

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
Postgrado en Química Analítica

TESIS DE GRADO:
Desarrollo de Metodologías Analíticas para la Determinación de
Elementos Trazas por Espectroscopía de Absorción Atómica.

www.bdigital.ula.ve

Realizada por:
MSc. Edwin A. Hernández Caraballo
Para optar al Título de:
Doctor en Química Analítica.

Tutor:
Dra. Marcela Pascu de Burguera.
Co-tutor:
Dr. José Luis Burguera.

Mérida - Venezuela
Mayo 2004

C.C.Reconocimiento

Dedicatoria.

A mis padres,

Luisa F. y Edgar:

No habría podido hacer lo poco que he
hecho hasta ahora de no haberme
brindado La Oportunidad. Gracias!

A mi esposa,

Rita María (La Flaca):

Por todo lo que has sido, por lo que
eres ... y por lo que seremos! Te amo!

www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

Prefacio.

Como científicos, los químicos analíticos tienen como misión la búsqueda y consecución de respuestas a una serie de preguntas básicas que surgen de la observación del mundo natural o que son presentadas por otras personas que necesitan de su ayuda para la resolución de un problema dado. Usualmente nos preguntamos:

- **¿Qué...**

- concentración de este elemento se halla presente en ... ?
- cantidad se debe añadir para ... ?
- concentración puede causar efectos tóxicos en los individuos ... ?

- **¿Cuál(es) ...**

- elementos forman parte de la aleación ... ?
- compuestos son excretados por la orina al ingerir el fármaco ... ?

Estás preguntas hacen clara alusión a lo que conocemos como análisis cualitativo y cuantitativo, respectivamente. Sin embargo, la misión va más allá de lo expuesto anteriormente. En efecto, la definición de los deberes del Químico Analítico que provee la División de Química Analítica de la Sociedad Americana de Química nos dice que [1]:

“Los químicos analíticos trabajan para mejorar la confiabilidad de las técnicas existentes para satisfacer las demandas de mejores determinaciones químicas que surgen constantemente en nuestra sociedad. Ellos adaptan metodologías ya probadas a nuevos materiales, o responden nuevas preguntas acerca de la composición de estos últimos. También llevan a cabo investigación para descubrir principios de medición completamente nuevos, y se encuentran a la cabeza de la utilización de los descubrimientos más importantes (...) con fines prácticos. Los químicos analíticos hacen contribuciones importantes en campos

tan diversos como la química forense, la arqueología, y la ciencia espacial." (T. del A.).

Claramente nos damos cuenta que, en ocasiones, es preciso preguntarse:

- **¿Por qué ...**

desarrollar una nueva metodología para ... ?

- **y, ¿Cómo ...**

reducir los costos y la frecuencia de análisis del método ... ?

Esta "necesidad" de formular nuevas preguntas y la búsqueda de respuestas ha llevado al químico analítico a salir del aislamiento del laboratorio y a la exploración de nuevas fronteras, llegando inclusive a ser un pilar fundamental en áreas del saber que no habría imaginado algunas décadas atrás. Una muestra de lo anterior puede ser apreciada en el artículo de E. Zubritsky titulado "*How analytical chemists saved the Human Genome Project... or at least gave it a helping hand*"¹¹ [2].

Independientemente del fin último de un proyecto -entiéndase de la dupla Pregunta/Respuesta- el químico analítico debe llevar a cabo su búsqueda empleando para ello el Método Analítico. Explicar con detalle cada una de las etapas que lo constituyen va más allá del propósito de este trabajo. El lector interesado puede consultar las referencias 3-5 para una discusión más detallada de las mismas. En este caso nos conformaremos con mencionar, brevemente, que el Método Analítico esta conformado por las siguientes etapas:

1. Muestreo.

2. Conservación y almacenamiento de la muestra.

¹ "Cómo los químicos analíticos salvaron el Proyecto del Genoma Humano... o al menos ayudaron." (T. del A.).

3. Preparación de la muestra. { Tratamiento. { Dilución.
Digestión.
Extracción, etc.
Separación analito/interferente(s).
4. Análisis de la muestra. { Selección de la técnica de análisis.
Selección de las condiciones de análisis.
Empleo de la técnica adecuada de calibración.
Verificación de la exactitud del análisis.
5. Análisis de los resultados.

El presente Trabajo de Grado, tal y como lo sugiere su título, gira en torno a la implementación del Método Analítico en la resolución de una serie particular de problemas. Sin embargo, se ha hecho especial énfasis en algunas de las partes que lo constituyen. Debido a la naturaleza de los trabajos que se discuten a lo largo de esta Tesis de Grado, se ha optado por organizarla en tres (3) partes. La Parte 1 está enfocada al desarrollo de metodologías analíticas previas a la etapa de cuantificación de la especie de interés. En este sentido, el Capítulo 1 está dedicado a la evaluación de una alternativa para la preparación de *especímenes*²² de suero sanguíneo para la posterior determinación de selenio por espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito. El Capítulo 3 describe una metodología para la medición en un menor tiempo de la concentración de cadmio en especímenes de orina, empleando para ello programas rápidos de atomización. Aun cuando este capítulo puede ser leído de manera independiente, se le sugiere al lector interesado que revise el Capítulo 2 previamente, el cual tiene como fin evaluar de manera crítica las propuestas existentes hasta el presente en relación a este tipo de programa de atomización.

²² Desde el punto de vista estadístico, una muestra se refiere a un grupo (de tamaño finito) de objetos tomados de una población dada, e. g., una muestra de balones aforados de una fábrica de material de laboratorio. Cuando se habla de una porción que es *representativa del material original para el momento en que es muestreada*, e.g., sangre, se habla de un *espécimen*. Ambos términos, sin embargo, suelen emplearse comúnmente, aunque de forma errónea, sin distinción (ver W. Horwitz, Pure & Appl. Chem. 62 (1990) 1193).

La Parte II agrupa las que se han considerado como las etapas posteriores a la cuantificación. El aspecto común que tienen los Capítulos 5 y 6, al mismo tiempo de ser la característica más interesante, es el empleo de una herramienta de *computación inteligente* conocida como la *red neuronal artificial* [6]. El Capítulo 4 tiene como objetivo presentar al lector no avezado los fundamentos de estas herramientas. Los capítulos que siguen a continuación evalúan dos (2) de las capacidades más importantes de las redes neuronales. En este sentido, el *modelado* de una curva de calibración no lineal en GF AAS, con el objeto de aumentar el rango de trabajo, es presentado en el Capítulo 5. Por otra parte, en el Capítulo 6 se emplea una red neuronal artificial como herramienta de *clasificación* de muestras de Aguardiente de Cocuy fabricado clandestinamente, cuya procedencia se desea conocer con el propósito de estimular políticas de control de calidad. La Parte III simplemente agrupa los trabajos presentados a lo largo de esta Tesis, con el formato como fueron publicadas en revistas especializadas.

www.bdigital.ula.ve

Referencias.

- [1] C. A. Lucy, Talanta 51 (2000) 1125
- [2] E. Zubritsky, Anal. Chem. (2002)
- [3] B. Welz, M. Sperling, Chapter 5. The individual steps of an analytical method, en *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd Edition, WILEY-VCH, República Federal Alemana, 1999, pp. 221-296
- [4] W. F. Smyth, Chapter 2. Unit processes of analytical procedures, en *Analytical Chemistry of Complex Matrices*, WILEY - TEUBNER. Gran Bretaña, 1996, pp. 18-78.
- [5] M. Hoenig, Talanta 54 (2001) 1021-1038.
- [6] J. Aguilar Castro, F. Rivas Echeverría (Editores), Introducción a las Técnicas de Computación Inteligente, Universidad de Los Andes, Venezuela, 2001

Agradecimientos.

El autor expresa sus más sinceros agradecimientos a las siguientes instituciones y personas, sin el apoyo de quienes no habría sido posible la realización del siguiente trabajo.

Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT).

Profa. Marcela Burguera y Prof. José L. Burguera.

Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A, Venezuela

Profa. Rita Ma. Ávila Gómez.

Departamento de Procesos Agroindustriales. Programa de Ingeniería Agroindustrial, Decanato de Agronomía, Universidad Centro-occidental Lisandro Alvarado, Núcleo Obelisco, Barquisimeto 3002, Venezuela.

Prof. Francklin Rivas.

Laboratorio de Sistemas Inteligentes, Escuela de Ingeniería de Sistemas, Facultad de Ingeniería. Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.

Profa. Lué M. Marcó Parra y Prof. Tarcisio Capote.

Unidad de Análisis Instrumental, Decanato de Agronomía, Departamento de Química y Suelos. Universidad Centro-occidental Lisandro Alvarado, Apartado Postal 4076, Cabudare 3023, Venezuela.

Lic. Anna G. Pérez.

Instituto de Estadística Aplicada y Computación, Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, Universidad de Los Andes, Mérida 5/0J, Venezuela.

ÍNDICE GENERAL.

Dedicatoria	i
Prefacio	ii
Agradecimientos	vii
Índice General	viii
Índice de Tablas	xvi
Índice de Figuras	xviii

PARTE I. Desarrollo de métodos para el análisis de especímenes biológicos mediante espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica	1
--	---

CAPITULO 1. Evaluación del hidróxido de amonio como diluyente para la preparación de especímenes de suero sanguíneo y la posterior determinación de selenio total mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito	2
1.1 Resumen	2
1.2 Introducción	3
1.3 Experimental	6
1.3.1 Equipos y accesorios	6
1.3.2 Reactivos y materiales	7
1.3.3. Muestreo	7
1.4. Procedimiento	8
1.4.1 Preparación de las soluciones de trabajo	8
1.4.2. Determinación de selenio mediante GFAAS	9
1.5. Resultados y discusiones	11
1.5.1. Selección de las condiciones del programa de atomización y de la composición del modificador químico	11
1.5.2. Determinación de la composición de la solución diluyente	18

1.5.3. Características analíticas de la metodología	22
1.5.4. Determinación de selenio en especímenes de suero sanguíneo	23
1.6. Conclusiones	23
1.7. Referencias del Capítulo 1	24

CAPÍTULO 2. Programas rápidos de atomización en espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica: Tutorial

2.1. Resumen	28
2.2. Introducción	28
2.3. Programas de atomización convencionales en GFAAS	30
2.4. Programas rápidos de atomización	34
2.4.1. Reducción del volumen de inyección	35
2.4.2. Deposición sobre una superficie pre-calentada	36
2.4.3 Secado a alta temperatura	37
2.4.4 Remoción de la etapa de secado	39
2.4.5 Eliminación de la etapa de pirólisis	40
2.4.6 Omisión de la etapa de limpieza	42
2.4.7 Aplicación de modificaciones permanentes	42
2.5. El concepto STPF dentro del marco de los programas rápidos de atomización	45
2.6. Problemas asociados a la aplicación de los programas rápidos de atomización	47
2.7. Conclusiones	48
2.8. Referencias del Capítulo 2	49

CAPÍTULO 3. Programas rápidos de atomización en espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica: Determinación de cadmio en especímenes de orina

3.1. Resumen	54
3.2. Introducción	55

3.3. Experimental	60
3.3.1. Equipos, accesorios y paquetes computacionales	60
3.3.2. Reactivos y materiales	60
3.3.3. Especímenes	61
3.4. Procedimiento	61
3.4.1. Preparación de las soluciones de trabajo	61
3.4.2. Optimización del programa rápido de atomización	62
3.4.3. Determinación de cadmio por GFAAS	63
3.5. Resultados y discusiones	66
3.5.1. Evaluación del programa convencional de atomización	66
3.5.2. Optimización del programa rápido de atomización	72
3.5.3. Características analíticas del método	76
3.5.4. Determinación de cadmio en muestras de orina por GFAAS	77
3.5.5. Evaluación de la resistencia del atomizador	78
3.6. Conclusiones	80
3.7. Referencias del Capítulo 3	81

PARTE II. Fundamentos y aplicaciones de las redes neuronales artificiales en la química analítica	85
---	----

CAPÍTULO 4. Fundamentos de las redes neuronales artificiales	86
4.1. Resumen	86
4.2. Introducción	86
4.3. Las redes neuronales artificiales	87
4.3.1. La unidad fundamental: la neurona	88
4.3.2. La unión hace la fuerza: la red neuronal	92
4.4. Desarrollo de una red neuronal artificial	94
4.4.1. Entrenamiento	94
4.4.2. Patrones: Características y transformaciones	95
4.4.3. La regla delta generalizada	97

4.4.4. Validación	100
4.4.5. Prueba	102
4.5. Capacidades de las redes neuronales artificiales	102
4.5.1. Clasificación	103
4.5.2. Representación gráfica	104
4.5.3. Modelado	104
4.5.4. Optimización	105
4.6. Problemas de las redes neuronales artificiales	107
4.7. Conclusiones	109
4.8. Referencias del Capítulo	110
 CAPÍTULO 5. Aplicaciones de las redes neuronales artificiales en química analítica: Extensión del rango de trabajo mediante redes neuronales artificiales para la determinación de cadmio por espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica	113
5.1. Resumen	113
5.2. Introducción	114
5.3. Experimental	116
5.3.1. Equipos, accesorios y paquetes computacionales	116
5.3.2. Reactivos y materiales	117
5.4. Procedimiento	117
5.4.1. Preparación de las soluciones de trabajo	117
5.4.2. Determinación de cadmio por GFAAS	119
5.4.3. Características de las redes neuronales	119
5.5. Resultados y discusiones	121
5.5.1. La curva de calibración de cadmio en GFAAS	121
5.5.2. Modelando la curva de calibración mediante redes neuronales	123
5.5.3. Determinación de cadmio en el material de referencia mediante GFAAS	127
5.6 Conclusiones	130

5.7. Referencias del Capítulo 5	131
---------------------------------	-----

CAPITULO 6. Aplicaciones de las redes neuronales artificiales en química analítica: Clasificación de bebidas espirituosas venezolanas en base a las concentraciones de cinc, cobre y hierro, mediante redes neuronales artificiales y análisis discriminante	134
6.1. Resumen	134
6.2. Introducción	135
6.3. Datos	137
6.4. Herramientas de análisis	139
6.4.1. Análisis discriminante	139
6.4.2. Redes neurona les artificiales	140
6.5. Resultados y discusiones	142
6.5. Conclusiones	148
6.6. Referencias del Capítulo 6	149

PARTE III. Publicaciones	152
--------------------------	-----

Publicación I.

Evaluation of ammonia as diluent for serum sample preparation and determination of selenium by graphite furnace atomic absorption spectrometry.

Edwin A. Hernández-Caraballo, Marcela Burguera, José L. Burguera.

Spectrochimica Acta Part B 57 (2002) 2159-2165

Publicación II.

Classification of Venezuelan spirituous beverages by means of discriminant analysis and artificial neural networks based on their Zn, Cu and Fe concentrations.

Edwin A. Hernández-Caraballo, Rita Ma Ávila-Gómez, Tarcisio Capote, Francklin Rivas, Anna G. Pérez.

Talanta 60 (2003) 1259-1267

Publicación III.

Determination of cadmium in urine specimens by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a fast atomization program.

Edwin A. Hernández-Caraballo, Marcela Burguera, José L. Burguera.

Talanta 63 (2004) 419-425

Publicación IV.

Increasing the working calibration range by means of artificial neural networks for the determination of cadmium by graphite furnace atomic absorption spectrometry.

Edwin A. Hernández-Caraballo, Rita Ma Ávila Gómez, Francklin Rivas, Marcela Burguera, José L. Burguera.

Talanta 63 (2004) 425-431

www.bdigital.ula.ve

Índice de Tablas.

CAPÍTULO 1.

Tabla 1.1.

Programa de atomización para la determinación de selenio por GFAAS	10
--	----

CAPÍTULO 3.

Tabla 3.1.

Factores y niveles empleados en el diseño factorial fraccionado	63
---	----

Tabla 3.2.

Matriz del diseño experimental y respuestas empleadas en el desarrollo del programa rápido de atomización	64
---	----

Tabla 3.3.

Programas de atomización para la determinación de Cd por GFAAS	65
--	----

CAPÍTULO 4.

Tabla 4.1.

Funciones de transferencias y rangos de los datos de salida	90
---	----

CAPÍTULO 5.

Tabla 5.1.

Programa de atomización para la determinación de Cd por GFAAS ^(a)	118
--	-----

Tabla 5.2.

Determinación de Cd en el material de referencia "Trace Metals in Drinking Water" mediante GFAAS, empleando diferentes aproximaciones	128
---	-----

CAPÍTULO 6.

Tabla 6.1.

Clasificación y características de las muestras de cocuy	138
--	-----

Tabla 6.2.

Concentraciones de Zn, Cu y Fe encontrados en las muestras de Cocuy
provenientes de los estados Lara y Falcón 140

Tabla 6.3.

Variables y características de las redes neuronales en estudio 141

Tabla 6.4.

Porcentajes de estimación y de predicción de las diferentes técnicas
quimiométricas y de las redes neurales artificiales en la clasificación de las
muestras de cocuy 145

www.bdigital.ula.ve

Índice de Figuras.

CAPÍTULO 1.

Figura 1.1.

Efecto de la masa de paladio y de la temperatura de atomización sobre la absorbancia integrada de Se (a,b) y la relación altura:área (a',b') para un patrón acuoso (1.0 ng Se) y para una muestra de suero diluida 1:5 (1% NH₄OH), respectivamente

14

Figura 1.2.

Efecto de la masa de paladio y de nitrato de magnesio sobre la absorbancia integrada de Se (a,b) y la relación altura:área (a',b') para un patrón acuoso (1.0 ng Se) y para una muestra de suero diluida 1:5 (1% NH₄OH), respectivamente

15

Figura 1.3.

Efecto del aumento de la masa de Mg(NO₃)₂ en las señales atómica y del fondo para una muestra de suero en presencia de 10 µg de Pd: (♦) absorbancia integrada del Se; (•) altura de pico de la señal de Se; y, (▲) absorbancia integrada del fondo

18

Figura 1.4.

Efecto del HNO₃ con (□) y sin (■) homogenización, y del NH₄OH (♦) sobre la sensibilidad de las mediciones de selenio total en una muestra de suero diluida 1:5 (Ver el texto para más detalles)

20

Figura 1.5.

Efecto del diluyente sobre la estabilidad a largo plazo de la señal analítica de selenio en una muestra diluida (1:5) de suero: (•) 1% NH₄OH + 0.05% Triton X-100[®] y, (▲) (6.0% HNO₃ + 0.05% Triton X-100[®]). La flecha indica el punto en el cual la muestra fue homogeneizada previamente

21

CAPÍTULO 2.

Figura 2.1.

Esquema de un programa rápido (PRA) y un programa convencional (PCA) de atomización mostrando algunas de las etapas de tratamiento térmico más comunes: (a) Secado; (b) pirólisis; (c) enfriamiento previo a la atomización; (d) atomización; (e) limpieza, y (f) enfriamiento

31

CAPÍTULO 3.

Figura 3.1.

Curvas de pirólisis y de atomización para (▲) un patrón acuoso de cadmio (0.02 ng), y (■) una muestra diluida (1:1) de orina dopada con 0.02 ng de Cd. (●) Absorbancia no específica de una muestra diluida (1:1) de orina

67

Figura 3.2.

Efecto de la temperatura de atomización en los perfiles de la señal atómica (líneas sólidas) y del fondo (líneas punteadas) para una muestra diluida (1:1) de orina dopada con 0.02 ng de Cd. (a) 1200 °C; (b) 1300 °C; (c) 1400 °C; (d) 1600 °C. Las flechas indican una ligera distorsión de la señal analítica

68

Figura 3.3.

Efecto de la temperatura de pirólisis y del ácido nítrico en la señal de fondo para una solución de orina diluida (1:1)

70

Figura 3.4.

Comparación de las pendientes de la técnica de calibración estándar (TCE) y de la técnica de adición de estándar (T AE) en la determinación de cadmio mediante GF AAS empleando programas convencionales y rápidos de atomización. Las líneas punteadas representan los límites inferiores de tolerancia aceptables

71

Figura 3.5.

Gráficos de Pareto para (a,b) un patrón acuoso (0.02 ng de Cd); y, (c,d) una solución de orina diluida (1:1) y dopada con 0.02 ng de Cd. Los diagramas a

la izquierda corresponden al análisis basado en la absorbancia integrada; en tanto los de la derecha corresponden a aquellos empleando la relación altura:área de la señal analítica. Las líneas discontinuas indican la probabilidad de que un factor sea considerado como estadísticamente significativo ($\alpha = 0.1$)

Figura 3.6.

Efecto del tiempo de corrección de la línea base sobre el límite de detección metodológico

Figura 3.7.

Ensayo de resistencia de un atomizador de calentamiento transversal empleando un programa rápido de atomización. Cada punto representa el promedio de veinte (20) medidas consecutivas

CAPÍTULO 4.

Figura 4.1.

Diagrama simplificado de una neurona biológica (a), y de una artificial (b), con sus principales similitudes

Figura 4.2.

Función de transferencia sigmoideal. El ajuste de los pesos durante la etapa de entrenamiento permite establecer las relaciones adecuadas (lineales o no lineales) entre los datos de salida (Y_i) y los de entrada (Z_i)

Figura 4.3.

Diagrama simplificado de una red neuronal artificial de tipo cascada. Los datos introducidos por el usuario "fluyen" exclusivamente desde la capa de entrada hacia la capa de salida. La corrección de los pesos al emplear el algoritmo de retro-propagación se lleva a cabo en la dirección contraria (de allí el nombre del algoritmo)

Figura 4.4.

La regla delta generalizada puede ser implementada en arquitecturas con conexión: (a) total, (b) parcial (las neuronas en blanco no reciben

información de todas las neuronas), o (c) entre capas no consecutivas (línea gruesa) 97

Figura 4.5.

El problema de la búsqueda del mínimo global en el espacio de soluciones:
(a) Sin la selección adecuada de la tasa de aprendizaje y/o el factor de momento la red puede demorarse mucho en reducir el ECM, o puede quedar atorada en un mínimo local. (b) El uso de dichas variables optimizadas permite solventar dichos problemas 99

Figura 4.6.

Variación del error cuadrático medio en función del número de iteraciones para un grupo de datos de entrenamiento (●) y uno de validación (○). Las flechas indican los puntos más importantes ha considerar para la selección del tiempo de entrenamiento de la red neuronal (ver texto para más detalles) 101

Figura 4.7.

La optimización mediante una red neuronal entrenada con el algoritmo de retropropagación no es un proceso "lógico", debido a que el procesamiento de datos se lleva a cabo de forma unidireccional 106

CAPÍTULO 5.

Figura 5.1.

Variación de la señal analítica del cadmio (absorbancia integrada) en función de la concentración. La línea representa un ajuste polinómico de segundo orden. El gráfico inserto muestra el rango dinámico lineal 122

Figura 5.2.

Error cuadrático medio para el grupo de datos (patrones) de entrenamiento (▲) y uno de validación (●) para la red neuronal del tipo (1 :2:1) 125

Figura 5.3.

Comparación entre la concentración de cadmio predicha por la red (1:2:1) y la concentración nominal para un grupo de soluciones a lo largo del intervalo 126

de trabajo

CAPÍTULO 6.

Figura 6.1.

Diagrama de dispersión de las muestras de cocuy basado en las dos primeras funciones discriminantes lineales. Grupos: ($\diamond$) SP, ($\square$) SS, ($\circ$) UP, y ($\triangle$) US. Los símbolos negros corresponden a los centroides de los grupos en cuestión

143

Figura 6.2.

Error cuadrático medio para la red (3:5:7:4) empleando un grupo de datos de entrenamiento ($\bullet$), y uno de validación ($\circ$)

147

www.bdigital.ula.ve

Parte I

Desarrollo de métodos para el análisis de especímenes biológicos mediante espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica

www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

CAPITULO 1. Evaluación del hidróxido de amonio como diluyente para la preparación de especímenes de suero sanguíneo y la posterior determinación de selenio total mediante espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito.◇

1.1. Resumen.

Se desarrolló un método para la determinación de selenio total en especímenes de suero sanguíneo mediante espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica. El mismo involucró la dilución del suero (1:5) empleando una solución de 1% NH_4OH + 0.05% Triton X-100®, su introducción directa en un atomizador de grafito calentado transversalmente, y el empleo de un modificador químico mixto de paladio + nitrato de magnesio. La optimización de la temperatura de atomización y de la composición del modificador químico fue llevada a cabo simultáneamente mediante el uso de superficies de respuesta, con el objeto de minimizar los problemas asociados a la sobre-estabilización del analito. En base a ello se consideró una temperatura de atomización de 2100 °C y una masa del modificador de 10 μg Pd + 3 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como un buen compromiso en términos de sensibilidad de las mediciones, perfil de la señal analítica y estabilidad térmica. Bajo dichas condiciones se obtuvo una masa característica de 48.8 μg y un límite de detección (3s) de 6.1 ng ml^{-1} Se, correspondiente a 30.5 ng ml^{-1} Se en el espécimen de suero si se toma en cuenta el factor de dilución. La calibración se condujo mediante la técnica de adición de estándares. La exactitud fue evaluada a través de la determinación de selenio total en el material estándar de referencia "Seronorm™ Trace Elements Serum Batch 116" (Nycomed Pharma AS). El método fue aplicado a la determinación de selenio total en una muestra de suero sanguíneo tomada de diez (10) voluntarios sin afecciones físicas conocidas. La concentración de selenio varió entre 78.6 y 147.2 ng ml^{-1} , con un valor promedio de $113.6 \pm 21.8 \text{ ng ml}^{-1}$.

◇ Este trabajo fue presentado en el Seventh Rio Symposium on Atomic Spectroscopy (Florianópolis, Brasil, 2002), y publicado en el Número Especial de Spectrochimica Acta Part B dedicado a dicho evento [E. A. Hernández-Caraballo, M. Burguesa, J. L. Burguesa, Spectrochim. Acta Part B 57 (2002) 2159-2165].

1.2. Introducción.

El selenio desempeña un rol importante en numerosas reacciones metabólicas que tienen lugar en los organismos vivos [1]. Por ejemplo, el mismo es un componente de la enzima glutatión-peroxidasa, la cual está involucrada en la prevención del ataque celular por parte de peróxidos y radicales libres. La deficiencia de selenio es causal de las enfermedades Keshan y Kaschin-Beck. La primera es una forma de cardiopatía, en tanto que la segunda resulta en una atrofia de los huesos de las extremidades [1]. Por otra parte, el selenio es capaz, entre otras cosas, de sustituir al azufre en aquellas moléculas en las que éste es un componente fundamental. Evidentemente, al modificar la estructura química original de las mismas afecta negativamente las funciones para las cuales están diseñadas [2]. Debido entonces a esta capacidad dual del selenio se hacen necesarias técnicas analíticas que permitan el monitoreo de la concentración de este elemento en especímenes de interés clínico, tales como tejidos y fluidos biológicos.

La espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito (GF AAS, que corresponde a las siglas del nombre en inglés) se destaca entre las variadas técnicas disponibles para el análisis de especímenes biológicos. Esto se desprende de su alta sensibilidad, bajo consumo de soluciones, mínimos requerimientos en lo que concierne a la preparación de los especímenes, y una alta robustez ante posibles interferencias ocasionadas por los componentes de la matriz [3]. Sin embargo, y a pesar de las ventajas intrínsecas de la técnica, la determinación de selenio todavía adolece de interferencias físico-químicas importantes, y en particular en especímenes biológicos como la orina, el suero sanguíneo, la sangre completa, etc. La experiencia acumulada durante varios años por grupos independientes en todo el mundo ha mostrado que, afortunadamente, dichos problemas pueden ser minimizados hasta cierto punto mediante la aplicación estricta del concepto STPF (Stabilized Temperature Platform Furnace) desarrollado a principios de la década de 1980 por Slavin et al. [4].

El selenio es removido del atomizador a bajas temperaturas de pirólisis ($> 200^{\circ}\text{C}$), bajo la forma de diversas especies moleculares cuyas naturalezas dependen de la composición de la atmósfera dentro del atomizador, del tipo de grafito del cual esté hecha la superficie de deposición, etc.[5-7]. En este sentido, la modificación química resulta mandatoria, con el objeto de incrementar la estabilidad térmica del analito y prevenir así dichas pérdidas. El níquel fue propuesto inicialmente por Ediger, cuando el término "modificador de matriz" fue acuñado originalmente [8]. Si bien fue empleado con mucha frecuencia en los años que le siguieron [9], se probó posteriormente que el comportamiento electrotérmico de las distintas especies de selenio varía significativamente en su presencia [10,11], a pesar de ser capaz de reducir algunas interferencias tan bien como otros modificadores químicos [12,13]. Aparte del níquel, se han evaluado una amplia variedad de modificadores simples y mixtos, entre los cuales caben mencionar: Cu + Mg [10,14,15], Pd + Mg [11,15-17], Pd + Cu [18], Pd + ácido ascórbico [19], paladio coloidal [20], y otros metales del grupo del platino [13].

Otra fuente importante de interferencias usualmente observadas en la determinación de selenio por GFAAS son las causadas por el hierro y por los fosfatos, los cuales son componentes regulares de los especímenes biológicas/ambientales. La estructura compleja de los espectros de dichos concomitantes es responsable de la sobre-compensación de la señal analítica, fenómeno este que es particularmente marcado cuando se emplean correctores de fondo de fuente continua [21,22]. Si bien es cierto que los correctores de fondo basados en el efecto Zeeman pueden reducir de manera importante dicha interferencia [23,24], ello no quiere decir que los mismos son una panacea, por lo que es aún fundamental la selección cuidadosa de las diversas condiciones analíticas e instrumentales para la determinación exacta y precisa de selenio por GF AAS. Becker-Ross et al. desarrollaron un corrector de fondo de fuente continua que, acoplado a un detector de estado sólido, permite la obtención simultánea de toda la información espectral, tanto del analito como de las especies moleculares presentes en el atomizador [25]. El procesamiento matemático

posterior de dicha información permite la eliminación de las interferencias observadas usualmente en el análisis de orina. El sistema en cuestión, hasta donde alcanza el conocimiento de este autor, no se encuentra disponible comercialmente, por lo que los investigadores aún tienen que lidiar con los problemas mencionados de otras maneras.

El propósito del presente trabajo es la evaluación del NH_4OH como diluyente en la preparación de especímenes de suero sanguíneo para la posterior determinación de selenio total por GFAAS. El NH_4OH será evaluado como diluyente, y su desempeño comparado con el del ácido nítrico, más comúnmente empleado con este fin. Adicionalmente se estudiará la aplicación del paladio y de la mezcla paladio + nitrato de magnesio como modificadores químicos. Se recurrirá a la generación de superficies de respuesta para la exploración rápida del efecto de las masas del modificador y de la temperatura de atomización sobre la sensibilidad de las mediciones y el perfil de la señal analítica. La exactitud del método se llevará a cabo mediante la determinación de selenio total en el material de referencia "Seronorm™ Trace Elements Serum Batch 116" (Nycomed Pharma AS). Finalmente, se aplicará el método desarrollado para determinar la concentración de dicho elemento en suero de individuos sin ninguna afección física conocida. Es importante destacar que el presente trabajo no está diseñado con propósitos clínicos, sino más bien como la evaluación de un método alternativo de preparación del tipo de espécimen ya mencionado.

1.3. Experimental.

1.3.1. Equipos, accesorios y paquetes computacionales.

Se utilizó un espectrómetro de absorción atómica marca Perkin-Elmer, modelo 4100ZL, equipado con una unidad de calentamiento electrotérmico, un sistema de corrección de fondo basado en el efecto Zeeman, y un auto-muestreador modelo AS-71. Se emplearon atomizadores electrotérmicos calentados transversalmente, los cuales están provistos de plataformas de grafito integradas. Los mismos fueron acondicionados térmicamente previo a su uso,

siguiendo las instrucciones del fabricante [26]. Se usó una lámpara de descarga sin electrodos (EDL System 2) alimentada por una unidad de radiofrecuencia externa, a la longitud de onda del selenio (196.0 nm).

Se empleó una centrífuga marca Clay Adamás, modelo DYNAC II, para la separación del suero de los especímenes de sangre completa. Un agitador tipo "vortex" marca Heindolph, modelo Reax 1, fue empleado para la homogeneización de las soluciones de trabajo. Se utilizaron micropipetas marca Socorex (volumen variable: 100-1000 μ l) con puntas desechables de plástico (La Fontaine) para la preparación de las soluciones de trabajo.

El procesamiento estadístico de los datos, así como la generación de las curvas 3D fueron llevados a cabo empleando Microsoft® EXCEL 2002 para Windows ME (Microsoft Corp.) y Microcal™ Origin 6.0® (Microcal Software, Inc.).

1.3.2. Reactivos y materiales.

Se empleó selenito de sodio (Aldrich, 99% pureza) en la preparación de los estándares de selenio. Se usó una solución patrón para absorción atómica de 1000 μ g ml⁻¹ Pd (Acros Organics) para la preparación de la solución del modificador químico. Se utilizó ácido nítrico concentrado (Alfa Aesar, 99.999 %, metals basis), y solución concentrada de hidróxido de amonio (Prolabo Venezolana, pro análisis), para la preparación-estabilización de los patrones y de los especímenes de suero. Se usó Triton X-100® (Sigma) con el objeto de modificar la viscosidad natural de los especímenes de suero. La evaluación de la exactitud del método se llevó a cabo utilizando el material de referencia "Seronorrn™ Trace Elements Serum Batch 116" (Nycomed Pharma AS). En todos los casos se usó agua destilada y des-ionizada (Milipore), con una resistencia de 18 M Ω cm⁻¹, en la preparación de las soluciones correspondientes. Todo el material de plástico y/o vidrio empleado fue lavado por inmersión en HNO₃ (10%) durante al menos 12 horas, y posteriormente enjuagado con agua destilada y desionizada (DDI) y secado al aire protegido de posibles fuentes de contaminación aérea.

1.3.3. Muestreo.

Se recogieron diez (10) especímenes de sangre completa entre voluntarios del laboratorio quienes no se encontraban bajo ninguna medicación ni sufrían desórdenes físicos conocidos. La sangre se tomó mediante punción en la vena del antebrazo derecho. Los especímenes fueron centrifugados por 20 minutos a 2300 rpm, y el suero fue cuidadosamente removido con una micropipeta. La separación del suero de los eritrocitos en esta etapa debe ser llevada a cabo de manera cuidadosa, por cuanto es bien sabido que estos últimos contienen una concentración significativa de selenio [27,28]. La ejecución inadecuada de este procedimiento puede conducir a la obtención de resultados erróneos (más elevados). Las fracciones de suero así recogidas fueron transferidas a tubos de ensayo con tapas, previamente lavados, y posteriormente refrigeradas a 4 °C hasta el momento de su análisis.

1.4. Procedimiento.

1.4.1. Preparación de las soluciones de trabajo.

Es importante mencionar que algunos especímenes biológicos, p.ej., la sangre completa, el suero sanguíneo, etc., pueden ser considerados como una amenaza potencial para la salud, y en consecuencia deben ser manipulados como tales. Ello se deriva del hecho que los mismos pueden contener agentes patógenos que pueden pasar a la atmósfera y ser aspirados por el analista al abrir los recipientes que las contienen [29]. Por esa razón, todos los especímenes de suero fueron manipulados en una campana de laboratorio. De esta forma también se contribuye a reducir la contaminación de los mismos, aun cuando cabe esperar que la misma no sea muy importante en este caso en particular [3].

Se permitió que los especímenes alcanzaran la temperatura ambiental de manera natural antes de cualquier operación. Seguidamente, los mismos fueron homogeneizados en un mezclador tipo vortex por aproximadamente 30 s. Se diluyeron los especímenes de suero 1:5 directamente en los viales del automuestreador ($V = 1$ ml) con una solución de $1\% \text{ } ^\text{v}/\text{v}$ NH_4OH + $0.05\% \text{ } ^\text{w}/\text{v}$ Triton

X-100[®], ó 0.5%^{v/v} HNO₃ + 0.05%^{w/v} Triton X-100[®]. La mezcla fue bombeada repetidamente con la misma micropipeta con el objeto de asegurar la homogenización total de la solución resultante. Las soluciones acuosas de selenio fueron preparadas mediante la dilución apropiada de una solución madre de 1000 µg ml⁻¹ Se, empleando los diluyentes mencionados previamente. La preparación de los patrones para la adición de estándares se realizó añadiendo 200 µl del espécimen de suero directamente en los viales del automuestreador, y completando el volumen final con 800 µl de uno de los diluyentes mencionados previamente conteniendo 10, 25 y 50 ng ml⁻¹ Se. En todos los casos se dispensó el diluyente en primer lugar, seguido de la alíquota del espécimen correspondiente. El material de referencia "Seronorrn[™] Trace Elements Serum Batch 116" fue reconstituido siguiendo las instrucciones del fabricante [30], y preparado para su análisis de la misma manera que los especímenes "reales".

1.4.2. Determinación de selenio mediante GFAAS.

La determinación de selenio en los especímenes de suero se llevó a cabo empleando el programa de atomización que se muestra en la Tabla I. Las temperaturas que se reportan a lo largo del trabajo corresponden a los valores nominales dados por el programa con el que se controla al espectrómetro. Alíquotas de las soluciones de trabajo (10 µl) fueron inyectadas en un atomizador pre-calentado a 60°C con el objeto de reducir la dispersión de sobre la superficie de deposición (plataforma de grafito), y aumentar así la repetibilidad de las mediciones. Con ese mismo propósito se posicionó cuidadosamente la punta del capilar del auto-muestreador cerca de la superficie de la plataforma integrada, y las soluciones fueron inyectadas a una velocidad del 50%, de forma de minimizar la formación de burbujas durante la deposición de las mismas.

Tabla 1.1. Programa de atomización para la determinación de selenio por GFAAS.^(a)

Etapa	Temp. (°C)	Rampa(s)	Duración (s)
Inyección de la solución de modificador	-----	-----	-----
Secado 1	110	5	10
Secado 2	130	10	20
Reducción	1000	10	10
Inyección de la solución de patrón/suero	-----	-----	-----
Secado 1	110	5	15
Secado 2	130	10	20
Pirólisis	1200	10	20
Enfriamiento	50	1	5
Atomización	2100	0	4 (Lectura)
Limpieza	2500	1	3

^(a) Temperatura de inyección: 60 °C; velocidad de inyección: 50 %; flujo del gas de purga: 250 ml min⁻¹ en todas las etapas excepto durante la atomización (modo flujo interrumpido).

Finalmente, se llevó a cabo la cuantificación de la concentración del analito mediante la técnica de adición de estándares, usando el área de la señal analítica (A_i) con dicho propósito. En algunos casos, sin embargo, se empleó la relación altura/área de la señal analítica (A_h/A_i) con algunos propósitos específicos que se discutirán en su debido momento. Los valores reportados a lo largo del trabajo corresponden al promedio de tres (3) a cinco (5) mediciones realizadas consecutivamente.

1.5. Resultados y discusiones.

1.5.1. Selección de las condiciones del programa de atomización y de la composición del modificador químico.

Ensayos preliminares mostraron que la adición del modificador (Pd) junto con el patrón o el espécimen resultaba en una baja sensibilidad de las mediciones. Lo anterior se reflejaba en una masa característica mayor (ca. 70 pg) a la reportada en la literatura (45 pg) [26]. Posteriormente se encontró que el modificador está preparado en una solución de HCL al 5 %^{v/v}. Es bien sabido que la generación de la forma activa del paladio (Pd metálico) puede verse disminuida en un medio contentivo de cloruros [15]. Ello conduce a una reducción de su capacidad para estabilizar térmicamente al analito, con las consecuentes pérdidas por volatilización de este último. Por otra parte, también existe la posibilidad que, en el medio en cuestión, se promueva la volatilización del cloruro de selenio en las distintas etapas del programa de atomización [12,13,20]. El problema anteriormente mencionado fue resuelto mediante la inclusión de una etapa de reducción del modificador a 1000 °C previo a la introducción del patrón o del espécimen de forma de, al mismo tiempo, promover la formación del paladio metálico y aumentar su eficiencia, y eliminar al agente interferente (cloruro). Esta modificación del programa permitió la obtención de una masa característica cercana al valor esperado (48.8 pg).

Usualmente, la selección de la temperatura de atomización y la composición del modificador químico (componentes y concentración) se lleva a cabo estudiando una de dichas variables a la vez, mientras se mantienen las otras fijas. En nuestra opinión, dicha aproximación no es la más adecuada, ya que no considera las relaciones intrínsecas que pueden existir entre las mismas. Tal es el caso, por ejemplo, de la masa de modificador y la temperatura de atomización. En este sentido, es bien sabido que el empleo de masas elevadas del modificador pueden conducir a la sobre-estabilización del analito si la energía provista por el atomizador (temperatura de atomización) es insuficiente para favorecer la atomización total del mismo [31].

En un intento por salvar el problema mencionado, se evaluó una aproximación basada en la variación simultánea de la temperatura de atomización (2000, 2100 y 2200 °C) y la masa del modificador químico (5, 10 y 15 µg), y la construcción de superficies de respuesta. Los rangos de trabajo de dichas variables fueron escogidos en base a ensayos preliminares, con el objeto de conseguir perfiles de atomización que pudiesen ser integrados completamente durante la etapa de atomización (4 s), con una buena sensibilidad de las mediciones, al tiempo de proveer al analito de la estabilidad térmica necesaria para su determinación en los especímenes de suero.

La Figura 1.1 muestra el efecto de la variación de dichas variables sobre la absorbancia integrada y sobre la relación A_h/A_i para un patrón acuoso de selenio (1.0 ng Se) y un espécimen de suero diluido 1:5, ambos en una solución de 1.0% NH_4OH + 0.05% Triton X-100®. La relación A_h/A_i da una indicación del perfil de la señal analítica. A través del estudio de estas dos variables de respuesta (A_i y A_h/A_i), no sólo es posible lograr una buena sensibilidad, sino también un perfil analítico adecuado.

En la Figura 1.1(a) se puede apreciar cómo varía la sensibilidad de las mediciones de selenio, en una solución acuosa, con respecto a la masa del modificador. A una temperatura de atomización fija no es posible apreciar variaciones significativas en dicha variable; sin embargo, los perfiles de atomización sí se ven afectados [ver Figura 1.1(a')], tomándose más anchos a medida que aumenta la masa del modificador. Al aumentar la temperatura de atomización de 2000 a 2200 °c se consigue mejorar el perfil de la señal, aunque a expensas de la sensibilidad, esto último debido a un incremento de las pérdidas del analito por difusión.

