.160 ± 0.001
Chickpea 2	0.156 ± 0.006	0.160 ± 0.005
Nut	0.199 ± 0.006	0.199 ± 0.006
Pistachio	0.172 ± 0.006	0.169 ± 0.006
Chestnut	0.230 ± 0.003	0.241 ± 0.006
Hazelnut	0.231 ± 0.003	0.229 ± 0.009
Peanut	0.239 ± 0.004	0.236 ± 0.004
Almond	0.226 ± 0.003	0.225 ± 0.009

(i) Off-line acid digestion, preconcentration with a chelating resin (Chelite P) and FAAS Cd determination (*n* = 3)

(ii) Cd concentration obtained by the present method (*n* = 3). Experimental value of *t* = 1.18; critical value of *t* (*n* - 1 = 9, *P* = 0.05) = 2.26

dilute nitric acid was studied. For legume samples, 2 M nitric acid was enough to achieve a quantitative recovery, whereas 3 M nitric acid was necessary for dried fruit samples. The results from these experiments are shown in Table 3. The optimum conditions for continuous ultrasonic acid extraction are listed in Table 2.

Other variables that can affect the acid extraction process were studied separately, namely sample particle size and sample amount. Particle sizes of between 30 and 100 μm were tested, and the results obtained demonstrated that this variable does not affect the extraction process in the range studied. For legume samples, 60 mg is the maximum sample amount that can be used, because greater amounts produce high pressure in the flow system. In the case of dried fruit, up to 80 mg of sample can be used.

### Analytical figures of merit

A seven-point calibration graph was constructed for the optimal chemical and flow conditions for the whole process. The equation was  $\text{absorbance} = 7.8 \times 10^{-4} + 3.12X$  (*r* = 0.999), where *X* is the cadmium concentration, expressed in μg mL<sup>-1</sup>. The precision of the global process was verified using a broad bean sample containing 0.202 ± 0.005 μg g<sup>-1</sup> Cd (*n* = 11) (as a representative sample for legumes) and a peanut sample containing 0.239 ± 0.004 μg g<sup>-1</sup> Cd (*n* = 11) (as a representative sample for dried fruits). The results obtained, expressed as the relative standard deviation, were 2.0 and 2.5%, for legumes and dried fruits, respectively.

The detection limits (LOD) based on three times the standard deviation of the blank (*n* = 30) were found to be 0.014 and 0.011 μg g<sup>-1</sup>, for legume and dried fruit samples, respectively. To evaluate the cadmium determination for possible sample interferences, a standard addition method was performed. In this way, two samples (broad bean and peanut) were spiked with several cadmium standard solutions added as leaching solution

(0–0.015 μg mL<sup>-1</sup>). Under these conditions, standard calibration graphs were plotted for the optimal chemical and flow conditions for the global process (*n* = 6), and the equations were  $\text{absorbance} = 9.75 \times 10^{-3} + 3.25[\text{Cd}]$  (*r* = 0.999, for legumes) and  $\text{absorbance} = 0.015 + 3.28[\text{Cd}]$  (*r* = 0.998, for dried fruits), where [Cd] is the cadmium concentration, expressed in μg mL<sup>-1</sup>. The slopes of these equations and the slope of the calibration graph were compared using a *t*-test, and the results demonstrated that they were statistically comparable at 99.5%. Thus, cadmium determination is free of matrix interference effects.

The method was validated using broad bean and peanut samples, with the cadmium contents determined using offline acid digestion and FI-FAAS detection. The cadmium contents obtained by the proposed method were in good agreement with those obtained using an acid digestion procedure. The results are shown in Table 4. The sample throughput, taking into account the time required for sample milling and weighing, the continuous acid extraction, preconcentration and Cd detection, was about 10 and 14 samples per hour for legume and dried fruit samples, respectively.

### Analysis of legume and dried fruit samples

The method was used to determine cadmium levels in various legume and dried fruit samples. The concentrations of cadmium in these samples ranged between 0.160 and 0.244 μg g<sup>-1</sup> (dry mass). Results obtained with the proposed method were compared with those achieved using a conventional offline sample digestion with concentrated nitric acid, FI preconcentration using the chelating resin Chelite P, and determination by FAAS. To compare the results obtained by both methods, the paired *t*-test was applied [14], and the agreement between the two methods is satisfactory (Table 4).

### Conclusions

The system consisting of CUES combined with a FI preconcentration provides a rapid, precise and accurate sample pre-treatment procedure and an effective approach to improving the sensitivity of FAAS determinations of cadmium in solid samples. The main advantages achieved with the proposed method were reduction of sample contamination and analyte losses due to the reduced sample manipulation required, the reduced sample and reagents consumption, and the reduced sample preparation time (which also significantly increases the sample throughput).

**Acknowledgments** The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA). Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project No. CAL01-043). S.C. acknowledges a grant from the Xunta de Galicia (Spain).

---

**References**

1. Robards K, Worsfold P (1991) *Analyst* 116:549–568
2. Amoedo L, Capelo JL, Lavilla I, Bendicho C (1999) *J Anal Atom Spectrom* 14:1221–1226
3. Ashley K, Andrews RN, Cavazos L, Demange M (2001) *J Anal Atom Spectrom* 16:1147–1153
4. Lima EC, Barbosa F, Krug FJ, Silva M, Vale MGR (2000) *J Anal Atom Spectrom* 15:995–1000
5. El Azouzi H, Cervera ML, de la Guardia M (1998) *J Anal Atom Spectrom* 13:533–538
6. Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera A (2000) *J Anal Atom Spectrom* 15:121–130
7. Brasil JL, Lima EC, Veses RC, Tissot MM (2004) *Atom Spectrosc* 25:94–101
8. Moreno-Cid A, Yebra MC (2002) *Spectrochim Acta B* 57:967–974
9. Yebra MC, Moreno-Cid A (2003) *Anal Chim Acta* 477:149–155
10. Moreno-Cid A, Yebra MC, Cancela S, Cespón RM (2003) *Anal Bioanal Chem* 377:730–734
11. Moreno-Cid A, Yebra MC (2004) *Anal Bioanal Chem* 379:77–82
12. Tewari PK, Singh AK (2001) *Talanta* 53:823–833
13. Pourreza N, Zavvar MH (2004) *Anal Chim Acta* 503:279–282
14. Miller JC, Miller JN (1984) *Statistics for analytical chemistry*. Ellis Horwood, Chichester, UK





## RESIDUES AND TRACE ELEMENTS

# Flow-Injection Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination of Trace Amounts of Cadmium in Solid and Semisolid Milk Products Coupling a Continuous Ultrasound-Assisted Extraction System with the Online Preconcentration on a Chelating Aminomethylphosphoric Acid Resin

SHEILA CANCELA and M. CARMEN YEBRA<sup>1</sup>

University of Santiago de Compostela, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Nutrition, and Bromatology, 15782-Santiago de Compostela, Spain

**A new sensitive and low-cost method that combines continuous acid extraction, online preconcentration, and flame atomic absorption spectrometry for cadmium determination at  $\mu\text{g}$  levels in solid and semisolid milk products is described. A continuous ultrasound-assisted extraction system is used to carry out the dynamic acid extraction step. The acid extract is preconcentrated online on a minicolumn packed with a chelating resin (Chelite P, with aminomethylphosphoric acid groups), and the retained cadmium is eluted with hydrochloric acid and continuously monitored by flame atomic absorption spectrometry. An experimental design (Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$ ) is used to optimize the continuous extraction and the preconcentration step. The method allowed a total sampling frequency of 28 samples/h. A good precision of the whole procedure (3.0% relative standard deviation) for a cheese sample containing  $0.103 \pm 0.004 \mu\text{g/g}$  Cd (dry mass), a high enrichment factor (20.5), and detection and quantification limits of 0.014 and 0.067  $\mu\text{g/g}$ , respectively, for a 60 mg of sample were obtained with this methodology. The method was successfully applied to the determination of trace amounts of cadmium in solid and semisolid milk products, such as cheese and yogurt samples.**

fairly low, and very sensitive techniques are required. Electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) or inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP/MS) usually have sufficient sensitivity to allow cadmium determination in these samples. Flame atomic absorption spectrometry (FAAS), with its relatively low cost, common availability of the instrumentation, simplicity of procedures, speed, precision, and accuracy, is probably the most widely used technique to determine a variety of metals in foods. However, the low Cd concentration in cheese is not compatible with the determination limit of this technique, so a preconcentration step is needed prior to the FAAS measurement.

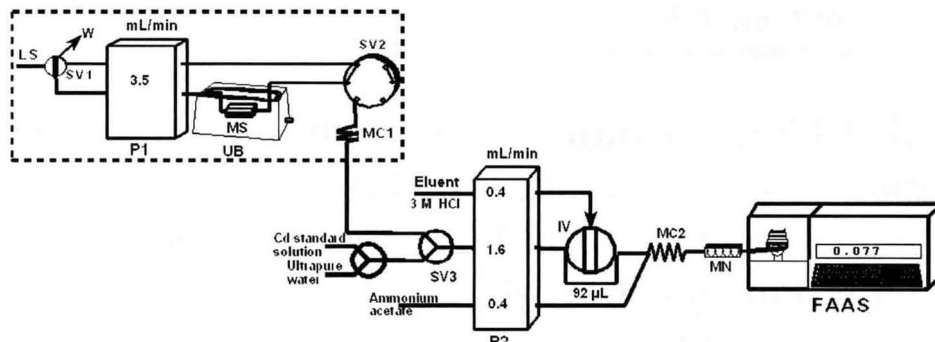
Offline procedures for Cd preconcentration included sorbent extraction on silica gel modified with 2-mercapto-5-phenylamino-1,3,4-thiadiazole (MPATD; 2), Na-DDTC or hexamethylenedithiocarbamate (HMDTC; 3), BBT (4), and *N*-propylsalicylaldehyde (IE 11; 5); sorbent extraction on activated carbon after chelation with 8-hydroxyquinoline (6); and solid supports such as Amberlite XAD-1180 (7), Chelex 100 (8, 9), Amberlite XAD-7 (10), Chelamine (9), Amberlite XAD-2 (11), Amberlite XAD-4 (12), and Amberlite XAD-16 modified with 1,2-diphenylethanolamine (13). Other procedures used for Cd preconcentration were ion chromatography (14), precipitate flotation (15), and cloud point solvent extraction (16, 17).

Online preconcentration systems using flow-injection analysis (FIA) have several advantages in comparison to their offline counterparts, such as higher analytical throughput, low sample and reagents consumption, and less risks of analyte losses or sample contamination. A number of resins have been used for online Cd preconcentration, such as AG50W-X8 (18), poly(aminophosphonic acid) chelating resin (PAPhA; 19), Toyopearl AF-CHELATE 650M (20, 21), and Amberlite IRA-904 (22). Sorbent extraction was carried out using C18 and Amberlite XAD-4 supports after formation of neutral chelates. The complexing agents that have been mostly used for chelate formation were DDTC (23–25) and 1,10-phenanthroline (phen; 26). APDC has been used as

Cadmium (Cd) is a prevalent toxic metal that tends to be concentrated in environmental systems and humans. Absorption from the air in the local environment and intake from the diet are the major sources of human exposure. Milk and milk products form an important part of the human diet; their components are basically nutritious, but some, such as cadmium, may have toxic effects (1). The concentration level of cadmium in some food matrixes, such as cheese, is

Received May 31, 2005. Accepted by AK August 1, 2005.

<sup>1</sup> Author to whom correspondence should be addressed; e-mail: qncayebi@usc.es



**Figure 1.** Flow injection manifold for cadmium determination in solid and semisolid milk products samples. P1 and P2, peristaltic pumps; LS, leaching solution; W, waste; UB, ultrasonic bath; MS, micolumn containing the sample; IV, injection valve; SV1, SV2, and SV3, switching valves; MC1 and MC2, mixing coils; MN, micolumn containing the chelating resin (Chelite P); and FAAS, flame atomic absorption spectrometry instrument.

chelating agent for Cd collection on PDI-18 (27). A chelate between Cd and diethyldithiophosphate (DDTP) has been adsorbed on polyurethane foam (PUF; 28), and ZrO<sub>2</sub> (29) and silica gel modified with 2-aminothiazol (SiAT) have been used for Cd retention from water samples (30). Cd has been retained in the form of Cd(5-Br-PADAP) (pyridylazodiethylaminophenol) complex in a knotted reactor of polytetrafluoroethylene (PTFE; 31, 32), and ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (APDC) has been used for chelation of Cd with posterior adsorption on a mixture of C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> (33).

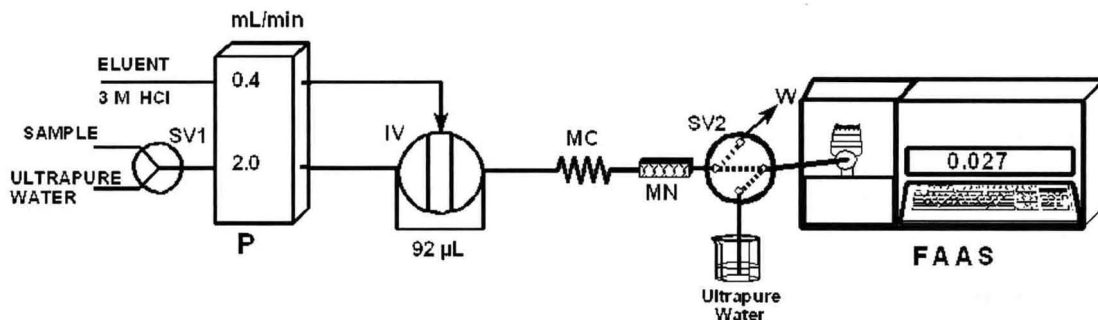
The preparation of a solid sample is often the most time-consuming step of the analytical process and involves potential problems, such as contamination or loss of analytes. Ultrasound-assisted extraction procedures are an attractive sample pretreatment for solid samples. This methodology presents some important advantages, such as its wide application field, the use of diluted acids, and the quantitative extraction of the analyte from the solid sample. Nevertheless, offline ultrasound-assisted procedures are laborious and time-consuming (30–60 min) and also require a centrifugation step (34–37). Our investigation team developed for the first time a continuous ultrasound-assisted extraction system (CUES) coupled to a flame injection (FI) manifold for the determination of Cu, Mn, Fe, and Ca in solid samples by FAAS (38–41).

In this paper, we describe a simple CUES coupled to an FI manifold for the acid leaching of cadmium, online preconcentration of this trace metal from the acid extract by using a chelating resin (Chelite P, with aminomethylphosphoric acid groups), and continuous cadmium determination by FAAS. Thus, the whole continuous manifold combines the 3 processes (acid extraction, preconcentration, and detection). The method was applied to the determination of cadmium in solid and semisolid milk products.

**Experimental**

*Instrumentation*

A Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer, Shelton, CT) fitted with a cadmium hollow cathode lamp was set at 228.8 nm. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. As can be seen in Figure 1, the FI system comprised 2 Minipuls 3 peristaltic pumps (Gilson, Villiers Le Bel, France) fitted with Viton tubes; an ultrasonic bath with an ultrasound power of 40 KHz (Selecta, Barcelona, Spain); 6 Rheodyne (Rheodyne, Rohnert Park, CA) injection or switching valves, Models 5041 and 5301; extraction loops of



**Figure 2.** Flow injection manifold for cadmium preconcentration on a micolumn containing Chelite P resin. P, peristaltic pump; SV1 and SV2, switching valves; IV, injection valve; MC, mixing coil; MN, micolumn; W, waste; FAAS, flame atomic absorption spectrometry.