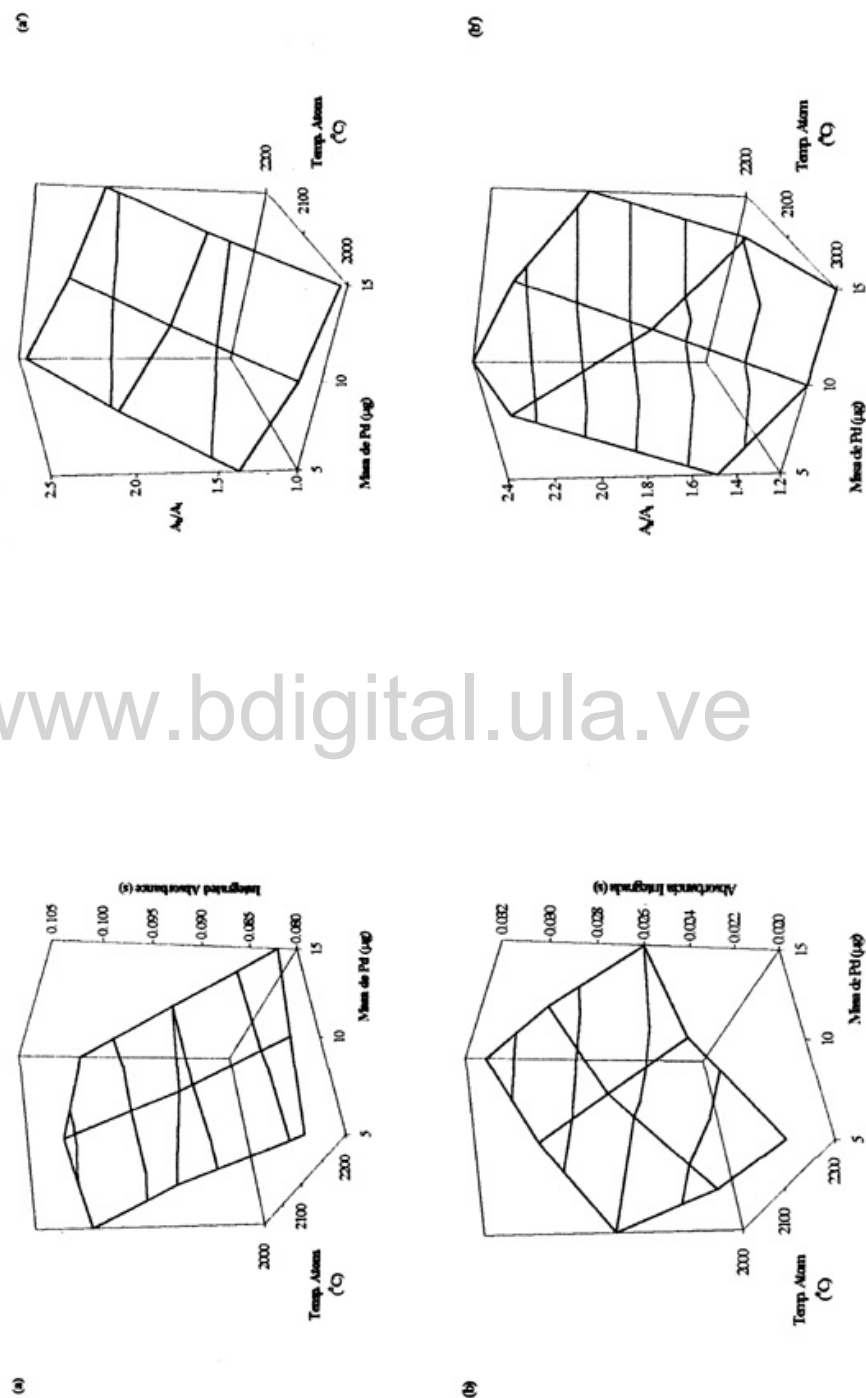
Aumentar la masa de modificador en el rango de estudio, en el caso de la solución de suero, conduce a un aumento en la sensibilidad de las mediciones, como se aprecia en la Fig. 1.1(b). Lo anterior se ve reflejado en un achatamiento de los perfiles analíticos. En base a las observaciones realizadas a partir de los gráficos 3D se escogieron una temperatura de atomización de 2100 °C y una

masa de modificador de 10 μg Pd como un buen compromiso entre la sensibilidad de las señales y el perfil de las mismas. Desde que fue propuesto por Schlemmer y Welz [32], la mezcla Pd + $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (el "modificador universal") ha ganado amplia aceptación como modificador químico. Por esta razón, resulta lógico su estudio dentro del marco del presente trabajo. El desempeño del nitrato de magnesio no fue evaluado de manera independiente, como en el caso del paladio, debido a que el mismo ha sido empleado principalmente como un componente secundario en dicha mezcla. La masa de cada modificador fue variada simultáneamente, y se obtuvieron las superficies de respuesta correspondientes (Figura 1.2) [33,34].

Algunas diferencias en el comportamiento electrotérmico de selenio en el patrón acuoso y en la solución de suero pudieron ser observadas al incluir al nitrato de magnesio en la composición del modificador químico. En lo que concierne al patrón acuoso [ver Figura 1.2(a)], se alcanzó una sensibilidad máxima en presencia de 10 μg de Pd. Una masa menor (5 μg) podría no estar proporcionando la suficiente estabilidad térmica, por lo cual tendrían lugar pérdidas parciales del analito, efecto éste que traería como consecuencia una menor sensibilidad en las mediciones. Por otra parte, una masa mayor (15 μg) podría estar causando una sobre-estabilización del analito a la temperatura de atomización de trabajo (2100 $^{\circ}\text{C}$). La mayor sensibilidad de las mediciones se obtuvo en presencia de 3 μg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$.

Contrario a lo que ocurre con el patrón acuoso, en el caso del espécimen de suero resulta fundamental aumentar la masa de paladio para alcanzar la máxima sensibilidad. Más aún, lo anterior no conduce a una sobre-estabilización de la señal analítica como ocurrió en el caso de la solución acuosa. Lo dicho previamente puede ser explicado considerando que, en este caso, la acción del modificador se ve afectada negativamente, bien sea debido a que parte del mismo puede estar estabilizando térmicamente a otros elementos, o que la acción de aquel se ve minimizada por los otros componentes de la matriz. Una vez más, aunque resulta tentador utilizar masas altas de modificador, la relación A_h/A_i

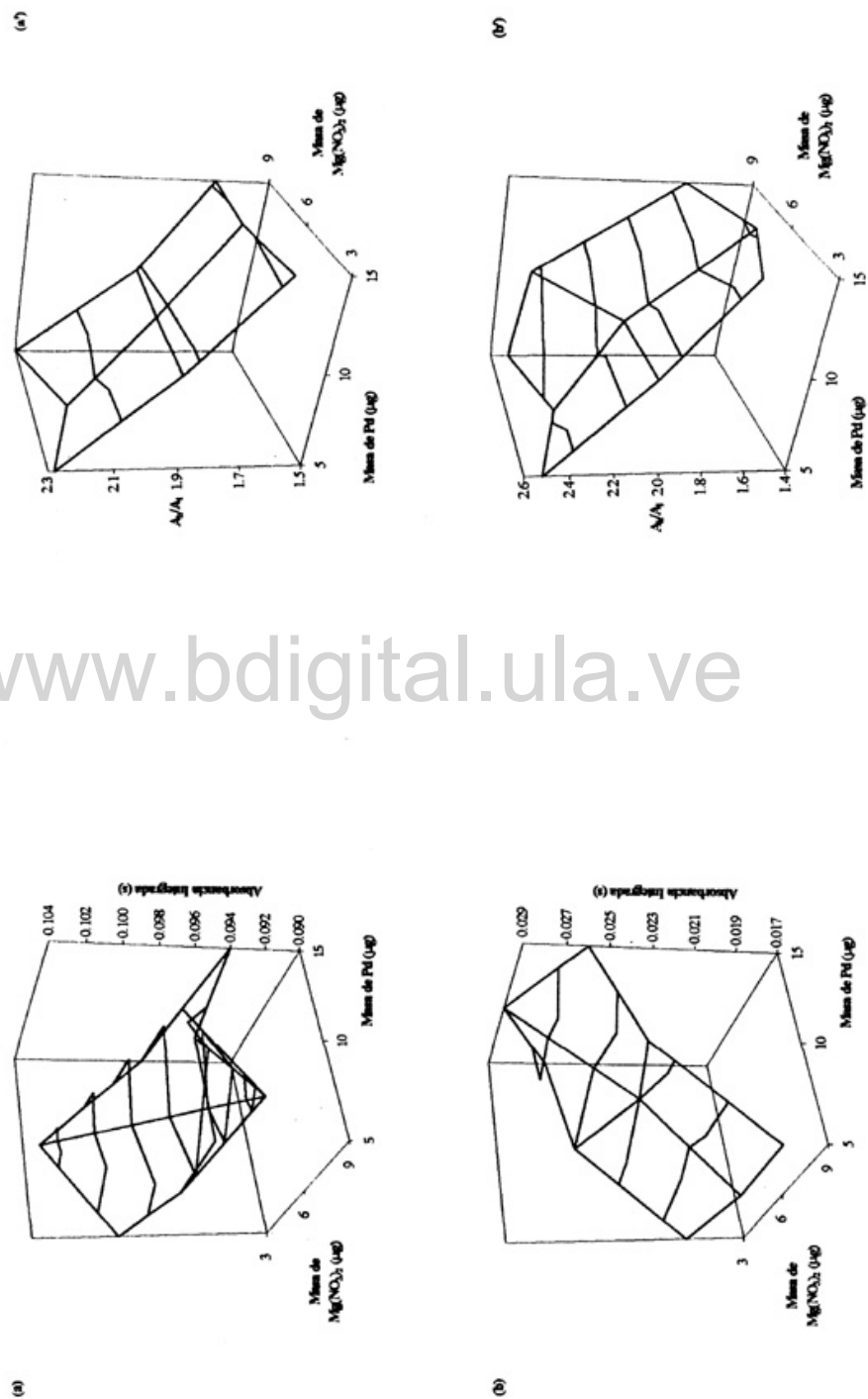
Figura 1.1. Efecto de la masa de paladio y de la temperatura de atomización sobre la absorbancia integrada de Se (a,b) y la relación altura:área (a',b') para un patrón acuoso (1.0 ng Se) y para un espécimen de suero diluido 1:5 (1% NH_4OH), respectivamente.



www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

Figura 1.2. Efecto de la masa de paladio y de nitrato de magnesio sobre la absorbancia integrada de Se (a,b) y la relación altura:área (a',b') para un patrón acuoso (1.0 ng Se) y para un espécimen de suero diluido 1:5 (1% NH_4OH), respectivamente.



www.bdigital.ula.ve

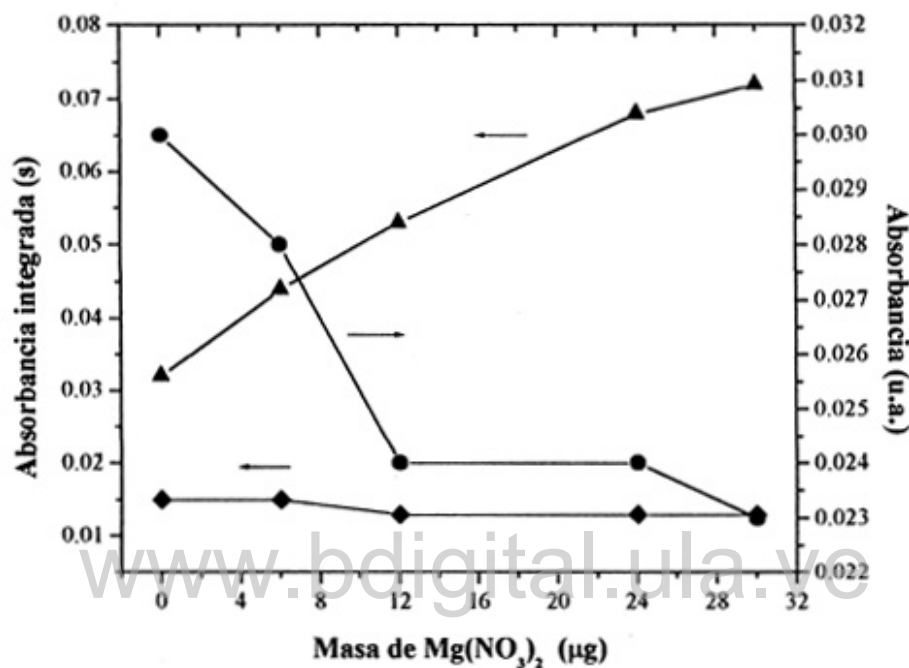
C.C.Reconocimiento

muestra que ello resulta en perfiles analíticos anchos [ver figuras 1.2(a') y 1.2(b')]. La adición de nitrato de magnesio no parece aportar ningún beneficio importante en términos de la sensibilidad de las mediciones. Sin embargo, los perfiles de atomización son ligeramente más estrechos en su presencia, y por lo tanto dicho componente fue incorporado en la composición final del modificador.

Diversos investigadores han encontrado que el nitrato de magnesio juega un papel importante en la distribución y en la morfología de las partículas de paladio depositadas sobre la superficie de grafito (plataforma o pared) después de las etapas de secado y/o pirólisis [35,36]. De hecho, se cree que más que la masa del modificador, es el tamaño de partícula el que determina, en gran medida, el desempeño de éste [37,38]. Adicionalmente, aunque ciertamente relacionado con la observación anterior, el nitrato de magnesio contribuye a aumentar la exactitud de los análisis en el caso de algunos especímenes reales [15,33]. Basado en lo dicho previamente, se llevó a cabo un estudio adicional para determinar el efecto de la masa de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (0-30 μg) sobre la determinación de selenio.

La Figura 1.3 muestra que, para un espécimen diluido (1:5) de suero, no hay variaciones significativas de la absorbancia integrada en el rango estudiado. Por el contrario, la altura de pico de la señal analítica disminuye a medida que la concentración de nitrato de magnesio aumenta, es decir, que los perfiles se van achatando progresivamente ("sobre-estabilización"). Más aún, la absorbancia no específica aumenta linealmente con la masa de nitrato de magnesio, tal y como lo han reportado otros investigadores [39], aunque el fondo puede ser corregido fácilmente por el corrector basado en el efecto Zeeman. Lo anterior muestra que la adición de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ no parece traer consigo ningún beneficio importante, aparte de un efecto menor sobre los perfiles de atomización del selenio. En base a los resultados presentados a lo largo de esta sección se escogió definitivamente la mezcla de 10 μg Pd + 3 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador químico para los ensayos que siguen a continuación.

Figura 1.3. Efecto del aumento de la masa de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ en las señales atómica y del fondo para un espécimen de suero en presencia de 10 μg de Pd: (◆) absorbancia integrada del Se; (●) altura de pico de la señal de Se; y, (▲) absorbancia integrada del fondo.



Finalmente, resulta conveniente destacar que la optimización de los programas de atomización en GFAAS se ha llevado a cabo de diversas maneras [40-43] sin embargo, el empleo de las superficies de respuesta, tal y como se ha mostrado en esta sección, representa una alternativa simple para dicho fin, una vez que el analista posee un conocimiento previo del sistema a optimizar.

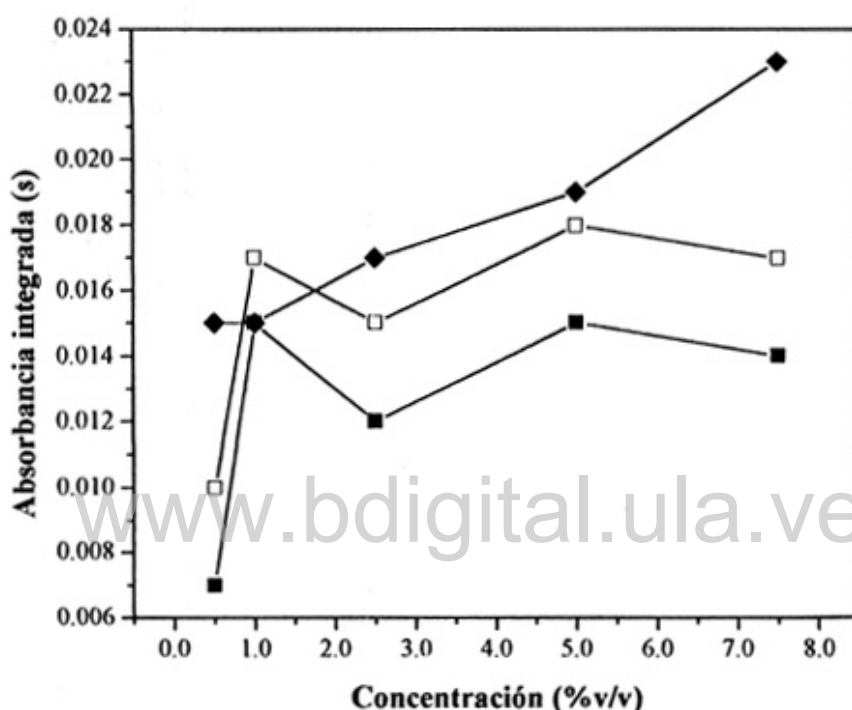
1.5.2. Determinación de la composición de la solución diluyente.

El uso del NH_4OH como diluyente fue descrito por Subramanian como una alternativa en la preparación de materiales biológicos para su análisis por técnicas espectroscópicas [44]. A pesar de que el mismo ha hallado cierta acogida en algunas metodologías basadas en espectroscopía de masas con plasma

inductivamente acoplado [45,46], no ha resultado así en el caso de GFAAS [47]. La Figura 1.4 muestra el efecto del aumento en la concentración de amoníaco (0.5-7.5%) en la sensibilidad de las mediciones de selenio en un espécimen de suero diluido 1:5. Los blancos fueron significativos a concentraciones $\geq 7.5\%$. Por ejemplo, a una concentración de 7.5% NH_4OH el blanco resultante es equivalente a 0.013 s, en tanto que para una solución de 1.0% NH_4OH es de aproximadamente 0.002 s. Este último es comparable al que se obtiene con el ácido nítrico de más alta pureza disponible, y el más costoso, lo cual debería redundar positivamente en una reducción de los costos de análisis. Los estudios que siguen a continuación se llevaron a cabo empleando exclusivamente una solución de 1.0 % NH_4OH .

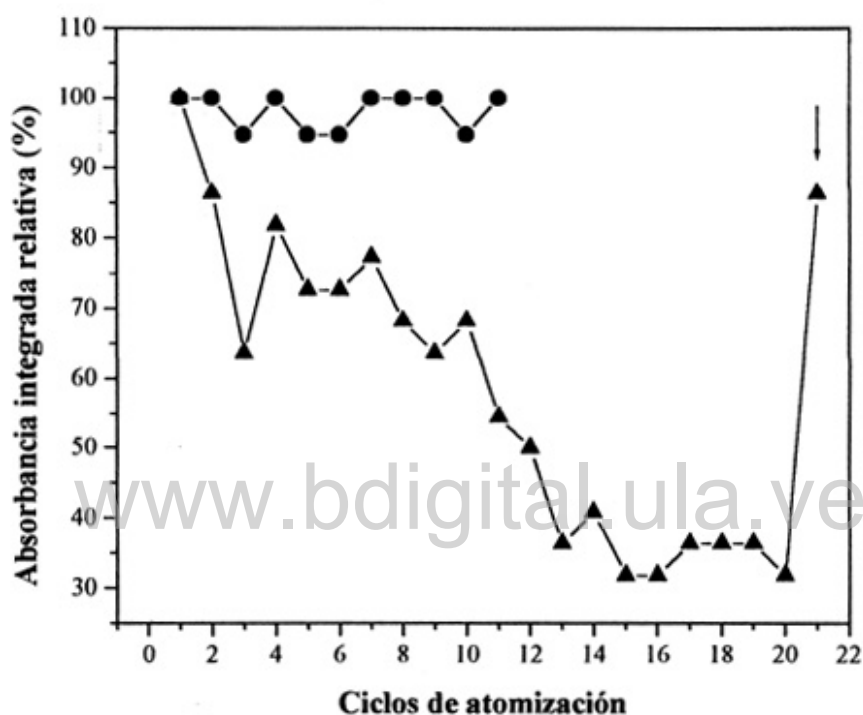
Cuando se emplea ácido nítrico (0.2-0.5%) como diluyente se observa un incremento en la sensibilidad de las mediciones, en tanto que la misma permanece prácticamente constante en el rango de concentraciones comprendido entre 0.5 y 6.0 %. Concentraciones de ácido superiores a ésta no fueron consideradas con el objeto de evitar el deterioro acelerado del atomizador. Es importante destacar que a concentraciones $\geq 1.0\%$ HNO_3 se obtenían soluciones "lechosas", y una eventual precipitación de las proteínas [20]. Dicho fenómeno afectaba de manera importante la repetibilidad de las mediciones. Por ejemplo, en tanto que ésta resultó aceptable para 0.5% HNO_3 (DER= 3.5%), se tomó inaceptable a 3.0% HNO_3 (RSD= 15.5%) y a 6.0% HNO_3 (RSD= 24.0%). Lo anterior puede ser explicado tomando en cuenta que el selenio se encuentra principalmente (95%) unido a las proteínas [48]. Evidentemente, a medida que estos compuestos precipitan, disminuye la concentración del analito en el sobrenadante, y en consecuencia la masa del mismo que es realmente dispensada en el atomizador. Si los especímenes de suero son homogeneizados justo antes de que la alícuota correspondiente sea introducida en el atomizador, se observa un incremento del 10% en la sensibilidad de las mediciones (ver Figura 1.4).

Figura 1.4. Efecto del HNO_3 , con ($\square$) y sin ($\blacksquare$) homogeneización, y del NH_4OH ($\blacklozenge$) sobre la sensibilidad de las mediciones de selenio total en un espécimen de suero diluido 1:5 (Ver el texto para más detalles)



La Figura 1.5 sirve para ilustrar aún más el efecto deletéreo que puede tener la adición de ácido nítrico sobre la estabilidad a largo plazo de la señal de selenio en un espécimen de suero sanguíneo. La precipitación de las proteínas que tiene lugar trae consigo una reducción subsecuente de la concentración del analito en el seno de la solución, situación que se refleja en la reducción progresiva de la sensibilidad de las mediciones. La homogeneización de los especímenes de suero y consecuente re-suspensión del material conduce a la recuperación de la señal prácticamente a su valor original. Muy por el contrario, la señal de selenio permanece constante (RSD= 2.7%) por al menos 11 medidas consecutivas cuando el suero sanguíneo es diluido en un medio amoniacal.

Figura 1.5 Efecto del diluyente sobre la estabilidad a largo plazo de la señal analítica de selenio en un espécimen diluido (1:5) de suero: (●) 1% NH_4OH + 0.05% Triton X-100[®]; y, (▲) 6.0% HNO_3 + 0.05% Triton X-100[®]. La flecha indica el punto en el cual la solución de suero sanguíneo fue homogeneizada previamente.



Sobre la base de los estudios hasta ahora conducidos se escogió una solución de 1.0% NH_4OH + 0.05% Triton X-100[®] para la preparación de los especímenes de suero. Bajo estas condiciones se obtuvieron las curvas de pirólisis para un patrón acuoso y para un espécimen de suero diluido, en presencia del modificador químico mixto de Pd + $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. Se encontró que en ambos casos se puede alcanzar una temperatura máxima de pirólisis de 1300 °C sin pérdidas del analito. Se escogió, sin embargo, una temperatura de 1200 °C para tomar en cuenta las posibles variaciones que experimenta la resistencia del

atomizador a medida que envejece. El programa de atomización óptimo para la determinación de selenio en suero sanguíneo se presenta en la Tabla 1.1.

1.5.3. Características analíticas de la metodología.

La comparación de las pendientes de las curvas de calibración acuosa y la adición de estándares mostró diferencias significativas, apuntando a una clara interferencia de matriz, aunque de origen desconocido. Este tipo de problema no ha podido ser resuelto satisfactoriamente cuando se trata del análisis de especímenes biológicos tales como orina, suero, etc. [49]. La razón yace en la dificultad de promover el mismo comportamiento electrotérmico de todas las especies de selenio (Se^{-2} , Se^{+4} y Se^{+6}) presentes en este tipo de especímenes. Debido a lo anterior, la cuantificación se llevó a cabo empleando la técnica de adición de estándares. El límite de detección (3s) fue de $6.1 \text{ ng ml}^{-1} \text{ Se}$ el cual, tomando en cuenta el factor de dilución, es equivalente a $30.5 \text{ ng ml}^{-1} \text{ Se}$ en el espécimen original. La determinación de selenio en el material de referencia "Seronorm™ Trace Elements Serum (Batch 116)" mediante el método aquí desarrollado arrojó un valor ($98.6 \pm 6.6 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Se}$) que no difiere significativamente ($p < 0.05$) del valor recomendado ($100 \pm 6 \mu\text{g L}^{-1} \text{ Se}$) [30].

1.5.4. Determinación de selenio en especímenes de suero sanguíneo.

El método desarrollado fue empleado en la determinación de selenio en una muestra ($n = 10$) de suero sanguíneo tomada entre voluntarios (masculinos y femeninos, edades 25-40 años). La concentración del analito varió entre 78.6 y 147.2 ng ml^{-1} , con una media de $113.6 \pm 21.8 \text{ ng ml}^{-1}$. Estos valores son similares a los reportados por Burguera *et al.* para una muestra de una población del estado Mérida ($87 - 115 \text{ ng ml}^{-1}$) [50]. Una vez más es preciso señalar que el presente estudio no estuvo dirigido hacia su aplicación a nivel clínico, y de allí el pequeño número de especímenes analizados.

1.6. Conclusiones

Se evaluó un método para la determinación de selenio total en especímenes de suero sanguíneo mediante GFAAS. Dicho método involucró la dilución (1:5) de los mismos con una solución de 1.0% NH_4OH + 0.05% Triton X-100®, y su posterior introducción directamente en el atomizador. La optimización de las condiciones de análisis se realizó empleando superficies de respuesta. En este sentido, el modificador químico mixto 10 μg Pd + 3 μg $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ y una temperatura de atomización de 2100 °C representaron el mejor compromiso entre la sensibilidad de las mediciones y los perfiles de atomización de la señal analítica.

El uso de NH_4OH como diluyente trajo consigo algunas ventajas. En primer lugar, el mismo no causa precipitación de las proteínas, como la haría el empleo de ácido nítrico por encima de ciertas concentraciones. Esto último puede ser una fuente de errores si el analito se encuentra unido a dichos compuestos, lo cual es usualmente el caso en especímenes biológicos. En segundo lugar, aunque de cualquier modo importante, el amoníaco es más económico que el ácido nítrico de alta pureza. Esto reduce, al menos hasta cierto punto, el costo de los análisis. Adicionalmente, los límites de detección no deberían ser afectados por el empleo de este reactivo, dado que los blancos que se obtienen con ambos reactivos son comparables.

1.7. Referencias del Capítulo 1.

- [1] D. Casabiell, L. Cortes, Rev. Soc. Venez. Quím. 21 (1998) 21
- [2] J. Ladrón de Guevara, V. Moya Pueyo, Capítulo 47. Selenio y sus compuestos, in Toxicología Médica, Clínica y Laboral, pp. 293-295, Interamericana McGraw-Hill, Spain, 1995
- [3] B. Welz, M. Sperling, Applications of AAS. Body fluids and tissues, in Atomic Absorption Spectrometry, Third Ed., Wiley-VCH, Germany, pp. 592-595, 1999
- [4] W. Slavin, D. C. Manning, G. R. Carrick, Al. Spectrosc. 2 (1981) 137
- [5] D. L. Styris, Fresenius J. Anal. Chem. 323 (1986) 710
- [6] M. S. Droessler, J. Holcombe, Spectrochim. Acta Part B 42 (1987) 981

- [7] J. Dedina, W. Frech, I. Lindberg, E. Lundberg, A. Cedergren, J. Anal. At. Spectrom. 7 (1987) 287
- [8] R. D. Ediger, At. Absorpt. Newsl. 14 (1975) 127
- [9] D. L. Tsalev, V. I. Slaveykova, P. Mandjukov, Spectrochim. Acta Rev. 13 (1990) 225
- [10] B. Welz, G. Shlemmer, U. Voellkopf, Spectrochim. Acta Part B 39 (1984) 501
- [11] V. Krivan, M. Kückenwaitz, Fresenius J. Anal. Chem. 342 (1992) 692
- [12] E. A. Hernández Caraballo, J. D. Alvarado, J. R. Domínguez, Spectrochim. Acta Part B 54 (1999) 1593
- [13] A. B. Volynsky, V. Krivan, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 333
- [14] B. Sampson, J. Anal. At. Spectrom. 2 (1987) 447
- [15] J. K. Johannessen, B. Gammerlgaard, O. Jøns, S. H. Hansen, J. Anal. At. Spectrom. 8 (1993) 999
- [16] B. Gammelgaard, O. Jøns, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 465
- [17] W. -K. Chen, C. -C. Yen, B. -L. Wei, C. -C. Hu, J. -J. Yu, C. Chung, S. -C. Kuo, Spectrochim. Acta Part B 53 (1998) 131
- [18] C. K. Martin, J. C. Williams, J. Anal. At. Spectrom. 4 (1989) 691
- [19] M. B. Knowles, K. G. Brodie, J. Anal. At. Spectrom. 3 (1988) 511
- [20] A. B. Volynsky, V. Krivan, J. Anal. At. Spectrom. 11 (1996) 159
- [21] K. Saeed, J. Anal. At. Spectrom. 2 (1987) 151
- [22] A. Maage, K. Julshamn, K. -J. Andersen, J. Anal. At. Spectrom. 6 (1991) 277
- [23] R. Peile, R. Grey, R. Starek, J. Anal. At. Spectrom. 4 (1989) 407
- [24] B. Radziuk, Y. Thomassen, J. Anal. At. Spectrom. 7 (1992) 397
- [25] H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 137
- [26] The THGA graphite furnace: techniques and recommended conditions, Perkin-Elmer Corp., Part No. B050-5538, June 1992.
- [27] J. D. Kruse-Jarres, M. Rügauer, J. Trace Elements Med. Biol. 14 (2000) 21
- [28] C. Prohaska, I. Steffan, K. Pomazal, A. Törvényi, J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 97
- [29] P. J. Parsons, W. Slavin, Spectrochim. Acta Part B 48 (1993) 925

- [30] Seronorrn™ Trace Elements Serum Batch 116 (Nycomed Pharma AS)
- [31] W. Frech, K. Li, M. Berglund, D. C. Baxter, J. Anal. At. Spectrom. 7 (1992) 141
- [32] G. Schlemmer, B. Welz, Spectrochim. Acta Part B 41 (1986) 1157
- [33] M. Deaker, W. Maher, J. Anal. At. Spectrom. 10 (1995) 423
- [34] M. W. Hinds, K. W. Jackson, J. Anal. At. Spectrom. 5 (1990) 199
- [35] H. Qiao, K. W. Jackson, Spectrochim. Acta Part B 46 (1991) 1841
- [36] E. A. Hernández Caraballo, J. Alvarado D., F. Arenas, Spectrochim. Acta Part B 54 (1999) 1451
- [37] A. B. Volynsky, V. Krivan, Spectrochim. Acta Part B 52 (1997) 1293
- [38] V. I. Slaveykova, P. K. Stoimenov, S. G. Manev, D. L. Lazarov, Spectrochim. Acta Part B 52 (1997) 1259
- [39] X. -Q. Shan, B. Wen, J. Anal. At. Spectrom. 10 (1995) 791
- [40] C. D. Stalikas, G. A. Pilidis, M. I. Karayannis, J. Anal. At. Spectrom. 11 (1996) 595
- [41] I. Koch, C. F. Harrington, K. J. Reimer, W. R. Cullen, Talanta 44 (1997) 771
- [42] I. Koch, C. F. Harrington, K. J. Reimer, W. R. Cullen, Talanta 44 (1997) 1241
- [43] B. Izgi, C. Demir, S. Güçer, Spectrochim. Acta Part B 55 (2000) 971
- [44] K. S. Subramanian, Spectrochim. Acta Part B 51 (1996) 291
- [45] E. Barany, I. A. Bergdahl, A. Schütz, S. Skerfving, A. Oskarsson, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 1005
- [46] C. Bonnefoy, A. Menudier, C. Moesch, G. Lachâtre, J. -M. Mermet, J. Anal. At. Spectrom. 17 (2002) 1161
- [47] R. Forrer, K. Gautschi, H. Lutz, J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis. 5 (1991) 101
- [48] J. M. Marchante-Gayón, J. E. Sánchez-Uría, A. Sanz-Medel, J. Trace Elements Med. Biol. 10 (1996) 229
- [49] R. Sabé, R. Rubio, L. García-Beltrán, Anal. Chim. Acta 419 (2000) 121
- [50] J. L. Burguera, M. Burguera, M. Galliganani, O. M. Alarcón, J. A. Burguera, J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis. 4 (1990) 73

Capítulo 2. Programas rápidos de atomización en espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica: Tutorial.

2.1. Resumen.

El propósito del presente trabajo es la discusión crítica de los programas rápidos de atomización usados en espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica. Se hace una revisión del Concepto STPF (que corresponden a las siglas del nombre en inglés: Stabilized Temperature Platform Furnace) con el objeto de evaluar su aplicabilidad dentro de este contexto. Finalmente, se presentan algunos posibles problemas asociados a la implementación de dichos programas. Se espera que el conocimiento de las formas a través de las cuales se puede reducir el ciclo de medición haga posible su implementación en el análisis rutinario mediante la mencionada técnica.

2.2. Introducción.

La espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica (GFAAS, por las siglas de su nombre en inglés) es una técnica ya establecida dentro del campo del análisis inorgánico a nivel de trazas. Dicha posición ha sido alcanzada gracias en parte al desarrollo e incorporación del Concepto STPF (que corresponden a las siglas del nombre en inglés: Stabilized Temperature Platform Furnace) [1], así como a las continuas mejoras que se han introducido a nivel de la óptica y la electrónica de los espectrómetros, así como en el diseño de los atomizadores [2,3].

La técnica de GFAAS presenta claramente numerosas ventajas sobre otras técnicas espectroscópicas. Entre ellas se destacan: alta sensibilidad; bajo consumo de soluciones de trabajo (1- 100 μ l); tolerancia a la introducción de solventes orgánicos; capacidad de análisis libre de interferencias; y excelente relación sensibilidad/costo. Sin embargo, es importante destacar también que la misma presenta algunas desventajas, a saber, capacidad de análisis mono-

elemental (principalmente); rango dinámico lineal estrecho (1-2 órdenes de magnitud); y tiempos de análisis extensos (1-3 minutos por réplica) [4].

El presente trabajo está enfocado exclusivamente a la discusión de los medios empleados para reducir el tiempo requerido para completar un ciclo de atomizado, i.e., en el desarrollo y la aplicación de programas rápidos de atomización (PRA) en GFAAS. Hay que señalar que algunos intentos por reducir el tiempo de análisis a través de modificaciones en el diseño del atomizador fueron llevados a cabo por el grupo de investigación liderado por Dawson, a principios de la década de 1980 [5,6]. La discusión, sin embargo, se centrará únicamente en la aplicación de los PRA en equipos comercialmente disponibles.

Halls [7], uno de los pioneros en el desarrollo y aplicación de los PRA, evaluó los avances llevados a cabo en dicha área en el periodo 1984-1994 [8]. Aún cuando su trabajo es ciertamente una fuente importante de información respecto a dicho periodo, el autor del presente trabajo considera que esta es un área que no ha sido debidamente explotada. La idea entonces es, no sólo hacer una discusión crítica de la literatura especializada, sino también motivar la investigación en un área de tanta importancia para los analistas que trabajan con GFAAS. Con este propósito, se revisan cada una de las etapas más comunes en un programa de atomización convencional, con el objetivo de evaluar la necesidad de su aplicación. En segundo lugar, se presentan los diferentes medios desarrollados hasta el presente para reducir el tiempo de análisis. Algunos aspectos del Concepto STPF son discutidos y contrastados con la forma como los mismo han sido implementados dentro del contexto de los PRA. Finalmente, se presentan los posibles problemas que pueden presentarse al implementar este tipo de programa de atomización.

2.3. Programas de atomización convencionales en GFAAS.

Uno de los aspectos que diferencia a GFAAS de otras técnicas de análisis espectroscópico es que el material³ de trabajo, tras ser introducido en el atomizador, es sometido a una serie de tratamientos térmicos sucesivos previo a la etapa en la cual se ejecuta la cuantificación del analito (atomización). Gracias a ello es posible eliminar los componentes de la matriz que pueden llegar a afectar negativamente el proceso de generación del vapor atómico, facilitando así, en el mejor de los casos, un análisis prácticamente libre de interferencias. Lo anterior, sin embargo, también contribuye a que el tiempo de análisis sea significativamente mayor que al utilizar otras técnicas tales como la espectroscopía de absorción atómica con atomización en llama, o la espectroscopía de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado, entre otras.

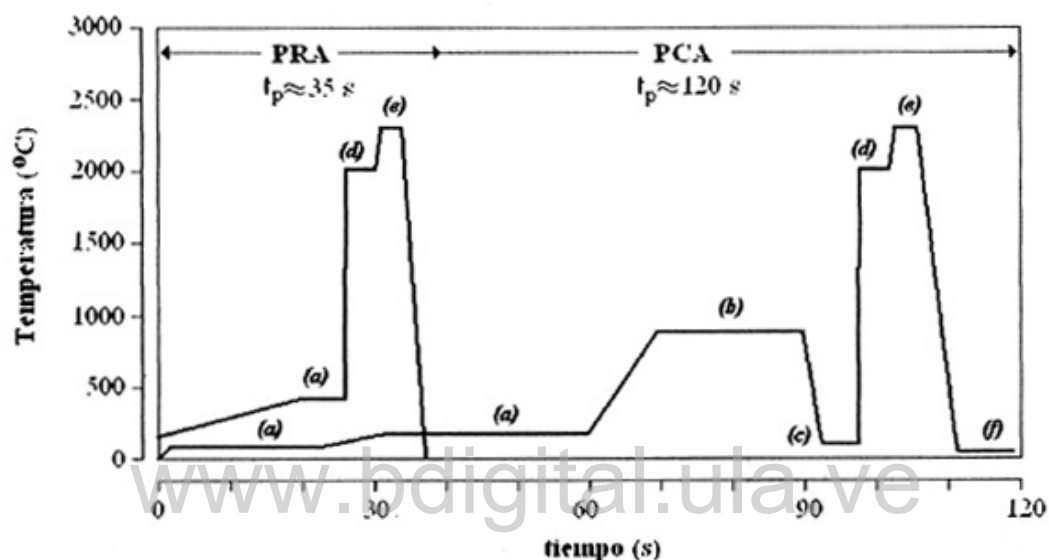
La Figura 1 muestra esquemáticamente las etapas que suelen constituir un programa de atomización convencional, de acuerdo a las recomendaciones de uno de los principales fabricantes de espectrómetros de atomización electrotérmica [9,10]. La función de las mismas se discute a continuación. Más adelante se verá que algunas de las consideraciones que se presentan a continuación pueden ser "violadas" sin afectar grandemente la calidad de los análisis.

- **Secado.** Comúnmente la evaporación del solvente se lleva a cabo de forma gradual, a través de dos etapas cuyas temperaturas se fijan cercanas al punto de ebullición de aquel, con la intención de evitar que las alícuotas depositadas se "desparramen" dentro del atomizador. Cuando esto último ocurre es posible observar señales atómicas con múltiples picos o muy "ruidosas" [9], lo cual puede traducirse en el detrimento en la calidad del análisis.

- **Pirólisis.** El propósito de esta etapa es la de remover los concomitantes de la matriz de manera de favorecer la generación del vapor atómico en una etapa posterior. Usualmente se desea alcanzar temperaturas elevadas ($T \approx 1000^\circ\text{C}$), las

³ Este término se seleccionó porque es posible la introducción de líquidos, suspensiones o sólidos directamente en el atomizador.

Figura 2.1. Esquema de un programa rápido (PRA) y un programa convencional (PCA) de atomización mostrando algunas de las etapas de tratamiento térmico más comunes: (a) Secado; (b) pirólisis; (c) enfriamiento previo a la atomización; (d) atomización; (e) limpieza, y (f) enfriamiento previo a la siguiente deposición.



cuales garanticen la vaporización de aquellos compuestos que puedan representar algún tipo de interferencia durante la atomización del analito. El empleo de *modificadores químicos*⁴; puede contribuir en este respecto [11], particularmente en el caso de analitos volátiles y semi-volátiles, y/o en la presencia de concomitantes que puedan aumentar la volatilidad de la especie de interés.

- **Enfriamiento previo a la atomización.** Este proceso es particularmente útil en conjunto con el empleo de la plataforma de L'vov [12,13]. La razón es que la atomización del analito ocurre en un ambiente termodinámicamente más favorable cuando la diferencia de temperaturas entre la etapa de atomización y la etapa que la antecede es superior a 1000 °C [14]. El empleo de dicha etapa puede traducirse

⁴ Un modificador químico es una sustancia que, usualmente se añade en exceso con respecto al analito, con el propósito de favorecer la generación del vapor atómico de esta última especie.

en una mejor sensibilidad de las mediciones y/o en una reducción en la ocurrencia de interferencias. Este "efecto plataforma", es particularmente efectivo en el caso de los elementos volátiles [15], y de aquellos cuya eficiencia de atomización depende de la temperatura (p. ej. P, Ba) [16,17]. Aunque dicho efecto es más pronunciado cuando se emplean atomizadores de calentamiento longitudinal [10], también es posible apreciarlo en atomizadores de calentados transversalmente [18-20].

- **Atomización.** Como su nombre lo indica, es en este estadio en el que se genera el vapor atómico del analito. La duración de esta etapa representa sólo una fracción del tiempo total del programa, entre los 3 y los 10 s, aproximadamente, dependiendo de la naturaleza del elemento de interés.

- **Limpieza.** La función de este paso es remover cualquier remanente de la matriz, o incluso del analito, que no haya sido vaporizado en las etapas precedentes. Esta suele ser tan corta como la anterior, aunque en aquellos casos en los que la matriz o el analito tienen características refractarias, puede ser necesario aumentar el tiempo y/o el número de etapas destinadas a este fin [21,22].