2.5, 4.5, and 8.0 m length (made with 0.8 mm id PTFE tubing; Omnifit, Cambridge, UK); and a glass minicolumn (100 mm × 3 mm id, bed volume 700 µL; Omnifit). The ends of the minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541; Clifton, NJ). Preconcentration minicolumns were prepared by filling Viton tubes (10 cm length and 1 mm id) with 50 mg chelating resin.

**Reagents**

Ultrapure water of 18.2 MΩcm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA) was used for the preparation of the reagents and standards. Hydrochloric acid (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain), nitric acid (Scharlau Chemie), ammonium acetate (Merck, Darmstadt, Germany) and 1000 µg/mL cadmium standard solution (Merck) were reagent grade. Chelate P (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) with aminomethylphosphoric acid groups, particle size 0.3–0.8 mm, was used as the chelating resin.

**Sample Preparation and Procedure**

Samples were purchased from several local markets. All samples were commercially available and of Spanish origin.

Samples were dried at 50°C, triturated and pulverized in a porcelain mortar, and, after sieving, fractions with a particle size between 30–100 µm were taken. The continuous cadmium determination system is shown in Figure 1. Cheese samples (50–60 mg) were directly weighed into the glass minicolumn. Then, the minicolumn was connected to the CUES circuit. First, the CUES circuit (2 mL) was loaded with the acid leaching solution (3 M nitric acid). Once the CUES circuit was closed, the leaching solution circulated through the minicolumn under ultrasonic energy action at a flow rate of 3.5 mL/min for 0.5 min. The direction of the flow was changed each 10 s in order to avoid sample accumulation at the end of the minicolumn. Then, the switching valve (SV2) was switched to its opposite position, and the acid extract was homogenized in the mixing coil. After this, the acid extract channel converged with a buffer solution stream (0.5 mL of 16 M ammonium acetate) in order to obtain a pH value >3. The mixture was homogenized in a second

mixing coil and then passed through the preconcentration minicolumn, at a flow rate of 2 mL/min. The cadmium was retained quantitatively (ca 100%) as its chelate and then was eluted by injection of 92 µL of 3 M hydrochloric acid into a water carrier stream that swept it to the detector, where it was continuously monitored. The preconcentration minicolumns could be used repeatedly (ca 50 operational cycles) with no apparent deterioration in their analytical performance. Standard solutions up to 0.036 µg/mL Cd in the same acid medium as the leaching solution were introduced into the flow system.

**Results and Discussion**

*Optimization of the Cadmium Preconcentration/Elution Step*

As the number of variables that affect the overall system is large, i.e., sample pH, sample flow rate, eluent concentration (HCl), eluent flow rate, eluent volume, and minicolumn diameter, if a 2-level full factorial design (2<sup>6</sup>) is applied, it is necessary to carry out 64 experiments. In addition, at least 2 replicates are needed for the statistical evaluation of the coefficients for the fitted model and the degree of coincidence of the hyperplane obtained with the true response surface. Therefore, for optimization purposes, Plackett-Burman designs were used principally when the number of variables influencing the analytical system is very large because such designs allow the division of full factorial designs, obtaining numbers of factor combinations that are multiples of 4. Thus, the number of experimental runs can be reduced intentionally confounding some of the experimental effects, providing the knowledge about system tendencies (42). In this paper, a Plackett-Burman (2<sup>6</sup>\*3/16) type III resolution design with 1 center point has been selected, allowing 6 degrees of freedom and involving 13 nonrandomized runs. In order to test statistical significance of the effects, an analysis of variance (ANOVA) is employed by using the software package Statgraphics V.5.1. This factorial design was applied to 1 mL of a standard solution containing 0.04 µg/mL cadmium, which was inserted into a flow system similar to that depicted in Figure 2. The variable response was % Cd recovery. Table 1 summarizes the lower

**Table 1. Optimization of the cadmium preconcentration/elution step: factor levels in the Plackett-Burman design, estimated effects, and optimum conditions for each variable**

Variable	Low	High	Estimated effects	Optimum <sup>a</sup>	Optimum <sup>b</sup>
Sample pH	1	7	30.12	7	3–8
Sample flow rate, mL/min	0.5	4.0	–9.28	0.5	2.0
[HCl], M	0.1	3.0	11.92	3.0	3.0
Eluent flow rate, mL/min	3	5	–20.42	3	3
Eluent volume, µL	70.4	190.0	16.12	190.0	92.0
Minicolumn diameter, mm	1.0	2.0	6.55	2	1.0

<sup>a</sup> Optimum value of each variable according to the Plackett-Burman design.

<sup>b</sup> Optimum value of each variable according to fine-tuning.

**Table 2. Optimization of the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium: factor levels in the Plackett-Burman design, estimated effects, and optimum conditions for each variable**

Variable	Low	High	Estimated effects	Optimum <sup>a</sup>	Optimum <sup>b</sup>
HNO <sub>3</sub> concentration, M	0	3	35.92	3	3
HCl concentration, M	0	3	2.55	3	0
Sonication time, min	0.5	5.0	1.58	5	0.5
Leaching volume, mL	2	5	-1.92	2	2
Flow rate of the CUES, mL/min	3.5	6.0	-8.08	3.5	3.5
Leaching temperature, °C	20	70	0.52	70	20

<sup>a</sup> Optimum value of each variable according to the Plackett-Burman design.

<sup>b</sup> Optimum value of each variable according to fine-tuning.

and upper levels for each studied variable. The results of these analytical data concluded that the cadmium preconcentration-elution process was affected positively by 1 statistically significant factor: sample pH. All the other factors were not statistically significant. Table 1 lists the estimated effects and the optimum value for each variable according to the Plackett-Burman design. Because the Plackett-Burman design only provides the tendencies to the optimum values of the variables, these factors were fine-tuned outside the framework of the design. The aims of this study were to decrease the eluent volume and its concentration, increase the sample flow rate, and establish the pH range for quantitative cadmium retention on the chelating resin. The values for eluent flow rate and minicolumn diameter were fixed at 3 mL/min and 1 mm, respectively.

#### Eluent Volume

The possibility of decreasing the eluent volume was studied to obtain a better concentration factor. It was proven that 92 µL was the minimum value for this variable to provide a quantitative cadmium recovery.

#### Sample Flow Rate

The possible increase of the sample flow rate was tested in order to achieve the greatest sampling frequency. The maximum value for this variable that provided quantitative cadmium recovery was 2 mL/min.

#### Eluent Concentration

A possible reduction of the eluent concentration was studied, but it was not possible because quantitative recoveries were not achieved with concentrations less than 3 M HCl. Therefore, this solution was chosen for elution purposes.

#### pH Range

A small number of experiments were carried out with the aim to establish the pH range for quantitative cadmium retention. Eluent volume and concentration and sample flow rates were fixed at 92 µL, 3 M, and 2 mL/min, respectively. The results of these experiments showed that cadmium was

quantitatively retained in the pH range 3–8. This is an important factor because the acid extract has a very low pH value (3 M HNO<sub>3</sub> medium). In order to achieve the optimum pH for cadmium retention, an ammonium acetate buffer solution was proposed. To carry out this pH increase online, concentration, volume, and flow rate of the ammonium acetate buffer solution channel was studied. A 16 M concentration, a volume of 0.5 mL, and a flow rate of 0.4 mL/min were selected as a compromise for the ammonium acetate channel. The optimum conditions for cadmium preconcentration/elution are listed in Table 1.

#### Optimization of the Continuous Ultrasonic Acid Extraction of Cadmium

The same experimental design used for the previous optimization study (Plackett-Burman 2<sup>6</sup>\*3/16) was used to optimize the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium from solid and semisolid milk products. The factorial design was applied to 50–60 mg of a cheese sample with a cadmium content of 0.103 ± 0.004 µg/g (dry mass). This cadmium concentration was determined in triplicate by

**Table 3. Determination of cadmium in solid and semisolid milk products and paired t-test<sup>a</sup>**

Sample	Cd <sup>b</sup> , µg/g (dry mass)	Cd <sup>c</sup> , µg/g (dry mass)
Sheep cheese	0.098 ± 0.005	0.096 ± 0.002
Fresh cheese	0.084 ± 0.005	0.083 ± 0.005
Cream cheese	0.096 ± 0.002	0.096 ± 0.002
Slice cheese	0.087 ± 0.002	0.082 ± 0.003
Mozzarella	0.087 ± 0.001	0.087 ± 0.005
Grated cheese	0.103 ± 0.004	0.104 ± 0.003
Yogurt	0.085 ± 0.005	0.088 ± 0.004
Curd	0.082 ± 0.002	0.086 ± 0.003

<sup>a</sup> Experimental value of  $t = 0$ ; critical value of  $t(n - 1 = 7, P = 0.05) = 2.36$ .

<sup>b</sup> Offline acid digestion, preconcentration using a chelating resin (Chelate P), and FAAS Cd determination.

<sup>c</sup> Cd concentration obtained by the present method.

**Table 4. Features of automatic-preconcentration methods for the determination of cadmium by spectrometric techniques**

Detection <sup>a</sup>	Preconcentration method	Eluting solvent	Preconcentration factor	Sample frequency (samples/h)	RSD, %	LOD, µg/L	Application	Ref.
FAAS	Ion exchange (AG50W-X8)	3 M HCl	—	80	2	0.7	Biological standard material	18
ICP-MS	Sorbent extraction <sup>b</sup> (silica-C <sub>18</sub> )	Methanol	20–30	—	—	0.03	Natural and sea waters	24
FAAS	Ion exchange (PAPhA) <sup>c</sup>	0.5 M HCl	16–47	40	1.4–6.6	0.56	Mussel samples and SRM <sup>d</sup>	19
FAAS	Sorbent extraction <sup>e</sup> (C <sub>18</sub> )	2% Ethanol	32	90	1.4	0.5	Seawater, mussel, and geological SRM	26
FAAS	Sorbent extraction <sup>f</sup> (silica-C <sub>18</sub> )	Methanol	19	40	3	0.7	Human hair, bovine blood, and SRM	25
ICP-MS	Ion exchange <sup>g</sup>	1 M HCl	—	10	5	0.06 × 10 <sup>-3</sup>	Seawater SRM	20
ICP-AES	Sorbent extraction (ZrO <sub>2</sub> )	3 M HNO <sub>3</sub>	100	2	2.8–6.5	0.003	Natural and seawater SRM	29
ICP-OES	Sorbent extraction (knotted reactor) <sup>h</sup>	3 M HNO <sub>3</sub>	18	40	2.9	0.00	Wine	31
FAAS	Sorbent extraction (PDI-18) <sup>i</sup>	MIBK	110	—	2.1	0.08	Tape, river, and ozonized water, SRM	27
ICP-AES, SP <sup>j</sup>	Ion exchange (Lewatit TP)	0.03 M HCl	50	—	<10	2.5	River and ground water	45
FAAS	Sorbent extraction (Amberlite IRA-904) <sup>k</sup>	2 M HNO <sub>3</sub>	32	20	2.1	1.4	Mineral and lake water, SRM	22
FAAS	Sorbent extraction (knotted reactor) <sup>l</sup>	Ethanol	40	2	3.5	0.5 × 10 <sup>-3</sup>	Honey samples	32
ICP-MS	Ion exchange <sup>g</sup>	1.5 M HNO <sub>3</sub>	—	6	4.2	1.4 × 10 <sup>-3</sup>	Bay water	21
GFAAS	Sorbent extraction <sup>m</sup> (AC)	2 M HNO <sub>3</sub>	32	18	2.8	0.4 × 10 <sup>-3</sup>	Mineral and tap water	46
TS-FF-AAS	Sorbent extraction <sup>n</sup> (Polyurethane foam)	80% Ethanol	5.2	16	4.9–3.5	0.12	SRM	28
FAAS	Sorbent extraction (silica gel) <sup>o</sup>	2 M HCl	51	15	3	0.38	River water	30
TS-FF-AAS	Sorbent extraction <sup>p</sup> (C <sub>60</sub> -C <sub>70</sub> )	80% Ethanol	11	24	4	0.1	Mineral and tap water	33
FAAS	Sorbent extraction <sup>q</sup> (Amberlite XAD-4)	4 M HCl	20	—	2.8–8.8	—	Dogfish liver, oyster tissue, pig kidney, and lobster hepatopancreas	23

<sup>a</sup> FAAS, flame atomic absorption spectrometry; ICP-MS, inductively coupled plasma-mass spectrometry; ICP-AES, inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry; ICP-OES, inductively coupled plasma-optical emission spectrometry; SP, spectrophotometry; GFAAS, graphite furnace atomic absorption spectrometry; TS-FF-AAS, thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry.

<sup>b</sup> Chelation by DDTc.

<sup>c</sup> Poly(aminophosphonic acid) resin.

<sup>d</sup> SRM = Standard reference material.

<sup>e</sup> Chelation by 1,10-phenanthroline.

<sup>f</sup> Chelation by DDC.

<sup>g</sup> Toyopearl AF-CHELATE 650M.

<sup>h</sup> Chelation by 5-Br-PADAP.

<sup>i</sup> Chelation by APDC.

<sup>j</sup> Sulfarsazene as chromogenic reagent.

<sup>k</sup> Chelation by TCPP.

<sup>l</sup> After formation of Cd(OH)<sub>2</sub>.

<sup>m</sup> Chelation by DDTP.

<sup>n</sup> Modified by 2-aminothiazole.

<sup>o</sup> After chelation by APDC.

using a conventional digestion procedure with concentrated nitric acid, preconcentration on Chelite P resin, and FAAS cadmium measurement. To optimize the CUES, cadmium was measured online with a flow system similar to that depicted in Figure 1. Six experimental variables were optimized. Table 2 shows the lower and upper levels for each studied variable. From the results of these analytical data, it can be concluded that cadmium extraction from these samples appeared to be affected by 2 statistically influential factors: nitric acid concentration and flow rate of the CUES. Table 2 summarizes the estimated effect for each variable and the optimum value according to the Plackett-Burman design. HCl concentration, sonication time, leaching volume, and leaching temperature were not significant at the 95% confidence level. So 0 M, 0.5 min, 2 mL, and 20°C, respectively, were selected as the optimum values of these variables. A possible reduction of nitric acid concentration was studied, but 2 M HNO<sub>3</sub> was not sufficient to obtain quantitative cadmium extraction from these samples. The optimum conditions for the continuous ultrasonic acid extraction of cadmium are listed in Table 2.

The amount of sample was studied by a univariate method. Because a sample amount of 60 mg was used to optimize the CUES and we obtained good results, we supposed that smaller quantities would also be suitable. However, it is important to determine the maximum sample amount that the CUES is able to leach quantitatively in order to increase the sensitivity of the method. For this purpose, the method was applied to 80 mg of sample. It was observed that a sample amount of 80 mg produced great pressure within continuous extraction system, causing losses of sample and a nonquantitative cadmium extraction. Therefore, the maximum amount of sample that can be used is about 60 mg.

#### Analytical Performance

The calibration graph was run ( $n = 7$ ) under the optimal chemical and flow conditions for the global process; the equation for absorbance was:

$$\text{Absorbance} = 7.8 \times 10^{-4} + 3.12 [\text{Cd}] \quad (r = 0.999)$$

where [Cd] is Cd concentration, expressed as  $\mu\text{g/mL}$ . The linear range for 60 mg of sample was 0.067–3.234  $\mu\text{g/g}$ .

To evaluate the cadmium determination for possible sample matrix interferences, a standard addition method was performed. A sample with a cadmium content of  $0.103 \pm 0.004 \mu\text{g/g}$  (dry mass) was spiked with several cadmium standard solutions added to the leaching solution (0–0.015  $\mu\text{g/mL}$ ). Under these conditions, an additional calibration graph was derived ( $n = 7$ ) under the optimal chemical and flow conditions for the global process; here the absorbance equation was:

$$\text{Absorbance} = 9.2 \times 10^{-3} + 3.16 [\text{Cd}] \quad (r = 0.999)$$

where [Cd] is Cd concentration, expressed as  $\mu\text{g/mL}$ .

The difference between the slope of this equation and the slope of the calibration graph was not statistically significant, demonstrating that the cadmium determination is free from

matrix interferences when the method is applied to solid and semisolid milk products samples (43).

The precision of the preconcentration step was verified using cadmium standard solutions ( $n = 11$ ). The precision of the whole process was verified using a cheese sample containing  $0.103 \pm 0.004 \mu\text{g/g}$  Cd ( $n = 11$ ). The results obtained, expressed as relative standard deviation (RSD), were 1.9 and 3.0%, respectively.

The limit of detection (LOD) based on 3 times the standard deviation of the blank ( $n = 30$ ) was found to be 0.014  $\mu\text{g/g}$  for 60 mg of sample. The limit of quantification (LOQ) based on 10 times the standard deviation of the blank ( $n = 30$ ) was found to be 0.067  $\mu\text{g/g}$  for 60 mg of sample. The sample throughput, taking into account the global analytical process (0.5 min sonication, 1.25 min preconcentration of the acid extract, and 20 s measurement step) was approximately 28 samples/h.

The concentration factor of the method based on the ratio between the direct calibration graph and FIA calibration graph slopes were found to be 20.5.

#### Analysis of Samples

The method was applied to the determination of cadmium in different solid and semisolid milk products. The results obtained by the proposed method were compared with those achieved by a conventional offline sample digestion procedure using concentrated nitric acid, a preconcentration step using the chelating resin Chelite P, and determination by FAAS. To compare the results obtained by these both methodologies, the paired *t*-test was applied (44). As shown in Table 3, the 2 methods do not give significantly different values, thus the agreement between them is satisfactory at 95% confidence level.

#### Conclusions

A fully continuous approach for ultrasound assisted extraction, preconcentration, and FAAS determination of cadmium in solid and semisolid milk products by using a flow-injection manifold as the interface for coupling these 3 steps has been developed. This manifold allows automation of the whole analytical process. The online preconcentration system described is an effective approach for improving the sensitivity of the FAAS determination of cadmium in the studied samples. The features of other automatic methods for the preconcentration and determination of cadmium between 1995 and 2005 are summarized in Table 4.

This procedure combines the benefits of ultrasound-assisted extraction with the high sensitivity provided by the preconcentration step and the inherent advantages of FI systems. The system proposed presents the advantage of simplicity and avoids the use of expensive and sophisticated analytical instruments. High sample throughput, good accuracy and precision, low detection limits, ease of use and automation, freedom from interferences, and safety conditions (concentrated acids and carcinogenic nitrous vapors were avoided) are important advantages that make this

methodology very suitable for cadmium determination in solid and semisolid milk products, such as cheese and yogurt.

### Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio Ciencia y Tecnología (Project No. CAL01-043). S. Cancela acknowledges a grant from the Xunta de Galicia.

### References

- (1) Merian, E. (1991) *Metals and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance*, VCH, Weinheim, Germany
- (2) Roman, L., Florean, E., Sandulescu, R., & Mirel, S. (1996) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**, 1003–1006
- (3) Karadjova, I. (1999) *Mikrochim. Acta* **130**, 185–190
- (4) Beklemishev, M.K., Stoyan, T.A., & Dolmanova, I.F. (2000) *Fresenius J. Anal. Chem.* **367**, 17–23
- (5) Abou-El-Sherbini, K.S., Kenawy, I.M.M., Hamed, M.A., Issa, R.M., & Elmorsi, R. (2002) *Talanta* **58**, 289–300
- (6) Shiowatana, J., Benyatiab, K., & Siripinyanond, A. (2002) *At. Spectrosc.* **21**, 179–185
- (7) Tokahoglu, S., Kartal, S., & Elçi, L. (1997) *Mikrochim. Acta* **127**, 281–286
- (8) Sun, Y.C., Tu, Y.L., & Mierzwa, J. (1998) *Fresenius J. Anal. Chem.* **360**, 550–555
- (9) Gueguen, C., Dominik, J., & Perret, D. (2001) *Fresenius J. Anal. Chem.* **370**, 909–912
- (10) Tewari, P.K., & Singh, A.K. (2000) *Fresenius J. Anal. Chem.* **367**, 562–567
- (11) Kumar, M., Rathore, D.P.S., & Singh, A.K. (2001) *Fresenius J. Anal. Chem.* **370**, 377–382
- (12) Uzun, A., Soylak, M., & Elçi, L. (2001) *Talanta* **54**, 197–202
- (13) Maheswari, M.A., & Subramanian, M.S. (2003) *J. AOAC Int.* **86**, 1218–1224
- (14) Hibner, F., Mattusch, J., & Werner, G. (1996) *Fresenius J. Anal. Chem.* **354**, 718–721
- (15) Pavlovska, G., Stafilov, T., & Cundeva, K. (2001) *Fresenius J. Anal. Chem.* **369**, 670–673
- (16) Manzoori, J.L., & Bavili-Tabrizi, A. (2002) *Anal. Chim. Acta* **470**, 215–221
- (17) Manzoori, J.L., & Karin-Nezhad, G. (2004) *Anal. Chim. Acta* **521**, 173–177
- (18) Saraiva Miranda, C.E., Freire dos Reis, B., & Krug, F.J. (1995) *J. Braz. Chem. Soc.* **6**, 387–392
- (19) Enriquez-Dominguez, M.F., Yebra-Biurrun, M.C., & Bermejo-Barrera, M.P. (1998) *Analyst* **123**, 105–108
- (20) Warnken, K.W., Tang, D., Gill, G.A., & Santschi, P.H. (2000) *Anal. Chim. Acta* **423**, 265–276
- (21) Beck, N.G., Franks, R.P., & Bruland, R.W. (2002) *Anal. Chim. Acta* **455**, 11–22
- (22) Kilian, K., & Pyrzynska, K. (2002) *Anal. Sci.* **18**, 571–574
- (23) Dos Santos, E.J., Herrmann, A.B., Ribeiro, A.S., & Curtius, A.J. (2005) *Talanta* **65**, 593–597
- (24) Bortoli, A., Gerotto, M., Marchiori, M., Mariconti, F., Palonta, M., & Troncon, A. (1996) *Mikrochem. J.* **54**, 402–411
- (25) Bruhn, C.G., Vilches, C., & Cid, H.J. (1999) *Bol. Soc. Chil. Quim.* **44**, 321–335
- (26) Ali, A., Yin, X., Shen, H., Ye, Y., & Gu, X. (1999) *Anal. Chim. Acta* **392**, 283–289
- (27) Petit de Peña, Y., Lopez, W., Burguera, M., Burguera, J.L., Lopez-Carrasquero, F., & Carrillo, M. (2001) *Anal. Chim. Acta* **438**, 259–266
- (28) Teixeira Tarley, C.R., & Zezzi Arruda, M.A. (2004) *Anal. Sci.* **20**, 961–966
- (29) Vassileva, E., & Furuta, N. (2001) *Fresenius J. Anal. Chem.* **370**, 52–59
- (30) Alcantara, I.L., Roldan, P.S., Castro, G.R., Moraes, F.V., Silva, F.A., Padilha, C.C.F., Oliveira, J.D., & Padilha, P.M. (2004) *Anal. Sci.* **20**, 1029–1032
- (31) Lara, R.F., Wuilloud, R.G., Salonia, J.A., Olsina, R.A., & Martinez, L.D. (2001) *Fresenius J. Anal. Chem.* **371**, 989–993
- (32) Fernandez Orsi, R., Wuilloud, R.G., De Wuilloud, J.C.A., Olsina, R.A., & Martinez, L.D. (2002) *J. AOAC Int.* **85**, 1410–1414
- (33) Pereira, M.G., Pereira-Filho, E.R., Berndt, H., & Arruda, M.A.Z. (2004) *Spectrochim. Acta Part B* **59**, 515–521
- (34) Amoedo, L., Capelo, J.L., Lavilla, I., & Bendicho, C. (1999) *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1221–1226
- (35) Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, A., Muñoz-Naveiro, O., Gomez-Fernandez, A.M.J., & Bermejo-Barrera, A. (2000) *Spectrochim. Acta Part B* **55**, 1351–1371
- (36) Bermejo-Barrera, P., Muñoz-Naveiro, O., Moreda-Piñeiro, A., & Bermejo-Barrera, A. (2001) *Anal. Chim. Acta* **439**, 211–227
- (37) Ashley, K., Andrews, R.N., Cavazos, L., & Demange, M. (2001) *J. Anal. At. Spectrom.* **16**, 1147–1153
- (38) Moreno-Cid, A., & Yebra, M.C. (2002) *Spectrochim. Acta Part B* **57**, 967–974
- (39) Yebra, M.C., & Moreno-Cid, A. (2003) *Anal. Chim. Acta* **477**, 149–155
- (40) Moreno-Cid, A., Yebra, M.C., Cancela, S., & Cespón, R.M. (2003) *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 730–734
- (41) Moreno-Cid, A., & Yebra, M.C. (2004) *Anal. Bioanal. Chem.* **379**, 77–82
- (42) Deming, S.N., & Morgan, S.L. (1993) *Experimental Design: A Chemometric Approach*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, Chapter 14
- (43) Boqué, R., & Rius, F.X. (1994) *Univariate Linear Calibration (ULC)*, Department of Chemistry, University of Tarragona, Spain
- (44) Miller, J.C., & Miller, J.N. (1984) *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester, UK
- (45) Castillo, E., Cortina, J.L., Beltran, J.L., Prat, M.D., & Granados, M. (2001) *Analyst* **126**, 1149–1153
- (46) Xingguang, S., Meijia, W., Yihua, Z., Jiahua, Z., Hanqi, Z., & Qinhan, J. (2003) *Talanta* **59**, 989–997



# AUTOMATIC DETERMINATION OF NICKEL IN FOODS BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

S. Cancela and M.C. Yebra\*

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology. Faculty of Chemistry

University of Santiago de Compostela. 15782-Santiago de Compostela, Spain

## Abstract

A new sensitive and low cost flow injection method that combines acid extraction, preconcentration and flame atomic absorption spectrometric determination of nickel in food samples at  $\mu\text{g/g}$  levels is described. The dynamic acid extraction step was carried out by using a continuous ultrasound-assisted extraction system. The acid extract was preconcentrated on-line on a minicolumn packed with a chelating resin (Serdolit Che, with iminodiacetic groups) and nickel was eluted with diluted hydrochloric acid, being continuously monitored by flame atomic absorption spectrometry. An experimental design (Plackett-Burman  $2^{6*3/16}$ ) is used to optimise the methodology proposed. The method allowed a total sampling frequency of 13-28 samples per hour. Good precision of the whole procedure (1.9-3.6 % expressed as relative standard deviation) and a detection limit of 0.12  $\mu\text{g/g}$ , for 60 mg of sample were achieved. The method was successfully applied to the determination of trace amounts of nickel in food samples.

*Keywords:* Ultrasound-assisted acid extraction; Minicolumn preconcentration; Flow injection analysis; Nickel; Food analysis.

---

\* Corresponding author. E-mail:qncayebi@usc.es; fax: 34981595012

## 1. Introduction

Nickel occurs naturally in vegetables and animal flesh. The functions of nickel are not completely understood and it has not been established as an essential element in man. In very trace amounts it may be beneficial as an activator of some enzyme systems, but its toxicity at higher levels is more prominent. It accumulates in the lungs and may cause bronchial haemorrhage or collapse. Other symptoms include nausea, weakness, dizziness, etc. The principal route of nickel exposure is dietary intake. Apart from environmental contamination, the metal may also be derived in foods from processing activities such as drying, cooking and canning in nickel-containing vessels. Therefore, the determination of minerals and trace elements in foodstuffs is an important part of nutritional and toxicological analyses (Seiler & Sigel, 1994).

Foods pretreatment usually involves acid digestion, but this sample treatment requires high energy and the use of concentrate mineral acids. Nevertheless, the introduction of microwave energy has allowed the reduction of the digestion time. Thus, acid digestion under microwave energy has been applied prior to nickel determination in food samples (Yan-Zhou, Keong-Wong & Lin-Koh, 1996; Larsen, Andersen, Moller, Petersen, Mortensen & Petersen, 2002; Cabrera, Fuensanta, Gimenez, Olalla & Lopez, 2003). However, the main limitation of these procedures is the large cooling times required before opening the low or high-pressure bombs. Other drawback that offers the microwave sample pretreatment is the generation of nitrous vapours as consequence of the organic matrix destruction.

Methods such as ultrasonic extraction are emerging as an alternative for solid samples pretreatment because ultrasonic energy helps to speed up the leaching procedure because the induced cavitation process in the liquid promotes an increase of the local pressure and temperature, favouring the ability to extract the analyte into the acidic solution. In this sense, ultrasounds have been applied to assist acid leaching procedures from different solid samples (Balarama & Arunachalam, 2004; Ladra-Ramos, Dominguez-Gonzalez, Moreda-Piñeiro, Bermejo-Barrera & Bermejo-Barrera, 2005). Several techniques have been used to determine nickel in food samples,

such as inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) (LaBrecque et al., 2004;), inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) (Lee, Muraoka, Oshima & Motomizu, 2004), differential pulse cathodic stripping voltammetry (DPCSV) (Karadjova, Girousi, Iliadou & Stratis, 2000), differential pulse adsorptive voltammetry (DPAV) (Panelli & Voulgaropoulos, 1991), potentiometry (Pinilla-Gil & Ostapczuk, 1993) and graphite furnace (GFAAS) or flame atomic absorption spectrometry (FAAS) (Onianwa, Lawal, Ogunkeye & Orejimi, 2000; Jorhem, Sundstrom & Engman, 2001; Cabrera et al., 2003). FAAS is a widely used analytical technique because of its low cost, but its sensitivity is usually insufficient for the low concentrations of nickel in food samples. Thus, several solid phase preconcentration methods involving chelating resins were proposed to improve the sensitivity of nickel determinations: by using an iminodiacetate resin (Warnken, Tang, Gill & Santschi, 2000), a chelating resin obtained by chemical modification of Amberlite XAD-16 with 1, 2-diphenyl-ethanolamine (Maheswari & Subramanian, 2003), Amberlite XAD-7 impregnated with xylenol orange (Tewari & Singh, 2000) or by using the chelating resin Toyopearl AF-Chelate 650M (Beck, Franks & Bruland, 2002).

In this paper we describe a flow injection (FI) method combining continuous ultrasound-assisted extraction, preconcentration using a commercial chelating resin (Serdolit Che, with iminodiacetic groups) and nickel determination by FAAS. Thus, the whole manifold combines the three processes (acid extraction, preconcentration and detection), allowing the direct treatment of a solid sample within the flow system. The method was applied to food samples for the determination of nickel.