- **Enfriamiento.** Finalmente, la temperatura del atomizador es reducida rápidamente con el propósito de dispensar la siguiente solución, e iniciar el próximo ciclo de atomización. Esto es particularmente importante cuando la plataforma de L'vov se encuentra insertada en el atomizador, debido a que ella se enfría mucho más lentamente que este último, y por lo tanto requiere de un tiempo mayor para alcanzar una temperatura adecuada para la deposición de la siguiente alícuota [16].

Es posible añadir más etapas con algunos propósitos específicos, p. ej., varias etapas de pirólisis para remover de manera gradual los componentes de la matriz de acuerdo con la volatilidad de los mismos [23]; etapas de pretratamiento para la limpieza *in situ* del modificador químico [24,25], o para el acondicionamiento térmico del mismo [22,26], etc. Sin embargo, las etapas descritas anteriormente constituyen el eje sobre el cual se desarrollan los programas de calentamiento convencionales. El secado y la pirólisis son las

etapas que consumen la mayor cantidad de tiempo del programa y, por lo tanto, son las que hay que evaluar con más cuidado para reducir el tiempo de análisis. Lo anterior es evidente si se compara en la Figura 1 el programa de calentamiento convencional con su contraparte rápida. Obsérvese que este último, que en dicha Figura consta de una etapa de secado, una de atomización y una de limpieza, toma sólo una fracción del tiempo (ca. $\frac{1}{3}$) que el programa convencional.

2.4. Programas rápidos de atomización.

El criterio utilizado en el presente trabajo para la selección de los programas rápidos de atomización es que los mismos no excedan de los 60 s. Se considera que ese tiempo, equivalente al 30-50 % en el ciclo de atomizado convencional, contribuye en gran medida a aumentar la competitividad de la técnica de GFAAS. Lo anterior no ha incluido el tiempo de introducción de las soluciones en el atomizador, ya que, en la mayoría de los casos, los autores no reportan dicho valor o, en otros pocos, la introducción se lleva a cabo manualmente con la ayuda de micropipetas. Los problemas asociados a la inyección de soluciones en el atomizador, y su efecto sobre el tiempo de análisis, ya fueron tratados previamente por Halls [8], por lo que su discusión se considera innecesaria. Tampoco ha sido posible considerar aquellos trabajos en los que no se provee información detallada sobre las características del programa de atomización.

La aproximación más directa para la reducción de los programas de atomización en GFAAS es la evaluación crítica, y la consiguiente optimización, de las características (temperatura, rampa y duración) de cada una de las etapas descritas en la sección anterior [27]. La reducción en el tiempo del programa que se puede alcanzar por esta vía es ciertamente limitada. Numerosos autores han desarrollado diversos métodos, en algunos casos bastante agresivos, que conducen a reducciones aún mayores en el ciclo de análisis de las que se pueden conseguir de la manera anterior. En efecto, una revisión de la literatura especializada muestra el desarrollo exitoso de programas de hasta 16 s de

duración [28]. Sobre estas aproximaciones se discutirá en las secciones que siguen a continuación.

2.4.1. Reducción del volumen de inyección.

De acuerdo con Slavin [9], el secado de un microlitro de una solución acuosa a temperaturas cercanas al punto de ebullición del agua (80-120 °C) toma 2-3 s. Considerando que usualmente se inyecta en el atomizador un volumen total de 20 a 30 μl , se puede deducir que el tiempo de secado consumirá una porción considerablemente larga del programa de atomización (ver Fig. 1). Obviamente, dicho tiempo puede variar con la naturaleza del solvente, el contenido de sólidos presentes, así como con la temperatura y la velocidad de calentamiento de la etapa en cuestión. De lo anterior resalta que, entre otras cosas, una disminución en el volumen de las soluciones inyectadas podría traer consigo la posibilidad de reducir la duración de la(s) etapa(s) de secado, e inclusive de las etapas subsiguientes. Las únicas limitaciones asociadas a esta aproximación pudiesen tener que ver con la exactitud de los volúmenes inyectados y el posible detrimento (exactitud y precisión) del análisis; así como el hecho que la (baja) concentración del analito pudiese imponer restricciones sobre el volumen mínimo de inyección.

Es importante destacar que, ciertamente, una reducción en el volumen depositado en el atomizador puede contribuir en la reducción del tiempo de secado, así como el de las etapas que siguen a continuación. Sin embargo, también hay que señalar que la introducción de una cantidad convencional (20 μl) no implica que, necesariamente, se tenga que recurrir a tiempos de secado excesivos. En efecto, y como se discutirá más adelante, es posible llevar a cabo el secado de volúmenes como el mencionado previamente, seleccionando apropiadamente los distintos parámetros de calentamiento (temperatura, rampa y duración) del atomizador.

2.4.2. Deposición sobre una superficie pre-calentada.

Algunos espectrómetros ofrecen la posibilidad de calentar el atomizador previo a la inyección de la solución. Esto permite el secado acelerado de la alícuota durante el proceso mismo de su deposición. Para ello es necesario la selección cuidadosa de: *i)* la temperatura de inyección; *ii)* la distancia entre el capilar de inyección y la superficie de deposición⁵; y, *iii)* la velocidad de inyección. Esta modalidad, conocida como "inyección en caliente" (hot injection), facilita la reducción del tiempo de las etapas de secado [29], e incluso la remoción total de las mismas [30].

En aquellos casos en los que el espectrómetro no dispone de la modalidad de inyección en caliente, es posible programar una etapa de calentamiento previo a la inyección, y depositar luego la solución cuando la superficie de deposición haya alcanzado una temperatura tal que permita la evaporación acelerada del solvente [31]. En la experiencia del autor del presente trabajo, puede que no sea posible implementar esta opción en algunos espectrómetros de fabricación relativamente reciente. Ello se debe a que, como medida de seguridad, algunos programas de control impiden la introducción de la(s) solución(es) en el atomizador hasta que éste se haya enfriado lo suficiente, con el objeto de minimizar el daño al material del capilar de inyección.

2.4.3. Secado a alta temperatura.

Una revisión cuidadosa de la literatura relacionada con los programas rápidos de atomización muestra que no es necesario evaporar la solución depositada en el atomizador empleando largas etapas de secado. Efectivamente, y como lo ha demostrado el grupo de investigación de Halls [7,32-34], es posible secar soluciones tan variadas como agua [7,34,35], orina [7,31], sangre [7], o

⁵ Este término se refiere a la plataforma de grafito o a la pared del atomizador. Aun cuando algunos autores emplean el término *superficie de atomización*, este último no parece adecuado, por cuanto ciertos analitos son atomizados en fase gaseosa mediante la disociación térmica de alguna especie molecular o *precursor*.

material vegetal [32], en tiempos que pueden oscilar entre los 5 y los 20 s, en una sola etapa.

Halls empleó una termocupla para el estudio de la evolución de la temperatura de gotas de agua depositadas en la pared de un atomizador durante la etapa de secado [7]. Dicho autor halló que la velocidad a la cual aumenta la temperatura de la gota durante dicha etapa es independiente de la rampa de calentamiento programada cuando esta última es < 10 s. Esto quiere decir que es posible calentar rápidamente el atomizador hasta la temperatura de ebullición del solvente (rampa= 1 s), sin que ello afecte negativamente el proceso de secado. Esto, a su vez, reduce el tiempo durante el cual debe mantenerse dicha etapa para alcanzar el secado total de la solución depositada. Con esta aproximación se consiguió programar etapas de secado de 5-15 s de duración ($T= 130-140$ °C) [7]. Lo anterior permitió el desarrollo de programas de atomización de hasta 23-31 s de duración. Los resultados de Halls fueron confirmados por López-García *et al.* [36-38], quienes estudiaron el mismo fenómeno al depositar una alícuota de solución sobre la pared del atomizador, y sobre una plataforma de grafito.

La temperatura que se puede aplicar en la etapa de secado depende de muchos factores, entre los cuales cabe destacar, además de los mencionados en la sección 2.4.1., el material (grafito pirolítico o estándar) y el tipo de superficie de deposición (plataforma o pared del atomizador). En este sentido, Halls reportó que la inyección directa sobre la pared de un atomizador de grafito estándar permite un secado más rápido de la gota que sobre grafito pirolítico [7]. Cuando la inyección se lleva a cabo sobre plataformas de grafito pirolítico puede ser necesario la aplicación de temperaturas nominales mayores (reportadas por el software de control), con el fin de alcanzar temperaturas efectivas cercanas a la temperatura de ebullición del solvente. Esto se debe a la baja tasa de transferencia de calor desde el atomizador (calentado resistivamente) hacia la plataforma (que a bajas temperaturas se calienta por conducción) [42]. Slavin *et al.* [31], Hinds *et al.* [39], Hinds [40], y López-García *et al.* [36,37,41], desarrollaron programas de calentamiento con etapas de secado a 400-600 °C para el análisis de

especímenes digeridos [31,40], así como de suspensiones de suelos [39], tierras diatomáceas [36,41], y comida marina [37]. Es posible, sin embargo, el secado a temperaturas menores ($T_s = 120^\circ\text{C}$) [42], por lo que la selección final debe ser críticamente evaluada.

Las aproximaciones hasta ahora presentadas pueden ser combinadas con el objeto de reducir el ciclo de análisis de los programas de atomización convencionales [44-46]. Sin embargo, y como se verá seguidamente, es posible implementar métodos más agresivos que permitan reducir de una manera apreciablemente mayor la duración del programa de atomización, sin que ello afecte negativamente la calidad del análisis.

2.4.4. Remoción de la etapa de secado.

Esta aproximación, al mismo tiempo de resultar atractiva, por cuanto implica eliminar una de las etapas más largas del programa, ha sido una de las menos implementadas [30,47]. Halls y Fell llevaron a cabo el secado de una solución de fluido de diálisis empleando una rampa de 10°C/s hasta alcanzar la temperatura de pirólisis (1400°C) en la determinación de aluminio por GFAAS [47]. De esta manera fue posible evaporar aceleradamente el solvente, al mismo tiempo que se eliminaron los concomitantes de la matriz responsables de las interferencias. La duración de los programas de atomización fue de 27-30 s.

De acuerdo con Li *et al.*, el uso de un programa rápido sin etapa de pirólisis arrojó resultados por debajo de los valores de referencia en la determinación de As y Pb en materiales de referencia [30]. El programa fue modificado de manera que se eliminó la etapa de secado, y en su lugar se introdujo una etapa de pirólisis a 1000°C . La solución fue depositada sobre una superficie pre-calentada (120°C), y se recurrió a la adición del modificador químico paladio + nitrato de magnesio para la estabilización térmica de los elementos en cuestión. De acuerdo con los autores, el desempeño del atomizador calentado transversalmente (THGA, por las siglas de su nombre en inglés) contribuyó al secado instantáneo de la solución durante su deposición. La etapa de pirólisis, además de ayudar a

eliminar los interferentes presentes en la matriz de los materiales analizados, también contribuyó a remover los vapores del solvente generados durante el proceso de deposición en caliente de las soluciones correspondientes. De esta manera, se eliminaron las posibles pérdidas del analito que podían tener lugar por la expansión térmica de la atmósfera dentro del atomizador durante la etapa de atomizado [33-35,48-50]. Los valores obtenidos bajo estas condiciones resultaron estadísticamente indistinguibles de los valores certificados para los materiales de referencia analizados, al tiempo que se redujo el tiempo del programa de atomización a 24 s.

2.4.5. Eliminación de la etapa de pirólisis.

Dado que la pirólisis es una de las etapas del programa de atomización que más tiempo consume, parece tentador eliminar esta etapa para acelerar el ciclo de análisis. De hecho, la misma es omitida en una porción importante de los programas rápidos de atomización desarrollados hasta el presente [30-38,41,51-63]. Lo anterior, sin embargo, ha de ser evaluado cuidadosamente, ya que el ambiente en el que se genera el vapor atómico, y el éxito de la determinación, vendrán determinados por: *i)* la naturaleza del espécimen a analizar; *ii)* la preparación previa a la que ha sido sometida; *iii)* el volumen de solución introducido en el atomizador; y, *iv)* las características del programa de atomización.

Bendicho *et al.* estudiaron el efecto de la pirólisis en la atomización electrotérmica de Cu, Co, Cr, Fe, Mn y Ni en suspensiones de materiales vítreos [64]. El trabajo, hay que destacar, no estuvo enfocado al desarrollo de programas rápidos de atomización. Sin embargo, el caso sirve para ilustrar que la evaluación cuidadosa de las diversas etapas que componen un programa de atomización, y en particular la etapa de pirólisis, puede conducir a una reducción significativa de la duración del mismo.

De acuerdo con dichos autores, los valores de absorbancia integrada para los elementos en cuestión, en presencia y en ausencia de la etapa de pirólisis, no

varían significativamente. Lo anterior no debe resultar sorprendente, por cuanto los elementos determinados presentan gran estabilidad térmica, como lo reflejan las altas temperaturas de pirólisis que se pueden alcanzar en ausencia de modificadores ($\approx 1100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Gracias a ello, no se observan pérdidas de los analitos durante el rápido incremento en la temperatura que ocurre en la etapa de atomización, lo cual puede tener lugar en el caso de elementos más volátiles [36]. Los componentes de la matriz, principalmente óxidos de Ca, Mg, Si, etc., también poseen carácter refractario, por lo cual no pueden ser eliminados en la etapa de pirólisis. En base a lo anterior, los autores llegaron a la conclusión que esta etapa resulta totalmente innecesaria, y que en consecuencia puede ser eliminada sin que esto vaya en detrimento del análisis.

Slavin *et al.* [31], y Bradshaw y Slavin [62], evaluaron algunos de los efectos que tiene eliminar la etapa de pirólisis sobre la atomización electrotérmica de analitos con diferentes volatilidades. Los valores encontrados en el análisis de varios materiales de referencia coincidieron con los valores certificados; en tanto que la precisión, en términos de desviación estándar relativa, no se vio comprometida empleando dicha condición ($\leq 5\%$). En el estudio se observaron pérdidas parciales de As y Se, así como la distorsión de los perfiles de las señales analíticas correspondientes [62]. Esto último hace que la cuantificación deba llevarse a cabo a través del registro del área de pico (absorbancia integrada). La adición del modificador químico puede ser útil, por cuanto el mismo puede contribuir notablemente a mejorar el perfil de la señal analítica.

Evidentemente, habrá oportunidades en las que no será posible eliminar la pirólisis del programa de atomización. La duración de la misma deberá ser reducida al mínimo en esos casos, sin llegar a comprometer el desempeño del programa [7]. De acuerdo con Halls [7], la duración de la etapa de pirólisis debe ser tal que permita la corrección adecuada de la absorbancia no específica por parte del sistema de corrección de fondo. Esto, en opinión del autor del presente, pudiese traer consigo un detrimento en los límites de detección de la metodología, debido a una posible desmejora de la relación señal/ruido.

2.4.6. Omisión de la etapa de limpieza.

Se mencionó previamente que la extensión de esta etapa no suele afectar significativamente la duración total del programa. Sin embargo, algunos autores han encontrado que es posible eliminar la misma, y reducir aun más el ciclo de atomización [37,40,47]. López-García *et al.* emplearon esta aproximación en el análisis de suspensiones de comida marina y tierras diatomáceas [37,40]. El empleo de peróxido de hidrógeno como agente oxidante contribuyó a minimizar la alteración de la superficie de la plataforma debido a la pirólisis de la materia orgánica, y el deterioro subsiguiente de los análisis que tienen lugar en estas condiciones. En el segundo caso, el uso de ácido fluorhídrico como medio de suspensión, permitió la eliminación efectiva del silicio presente en el espécimen de interés, el cual es responsable del deterioro acelerado de los atomizadores y de las plataformas de grafito. En todos los casos, la aplicación de temperaturas de atomización elevadas ($T \leq 2400\text{ }^{\circ}\text{C}$) contribuyó a eliminar los remanentes de la matriz que pudiesen permanecer en el atomizador al concluir cada ciclo de atomizado [37,40,47].

2.4.7. Aplicación de modificadores químicos permanentes.

Hasta el momento se han discutido los medios para reducir la duración del programa de atomización desde el punto de vista instrumental, principalmente. Sin embargo existe otra manera, de carácter analítico, para llevar a cabo dicha función: el uso de *modificadores permanentes*. El término se refiere al recubrimiento de la superficie de deposición por uno o más compuestos, los cuales ejercerán algún efecto sobre el sistema de estudio durante varios cientos (de allí el adjetivo permanente) de ciclos de atomización. Algunas ventajas importantes que traen consigo el uso de modificadores permanentes en GFAAS son [65]:

- **Simplificación de los protocolos de inyección del auto-muestreador.**

La presencia del modificador en el atomizador conduce a que sólo las

soluciones de trabajo tengan que ser inyectadas previo a cada ciclo de atomización.

- **Simplificación de los programa de atomización.** El acondicionamiento inicial del modificador conduce a la transformación de éste en su forma activa, usualmente el metal en estado elemental. Lo anterior hace innecesario el pre-tratamiento térmico del modificador en cada ciclo de atomizado [22,26].
- **Reducción de los blancos metodológicos.** Gracias a que el modificador es sometido a un proceso de acondicionamiento térmico previo a su utilización, es posible vaporizar durante el proceso a los contaminantes que se encuentran regularmente en los reactivos químicos empleados. Esta reducción en los niveles del blanco asociado al modificador, redundará positivamente en mejores límites de detección.

En base a lo discutido en las secciones precedentes, también es razonable suponer que la aplicación de modificadores permanentes pudiese contribuir al desarrollo de programas rápidos de atomización. En este sentido, se podrían programar etapas de secado a alta temperatura, o incluso eliminar estas etapas, dado que el analito podría ser estabilizado térmicamente durante la deposición del mismo sobre el modificador. Esta área de investigación, sin embargo, permanece escasamente explorada, como lo muestra el reducido número de trabajos publicados [66,67].

Meeravali y Kumar desarrollaron un programa rápido ($t = 53$ s) para la determinación de níquel en especímenes emulsificados de nafta y aceites por GFAAS, empleando un modificador permanente de W-Ir [66]. La implementación del PRA resultó valiosa en el análisis de estos especímenes debido a que la volatilidad de las mismas puede conducir a variaciones en la señal analítica durante el proceso. Por otra parte, el modificador permanente permitió la determinación de níquel durante aproximadamente 400 ciclos, contribuyendo así a la reducción de los costos de análisis. Los blancos obtenidos de esta manera fueron significativamente menores a aquellos reportados al emplear el

modificador de forma convencional, lo cual se tradujo en menores límites de detección.

Vassileva *et al.* estudiaron el sinergismo modificador permanente (Ir)-programa rápido en el análisis de especímenes vegetales por GFAAS [67]. El modificador presentó una "vida analítica útil"⁶ de 200 a 250 ciclos. De acuerdo con estos autores, el recubrimiento puede ser renovado reiteradamente, aumentando así el "tiempo de vida"⁷ del atomizador. El hecho que esta figura sea menor a la reportada por Meeravali y Kumar se debe a que el soporte de tungsteno aplicado por éstos últimos aumenta la estabilidad térmica del iridio, reduciendo las pérdidas por volatilización del mismo. Vassileva *et al.* lograron reducir el ciclo de análisis implementando la inyección en caliente de las soluciones sobre la superficie de deposición (90-110 °C), el empleo de una etapa de secado a alta temperatura (200-300 °C), y la remoción de la etapa de pirólisis. Desafortunadamente, no es posible estimar el tiempo total del programa de atomización por cuanto no se encuentran reportadas todas las características (rampa y duración) de las etapas que constituyen al mismo.

2.5. El Concepto STPF dentro del marco de los programas rápidos de atomización.

A principios de la década de 1980, Slavin *et al.* agruparon un conjunto de mejoras analíticas e instrumentales que habían sido desarrolladas individualmente con el propósito de reducir, o en el mejor de los casos eliminar, los problemas que constantemente referían los primeros usuarios de GFAAS [1]. Dicho compendio fue bautizado con el nombre del Concepto STPF, y la implementación del mismo ha colocado a esta técnica entre las más poderosas con las que cuenta el analista para el análisis elemental a nivel de trazas. En esta sección se persigue discutir

⁶ El *tiempo de vida* de un atomizador se define como el número de ciclos de atomización que el mismo puede resistir antes de tomarse inoperante, bien sea por ruptura o por cambios en la resistencia eléctrica del material.

⁷ Se entiende por *vida analítica útil* al número de disparos después de los cuales la sensibilidad de las mediciones se reduce en un 25% de su valor original.

brevemente algunos de los preceptos que constituyen al mencionado Concepto, y el papel que éstos desempeñan en el desarrollo de los programas rápidos de atomización.

- **Integración de la señal analítica.** La cuantificación a través del área de pico es una medida más confiable de la concentración del analito que la altura de pico. Ello se debe a que aquella es independiente de los procesos que pueden conducir a variaciones en la cinética de formación de los átomos y, en consecuencia, afectar el perfil de la señal (altura y ancho). Esto puede ser particularmente evidente al emplear programas rápidos de atomización en los que se omite la etapa de pirólisis [62]. Aun cuando algunos autores continuaron empleando la altura de pico como medida de cuantificación durante la década de 1980 [7,33,34,47], incluso después de la introducción del Concepto STPF, dicha práctica ha caído en desuso.
- **Uso de grafito pirolítico como superficie de deposición.** Algunos autores prefieren el uso de grafito estándar como superficie de deposición cuando se trata de la implementación de programas rápidos de atomización. Ello se debe a que el carácter hidrofóbico del grafito pirolítico trae como desventaja que los tiempos de secado sean mayores [7,32,46]. El uso del grafito estándar, sin embargo, no es recomendable para la determinación de elementos que formen carburos estables (V, Cr, etc.).
- **La plataforma de L'vov.** La utilidad de ésta, dentro del contexto de los programas rápidos, ha sido cuestionada. De acuerdo con algunos autores [28], es menester someter al atomizador a temperaturas elevadas para que la temperatura de la plataforma permita el secado acelerado de la solución depositada. Esto puede traer como consecuencia la evaporación explosiva de la misma, con el consecuente deterioro del análisis. Sin embargo, numerosos autores han desarrollado programas rápidos con etapas de secado a altas temperaturas (400-600 °C) sin problema alguno [39,40].
- **Máxima velocidad de calentamiento en la etapa de atomización.** Algunos autores no aplican esta premisa en los programas rápidos de

atomización desarrollados [7,34,56]. Halls destaca que se puede emplear la máxima velocidad de calentamiento si se desea una reducción aún mayor en la duración del ciclo de medición [7]. Sin embargo ese mismo autor empleó, paradójicamente, rampas de calentamiento en algunos de los programas desarrollados [7], sin exponer las razones que lo condujeron al uso de las mismas.

- **Corrección de fondo por efecto Zeeman.** En ausencia de una etapa de pirólisis, los concomitantes de la matriz que no son eliminados serán responsables de un incremento en la absorción no específica. El empleo de este corrector de fondo puede contribuir a incrementar la tolerancia hacia la masa de matriz que puede ser co-volatilizada durante la etapa de atomización, permitiendo el desarrollo de programas rápidos sin la mencionada etapa. Una vez más, hay que tener en cuenta el posible efecto negativo que esto puede tener sobre los límites de detección, en caso de un deterioro de la relación señal/ruido.
- **El empleo de modificadores químicos.** Numerosos autores consideran que, en ausencia de la etapa de pirólisis, resulta innecesaria la adición de estos compuestos. Sin embargo, esto no puede ser considerado como una regla general, ya que es bien sabido que existen elementos volátiles que pueden ser expulsados del atomizador a causa del rápido aumento de la temperatura que antecede a la etapa de atomización [37,59]. Por ello, no es conveniente descartar *a priori* el empleo de los modificadores químicos, aún cuando la solución a analizar no sea sometida a una etapa de pirólisis. Adicionalmente, estos compuestos pueden contribuir a mejorar el perfil de las señales analíticas en programas rápidos que carecen de la etapa de pirólisis [62], y posiblemente la calidad del análisis.

Lo anterior sirve para ilustrar que, independientemente del reconocido impacto que tiene el Concepto STPF en GF AAS, la implementación del mismo ha de estar supeditada a las necesidades del analista y al problema específico al cual se enfrenta.

2.6. Problemas asociados a la aplicación de los programas rápidos de atomización

Parece haber pocos problemas que puedan ser atribuidos directamente al empleo de programas rápidos de atomización en GFAAS, en tanto las condiciones analíticas e instrumentales sean seleccionadas apropiadamente para cada caso en particular. Sin embargo, es importante destacar que, de acuerdo con Schlemmer [68], el empleo de programas de atomización sin etapa de pirólisis puede conducir a un deterioro acelerado del atomizador. Según dicho autor, algunos analitos y/o concomitantes pueden reaccionar con el material del atomizador a las altas temperaturas de las etapas de atomización y de limpieza sin no son removidos adecuadamente. El empleo de modificadores químicos pudiese contribuir en este sentido a la eliminación de dichos componentes durante la etapa de atomizado [37,40].

En cualquier caso, resulta difícil evaluar el impacto físico-químico al cual se ven sometidos los atomizadores al emplear programas rápidos de atomización. Esto es debido a que la estabilidad a largo plazo de la señal analítica, en términos de variaciones de la señal promedio y/o de la desviación estándar relativa, no es un parámetro que suele ser reportado por los investigadores. Lo anterior hace menester entonces una evaluación más cuidadosa de dicho factor, debido al efecto que tiene, directamente, sobre el análisis mismo, e indirectamente sobre el aspecto económico.

Por otra parte, y como se mencionó brevemente en una sección anterior, la remoción de la etapa de pirólisis pudiese conducir a una desmejora de la relación señal/ruido y, en consecuencia, a un aumento en los límites de detección. Esto sin embargo, es aun objeto de conjetura, por cuanto dicho aspecto no ha sido investigado en detalle.

2.7. Conclusiones

La implementación de programas rápidos de atomización en GFAAS representa una opción atractiva para la reducción tanto del tiempo como de los

costos de análisis. Los trabajos discutidos prueban que la selección apropiada de las condiciones de pre-tratamiento en el atomizador permite la obtención de resultados con exactitud y precisión comparables a las que se obtendrían empleando programas convencionales de atomización, pero en una fracción del tiempo usual. Es razonable pensar, en base a lo anterior, que las ventajas que trae la aplicación de programas rápidos de atomización deberían, en principio, compensar la seguridad que proveen los programas convencionales. Prueba de ello resulta el hecho que algunos de los componentes del Concepto STPF pueden ser excluidos del programa de atomización sin que ello afecte negativamente el resultado final. Sin embargo parece menester una investigación más profunda, antes de hacer conclusiones definitivas en este sentido. Adicionalmente, el doble atractivo que presenta el uso de modificadores químicos permanentes, en conjunto con los programas rápidos de atomización, hace de éste un campo de estudio que, igualmente, debe ser investigado con mayor detenimiento.

2.8. Referencias del Capítulo 2.

- [1] W. Slavin, D. C. Manning, G. R. Carnrick, *At. Spectrosc.* 2 (1981) 137
- [2] N. Hadgu, W. Frech, *Spectrochim. Acta Part B* 49 (1994) 445
- [3] M. Sperling, B. Welz, J. Hertzberg, C. Rieck, G. Marowsky, *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 897
- [4] L. de Galan, *J. Anal. At. Spectrom.* 2 (1987) 89
- [5] M. H. Bahreyni-Toosi, and J. B. Dawson, *Analyst* 108 (1983) 225
- [6] M. H. Bahreyni-Toosi, J. B. Dawson, D. J. Ellis, and R. L. Duffield, *Analyst* 109 (1984) 1607
- [7] D. J. Halls, *Analyst* 109 (1984) 1081
- [8] D. J. Halls, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 169
- [9] W. Slavin, Perkin-Elmer Corp., Part No. 0993-8150, April 1985.
- [10] The THGA graphite furnace: techniques and recommended conditions, Perkin-Elmer Corp., Part No. B050-5538, June 92.
- [11] G. Schlemmer, B. Welz, *Spectrochim. Acta Part B* 41 (1986) 1157

- [12] W. Slavin, D. C. Manning, Spectrochim. Acta Part B 35 (1980) 701
- [13] F. J. Fernández, M. M. Beaty, M. W. Barnett, At. Spectrosc. 2 (1981) 16
- [14] S. B. Chang, C. L. Chakrabarti, Prog. Analyt. Atom. Spectrom. 8 (1985) 83
- [15] E. A. Hernández Caraballo, J., R. Domínguez, J. Alvarado, At. Spectrosc. 21 (2000) 132
- [16] A. J. Curtius, G. Schlemmer, B. Welz, J. Anal. At. Spectrom. 2 (1987) 115
- [17] J. Kelemen, O. Szakács, A. Lásztity, J. Anal. At. Spectrom. 5 (1990) 377
- [18] M. T. C. de Loos-Vollebregt, E. X. Vrouwe, Spectrochim. Acta Part B 52 (1997) 1341
- [19] E. A. Hernández-Caraballo, M. Burguera, J. L. Burguera, Spectrochim. Acta Part B 57 (2002) 2159
- [20] E. A. Hernández-Caraballo, R. M. Ávila-Górnez, F. Rivas, M. Burguera, J. L. Burguera, *trabajo aceptado para su publicación Talanta*.
- [21] M. W. Hinds, I. L. Shuttler, C. Priest Bosnak, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 833
- [22] E. Hernández, J. R. Domínguez, J. Alvarado D., Spectrochim. Acta Part B 54 (1999) 1593
- [23] A. K. Skipper, J. J. Jacobs. J. Schavoscky, J. Black, J O. Galante, At. Spectrosc. 15 (1994) 131
- [24] E. Bulska, Z. Grobowski, G. Schlemmer, J. Anal. At. Spectrom. 5 (1990) 203
- [25] F. R. Moreira, F. Pivetta, At. Spectrosc. 19 (1998) 137
- [26] A. B. Volynsky, V. Krivan, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 333
- [27] V. A. Granadillo, Ll. Parra de Machado, R. A. Romero, Anal. Chem. 66 (1994) 3624
- [28] M. B. Knowles, J. Anal. At. Spectrom. 4 (1987) 257
- [29] U. K. Kunwar, D. Littlejohn, D. J. Halls, Talanta 37 (1990) 555
- [30] Z. Li, G. Carnrick, W. Slavin, Spectrochim. Acta Part B 48 (1993) 1435
- [31] W. Slavin, D. C. Manning, G. R. Carnrick, Spectrochim. Acta Part B 44 (1989) 1237
- [32] D. J. Halls, C. Mohl, M. Stoeppler, Analyst 112 (1987) 185

- [33] D. J. Halls, G. S. Fell, J. Anal. At. Spectrom. 3 (1988) 105
- [34] D. J. Halls, J. Anal. At. Spectrom. 4 (1989) 149
- [35] U. K. Kunwar, D. Littlejohn, and D. J. Halls, J. Anal. At. Spectrom. 4 (1989) 153
- [36] I. López García, J. Arroyo Cortez, M. Hernández Córdoba, Anal. Chim. Acta 283 (1993) 167
- [37] I. López García, P. Viñas, N. Campillo, M. Hernández Córdoba, J. Agric. Food Chem. 44 (1996) 836
- [38] I. López García, M. Sánchez-Merlos, M. Hernández Córdoba, Anal. Chim. Acta 328 (1996) 19
- [39] M. W. Hinds, K. E. Latimer, K. W. Jackson, J. Anal. At. Spectrom. 6 (1991) 473
- [40] M. W. Hinds, J. Anal. At. Spectrom. 7 (1992) 685
- [41] I. Lopez García, J. Arroyo Cortez, M. Hernández Córdoba, J. Anal. At. Spectrom. 8 (1993) 103
- [42] L. Bezur, J. Marshall, J. M. Ottaway, R. Fakhru-Aldeen, The Analyst 108 (1983) 553
- [43] S. C. Chen, M. Y. Shiue, M. H. Yang, Fresenius J. Anal. Chem. 357 (1997) 1192
- [44] P.J. Parsons, W. Slavin, Spectrochim. Acta Part B 48 (1993) 925
- [45] R. Moreno Camero, J. Alvarado, Spectrochim. Acta Part B 55 (2000) 875
- [46] P. R. M. Correia, E. Oliveira, P. V. Oliveira, Anal. Chim. Acta 458 (2002) 321
- [47] D.J. Halls, G. S. Fell, Analyst 110 (1985) 243
- [48] L. Lian, Spectrochim. Acta Part B 47 (1992) 239
- [49] C. A. Schneider, J. T. McCaffrey, At. Spectrosc. 14 (1993) 65
- [50] V. Chernyakhovskiy, S. Chernyakhovskaya, A. Cirillo, At. Spectrosc. 15 (1994) 250
- [51] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Fresenius J. Anal. Chem. 351 (1995) 695

- [52] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *At. Spectrosc.* 16 (1995) 86
- [53] I. López-García, M. Sánchez-Merlos, M. Hernández-Córdoba, *J. Anal. At. Spectrom.* 11 (1996) 1003
- [54] P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Pineiro, J. Moreda-Pineiro, A. Bermejo-Barrera, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 301
- [55] I. López-García, E. Navarro, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 642
- [56] I. López-García, M. Sánchez-Merlos, M. Hernández-Córdoba, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 777
- [57] I. López-García, M. Sánchez-Merlos, M. Hernández-Córdoba, *Spectrochim. Acta Part B* 52 (1997) 437
- [58] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *Anal. Chim. Acta* 356 (1997) 267
- [59] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *Talanta* 46 (1998) 615
- [60] I. López-García, M. Sánchez-Merlos, M. Hernández-Córdoba, *Mikrochim. Acta* 130 (1999) 295
- [61] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *Talanta* 48 (1999) 905
- [62] D. Bradshaw, W. Slavin, *Spectrochim. Acta Part B* 44 (1989) 245
- [63] D. J. Halls, M. M. Black, G. S. Fell, J. M. Ottaway, *J. Anal. At. Spectrom.* 2 (1987) 305
- [64] C. Bendicho, M. T. C. de Loos-Vollebregt, *Spectrochim. Acta Part B* 45 (1990) 679
- [65] D. L. Tsalev, V. I. Slaveykova, L. Lampugnani, A. D'Ulivo, R. Georgieva, *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 473
- [66] N. N. Meeravali, S. J. Kumar, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 527
- [67] E. Vassileva, H. Baeten, M. Hoenig, *Fresenius J. Anal. Chem.* 369 (2001) 491
- [68] G. Schlermer, *At. Spectrosc.* 16 (1996) 15

Capítulo 3. Programas rápidos de atomización en espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica: Determinación de cadmio en muestras de orina. ◇

3.1. Resumen.

Se desarrolló un programa rápido de atomización (42 s) para la determinación de cadmio en especímenes de orina por espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito. La optimización del programa se realizó en tan sólo 24 experimentos, gracias a un diseño factorial fraccionado del tipo 2^{4-1} (resolución IV). La inyección de alícuotas de 10 µl de cada una de las soluciones de trabajo (modificador + soluciones patrones/prueba) en un atomizador precalentado (110 °C), la aplicación de una etapa de secado a alta temperatura (300 °C), y la remoción de la etapa de pirólisis del programa de calentamiento condujo al desarrollo de un programa significativamente más rápido que el correspondiente programa "convencional" (105 s). El tratamiento de los especímenes de orina se limitó a su dilución (1:1) con una solución de HNO₃ al 4.0%. No se emplearon modificadores químicos, aparte del ácido mismo, con el objeto de promover la atomización del analito a baja temperatura (1200 °C); maximizar la separación temporal de la señal analítica de aquella del fondo; reducir los blancos, y mejorar el límite de detección de la metodología. Bajo las condiciones mencionadas se obtuvo un límite de detección (3s) de 0.12 ng ml⁻¹ Cd, y una masa característica de 1.78 pg/0.0044 s. La técnica de calibración estándar fue empleada para la cuantificación de cadmio en los especímenes en cuestión. La exactitud del método fue evaluada a través de la determinación de cadmio en el material de referencia "Seronorm™ Trace Elements Urine Batch No. 115" (Nycomed Pharma AS). El procedimiento propuesto fue aplicado en el análisis de especímenes puntuales de orina tomadas de siete (7) voluntarios (fumadores y no fumadores). La concentración de cadmio varió entre 0.20 y 4.30 µg L⁻¹ con un valor promedio de 2.14 ± 1.96 µg L⁻¹. Finalmente, se llevó a cabo un ensayo de resistencia del

◇ E. A. Hernández-Caraballo, M. Burguera, J. L. Burguera, Talanta 62 (2004) 419-424

atomizador bajo las condiciones químicas (diluyente: 4.0% HNO₃) y térmicas (programa rápido de atomización) de trabajo, encontrándose una excelente estabilidad de la señal analítica, tanto en términos de exactitud ($\pm 10\%$ del valor promedio) como de precisión ($\leq 10\%$ DER) durante 1060 ciclos de atomización.

3.2. Introducción.

El cadmio es un elemento tóxico cuyo(s) efecto(s) benéfico(s) en los organismos vivientes, de existir alguno(s), se desconoce(n). Adicional mente, las actividades antropogénicas han contribuido a elevar su concentración en el medio ambiente [1], lo cual incrementa los riesgos a los que dichos organismos se hallan expuestos. La minería, el refinamiento de metales como el cinc, la fabricación de plásticos, la producción y la aplicación de fertilizantes fosfatados, etc., son algunas de las fuentes más importantes de contaminación ambiental [1,2]. Por otra parte, el (mal) hábito de fumar, el consumo de ciertos alimentos (leguminosas, arroz, etc.), así como la exposición a polvos de cadmio o a pigmentos conteniendo dicho metal, son algunos de los principales medios a través de los cuales el mismo puede afectar a los seres humanos [1-3]. Se deduce de lo anterior que el monitoreo de las concentraciones de cadmio debería ser, en general, una actividad que debería llevarse a cabo regularmente. Ello puede constituirse en una herramienta fundamental en la prevención de enfermedades causadas por dicho elemento en el caso particular de individuos ocupacionalmente expuestos.

La determinación de cadmio en sangre y orina es uno de los ensayos toxicológicos más importantes [1]. La información obtenida en el primer caso permite evaluar posibles exposiciones recientes; en tanto que en el segundo caso es factible determinar la concentración total en el organismo, siempre y cuando los riñones del individuo no hayan sido afectados de manera irremediable [1]. Las bajas concentraciones en las que usualmente se encuentra presente este elemento en dichos fluidos biológicos demandan, en principio, de una técnica con una alta sensibilidad que permita su cuantificación. En este sentido, la espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS) es la técnica

más comúnmente empleada [5-20]. Sin embargo, la misma no está exenta de problemas, particularmente en lo que se refiere a la determinación de cadmio en orina. Aspectos como la baja concentración del analito, las altas concentraciones de ciertos concomitantes potencialmente perjudiciales (principalmente NaCl), y las bajas temperaturas de pirólisis que pueden ser aplicadas sin incurrir en pérdidas del analito, se cuentan entre las principales dificultades en la utilización de GFAAS para la mencionada tarea.

Con el objeto de minimizar estas complicaciones se han implementado una serie de propuestas analíticas y/o instrumentales, siendo la más común el empleo de modificadores químicos que estabilicen térmicamente al analito y/o aumenten la volatilidad de los componentes de la matriz [6,9,12]. A pesar de las ventajas que trae consigo el uso de modificadores, también es bien sabido que los mismos pueden ser, a su vez, fuentes de problemas adicionales en el curso de un análisis dado. Ciertamente, valores altos de los blancos (contaminación); incremento en la señal de fondo; disminución en la sensibilidad de las mediciones (sobre-estabilización); reducción de la vida útil del atomizador, y altos costos, entre otros, son algunos de ellos [21]. Por lo tanto, la aplicación de los modificadores químicos en GF AAS debería ser, en todas las ocasiones, cuidadosamente evaluada.

Otras alternativas empleadas con menos frecuencia han sido la implementación del concepto de "volatilización selectiva" [8], a través de la cual los procesos de volatilización del analito y de la matriz son separados espacial y temporalmente empleando una etapa de atomización lenta; así como la atomización desde una sonda insertada en un atomizador pre-calentado, con el objeto de favorecer la atomización en un ambiente termodinámicamente más favorable [14], entre otras. El hecho que la primera aproximación se desvíe de los preceptos del concepto STPF puede parecer inaceptable para algunos investigadores; en tanto que es bien sabido que el insertar una sonda en un atomizador perturba el pseudo-equilibrio térmico del sistema y, de hecho, aumenta las pérdidas del analito a través de las aperturas adicionales que se necesitan

para insertar la sonda, sin mencionar la necesidad de un sistema electro-mecánico más complicado [22].

Adicionalmente a los problemas específicos asociados a la determinación de cadmio en orina por GFAAS, esta técnica también sufre de un problema más general, *viz.*, extensos ciclos de análisis (> 1 min) [23]. Esto último resulta claramente adverso para aquellos laboratorios que conducen análisis de rutina, no sólo porque disminuye el número de *especímenes*⁸ que se pueden analizar por día de trabajo sino que, además, aumenta los costos. La forma más expedita de solventar esta dificultad ha sido la implementación de programas de atomización simplificados, en los que las etapas que usualmente constituyen dichos programas son, o bien eliminadas, o cuidadosamente evaluadas, con el objeto de acortar el ciclo de análisis [24,25].

La aplicación de la estrategia mencionada previamente para la determinación de cadmio por GF AAS ha sido limitada [10, 11,13,15,17,19]. Halls *et al.* desarrollaron un programa rápido de atomización de 21 s, aun cuando el mismo se desvía significativamente del concepto STPF [10]. En este sentido, la atomización se llevó a cabo desde la pared de un tubo de grafito estándar se atomizó a baja velocidad, y se empleó un flujo de argón interno (30 ml min^{-1}), para favorecer la volatilización selectiva; y finalmente se empleó la altura de pico para la cuantificación. El programa de atomización más rápido (16.6 s) para la determinación de cadmio en orina fue desarrollado por Knowles [11]. Dicho autor logró simplificar de manera significativa el programa de atomización mediante la inyección lenta de la solución en un tubo particionado de grafito pirolítico⁹ y la eliminación de la etapa de pirólisis. La intensidad de la señal de fondo fue reducida

⁸ Desde el punto de vista estadístico, una *muestra* se refiere a un grupo (de tamaño finito) de objetos tomados de una población dada, e. g., una muestra de balones aforados de una fábrica de material de laboratorio. Cuando se habla de una porción que es *representativa del material original para el momento en que es muestreada*, e.g., sangre, se habla de un *especimen*. Ambos términos, sin embargo, suelen emplearse comúnmente, aunque de forma errónea, sin distinción (ver W. Horwitz, Pure & Appl. Chem. 62 (1990) 1193).