## **2. Experimental**

### *2.1 Instrumentation*

A Perkin Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer, Shelton, CT-USA) fitted with a nickel hollow cathode lamp was used. The instrument was set at 232.0 nm. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range

of 5 mV. As can be seen in Fig. 1, the FI system comprises two Gilson Minipuls 3 peristaltic pumps (Gilson, Villiers Le Bel, France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath with an ultrasound power of 40 KHz (Selecta, Barcelona, Spain), six Rheodyne injection or switching valves (Rohnert Park, USA), Models 5041 and 5301, extraction loops of 2.5, 4.5 and 8.0 m (made with 0.8 mm i.d. PTFE tubing, Omnifit, Cambridge, UK), a glass minicolumn (100 mm x 3 mm i.d., bed volume 700  $\mu$ L, Omnifit, Cambridge, UK). The ends of minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541). Minicolumns for the preconcentration step were prepared by filling Viton tubes (10 cm length and 1 mm i.d.) with 50 mg of chelating resin.

## *2.2 Reagents*

Ultrapure water of 18.2 M $\Omega$ cm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA USA) was used for the preparation of the reagents and standards. Hydrochloric acid, nitric acid (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain), ammonium acetate (Merck, Germany) and 1000  $\mu$ g/mL nickel standard solution (Merck, Darmstad, Germany) were reagent grade. Serdolit Che (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) with iminodiacetic acid groups was used as chelating resin.

## *2.3 Sample preparation and procedure*

Mussel samples were grinded, homogenized and freeze-dried (-40 °C). The rest of samples were cut in small pieces, dried at 50 °C, triturated and pulverized in a porcelain mortar. After sieving, fractions with a particle size less than 30  $\mu$ m were taken.

Samples of 50-60 mg were directly weighed into the glass minicolumn. Then, the minicolumn was connected to the continuous device (Fig. 1). First, the extraction unit circuit (2 mL) was loaded with the acid leaching solution (3 M nitric acid for legume samples and 1.5 M nitric acid for the other samples). Once this circuit was closed by means of SV1, the leaching solution circulates through the minicolumn subjected to ultrasound energy during 3 min (meat and cereal samples), 2.5 min (seafood samples), 1.5 min (legume and dried fruit samples) and 0.5 min (cheese samples). The flow rate of the leaching solution was 3.5 mL/min. Then, the switching valve (SV2) was switched

to its opposite position and the acid extract was homogenized in the mixing coil. After this, the acid extract channel converged with a buffer solution stream (16 M ammonium acetate for legume samples and 8 M ammonium acetate for the other samples) in order to obtain a pH value > 4.5. The mixture was homogenized in a second mixing coil and then, was passed through the preconcentration minicolumn, at a flow rate of 2 mL/min, where Ni(II) was retained quantitatively by formation a metal chelate. Then, it was eluted by injection of 133.2  $\mu$ L of 3 M hydrochloric acid into a water carried stream, which swept it to the detector where was continuously monitored. As is shown in Fig. 1, standard solutions containing up to 0.040  $\mu$ g/mL of nickel in the same acid medium as the leaching solution were introduced into the FI system.

### **3. Results and discussion**

#### *3.1 Optimisation of the nickel preconcentration step*

Since optimisation of the analytical procedure involves the study of a large number of variables, an experimental design was used. Plackett-Burman designs were used principally when the number of variables influencing the analytical system was very large, because the number of experimental runs can be reduced due to the designs would provide knowledge about the system tendencies. In this paper, a Plackett-Burman  $2^{6*3}/16$  factorial type III resolution design with one center point was selected, allowing 6 degrees of freedom and involving 13 non-randomised runs. This factorial design was applied to a standard solution containing 0.04  $\mu$ g/mL of nickel. In such case, 2 mL of this solution was passed through the preconcentration minicolumn. In order to test statistical significance of the effects, an ANOVA is employed by using Statgraphics Plus V.5.1. To optimise the preconcentration step, nickel was measured on-line by FAAS with a FI system similar to that depicted in Fig. 2. The variable response was % Ni recovery. The following factors, which could affect the preconcentration process, were considered as variables: sample pH, sample flow rate, eluent concentration (hydrochloric acid), eluent flow rate, eluent volume and minicolumn diameter. The lower and upper levels for each studied variable are listed in Table 1. These values

were chosen from experiences developed in previous experiments. From the results of these analytical data it can be concluded that nickel preconcentration-elution process appeared to be affected positively by one statistically significant factor: eluent concentration. This factor overtakes the limit of statistical significance (at 95 % confidence). All the other factors were not significant. As the Plackett-Burman design only provides the tendencies to the optimum values of the variables, these factors were fine-tuned outside the framework of the design. The aims of this study were decrease the eluent volume and concentration, increase the sample flow rate and establish the pH range for quantitative Ni(II) retention. Eluent flow rate and minicolumn diameter were fixed in 3 mL/min and 1 mm, respectively. The optimum conditions for nickel preconcentration-elution were listed in Table 1. An ammonium acetate buffer solution was proposed in order to achieve the optimum pH (4.5-5.5) for nickel retention. In order to carry out on-line this pH increase, a study of concentration, volume and flow rate of the ammonium acetate buffer solution was developed. So, a 8 or 16 M concentration (according to the acid concentration required in the extraction step), 0.5 mL and 0.4 mL/min, were selected as a compromise for the ammonium acetate channel.

### *3.2 Optimisation of the continuous ultrasonic acid extraction of nickel*

It was used the same experimental design that for the preconcentration step (Plackett-Burman  $2^{6*3/16}$ ). This factorial design was applied to 60 mg of the following samples: mussel tissue (0.80 µg/g), rabbit liver (0.91 µg/g), lentils (0.86 µg/g), chestnut (0.90 µg/g), breakfast cereal (0.78 µg/g) and slice cheese (0.61 µg/g). To optimise the continuous acid extraction, nickel was measured on-line by FAAS with the FI system depicted in Fig.1. The studied variables and their lower and upper levels were: nitric acid concentration (0-3 M), hydrochloric acid concentration (0-3 M), sonication time (0.5-5 min), leaching volume (2-5 mL), flow rate of the extraction system (3.5-5.0 mL/min) and leaching temperature (20-70 °C). From the results of these analytical data obtained, was proven that sonication time and nitric acid concentration were the significant variables for meat, legume and cereal samples. For seafood and dried fruit samples, the significant variable was sonication time, while for cheese samples, the significant variable was nitric acid concentration.

These significant variables were affected by a positive sign. To simplify the analysis, 0 M hydrochloric acid, room temperature, 2 mL of leaching solution and a flow rate of 3.5 mL/min were selected since these parameters were not statistically influential factors. In order to increase the sampling frequency, a possible reduction of the sonication time was studied. Thus, 3 min was enough to obtain a quantitative extraction of nickel in meat and cereal samples. Seafood samples required a sonication time of 2.5 min, while 1.5 min was an adequate sonication time for dried fruit and legume samples. The less sonication time was obtained for cheese samples that only need 0.5 min for quantitative nickel extraction. Finally, the use of less concentrated nitric acid was studied. Only legume samples require 3 M HNO<sub>3</sub>. In the other food samples, 1.5 M was enough to obtain a quantitative nickel extraction.

Other variables that can affect the acid extraction process were studied separately, namely particle size and amount of sample. Particle sizes between 30-100 µm were tested, and the results obtained indicated that this variable does not affect to the extraction process within the range studied. As a sample amount of 60 mg was used to optimise the continuous extraction system and we obtained good results, we suppose that smaller quantities would also be suitable. However, is important to determine the maximum sample amount that the continuous extraction manifold is able to leach quantitatively in order to increase the sensitivity of the method. For this purpose, we studied sample amounts until 80 mg, but it was observed that sample amounts greater than 60 mg produced great pressure in the continuous extraction system causing sample losses. Therefore, the maximum amount of sample that can be used in this continuous system is 60 mg.

### *3.3 Features of the method*

The calibration graph was run (n=7) under the optimal chemical and flow conditions for the global process; the equation for absorbance was:  $\text{absorbance} = 6 \times 10^{-6} + 0.49 [\text{Ni}]$  ( $r = 0.999$ ), where [Ni] is Ni concentration, expressed as µg/mL.

To evaluate the nickel determination for possible sample matrix interferences, a standard addition method was performed. In this way, samples with nickel contents of 0.80 µg/g (seafood),

0.91 µg/g (meat), 0.86 µg/g (legume), 0.90 µg/g (dried fruit), 0.78 µg/g (cereal) and 0.61 µg/g (cheese) were spiked with several nickel standard solutions (0-0.015 µg/mL) added to the leaching solution. In these conditions, additional calibration graphs were obtained (n=7) under the optimal chemical and flow conditions for the global process. Thus, the slopes of these addition calibration graphs were statistically comparable (95 %) to the achieved by the calibration graph, demonstrating that nickel determination is free of matrix interferences in the samples studied.

The precision of the whole process was verified using food samples containing 0.80 µg/g (mussel tissue), 0.91 µg/g (rabbit liver), 0.86 µg/g (lentils), 0.90 µg/g (chestnut), 0.78 µg/g (breakfast cereal) and 0.61 µg/g (filled cheese) (n=11). The results obtained expressed as relative standard deviation were 3.6 % (seafood), 2.9 % (meat), 1.9 % (legume), 3.0 % (dried fruit), 2.4 % (cereal) and 2.1 % (cheese).

Detection limits (LOD) based on three times the standard deviation of the blank (n=30), was found to be 0.12 µg/g, for 60 mg of sample.

Sample throughputs, taking into account the global analytical process were ca. 14 samples/h (seafood), 13 samples/h (meat and cereal), 19 samples/h (legume and dried fruit) and 28 samples/h (cheese).

Validation of the method was performed by using certified reference materials (BCR186 Pig Kidney and BCR189 Wholemeal Flour, Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium, with indicative concentrations of 0.42 and 0.38 µg/g Ni). The nickel contents obtained (mean ± S.D., n=3) were  $0.44 \pm 0.01$  and  $0.38 \pm 0.01$  µg/g for BCR186 and BCR189, respectively, which agrees with the indicative values.

### *3.4 Analysis of samples*

The proposed methodology was applied to determine nickel in several food samples. The results obtained were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion method with concentrated nitric acid, the preconcentration step previously optimised by using the chelating resin Serdolit Che and determination by FAAS. The results, expressed as µg/g and their

standard deviation ( $n=3$ ) obtained by these two methods are shown in Table 2. To compare the results, the Paired  $t$ -test ( $P=0.05$ ) (Miller & Miller, 1984) was applied and it was concluded that both methods do not give significantly different values for the nickel concentration and thus, the agreement between the two methods is satisfactory.

#### **4. Conclusions**

An automatic approach based on the coupling between a continuous ultrasound-assisted extraction system with an on-line preconcentration unit prior to a flame atomic absorption spectrometer is proposed for nickel determination in food samples. The continuous extraction device inserted into a FI manifold has been demonstrated to be a rapid, precise and accurate sample pre-treatment procedure for the acid extraction of nickel from food samples. The inclusion of a minicolumn containing a chelating resin before the detector is an effective strategy to improve the sensitivity of the FAAS for nickel determination, and constitutes an important contribution to the development of new FI-FAAS methods for routine determination of trace nickel in foods. The system proposed presents the advantage of simplicity and avoids the use of expensive and sophisticated analytical instruments. High sample throughput, good accuracy and precision, low detection limit, easy of use, freedom from interferences, safety conditions (concentrated acids and carcinogenic nitrous vapours were avoided) and automation makes this methodology very suitable for nickel determination in solid food samples.

#### **Acknowledgements**

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). S.C. acknowledges a grant from the Xunta de Galicia.

## References

- Balarama, M.V., & Arunachalam, J. (2004). Ultrasound-assisted extraction procedure for the fast estimation of major, minor and trace elements in lichen and mussel samples by ICP-MS and ICP-AES. *Analytica Chimica Acta*, 522, 179-187.
- Beck, N.G., Franks, R.P., & Bruland, K.W. (2002). Analysis for Cd, Cu, Ni, Zn and Mn in estuarine water by inductively coupled plasma mass spectrometry coupled with an automated flow injection system. *Analytica Chimica Acta*, 455, 11-22.
- Cabrera, C., Fuensanta, L., Gimenez, R., Olalla, M., & Lopez, M.C. (2003). Mineral content in legumes and nuts: contribution to the Spanish dietary intake. *The Science of the Total Environment*, 308, 1-14.
- Jorhem, L., Sundstrom, B., & Engman, J. (2001). Cadmium and other metals in Swedish wheat and rye flours: longitudinal study, 1983-1997. *Journal of AOAC International*, 84(6), 1984-1992.
- Karadjova, I., Girousi, S., Iliadou, E., & Stratis, I. (2000). Determination of Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni and Pb in milk, cheese and chocolate. *Mikrochimica Acta*, 134, 185-191.
- LaBrecque, J.J., Benzo, Z., Alfonso, J.A., Codoves, P.R., Quintal, M., Gomez, C.V., & Marcano, E. (2004). Determination of selected trace elements in raw clams and commercial clam meats from the state of Miranda (Venezuela) employing ICP-OES, GF-AAS and WD-XRF. *Atomic Spectroscopy*, 25(3), 112-124.
- Ladra-Ramos, N., Domínguez-Gonzalez, R., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, A., & Bermejo-Barrera, P. (2005). Determination of major and trace elements in edible seaweeds by AAS after ultrasound-assisted acid leaching. *Atomic Spectroscopy*, 26(2), 59-67.
- Larsen E.H., Andersen, N.L., Moller, A., Petersen, A., Mortensen, G.K., & Petersen, J. (2002). Monitoring the content and intake of trace elements from food in Denmark. *Food Additives and Contaminants*, 19(1), 33-46.

- Lee, K.H., Muraoka, Y., Oshima, M., & Motomizu, S. (2004). Determination of heavy metals and rare earth elements in environmental samples by ICP-MS after solid phase preconcentration with chelating resin fibers and anion exchanger filters. *Analytical Sciences*, 20, 183-187.
- Maheswari, M.A., & Subramanian, M.S. (2003). A new chelating resin for preconcentration and determination of Mn(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II) and Pb(II) by flame atomic absorption spectrometry. *Journal of AOAC International*, 86(6), 1218-1224.
- Miller, J.C., & Miller, J.N. (1984). *Statistics for Analytical Chemistry*. Chichester: Ellis Horwood.
- Onianwa, P.C., Lawal, J.A., Ogunkeye, A.A., & Orejimi, B.M. (2000). Cadmium and nickel composition of Nigerian foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 961-969.
- Paneli, M.G., & Voulgaropoulos, A. (1991). Determination of Ni and Co using 2-quinolinethiol by adsorptive voltammetry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 341, 71-719.
- Pinilla-Gil, E., & Ostapczuk, P. (1993). Determination of nickel and cobalt by constant current potentiometry. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 346, 957-960.
- Seiler, H.G., Sigel, A., & Sigel, H. (1994). *Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry*. New York: Marcel Dekker.
- Tewari, P.K., & Singh, A.K. (2000). Amberlite XAD-7 impregnated with Xylenol Orange: a chelating collector for preconcentration of Cd(II), Co(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II) and Fe(III) ions prior to their determination by flame AAS. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 367, 562-567.
- Warnken, K.W., Tang, D., Gill, G.A., & Santschi, P.H. (2000). Performance optimisation of a commercially available iminodiacetate resin for the determination of Mn, Ni, Cu, Cd and Pb by on-line preconcentration inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 423, 265-76.
- Yan-Zhou, C., & Keong-Wong, M., Lin-Koh, L. (1996). Microwave-assisted dilute acid extraction of trace metals from biological samples for atomic absorption spectrometric determination. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 11, 585-590.

Table 1

Factor levels, estimated effects and optimum conditions for each variable

<b>Variable</b>	<b>Low</b>	<b>Upper</b>	<b>Estimated effect</b>	<b>Optimum</b>
pH	1	7	13.0833	4.5-5.5
Sample flow rate (mL/min)	0.5	4.0	-10.3167	2.0
Eluent concentration (M)	0.1	3.0	21.65	3.0
Eluent volume ( $\mu$ L)	70.4	190.0	8.31667	133.2
Eluent flow rate (mL/min)	3.0	5.0	-12.6833	3.0
Minicolumn diameter (mm)	1.0	2.0	4.61667	1.0

Table 2

Determination of nickel in food samples

Sample	Nickel concentration ( $\mu\text{g/g}$ )		Sample	Nickel concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	
Seafoods	Conventional method <sup>a</sup>	Present method	Cheeses	Conventional method <sup>a</sup>	Present method
Mussel 1	0.80 $\pm$ 0.00	0.77 $\pm$ 0.01	Sheep cheese	0.46 $\pm$ 0.01	0.45 $\pm$ 0.01
Mussel 2	0.97 $\pm$ 0.03	1.04 $\pm$ 0.03	Fresh cheese	0.57 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.00
Mussel 3	0.74 $\pm$ 0.02	0.75 $\pm$ 0.01	Cream cheese	0.57 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.01
Mussel 4	0.84 $\pm$ 0.01	0.83 $\pm$ 0.00	Slice cheese	0.61 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.00
Clam 1	0.43 $\pm$ 0.01	0.41 $\pm$ 0.01	Mozzarella	0.49 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.01
Clam 2	0.46 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.01	Grated cheese	0.42 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.01
Tuna	0.50 $\pm$ 0.01	0.51 $\pm$ 0.00	Yoghurt	0.84 $\pm$ 0.01	0.84 $\pm$ 0.00
Cockle	0.63 $\pm$ 0.02	0.61 $\pm$ 0.00	Curd	0.86 $\pm$ 0.00	0.85 $\pm$ 0.00
Crab	0.57 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.00	Cereals	Conventional method <sup>a</sup>	Present method
Prawn	0.72 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.01	Wheat flour	0.67 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.01
Hake	0.52 $\pm$ 0.02	0.52 $\pm$ 0.01	Corn flour	0.95 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.01
Razor-shell	0.52 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.01	Wholemeal flour	0.67 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.01
Sardine	0.55 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.00	Semolina	0.41 $\pm$ 0.02	0.43 $\pm$ 0.01
Scallops	0.48 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.01	Breadcrumbs	0.66 $\pm$ 0.01	0.667 $\pm$ 0.01
Meats	Conventional method <sup>a</sup>	Present method	Wafer-thin slice	0.51 $\pm$ 0.01	0.52 $\pm$ 0.01
Chicken	0.63 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.01	Biscuits	0.61 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.02
Turkey	0.74 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.00	Breakfast cereals	0.78 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.01
Pork	0.61 $\pm$ 0.01	0.63 $\pm$ 0.01	Spaghetti	0.56 $\pm$ 0.01	0.57 $\pm$ 0.01
Calf	0.92 $\pm$ 0.01	0.91 $\pm$ 0.00	Noodle	0.56 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.01
Mutton	0.72 $\pm$ 0.01	0.71 $\pm$ 0.01	Rice	0.54 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.01
Rabbit liver	0.91 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.00	Dried fruits	Conventional method <sup>a</sup>	Present method
Mutton kidney	1.10 $\pm$ 0.03	1.08 $\pm$ 0.02	Nut	0.55 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.01
Legumes	Conventional method <sup>a</sup>	Present method	Pistachio	0.63 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.01
Chickpea 1	0.59 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.01	Chestnut	0.90 $\pm$ 0.01	0.92 $\pm$ 0.00
Chickpea 2	0.55 $\pm$ 0.01	0.55 $\pm$ 0.00	Almond	0.52 $\pm$ 0.01	0.53 $\pm$ 0.01
Broad bean	0.49 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.00	Hazelnut	0.48 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.01
Lentil	0.86 $\pm$ 0.01	0.88 $\pm$ 0.00	Peanut	0.75 $\pm$ 0.02	0.75 $\pm$ 0.01

<sup>a</sup> Conventional off-line sample digestion method with concentrated nitric acid, preconcentration step previously optimised by using the chelating resin Serdolit Che and determination by FAAS

Fig. 1. Flow injection manifold for the whole procedure (continuous acid extraction and preconcentration devices) for nickel determination in food samples. P1 and P2, peristaltic pumps; LS, leaching solution; W, waste; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn containing the sample; SS, standard solution; B, blank; IV, injection valve; E, eluent (HCl, 3 mol/L); BU(buffer, ammonium acetate); SV1-SV5, switching valves; MC1 and MC2, mixing coils; MN, minicolumn containing the chelating resin (Serdolit Che or Chelite P); UW, ultrapure water and FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

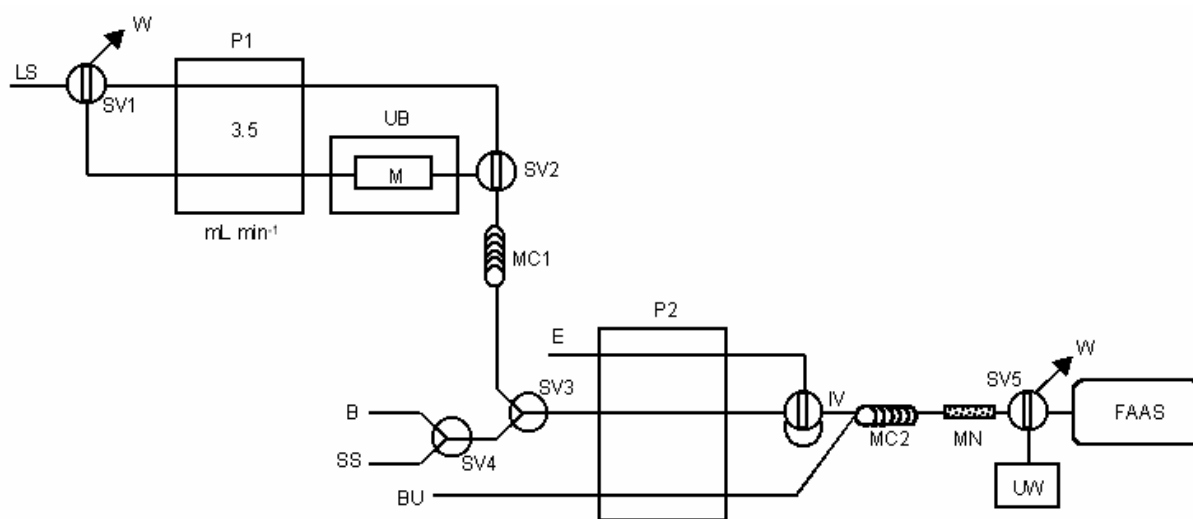
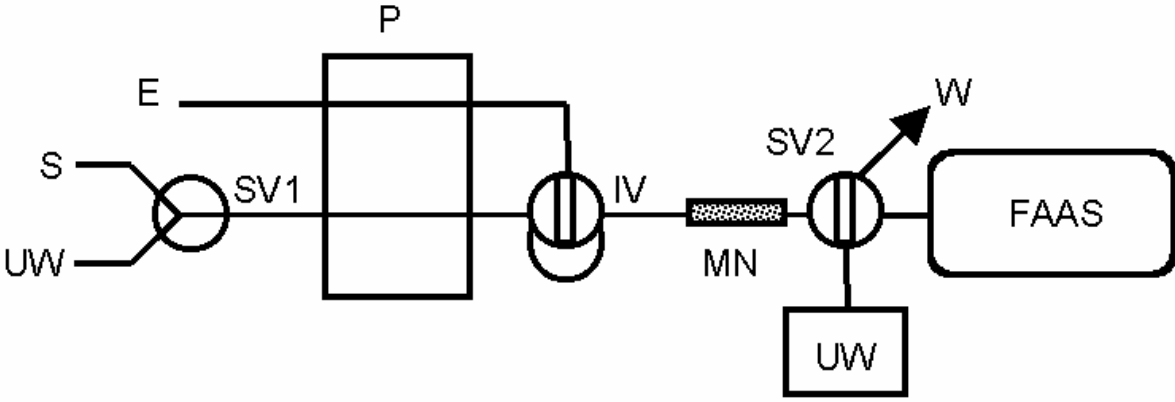


Fig. 2. Flow injection manifold for nickel preconcentration. P, peristaltic pump; SV1 and SV2, switching valves; IV, injection valve; MN, minicolumn containing the chelating resin Serdolit Che; W, waste; UW, ultrapure water; FAAS, flame atomic absorption spectrometer





1  
2  
3  
4  
5  
6  
7 **Flow injection flame atomic absorption spectrometric**  
8  
9  
10 **determination of nickel and cobalt in vegetable samples using**  
11  
12 **an automatic sample pretreatment**  
13

14  
15 S. Cancela and M.C. Yebra\*

16  
17 Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology. Faculty of  
18  
19 Chemistry. University of Santiago de Compostela. 15782-Santiago de  
20  
21  
22 Compostela, Spain  
23  
24  
25  
26

27 **Abstract**

28  
29 A simple flow injection flame atomic absorption spectrometric method to  
30  
31 determine nickel and cobalt in plant samples is presented. This approach  
32  
33 includes a dynamic acid extraction unit assisted by ultrasounds energy and an  
34  
35 on-line solid-phase extraction step for nickel and cobalt preconcentration by  
36  
37 using a minicolumn packed with a chelating resin (Serdolit Che for nickel and  
38  
39 Chelite P for cobalt). Metals elution was carried out with diluted hydrochloric  
40  
41 acid, being continuously monitored by flame atomic absorption spectrometry. A  
42  
43 good precision of the whole procedure (2.4 and 3.2 %) and detection limits of  
44  
45 0.12 and 0.11  $\mu\text{g g}^{-1}$  for nickel and cobalt, respectively, were obtained for 60 mg  
46  
47 of sample. Sample throughputs were ca. 28 and 19 samples  $\text{h}^{-1}$ . The method  
48  
49 was successfully applied to the determination of trace amounts of nickel and  
50  
51 cobalt in fresh vegetable samples.  
52  
53  
54  
55  
56

57 **Keywords:** Ultrasound-assisted acid extraction; Minicolumn preconcentration;  
58  
59 Flow injection analysis; Nickel; Cobalt; Vegetable samples.  
60

---

\* Corresponding author. E-mail: qncayebi@usc.es; fax: 34981595012

## Introduction

Contamination of the environment by heavy metals is of major concern because of their toxicity. Plants can transfer heavy metal pollutants from soils into the food chain by accumulating metals in both the root and the above-ground tissue. This accumulation is one of the most serious environmental concerns of the present day, not only because of the phytotoxicity of many of these metals to the crops themselves but also because of the potential harmful effects that toxic metals could have on animals and human health.

Cobalt is an essential element in humans necessary for the formation of vitamin B12 (hydroxycobalamin). However, excessive administration of this trace element may reduce thyroid activity. Nickel is a moderately toxic element as compared with other transition metals. It is an essential element for several animals, particularly for the regulation of lipid content in tissues and synthesis of phospholipids, but it is known that inhalation of nickel and its compounds can lead to serious problems, including respiratory system cancer. Moreover, nickel can cause a skin disorder known as nickel-eczema. Several studies have demonstrated that disease incidence increased in patients who consume foods rich in nickel, such as oats, nuts, beans and chocolate. So, an appropriate knowledge of the nickel content in vegetable foods could be of a great interest for the dietary control of nickel-eczema patients.

Nickel and cobalt determination by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) can be performed with appreciable sensitivity and accuracy using an air-acetylene flame. Nevertheless, the concentration of these metal ions in several matrices is often below the detection limit attainable with this detector, so a preconcentration step is needed prior to the determination. For this purpose, several methods have been proposed for nickel and cobalt

1  
2  
3 preconcentration. These methods include coprecipitation (Saracoglu et al.  
4 2003), solvent extraction (Shukla and Rao 2002), sorbent extraction (Bagheri et  
5 al. 2000; Yin et al. 2005) and ion exchange (Wang and Hansen 2000; Jiang et  
6 al. 2005). Of all preconcentration methods, chelating resin sorption procedures  
7 (Venkatesh and Singh 2005; Zhu et al. 2005; Bowles et al. 2006) are one of the  
8 most effective multielement preconcentration methods because can provide  
9 more flexible working conditions together with good stability, selectivity, high  
10 concentrating ability, high capacity of metal ions and simple operation.  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21

22 The determination of metals in complex samples by FAAS generally requires  
23 the destruction of the sample matrix to render a solution of the analyte ready for  
24 analysis. Both the wet and dry ashing procedures are slow and time consuming  
25 (Maiga et al. 2005). Nevertheless, microwave-assisted digestion has been used  
26 widely for samples dissolution (Mendil et al. 2005; Xu et al. 2005). Such  
27 digestion techniques require the use of concentrated acids, high temperatures  
28 and often high pressures. Thus, these procedures are time-consuming, since  
29 apart from the time required for digestion, cooling of the reactors needs to be  
30 accomplished before opening.  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43 Acid leaching procedures can be assisted by ultrasound energy in order to  
44 speed up the leaching process because of the induced cavitations process  
45 occurring in the liquid when applying ultrasound energy promotes an increase of  
46 pressure and temperature, which allow a high analyte transport from the solid  
47 particles to the liquid phase (Luque-Garcia and Luque de Castro 2003).  
48 Because this high extracting efficiency, low acids concentrations can be used,  
49 implying a low reagents consumption and low wastes. Our investigation team  
50 proposed for first time a flow injection manifold as interface to couple  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 ultrasound-assisted extraction, preconcentration and FAAS detection, allowing  
4  
5 automation of the whole analytical process (Yebara-Biurrun et al. 2005).  
6  
7

8 In this paper, we applied the coupling between a continuous ultrasound-  
9  
10 assisted extraction unit with a preconcentration step using a minicolumn  
11  
12 containing a chelating resin and FAAS detection for the determination of nickel  
13  
14 and cobalt in vegetable samples.  
15  
16

## 17 18 19 20 **Experimental**

### 21 22 *Instrumentation*

23  
24 A Perkin Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer,  
25  
26 Shelton, CT-USA) fitted with nickel or cobalt hollow cathode lamp was used. The  
27  
28 instrument was set at 232.0 and 240.7 nm, for nickel and cobalt, respectively.  
29  
30 The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer Model 50 Servograph  
31  
32 Recorder with a range of 5 mV. As can be seen in Fig. 1, the FI system  
33  
34 comprises two Gilson Minipuls 3 peristaltic pumps (Gilson, Villiers Le Bel,  
35  
36 France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath with an ultrasound power of 40  
37  
38 KHz (Selecta, Barcelona, Spain), six Rheodyne injection or switching valves  
39  
40 (Rohnert Park, USA), Models 5041 and 5301, extraction loops of 2.5, 4.5 and  
41  
42 8.0 m (made with 0.8 mm i.d. PTFE tubing, Omnifit, Cambridge, UK), a glass  
43  
44 minicolumn (100 mm x 3 mm i.d., bed volume 700  $\mu$ l, Omnifit, Cambridge, UK).  
45  
46 The ends of minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541).  
47  
48 Minicolumns for the preconcentration step were prepared by filling Viton tubes  
49  
50 (10 cm length and 1 mm i.d.) with 50 mg of chelating resin.  
51  
52