⁹ Este tipo de atomizadores poseen dos anillos en la parte interna, ubicados simétricamente a ambos lados del puerto de inyección. El propósito de los mismos es el de confinar a la solución, particularmente las orgánicas, en la región central del atomizador para evitar su dispersión, y promover una distribución más homogénea de la temperatura durante la etapa de atomización.

empleando oxalato de amonio como modificador químico, así como llevando a cabo la atomización a baja temperatura (1300°C). La cuantificación, sin embargo, se realizó por medio de la técnica de adición de estándar. Littlejohn *et al.* desarrollaron un programa de 57 s de duración, con el objeto de simplificar la implementación general de GFAAS en el análisis de trazas [13]. El método involucró la inyección "en caliente", el empleo de paladio reducido en atmósfera de hidrógeno como modificador químico, y la aplicación de una etapa de pirólisis a 1000 °C, con el propósito de estabilizar térmicamente a los elementos de interés y, al mismo tiempo, facilitar la vaporización de los concomitantes de las matrices de estudio. Li *et al.* implementaron programas rápidos (24-32 s) en la determinación de varios analitos en especímenes de diferentes naturalezas (ambientales y biológicas), utilizando para ello un atomizador de calentamiento transversal [15]. Dicha aplicación, sin embargo, fue limitada exclusivamente al análisis de materiales de referencia y no a especímenes "reales". Chen *et al.* aplicaron un programa de atomización (51 s) sin etapa de pirólisis y sin modificador químico para la determinación de cadmio en especímenes de orina [17]. La metodología propuesta incluyó la separación inicial del analito mediante el paso de la solución a través de una columna conteniendo 8-hidroxiquinolina inmovilizada en sílice. Lo anterior ciertamente aceleró el ciclo de atomización, aunque a expensas de un mayor tiempo de preparación de los especímenes. Finalmente, Campillo *et al.* redujeron la extensión de la etapa de medición a través de la remoción de la etapa de pirólisis del programa de atomización, y llevando a cabo el secado de la solución a alta temperatura (220 °C) para acelerar la remoción del solvente [19].

La evaluación crítica de los trabajos mencionados en el párrafo anterior motivó el desarrollo del presente trabajo. Siendo el objetivo del mismo, el desarrollo de un programa rápido de atomización para la determinación de cadmio en especímenes de orina mediante GFAAS. Para tal fin, se empleó un diseño factorial fraccionado del tipo 2^{4-1} (resolución IV). La optimización se llevó a cabo tomando en cuenta los siguientes factores *i)* velocidad de inyección; *ii)* temperatura de inyección; *iii)* rampa de secado; y, *iv)* duración del secado. Tanto

el área de pico (absorbancia integrada), como el perfil de la señal (relación altura:área) fueron empleadas como funciones de respuesta en el proceso de optimización. No se emplearon modificadores químicos, a excepción del ácido nítrico utilizado en la dilución de las soluciones. Es importante destacar que el presente trabajo no estuvo diseñado con propósitos clínicos, sino principalmente como la evaluación de un método alternativo para la determinación de cadmio en orina por GFAAS.

3.3. Experimental.

3.3.1. Equipos, accesorios y paquetes computacionales.

Se utilizó un espectrómetro de absorción atómica marca Perkin-Elmer, modelo 4100ZL, equipado con una unidad de calentamiento electrotérmico, un sistema de corrección de fondo basado en el efecto Zeeman, y un auto-muestreador modelo AS-71. Se emplearon atomizadores electrotérmicos de calentamiento transversal, provistos de plataformas integradas de grafito. Los mismos fueron acondicionados térmicamente previamente a su uso siguiendo las instrucciones del fabricante [26]. Las determinaciones se llevaron a cabo a la longitud de onda del cadmio (228.8 nm), empleando para ello una lámpara de cátodo monoelemental marca Varian operada a 6 mA, y con una apertura del monocromador de 0.7 nm. El diseño factorial y el análisis estadístico posterior se realizó con MINITAB Statistical Software v. 13.1. (Minitab Inc.).

3.3.2. Reactivos y materiales.

Se empleó polvo de cadmio metálico (MERCK, pro analysis) para la preparación de la solución madre del analito. Se utilizó ácido nítrico (Alfa Aesar, 99.999 %, metals basis) para la estabilización/preparación de las soluciones de trabajo. En todos los casos se usó agua destilada y des-ionizada (Milipore), con una resistencia de 18 MΩ cm, en la preparación de las soluciones correspondientes. Todo el material de plástico y/o de vidrio empleado fue lavado por inmersión en HNO₃ (10%) durante al menos 12 horas, y posteriormente

enjuagado con agua DDI y secado al aire protegido de posibles fuentes de contaminación aérea.

3.3.3. Especímenes.

Se recogieron especímenes puntuales de orina de voluntarios en recipientes de 30 ml previamente lavados como se indicó en la sección anterior. dichos especímenes fueron acidificados a $\text{pH} < 2$ con ácido nítrico al momento de ser recibidos. Los especímenes fueron analizados inmediatamente, o conservados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en caso que el análisis no pudiera realizarse el mismo día. Se utilizó el material de referencia "Seronorm™ Trace Elements Urine Batch No. 115" (Nycomed Pharma AS), el cual posee una concentración reportada de cadmio de $3.8\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ [27], para la evaluación de la exactitud del método.

3.4. Procedimiento.

3.4.1. Preparación de las soluciones de trabajo.

Las soluciones de trabajo fueron preparadas mediante la dilución adecuada de una solución madre de 1000 mg L^{-1} de Cd con una solución al 4.0% de HNO_3 . Los especímenes de orina fueron diluidos (1:1) directamente en los viales del auto-muestreador ($V = 1\text{ ml}$) con el mismo diluyente que se empleó en la preparación de los patrones. En este sentido, se dispensaron con una micropipeta $500\text{ }\mu\text{L}$ del diluyente, seguidos del mismo volumen de orina, y la solución resultante fue homogeneizada mediante el bombeo repetido de la micropipeta. El material de referencia "Seronorm™ Trace Elements Urine Batch No. 115" (Nycomed Pharma AS) fue reconstituido siguiendo las instrucciones del fabricante [27], y posteriormente preparado para su análisis en la misma manera que los especímenes de orina.

3.4.2. Optimización del programa rápido de atomización.

En base a ensayos preliminares se consideraron cuatro factores en el proceso de optimización del programa rápido, viz., i) velocidad de inyección; ii)

temperatura de inyección; *iii*) duración de la rampa de secado: y, *iv*) duración de la etapa de secado. Debido a la interrelación que cabría esperar exista entre ellos se consideró como lo más adecuado la optimización simultánea, empleando para ello un diseño factorial fraccionado del tipo 2^{4-1} (resolución IV). La Tabla 3.1 resume los niveles máximos y mínimos para cada uno de los factores mencionados. El diseño experimental se muestra a su vez en la Tabla 3.2, junto con las respuestas experimentales empleadas en la optimización, i.e., el área de pico (A_i), la altura de pico (A_n), y la relación altura:área, normalizadas contra los valores que se obtienen al emplear un programa convencional de atomización. Los experimentos se condujeron de manera aleatoria, tomando tres (3) réplicas en cada caso, con el objeto de obtener un estimado de la repetibilidad¹⁰ de las mediciones.

Tabla 3.1. Factores y niveles empleados en el diseño factorial fraccionado.

Código	Factor	Nivel	
		Mínimo (-)	Máximo (+)
A	Temperatura de inyección (T_{iny}) / °C	90	110
B	Velocidad de inyección (r_{iny}) /%	60	90
C	Rampa de secado (r_{sec}) /s	10	15
D	Duración del secado (t_{sec}) /s	10	20

3.4.3. Determinación de cadmio por GFAAS.

La Tabla 3.3 muestra los programas de atomización evaluados en el presente trabajo. Las temperaturas reportadas corresponden a los valores nominales provistos por el paquete computacional que controla al espectrómetro.

¹⁰ Este término se refiere a la precisión dentro de un grupo (en inglés "within batch") medidas individuales tomadas de forma consecutiva. Usualmente se suele emplear con este propósito, aunque equivocadamente, el término *reproducibilidad*. Este último es una medida de la precisión entre grupos de medidas (en inglés "between batch").

Tabla 3.2. Matriz del diseño experimental y respuestas empleadas en el desarrollo del programa rápido de atomización.

Exp.	Factores				Patrón acuoso ^(a)		Orina ^(a)	
	A	B	C	D	(%A _i)	(%A _b /A _i)	(%A _i)	(%A _b /A _i)
1	-	+	+	-	96.9 (2.7)	102.2 (6.9)	102.0 (2.5)	107.9 (3.9)
2	+	+	-	-	98.0 (0.9)	102.3 (5.3)	101.0 (0.8)	121.9 (7.9)
3	-	-	+	+	101.0 (3.5)	91.4 (6.6)	104.4 (3.6)	105.7 (13.7)
4	+	+	+	-	98.5 (0.1)	96.9 (8.9)	101.5 (3.0)	121.3 (3.9)
5	+	-	-	+	99.0 (0.9)	101.7 (1.5)	102.0 (1.4)	118.1 (3.9)
6	+	-	+	-	96.4 (0.9)	97.8 (4.3)	105.4 (3.2)	108.2 (14.2)
7	-	+	-	+	96.9 (1.6)	100.9 (4.7)	104.9 (3.7)	115.2 (7.9)
8	+	+	+	+	98.5 (1.6)	93.8 (5.3)	102.0 (1.4)	124.0 (5.6)

^(a) Los porcentajes de recuperación están normalizados con respecto a los valores obtenidos con el programa convencional de atomización. Los valores en paréntesis corresponden a la desviación estándar relativa (n= 3)

Tabla 3.3. Programas de atomización para la determinación de Cd por GFAAS.^(a)

a) Programa convencional

Etapa	Temp. (°C)	Rampa (s)	Duración (s)
Secado	110	1	20
Secado	130	10	30
Pirólisis	300	10	20
Enfriamiento	50	1	5
Atomización	1200	0	4 (Lectura)
Limpieza	2500	1	3

Temperatura de inyección: 60 °C; Velocidad de inyección: 100 %

Duración del programa: 105 s.

www.bdigital.ula.ve

b) Programa rápido

Etapa	Temp. (°C)	Rampa (s)	Duración (s)
Secado	300	10	20
Enfriamiento	50	1	5
Atomización	1200	0	4 (Lectura)
Limpieza	2500	1	1

Temperatura de inyección: 110 °C; Velocidad de inyección: 60%

Duración del programa: 42 s.

^(a) Flujo del gas de purga: 250 ml min⁻¹ en todas las etapas excepto durante la atomización (flujo interrumpido); tiempo de corrección de línea base (BOC): 4 s.

Alícuotas (10 µl) de las soluciones de trabajo correspondientes fueron inyectadas en un atomizador pre-calentado con el objeto de reducir la dispersión de la solución sobre la superficie de deposición, acelerar el secado de las mismas, y mejorar la precisión de las mediciones. La punta del capilar del automuestreador fue posicionada cuidadosamente cerca de la superficie de la plataforma integrada del atomizador, con el propósito de acelerar aún más el proceso de secado.

En ambos programas se incluyó un paso de enfriamiento previo a la atomización con el objeto de realizar el ajuste de la línea base (en inglés "baseline offset correction", BOC) de manera adecuada. La cuantificación se llevó a cabo exclusivamente mediante el registro de la absorbancia integrada (A_i), aunque la forma de la señal analítica (relación $A_h:A_i$) también fue empleada en el proceso de optimización. Los valores reportados a lo largo del trabajo corresponden al promedio de tres (3) a cinco (5) mediciones realizadas consecutivamente.

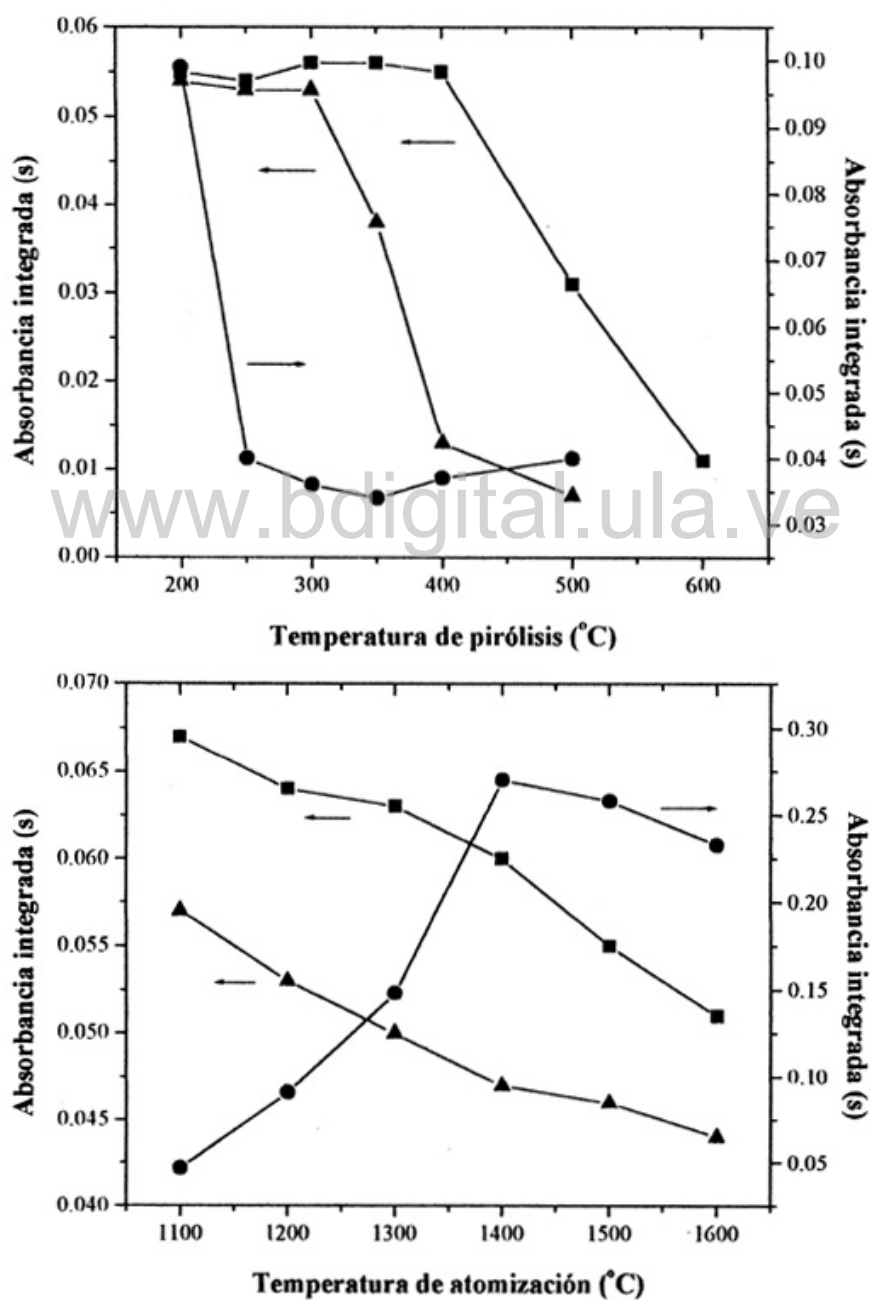
3.5. Resultados y discusiones.

3.5.1. Evaluación del programa convencional de atomización.

La optimización del programa convencional de atomización (PCA) se llevó a cabo de la manera usual, es decir, variando un factor cada vez, manteniendo las condiciones de los demás factores constantes. Para tal fin se empleó un patrón acuoso de cadmio (0.02 ng Cd) y un espécimen de orina (diluido 1:1) dopado con 0.02 ng de Cd. La Figura 3.1 muestra las curvas de pirólisis y de atomización, respectivamente, en donde se grafican simultáneamente la absorbancia específica y no específica (fondo). Se puede apreciar que, en este caso en particular en el que no se emplean modificadores químicos aparte del ácido nítrico, es posible aplicar una temperatura máxima de pirólisis de 300-400 °C sin que ocurran pérdidas del analito. Es interesante destacar que es posible conseguir una reducción importante del fondo a través de un incremento menor de la temperatura de pirólisis de 200 a 300 °C; en tanto que el mismo permanece posteriormente constante en el rango de 300-500 °C. Esto se logra en gran medida gracias a la

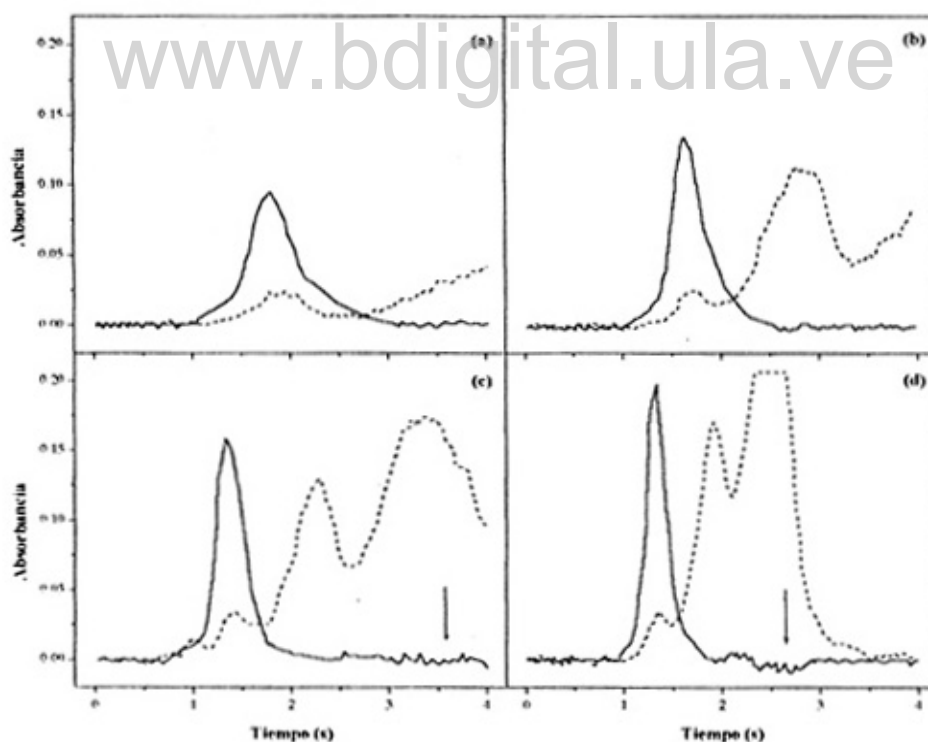
adición de ácido nítrico, con lo que se consigue remover el cloruro responsable de la absorción no específica en este tipo de especímenes biológicos.

Figura 3.1. Curvas de pirólisis y de atomización para (▲) un patrón acuoso de cadmio (0.02 ng), y (■) un espécimen de orina diluido (1:1) y dopado con 0.02 ng de Cd. (●) Absorbancia no específica de la solución de orina.



Las curvas de atomización muestran la tendencia que habría de esperar sobre la base de un mecanismo de expulsión del vapor atómico basado, mayormente, en un proceso de difusión para un analito que no interactúa con el material del atomizador, es decir, una reducción paulatina de la señal analítica a medida que aumenta la temperatura de atomización. La señal de fondo, por otra parte, aumenta continuamente en el rango de temperaturas entre 1100 y 1400 °C, decreciendo ligeramente a temperaturas más elevadas.

Figura 3.2. Efecto de la temperatura de atomización en los perfiles de la señal atómica (líneas sólidas) y del fondo (líneas punteadas) para un espécimen de orina dopado con 0.02 ng de Cd. (a) 1200 °C; (b) 1300 °C; (c) 1400 °C; (d) 1600 °C. Las flechas indican una ligera distorsión de la señal analítica.



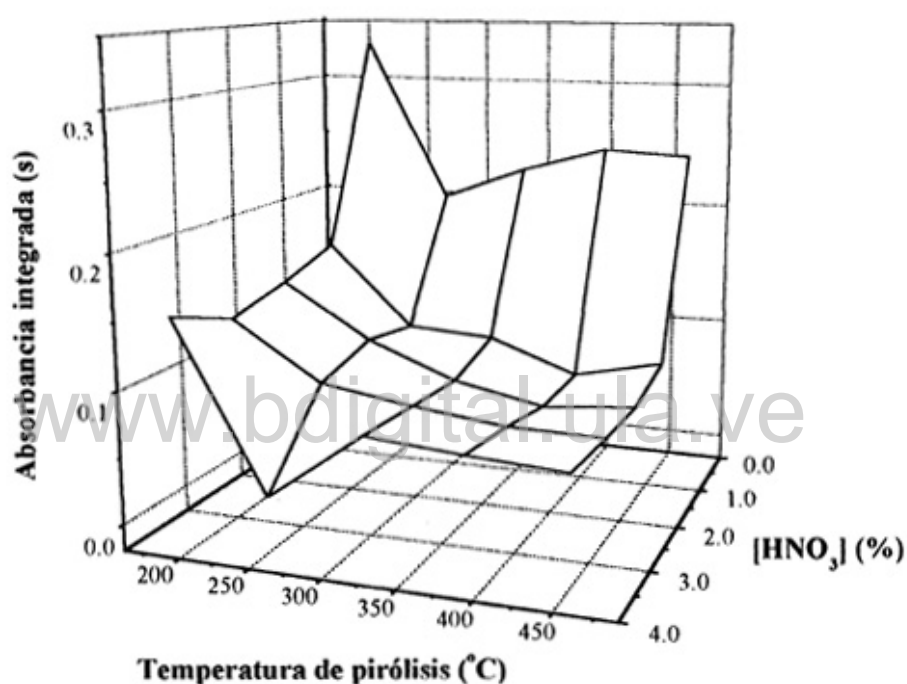
Esta última observación puede ser atribuida al hecho que una porción cada vez mayor de cloruro de sodio es co-volatilizada durante la etapa de atomización a medida que la temperatura de la misma se aproxima al punto de fusión de esta sal. Esto puede ser fácilmente observado en la Figura 3.2. A medida que la temperatura de atomización aumenta se observa que los perfiles de la seoal analítica se hacen cada vez más estrechos, debido a que el proceso de generación, el cual define la porción inicial de la seoal, y remoción del vapor atómico, que determina el perfil de la porción posterior al máximo, son funciones de la temperatura. Por otra parte, la seoal de fondo también aumenta de manera progresiva con la temperatura, al punto que ello causa una pequeña, aunque apreciable distorsión de la seoal analítica (sobre-corrección) entre 1400 y 1600 °C. Tomando en consideración estas observaciones se optó por un compromiso entre las temperaturas de pirolisis, y de atomizado, las cuales fueron programadas en 300°C y 1200 °C, respectivamente. Finalmente, se incluyó una etapa de enfriamiento previo a la atomización (ver Tabla 3.3) con el objeto de remediar una sobre-corrección de la seoal analítica que se ha observado regularmente en el modelo de espectrómetro empleado en el presente trabajo [28-30]. De esta manera fue posible hacer un ajuste adecuado de la línea base y evitar así el problema mencionado.

A continuación se condujo un estudio para determinar la concentración óptima de ácido nítrico a ser empleada como diluyente/modificador químico. La selección de la misma se realizó sobre la base del efecto de dicho ácido en la magnitud de la absorbancia no específica para una solución de orina. Debido a que resulta claro que la magnitud del fondo va a ser una función de la concentración de ácido nítrico y, al mismo tiempo, de la temperatura de pirolisis, la evaluación se llevó a cabo variando, simultáneamente, ambas variables.

La Figura 3.3 muestra una superficie de respuesta de la magnitud del fondo, en función de las variables mencionadas. Este método se considera extremadamente útil, al tiempo que más eficiente, cuando se sabe que dos variables pueden interactuar para definir una respuesta dada [30-33]. Es posible

apreciar en dicha figura un mínimo en la señal de fondo en el rango de temperaturas entre 250 y 500°C, para una concentración de HNO_3 entre 1.0 y 4.0 %.

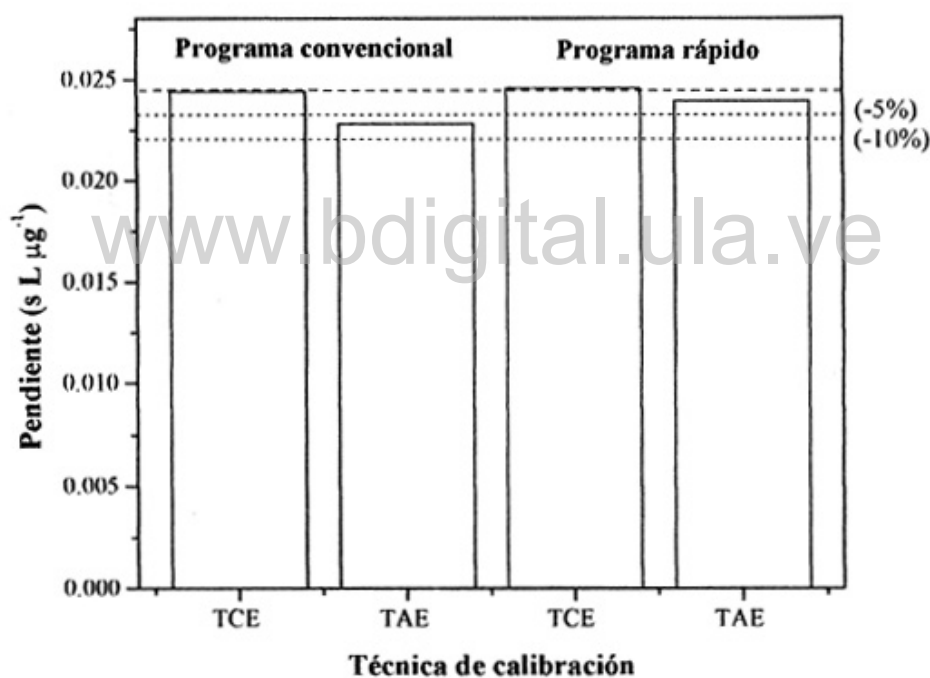
Figura 3.3. Efecto de la temperatura de pirólisis y del ácido nítrico en la señal de fondo para una solución de orina diluida (1:1).



Como se puede deducir de la Figura 3.1, resulta imposible aumentar la temperatura de pirólisis por encima de 300°C, por cuanto ello conduciría a pérdidas irremediables del analito. Por otra parte, es bien sabido que la composición de la orina varía entre diferentes individuos, así como para el mismo individuo a lo largo del día, dependiendo de una serie de factores biológicos y ambientales. Por esa razón, se consideró apropiado emplear una solución al 4% de HNO_3 como diluyente/modificador de forma de compensar dicha variabilidad. Aun cuando esta concentración podrá parecer elevada, la evidencia experimental

mostró que no lo es tanto como para, en primer lugar, desmejorar los límites de detección de la metodología (debido a la contaminación que podrá ser introducida) y, en segundo lugar, contribuir a acelerar el deterioro del atomizador, como se mostrará más adelante.

Figura 3.4. Comparación de las pendientes de la técnica de calibración estándar (TCE) y de la técnica de adición de estándar (TAE) en la determinación de cadmio mediante GFAAS empleando programas convencionales y rápidos de atomización. Las líneas punteadas representan los límites inferiores de tolerancia aceptables.



Finalmente se realizó una comparación entre las pendientes de las curvas de la técnica de calibración estándar y la adición de patrones, tal y como se aprecia en la Figura 3.4. Aunque es posible observar una pequeña diferencia entre las pendientes correspondientes, cuando el analito es sometido al programa convencional de atomización, la misma no excede al 10%. Por lo tanto, es posible

llevar a cabo la cuantificación de la concentración de cadmio en orina sin incurrir en una merma significativa de la exactitud de las mediciones [34]. A pesar de la robustez aparente del método, así como de su clara simplicidad, resulta también obvio que el largo ciclo de atomización (105 s) no es atractivo para implementar su aplicación rutinaria. Por lo tanto, los intentos que siguen a continuación se dirigieron hacia la reducción del tiempo de análisis y, como consecuencia inmediata, aumentar la productividad de la metodología sin afectar la simplicidad de la misma.

3.5.2. Optimización del programa rápido de atomización.

Hasta donde alcanza el conocimiento del autor, el desarrollo de programas rápidos de atomización ha sido llevado a cabo estudiando el efecto sobre la variable respuesta de un factor (temperatura o tiempo de las etapas) a la vez. El problema con esta aproximación es que, por una parte, pueden ser necesarios un número importante de ensayos para cubrir el dominio del factor en cuestión lo cual, además de incrementar el tiempo de optimización, puede ir en detrimento de la integridad física del atomizador y, en consecuencia, de la calidad de la variable respuesta como herramienta de optimización. Por otra parte, el programa de atomización desarrollado puede no ser "óptimo" desde el punto de vista de la duración del mismo. Esto último resulta del hecho que, por dicha vía, no se toman en cuenta las posibles interacciones entre las diversas variables (temperaturas/tiempos de rampa/tiempos de duración) que conforman al programa de atomización. Algunos autores han recurrido a diferentes métodos quimiométricos para optimizar las condiciones analíticas/instrumentales involucradas en el análisis espectrométrico con el propósito de solventar los problemas anteriormente mencionados [35-40]. Con esto en mente, se optó por implementar un diseño factorial fraccionado para llevar a cabo el desarrollo de un programa rápido de atomización, eliminando la etapa de pirolisis, y combinando las dos etapas de secado que forman parte del programa convencional (Tabla 3.3), en una única etapa de secado a alta temperatura.

Se escogieron cuatro (4) factores en el desarrollo del programa rápido, a saber, la temperatura y la velocidad de inyección, y la rampa y la duración de la etapa de secado. Aunque la temperatura de secado fue considerada en un principio entre los factores de estudio, se encontró posteriormente que reducir la temperatura de la misma por debajo de 300°C aumentaba las interferencias de matriz, como lo evidenciaba la diferencia observada entre las pendientes de las curvas de la técnica de calibración estándar y la adición de patrones. Por lo tanto, dicha variable fue fijada al valor máximo permisible (300°C). En base a lo anterior se seleccionó un diseño factorial fraccionado del tipo 2^{4-1} (resolución IV), el cual permitirá evaluar el impacto de las variables escogidas en un número reducido de ensayos, a saber, 24 experimentos (cada corrida fue reproducida en tres oportunidades para tener un idea de la precisión de las mediciones). La Tabla 3.1 muestra los niveles mínimos y máximos de los factores en cuestión.

La evaluación del impacto de los diversos factores en el programa de atomización resultante se llevó a cabo empleando tres (3) variables de respuesta, a saber, i) la absorbancia integrada (como una medida de la sensibilidad), ii) la relación de altura de pico:área de pico (como una medida de la forma de la señal analítica) y, iii) la repetitividad (como una medida de la precisión de las mediciones). Las dos primeras variables fueron normalizadas con respecto a los valores obtenidos empleando el programa convencional de atomización. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3.2. Se puede apreciar que existe una gran similitud (alrededor del 100%) entre las respuestas obtenidas bajo las condiciones de estudio. Los niveles de los factores evaluados, tal y como se presentan en la corrida experimental #5, permiten la obtención de condiciones adecuadas en términos de la exactitud (96.4-118.2%) y de la repetitividad de las mediciones (0.9-3.9%), por lo que las mismas fueron escogidas como las condiciones finales de trabajo (Tabla 3.3).

El hecho que, como se mencionó anteriormente, los distintos factores pueden interactuar entre ellos, y en consecuencia afectar las características del programa de atomización, se puede apreciar en el gráfico de Pareto que se

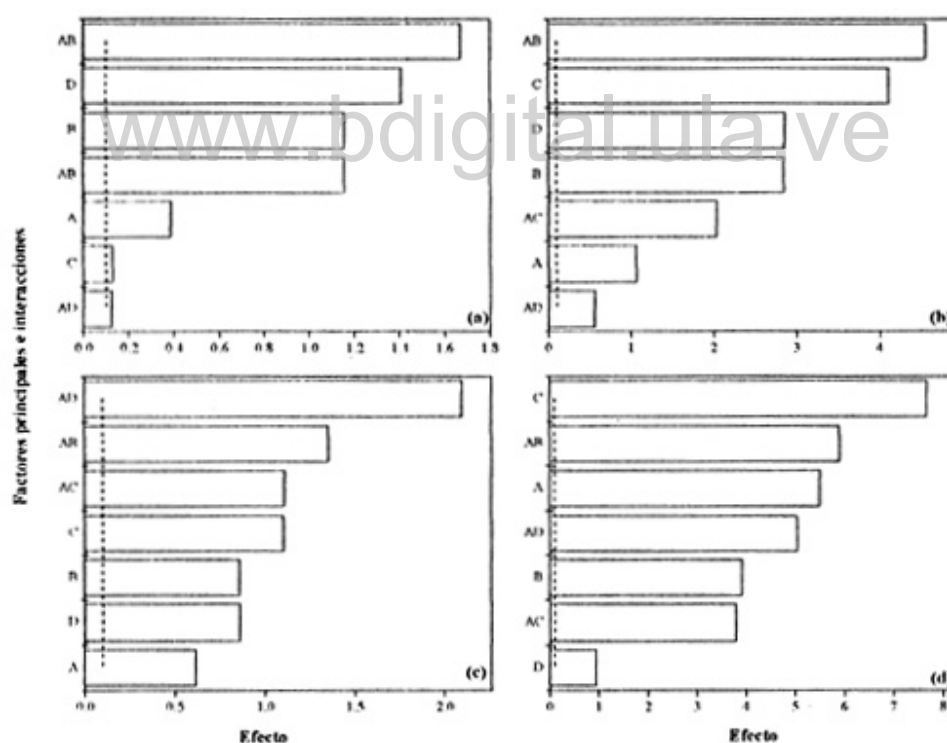
muestra en la Figura 3.5. En el mismo se grafican los efectos de los factores principales y de sus posibles interacciones versus su significación estadística. Se puede apreciar que todos los factores principales (temperatura y velocidad de inyección, y la rampa y duración de la etapa de secado) son estadísticamente significativos, es decir que la probabilidad de que los mismos afecten a las variables respuestas es mayor que el valor de corte ($\alpha=0.1$). También resultan importantes las interacciones del factor A (temperatura de inyección) con los demás factores (Factores AB, AC y AD en la Figura 3.5). Por lo tanto, las técnicas estadísticas como la empleada en el presente trabajo, deberán ser aplicadas con más frecuencia para un desarrollo más eficaz y acelerado de los programas rápidos de atomización.

La inclusión de una etapa de enfriamiento previa a la atomización fue necesaria por cuanto la misma redundó en el establecimiento correcto de la línea base. Esto, como se destaca en una sección posterior, también condujo a una reducción en los límites de detección de la metodología. Por otra parte, es posible recortar aún más la duración del programa al disminuir el tiempo de la etapa de limpieza de 3 a 1 s. Esto último no afectó la sensibilidad de las mediciones (desviación estándar relativa = 2.5%), al tiempo que la absorbancia integrada del fondo permaneció constante e igual a aquella obtenida al emplear tiempos de limpieza mayores al analizar una solución diluida (1:1) de orina. El programa rápido que se muestra en la Tabla 3.3 es aproximadamente un (1) minuto más corto que el programa convencional, lo cual se traduce en un ahorro importante en el tiempo de análisis.

Finalmente se realizó una comparación entre las pendientes de las curvas de la técnica de calibración estándar y la técnica de adición de patrones empleando el programa rápido de atomización desarrollado (ver Figura 3.4.). Las pendientes resultantes son muy similares, difiriendo entre sí en menos del 5%. Por consiguiente, es posible llevar a cabo la determinación de cadmio en orina

empleando una curva de calibración acuosa con un grado de exactitud que, resulta interesante destacar, sería más alto que el que se alcanzaría con el programa convencional y la misma técnica de calibración.

Figura 3.5. Gráficos de Pareto para (a,b) un patrón acuoso (0.02 ng de Cd); y, (c,d) una solución de orina diluida (1:1) y dopada con 0.02 ng de Cd. Los diagramas a la izquierda corresponden al análisis basado en la absorbancia integrada; en tanto los de la derecha corresponden a aquellos empleando la relación altura:área de la señal analítica. Las líneas discontinuas indican la probabilidad de que un factor sea considerado como estadísticamente significativo ($\alpha = 0.1$).



3.5.3. Características analíticas del método.

El límite de detección (3s) bajo las condiciones propuestas en la presente metodología fue de 0.06 ng ml^{-1} de Cd, el cual corresponde a 0.12 ng ml^{-1} en especímenes de orina cuando se toma en cuenta el factor de dilución. Se encontró que al variar el tiempo de corrección de la línea base de 2 a 4 segundos se consiguió mejorar el límite de detección (LDD) en un factor de 1.7 (ver Figura 3.6). El LDD encontrado es similar a otros reportados en la literatura empleando procedimientos más complicados. Dicho valor puede ser disminuido aún más por medios instrumentales, tales como el empleo de una lámpara de línea de mayor intensidad (lámpara de descarga sin electrodos), atomizadores de calentamiento transversal con los extremos parcialmente cerrados (end-capped), y conos de grafito modificados [18,41]. La masa característica (m_0/pg 0.0044 s), calculada a partir de la pendiente de la curva de calibración, fue estimada en 1.78 pg, la cual no difiere significativamente del valor reportado por el fabricante del espectrómetro [26].

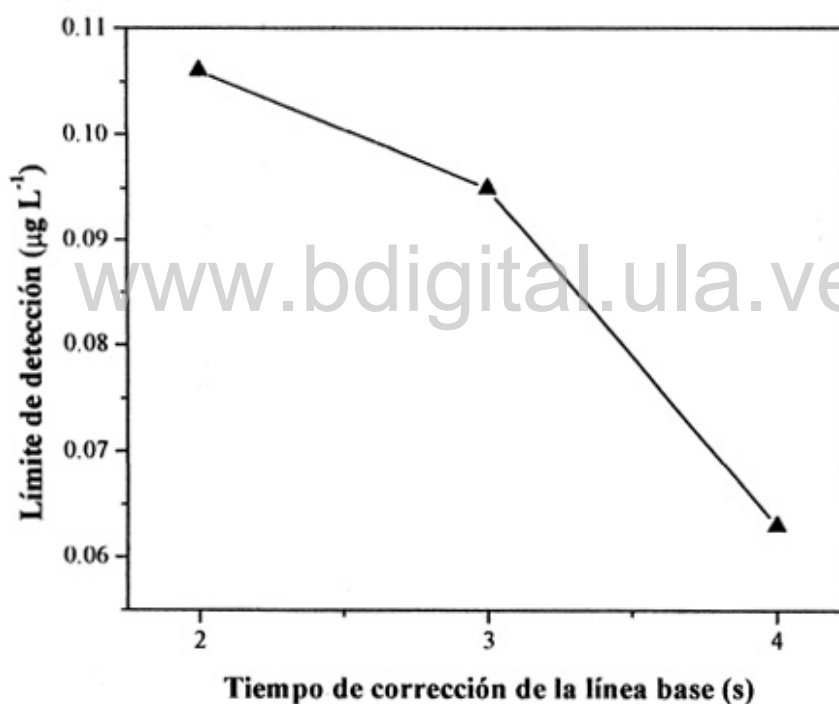
La exactitud del método fue evaluada a través de la determinación de cadmio en el material de referencia SeronormTM Trace Elements Urine (Batch 115), llevando a cabo la cuantificación con la técnica de calibración estándar. Se encontró una concentración de cadmio de $3.93 \pm 0.05 \mu\text{g L}^{-1}$, la cual no difiere significativamente de los valores reportados en el certificado [27]. La repetitividad fue mejor que 1.4 %DER; mientras que la reproducibilidad no excedió el 2.0 %DER.

3.5.4. Determinación de cadmio en especímenes de orina por GFAAS.

Se llevó a cabo la determinación de cadmio en especímenes puntuales de orina de siete voluntarios (masculinos y femeninos con edades entre 26 y 52 años) con diferentes hábitos, a saber, desde fumadores pasivos u ocasionales (2-3 cigarrillos por día) hasta fumadores empedernidos (60 cigarrillos por día). No se tomaron consideraciones en cuanto a ajustar las concentraciones de cadmio con respecto a las concentraciones de creatinina o a la densidad de los especímenes

[34], por cuanto el estudio no fue diseñado para ser implementado a nivel clínico. Las concentraciones variaron entre 0.20 y 4.30 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cd, con un valor promedio de $2.14 \pm 1.96 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd. Las concentraciones más altas fueron encontradas, como era de esperarse, en los especímenes pertenecientes al fumador más empedernido y en el caso de un individuo que trabaja con pigmentos en base a cadmio.

Figura 3.6. Efecto del tiempo de corrección de la línea base sobre el límite de detección metodológico.



3.5.5. Evaluación de la resistencia del atomizador.

De acuerdo con Schlemmer [42], es posible que la implementación de programas rápidos pueda conducir a un deterioro más acelerado del atomizador que el que causaría la implementación de un programa convencional. Ello sería particularmente importante en aquellos casos en los que la etapa de pirólisis ha

sido eliminada del programa para acortar su duración, como resultado del ataque más agresivo del material de grafito durante la etapa de atomización por parte de los componentes de la matriz que no fueron removidos previamente. La extensión de dicho ataque dependerá, por supuesto, de la reactividad de los componentes del sistema analito-modificador-matriz hacia el grafito, así como de las temperaturas de las etapas del programa de atomización en cuestión.