### 53 54 55 *Reagents*

56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000

1  
2  
3 the reagents and standards. Hydrochloric acid, nitric acid (Scharlau Chemie,  
4 Barcelona, Spain), ammonium acetate (Merck, Germany) and 1000  $\mu\text{g ml}^{-1}$   
5 nickel and cobalt standard solutions (Merck, Darmstadt, Germany) were reagent  
6 grade. Serdolit Che and Chelite P (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg,  
7 Germany) with iminodiacetic acid groups and aminomethylphosphoric acid  
8 groups were used as chelating resins, for nickel and cobalt preconcentration,  
9 respectively.  
10  
11

#### 12 *Sample preparation and procedure*

13  
14 Vegetable samples were peeled and washed with ultrapure water, cut in small  
15 pieces and dried for 5 days at 50 °C. Then, the samples were triturated and  
16 pulverized in a porcelain mortar, and after sieving, fractions with a particle size  
17 less than 30  $\mu\text{m}$  were taken.  
18  
19

20  
21 Samples of 60 mg were directly weighed into the glass minicolumn. Then,  
22 the minicolumn was connected to the continuous manifold (Fig 1). First, the  
23 extraction circuit (2 ml) was loaded with the acid leaching solution (1.5 and 1.0  
24 M nitric acid, for nickel and cobalt, respectively). Once the extraction circuit was  
25 closed by means of SV1, the leaching solution circulates through the  
26 minicolumn subjected to ultrasound energy for 0.5 or 1.5 min (for nickel and  
27 cobalt, respectively). The flow rate of the leaching solution was 3.5  $\text{ml min}^{-1}$  and  
28 the direction of the flow was changed each 20 s in order to avoid sample  
29 accumulation at the minicolumn end. Then, the switching valve (SV2) was  
30 switched to its opposite position and the acid extract was homogenized in the  
31 mixing coil. After this, the acid extract channel converged with a buffer solution  
32 stream (8 M ammonium acetate) in order to obtain a pH value > 4.5. The  
33 mixture was homogenized in a second mixing coil and then, was passed  
34 through the preconcentration minicolumn at a flow rate of 2  $\text{ml min}^{-1}$ . Then were  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 eluted by injection of 133.2 or 150.8  $\mu\text{l}$  (for nickel and cobalt, respectively) of 3  
4  
5 M hydrochloric acid into a water carried stream, which swept them to the  
6  
7 detector where were continuously monitored.  
8  
9

10 Standard solutions containing up to  $0.040 \mu\text{g ml}^{-1}$  of nickel and cobalt in the  
11  
12 same acid medium as the leaching solution were introduced into the flow  
13  
14 system as show in Fig. 1.  
15  
16

17 [Insert Figure 1 about here]  
18  
19  
20  
21

## 22 **Results and discussion**

### 23 *Optimisation of the nickel and cobalt preconcentration step*

24  
25 The variables studied are those involving the preconcentration step (sample  
26  
27 pH, sample flow rate, eluent concentration (HCl), eluent volume, eluent flow rate  
28  
29 and minicolumn diameter). In order to study the behaviour of these variables, a  
30  
31 factorial Plackett-Burman  $2^6 \cdot 3/16$  type III resolution design allowing five  
32  
33 degrees of freedom plus one centre point was built. The lower and upper values  
34  
35 given to each variable were chosen from the available data and from  
36  
37 experience gathered in previous experiment, and are listed in Table I. This  
38  
39 experimental design involves 13 non-randomised runs and was applied to 2 ml  
40  
41 of a standard solution containing  $0.04 \mu\text{g ml}^{-1}$  of nickel and cobalt. In order to  
42  
43 test the statistical significance of the effects, an ANOVA was employed by using  
44  
45 the statistical package Statgraphics Plus (version 5.1). To optimise the  
46  
47 preconcentration step, nickel and cobalt were measured on-line by FAAS with a  
48  
49 flow system similar to that depicted in Fig. 2. The variable response was % Ni  
50  
51 and % Co recovery, respectively.  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58

59 [Insert Table I about here]  
60

1  
2  
3 From the results of these analytical data it can be concluded that nickel and  
4 cobalt preconcentration-elution process appeared to be affected by one and two  
5 statistically significant factors, respectively. Eluent concentration (positive effect)  
6 for nickel, and sample flow rate (negative effect) and sample pH (positive effect)  
7 for cobalt. All the other factors were not statistically significant in the range  
8 studied. As the Plackett-Burman design only provides the tendencies to the  
9 optimum values of the variables, these factors were fine-tuned outside of the  
10 framework of the design. The aims of this study were decrease the eluent  
11 volume and its concentration, increase the sample flow rate and establish the  
12 pH range for quantitative nickel and cobalt retention. Eluent flow rate and  
13 minicolumn diameter were fixed in  $3 \text{ ml min}^{-1}$  and 1 mm, respectively. The  
14 optimum conditions for nickel and cobalt preconcentration-elution were listed in  
15 Table I. An ammonium acetate buffer solution was proposed in order to achieve  
16 the optimum pH for nickel (4.5-5.5) and cobalt (4.5-6.5) retention. In order to  
17 carry out on-line this pH increase, a study of concentration, volume and flow  
18 rate of the ammonium acetate buffer solution was developed. So, a 8 M  
19 concentration, 0.5 ml and  $0.4 \text{ ml min}^{-1}$ , were selected as a compromise for the  
20 ammonium acetate channel.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45 [Insert Figure 2 about here]  
46  
47  
48  
49

#### 50 *Optimisation of the continuous ultrasonic acid extraction of nickel and cobalt*

51 It was used the same experimental design that was used for the previous  
52 optimisation (Plackett-Burman  $2^6 \times 3/16$ ). This factorial design was applied to 60  
53 mg of a lettuce sample ( $0.97 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ ) for nickel and a silver beet sample  
54 ( $0.80 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ ) for cobalt. These concentrations were determined in  
55 triplicate by using a conventional digestion procedure with concentrated nitric  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 acid, preconcentration on Serdolit Che or Chelite P resins and FAAS  
4 measurement. To optimise the continuous acid extraction, nickel and cobalt  
5 were measured on-line by FAAS with a flow system similar to that depicted in  
6 Fig. 1. Six experimental variables were optimised. In Table I, the lower and  
7 upper levels for each studied variable were listed. From the results of these  
8 analytical data, it can be concluded that nickel and cobalt extraction from plant  
9 samples appeared to be affected by one and two statistically significant factors  
10 (positive sign): nitric acid concentration, for nickel, and sonication time and nitric  
11 acid concentration, for cobalt extraction. To simplify the analysis, 0 M HCl, room  
12 temperature, 2 ml of leaching solution and a flow rate of 3.5 ml min<sup>-1</sup> were  
13 selected, since these parameters were not statistically influential factors. For  
14 nickel, sonication time was not a statistically significant variable, so 0.5 min was  
15 selected as the optimum value for this variable. The use of less concentrated  
16 nitric acid, for nickel and cobalt, and a possible reduction of the sonication time,  
17 for cobalt, were studied. Thus, was proven that 1.5 M nitric acid was required  
18 for a quantitative extraction of nickel from vegetable samples, while 1.0 M nitric  
19 acid was enough for cobalt extraction. The minimum sonication time that  
20 provides a quantitative extraction of cobalt was 1.5 min. The optimum  
21 conditions for continuous ultrasonic acid extraction of nickel and cobalt were  
22 listed in Table I.

23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51 The amount of sample and sample particle size were studied by a univariate  
52 method. Particle sizes between 30-100 µm were tested, and the results  
53 obtained indicated that this variable does not affect to the extraction process  
54 within the range studied. As a sample amount of 60 mg was used to optimise  
55 the continuous extraction system and we obtained good results, we suppose  
56 that smaller quantities would also be suitable. However, is important to  
57  
58  
59  
60

determine the maximum sample amount that the continuous extraction manifold is able to leach quantitatively in order to increase the sensitivity of the method. For this purpose, we studied sample amounts until 80 mg, but it was proven that sample amounts greater than 60 mg produced a great pressure in the continuous extraction system causing sample losses. Therefore, the maximum amount of sample that can be used with this continuous extraction system is 60 mg.

#### *Features of the method*

The calibration graph was run (n=7) under optimum chemical and flow conditions for the whole process. Equations were, absorbance =  $6 \times 10^{-6} + 0.49 X$  (r=0,999) and absorbance =  $7 \times 10^{-7} + 0.40 X$  (r=0.999), where X is nickel and cobalt concentration, respectively, expressed as  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

To evaluate the metal determination for possible sample matrix interferences, a standard addition method was performed. Samples with nickel and cobalt contents of  $0.97 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$  and  $0.80 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively, were spiked with several nickel and cobalt standard solutions added to the leaching solution ( $0-0.02 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Under these conditions, additional calibration graphs were derived (n=7) under optimal chemical and flow conditions for the global process. The absorbance equations were, absorbance =  $7 \times 10^{-3} + 0.51 X$  and absorbance =  $5 \times 10^{-3} + 0.41 X$ , where X is nickel and cobalt concentration, respectively, expressed as  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . The difference between the slopes of these equations and the slopes of the calibration graphs was not statistically significant, demonstrating that nickel and cobalt determination are free from matrix interferences when the methods are applied to vegetable samples.

The precision of the whole process was verified using a lettuce sample ( $0.97 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ ) for nickel and silver beet ( $0.80 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$ ) for cobalt (n=11). The

1  
2  
3 results obtained, expressed as relative standard deviation were 2.4 and 3.2%,  
4 for nickel and cobalt, respectively. Detection limits (LOD) based on three times  
5 the standard deviation of the blank (n=30) were found to be 0.12 and 0.11  $\mu\text{g g}^{-1}$   
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

results obtained, expressed as relative standard deviation were 2.4 and 3.2%, for nickel and cobalt, respectively. Detection limits (LOD) based on three times the standard deviation of the blank (n=30) were found to be 0.12 and 0.11  $\mu\text{g g}^{-1}$ , for nickel and cobalt, respectively. Concentration factors of the method, based on the rate between the direct calibration graph and FIA calibration graph slopes were found to be 15.2 for nickel and 12.2 for cobalt. The resin capacity is 9.23  $\mu\text{mol Ni g}^{-1}$  and 17.66  $\mu\text{mol Co g}^{-1}$ . The sample throughputs taking into account the global process were ca. 28 and 19 samples  $\text{h}^{-1}$ . The accuracy of the method was checked by two different approaches: on the one hand, recovery studies were performed for Co on a silver beet sample ( $0.80 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$  Co) spiked with  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  Co. Thus, a recovery of 96.0% was obtained. On the other hand, for Ni, a certified reference material (NCS DC 73351, tea leaves, China National Analysis Center for Iron and Steel, Beijing, China), with a nickel content of  $4.6 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$  was used. The nickel content obtained for this certified reference material by the proposed method (mean  $\pm$  SD, n=3) was  $4.3 \pm 0.4 \mu\text{g g}^{-1}$ , which agrees with the certified value.

#### *Analysis of samples*

The methodology proposed was applied to determine nickel and cobalt in several vegetable samples. The results obtained were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion method with concentrated nitric acid, preconcentration step previously optimised by using the chelating resin and determination by FAAS. The results expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  and their standard deviation (n=3) obtained by these two methods are shown in Table II. To compare the results obtained by these both methods, the paired *t*-test was applied (Miller and Miller 1994). As shown the Table II, both methods do not

1  
2  
3 give significantly different values, thus the agreement between the two methods  
4 is satisfactory at 95% confidence level.  
5  
6

7  
8 [Insert Table II about here]  
9

## 10 11 12 **Conclusions**

13  
14  
15 A system consisting of a continuous ultrasound-assisted extraction unit  
16 combined with a FI preconcentration step has been proposed. The method  
17 described offers a rapid, easy and efficient sample preparation for the direct  
18 determination of nickel and cobalt in vegetable samples by FAAS, being an  
19 alternative to the traditional sample preparation methods for the determination  
20 of nickel and cobalt in vegetable samples. The procedure is safer than acid  
21 digestion as neither pressure nor high temperature or corrosive concentrated  
22 acids are present during the extraction procedure. Simplicity of the manifold are  
23 also advantages of this procedure if compared to many methods existing to  
24 metal preconcentration. Furthermore, the proposed strategy minimizes sample  
25 manipulation and contamination, as well as the cost of routine analysis  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

## 43 **Acknowledgements**

44  
45 The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto  
46 Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio  
47 Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). S.C. acknowledges a grant from  
48 the Xunta de Galicia.  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## References

- 1  
2  
3  
4  
5  
6 Bagheri H, Saraji M, Naderi M. 2000. Optimization of a new activated carbon  
7 based sorbent for on-line preconcentration and trace determination of nickel  
8 in aquatic samples using mixed-level orthogonal array design. *Analyst* 125:  
9 1649-1654.  
10  
11  
12  
13  
14  
15 Bowles KC, Apte SC, Batley GE, Hales LT, Rogers NJ. 2006. A rapid Chelex  
16 column method for the determination of metal speciation in natural waters.  
17 *Analytica Chimica Acta* 558: 237-245.  
18  
19  
20  
21  
22 Jiang Z, Yu JC, Liu H. 2005. Simultaneous determination of cobalt, copper and  
23 zinc by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry after  
24 preconcentration on PAR-loaded ion-exchange resin. *Analytical Sciences*  
25 21: 851-854.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32 Luque-Garcia JL, Luque de Castro MD. 2003. Ultrasound: a powerful tool for  
33 leaching. *Trends in Analytical Chemistry* 22: 41-47.  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42 Maiga A, Diallo D, Bye R, Paulsen BS. 2005. Determination of some toxic and  
43 essential metal ions in medicinal and edible plants from Mali. *Journal of*  
44 *Agricultural and Food Chemistry* 53: 2316-2321.  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60 Mendil D, Uluozlu OD, Hasdemir E, Tuzen M, Sari H, Suiçmez M. 2005.  
Determination of trace metal levels in seven fish species in lakes in Tokat,  
Turkey. *Food Chemistry* 90: 175-179.  
Miller JC, Miller JN. 1994. *Statistics for Analytical Chemistry* Chichester: Ellis  
Horwood.  
Saracoglu S, Soylak M, Elci L. 2003. Separation/preconcentration of trace  
heavy metals in urine, sediment and dialysis concentrates by coprecipitation  
with samarium hydroxide for atomic absorption spectrometry. *Talanta* 59:  
287-293.