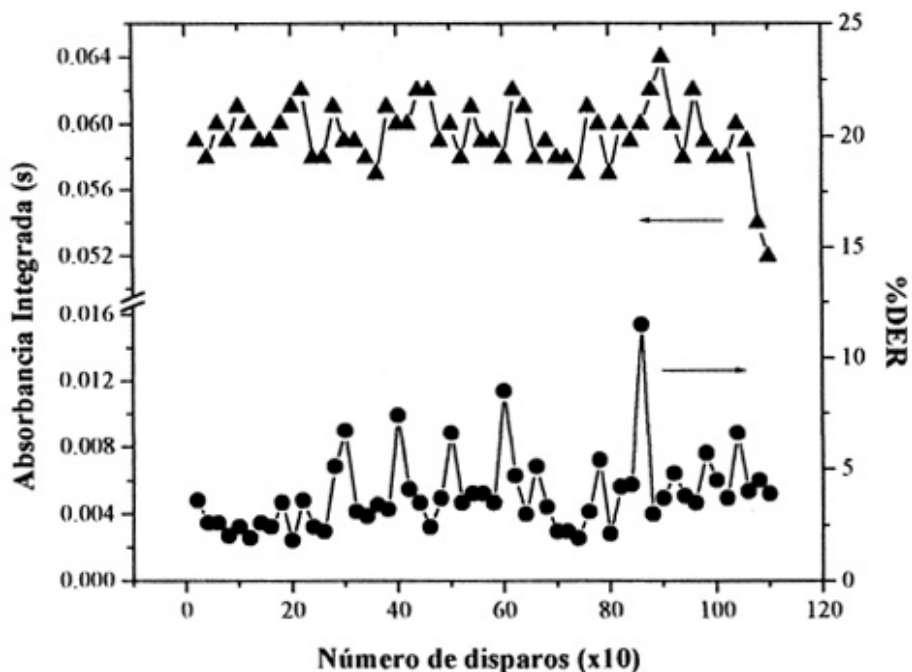
La experiencia del autor indica que el impacto general, tanto térmico como químico, que resulta de la implementación de programas rápidos de atomización sobre la estabilidad de la señal analítica y sobre la vida del atomizador no ha sido evaluado hasta el presente con suficiente detenimiento. En dicho sentido, se realizó un estudio sobre la estabilidad a largo plazo y la precisión de las mediciones en la determinación de cadmio en una solución diluida (1:1) de orina y dopada con 0.02 ng de Cd, empleando el programa rápido de la Tabla 3.3. La Figura 3.7 muestra las tendencias de las variables correspondientes para un atomizador de grafito nuevo, después que el mismo ha sido sometido al correspondiente pre-tratamiento térmico sugerido por el fabricante [26].

Resulta importante destacar que tras aproximadamente 500 ciclos se podía apreciar un ensanchamiento importante del puerto de inyección. A pesar de ello, la sensibilidad de las mediciones permaneció dentro de los límites aceptables de tolerancia para el análisis de especímenes reales [34], tanto en términos de la exactitud ($\pm 10\%$), como de la precisión ($\leq 10\% \text{DER}$), con una única excepción, por 1060 ciclos de atomización. El ensayo fue discontinuado después de 1100 ciclos, cuando la señal se redujo a un valor correspondiente al 10% del valor promedio (0.060 ± 0.002 s). En este punto, el atomizador mostraba señales de corrosión severa del recubrimiento pirolítico, as como un ensanchamiento mayor del puerto de inyección, aun cuando no se haya quebrado definitivamente.

Estos resultados contrastan con los reportados por otros autores quienes encontraron que la sensibilidad de las mediciones para cadmio disminuían progresivamente después de tan sólo 90-110 ciclos, hasta el rompimiento del tubo al emplear modificadores químicos convencionales (mezclas de paladio o fosfato

de amonio con nitrato de magnesio), incluso empleando programas convencional de atomización, y en condiciones (temperaturas y duración) de pirólisis y atomización "suaves". Fue sólo a través de la aplicación de un modificador químico permanente (W-Rh) que la vida del tubo pudo ser extendida hasta ca. 700-1700 ciclos [43,44]. Nuestros resultados pudieran ser adscritos a la reducción del estrés térmico al cual se ve sometido el atomizador en las condiciones de temperatura del programa rápido de atomización. Lo anterior también revela que el empleo de una solución de ácido nítrico al 4.0% no parece afectar de forma significativa a la integridad del atomizador y, más aún, favorece la posibilidad de llevar a cabo la determinación de cadmio en orina mediante la técnica de calibración estándar, haciendo del método una alternativa más atractiva para su aplicación rutinaria.

Figura 3.7. Ensayo de resistencia de un atomizador de calentamiento transversal empleando un programa rápido de atomización. Cada punto representa el promedio de veinte (20) medidas consecutivas.



3.6. Conclusiones.

Se desarrolló un método rápido y simple para la determinación de cadmio en orina mediante GFAAS, el cual involucró la dilución de los especímenes con ácido nítrico (4.0%), la inyección directa de las soluciones en un atomizador de calentamiento transversal previamente calentado (110 °C), el empleo de un programa rápido de atomización constituido por una etapa de secado a alta temperatura (300 °C) y sin etapa de pirólisis, y la cuantificación empleando una curva de calibración con patrones acuosos. La optimización del programa de atomización se llevó a cabo mediante un diseño factorial fraccionado del tipo 2^{4-1} (resolución IV), el cual limitó el número de experiencias necesarias, y permitió tomar en consideración en el proceso las interacciones entre los distintos factores estudiados. Gracias a que no fue necesaria la adición de modificadores químicos, aparte del ácido nítrico, fue posible la atomización del analito a baja temperatura lo cual, a su vez, facilitó la separación de la señal analítica de aquella del fondo, y con ello la obtención de límites de detección comparables a los obtenidos con metodologías más complejas. Esto último fue mejorado aun más con la selección adecuada del tiempo de corrección de la línea base. Finalmente, la vida analítica útil del atomizador excedió los 1000 ciclos lo que, unido al aumento en la cantidad de especímenes que se pueden analizar, contribuye de manera importante a la disminución de los costos de análisis.

3.7. Referencias del Capítulo 3.

- [1] D. L. Tsalev and Z. K. Zaprianov, Chapter 2. Biological and toxicological characteristics of individual elements. H. Cadmium, in *Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Practice. Vol. 1. Analytical Aspects and Health Significance*, CRC Press, Inc., USA, pp. 105-112, 1983
- [2] K. Robards, P. Worsfold, *Analyst* 116 (1991) 549.
- [3] J. Ladrón de Guevara, V. Moya Pueyo, Capítulo 31. Cadmio y sus compuestos, in *Toxicología Médica, Clínica y Laboral*, Interamericana McGraw-Hill, España, pp. 161- 167, 1995

- [4] E. J. Underwood, Chapter 9. Cadmium, in *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, 4th Edition, Academic Press Inc., London, pp. 243-257.
- [5] P. E. Gardiner, J. M. Ottaway, G. S. Fell, *Talanta* 26 (1977) 841
- [6] E. Pruszkowska, G. R. Carnrick, W. Slavin, *Clin. Chem.* 29 (1983) 477
- [7] W. Slavin, D. C. Manning, E. Pruszkowska, *Spectrochim. Acta Part B* 38 (1983) 1157
- [8] J.J. McAughey, N. J. Smith, *Anal. Chim. Acta* 156 (1984) 129
- [9] X. Yin, G. Schlemmer, B. Welz, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1462
- [10] D.J. Halls, M. M. Black, G. S. Fell, J. M. Ottaway, *J. Anal. At. Spectrom.* 2 (1987) 305
- [11] M. B. Knowles, *J. Anal. At. Spectrom.* 4 (1989) 257
- [12] J. Smeyers-Verbeke, Q. Yang, W. Penninckx, F. Vandervoort, *J. Anal. At. Spectrom.* 5 (1990) 393
- [13] D. Littlejohn, J. N. Egila, R. M. Gosland, U. K. Kunwar, C. Smith, *Anal. Chim. Acta* 250 (1991) 71
- [14] J. M. Marchante Gayón, A. Sanz-Medel, C. Fellows, P. Rock, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 1079
- [15] Z. Li, G. Carnrick, W. Slavin, *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 1435
- [6] S. T. Sauerhoff, Z. A. Grosser, G. R. Carnrick, *At. Spectrosc.* 17 (1996) 225
- [17] S. -C. Chen, M. -Y. Shiue, M. -H. Yang, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 1192
- [18] J. P. Snell, S. Sandberg, W. Frech, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 491
- [19] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *Anal. Chim. Acta* 390 (1999) 207-215
- [20] C. -J. Horng, J. -L. Tsai, P. -H. Horng, S. -C. Lin, S. -R. Lin, C. -C. Tzeng, *Talanta* 56 (2002) 1109
- [21] D. L. Tsalev, V. I. Slaveykova, P. B. Mandjukov, *Spectrochim. Acta Rev.* 13 (1990) 225

- [22] B. Welz, M. Sperling, Chapter 4. Atomizers and atomizer units, in *Atomic Absorption Spectrometry*, 3rd edn., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp. 149-219, 1999
- [23] L. de Galan, J. Anal. At. Spectrom. 2 (1987) 89
- [24] D.J. Halls, Analyst 109 (1984) 1081
- [25] D. J. Halls, J. Anal. At. Spectrom. 10 (1995) 169
- [26] *The THGA graphite furnace: techniques and recommended conditions*, Perkin-Elmer Corp., Part No. B050-5538, June 1992.
- [27] Seronorm™ Trace Elements Urine Batch No. 115 reference material (Nycomed Pharma AS)
- [28] M. T. C. de Loos-Vollebregt, E. X. Vrouwe, Spectrochim. Acta Part B 52 (1997) 1341
- [29] S. Tang, P. J. Parsons, W. Slavin, Spectrochim. Acta Part B 52 (1997) 1351
- [30] E. A. Hernández-Caraballo, M. Burguera, J. L. Burguera, Spectrochim. Acta Part B 57 (2002) 2] 59
- [31] M. W. Hinds, K. W. Jackson, J. Anal. At. Spectrom. 2 (1987) 441
- [32] M. Deaker, W. Maher, J. Anal. At. Spectrom. 10 (1995) 423
- [33] P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Piñeiro, J. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barrera, J. Anal. At. Spectrom. 12 (1997) 301
- [34] R. Cornelis, B. Heinzow, R. F. M. Herber, J. Molin Christensen, O. M. Paulsen, E. Sabbioni, D. M. Templeton, Y. Thomassen, M. Vahter, O. Vesterberg, Pure & Appl. Chem. 67 (1995) 1575
- [35] G. Lespes, F. Seby, P. -M. Sarradin, M. Potin-Gautier, J. Anal. At. Spectrom. 9 (1994) 1433
- [36] B. S. Iversen, A. Panayi, J. P. Cambor, E. Sabbioni, J. Anal. At. Spectrom. 11 (1996) 591
- [37] C. D. Stalikas, G. A. Pilidis, M. I. Karayannis, J. Anal. At. Spectrom. 11 (1996) 595
- [38] I. Koch, C. F. Harrington, K. J. Reimer, W. R. Cullen, Talanta 44 (1997) 771
- [39] I. Koch, C. F. Harrington, K. J. Reimer, W. R. Cullen, Talanta 44 (1997) 1241

- [40] B. Izgi, C. Demir, Ş. Güçer, Spectrochim. Acta Part B 55 (2000) 971
- [41] B. V. L'vov, L. K. Polzik, A. V. Borodin, A. O. Dyakov, A. V. Novichkhin, J. Anal. At. Spectrom. 10 (1995) 703
- [42] G. Schlemmer, At. Spectrosc. 17 (1996) 15
- [43] É. C. Lima, F. J. Krug, K. W. Jackson, Spectrochim. Acta Part B 53 (1998) 1791
- [44] É. C. Lima, F. J. Krug, A. T. Ferreira, F. Barbosa, Jr., J. Anal. At. Spectrom. 14 (1999) 269

www.bdigital.ula.ve

Parte II

Fundamento y aplicaciones de las redes neuronales artificiales en la química analítica

www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

Capítulo 4. Fundamentos de las redes neuronales artificiales.

4.1. Resumen

El volumen de datos que pueden generar los cada vez más sofisticados equipos de análisis instrumental, así como el tiempo que puede tomar la interpretación de los mismos, pueden a menudo abrumar a cualquier químico analítico. Es por ello que se hace necesario el empleo de herramientas para el análisis y el procesamiento de datos que sean igualmente poderosas. Las redes neuronales artificiales multi-capas entrenadas con el algoritmo de retro-propagación, se cuentan entre el grupo de las llamadas técnicas de computación inteligente disponibles para tal fin. El propósito del presente trabajo es discutir, de forma general, los fundamentos, capacidades y problemas del tipo de red neuronal artificial previamente mencionada.

4.2. Introducción.

El químico analítico dispone actualmente de una enorme variedad de técnicas instrumental es que le permiten atacar una cantidad de problemas de diversa índole. La microelectrónica y la computación, a su vez, han conducido a un incremento en la cantidad de datos que se pueden obtener en cada experimento. Ejemplo de ello lo constituyen los voltagramas/polarogramas, los espectros infrarrojos de compuestos individuales, o los espectros UV-visible de mezclas, entre otros. La extracción de la información útil a partir de dichos datos hace necesaria la disponibilidad de técnicas computacionales igualmente poderosas. Convencionalmente, esto se ha llevado a cabo a través de la aplicación de técnicas *quimiométricas*, e. g., análisis por componentes principales, análisis discriminante, etc. [1] Más recientemente, y con el mismo fin, se han venido aplicando una serie de estrategias que se agrupan dentro de lo que se conoce como *técnicas de computación inteligente* [2], entre las que se destacan las *redes neuronales artificiales* [3].

El presente trabajo está dirigido a mostrar, de una forma sencilla, los principios sobre los que se basan las redes neuronales artificiales, así como sus potenciales aplicaciones y los problemas asociados a su empleo. Es importante acotar que actualmente existe una amplia variedad de redes neuronales y algoritmos de entrenamiento. Este Capítulo, sin embargo, está enfocado a la discusión de un sólo tipo de red neuronal artificial, a saber, la *red multi-capas (o en cascada)*¹¹ *entrenada con el algoritmo de retro-propagación*. Esta simplificación del tema está motivada principalmente por las siguientes razones [4]:

- Este tipo de red neuronal puede ser utilizada para resolver problemas que involucren *clasificación, representación gráfica, modelado u optimización*, con mínimas modificaciones en su *arquitectura*.
- La simplicidad de su desarrollo, aunado a su versatilidad, han hecho de este tipo de red la más empleada para la resolución de problemas en el área química.

4.3. Las Redes Neuronales Artificiales.

Las redes neuronal muti-capas entrenadas con el algoritmo de retro-propagación han sido ampliamente descritas en monografías [2-5], artículos tutoriales [6-10], etc. Nuestro fin es el de mostrar una visión inicial de lo que son estas herramientas y, posteriormente, ejemplificar las capacidades de las mismas a través de algunas aplicaciones químicas. El ejemplificar las capacidades de las mismas a través de algunas aplicaciones químicas. El presente trabajo está dirigido principalmente a lectores con escaso o ningún conocimiento en el área. Por esa razón, el empleo de ecuaciones matemáticas ha sido restringido al mínimo necesario para la comprensión de este tópico. Para una discusión más profunda de los temas aquí tratados el lector interesado puede consultar las referencias [6-10].

¹¹ Ambas expresiones (*multi-capas* o *en cascada*) hacen alusión a la forma como "fluyen" los datos a través de la red neuronal. por lo que se emplearán indiferentemente a lo largo de este trabajo.

4.3.1. La unidad fundamental: La neurona.

Las computadoras biológicas (cerebros) están constituidas por un número variable de unidades que, esencialmente, son las responsables de las maravillas de las que son capaces los seres vivos: *las neuronas*. La Figura 4.1 (a) muestra un esquema simplificado de uno de los varios tipos de células nerviosas y las partes que la componen. La función principal de dichas células es la transmisión y el almacenamiento de información necesarias para la adaptación del individuo al entorno siempre cambiante en el que vive. Resulta lógico entonces que algunos de los intentos llevados a cabo por el hombre para crear *inteligencia artificial*, hayan comenzado con un intento por simular la engañosa simplicidad de dicha unidad. La Figura 4.1(b), por otra parte, muestra un esquema de una neurona artificial.

El procesamiento de los impulsos nerviosos, en el caso biológico, y de los datos, en el caso artificial, es bastante similar, por lo que sólo nos referiremos a cómo esto tiene lugar en esta última instancia. El "cuerpo" de la neurona recibe datos (X_i) del usuario o de otras neuronas a través de un número variable de conexiones. La fuerza de dichas entradas es modificada a través de los pesos (w_i), los cuales desempeñan un papel similar al de las *conexiones sinápticas*¹².

Cada neurona artificial lleva a cabo únicamente dos funciones, siendo la primera de ellas la suma ponderada de los datos de entrada:

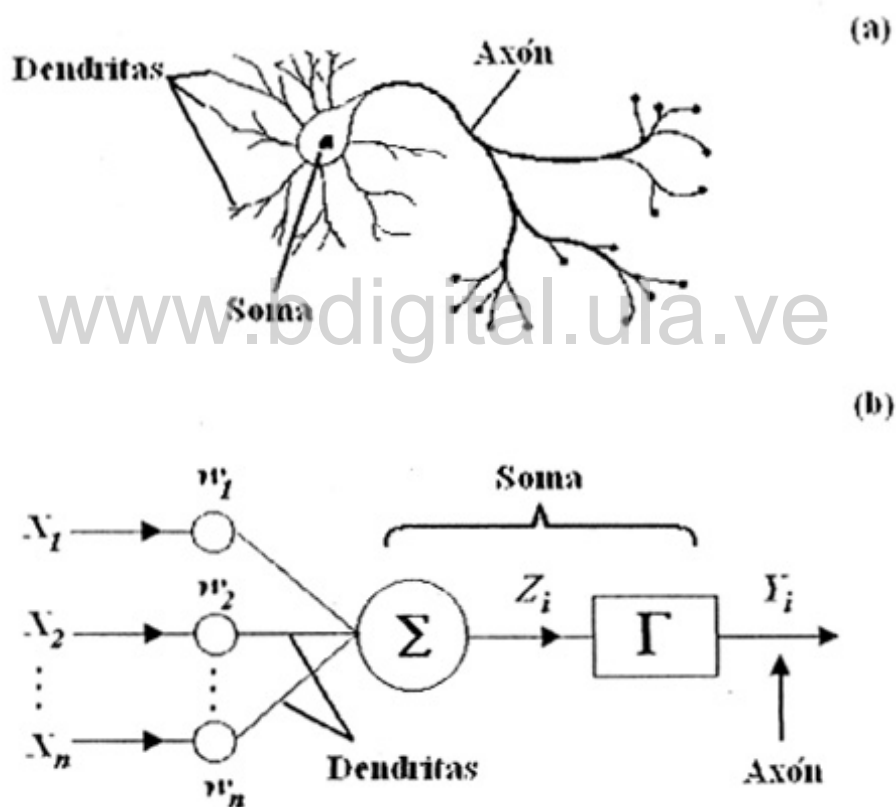
$$Z_i = \sum w_i X_i \quad (1)$$

El valor resultante de esta operación puede ser muy grande o negativo. Desde el punto de vista biológico, esto último no tiene sentido por cuanto se sabe que una neurona emite o no una señal electroquímica (aunque computacionalmente lo anterior no tiene importancia). Es principalmente por la

¹² Este tipo de conexiones tiene lugar entre las ramificaciones del axón de una neurona y las dendritas de otra neurona. El proceso de transmisión de los impulsos nerviosos, es esta interfase en particular, se lleva a cabo a través de las sustancias químicas conocidas como *neurotransmisores*.

primera razón, i. e., la magnitud de la suma, que el valor resultante es sometido a un segundo procesamiento. Aquí los valores son transformados mediante *una función de transferencia*, la cual reduce el rango de los valores de salida de la neurona a un intervalo más estrecho¹³. La Tabla 4.1 resume algunas de las funciones de transferencia más empleadas en la actualidad, así como los rangos dentro de los cuales son expresados los datos de salida.

Figura 4.1. Diagrama simplificado de una neurona biológica (a), y de una artificial (b).



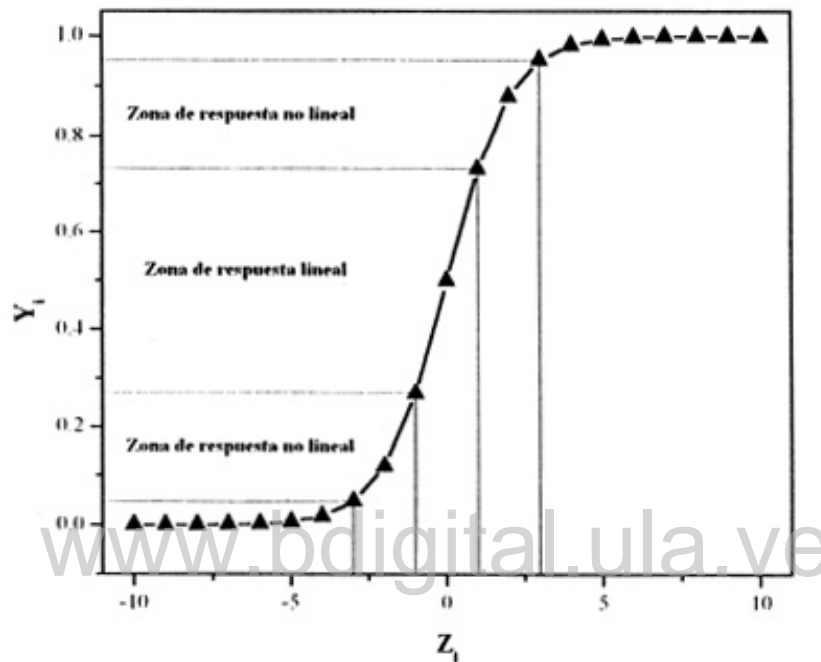
¹³ Por esta razón, dichas funciones han sido bautizadas también con el adjetivo anglosajón *squashing* ("aplastadoras").

Tabla 4.1. Funciones de transferencias y rangos de los datos de salida.

Nombre	Ecuación	Rango
Sigmoide unipolar	$Y_i = \frac{1}{1 + e^{-(Z_i)}}$	[0, 1]
Sigmoide bipolar	$Y_i = \frac{2}{1 + e^{-(Z_i)}} - 1$	[-1, 1]
Tangente hiperbólica	$Y_i = \tanh(Z_i)$	[-1, 1]
Lineal	$Y_i = Z_i$	Reales

La Figura 4.2 muestra el perfil de una de las funciones de transferencia más comúnmente empleadas: la *sigmoide unipolar*. En dicha Figura se puede apreciar una región en la que la neurona no transmite señal ($Y_i = 0$), independientemente del valor de entrada ($Z_i \leq -5$); y una región en la que la señal de salida es máxima ($Y_i = 1$), para valores de entrada $Z_i \geq 5$. Entre esas dos zonas existe una región de transición en la que la respuesta varía continuamente de manera no lineal (zonas en gris) y/o linealmente (zona en blanco). La capacidad de una neurona (o de una red neuronal), Para adaptar sus pesos de manera de generar una respuesta en alguna de las zonas mencionadas anteriormente, es lo que le otorga a estas herramientas el poder para la ejecución de tan diversas tareas. Lo anterior será visto con más claridad cuando discutamos posteriormente los tipos de problemas que se pueden resolver empleando redes neuronales artificiales.

Figura 4.2. Función de transferencia sigmoideal. El ajuste de los pesos durante la etapa de entrenamiento permite establecer las relaciones adecuadas (lineales o no lineales) entre los datos de salida (Y_i) y los de entrada (Z_i).



4.3.2. La unión hace la fuerza: La red neuronal.

Como se vio en la sección anterior, cada neurona lleva a cabo una función muy simple: sumar los "estímulos" y generar una "respuesta". Esto por sí sólo es insuficiente como para explicar la increíble capacidad de los seres vivos para desempeñarse (adaptarse) en un medio ambiente cambiante. De hecho, algunos investigadores han mostrado que las señales generadas por las neuronas son muy similares entre especies que difieren grandemente en desarrollo (evolutivamente hablando), e.g., un caracol y un profesor universitario [3]. Por otra parte, también se sabe que las neuronas son entre cinco y seis órdenes de magnitud más lentas que cualquier procesador de silicón utilizado en cualquier computador moderno. Sin embargo, un ser humano es capaz de ejecutar algunas

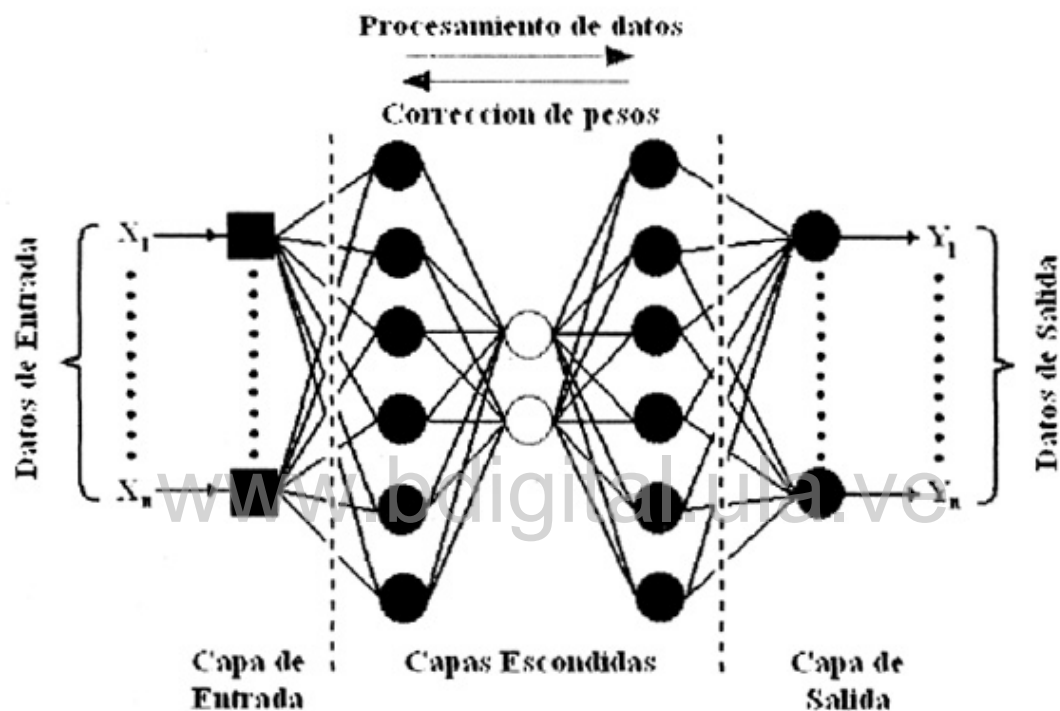
tareas a velocidades que no han podido ser emuladas por estos últimos, e.g., reconocer de un vistazo el rostro de un amigo entre una muchedumbre [4]. De lo anterior se deriva la conclusión de que el poder del cerebro y de su simulación artificial radica no en sus elementos constituyentes *per se*, sino en la unión de ellos: "La unión hace la fuerza".

Una red neuronal artificial no es más que una herramienta computacional diseñada para simular la forma como el cerebro lleva a cabo algunas de sus tareas. La Figura 4.3 muestra un esquema general de una red neuronal artificial del tipo cascada. Este tipo de representación es muy útil en la etapa de diseño de la red, por cuanto permite visualizar fácilmente la forma como fluyen los datos, y como éstos son transformados por cada una de las neuronas que la constituyen. La red neuronal mostrada en la Figura 4.3 consta de cuatro capas activas, i. e., tres capas escondidas y una capa de salida; cada una de las cuales, a su vez, se encuentra conformada por un número variable de neuronas interconectadas entre sí.

Se ha dicho que una red neuronal con una sola capa escondida es, por sí misma, un "aproximador universal", es decir, que es capaz de resolver cualquier problema. En este sentido, es el investigador quien debe evaluar y decidir acerca de la necesidad de emplear más de una capa escondida. El número de nodos¹⁴ en la capa de entrada y de neuronas en la capa de salida viene determinado por las características de cada problema, y dependen del número de descriptores y soluciones del mismo. Por el contrario, el número de neuronas y capas escondidas, así como las funciones de transferencia, deben ser determinados y optimizados para cada situación en particular.

¹⁴ Esta expresión se emplea exclusivamente para diferenciar a las unidades que conforman la capa de entrada de las unidades en las capas activas (neuronas), por cuanto las primeras, como ya se discutió: NO ejecutan ninguna función de transformación; SÓLO distribuyen los datos a las capas siguientes.

Figura 4.3. Diagrama simplificado de una red neuronal artificial de tipo cascada. Los datos introducidos por el usuario “fluyen” exclusivamente desde la capa de entrada hacia la capa de salida. La corrección de los pesos al emplear el algoritmo de retro-propagación se lleva a cabo en la dirección contraria (de allí el nombre del algoritmo).



4.4. Desarrollo de una Red Neuronal Artificial.

El desarrollo adecuado de una red neuronal involucra una serie de consideraciones y de pasos que se discuten brevemente a continuación.

4.4.1. Entrenamiento.

El entrenamiento de una red neuronal es el proceso a través del cual se ajustan los pesos, de manera que la respuesta de la misma se aproxime lo más posible a la respuesta esperada (conocida) por el investigador. Ello quiere decir que, en esta primera etapa, es preciso suministrar tanto los datos de entrada

(descriptores del problema) como los de salida (soluciones del problema). A cada pareja de datos entrada/salida se le conoce como "patrón"; en tanto que el proceso de entrenamiento ejecutado de la manera previamente mencionada, es del tipo "supervisado". Existe otro tipo de estrategia, la "no supervisada", en la que sólo los datos de entrada son suministrados a la red, y se permite que ésta se establezca a través del empleo de algún tipo de algoritmo. Este último tipo de aprendizaje, sin embargo, no será discutido en el presente trabajo.

El proceso de ajuste de los pesos se lleva a cabo de manera iterativa, comparando las respuestas que arroja la red al suministrársele un grupo de datos de entrada con las respuestas proporcionadas a la misma, y buscando minimizar la diferencia entre ambas respuestas mediante algún algoritmo. Una de las funciones empleadas para monitorear tal diferencia es el error cuadrático medio (ECM) [11]:

$$ECM = \sum_i^n \frac{(Y_i^{Red} - Y_i^{Real})^2}{n} \quad (2)$$

en donde Y_i^{Red} y Y_i^{Real} , corresponden a la i-ésima respuesta que arroja la red y que suministra el usuario, respectivamente, y n es el número de patrones empleados en el entrenamiento. El ajuste de los pesos se ejecuta mediante diversas estrategias, una de las cuales se discutirá posteriormente.

4.4.2. Patrones: Características y transformaciones.

La calidad del modelo generado por una red neuronal depende, en gran medida, de la calidad de los datos suministrados a la misma. Por esa razón, el investigador ha de hacer especial énfasis en la selección de los datos que se van a emplear en el entrenamiento. Ellos han de ser, primeramente, representativos del problema en cuestión. La escogencia equivocada de datos anómalos se va a traducir en un modelo neuronal errado. Es aconsejable, en segundo lugar,

seleccionar una cantidad "grande" de patrones¹⁵, de manera que la red disponga de suficientes ejemplos con los cuales ajustar los pesos correspondientes.

Otro punto importante es el pre-tratamiento de los datos. En muchos casos se hace imprescindible transformar los datos de entrada; en particular cuando éstos difieren entre sí, por ejemplo, en las unidades de medición, magnitud, etc. Lo anterior se hace con el fin de evitar que la red le otorgue *a priori* una importancia indebida a ciertos datos basándose en aspectos que no son de relevancia para la solución del problema. Las transformaciones pueden ser de varios tipos, a saber, normalización, estandarización, reducción mediante análisis por componentes principales, etc. Debido a que no existen reglas claras que permitan determinar cuál transformación puede ser la más adecuada para un problema dado, se hace imprescindible que el investigador evalúe a menudo varias de ellas antes de la selección final.

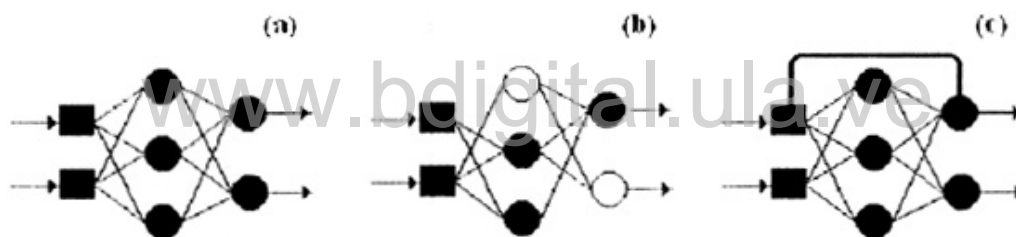
El pre-tratamiento de los datos de salida es menos complejo, por cuanto sólo puede haber dos casos: salidas binarias o continuas. En el primer caso los datos de salida son codificados mediante una combinación de 0 y/o ± 1 . En el segundo caso, puede ser necesaria la normalización de los datos (dividiendo entre el valor más alto). El primer tipo de transformación puede verse más claramente con un ejemplo. Supóngase que un analista desea determinar cuál de entre tres casas comerciales (A, B y C) fabrica un medicamento "X", mediante redes neuronales artificiales, empleando como dato de entrada el cromatograma de dicho compuesto. La salida de la red será entonces la casa comercial, en cuyo caso se puede utilizar una capa de salida con tres neuronas. El código que identifique a cada fabricante, de emplearse una función de transferencia sigmoideal, podría ser A(1,0,0), B(0,1,0) y C(0,0,1). Durante el entrenamiento, la red neuronal buscará entonces ajustar los pesos de forma que la señal de salida, por ejemplo en el caso de una función de transferencia sigmoideal, se encuentre en la región de mínima ($Y_i = 0$) o máxima ($Y_i = 1$) respuesta (ver Figura 2).

¹⁵ El tamaño de la base de datos depende, exclusivamente, de la complejidad propia del sistema de estudio. Por esta razón, no existen reglas que le sugieran al usuario qué cantidad mínimas de datos será necesaria para la resolución adecuada de un problema dado.

4.4.3. La Regla Delta Generalizada.

Como ya ha sido mencionado, el ajuste de los pesos se lleva a cabo con el fin de minimizar la diferencia entre la respuesta de la red y la respuesta "real". Para esto es posible emplear distintas funciones de aprendizaje. Una de las más utilizadas para tal fin es el algoritmo de retro-propagación, también conocido como la *Regla Delta Generalizada* [6]. Esta estrategia puede ser implementada en arquitecturas con conexión total o parcial entre neuronas de capas consecutivas, o entre capas no consecutivas (ver Figura 4.4).

Figura 4.4. La regla delta generalizada puede ser implementada en arquitecturas con conexión: (a) total, (b) parcial (las neuronas en blanco no reciben información de todas las neuronas), o (c) entre capas no consecutivas (línea gruesa).



Debido al carácter general de este artículo vamos a dejar a un lado la derivación detallada de la misma, y nos conformaremos con presentar la forma general de esa expresión [3]:

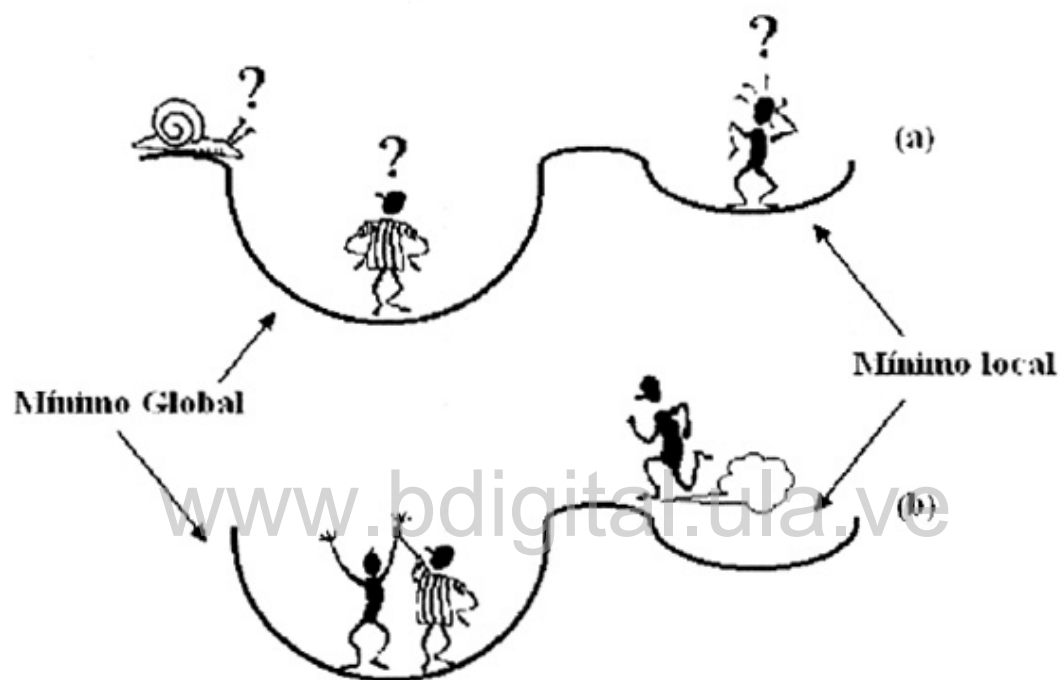
$$\Delta w_{ji}^l = w_{ji}^{l(\text{nuevo})} - w_{ji}^{l(\text{anterior})} = \eta \delta_j^l Y_i^{(l-1)} + \mu [\Delta w_{ji}^{l(\text{anterior})}] \quad (3)$$

en donde los sub-índices j e i representan a la neurona actual y a aquella de donde proviene la señal de entrada, respectivamente; el super-índice l indica la capa en la que se está haciendo el ajuste de los pesos; δ_j (cuya derivación, que no será discutida en este trabajo, depende de la capa en cuestión) es el error

asociado a la j -ésima neurona; y Y_i es la respuesta de la i -ésima neurona. El término η , la *tasa de aprendizaje*, es una variable que determina la velocidad de búsqueda en el espacio de soluciones (ver el párrafo siguiente). Por otra parte, el término a la extrema derecha de la igualdad, y que incluye al *factor de momento* (μ), es una modificación del algoritmo de retro-propagación que contribuye a "impulsar" la búsqueda en la dirección más favorable. Ambas variables (cuyos valores oscilan entre 0 y 1) deben ser determinadas empíricamente por el usuario de acuerdo a cada caso. Algunos autores sugieren que la suma de los mismos debe ser menor o igual a 1 [3], pero ello no necesariamente tiene por qué ser así [12].

La minimización del error puede ilustrarse gráficamente (ver Figura 4.5) como el ajuste de los pesos de manera de encontrar un mínimo (máximo) global en una superficie N-dimensional cuyo tamaño viene dado por el número de variables independientes involucradas en el problema (en el ejemplo hipotético de la Figura 4.5 se trata de un espacio bidimensional). Inicialmente se desconoce la dirección de búsqueda, por lo que es necesario asignar los valores numéricos de los pesos de forma aleatoria. En este sentido, es preciso destacar que el desempeño de una red neuronal puede depender de esta escogencia inicial (¡sobre la que no se tiene control!) [7]. Es por ello que se recomienda evaluar una misma arquitectura reiniciando los pesos repetidamente, y escoger finalmente aquella cuyo desempeño sea el más cercano al promedio. Una tasa de aprendizaje muy pequeña se traducirá en una búsqueda más exhaustiva, pero también más lenta [Figura 4. 5 (a)]. Por otra parte, un valor de η muy alto aumentará la velocidad de búsqueda, aunque a expensas de la minuciosidad con la que se ejecutará la misma. El factor de momento ha de ajustarse de forma que prevenga a la red de quedar atrapada en lo que se conoce como un *mínimo (o máximo) local* [Figura 4.5(a)]. Un valor pequeño implica que se van a tomar menos en cuenta los cambios en los pesos que han ocurrido en los ciclos anteriores. Un valor mayor facilitará la salida de la red de los temidos mínimos (máximos) locales en la dirección adecuada, tal y como se representa en la Figura 4.5(b).

Figura 4.5. El problema de la búsqueda del mínimo global en el espacio de soluciones: (a) Sin la selección adecuada de la tasa de aprendizaje y/o el factor de momento la red puede demorarse mucho en reducir el ECM, o puede quedar atorada en un mínimo local. (b) El uso de dichas variables optimizadas permite solventar dichos problemas.



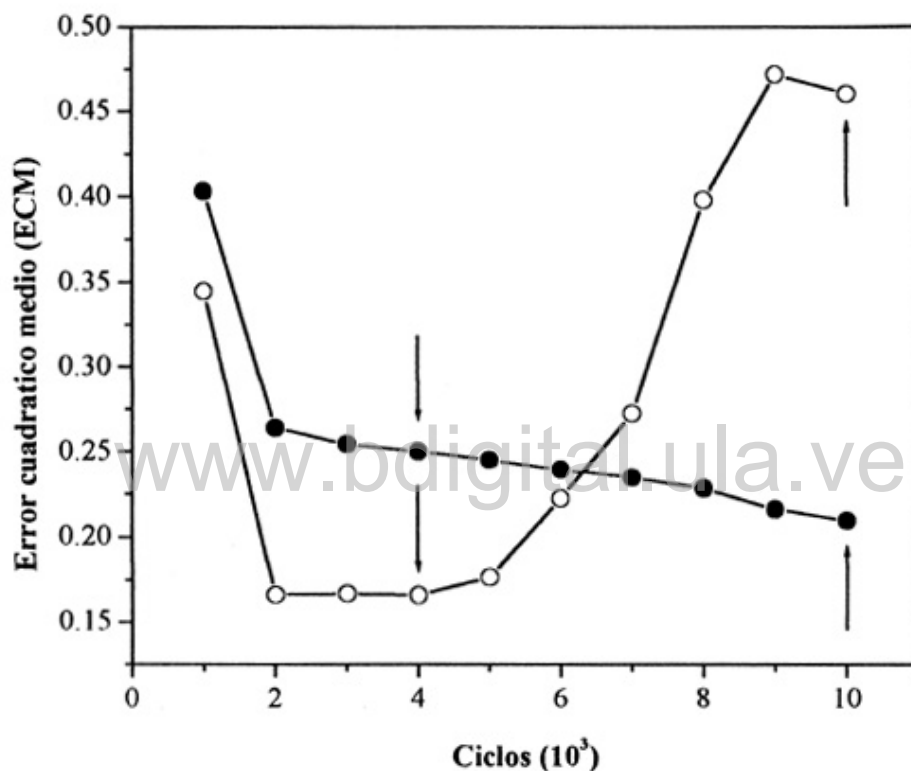
El entrenamiento de la red es un proceso iterativo que concluye cuando se cumple una de las siguientes imposiciones del usuario: *i)* que los patrones de entrenamiento sean presentados repetidamente a la red por un número de ciclos (o *épocas*) dado; o, *ii)* que la función de error escogida alcance un valor (mínimo) pre-determinado. Sin embargo, y como se verá en las secciones que siguen a continuación, la red neuronal que resulte de esta etapa de entrenamiento no tiene porque ser la más adecuada para la tarea designada. Dicha red debe ser sometida a un proceso de validación y prueba previo a su implementación final.

4.4.4. Validación.

Un punto importante que hay que tomar en consideración es la posibilidad de "sobre-entrenar" a la red. Esto se refiere al fenómeno que se observa cuando la red ajusta los pesos de las neuronas de forma de reproducir exactamente las respuestas suministradas por el usuario durante el proceso de entrenamiento. Cuando una red "memoriza" en lugar de "aprender", pierde una de sus propiedades más atractivas: la capacidad de *generalización*. Ello se traduce en la imposibilidad de la misma para predecir respuestas plausibles ante un grupo de datos de entrada nuevos, i. e., que no han sido vistos por la red durante el entrenamiento. Para evitar el problema mencionado es conveniente utilizar un grupo de *datos de validación*, el cual ayuda a determinar el tiempo prudencial de entrenamiento.

La Figura 4.6 sirve para ilustrar la importancia de esta etapa [12]. Se puede apreciar como el error cuadrático medio disminuye a medida que los datos de entrenamiento son procesados iterativamente por la red. Inicialmente, entre 1000 y 2000 ciclos, hay una reducción brusca del error lo cual puede estar relacionado con un cambio significativo en los pesos de las neuronas. Entre 2×10^3 y 10^4 ciclos continua disminuyendo el ECM, si bien no con la misma rapidez. El usuario podría estar tentado a utilizar la red neuronal resultante tras 10^4 ciclos de entrenamiento, por cuanto el ECM es el menor. Sin embargo, de hacer esto, estaría incurriendo en un error que sólo podría ser apreciado a través de la inclusión de los datos de validación. En efecto, obsérvese como el ECM para este último grupo de datos, después de alcanzar un mínimo entre 2×10^3 y 4×10^3 , aumenta considerablemente hasta alcanzar un máximo entre 9×10^3 y 10^4 ciclos. Esto implica que la capacidad de generalización de la red se ha deteriorado significativamente a ese punto. Un buen compromiso es entonces detener el entrenamiento tras 4×10^3 ciclos, cuando se ha alcanzado el menor ECM para ambos grupos de datos.

Figura 4.6. Variación del error cuadrático medio en función del número de iteraciones para un grupo de datos de entrenamiento (●) y uno de validación (○). Las flechas indican los puntos más importantes ha considerar para la selección del tiempo de entrenamiento de la red neuronal (ver texto para más detalles).



4.4.5. Prueba.

La última etapa en el desarrollo de una red neuronal consiste en evaluar su desempeño empleando datos que no han sido utilizados durante la etapa de entrenamiento. Los datos de prueba que se hayan seleccionado para este fin deben cumplir con un requisito fundamental, a saber, los mismos deben encontrarse dentro del rango de los datos empleados en la etapa previa. Ello se debe a que los modelos desarrollados por las redes neuronales, en analogía con

aquellos desarrollados por medios matemáticos convencionales, permiten *interpolarse* con un alto grado de exactitud. De igual manera, cuando se utilizan datos que se encuentran por fuera del rango de aquellos para los cuales fueron ajustados los pesos, es decir, se le pide a la red neuronal que *extrapole*, entonces se corre el riesgo de obtener resultados inexactos. Una analogía útil es esta: Una vez aprendidos, un niño es capaz de reconocer los caracteres que le permiten expresarse de manera escrita en su lengua nativa, e.g., el niño venezolano identificará bajo casi cualquier circunstancia las letras en español, a pesar de las variaciones que le imprimen diferentes personas al escribirlos. Pero ese conocimiento no le va a permitir reconocer un carácter chino: para ello es necesario "entrenarlo" (enseñarle) con estos datos también.

4.5. Capacidades de las Redes Neuronales Artificiales.

La arquitectura de una red neuronal y su capacidad de adaptación las convierten en herramientas valiosas en la resolución de problemas de muy diversas índoles. Seguidamente se describen las principales funciones que pueden desempeñar las redes neuronales multi-capas entrenadas con el algoritmo de retro-propagación.

4.5.1. Clasificación.

La clasificación de un objeto dado consiste en determinar la pertenencia del mismo a un conjunto de objetos que comparten características similares, y que a su vez difiere de otros grupos. Para ello se pueden emplear algunos atributos de dichos objetos, o variables descriptivas, tales como las concentraciones de los elementos trazas, o el espectro de un espécimen dado, etc. Debido a que una red neuronal sólo puede procesar valores numéricos, resulta obligatorio codificar las categorías. Esto se puede llevar a cabo fácilmente mediante una combinación de 0, y/o ± 1 , tal y como se explicó en la sección 4.4.2.

Algunas de las aplicaciones de las redes neuronales en la resolución de este tipo de problema lo constituyen la determinación de la procedencia de

bebidas alcohólicas fabricadas ilegalmente (Aguardiente de Cocuy) a partir de las concentraciones de hierro, cobre y cinc [12] (misma que será presentada en el Capítulo 6); la determinación del origen geográfico de una *muestra de especímenes*¹⁶ de aceite de oliva extra virgen proveniente de distintas regiones de Italia, a través de su análisis por espectrometría de masas [13]; como herramienta de control de calidad de un producto farmacéutico contentivo de l-triptofano (para el tratamiento de la obesidad, el insomnio y la depresión), y que es producido por seis fabricantes diferentes [14]; y la caracterización geoquímica de una muestra de sedimentos mediante análisis por espectroscopía de reflectancia difusa [15], entre otros.

4.5.2. Representación gráfica.

Como su nombre lo sugiere, ésta consiste en la proyección en dos o tres dimensiones, de grupos de objetos dados que pueden compartir o no algunas características que los describen. Lo anterior es particularmente útil cuando se estudia el efecto de más de tres (3) variables sobre la respuesta de un sistema. La estructura original y la información más relevante de los datos no son alteradas, a pesar de dicha transformación, gracias a lo cual es posible establecer relaciones que no se pueden apreciar de otra manera (¡Trate de resolver un problema en cuatro dimensiones solamente y comprenderá la importancia de la reducción espacial!). La red de tipo "cuello de botella", cuya topología está esquematizada en la Figura 4.3, puede ser empleada para la representación gráfica en dos o tres dimensiones, de acuerdo con el número de neuronas que se empleen en la segunda capa escondida [16,17]. Este caso, así como en los que se discuten seguidamente, la red neuronal procurará ajustar los pesos para que la señal resultante se encuentre en el intervalo (continuo) de transición mostrado en la Figura 4.2. La identificación en dos dimensiones de una muestra de especímenes

¹⁶ Desde el punto de vista estadístico, una *muestra* se refiere a un grupo (de tamaño finito) de objetos tomados de una población dada, e. g., una muestra de balones aforados de una fábrica de material de laboratorio. Cada objeto de dicha muestra es, por el contrario, un *especimen*. Ambos términos, sin embargo, suelen emplearse comúnmente sin distinción.

de leche de vaca contaminadas con dioxinas provenientes de cinco regiones de Holanda, se encuentran entre las aplicaciones en este campo [16].

4.5.3. Modelado.

Las redes neuronales son capaces de modelar sistemas, lineales y/o no lineales, mediante el ajuste de los pesos de las neuronas, y con el empleo de las funciones de transferencia adecuadas. Ello representa una importante ventaja frente a "los modelos matemáticos convencionales, particularmente en aquellos casos en los que no se conoce(n) *a priori* la(s) posible(s) relación(es) entre las variables dependiente(s) e independiente(s), o la complejidad del problema es tal que dificulta, e incluso imposibilita, la formulación de dicha(s) relación(es). Se pueden citar como ejemplos el modelado de una curva de calibración no lineal para la determinación de cadmio por espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica [18] (el cual será discutido en el Capítulo 5); el comportamiento de retención de diversos analitos en mezclas de metanol-tetrahidrofurano-agua o metanol-acetonitrilo-agua para su determinación por cromatografía líquida de alto desempeño [19]; y el modelado de las respuestas electroquímicas de la adenina y de la citosina en la región de evolución de hidrógeno para su determinación simultánea mediante voltametría de barrido lineal y polarografía de pulso diferencial [20].

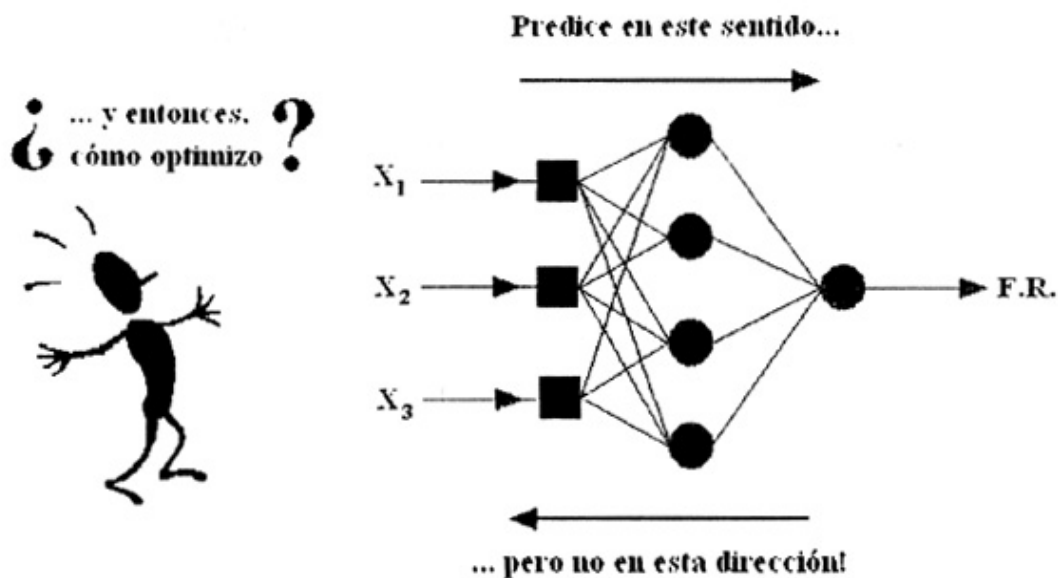
4.5.4. Optimización.

Este aspecto está también relacionado con el discutido previamente. El problema de optimizar consiste en encontrar aquellas condiciones en las que un grupo de variables independientes conducen a la obtención de un máximo o de un mínimo en una variable dependiente, o variable respuesta. De esto se deduce que, previo a la optimización de un sistema, es necesario disponer del modelo que describe la relación entre las variables involucradas. Este modelo, como se vio previamente, puede ser extraído de los datos por la misma red neuronal, por lo que parece lógico el empleo de estas herramientas para la optimización. Sin

embargo, es menester aclarar que, en opinión de este autor, las redes neuronales entrenadas con el algoritmo de retro-propagación *no parecen ser las herramientas mas adecuadas para tal propósito*.

Lo dicho anteriormente requiere que nos detengamos un instante a explicar el por qué. Imagine el lector que se ha desarrollado una red neuronal de dos capas gracias a la cual se dispone de la relación entre tres (3) variables independientes hipotéticas (X_1 , X_2 y X_3) y una función de respuesta dada (F.R.). Optimizar en este caso implica encontrar los valores de X_1 , X_2 y X_3 para los cuales F.R. es la más adecuada. Sin embargo, y como hemos visto previamente (Sección 4.3.2.), la red neuronal sólo funciona en una única dirección y no puede ser empleada para responder directamente a esta pregunta (Figura 4.7.).

Figura 4.7. La optimización mediante una red neuronal entrenada con el algoritmo de retro-propagación no es un proceso “lógico”, debido a que el procesamiento de datos se lleva a cabo de forma unidireccional.



A pesar de lo comentado anteriormente, es posible encontrar algunas implementaciones de las redes neuronales para la optimización de las condiciones analíticas y/o instrumentales para la determinación de aluminio [21] y rutenio [22], empleando sistemas de inyección en flujo y detección espectrofotométrica; la determinación de impurezas en drogas mediante cromatografía de gases [23]; y la selección de la fase móvil en cromatografía de par iónico [24]. La optimización en cada caso se ha llevado a cabo mediante dos aproximaciones diferentes. En el primer caso, los autores han modelado el sistema analítico mediante las redes neuronales y, posteriormente, llevan a cabo lo que denominan un *barrido computacional*, en el cual se introducen nuevamente los datos experimentales y se busca aquella combinación que arroje el valor más alto de la función de respuesta. En el segundo caso se realiza la misma operación pero el barrido computacional da lugar a una *superficie de respuesta*, gracias a la cual es posible, de manera gráfica, determinar las condiciones que maximicen la función de respuesta. Esto último sólo es posible cuando, como en efecto ocurrió, se dispone de máximo dos (2) variables independientes: ¡de lo contrario es imposible graficar! El problema con la implementación de las redes neuronales en este tipo de tareas es el aumento en el tiempo de desarrollo del sistema analítico (¡el cual de por sí puede ser importante cuando se emplean redes neuronales!).

Hay que destacar finalmente que, en este sentido, la gran capacidad de modelado de las redes neuronales puede ser empleada de forma efectiva, aunque quizás no eficientemente, en la optimización de sistemas analíticos. Es por ello que recomendamos al posible usuario que, si está dentro de sus posibilidades, evalúe simultáneamente otros medios, bien sea quimiométricos [25,26] o basados en técnicas de computación inteligente [27-30], de manera de tomar la decisión más acertada.

4.6. Problemas Asociados a las Redes Neuronales Artificiales.

Como toda herramienta, las redes neuronales artificiales no están exentas de problemas. Una de las críticas más importantes deriva de su carácter de "cajas

negras". En algunos casos, particularmente en aquellos en los que el número de neuronas es considerable (desde varias decenas hasta cientos de miles) no es posible "seguir el rastro" de los datos introducidos a través de la capa de entrada. Hay que recordar en este sentido que cada uno de los datos de entrada es transferido a TODAS las neuronas de la capa siguiente, y posteriormente transformado como se explicó en una sección previa. Por esta misma razón, resulta imposible a su vez determinar la importancia de los pesos neuronales, de manera análoga a como se podría hacer, por ejemplo, con los coeficientes de una función lineal discriminante [12]. Adicionalmente, los mismos pesos no poseen un equivalente físico, tal y como lo pueden tener, por ejemplo, el intercepto y la pendiente de una regresión lineal empleada para cuantificar en espectroscopía de absorción atómica [18]. Todo lo anterior se traduce en la incapacidad del usuario de establecer lo que ocurre, matemáticamente hablando, dentro de una red neuronal artificial.

Por otra parte, es preciso destacar el hecho que, para que la red pueda establecer adecuadamente las relaciones correspondientes entre los datos de entrada y salida, es necesario tener un volumen suficientemente grande de datos que permita su segmentación en grupos de entrenamiento, validación y prueba (¡el tamaño SI importa!). Cabe resaltar que no existen reglas pre-establecidas que permitan determinar cuán grande ha de ser la base de datos a emplear en la resolución de un problema en particular. En cualquier caso, su adquisición puede ser una tarea complicada en sí misma, dependiendo de aspectos tales como tiempo y costos de análisis, etc.

El uso de la regla delta generalizada como algoritmo de aprendizaje trae consigo dos problemas. Por una parte es posible que el empleo de la misma no permita la consecución del mínimo/máximo global de la función en el espacio de soluciones N-dimensional o, por el contrario, que la red se "atasque" en un mínimo/máximo local (Figura 4.5). Por otra parte, se ha verificado que la regla delta generalizada prolonga el tiempo de desarrollo (entrenamiento) de las redes neuronales artificiales [31].

Nada de lo anterior, sin embargo, ha detenido a los químicos analíticos en su búsqueda de nuevas aplicaciones. Como lo han planteado algunos autores [18], la veracidad del modelo (en términos físicos) desarrollado por la red puede no ser tan importante como el hecho que la misma pueda ejecutar adecuadamente la tarea para la cual ha sido diseñada. Por otra parte, la disponibilidad de técnicas instrumentales cada vez más sofisticadas usualmente ha venido acompañada de un volumen cada vez mayor de datos derivados de su uso, por lo que la obtención de datos no parece representar un problema *per se*. Finalmente, el hecho que la red neuronal pueda desempeñar su función de forma casi inmediata, una vez ha sido entrenada, compensa hasta cierto punto el problema asociado al tiempo que consume el desarrollo de la misma.

4.7. Conclusiones

Las redes neuronales artificiales pertenecen al grupo de técnicas de computación inteligente que pueden ser empleadas en la resolución de numerosos tareas, e. g., clasificación, representación gráfica, modelado y optimización. Una de las ventajas más importantes de estas herramientas es que su implementación no requiere del conocimiento *a priori* del sistema a estudiar. Lo anterior, sin embargo, no quiere decir que las mismas sean una suerte de panacea para la resolución de todos los problemas. La aplicación y el correcto desempeño de las mismas dependerán, como ocurre, en cualquier caso, de las necesidades del usuario y del escrutinio con el cual éste lleve a cabo su desarrollo.

4.8. Referencias del Capítulo 4.

- [1] Brown S. D., and Bear, Jr., R. S., Crit. Rev. Anal. Chem. 24 (1993) 99
- [2] J. Aguilar Castro, F. Rivas Echeverría, Introducción a las Técnicas de Computación Inteligente, Universidad de Los Andes, Venezuela, 2001.
- [3] J. Zupan, J. Gasteiger, Neural Networks in Chemistry and Drug Design, Wiley-VCH, 2nd Ed., Germany, 1999.

- [4] N. K. Bose, P. Liang, Neural Networks Fundamentals with Graphs, Algorithms, and Applications, McGraw-Hill, Inc., USA, 1996.
- [5] S. Haykin, Neural Networks. A Comprehensive Foundation, Macmillan College Publishing Company, Inc., USA, 1994.
- [6] B. J. WythotT, Chemom. Intell. Lab. Syst. 18(1993) 115
- [7] J. R. M. Smits, W. J. Melssen, L. M. C. Buydens, G. Kateman, Chemom. Intell. Lab. Syst. 22 (1994) 165
- [8] J. A. Burns, G. M. Whitesides, Chem. Rev. 93 (1993) 2583
- [9] J. Gasteiger, J. Zupan, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32 (1993) 503
- [10] J. Zupan, J. Gasteiger, Anal. Chim. Acta 248 (1991) 1
- [11] Propagator™, Neural Network Development Software, Version 1.0 for Windows, ARD Corp., USA, 1993.
- [12] E. A. Hernández-Caraballo, R. M. Avila-Gómez, T. Capote, F. Rivas, A. G. Pérez, Talanta 60 (2003) 1259-1267
- [13] G. J. Salter, M. Lazzari, L. Giansante, R. Goodacre, A. Jones, G. Surricchio, D. B. Kell, G. Bianchi, 1. Anal. Appl. Pyrolysis 40-41 (1997) 159
- [14] W. J. Welsh, W. Lin, S. H. Tersigni, E. Collantes, R. Duta, M. S. Carey, W. L. Zielinski, J. Brower, J. A. Spencer, T. P. Layloff, Anal. Chem. 68 (1996) 3473
- [15] T. Udelhoven, B. Schütt, Chemom. Intell. Lab. Syst. 51 (2000) 9
- [16] P. Cleij, R. Hoogerbrugge, Anal. Chim. Acta 348 (1997) 495
- [17] M. Daszykowski, B. Walczak, D. L. Massart, Chemom. Intell. Lab. Syst. 65 (2003) 97
- [18] E. A. Hernández-Caraballo, R. M. Avila-Górnez, F. Rivas, M. Burguera, J. L. Burguera, Talanta (2003).
- [19] R. H. Zhao, B. F. Yue, J. Y. Ni, H. F. Ihou, Y. K. Zhang, Chemom. Intell. Lab. Syst. 45 (1999) 163
- [20] E. Cukrowska, L. Trnková, R. Kizek, J. Havel, J. Electroanal. Chem. 503 (2001) 117
- [21] Y. Zhou, H. Wang, G. Sun, Y. Fan, X. Chen, Z. Hu, Fresenius J. Anal. Chem. 366 (2000) 17

- [22] H. Wang, Y. Zhou, Y. Zhao, Q. Li, X. Chen, Z. Hu, *Anal. Chim. Acta* 429 (2001) 207
- [23] W. Guo, P. Zhu, H. Brodowsky, *Talanta* 44 (1997) 1995
- [24] J. V. S. Gobburu, W. L. Shelver, W. H. Shelver, *J. Liquid Chrom.* 18 (1995) 1957
- [25] L. M. B. C. Alvarez-Ribeiro, A. A. S. C. Machado, J. Alonso, J. Bartroli, M. del Valle, *Talanta* 40 (1993) 1113
- [26] R. J. Cassella, O. D. de San't Ana, R. E. Santelli, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1967
- [27] J. Ruisánchez, J. Lozano, M. S. Larrechi, F. X. Rius, J. Zupan, *Anal. Chim. Acta* 348 (1997) 113
- [28] B. Divjak, M. Moder, J. Zupan, *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 305
- [29] J. de García, A. Araujo, J. L. F. C. Lima, I. Villaescusa, M. Poch, *Anal. Chim. Acta* 402 (1999) 275
- [30] E. R. Pereira-Filho, C. Mello, P. A. Costa Filho, M. A. Z. Arruda, R. J. Poppi, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 111
- [31] E. P. P. A. Derks, L. M. C. Buydens, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 41 (1998) 171

Capítulo 5. Aplicaciones de las redes neuronales artificiales en química analítica.

Extensión del intervalo de trabajo mediante redes neuronales artificiales para la determinación de cadmio por espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica. ◇

5.1. Resumen.

Se evaluó la aplicabilidad de las redes neuronales artificiales entrenadas con la regla delta generalizada con el objeto de modelar el carácter no lineal de las curvas de calibración que se observan en la espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica, y aumentar así el intervalo de trabajo en dicha técnica. Se escogió al cadmio como elemento de estudio debido a que el mismo presenta un intervalo lineal muy estrecho (hasta $4.0 \mu\text{g L}^{-1}$). Se evaluaron con ese propósito diferentes redes neuronales de dos capas activas, constituidas por un nodo en la capa de entrada (función de transferencia lineal), un número variable de neuronas en la capa escondida (función de transferencia sigmoideal) y una neurona en la capa de salida (función de transferencia lineal). La red (1:2:1) fue seleccionada sobre la base de su capacidad para modelar adecuadamente la curva de trabajo en el intervalo de estudio ($0\text{-}22.0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd}$). Lo anterior se tradujo en un incremento de hasta 6 veces del intervalo de trabajo. La determinación de cadmio se llevó a cabo en el material estándar de referencia "Trace Metals in Drinking Water" (High Purity Standards, Lot N° 490915) a cuatro niveles de concentración ($2.0, 4.0, 8.0$ y $12.0 \mu\text{g L}^{-1} \text{Cd}$), los cuales se encontraban dentro y fuera del intervalo dinámico lineal. No se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los resultados esperados y los obtenidos mediante la simulación de redes neuronales. La precisión en todos los casos fue $\leq 2.5 \%$ (DER). El método propuesto fue comparado con la aproximación más convencional de "dilución", y con el modelado de la curva de calibración con un polinomio de segundo orden. El

◇ E. A. Hernández-Caraballo, R. M. Ávila-Gómez, F. Rivas, M. Burguera, J. L. Burguera, Talanta 62 (2004) 425-431

modelado mediante redes neuronales artificiales ofrece las siguientes ventajas: *i*) una reducción en la manipulación de las muestras (gracias a la extensión del intervalo de trabajo de la curva de calibración), y *ii*) una mayor exactitud (motivado al ajuste de la curva).

5.2. Introducción.

La espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica (GFAAS) es, actualmente, una de las técnicas espectroscópicas más poderosas con las que cuenta el analista para la determinación de elementos a niveles de trazas (ng/pg). Dicha técnica se caracteriza por su alta sensibilidad, alta tolerancia hacia las interferencias, un consumo reducido de muestra, y una alta versatilidad para el análisis directo de sólidos, líquidos, suspensiones, etc. A pesar de lo anterior, la misma sufre, entre otras, de una importante desventaja, i.e., intervalos lineales estrechos [1]. En este sentido, es interesante destacar que, mientras que los intervalos lineales en técnicas como la espectroscopía de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES) o la fluorescencia de rayos-X con geometría de reflexión total (TXRF) se extienden hasta 4 ó 6 órdenes de magnitud [2,3], en GFAAS sólo se alcanzan hasta 2 órdenes de magnitud [1]. Aun cuando es posible trabajar en la porción no lineal de la curva de trabajo, ello puede conducir a una reducción de la exactitud del análisis [4]. Por esta razón, el analista se ve usualmente forzado a diluir la(s) muestra(s) con el objeto de llevar la concentración del analito dentro del intervalo lineal. Evidentemente, además de ser una práctica laboriosa, la misma trae consigo el riesgo de contaminación de la(s) muestra(s) durante el proceso.

Con el objeto de salvar las desventajas mencionadas anteriormente se han propuesto diversas aproximaciones analíticas, instrumental es y matemáticas. Entre ellas caben mencionar: la cuantificación empleando el área de pico en lugar de la altura [5]; el uso de atomizadores a alta presión [6,7]; el empleo de líneas de absorción no resonantes [8,9]; la aplicación de un flujo de argón no interrumpido durante la etapa de atomización [8]; la atomización desde distintas superficies

(pared o plataforma) [8,9]; la corrección matemática de la causa de la desviación de la linealidad [10-12]; y menos frecuentemente, el modelado de las curvas de trabajo con algoritmos polinómicos [4,13,14].

Las redes neuronales artificiales representan un medio alternativo para el modelado de sistemas no lineales [15-18]. Por lo tanto, en primera instancia, las mismas podrían ser empleadas para modelar el comportamiento no lineal de las curvas de calibración en espectroscopía de absorción atómica. Si bien es cierto que las redes neuronales han sido ampliamente utilizadas en este sentido en algunas aplicaciones espectrofotométricas [19- 22], su uso en el campo de la espectroscopía atómica a sido limitado [23-25].

El propósito del presente trabajo es la aplicación de las redes neuronales artificiales en el modelado de las curvas de trabajo en GFAAS, con el de trabajo de la técnica. En este sentido, se seleccionó al cadmio como elemento de estudio debido a que el mismo posee un intervalo lineal marcadamente estrecho. La exactitud y la precisión del método fueron evaluadas mediante la determinación de cadmio en el patrón de referencia "Trace Metals in Drinking Water" (High Purity Standards). El desempeño de las redes neuronales fue comparado con el del método convencional de dilución y con el modelado de la curva de trabajo mediante un ajuste polinómico de segundo orden.

5.3. Experimental.

5.3.1. Equipos, accesorios y paquetes computacionales.

Se utilizó un espectrómetro de absorción atómica marca Perkin-Elmer, modelo 2100, provisto de un módulo de atomización electrotérmica modelo HGA-700, un sistema automático de inyección modelo AS-70, y corrección de fondo continua (lámpara de deuterio). Se emplearon tubos de grafito recubiertos con grafito pirolítico, los cuales constan de ranuras de inserción para plataformas de grafito pirolítico total, ambos marca Perkin-Elmer. Tanto los tubos como las plataformas fueron acondicionados previo a su utilización de acuerdo con las

instrucciones del fabricante [26]. Todas las mediciones se realizaron a la longitud de onda de principal del cadmio (228.8 nm) empleando una lámpara monoelemental del mismo elemento, marca Varian, operada a 6 mA.

Las redes neuronales fueron desarrolladas con el paquete computacional PROPAGATOR 1.0 (ARD Corporation, USA) [27]. Este programa genera una lista de pesos una vez concluido el periodo de entrenamiento de las redes. Dichos pesos, junto con las correspondientes funciones de transferencia de las diversas capas que constituyen a una red determinada fueron procesados posteriormente mediante EXCEL 2002 (Microsoft Corp., USA), bajo el ambiente Windows Me (Microsoft Corp., USA), para la obtención de las respuestas de las redes neuronales. La evaluación estadística, así como los ajustes lineales y polinómicos fueron llevados a cabo con MINITAB Statistical Software v. 13.1 (Minitab Inc., USA).

5.3.2. Reactivos y materiales.

Se empleó cadmio metálico en polvo (Merck, pro analysis) para la preparación de la solución madre del analito. Se utilizó una solución de paladio al 10 % (Aldrich), y nitrato de magnesio hexahidratado (Carlo Erba) como modificadores químicos. Se usó ácido nítrico de alta pureza (Alfa Aesar, 99.999 % pureza) en la estabilización y dilución de las soluciones de trabajo. En todos los casos se usó agua destilada y des-ionizada (Milipore), con una resistencia de $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, en la preparación de las soluciones correspondientes.

Para verificar la exactitud del método se utilizó el material de referencia "Trace Metals in Drinking Water" (High Purity Standards, Lote No. 490915), el cual posee una concentración certificada de cadmio de $12 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\pm 0.5\%$) [28].

5.4. Procedimiento.

5.4.1. Preparación de las soluciones de trabajo.

Se preparó una solución de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cadmio mediante pesada directa del polvo metálico y su posterior disolución en 1.0% HNO_3 . Los patrones de cadmio se prepararon mediante dilución adecuada de la solución anterior en 0.2% HNO_3 . En este sentido, se prepararon un total de quince (15) patrones con las siguientes concentraciones de cadmio: 0 (blanco), 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, 18.0, 20.0 y $22.0 \mu\text{g L}^{-1}$. Se preparó una solución de $6000 \mu\text{g L}^{-1}$ de nitrato de magnesio pesando una cantidad exacta de la sal hexahidratada (1.037 g) y disolviendo en 100 ml con una solución de 0.2% HNO_3 . Se preparó una solución conteniendo $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de paladio y $300 \mu\text{g L}^{-1}$ de nitrato de magnesio para ser utilizada como modificador químico. La concentración del modificador fue seleccionada sobre la base de ensayos preliminares, con el objeto de corregir una distorsión del perfil de atomización del analito en el material de referencia.

A partir de la solución original del material de referencia se prepararon soluciones con concentraciones de cadmio a cuatro niveles, a saber, 2.0, 4.0, 8.0 y $12.0 \mu\text{g L}^{-1}$. Estas fueron seleccionadas para yacer dentro y fuera del intervalo lineal de la curva de calibración.

5.4.2. Determinación de cadmio por GFAAS.

Para la determinación de cadmio por GFAAS se procedió a inyectar $10 \mu\text{L}$ del patrón/muestra, seguido de $10 \mu\text{L}$ del modificador químico sobre la plataforma de grafito previamente calentada a 100°C . El programa de calentamiento optimizado se muestra en la Tabla 5.1. El uso de una etapa de secado a alta temperatura (200°C) tuvo como objeto reducir la duración del programa. Se introdujo una etapa de enfriamiento previo a la atomización con el propósito de promover la atomización del analito en un ambiente termodinámicamente más favorable [29,30]. El flujo de gas de purga fue interrumpido en la etapa previa a la

atomización con el fin de garantizar la ausencia de corrientes convectivas durante dicha etapa y aumentar así el tiempo de residencia del analito. Todas las temperaturas reportadas a lo largo del trabajo se refieren a valores nominales provistos por el programa que controla al espectrómetro. Los valores reportados corresponden al promedio de cinco (5) réplicas tomadas consecutivamente.

Tabla 5.1. Programa de atomización para la determinación de Cd por GFAAS^(a)

Etapas	Temp. (°C)	Rampa (s)	Duración (s)
Secado	200	20	5
Pirólisis	800	5	15
Enfriamiento I	50	1	5
Enfriamiento II ^(b)	50	1	5
Atomización ^(b)	1400	0	3(Leer)
Limpieza	2500	1	3
Enfriamiento	20	1	8

^(a) Temperatura de inyección: 100 °C; velocidad de inyección: 40%

^(b) Flujo interrumpido (0 ml min⁻¹ Ar), excepto en todas las demás etapas (300 ml min⁻¹ Ar)

La determinación de cadmio se llevó a cabo mediante tres métodos: *i)* dilución del material de referencia para que la concentración del analito se encuentre dentro del intervalo lineal de la curva de calibración (Método 1); *ii)* modelado de la curva de calibración mediante un polinomio de segundo orden (Método 2), y modelado mediante redes neuronales artificiales (Método 3).

5.4.3. Características de las redes neuronales.

Se evaluaron un grupo de redes neuronales artificiales constituidas por un nodo en la capa de entrada (función de transferencia lineal), un número variable de neuronas en la capa escondida (función de transferencia sigmoideal), y una neurona en la capa de salida (función de transferencia lineal). A lo largo del trabajo se emplea el código (1: n :1) para describir la topología de las redes (n representa el número de neuronas en la capa escondida). El entrenamiento y la validación de las diversas redes estudiadas fue llevado a cabo de manera supervisada, utilizando para tal fin el área de pico (absorbancia integrada) como dato de entrada, y la concentración (normalizada) de cadmio como dato de salida. Las diferentes redes fueron entrenadas/validadas por un número variable de ciclos (10^4 - 10^5). El programa empleado para el desarrollo de las redes neuronales utiliza la regla delta generalizada para el ajuste de los pesos de las neuronas de las diversas capas activas [27].

Ensayos preliminares mostraron que una tasa de aprendizaje de 0.04 y un factor de momento de 0.4, así como el empleo de la concentración normalizada de cadmio, redundaron en los menores errores cuadráticos medios. El entrenamiento de las redes se realizó empleando un grupo de patrones que cubren el intervalo de trabajo (45 pares Absorbancia integrada-concentración). Por otra parte, se utilizó un grupo de 30 patrones con el objeto de evitar el sobre-entrenamiento de las redes en cuestión (validación). El ajuste de los pesos para una topología en particular se llevó a cabo al menos tres (3) veces, con el propósito de evitar que la red quedase estancada en un mínimo local durante el proceso de entrenamiento. Los pesos iniciales fueron escogidos aleatoriamente por el paquete computacional en el intervalo comprendido entre -1.0 y 1.0.

Se empleó el error cuadrático medio (mean squared error, MSE) para determinar la topología más adecuada para el modelado de la curva de calibración (ver ecuación 1) [27].

$$MSE = \left[\frac{\sum_i (d_i - o_i)^2}{n} \right] \quad (1)$$

En dicha ecuación, d_i y o_i representan a la concentración nominal y la predicha por la red para el i -ésimo patrón, respectivamente, y n corresponde al número de pares de datos entrada-salida utilizados para entrenar y/o validar a una red dada. La topología seleccionada fue aquella cuyo error cuadrático medio se aproximó más al error promedio correspondiente al entrenamiento.

El desempeño de la red neuronal finalmente seleccionada para la determinación de cadmio por GFAAS fue conducido de dos maneras. En primer lugar, a través de la evaluación de la calidad del ajuste de un modelo de regresión lineal de la concentración de cadmio predicha por la red neuronal versus la concentración real (nominal) de las soluciones de trabajo. La bondad del ajuste de dicho modelo fue evaluado igualmente a través de la estimación del error cuadrático medio de las desviaciones porcentuales (mean squared error of the percentage deviations, RMSPD), el cual fue estimado de acuerdo a la ecuación (2) [13,31]:

$$RMSPD = \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{C_{Pred}^i - C_{Real}^i}{C_{Real}^i} \times 100 \right)^2 \right)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

en donde C_{Pred}^i y C_{Real}^i corresponden a la concentración predicha y nominal del i -ésimo patrón, respectivamente, y N es el número de puntos empleados en la construcción de la curva de calibración, excluyendo al blanco. En segundo lugar, la evaluación se llevó a cabo empleando el modelo generado por la red neuronal seleccionada para la determinación de cadmio en el material certificado de referencia a los cuatro (4) niveles de concentración descritos en la sección anterior.

5.5. Resultados y discusiones.

5.5.1. Evaluación del intervalo de trabajo de cadmio en GFAAS.

La Figura 5.1 muestra claramente el comportamiento no lineal de la señal de absorbancia integrada de cadmio al aumentar la concentración en el intervalo de estudio (0 a 22.0 $\mu\text{g L}^{-1}$). La precisión de las mediciones en dicho intervalo fue $\leq 2.5\%$, excepto a una concentración de 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (%RSD = 4.0) lo cual es aún analíticamente aceptable. Por encima de este valor, la señal de absorbancia integrada se hace independiente de la concentración, por lo cual dichos puntos no fueron considerados para el estudio. Los datos fueron ajustados mediante un polinomio de segundo orden descrito por la siguiente ecuación ($r^2 = 0.9988$):

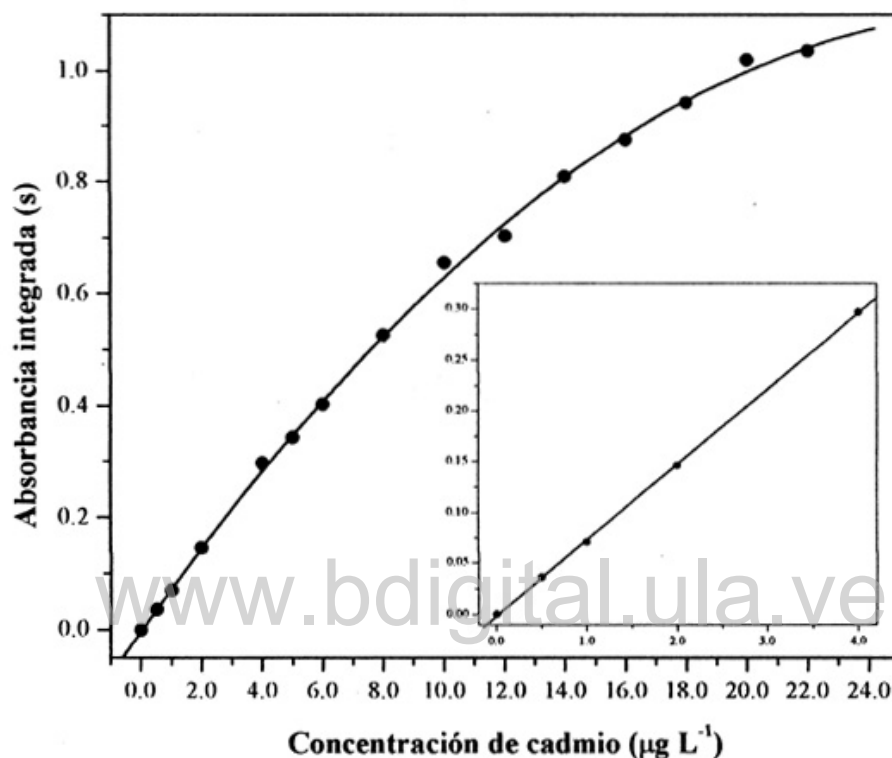
$$A_i = -0.0013[\text{Cd}]^2 + 0.0761[\text{Cd}] - 0.0002 \quad (3)$$

La bondad del ajuste fue evaluada, en primer lugar, mediante el coeficiente de determinación ajustado (adjusted coefficient of determination, r^2) [32]. Este parámetro toma en cuenta la variación en el número de grados de libertad que experimentan los residual es con la inclusión del término cuadrático en la expresión (3). Por lo tanto, el mismo es un reflejo estadístico más preciso del ajuste que el coeficiente de determinación (r^2) empleado regularmente en un análisis por regresión lineal [32], y que ha sido empleado erróneamente por otros autores [33].

El intervalo lineal para el cadmio es significativamente corto, extendiéndose sólo hasta 4.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ver el inserto en la Figura 5.1). La regresión lineal que mejor describe a la variación de la absorbancia integrada en función de la concentración de cadmio viene descrita por la ecuación ($r^2 = 0.9998$):

$$A_i = 0.0745[\text{Cd}] - 0.0019 \quad (4)$$

Figura 5.1. Variación de la señal analítica del cadmio (absorbancia integrada) en función de la concentración. La línea representa un ajuste polinómico de segundo orden. El gráfico inserto muestra el intervalo dinámico lineal.



La inclusión de par de datos adicionales (A_i -[Cd]) deteriora la calidad del ajuste ($r^2 = 0.9967$). El hecho que el intervalo lineal sea tan estrecho implica que aquellas soluciones de trabajo con una concentración de cadmio que exceda al límite superior de dicho intervalo deben ser diluidas, trayendo consigo todos los problemas mencionados con anterioridad. Una alternativa que se podría implementar para soslayar dichas dificultades podría ser extender el intervalo de trabajo a través del modelado de la curva (no lineal) de calibración mediante redes neuronales artificiales.

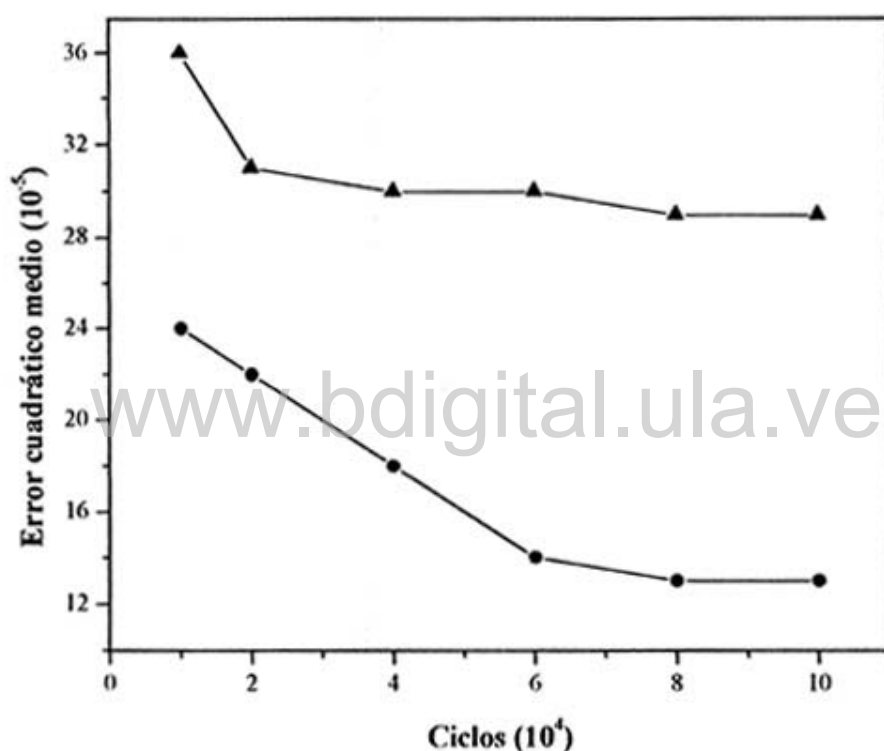
5.5.2. Modelando la curva de calibración mediante redes neuronales.

El uso de redes neuronales en espectroscopía de absorción atómica es muy escaso [23-25]. En este sentido, Vander Heyden et al. desarrollaron una red neuronal de tipo Kohonen para diagnosticar la calidad de las curvas de calibración [24]. Dicha aproximación tuvo como fin determinar si existen valores anómalos (outliers) en la curva de calibración, o si la misma se desvía de la linealidad. El presente trabajo difiere del anterior en dos aspectos significativos. En primer lugar, se emplea una red neuronal artificial entrenada con la regla delta generalizada, lo cual requiere de un entrenamiento supervisado (la red de Kohonen es entrenada sin supervisión [34]). En segundo lugar, se persigue modelar la curva de calibración de manera de incluir la porción no lineal de la misma, y extender con ello el intervalo de trabajo para la determinación de cadmio por GFAAS.