- 1  
2  
3 Shukla R, Rao GN. 2002. Solvent extraction of metals with potassium-dihydro-  
4 bispyrazolyl-borate. *Talanta* 57: 633-639.  
5  
6  
7  
8 Venkatesh G, Singh AK. 2005. 2-[[1-(3,4-Dihydroxyphenyl)methylidene]amino]  
9 benzoic acid immobilized Amberlite XAD-16 as metal extractant. *Talanta* 57:  
10 187-194.  
11  
12  
13  
14 Wang J, Hansen EH. 2000. Coupling on-line preconcentration by ion-exchange  
15 with ETAAS. A novel flow injection approach based on the use of a  
16 renewable microcolumn as demonstrated for the determination of nickel in  
17 environmental and biological samples. *Analytica Chimica Acta* 424: 223-232.  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24 Xu Y, Iwashita A, Nakajima T, Yamashita H, Takanashi H, Ohki A. 2005. Effect  
25 of HF addition on the microwave-assisted acid-digestion for the  
26 determination of metals in coal by inductively coupled plasma-atomic  
27 emission spectrometry. *Talanta* 66: 58-64.  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34 Yebra-Biurrun MC, Cancela-Perez S, Moreno-Cid-Barinaga A 2005. Coupling  
35 continuous ultrasound-assisted extraction, preconcentration and flame  
36 atomic absorption spectrometric detection for the determination of cadmium  
37 and lead in mussel samples. *Analytica Chimica Acta* 533: 51-56.  
38  
39  
40  
41  
42  
43 Yin J, Jiang Z, Chang G, Hu B. 2005. Simultaneous on-line preconcentration  
44 and determination of trace metals in environmental samples by flow injection  
45 combined with inductively coupled plasma mass spectrometry using a  
46 nanometer-sized alumina packed micro-column. *Analytica Chimica Acta*  
47 540: 333-339.  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60 Zhu Y, Hattori R, Fujimori E, Umemura T, Haraguchi H. 2005. Multielement  
determination of trace metals in river water (Certified Reference Material,  
JSAC 0301-1) by high efficiency nebulization ICP-MS after 100-fold

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

preconcentration with a chelating resin-packed minicolumn. Analytical  
Sciences 21: 199-203.

For Peer Review Only

Table I

Factor levels and optimum conditions for each variable for the preconcentration and continuous ultrasonic acid extraction steps

Preconcentration step					Continuous ultrasonic acid extraction				
Variable			Nickel	Cobalt	Variable			Nickel	Cobalt
	Low	High	Optimum			Low	High	Optimum	
Sample pH	1	7	4.5-5.5	4.5-6.5	HNO <sub>3</sub> concentration (M)	0	3	1.5	1.0
Sample flow rate (ml min <sup>-1</sup> )	0.5	4.0	2.0	2.0	HCl concentration (M)	0	3	0.0	0.0
Eluent concentration (HCl, M)	0.1	3.0	3.0	3.0	Sonication time (min)	0.5	5.0	0.5	1.5
Eluent volume (μl)	70.4	190.0	133.2	150.8	Leaching volume (ml)	2.0	5.0	2.0	2.0
Eluent flow rate (ml min <sup>-1</sup> )	3.0	5.0	3.0	3.0	Extraction flow rate (ml min <sup>-1</sup> )	3.5	6.0	3.5	3.5
Minicolumn diameter (mm)	1.0	2.0	1.0	1.0	Leaching temperature (°C)	20.0	70.0	20.0	20.0

Table II

Determination of nickel and cobalt in vegetable samples and paired *t*-test

Sample	Reference method (n=3) <sup>a</sup>		Proposed methodology (n=3)	
	[Ni] ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	[Co] ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	[Ni] ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	[Co] ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Cabbage	0.83 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.00	0.75 $\pm$ 0.01
Lettuce	0.97 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.01	1.01 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.01
Turnip tops	1.10 $\pm$ 0.07	0.49 $\pm$ 0.01	1.15 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.01
Silver beet	0.56 $\pm$ 0.01	0.80 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.01	0.81 $\pm$ 0.01
Red cabbage	0.78 $\pm$ 0.01	0.72 $\pm$ 0.01	0.80 $\pm$ 0.00	0.70 $\pm$ 0.01
Potato	0.81 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.01
Courgette	0.50 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.01	0.52 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.01
Carrot	0.65 $\pm$ 0.00	0.85 $\pm$ 0.01	0.63 $\pm$ 0.01	0.86 $\pm$ 0.01
Tea	0.71 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.00	0.74 $\pm$ 0.01	0.49 $\pm$ 0.01
Lime tea	0.59 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.01	0.56 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.01
Camomile	0.65 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.01	0.64 $\pm$ 0.00	0.60 $\pm$ 0.00
Apple	0.84 $\pm$ 0.01	0.54 $\pm$ 0.01	0.87 $\pm$ 0.00	0.54 $\pm$ 0.01
Pear	0.62 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.01	0.59 $\pm$ 0.00	0.42 $\pm$ 0.00
Peach	0.65 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.01	0.62 $\pm$ 0.01	0.48 $\pm$ 0.01
Banana	0.70 $\pm$ 0.01	0.44 $\pm$ 0.01	0.68 $\pm$ 0.00	0.43 $\pm$ 0.01
DC 73351	Ni certified		Ni obtained	
Tea Leaves	4.6 $\pm$ 0.3		4.3 $\pm$ 0.4	

Critical value of *t* (P=0.05)= 2.15; experimental value of *t*: 0.86 for Ni and 0.55 for Co.

<sup>a</sup>Off-line acid digestion, preconcentration (chelating resin) and FAAS determination.

Fig. 1. Flow injection manifold for the whole procedure (continuous acid extraction and preconcentration devices) for nickel and cobalt determination in plant samples. P1 and P2, peristaltic pumps; LS, leaching solution; W, waste; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn containing the sample; SS, standard solution; B, blank; IV, injection valve; E, eluent (HCl, 3 mol/L); BU(buffer, ammonium acetate); SV1-SV5, switching valves; MC1 and MC2, mixing coils; MN, minicolumn containing the chelating resin (Serdolit Che or Chelite P); UW, ultrapure water and FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

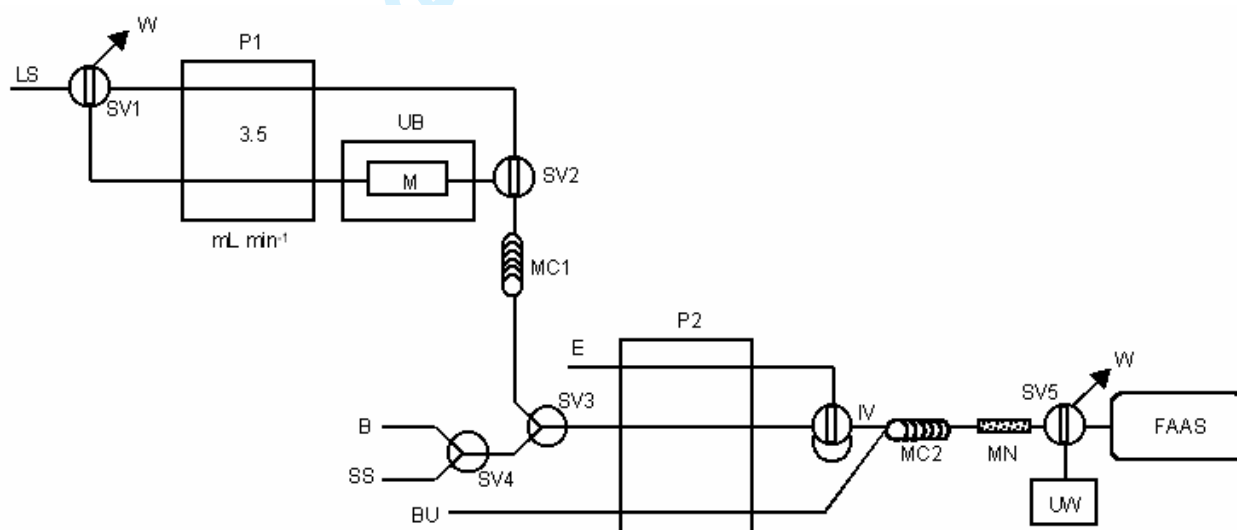
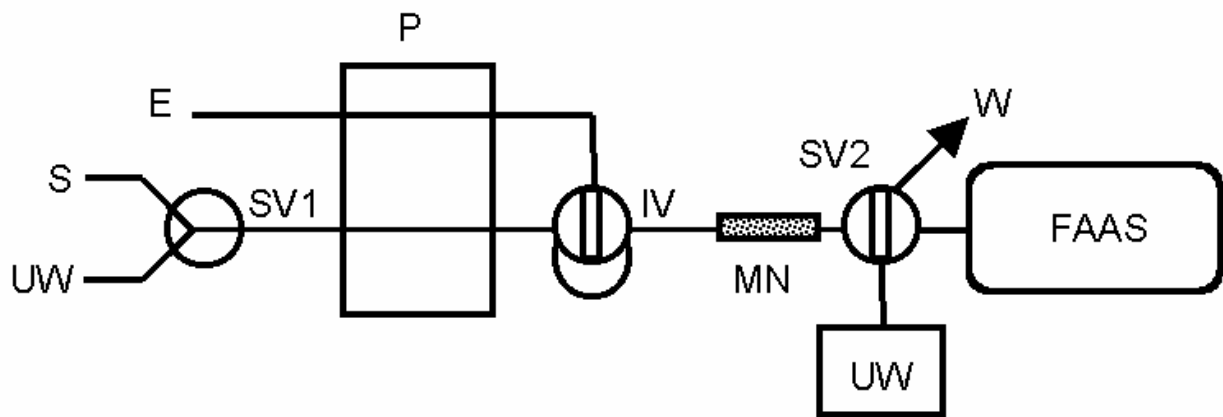


Fig. 2. Flow injection manifold for nickel and cobalt preconcentration. P, peristaltic pump; SV1 and SV2, switching valves; IV, injection valve; MN, minicolumn containing the chelating resin Serdolit Che; W, waste; UW, ultrapure water; FAAS, flame atomic absorption spectrometer







# **Continuous Approach for Ultrasound Assisted Extraction-Minicolumn Preconcentration of Chromium and Cobalt from Seafood Samples Prior to Flame Atomic Absorption Spectrometry**

Maria C. YEBRA-BIURRUN<sup>†</sup> and Sheila CANCELA-PÉREZ

*Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Bromatology, Faculty of Chemistry,  
University of Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

---

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed.

E-mail: qncayebi@usc.es

## **Abstract**

A rapid and sensitive method has been proposed for the determination of chromium and cobalt in seafood samples by flame atomic absorption spectrometry combined with a dynamic ultrasound-assisted acid extraction and an on-line minicolumn preconcentration. The use of diluted nitric acid as extractant in a continuous mode at a flow rate of  $3.5 \text{ mL min}^{-1}$  and room temperature was sufficient for quantitative extraction of these trace metals from seafoods samples. A minicolumn containing a chelating resin was as an excellent material for the quantitative preconcentration of chromium and cobalt prior to their flame atomic absorption detection. A flow-injection manifold was used as interface for coupling all analytical steps, which allowed the automation of the whole analytical process. A Plackett-Burman experimental design was used as a multivariate strategy for the optimization of both sample preparation and preconcentration steps. The method was successfully applied to the determination of chromium and cobalt in seafood samples.

## Introduction

The public attention to undesirable chemical substances in seafood products from natural environments and from fish farms is increasing. Among the substances of special concern are the heavy metals due to their toxicity and accumulation in biological marine tissues. The amount of chromium in the diet is of great importance as Cr is involved in insulin function and lipid metabolism. Cobalt plays an important role in the metabolism of iron and synthesis of haemoglobin, and it is also an integral part of Vitamin B12 and other biological compounds. Nevertheless, these metals can also produce toxic effects when the metal intake is excessively elevated.<sup>1,2</sup>

Trace metals are usually determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) due to its rapidity and simplicity. But this technique is not enough sensitive to allow the determination of metals at very low concentration levels. Therefore, a separation and/or preconcentration procedure is frequently required as a previous step before FAAS detection. Thus, several solid phase preconcentration methods were proposed to improve the sensitivity of chromium and cobalt determinations. These preconcentration strategies involving adsorbents as silica gel<sup>3,4</sup>, chelating resins<sup>5,6</sup>, microorganisms immobilized on solid supports<sup>7,8</sup>, etc. The use of flow injection (FI) sample preconcentration system enables trace metal determinations in complex diluted samples using conventional FAAS. In this sense, a number of FI-preconcentration methods including a minicolumn containing a chelating resin<sup>9-11</sup>, a ion exchange resin<sup>12</sup> or a solid sorbent<sup>13,14</sup> have been reported for trace chromium and cobalt determination.

By the other hand, as recently reported Luque-Garcia and Luque de Castro<sup>14</sup>, the use of ultrasound energy for accelerating or assisting a analytical process is a current

practice in analytical chemistry. Thus, ultrasonic extractions coupled with FI systems have been proved to be successful for achieving quantitative recoveries from various environmental matrices<sup>11,15</sup>. Our investigation team proposed for first time a FI manifold as interface to couple ultrasound-assisted extraction, preconcentration and FAAS detection, allowing automation of the whole analytical process<sup>16</sup>.

The aim of this work was to develop and establish an analytical method for Cr and Co determination in seafood samples using a continuous ultrasound-assisted system for extraction, chelating resins for on-line preconcentration and determination by FI-FAAS.

## **Experimental**

### *Reagents and chemicals*

Ultrapure water of 18.2 M $\Omega$ cm resistivity, obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA USA) was used for the preparation of the reagents and standards. Hydrochloric acid, nitric acid (Scharlau Chemie, Barcelona, Spain), ammonium acetate (Merck, Germany) and 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  chromium and cobalt standard solutions (Merck, Germany) were reagent grade. Serdolit Che and Chelite P (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) with iminodiacetic acid groups and aminomethylphosphoric acid groups, respectively, were used as chelating resins, for chromium and cobalt preconcentration.

### *Apparatus*

A Perkin Elmer Model 5000 atomic absorption spectrometer (Perkin Elmer, Shelton, CT-USA) fitted with chromium and cobalt hollow cathode lamps was used.

The instrument was set at 357.9 and 240.7 nm. The spectrometer output was connected to a Perkin Elmer Model 50 Servograph Recorder with a range of 5 mV. As can be seen in Fig. 1, the FI system comprises two Gilson Minipuls 3 peristaltic pumps (Gilson, Villiers Le Bel, France) fitted with Viton tubes, an ultrasonic bath with an ultrasound power of 40 KHz (Selecta, Barcelona, Spain), six Rheodyne injection or switching valves (Rohnert Park, USA), Models 5041 and 5301, extraction loops of 2.5, 4.5 and 8.0 m (made with 0.8 mm i.d. PTFE tubing, Omnifit, Cambridge, UK), a glass minicolumn (100 mm x 3 mm i.d., bed volume 700 mL, Omnifit, Cambridge, UK). The ends of minicolumn were plugged with filter paper (Whatman 541). Minicolumns for the preconcentration step were prepared by filling Viton tubes (10 cm length and 1 mm i.d.) with 50 mg of chelating resin.

#### *Sample preparation and procedure*

Mussel samples were grinded, homogenized and freeze-dried (-40 °C). The rest of samples were cut in small pieces, dried at 50 °C, triturated and pulverized in a porcelain mortar. After sieving, fractions with a particle size less than 30 mm were taken.

Samples of 60 mg were directly weighed into the glass minicolumn. Then, the minicolumn was connected to the continuous manifold (Fig 1). First, the extraction circuit (2 mL) was loaded with the acid leaching solution (3 M nitric acid). Once the extraction circuit was closed by means of SV1, the leaching solution circulates through the minicolumn subjected to ultrasound energy for 2.5 or 2.0 min (for chromium and cobalt, respectively). The flow rate of the leaching solution was 3.5 mL min<sup>-1</sup>. The direction of the flow was changed each 20 s in order to avoid sample accumulation at the end of minicolumn. Then, the switching valve (SV2) was switched to its opposite position and the acid extract was homogenized in the mixing coil. After this, the acid extract channel converged with a buffer solution stream (16 M ammonium acetate) in

order to obtain the optimum pH value. The mixture was homogenized in a second mixing coil and then, was passed through the preconcentration minicolumn, at a flow rate of 1.5 and 2 mL min<sup>-1</sup>, for Cr and Co, respectively. Then, were eluted by injection of a volume of 133.2 or 150.8 μL (for Cr and Co, respectively) of 3 M hydrochloric acid into a water carried stream, which swept them to the FAAS detector where were continuously monitored.