Diversas topologías fueron evaluadas con el fin de modelar la curva de calibración mostrada en la Figura 5.1. Las variables a optimizar fueron el número de neuronas en la capa escondida y el número de ciclos de entrenamiento. El criterio inicial para selección de la red neuronal fue la reducción del error cuadrático medio. La Figura 5.2 muestra la tendencia en los errores cuadráticos medios correspondientes al grupo de patrones de entrenamiento y al de validación para la red del tipo (1:2:1). Solo los datos correspondientes a dicha red son presentados porque se halló que aumentar el número de neuronas en la capa escondida no condujo a una mejora significativa del desempeño de las otras redes. Adicionalmente, el empleo de redes neuronales más complejas (con más neuronas) solo habría complicado el procesamiento posterior de los datos. Se puede apreciar que el error para el grupo de datos de entrenamiento prácticamente se estabiliza después de aproximadamente 4×10^4 ciclos; mientras que para el grupo de validación no se observa una variación importante tras 8×10^4 ciclos. Por encima de 10^5 ciclos no se aprecia ninguna reducción en el error cuadrático medio, por lo que el entrenamiento no prosiguió más allá de ese punto. El tiempo que tomó completar el entrenamiento osciló entre 15 y 27 segundos en

una computadora equipada con un procesador Pentium III, por lo que el desarrollo de las redes neuronales, en este caso en particular, fue un proceso relativamente rápido.

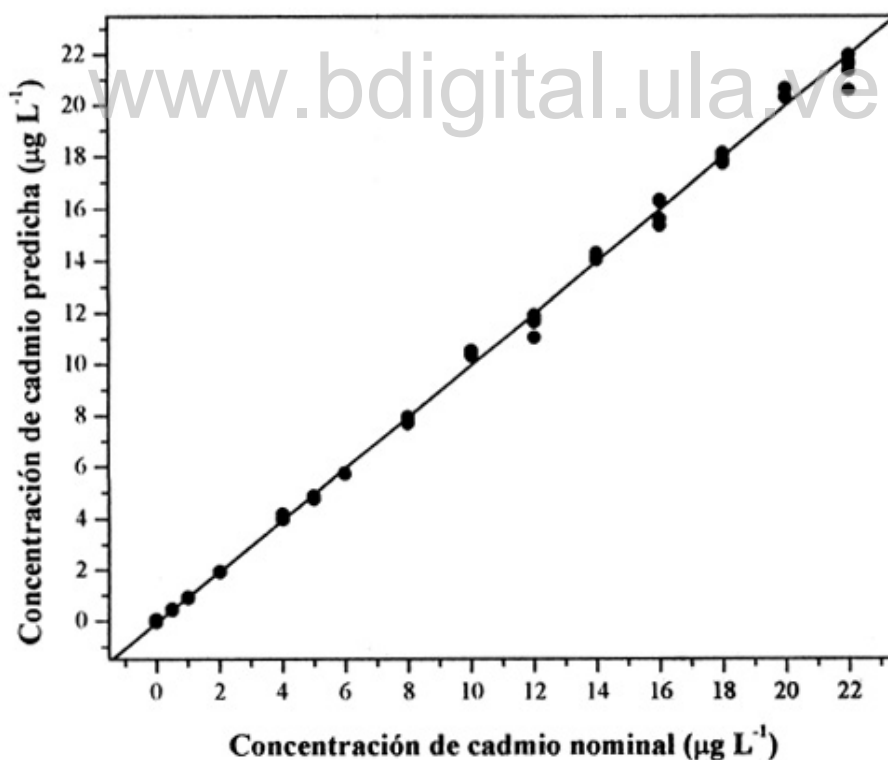
Figura 5.2. Error cuadrático medio para el grupo de datos (patrones) de entrenamiento (▲) y uno de validación (●) para la red neuronal del tipo (1:2:1)



Si bien la reducción del error cuadrático medio es un aspecto importante a considerar en la selección de la topología de la red más adecuada, también es fundamental evaluar la capacidad de generalización de la red en cuestión. Con este fin, se tomaron un grupo de treinta (30) datos de absorbancia integrada correspondientes a las soluciones de trabajo de todo el intervalo de la curva de calibración, y se introdujeron como datos de entrada a la red (1:2:1). Las salidas de la red (concentración de cadmio predicha) fueron graficadas contra los valores

de concentración nominales para cada una de dichas soluciones, tal y como se muestra en la Figura 5.3. El modelo de regresión lineal obtenido satisface la ecuación $[Cd]_{Pred} = 1.003[Cd]_{Real} - 0.058$ ($r^2=0.999$). El análisis estadístico (t-Student) reveló que el intercepto y la pendiente no difieren significativamente ($p \leq 0.05$) de cero y uno, respectivamente, indicando la calidad del modelo generado por la red neuronal. El error cuadrático medio de las desviaciones porcentuales (ecuación 2) fue de 4.3%, lo cual muestra la capacidad de esta red neuronal para modelar la no linealidad de la curva de calibración mostrada en la Figura 5.1.

Figura 5.3. Comparación entre la concentración de cadmio predicha por la red (1:2:1) y la concentración nominal para un grupo de soluciones a lo largo del intervalo de trabajo.



5.5.3. Determinación de Cd en el material de referencia mediante GFAAS.

Resulta razonable pensar que, dado que la concentración de cadmio en el material de referencia ($12.0 \mu\text{g L}^{-1}$) se encuentra por encima del intervalo lineal, la dilución de dicho material sería la primera aproximación para la determinación de cadmio por GFAAS. Los resultados obtenidos por esta vía se encuentran en la Tabla 5.2. El análisis estadístico (t-Student) no reveló diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las concentraciones obtenidas y las esperadas.

El ajuste polinómico de una curva no lineal es un método relativamente simple y rápido, el cual puede ser implementado prácticamente con cualquier paquete computacional matemático. Hay que destacar, sin embargo, que de acuerdo con L'vov [10], dicho método de calibración no debería ser empleado, por cuanto los coeficientes de ajuste carecen de significado físico. Si bien dicha observación es correcta, nosotros consideramos que un ajuste adecuado, al tiempo que la facilidad y la rapidez con la que se puede implementar esta aproximación hacen del ajuste polinómico una alternativa interesante que puede ser aplicado en el trabajo de rutina.

La determinación de cadmio en el material de referencia se llevó a cabo tras ajustar con un polinomio de segundo orden la curva mostrada en la Figura 5.1. El análisis de los resultados que se muestran en la Tabla 5.2 no reveló diferencias significativas excepto a la concentración de trabajo más elevada ($12 \mu\text{g L}^{-1}$). Se realizaron intentos con el objeto de mejorar la exactitud de las mediciones, i.e., mediante el ajuste de segundo orden de la porción no lineal de la curva, aunque no se tuvo éxito en ese sentido. Por lo tanto, a pesar de la aparente calidad del ajuste de dicho polinomio, el mismo no es adecuado para el caso estudiado. Otros autores han reportado problemas asociados con la exactitud de las determinaciones en la porción no lineal de las curvas de calibración [4], sin embargo, este tipo de ajustes ha sido empleado exitosamente en otras ocasiones [33]. Finalmente, se realizó la determinación de cadmio empleando el modelo generado por la red neuronal artificial (ver Tabla 5.2). Contrario al caso anterior, no

se hallaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) para ninguna de las soluciones de trabajo.

Tabla 5.2. Determinación de Cd en el material de referencia “Trace Metals in Drinking Water” mediante GFAAS, empleando diferentes aproximaciones

Conc. Cadmio ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Método ^(a)		
	Dilución	Ajuste polinómico	ANN (1:2:1)
2.0	2.09 ± 0.03 (1.4)	2.10 ± 0.03 (1.4)	2.03 ± 0.03 (1.4)
4.0	4.00 ± 0.04 (1.0)	4.19 ± 0.04 (1.0)	4.08 ± 0.04 (1.1)
8.0	----	8.05 ± 0.11 (1.4)	7.90 ± 0.12 (1.5)
12.0	----	$12.35 \pm 0.08^{(*)}$ (0.6)	12.30 ± 0.08 (0.6)

^(a) Los valores corresponden al promedio $\pm$ desviación estándar (N= 5). La desviación estándar relativa (%RSD) se muestra en paréntesis.

^(*) Diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Los resultados presentados indican que el intervalo de trabajo puede ser extendido mediante el modelado de la correspondiente curva de calibración por redes neuronales artificiales sin perder exactitud o precisión en el proceso. Para el caso específico de la determinación de cadmio por GFAAS fue posible extender dicho intervalo por un factor de seis (6). Un aspecto importante es que la alta

sensibilidad de las mediciones en la porción lineal de la curva se mantiene. Esto permite la determinación de cadmio a bajas (porción lineal) y a moderadamente altas (porción no lineal) concentraciones con la misma curva de calibración. Lo anterior no es posible con algunos métodos que recurren a una disminución de la sensibilidad de las mediciones con el objeto de aumentar el intervalo lineal, con lo cual sólo es posible la determinación de aquellos elementos que se encuentren presentes en altas concentraciones [8,9], pero no así aquellos que se hallen en bajas concentraciones. Otra ventaja de modelar con las redes neuronales es que, en general, no se necesita un conocimiento detallado del sistema, como el que se requeriría para la implementación de los llamados modelos matemáticos "rígidos" (hard models).

Es importante destacar que, análoga mente a lo que ocurre con los coeficientes del polinomio de segundo orden, los pesos de las neuronas en una red neuronal artificial carecen de significado físico. Más aún, mientras que una red neuronal puede modelar prácticamente cualquier sistema, no es posible traducir dicho modelo en una expresión matemática, particularmente cuando se trata de redes que constan de un número importante de neuronas. Esta es de hecho una de las críticas más importantes de las redes neuronales artificiales, es decir, su carácter de "cajas negras". Sin embargo, queremos reiterar que dichos modelos pueden ser empleados con propósitos prácticos, por ejemplo en análisis de rutina, siempre y cuando los mismos provean resultados con un grado de exactitud y precisión aceptables para el analista. El modelado de las curvas de calibración mediante redes neuronales puede ser una alternativa en el análisis multi-elemental simultáneo por GFAAS, en donde la selección del factor de dilución para la determinación de varios analitos en una misma muestra es más crítico que cuando se aplican otras técnicas instrumentales de análisis, como ICP-OES, TXRF, etc., debido a su intervalo lineal intrínsecamente corto.

5.6. Conclusiones.

Se evaluó exitosamente el empleo de una red neuronal artificial para el modelado de la curva de calibración y la extensión del intervalo de trabajo en la determinación de cadmio mediante GFAAS. Un aspecto interesante que destacar es que, contrario a otros métodos instrumentales hasta ahora desarrollados, el modelado mediante redes neuronales permite preservar la sensibilidad de las mediciones en la porción lineal de la curva de calibración. Este aspecto puede ser de importancia en aquellos casos en los que la concentración del analito varíe de tal manera que una alta sensibilidad sea requerida para el análisis de ciertas muestras, en tanto que, en otras, sea necesaria la dilución de las mismas. Paralelamente se evaluó el ajuste de la curva de calibración mediante un polinomio de segundo orden. Si bien dicho método es muy sencillo y rápido de implementar, el mismo puede arrojar resultados inexactos debido a un ajuste inadecuado. El modelado mediante redes neuronales representa una alternativa interesante para lidiar con el reducido intervalo lineal que se observa en el análisis multielemental simultáneo mediante GF AAS, y que demanda de condiciones de compromiso cuando se desea llevar a cabo un análisis multielemental de la misma muestra.

5.7. Referencias del Capítulo 5.

- [1] L. de Gahin, J. Anal. At. Spectrom. 2 (1987) 89
- [2] R. B. Boss, K. J. Fredeen, Chapter 2. General characteristics of ICP-OES, en *Concepts, instrumentation, and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, pp. 2-12, Perkin-Elmer Corp., USA, 1999
- [3] R. P. Petterson, Chapter 3. TXRF, en *Design of a total-reflection X-ray fluorescence spectrometer and application to periphyton communities*, PhD. Thesis (Chalmers University of Technology and Göteborg University, Sweden), pp. 8-11, 1997
- [4] J. M. Marchante Gayón, A. Sanz-Medel, C. Fellows, P. Rock, J. Anal. At. Spectrom. 7 (1992) 1079

- [5] R. E. Sturgeon, C. L. Chakrabarti, I. S. Maines, P. C. Bertels, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1250
- [6] R. E. Sturgeon, C. L. Chakrabarti, P. C. Bertels, *Spectrochim. Acta Part B* 32 (1977) 257
- [7] C. M. Smith, J. M. Harnly, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 187
- [8] M. A. Belarra, M. Resano, J. R. Castillo, *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 697
- [9] J. B. Borda da Silva, M. B. Oss Giacomelli, I. Gonçalves de Souza, *Anal. Chim. Acta* 401 (1999) 307
- [10] B. V. L'vov, L. K. Polzik, N. V. Kocharova, *Spectrochim. Acta Part B* 47 (1992) 889
- [11] E. G. Su, A. I. Yuzefovsky, R. G. Michel, J. T. McCaffrey, W. Slavin, *Spectrochim. Acta Part B* 49 (1994) 367
- [12] A. I. Yuzefovsky, R. F. Lonardo, J. X. Zhou, R. G. Michel, *Appl. Spectrosc.* 51 (1997) 738
- [13] S. R. Bysouth, J. F. Tyson, *J. Anal. At. Spectrom.* 1 (1986) 85
- [14] H. C. Wagenaar, L. de Galan, *Spectrochim. Acta Part B* 30 (1975) 361
- [15] J. R. Long, V. G. Gregoriu, P. J. Gemperline, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1791
- [16] Z. Li, Z. Cheng, L. Xu, T. Li, *Anal. Chem.* 65 (1993) 393
- [17] T. B. Black, S. D. Brown, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3081
- [18] L. Hadjiiski, P. Geladi, P. Hopke, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 49 (1999) 91
- [19] Y. Ni, C. Liu, *Anal. Chim. Acta* 396 (1996) 221
- [20] A. Safavi, G. Absalan, S. Maesum, *Anal. Chim. Acta* 432 (2001) 229
- [21] G. Absalan, A. Safavi, S. Maesum, *Talanta* 55 (2001) 1227
- [22] Y. Zhou, A. Yan, H. Xu, K. Wang, X. Chen, Z. Hu, *Analyst* 125 (2000) 2376
- [23] C. Schierle, M. Otto, *Fresenius J. Anal. Chem.* 344 (1992) 190
- [24] Y. Vander Heyden, P. Vankeerberghen, M. Novic, J. Zupan, D. L. Massart, *Talanta* 51 (2001) 455
- [25] R. Zhang, X. Chen, S. Chen, Z. Bu, *Fenxi Huaxue* 24 (1996) 724

- [26] HGA-700 Graphite Furnace Operator' s Manual, Perkin-Elmer Corp., Part No. B017-4145, 1990.
- [27] Propagator™, Neural Network Development Software, Version 1.0 for Windows, ARD Corp., USA, 1993
- [28] HPS Certified Reference Material "Trace Metals in Drinking Water", *Certificate of Analysis*, High Purity Standards (Charleston, SC, USA).
- [29] E. A. Hernández Caraballo, J. R. Domínguez, J. Alvarado, *Al. Spectrosc.* 21 (2000) 132
- [30] E. A. Hernández Caraballo, J. R. Domínguez, J. Alvarado, *At. Spectrosc.* 22 (2001) 295
- [31] N. J. Millar-Ihli, T. C. O'Haver, J. M. Harnly, *Spectrochim. Acta Part B* 39 (1984) 1603
- [32] J. C. Millar, J. N. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Prentice-Hall, Fourth Edition, Great Britain, 2000
- [33] M. G. R. Vale, M. M. Silva, B. Welz, R. Nowka, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 38
- [34] J. Zupan, J. Gasteiger, *Neural Networks in Chemistry and Drug Design*, Wiley-VCH, 2nd Ed., Germany, 1999.

Capítulo 6. Aplicaciones de las redes neuronales artificiales en química analítica.

Clasificación de bebidas espirituosas venezolanas en base a las concentraciones de cinc, cobre y hierro, mediante redes neuronales artificiales y análisis discriminante.◇

6. 1. Resumen.

Se evaluó la posibilidad de distinguir la procedencia de una muestra de "aguardiente de Cocuy" fabricado ilegalmente en los Municipios Sucre (estado Falcón) y Urdaneta (estado Lara), a través de las concentraciones de cobre, hierro y zinc determinadas en el producto final. Dichos elementos fueron seleccionados por cuanto su presencia puede ser vinculada al proceso de fabricación de dichas bebidas. Para tal fin, se empleó el análisis discriminante lineal y el análisis discriminante cuadrático, así como las redes neuronales artificiales entrenadas con el algoritmo de retro-propagación. El desempeño del análisis discriminante lineal fue considerablemente pobre, encontrándose porcentajes de estimación y de predicción del 51.7% y el 50.0%, respectivamente. Por otra parte, el análisis discriminante cuadrático mostró un desempeño ligeramente superior, sin embargo insatisfactorio (estimación: 79.2%, predicción: 72.5%). Se evaluaron diferentes redes neuronales constituidas por una función de transferencia lineal (L) en la capa de entrada, una función sigmoideal (S) en las capas escondidas, y una tangente hiperbólica (T) en la capa de salida. Los porcentajes de estimación (96.5%) y de predicción (97.0%) más elevados fueron obtenidos con la red (3L:5S:7S:4T), lo cual demuestra la increíble capacidad de las redes neuronales artificiales como herramientas de clasificación.

◇ E. A. Hernández-Caraballo, R. M. Ávila-Gómez, T. Capote, F. Rivas, A. G. Pérez, Talanta 60 (2003) 1257-1269.

6.2. Introducción.

La determinación de elementos trazas en productos destinados al consumo humano (alimentos y bebidas) es de vital importancia por un gran número de razones. En primer lugar, es bien sabido que muchos de ellos pueden ser perjudiciales, e incluso letales, por encima de ciertas concentraciones [1]. Por lo tanto, diversas regulaciones han sido promulgadas con el objeto de asegurar y preservar la integridad del consumidor. En segundo lugar, y desde el punto de vista del mercadeo del producto, se ha encontrado que algunos elementos pueden determinar, pero también afectar negativamente las propiedades organolépticas y la calidad general de un producto dado [2-5]. Ejemplo de lo anterior lo constituye el efecto del hierro y del cobre sobre algunas bebidas alcohólicas. Por encima de ciertas concentraciones, dichos elementos pueden afectar la estabilidad de los compuestos químicos que constituyen la matriz del vino, e.g., fenoles, polisacáridos, etc. Ello se traduce en una turbidez de los vinos rojos/rosados y en un oscurecimiento de los vinos blancos [2,4,5]. Esos mismos elementos pueden afectar negativamente la calidad de la espuma de la cerveza y favorecer el crecimiento de hongos, entre otros efectos [3]. Este deterioro del producto va claramente en detrimento del productor del mismo, por lo que debe hacerse un especial énfasis en los protocolos de control, de manera de mantener la calidad de aquel y su nicho en el mercado.

Otro aspecto interesante es el hecho que ciertos elementos¹⁷ pueden servir como marcadores para la identificación de la procedencia geográfica de un producto y su autenticidad [6-23]. Esto juega un papel vital en la prevención del fraude, el cual afecta tanto al consumidor como al productor del bien en particular. La importancia de esto último se ve claramente reflejada en la gran cantidad de estudios relacionados con la aplicación de técnicas quimiométricas y/o de computación inteligente en la determinación de la autenticidad y/o procedencia de

¹⁷ Otros compuestos químicos, e.g., aminoácidos, fenoles, alcoholes, etc., pueden ser empleados con el mismo propósito (ver Referencia [11]). Sin embargo, debido a la susceptibilidad de los mismos a las condiciones de almacenamiento, se precisan de grandes cuidados con el objeto de preservar la integridad de los mismos, para poder así extraer información confiable.

productos para el consumo humano, tales como papas [6], bebidas alcohólicas, e.g., brandies [7], vinos [8-15], cervezas [16,17], y cocuy [18-20], té [21-23], café [10], entre otros.

Las observaciones mencionadas en los párrafos anteriores son particularmente importantes cuando se trata de productos de consumo masivo, tales como las bebidas alcohólicas. El cocuy es una bebida espirituosa, similar al mundialmente reconocido tequila, la cual es muy popular en la región nor-occidental de Venezuela. El mismo es elaborado a través de la destilación de la planta de *Agave Cocuy*, añejado por tres años, con una adición máxima de alcohol de caña de azúcar del 70%^{v/v}. El "aguardiente de Cocuy de Penca" es, por el contrario, una bebida ilegal producida en destilerías clandestinas ocultas de las autoridades locales. Evidentemente, la producción de esta última variedad no se encuentra regulada por el gobierno regional. Debido a ello, resulta lógico presumir que la concentración de ciertos metales se encuentre por encima de los niveles aceptables, tal y como lo demostraron Capote et al. [24] y Paredes [25]. La presencia de elementos tales como cobre, hierro, cinc y plomo en el producto final se deriva del empleo de alambiques de cobre en el proceso de fabricación.

El propósito del presente trabajo fue el desarrollo de una estrategia para evaluar si las concentraciones de cinc, cobre y hierro pudieran ser empleadas para clasificar una muestra de aguardiente de Cocuy de acuerdo con la ubicación geográfica de los productores, distribuidos entre los estados de Lara y Falcón, y para determinar la presencia o ausencia de azúcar en el producto final [20]. La selección de dichos metales se basó en la experiencia acumulada en un trabajo anterior [24]. Debido a que estos elementos están directamente relacionados con el empleo de alambiques de cobre, ellos pudiesen proveer información relacionada con el proceso de fabricación y, además, promover el establecimiento de políticas de control de calidad para la fabricación de dichas bebidas. En ese sentido, se recurrirá, en primer lugar, a las redes neuronales artificiales (ANNs), debido a su reconocida capacidad para el reconocimiento de patrones. Por otra parte, se empleará el análisis discriminante lineal (LDA) y el análisis discriminante

cuadrático (QDA) con fines comparativos. Estas últimas herramientas fueron seleccionadas tomando en cuenta que, al igual que las redes neuronales, las mismas operan de manera supervisada [26].

6.3. Datos.

Las concentraciones de Cu, Fe y Zn de cada uno de los cuarenta (40) especímenes de cocuy fueron provistas por el Prof. Tarcisio Capote (Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado). Los detalles relacionados con la determinación de los mismos pueden ser encontrados en la Referencia [24]. Los especímenes fueron recolectados entre diversos productores dispersados entre los municipios Sucre y Urdaneta de los Estados Falcón y Lara, respectivamente. La Tabla 6.1 resume los códigos que fueron empleados para identificar las muestras, el número de especímenes recogidos en cada región, la naturaleza (con o sin azúcar) y la procedencia de los mismos. La Tabla 6.2., por otra parte, muestra los promedios de las concentraciones de los elementos determinados' en dichos especímenes.

6.4. Herramientas de análisis.

6.4.1. Análisis discriminante.

El análisis discriminante (DA) es una técnica quimiométrica en la cual se desarrolla un modelo mediante un grupo de funciones conocidas como *variables latentes*, las cuales son combinaciones lineales de las variables originales. El modelo resultante persigue agrupar las observaciones a través de la maximización de la varianza entre grupos [26]. La dimensionalidad del espacio puede ser reducida por este medio de un orden p (número de descriptores o variables iniciales) a un espacio de dimensión n (número de funciones discriminantes), pudiendo ser $n \ll p$. Esto último trae como beneficio la posibilidad de visualizar, en algunos casos, los datos en un espacio de 2 ó 3 dimensiones, y permitir así la clasificación gráfica de los objetos en cuestión.

Tabla 6.1. Clasificación y características de las muestras de cocuy.

Código/Categoría	No. de especímenes	Característica	Procedencia	Código de salida de la red
SP	12	Puro	Municipio Sucre (Falcón)	-1 1 1 1
SS	10	Con azúcar	Municipio Sucre (Falcón)	1 -1 1 1
UP	12	Puro	Municipio Urdaneta (Lara)	1 1 -1 1
US	6	Con azúcar	Municipio Urdaneta (Lara)	1 1 1 -1

Se cuenta con dos variantes del DA dependiendo si las variables latentes son una combinación lineal (LDA) o cuadrática (QDA) de las variables originales. El análisis discriminante se llevó a cabo empleando las concentraciones estandarizadas de Zn, Cu y Fe como datos de entrada, y las categorías de las muestras como salidas. La estandarización se condujo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$[x_{ij}]_s = \frac{[x_{ij}] - [x_j]_p}{s_j} \quad (6.1)$$

en donde $[X_{ij}]_s$ y $[X_{ij}]$ corresponden a la i -ésima concentración (estandarizada y normal) del j -ésimo elemento, respectivamente; y $[X_j]_p$ y s_j son las concentraciones promedio y la desviación estándar del j -ésimo elemento, respectivamente. El tratamiento de los datos de entrada se hizo con el propósito de suavizar la distribución de los mismos, los cuales, como se aprecia en la Tabla 2.2., muestran una amplia variabilidad. Los datos fueron divididos en dos grupos: el 75% de los mismos fueron seleccionados aleatoriamente para desarrollar las funciones discriminantes; y el 25% restante (grupo de predicción) fue empleado para validar la exactitud del modelo.

Tabla 6.2. Concentraciones promedio de Zn, Cu y Fe encontrados en las muestras de Cocuy provenientes de los estados Lara y Falcón.

Categoría	Concentración (mg L ⁻¹) ^a		
	Zn	Cu	Fe
SP	0.12 ± 0.05 (0.03 – 0.17)	28.03 ± 27.99 (6.12 – 85.69)	0.32 ± 0.07 (0.27 – 0.51)
SS	0.97 ± 0.04 (0.89 – 1.00)	31.36 ± 0.67 (30.64 – 33.13)	0.26 ± 0.06 (0.18 – 0.36)
UP	0.23 ± 0.21 (0.02 – 0.65)	14.63 ± 14.69 (4.49 – 58.46)	0.36 ± 0.13 (0.20 – 0.55)
US	0.13 ± 0.02 (0.03 – 0.38)	15.58 ± 0.07 (7.82 – 26.12)	0.33 ± 0.01 (0.12 – 0.59)
General	0.36 ± 0.38 (0.02 – 1.00)	22.97 ± 18.57 (4.49 – 85.69)	0.32 ± 0.12 (0.12 – 0.59)

^(a) Los valores reportados corresponden al promedio ± desviación estándar. Los rangos de concentración se muestran en paréntesis.

6.4.2. Redes neuronales artificiales.

Estudios preliminares revelaron que los menores errores cuadráticos medios se obtuvieron al emplear una tasa de aprendizaje de 0.01 y un momento de 0.5. El ajuste de los pesos de las redes se llevó a cabo al menos tres (3) veces, con el propósito de evitar que las mismas quedasen atrapadas en un mínimo local. Los pesos fueron iniciados aleatoriamente entre -1.0 y 1.0. La Tabla 6.3. muestra los parámetros y las características de las ANNs en estudio.

Tabla 6.3. Variables y características de las redes neuronales en estudio.

Parámetro	Características
Capa de entrada	No. nodos: 3 (Concentraciones normalizadas de Zn, Cu & Fe)
Capas escondidas	Función de transferencia: Lineal (L) No. capas: variable (1-2) No. neuronas: variable (1-7) Función de transferencia: Sigmoide (S)
Capa de salida	No. neuronas: 4 (Categoría) Función de transferencia: Tangente hiperbólica (TH)
Rata de aprendizaje	0.01
Momento	0.5
Ciclos	Variable (10^4 - 10^5)

Los datos fueron normalizados de acuerdo con la ecuación (6.2), y empleados como datos de entrada:

$$[X_{ij}]_N = \frac{[X_{ij}]}{[X_{(max,j)}]} \quad (6.2)$$

en donde $[X_{ij}]_N$ y $[X_{ij}]$ corresponden a la i -ésima concentración (normalizada y "cruda") del j -ésimo elemento, y $[X_{(max,j)}]$ es la concentración máxima del j -ésimo elemento. Un grupo constituido por el 75% de los datos fue empleado en el entrenamiento de las redes; en tanto que el restante 25% fue utilizado en la validación de las mismas. Para la definición de las categorías correspondientes se empleó una combinación de -1 y +1 (ver Tabla 6.1). Por ejemplo, el código para la categoría No. 2 es (+1 -1 +1 +1). Finalmente, se utilizó el código (3: n : m :4) para describir la topología de las redes neuronales desarrolladas; en donde n y m representan el número de neuronas de las capas escondidas.

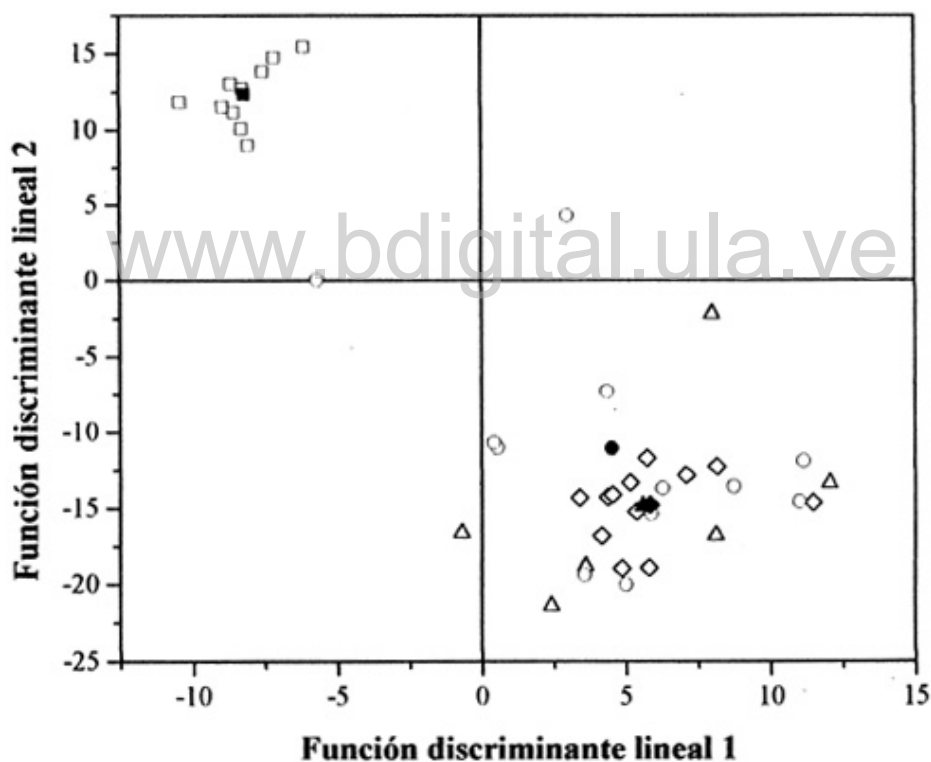
6.5. Resultados y discusiones.

Dos aspectos resaltan de la Tabla 6.2. En primer lugar, la amplia variabilidad en las concentraciones de los elementos, no sólo entre los diversos Municipios, sino también en cada uno de ellos. En segundo lugar, la elevada concentración de cobre ($> 20 \text{ mg L}^{-1}$) la cual, obviamente, deriva del empleo de alambiques del mismo material para la destilación de la bebida. Esto resulta de la falta de regulación existente en cuanto a la producción de la misma. Actualmente no existe una normativa que regule las concentraciones máximas permisibles de estos elementos en cocuy. Más aun, ¡los consumidores de esta bebida consideran que la presencia de este elemento, que se evidencia por el color marrón pálido que le otorga a las bebidas, le concede propiedades "afrodisíacas" al mismo! Se espera que los estudios realizados en tomo a este tema puedan contribuir al establecimiento de políticas de control que regulen este aspecto tan importante.

Los datos normalizados fueron evaluados mediante un análisis discriminante lineal. El cobre y el hierro poseen los coeficientes más altos en ambas funciones discriminantes, por lo que se deduce que son los elementos que

más contribuyen a la separación (distinción) de los grupos. La Figura 6.1. muestra un diagrama de dispersión de las muestras de cocuy empleando para ello las dos primeras funciones discriminantes lineales. La distribución de los especímenes en el espacio definido por dichas funciones presenta algunas características interesantes.

Figura 6.1. Diagrama de dispersión de las muestras de cocuy basado en las dos primeras funciones discriminantes lineales. Grupos: ($\diamond$) SP, ($\square$) SS, ($\circ$) UP, y ($\triangle$) US. Los símbolos negros corresponden a los centroides de los respectivos grupos.



En primer lugar, resulta clara la separación entre el grupo "SS" y el resto de los grupos, los cuales parecen formar un único conglomerado en el cuadrante inferior derecho de la Figura 6.1. Dentro de este conglomerado se puede apreciar, además, una gran dispersión entre los miembros de los grupos "UP" y "US"

(¡ambos procedentes del Municipio Urdaneta!), en tanto que los miembros del grupo "SP" muestran una menor dispersión (¡de forma análoga a lo que ocurre con el grupo "SS" del mismo Municipio!). Una mirada a la Tabla 6.2. permite explicar el por qué de las distribuciones de puntos en la Figura anterior. Obsérvese que las concentraciones de Cu y Zn en el grupo "SS" son más elevadas que las correspondientes concentraciones en el resto de los grupos. El hecho que el coeficiente del cobre en las funciones discriminantes sea de los más importantes, aunado a la observación anterior, conduce a una mejor separación de dicho grupo. Por otra parte, las concentraciones de Cu y Zn muestran una menor variabilidad que en el resto de los grupos, gracias a lo cual el grupo "SS" se presenta como un cúmulo compacto en la Figura 6.1. El marcado solapamiento entre el resto de los grupos se refleja igualmente en los bajos porcentajes de estimación y predicción que se muestran en la Tabla 6.4. El porcentaje general de clasificación es de aproximadamente un 50%, el cual es, evidentemente, insatisfactorio.

Basándonos en el hecho que la alta dispersión de los datos originales es, ciertamente, responsable de la incapacidad del modelo lineal de proveer una separación adecuada de los grupos de estudio, se consideró apropiado entonces intentar la clasificación con la variante no lineal (cuadrática) del modelo discriminante (QDA). A pesar que numerosos paquetes estadísticos disponen de tal función, no fue posible, con ninguno de ellos, graficar los resultados de la misma manera que se hizo en el caso anterior. Los resultados de la clasificación, sin embargo, se pueden apreciar en la Tabla 6.4., y en la misma se percibe una mejora en el desempeño del modelo discriminante. Una vez más, se alcanzó un 100% de exactitud al clasificar los objetos que integran la categoría SS. Por el contrario, los porcentajes de estimación y de predicción para el resto de los grupos fueron ligeramente superiores al 50%, con un desempeño general de ca. 80 y 72%, respectivamente.

Tabla 6.4. Porcentajes de estimación y de predicción de las diferentes técnicas quimiométricas y de las redes neuronales artificiales en la clasificación de las muestras de cocuy.

Categoría	LDA		QDA		ANN (3:5:7:4)	
	Estimación	Predicción	Estimación	Predicción	Estimación	Predicción
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
SP	33.3	27.8	83.3	72.2	88.5	100.0
SS	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
UP	33.3	33.3	55.6	50.0	100.0	83.3
US	44.4	44.4	83.3	72.2	100.0	100.0
General	51.7	50.0	79.2	72.5	96.5	97.0

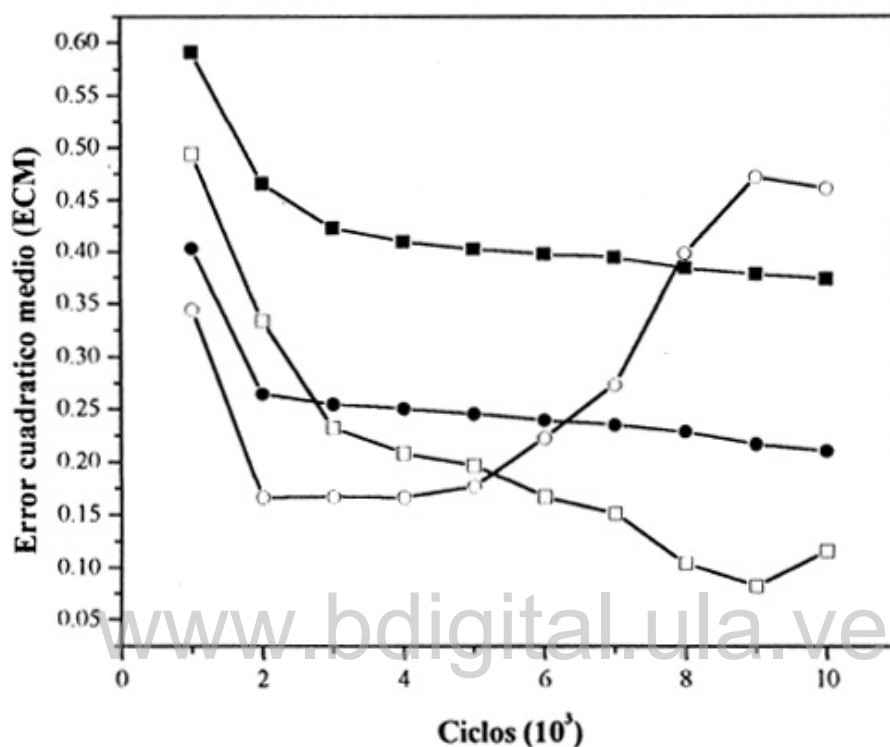
Los resultados discutidos hasta este punto apuntan al hecho que los grupos no son *linealmente separables*. Esto último es particularmente obvio en la Figura 6.1., específicamente entre los grupos que conforman el "gran conglomerado". Adicionalmente, una función no lineal capaz de llevar a cabo tal separación debe ser mucho más compleja que un polinomio de segundo orden, como se deduce de los bajos porcentajes de estimación/predicción del análisis discriminante cuadrático. Dicha función (¿o combinación de funciones?), no puede ser determinada *a priori*, lo cual impide la aplicación de técnicas matemáticas clásicas, demandando la implementación de técnicas alternativas para tal propósito. En este sentido, las redes neuronales artificiales son bien reconocidas por su habilidad para modelar sistemas no lineales, sin que para ello sea necesario el conocimiento de dicha función [27].

A diferencia de muchas herramientas quimiométricas, los datos que se presentan a las redes neuronales no tienen que, en principio, ajustarse a ningún tipo de distribución de frecuencias en particular. Sin embargo, y con el objeto de prevenir que las redes asignen *a priori* más importancia a un elemento que a otro, sólo en base a la magnitud de la concentración, como sería el caso del cobre, se normalizaron los datos originales (ecuación 6.2). También se evaluó el efecto de estandarizar los datos originales (resultados que no se presentan aquí), pero se encontró que la normalización permitió el desarrollo de redes neuronales con mayor eficiencia en la clasificación de las muestras de cocuy.

La selección de la red neuronal a ser empleada en la clasificación de las muestras de cocuy se llevó a cabo estudiando el efecto de variar el número de neuronas (1-7) y de capas escondidas (1-2) en el error cuadrático medio (ECM). Usualmente una única capa escondida es suficiente para establecer cualquier modelo mediante una red neuronal artificial. Sin embargo, en este caso se encontró que, tal y como se verá más adelante, el empleo de dos capas escondidas brinda mejores resultados. La Figura 6.2. muestra la variación del ECM para dos de las arquitecturas estudiadas, a saber, la (3:6:4) y la (3:5:7:4). La variación del ECM para las otras arquitecturas no fue incluida por razones de simplicidad, pero sí es preciso destacar que los valores obtenidos del ECM fueron superiores a los que se muestran en la Figura 6.2., y por lo tanto dichas arquitecturas no fueron consideradas para los estudios subsiguientes.

Se puede apreciar en la mencionada Figura como el ECM de entrenamiento baja abruptamente entre $1 \cdot 10^3$ y $2 \cdot 10^3$ ciclos, y posteriormente disminuye la velocidad de cambio de esta variable. Otra tendencia muestran los ECM correspondientes al emplear los datos de validación. Obsérvese como el mismo disminuye progresivamente para la red (3:6:4); en tanto que para la red (3:5:7:4) el valor del ECM aumenta a partir de $5 \cdot 10^3$ ciclos.

Figura 6.2. Error cuadrático medio de entrenamiento (símbolos negros) y de validación (símbolos blancos) para la red (3:6:4) (■□), y para la (3:5:7:4) (●○).



El segundo caso es un ejemplo típico de una red que ha sido "sobre-entrenada", es decir, los pesos de la misma han sido ajustados de tal manera que ha perdido su capacidad de generalización. Para evitar el sobre-entrenamiento se detuvo el desarrollo de la red en $4 \cdot 10^3$ ciclos. Lo anterior muestra la importancia del uso de un grupo de datos de validación durante el desarrollo de una red neuronal artificial¹⁸. Aun cuando la exactitud en la clasificación de ambas redes fue la misma al probar los datos de entrenamiento (desempeño general 97.0%), la red (3:6:4) arrojó dos resultados "desconocidos"¹⁹ al utilizar los datos de prueba

¹⁸ El lector interesado es referido al Capítulo 4, Sección 4.4.4., para una revisión de este aspecto en particular en el desarrollo de una red neuronal artificial.

¹⁹ Se habla de un resultado "desconocido" cuando los códigos de salida de una red neuronal no se corresponden con ninguno de los códigos utilizados para designar a los especímenes de estudio.

(desempeño general 93.0%). Por esta razón se escogió finalmente a la red (3:5:7:4) como herramienta de clasificación.

La Tabla 6.4 muestra el desempeño de la red escogida a partir de los estudios anteriores en la clasificación de las muestras de cocuy. La superioridad de esta aproximación es clara, al compararla con los métodos más convencionales (LDA y QDA). Esto último es atribuible al hecho que, no sólo los datos originales no son linealmente separables sino que, además, se requiere de una función más compleja para lograr una clasificación más exacta. A través del ajuste de los pesos de las neuronas, las redes neuronales artificiales son capaces de desarrollar funciones extremadamente complejas, lo cual sería imposible emular mediante otros medios matemáticos.