## **Results and Discussion**

### *Optimization of the chromium and cobalt preconcentration*

In order to study the behaviour of the variables involving in this process, a factorial Plackett-Burman 2<sup>6</sup>\*3/16 type III resolution design allowing five degrees of freedom plus one center point was built (Table 1). Optimisation experiments were performed on standard solutions of 2 mL containing 0.08 and 0.04 μg mL<sup>-1</sup> of chromium and cobalt, respectively. The variable response was % recovery. From the results of the analysis, it can be concluded that chromium and cobalt preconcentration process appeared to be affected by one and two statistically significant factors, respectively, eluent concentration for chromium, and sample flow rate and sample pH for cobalt. All the other factors were not statistically significant in the studied range. As the Plackett-Burman design only provides the tendencies to the optimum, several variables were fine-tuned outside of the framework of the design. The aims of this study were decrease the eluent volume and its concentration, increase the sample flow rate, and establish the pH range for quantitative chromium and cobalt retention. Eluent flow rate and minicolumn diameter were fixed in 3 mL min<sup>-1</sup> and 1 mm, respectively. The optimum conditions for chromium and cobalt preconcentration were listed in Table 1. In

order to carry out on-line the pH increase for a quantitative retention of the metals on the chelating resin, a study of concentration, volume and flow rate of the ammonium acetate buffer solution was developed. So, a 16 M ammonium acetate solution with a volume of 0.5 mL and a flow rate of 0.3 and 0.4 mL min<sup>-1</sup> for Cr and Co respectively, were selected as a compromise for the ammonium acetate channel.

#### *Optimisation of the continuous ultrasonic acid extraction of chromium and cobalt*

Also was employed a Plackett-Burman 2<sup>6</sup>\*3/16 design. This factorial design was applied to 60 mg of a CRM 278R Mussel tissue (0.78 ± 0.06 µg g<sup>-1</sup> Cr) and to a mussel sample (0.93 ± 0.01 µg g<sup>-1</sup> Co). The experimental variables and their levels are listed in Table 2. From the results of these analytical data, was proven that sonication time and nitric acid concentration were the significant variables for Cr and Co extraction from seafood samples. These significant variables were affected by a positive sign. To simplify the analysis, 0 M hydrochloric acid, room temperature, 2 mL of leaching solution and a flow rate of 3.5 mL min<sup>-1</sup> were selected since these parameters were not statistically influential factors. A possible reduction of the sonication time and the use of less concentrated nitric acid were studied outside the framework of the design. Thus, the optimum conditions achieved for continuous ultrasonic acid extraction of chromium and cobalt were listed in Table 2.

Two sample variables that can affect the acid extraction process (sample particle size and amount of sample) were studied by an univariate mode. The results obtained indicated that sample particle size does not affect the extraction process at the levels tested (30-100 µm) and the maximum sample amount that can be used was 60 mg.

#### *Features of the method*

The calibration graph was run (n=7) under optimum chemical and flow conditions for the whole process. Equations were, absorbance = 2.2 × 10<sup>-4</sup> + 0.39 X (r=0.999) and

absorbance =  $7 \times 10^{-7} + 0.40 X$  ( $r=0.999$ ), where X is Cr and Co concentration, respectively, expressed as  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

The precision of the whole process was verified using CRM 278R Mussel Tissue ( $0.78 \pm 0.06 \mu\text{g g}^{-1}$  Cr) and a mussel sample ( $0.93 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$  Co). The results obtained, expressed as relative standard deviation were 2.7 and 1.9 %, for chromium and cobalt, respectively. The limit of detection (LOD) based on three times the standard deviation ( $n=30$ ) of the blank was found to be 0.09 and  $0.11 \mu\text{g g}^{-1}$  for Cr and Co, respectively. The sample throughput, taking into account the global process was about 13 and 16 samples  $\text{h}^{-1}$  and the preconcentration factor was 15.1 and 12.2 for Cr and Co, respectively. The accuracy of the method was checked by two different approaches: on the one hand, recovery studies were performed for Co on a mussel sample ( $0.93 \pm 0.01 \mu\text{g g}^{-1}$  Co) spiked with  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  Co. Thus, a recovery of 98.0% was obtained. On the other hand, for Cr was used the CRM 278R Mussel Tissue, Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium, with a certified value of  $0.78 \pm 0.06 \mu\text{g g}^{-1}$  Cr. The Cr content obtained (mean  $\pm$  SD,  $n=3$ ) was  $0.77 \pm 0.03 \mu\text{g g}^{-1}$ , which agrees with the certified value.

#### *Analysis of seafood samples*

The proposed methodology was applied to determine chromium and cobalt in seafood samples. The results obtained were compared with those achieved by a conventional off-line sample digestion method with concentrated nitric acid, preconcentration step previously optimized by using the chelating resin and determination by FAAS. The results expressed as  $\mu\text{g g}^{-1}$  and their standard deviation ( $n=3$ ) obtained by these two methods are shown in Table 3. To compare the results obtained by these both methods, the paired t-test was applied. As shown the Table 3, both methods do not give significantly different values, thus the agreement between the

two methods is satisfactory at 95% confidence level.

## **Conclusions**

An automated approach based on the coupling between an ultrasound-assisted extraction system with a preconcentration unit prior to a flame atomic absorption spectrometric detector is proposed for the determination of Cr and Co in seafood samples. The use of this dynamic approach allowed the extraction of these trace metals in a short time (2.5 and 2.0 min, for Cr and Co, respectively) and the procedure is safer than acid digestion as neither pressure nor high temperature are present during the extraction procedure. The inclusion of a minicolumn containing a chelating resin (Serdolit Che, for Cr and Chelite P, for Co) before the detector is an effective strategy to improve the sensitivity of the FAAS for Cr and Co determination, and constitutes an important contribution to the development of new FI-FAAS methods for routine determination of trace Cr and Co in seafood samples.

## **Acknowledgements**

The authors are grateful for the financial support provided by the Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Ministerio Ciencia y Tecnología (Project no. CAL01-043). S.C. acknowledges a grant from the Xunta de Galicia.

## References

1. E. Merian, “*Metals and Their Compounds in the Environment*”, **1991**, VCH, Weinheim, Germany.
2. C. Reilly, “*Metal Contamination of Food*”, **1991**, Elsevier Applied Science, Cambridge, UK.
3. J. Nakajima, M. Fujinami and K. Oguma, *Anal. Sci.*, **2004**, 20, 1733.
4. A. Safavi, N. Iranpoor, N. Saghir and S. Momeni, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 569, 139.
5. P. Liang, L. Yang, B. Hu and Z. Jiang, *Anal. Sci.*, **2003**, 19, 1167.
6. R.S. Praveen, S. Daniel and T. Prasada Rao, *Talanta*, **2005**, 66, 513.
7. S. Baytak, and A.R. Turker, *Mikrochim. Acta*, **2005**, 149, 109.
8. S. Baytak, and A.R. Turker, *Talanta*, **2005**, 65, 938.
9. J.L. Luque-Garcia and M.D. Luque de Castro, *Analyst*, **2002**, 127, 1115
10. A.M. Hagi Shabani, S. Dadfarnia and K. Dehghan, *Talanta*, **2003**, 59, 719.
11. H. Sun, W. Kang, S. Liang, J. Ha and S. Shen, *Anal. Sci.*, **2003**, 19, 589.
12. A.I. Cabañero, Y. Madrid and C. Camara, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, 373, 244.
13. J.L. Luque Garcia and M.D. Luque de Castro, *Trends Anal. Chem.*, **2003**, 22, 41.
14. Y. Li, Y. Jiang and X. Yan, *Talanta*, 2004, 64, 758.
15. A. Collasiol, D. Pozebon and S.M. Maia, *Anal. Chim. Acta*, **2004**, 518, 157.
16. M.C. Yebra-Biurrun, S. Cancela-Pérez and A. Moreno-Cid-Barinaga, *Anal. Chim. Acta*, **2005**, 533, 51.

Table 1 Factor levels and optimum conditions for each variable (preconcentration step)

Variable	Low	High	Optimum	
			Chromium	Cobalt
Sample pH	1	7	3.5-4.5	4.5-6.5
Sample flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	0.5	4.0	1.5	2.0
Eluent concentration (HCl, M)	0.1	3.0	3.0	3.0
Eluent volume (μL)	70.4	190.0	133.2	150.8
Eluent flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	3.0	4.0	3.0	3.0
Minicolumn diameter (mm)	1.0	2.0	1.0	1.0

Table 2 Factor levels and optimum conditions for each variable for the continuous ultrasonic acid extraction step

Variable	Low	High	Optimum	
			Chromium	Cobalt
Nitric acid concentration (M)	0	3	3	3
Hydrochloric acid concentration (M)	0	3	0	0
Sonication time (min)	0.5	5.0	2.5	2.0
Leaching volume (mL)	2	5	2	2
Extraction flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	3.5	6.0	3.5	3.5
Leaching temperature (°C)	20	70	20	20

Table 3 Determination of chromium and cobalt in seafood samples

Samples	Chromium concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		Cobalt concentration ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
	Conventional method <sup>a</sup>	Present method	Conventional method <sup>a</sup>	Present method
Mussel 1	$0.71 \pm 0.01$	$0.74 \pm 0.01$	$0.60 \pm 0.01$	$0.62 \pm 0.01$
Mussel 2	$0.90 \pm 0.01$	$0.88 \pm 0.00$	$0.93 \pm 0.01$	$0.94 \pm 0.01$
Mussel 3	$0.82 \pm 0.02$	$0.79 \pm 0.01$	$1.00 \pm 0.01$	$1.00 \pm 0.01$
Mussel 4	$0.88 \pm 0.01$	$0.91 \pm 0.01$	$0.94 \pm 0.02$	$0.93 \pm 0.01$
Mussel 5	$0.93 \pm 0.01$	$0.95 \pm 0.01$	$0.74 \pm 0.01$	$0.73 \pm 0.01$
Clam 1	$0.77 \pm 0.01$	$0.78 \pm 0.00$	$0.54 \pm 0.01$	$0.56 \pm 0.01$
Clam 2	$0.61 \pm 0.01$	$0.61 \pm 0.01$	$0.55 \pm 0.01$	$0.57 \pm 0.01$
Tuna	$0.47 \pm 0.01$	$0.46 \pm 0.01$	$0.47 \pm 0.01$	$0.46 \pm 0.01$
Prawn	$0.68 \pm 0.01$	$0.67 \pm 0.01$	$0.45 \pm 0.02$	$0.48 \pm 0.01$
Hake	$0.59 \pm 0.01$	$0.59 \pm 0.01$	$0.60 \pm 0.01$	$0.61 \pm 0.01$
Razor-shell	$0.55 \pm 0.01$	$0.54 \pm 0.01$	$0.58 \pm 0.02$	$0.59 \pm 0.00$
Sardine	$0.49 \pm 0.01$	$0.47 \pm 0.01$	$0.57 \pm 0.01$	$0.56 \pm 0.01$
Scallops	$0.65 \pm 0.01$	$0.66 \pm 0.01$	$0.58 \pm 0.01$	$0.59 \pm 0.01$

Critical value of t (P=0.05)= 2.15; experimental value of t: 0.28 for Cr and 1.94 for Co.

<sup>a</sup> Conventional off-line sample digestion method with concentrated nitric acid, preconcentration step previously optimised by using the chelating resin and determination by FAAS.

## Figure Caption

Fig. 1. Flow injection manifold for the whole procedure (continuous acid extraction and preconcentration devices) for chromium and cobalt determination in seafood samples.

P1 and P2, peristaltic pumps; LS, leaching solution; W, waste; UB, ultrasonic bath; M, minicolumn containing the sample; SS, standard solution; B, blank; IV, injection valve; E, eluent (HCl, 3 mol L<sup>-1</sup>); BU(buffer, ammonium acetate); SV1-SV5, switching valves; MC1 and MC2, mixing coils; MN, minicolumn containing the chelating resin (Serdolit Che or Chelite P); UW, ultrapure water and FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

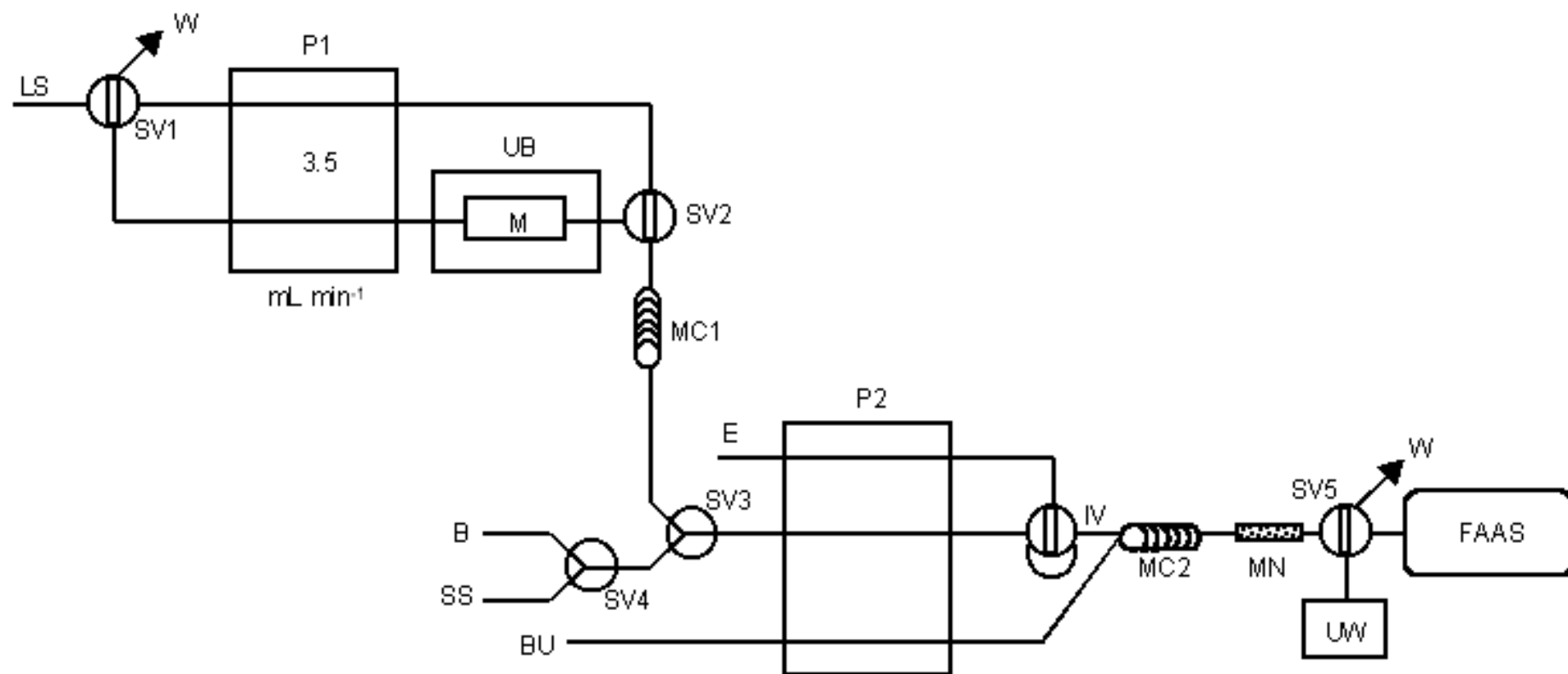


Fig. 1