6.5. Conclusiones.

Se evaluó la aplicabilidad de diversas técnicas quimiométricas (análisis discriminante lineal y cuadrático), así como de las redes neuronales artificiales para la determinación clasificación de muestras de aguardiente de Cocuy, basado en las concentraciones de Cu, Fe y Zn. Las redes neuronales mostraron un desempeño claramente superior que las técnicas quimiométricas (capacidad de predicción: 97% vs. 50% y 72%, respectivamente). La alta dispersión de los datos, que a su vez es el resultado de la falta de medidas de control de calidad en el procesamiento de dichas bebidas, ejerce un efecto deletéreo en los poderes de predicción de estas herramientas estadísticas. Lo anterior representa un claro ejemplo de las capacidades de las redes neuronales en el desarrollo de modelos matemáticos complejos, con fines de clasificación, sin las limitaciones que presentan muchas técnicas quimiométricas. Actualmente se están llevando a cabo estudios adicionales que permitan mejorar el proceso de clasificación de dichas bebidas, tomando en cuenta la presencia de otros elementos que podrían proporcionar información adicional sobre el origen geográfico de la materia prima empleada en la fabricación de las mismas.

6.6. Referencias del CAPÍTULO 6.

- [1] D. L. Tsalev and Z. K. Zaprianov, Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Practice. Vol. 1. Analytical Aspects and Health Significance, CRC Press, Inc., USA, 1983
- [2] A. Escobal, C. Iriondo, C. Laborra, E. Ulibarrena, At. Spectrosc. 16 (1995) 162
- [3] R. Svendsen, W. Lund, Analyst 125 (2000) 1933
- [4] I. Karadjova, B. Izgi, S. Gucer, Spectrochim. Acta Part B 57 (2002) 581 [5] P. Benítez, R. Castro, C. G. Barroso, Anal. Chim. Acta 458 (2002) 197
- [6] R. M. Peña, S. García, R. Iglesias, S. Barro, C. Herrero, Analyst 126 (2001) 2186
- [7] A. M. Cameán, I. Moreno, M. López-Artíguez, M. Repetto, A. G. González, Talanta 54 (2001) 53
- [8] I. E. Frank, B. R. Kowalski, Anal. Chim. Acta 162 (1984) 241
- [9] L. -X. Sun, K. Danzer, G. Thiel, Fresenius J. Anal. Chem. 359 (1997) 143
- [10] S. J. Haswell, A. D. Walmsley, J. Anal. At. Spectrom. 13 (1998) 131
- [11] J. L. Aleixandre, V. Lizama, J. Alvarez, Alimentación XVIII (1998) 73
- [12] S. Rebolo, R. M. Peña, M. J. Latorre, S. García, A. M. Botana, C. Herrero, Anal. Chim. Acta 417 (2000) 211
- [13] M. A. Brescia, V. Caldarola, A. De Giglio, D. Benedetti, F. P. Fanizzi, A Sacco, Anal. Chim. Acta 458 (2002) 177
- [14] S. Pérez-Magariño, M. Ortega-Heras, M. L. González-San José, Anal. Chim. Acta 458 (2002) 187
- [15] S. Frías, J. E. Conde, J. J. Rodríguez-Bencomo, F. García-Montelongo, J. P. Pérez-Trujillo, Talanta 59 (2003) 335
- [16] D. Bellido-Milla, J. M. Moreno-Pérez, M. P. Hernández-Artiga, Spectrochim. Acta Part B 55 (2000) 855
- [17] A. Alcázar, F. Pablos, M^a. J. Martín, A. G. González, Talanta 57 (2002) 45
- [18] T. Capote, L. M. Marcó P., E. Garrido de Dávila, E. Greaves, Characterisation and classification of spirituous beverages by total reflection X-ray fluorescence, 8th

Conference on Total Reflection X-ray Fluorescence Analysis and Related Methods (TXRF 2000), September 25-29, 2000, Vienna, Austria, Book of Abstracts, p. 50.

[19] T. Capote, L. M. Marcó, E. Garrido, E. Hernández, E. Greaves, Aplicación de la fluorescencia de rayos X en reflexión total en la caracterización de bebidas alcohólicas destiladas usando representaciones gráficas, V Congreso Venezolano de Química, Maracaibo 1-5 de abril, 2001, Memorias, pp. 765-767

[20] E. A. Hernández-Caraballo, R. M^a. Ávila-Gómez, T. Capote, F. Rivas, A. G. Pérez, Talanta 60 (2003) 1259

[21] X. Liu, P. van Espen, F. Adams, S. H. Yan, M. Vanbelle, Anal. Chim. Acta 200 (1987) 421

[22] A. Marcos, A. Fisher, G. Rea, S. J. Hill, J. Anal. At. Spectrom. 13 (1998) 521

[23] M. A. Herrador, A. G. González, Talanta 53 (2001) 1249

[24] T. Capote, L. M. Marcó, J. Alvarado and E. D. Greaves, Spectrochim. Acta Part B 54 (1999) 1463

[25] B. O. Paredes Buenaño, Determinación de trazas de plomo en aguardientes larenses por espectroscopía de absorción atómica de llama mediante una configuración de flujo continuo, Trabajo de Grado para optar al título de Licenciado en Química, Universidad de Los Andes, Venezuela, 2002

[26] C. J. Huberty, Applied discriminant analysis, John Wiley & Sons, Inc., USA, 1994

[27] B. J. Wythoff, Backpropagation neural networks. A tutorial, Chemom. Intell. Lab. Syst. 18 (1993) 115-155

Parte III

Publicaciones

www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento

Publicación I

www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento



ELSEVIER

Spectrochimica Acta Part B 57 (2002) 2159–2165

SPECTROCHIMICA
ACTA
PART B

www.elsevier.com/locate/sab

Analytical note

Evaluation of ammonia as diluent for serum sample preparation and determination of selenium by graphite furnace atomic absorption spectrometry[†]

Edwin A. Hernández-Caraballo*, Marcela Burguera, José L. Burguera

IVAIQUIM (Instituto Venezolano-Andino para la Investigación Química), Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes, Merida 5101, Venezuela

Received 19 April 2002; accepted 29 August 2002

Abstract

A method for the determination of total selenium in serum samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry was evaluated. The method involved direct introduction of 1:5 diluted serum samples (1% v/v NH_4OH + 0.05% w/v Triton X-100[®]) into transversely heated graphite tubes, and the use of $10\text{ }\mu\text{g}$ Pd + $3\text{ }\mu\text{g}$ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ as chemical modifier. Optimization of the modifier mass and the atomization temperature was conducted by simultaneously varying such parameters and evaluating both the integrated absorbance and the peak height/peak area ratio. The latter allowed the selection of compromise conditions rendering good sensitivity and adequate analyte peak profiles. A characteristic mass of 49 pg and a detection limit (3s) of $6\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ Se, corresponding to $30\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ Se in the serum sample, were obtained. The analyte addition technique was used for calibration. The accuracy was assessed by the determination of total selenium in Seronorm[™] Trace Elements Serum Batch 116 (Nycomed Pharma AS). The method was applied for the determination of total selenium in ten serum samples taken from individuals with no known physical affection. The selenium concentration ranged between 79 and $147\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$, with a mean value of $114 \pm 22\text{ }\mu\text{g l}^{-1}$.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Selenium; Serum; Ammonia; Graphite furnace atomic absorption spectrometry

[†] This paper was presented at the 7th Rio Symposium on Atomic Spectrometry, held in Florianópolis, Brazil, April 2002 and is published in the Special Issue of *Spectrochimica Acta Part B*, dedicated to that conference.

*Corresponding author. Tel.: +58-275-240-1376; fax: +58-274-240-1286.

E-mail address: ea_hernandezc@yahoo.com (E.A. Hernández-Caraballo).

1. Introduction

Selenium plays an important role in some metabolic reactions in living organisms [1]. For instance, it is a vital component of the glutathione-peroxidase, an enzyme involved in the prevention of cellular attack from peroxides and free radicals. Selenium deficiency is responsible for the Keshan and Kaschin-Beck diseases, the first one being a form of cardiomyopathy, whereas the second one is observed as an atrophy of the limbs' bones [1]. On the other hand, Se is able to, among other things, substitute sulfur in those biomolecules in which the latter is a vital component, thus altering their chemical structure and, as a result, negatively affecting their activity within the organism [2]. Due to this dual function of selenium, techniques with high sensitivity are required for monitoring its concentration in biological materials (tissues and fluids).

Graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS) stands out among the techniques available for the analysis of biological materials, because of its high sensitivity, low sample consumption, minimum sample preparation requirements, and reduced matrix-related interferences [3]. However, the determination of selenium by GF AAS is still prone to some interference, especially in bio-fluids (urine, serum, blood, etc.). Particularly troublesome are the low-temperature ($> 200\text{ }^{\circ}\text{C}$) losses in the form of various molecular species [4–6], and the spectral interference caused mainly by iron and phosphate [7]. Such problems can be minimized by adhering to the recommendations of the Stabilized Temperature Platform Furnace concept [8]. In this sense, chemical modification becomes mandatory [9], and background correction based on the Zeeman effect, while not a panacea, helps in reducing spectral interferences [10].

The aim of this work was the evaluation of ammonia as a diluent for the preparation of serum samples for the determination of selenium by GF AAS. In contrast to other reagents, which have been used for such purpose, such as nitric acid [11], ammonia has only scarcely been employed [12]. Palladium and palladium + magnesium nitrate were evaluated as chemical modifiers. Simultane-

ous variation of the modifier mass and atomization temperature, instead of the more common one-at-a-time optimization approach, was selected in order to establish adequate compromise conditions for achieving good sensitivity and peak profiles. Accuracy was assessed through the determination of total selenium in Seronorm™ Trace Elements Serum Batch 116 (Nycomed Pharma AS). The method was applied to the determination of selenium concentration in serum samples from individuals with no known physical affection. It is important to state that the present work is not intended for clinical purposes, but principally as an evaluation of an alternate sample preparation procedure.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

A Perkin-Elmer Model 4100 ZL atomic absorption spectrometer, equipped with a transversely heated graphite furnace, a longitudinal Zeeman-effect background correction system, and a Model AS-71 furnace autosampler, was used throughout. Transversely heated graphite tubes with integrated platforms were used after proper conditioning according to the manufacturer's recommendation [13]. A Perkin-Elmer selenium electrodeless discharge lamp (EDL System 2), powered by an external unit, was used at the 196.0 nm line using the conditions recommended by the manufacturer.

2.2. Reagents and materials

Sodium selenite (Aldrich, 99% purity) was used for preparation of selenium standards. A $1000\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ Pd atomic absorption standard solution (Acros Organics) and magnesium nitrate hexahydrate (Merck, pro analysis) were used for preparation of the chemical modifier solutions. Concentrated nitric acid (Alfa Aesar, 99.999%, metals basis), and concentrated ammonia solution (Prolabo Venezolana, pro analysis), was used for preparation and stabilization of standards and samples. Triton X-100® (Sigma), was employed for modification of the natural viscosity of the samples. Distilled, de-ionized water from a Milli-Q

Table 1
Atomization program for the determination of total selenium by GF AAS

Step	Temperature (°C)	Ramp (s)	Hold (s)
Hot injection (modifier)	60	—	—
Dry 1	110	5	10
Dry 2	130	10	20
Reduction	1000	10	10
Hot injection (standard/sample)	60	—	—
Dry 1	110	5	15
Dry 2	130	10	20
Pyrolysis	1200	10	20
Cool down	50	1	5
Atomization	2100	0	4 (Read)
Clean	2500	T1	3

Injection speed: 50%; argon flow: 250 ml min⁻¹, except during the atomization step (gas-stop mode).

system (Milipore, Bedford, MA), with a resistivity of 18 M Ω cm, was used throughout.

2.3. Samples

Seronorm™ Trace Elements Serum Batch 116 reference material (Nycomed Pharma AS) was prepared according to the manufacturer's instructions [14]. Serum samples ($n=10$) were collected from volunteers among the laboratory staff with no known illness and under no Se-containing medication. Blood was taken by puncture of the forearm vein with vacutainer tubes. Samples were then centrifuged for 20 min at 2300 rpm, and the serum was carefully removed with a micropipette. The collected serum fractions were transferred to previously cleaned test tubes with caps, and kept in a refrigerator at 4 °C until analysis.

2.4. Solution preparation

Serum samples were homogenized in a vortex mixer for approximately 30 s after they had reached ambient temperature. They were then transferred into 1-ml autosampler vials and immediately diluted (1:5) with a 1% v/v NH₄OH + 0.05% w/v Triton X-100® or a 0.5% v/v HNO₃ + 0.05% w/v Triton X-100® solution. The micropipette was pumped several times in order to ensure proper homogenization of the resulting solutions and dosing of the sample aliquots into the vials. Selenium standard solutions were prepared by proper dilution of a 1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Se stock solu-

tion with the above-mentioned mixtures. For analyte addition, 200 μl of the sample and 800 μl of the diluent containing 10, 25 and 50 ng ml⁻¹ Se were mixed directly in the autosampler vials. The diluent was always dispensed first, followed by the serum sample.

2.5. Determination of selenium by GF AAS

The determination of selenium in serum samples was carried out using the graphite furnace program shown in Table 1. Modifier and standards/samples were injected into a pre-heated atomizer (60 °C) in order to reduce dispersion on the platform and improve repeatability of the measurements. The temperatures reported herein correspond to nominal values given by the software controlling the spectrometer. The analyte addition technique was used for quantification. Integrated absorbance (peak area, A_i) values were used exclusively for quantification, although in some cases the peak height/peak area (A_h/A_i) ratio was employed for optimization of the peak profile. All values given in this work are the average of at least three to five measurements.

3. Results and discussion

3.1. Selection of atomization conditions and chemical modifiers

In preliminary experiments, it was observed that addition of the modifier together with the standard

or sample resulted in a characteristic mass of approximately 70 pg, which is significantly higher than that reported in Refs. [3,13] (45 pg). As the chemical modifier used in this work comes in a 5% v/v HCl medium, generation of the active form of palladium (metallic Pd) might be hampered [15]. An acceptable characteristic mass of 49 pg was obtained by thermally reducing the modifier at 1000 °C prior to the introduction of the standard or sample.

Selection of the atomization temperature and the chemical modifier composition and concentration is usually conducted by studying one of these variables at a time while keeping the other fixed at a given value. This approach has the disadvantage that it does not take into account the intrinsic relationship between them. It is known, for instance, that over-stabilization of the analyte might occur if a too high a mass of modifier is used, and the atomization temperature is not increased accordingly [16].

In order to circumvent this problem, an approach based on simultaneous variation of the atomization temperature (2000, 2100 and 2200 °C) and the mass of the palladium modifier (5, 10 and 15 µg) using 3D response surface diagrams (not shown for sake of simplicity) was considered to establish the optimum parameters. The above values for temperature and modifier mass were selected on the basis of preliminary experiments, in order to provide adequate thermal stabilization for the analyte in the complex matrix of study, and to obtain analyte peak profiles that could be completely integrated within the 4-s atomization time.

At first, the effect of these variables on the integrated absorbance (A_i) and the A_h/A_i ratio for an aqueous standard (1.0 ng Se) and a 1:5 diluted serum sample, both in a 1.0% v/v ammonia + 0.05% w/v Triton X-100® medium was investigated. While A_i gives only information about the sensitivity, the A_h/A_i ratio gives additional information about the peak profile. For an aqueous standard, varying the mass of the modifier at fixed atomization temperatures had no significant influence on the sensitivity (A_i), but peak profiles became broader with increasing modifier concentration. Varying the atomization temperature from 2000 to 2200 °C sharpened the peak profiles at

the expense of a reduced sensitivity, due to increased diffusional losses. In the case of the serum sample, increasing the mass of modifier at fixed atomization temperatures rendered higher recoveries, but peak profiles tended to flatten progressively. On the basis of these essays, 10 µg Pd as chemical modifier and an atomization temperature of 2100 °C were taken as a good compromise between sensitivity and an adequate peak profile.

Since first proposed by Schlemmer and Welz [17], the Pd+Mg(NO₃)₂ mixture has gained worldwide acceptance as a fairly universal modifier, hence this mixed modifier was also investigated in this work. As magnesium nitrate has mostly been used as a secondary component in such a mixed modifier, its effect as a single modifier was not investigated, as it was the case for palladium alone. The mass of each modifier was varied, and surface plots were established [18]. The palladium masses were the same as above; the minimum mass of magnesium nitrate studied (3 µg) was that recommended by the manufacturer for the Pd+Mg(NO₃)₂ mixed modifier [13], whereas higher masses were chosen on the basis of preliminary studies. Increasing the mass of magnesium nitrate resulted in over-stabilization of the analyte signal and higher background absorption, hence, the upper limit for this modifier component was set to 9 µg. The atomization temperature was set at 2100 °C for these experiments.

For the aqueous standard, maximum sensitivity was obtained with 10 µg Pd + 3 µg Mg(NO₃)₂. A lower Pd mass (5 µg) might not provide sufficient thermal stabilization, resulting in partial analyte loss, whereas a higher mass (15 µg) could result in over-stabilization at the atomization temperature used in the experiments (2100 °C). For the serum sample, in contrast, increasing the mass of palladium was mandatory for attaining maximum sensitivity, and no over-stabilization of the analyte was observed. The latter might be due to the presence of concomitants, or to the fact that selenium is present in serum mostly in the form of organic compounds. While it might be tempting to employ high masses of palladium in order to obtain the highest sensitivity, the A_h/A_i ratio

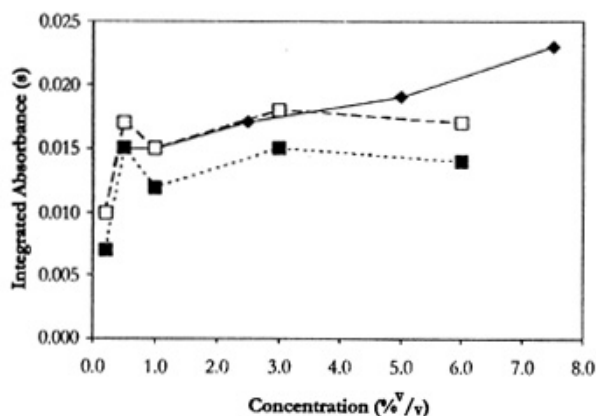


Fig. 1. Effect of increasing concentrations of HNO₃, with (□) and without (■) homogenization, and NH₄OH (◆) on the sensitivity of the measurements (blank corrected) of total Se in a 1:5 diluted serum sample.

revealed that the latter would result in broadened peak profiles. A mixture of 10 µg Pd+3 µg Mg(NO₃)₂ was finally chosen as chemical modifier for further studies.

3.2. Assessment of the diluent composition

In the present work an attempt was made to evaluate ammonia as a diluent for preparation of serum samples. Although its use was described by Subramanian [11] as an alternative reagent for sample dilution, it has not drawn much attention in GF AAS [12]. Fig. 1 shows the effects of increasing concentrations of ammonia (0.5–7.5% v/v) on the sensitivity of selenium in a 1:5 diluted serum sample. Blank values for ammonia became significant at concentrations $\geq 7.5\%$, and although one would be tempted to use the highest concentration of 7.5% v/v NH₄OH, as it provided the highest sensitivity, the associated blank ($A_b = 0.013$ s) was much higher than that obtained with a 1.0% v/v NH₄OH solution ($A_b = 0.002$ s). This latter blank was comparable with that obtained with high-purity nitric acid. In further studies a 1.0% v/v NH₄OH solution was employed for dilution purposes.

When using nitric acid as the diluent, the sensitivity increased when the reagent concentration was increased from 0.2 to 0.5% v/v, and it

remained practically constant up to 6.0% v/v. Higher concentrations were not considered in order to avoid accelerated deterioration of the graphite atomizer. Concentrations $\geq 1.0\%$ v/v HNO₃ rendered cloudy solutions and eventual precipitation of proteins, as observed by others [19]. Such phenomena greatly impaired the short-term repeatability of the measurements. For instance, whereas acceptable for a 0.5% v/v HNO₃ (R.S.D. = 3.5%), it became analytically unacceptable for 3.0% (R.S.D. = 15%) and 6.0% v/v HNO₃ solutions (R.S.D. = 24%). This observation could be explained on the basis that selenium is mostly (95%) bound to proteins [20]. Evidently, as the latter precipitate, the concentration of the analyte in the supernatant, the fraction that is actually sampled for injection into the atomizer, is progressively reduced. If the samples were homogenized just prior to injecting an aliquot into the atomizer, a 10% increase in sensitivity was recorded (Fig. 1).

On the basis of these studies, a 1.0% v/v NH₄OH + 0.05% w/v Triton X-100® solution was finally chosen for dilution purposes. Pyrolysis curves for selenium in aqueous standards and in 1:5 diluted serum in the presence of the mixed Pd + Mg(NO₃)₂ chemical modifier indicated that a pyrolysis temperature of 1300 °C could be used without analyte losses. A 'safe' pyrolysis temper-

ature of 1200 °C was chosen for working purposes; the optimized temperature program is shown in Table 1.

3.3. Determination of selenium in serum samples by GF AAS

A comparison of the slopes of the aqueous and analyte addition curves revealed differences that indicated residual matrix interference. Similar observations have been reported by others in the determination of selenium in biological fluids, such as urine or blood [21]. Quantification was therefore performed by means of the analyte addition technique. The detection limit (3s) was $6 \text{ ng ml}^{-1} \text{ Se}$, which is equivalent to $30 \text{ ng ml}^{-1} \text{ Se}$ in serum, when the dilution factor is taken into account. The determination of selenium in Seronorm™ Trace Elements Serum (Batch 116), using the proposed method, gave a value of $99 \pm 7 \text{ } \mu\text{g l}^{-1} \text{ Se}$, which is statistically not distinguishable ($P < 0.05$) from the recommended value ($100 \pm 6 \text{ } \mu\text{g l}^{-1} \text{ Se}$) [19].

The method was applied to the determination of total selenium in a number of samples taken from voluntary personnel (males and females, age 25–40 years) working in our laboratory. The concentration of selenium ranged between 79 and $147 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$, with a mean of $114 \pm 22 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$.

4. Conclusions

A method was evaluated for the determination of total selenium in serum by GF AAS, using a 1:5 dilution with a 1.0% v/v NH_4OH + 0.05% w/v Triton X-100® solution, and direct introduction into the graphite atomizer. The use of ammonia brought about some advantages over nitric acid, particularly as it did not cause protein precipitation, as it might be the case if nitric acid is used above certain concentrations, which entails a significant deterioration in precision. On the other hand, simultaneous variation of the modifier mass and the atomization temperature permitted the selection of compromise conditions providing good sensitivity as well as adequate analyte peak profiles. In this regard, a $10 \text{ } \mu\text{g Pd} + 3 \text{ } \mu\text{g Mg}(\text{NO}_3)_2$ chemical modifier and an atomization

temperature of 2100 °C were chosen for such a determination.

Acknowledgments

The authors express their sincere thanks to Dr B. Welz for his helpful suggestions during the writing of the manuscript.

References

- [1] D. Casabiell, L. Cortes, Selenio: su importancia biomédica y su determinación analítica, *Rev. Soc. Ven. Quim.* 21 (1998) 21–24.
- [2] J. Ladrón de Guevara, V. Moya Pueyo, Capítulo 47. Selenio y sus compuestos, in *Toxicología Médica, Clínica y Laboral*, Interamericana McGraw-Hill, Spain, 1995, pp. 293–295.
- [3] B. Welz, M. Sperling, Applications of AAS. Body fluids and tissues, *Atomic Absorption Spectrometry*, third ed., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1999, pp. 592–595.
- [4] D.L. Styris, Elucidating atomization mechanisms by simultaneous mass spectrometry and atomic absorption spectrometry, *Fresenius Z. Anal. Chem.* 323 (1986) 710–715.
- [5] M.S. Droessler, J. Holcombe, Mass spectral and atomic absorption studies of selenium vaporization from a graphite surface, *Spectrochim. Acta Part B* 42 (1987) 981–994.
- [6] J. Dedina, W. Frech, I. Lindberg, E. Lundberg, A. Cedergren, Determination of selenium by graphite furnace atomic absorption spectrometry. Part 1. Interaction between selenium and carbon, *J. Anal. At. Spectrom.* 2 (1987) 287–291.
- [7] B. Sampson, Determination of selenium in serum by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry with deuterium-arc background correction, *J. Anal. At. Spectrom.* 2 (1987) 447–450.
- [8] W. Slavin, D.C. Manning, G.R. Carnrick, The Stabilized Temperature Platform Furnace, *At. Spectrosc.* 2 (1981) 137–145.
- [9] D.L. Tsalev, V.I. Slaveykova, P. Mandjukov, Chemical modification in graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Spectrochim. Acta Rev.* 13 (1990) 225–274.
- [10] R. Peile, R. Grey, R. Starek, Interference-free determination of selenium in the presence of iron using a graphite furnace with carbon monoxide–platinum modification, *J. Anal. At. Spectrom.* 4 (1989) 407–410.
- [11] K.S. Subramanian, Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic

- absorption techniques (Review). *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 291–319.
- [12] R. Furrer, K. Gautschi, H. Lutz, Comparative determination in the serum of various animal species and humans by means of electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 5 (1991) 101–113.
- [13] The THGA graphite furnace: techniques and recommended conditions, Perkin-Elmer Corporation, Part No. B050-5538, June 1992.
- [14] Seronorm™ Trace Elements Serum Batch 116 (Nycomed Pharma AS).
- [15] A.B. Volynsky, V. Krivan, Comparison of various forms of palladium used as chemical modifier for the determination of selenium by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 11 (1996) 159–164.
- [16] W. Frech, K. Li, M. Berglund, D.C. Baxter, Effects of modifier mass and temperature gradients on analyte sensitivity in electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 141–145.
- [17] G. Schlemmer, B. Welz, Palladium and magnesium nitrates, a more universal modifier for graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* 41 (1986) 1157–1165.
- [18] M. Deaker, W. Maher, Determination of selenium in seleno compounds and marine biological tissues using electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 423–431.
- [19] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Cerdas, Rapid determination of lead and cadmium in biological fluids by electrothermal atomic absorption spectrometry and Zeeman correction. *Anal. Chim. Acta* 390 (1999) 207–215.
- [20] J.M. Marchante-Gayón, J.E. Sánchez-Uría, A. Sanz-Medel, Serum and tissue selenium contents related to renal disease and colon cancer as determined by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 10 (1996) 229–236.
- [21] R. Sábé, R. Rubio, L. García-Beltrán, Determination of selenium in human blood specimens by electrothermal atomic absorption. *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 121–135.

www.bdigital.ula.ve

Publicación II

www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento



Classification of Venezuelan spirituous beverages by means of discriminant analysis and artificial neural networks based on their Zn, Cu and Fe concentrations

Edwin A. Hernández-Caraballo^{a,*}, Rita M. Avila-Gómez^a, Tarcisio Capote^b,
Francklin Rivas^c, Anna G. Pérez^d

^a *Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias, Instituto Venezolano-Andino para la Investigación Química (IVAIQUIM), Universidad de los Andes, Mérida 5101, Venezuela*

^b *Unidad de Análisis Instrumental, Departamento de Química y Suelos, Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto 3001, Venezuela*

^c *Laboratorio de Sistemas Inteligentes, Escuela de Ingeniería de Sistemas, Facultad de Ingeniería, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela*

^d *Instituto de Estadística Aplicada y Computación, Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela*

Received 3 April 2003; received in revised form 3 April 2003; accepted 4 April 2003

www.bdigital.ula.ve

Abstract

Copper, zinc and iron concentrations were determined in “aguardiente de Cocuy de Penca” (Cocuy de Penca firewater), a spirituous beverage very popular in the North-Western region of Venezuela, by flame atomic absorption spectrometry (FAAS). These elements were selected for their presence can be traced to the (illegal) manufacturing process of the aforementioned beverages. Linear and quadratic discriminant analysis (QDA), and artificial neural networks (ANNs) trained with the backpropagation algorithm were employed for estimating if such beverages can be distinguished based on the concentrations of these elements in the final product, and whether it is possible to assess the geographic location of the manufacturers (Lara or Falcón states) and the presence or absence of sugar in the end product. A linear discriminant analysis (LDA) performed poorly, overall estimation and prediction rates being 51.7% and 50.0%, respectively. A QDA showed a slightly better overall performance, yet unsatisfactory (estimation: 79.2%, prediction: 72.5%). Various ANNs, comprising a linear function (L) in the input layer, a sigmoid function (S) in the hidden layer(s) and a hyperbolic tangent function (T) in the output layer, were evaluated. Of the networks studied, the (3L:5S:7S:4T) gave the highest estimation (overall: 96.5%) and prediction rates (overall: 97.0%), demonstrating the superb performance of ANNs for classification purposes.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Iron; Copper; Zinc; Classification; Cocuy; Spirituous beverages; Linear discriminant analysis (LDA); Quadratic discriminant analysis (QDA); Artificial neural networks (ANNs); Backpropagation algorithm

* Corresponding author. Tel.: +58-274-240-1376; fax: +58-274-240-1286.
E-mail address: ea_hernandez@yahoo.com (E.A. Hernández-Caraballo).

1. Introduction

The assessment of trace elements in products for human consumption (food and beverages) is of utmost importance for a number of reasons. Firstly, it is well known that they may be harmful, and even lethal, above certain concentration levels [1]. Therefore, very stringent regulations have been issued in order to insure and preserve the consumer's well being. Secondly, and from the marketing point of view, some elements may determine, but also negatively affect the organoleptic characteristics and overall quality of a given product. The latter goes in detriment of the manufacturer; thus, great care must be placed on quality control protocols so as to maintain the quality of the product and its niche in the market. Finally, and interestingly enough, certain chemical components can serve as markers for identification of the product's geographic origin and authenticity. This plays an important role in preventing illegal products to pass off as the authentic ones, not only fooling the consumer, but then again, affecting the manufacturer as well.

The observations stated in the preceding paragraph are particularly evident when it comes to worldwide popular beverages such as beer, wine, coffee, etc. Effectively, a great deal of methods has been developed for the determination of trace, minor and major elements in such beverages [2–7]. Assessment of these sample's origins has been mostly conducted through the application of chemometric techniques, namely, partial least-squares regression (PLSR) [8], principal components analysis (PCA) [9–13], linear discriminant analysis (LDA) [11,14,15], k-nearest neighbor (KNN) [10,11], etc.

Cocuy is a spirituous beverage, similar to the worldwide famous tequila, which is very popular in the North-Western region of Venezuela. It is made by distillation of the plant *Agave cocuy*, aged for 3 years, with a maximum addition of cane alcohol of 70% v/v. The "aguardiente de Cocuy de Penca" (Cocuy de Penca firewater) is, on the contrary, an illegal beverage produced in clandestine distilleries hidden in the forest away from local authorities. Evidently, production of this beverage is not under any quality control super-

vision by the regional government. As such, it is supposed that concentration of some metals may be above acceptable levels. Capote et al. determined the concentration of Cu, Fe and Zn in homemade Cocuy beverages by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry (TXRFS) and flame atomic absorption spectrometry (FAAS) [4]. These authors found that, while iron and zinc levels were below the maximum permissible levels in rum and whiskey (there are no current Venezuelan legislation concerning metals concentrations in alcoholic beverages such as Cocuy), copper levels were well above them. The latter derives from the fact that copper coils are employed in the manufacturing process, thus part of the element is leached into the final product. Paredes determined lead by FAAS in Cocuy samples ($N = 28$) using an on-line pre-concentration system [16]. This author found concentration levels ranging from 12.6 to 370.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ Pb, with an average of $78.9 \pm 98.5 \mu\text{g l}^{-1}$ Pb. For comparison purposes, 7% of the samples had lead concentrations exceeding maximum permissible levels set for wine in Europe ($300 \mu\text{g l}^{-1}$), 11% were above those in Canada ($200 \mu\text{g l}^{-1}$) and 25% violated the corresponding limit ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) in the US.

The aim of the present work was the development of a strategy for evaluating whether zinc, copper and iron could be used to classify these illegally-manufactured Cocuy firewaters according to the geographic location of the manufacturers, distributed along the Venezuelan states of Lara and Falcón, and the presence or absence of sugar in the final products. The selection of such elements was based on a previous work [4]. As these elements are directly related to the utilization of copper coils, they may provide information on the manufacturing process, and may be useful in establishing a quality-control policy in the making of such beverage. Artificial neural networks (ANNs) will be used for such a goal, due to their well-recognized capacity for pattern recognition [17–20]. LDA and quadratic discriminant analysis (QDA) will be performed for comparison purposes. The latter were selected on the basis that, like ANNs trained with the backpropagation algorithm, they also work on a supervised-training fashion.

2. Theory

ANNs derive their names from their similarity to their biological counterparts. They are pseudo-parallel processing systems capable of “adaptable learning”, meaning that they can do so without the formalisms and restrictions of computer programming languages. The fundamental constituents of the ANNs are called nodes or neurons. Fig. 1a shows a basic representation of one of such units. Each node performs a series of simple calculations. Firstly, the input signals (X_i) are processed in the “body” of the neuron according to:

$$Net_i = \sum w_i X_i \quad (1)$$

where w_i , the weights, are an analogy of the biological synapses. Net_i may take large positive or negative values; therefore, it is further modified

in a second step. Various transfer functions (f) have been proposed for this purpose, each of them accomplishing different transformations. The unipolar sigmoid (Eq. (2)) and the hyperbolic tangent are among these functions:

$$f_i = f(Net_i) = Out_i = \frac{1}{1 + \exp[-(Net_i + \theta)]} \quad (2)$$

They are both monotonous, non-linear functions which restrict the output of the neuron to between 0 and 1, or -1 and 1 , respectively. The term θ is known as the bias, and it represents a threshold value above which the neuron is said to “fire”, or emit a signal. This kind of transfer function is what makes ANNs particularly suitable for modeling non-linear systems. The value Out_i is thus propagated to the neurons on to the following layers.

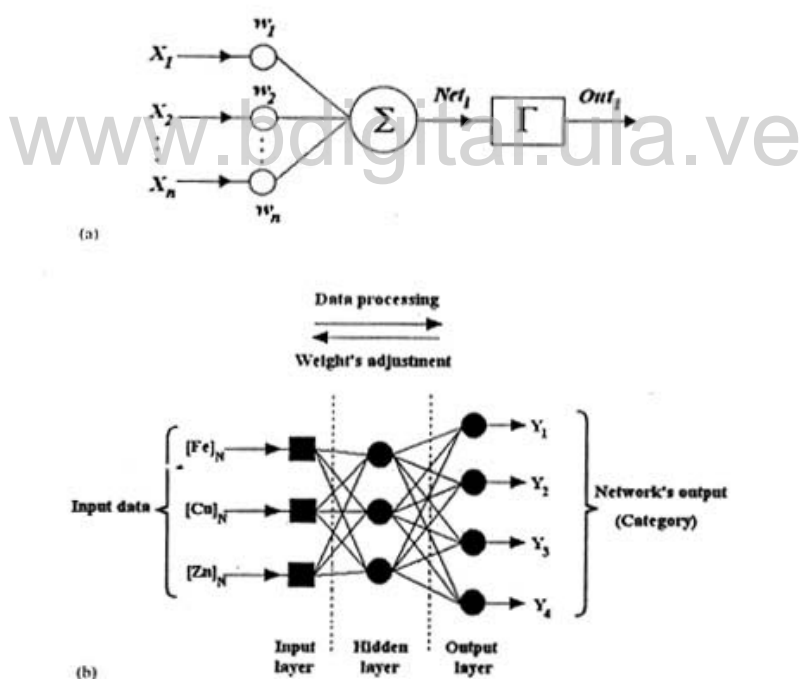


Fig. 1. Diagram of (a) an artificial neuron; and, (b) an ANN with two (active) layers (see text for details).

While a neuron is clearly an important part of an ANN, is the linking among them—the “networking”—which gives ANNs their outstanding performance [21]. Fig. 1b shows a diagram of a fully connected, ANN with two active layers. Each black symbol represents an individual neuron performing the operations described previously. The input layer serves to distribute the data and does not perform any calculation. The hidden layers are known as such for they neither receive nor transmit data directly from or to the user. Finally, there is the output layer, which provides the results of the network calculations. In this case, data “flows” exclusively from the input to the output layer. On the other hand, and for the particular type of ANN employed in this work, the adjustments of the weights are performed on the opposite direction. This “backpropagation” process means that the weights of the output layer are modified first, followed by those on the layer immediately preceding it, and so on [21,22]. “Learning” consists of adjusting the weights so that the error, that is the difference between the neuron (or the network’s) output and the expected value, is minimized (supervised learning). With this regard, the mean squared error (MSE) may be utilized [23]:

$$\text{MSE} = \left[\frac{\sum_i (d_i - o_i)^2}{n} \right] \quad (3)$$

in which d_i and o_i represent the desired and the actual network output values, respectively, and n the number of input-output pairs (patterns) used to training the network.

3. Materials and methods

3.1. Equipment and software

A Perkin–Elmer atomic absorption spectrometer, model 460, was used for all the determinations. Perkin–Elmer hollow cathode lamps for Zn, Cu and Fe were used according to the manufacturer recommendations [24]. The Statistical Pack-

age for SOCIAL SCIENCES 7.0 (SPS Inc.) and MINITAB 13.1 (Minitab Inc.) were used for statistical analyses. ANNs were developed using PROPAGATOR 1.0 (ARD Corporation) for Windows [23]. The software generates a list of weights after training is concluded. Those weights, together with the appropriate transfer functions, were processed by EXCEL XP (Microsoft Corp.), running under WINDOWS ME (Microsoft Corp.), to yield the network’s numerical output.

3.2. Reagents and samples

Titrisol[®] (Merck) stock solutions (1000 mg l^{-1}) were used for preparation of working standards. Ethyl alcohol (98% v/v, Riedel de Haen) and a 40% ethyl alcohol solution from a local producer were used for matrix matching.

Samples ($N = 40$) from different producers from Lara and Falcón states (Venezuela) were collected in glass bottles and stored at 4°C until analysis. Bottles were washed with nitric acid, and rinsed with distilled, de-ionized water prior to sample collection. Table 1 resumes the coding used to identify the samples, the number of samples collected from each region, the nature (with or without sugar) and geographic origin.

3.3. Determination of zinc, copper and iron by FAAS

The determination of Cu and Fe concentrations in Cocuy samples was carried out following the recommendations of the manufacturer [25]. The method was also effectively implemented for the determination of zinc [4]. Quantitation was made against a matrix-matched calibration curve. When necessary, the samples were diluted with 40% alcohol in order to bring the concentration of a given analyte within the corresponding linear dynamic range. Concentration values for each sample were estimated as the average of at least three consecutive measurements.

3.4. Discriminant analysis

Linear and quadratic discriminant analyses were performed using Zn, Cu and Fe standardized

Table 1
Classification and characteristics of the Cocuy samples

Code/category	Number of samples	Nature	Origin	Network's output code
SP	12	Pure	Municipio Sucre (Falcón)	-1 1 1 1
SS	10	With sugar	Municipio Sucre (Falcón)	1 - 1 1 1
UP	12	Pure	Municipio Urdaneta (Lara)	1 1 - 1 1
US	6	With sugar	Municipio Urdaneta (Lara)	1 1 1 - 1

concentrations as input data, and the samples' categories as outputs. Standardization was conducted according to the following equation:

$$[X_{ij}]_s = \frac{X_{ij} - \langle X_j \rangle}{s_j} \quad (4)$$

where $[X_{ij}]_s$ and X_{ij} correspond to the i th standardized and raw concentration of the j th element, $\langle X_j \rangle$ and s_j are the average concentration and standard deviation of the j th element. Data was split in two groups: i) 75% of the data was randomly selected in order to develop the discriminant functions; and, ii) the remaining 25% (prediction group) was used to validate the model.

3.5. Development of artificial neural networks

In the present work, the code (3:n:m:4) is used to describe the topology of the neural networks; where n and m represent the number of nodes in the hidden layers. For sake of simplicity, the transfer functions of the network's layers are not included in the code, as they were fixed for all topologies evaluated.

Preliminary assays revealed that low MSEs were attained when a learning rate of 0.01 and a momentum factor of 0.5 were used. In order to avoid a local minimum during training, the adjustment of the network weights for a given topology was conducted at least three times. In each case, the initial weights were randomly started (-1.0 to 1.0). Table 2 shows the parameters and characteristics of the ANNs under evaluation. Normalized data, according to Eq. (5), was used as inputs.

$$[X_{ij}]_n = \frac{X_{ij}}{X_{(\max,j)}} \quad (5)$$

Table 2
Parameters and characteristics of the ANNs under evaluation

Parameter	Characteristics
Input layer	Number of nodes: 3 (Zn, Cu and Fe normalized concentrations) Transfer function: linear (L)
Hidden layers	Number of layers: variable (1–2) Number of neurons: variable (1–7) Transfer function: sigmoid (S)
Output layer	Number of neurons: 4 (Category) Transfer function: hyperbolic tangent (HT)
Learning rate	0.01
Momentum	0.5
Training cycles	Variable (10^4 – 10^5)

where $[X_{ij}]_n$ and X_{ij} are the i th normalized and raw concentrations for the j th element, respectively, and $X_{(\max,j)}$ the maximum concentration for the j th element. A group constituted by 75% of the data was used for training the ANNs; whereas the remaining 25% was employed for validation. A sigmoid transfer function was implemented in the hidden layers, and a hyperbolic tangent was employed in the output layer. A code comprising a combination of -1 and +1 was used for definition of the corresponding categories (see Table 1).

4. Results and discussions

4.1. Determination of Zn, Cu and Fe in Cocuy samples by FAAS

Zinc, copper and iron were selected on the basis of a previous work [4]. A more detailed elemental characterization of these samples would have

required a more complex methodology [16] or, certainly, more sensitive techniques, which was beyond the scope of this first approach. Work is being currently conducted in this direction, and will be the subject of a future publication. Although other elements could be employed that may relate the product with soil characteristics, thus with the geographic origin of the raw material, Zn, Cu and Fe may be useful in establishing a relationship between the illegal products and their manufacturing process. It is believed that, at first, this may be helpful in the establishment of quality-control policies.

Table 3 summarizes the concentrations of Zn, Cu and Fe found in Cocuy samples from different manufacturers from Falcón and Lara states. Particular attention must be paid to the elevated concentration of copper, which is evidently the result of the leaching of the element from the distillation coil. Although copper is an essential element, its ingestion above certain levels may pose a likely threat to human health [26]. The results presented here confirm previous findings by Capote et al. [4].

A look at the concentration ranges presented in Table 3 reveals an ample variability, not only between the two states (Falcón and Lara), but within states as well. Copper and zinc concentrations represent a clear evidence of the latter, their concentrations varying by as much as 1–2 orders of magnitude. Such variability is clear evidence of the lack of quality control measures regulating the manufacturing of such beverages. The latter will exact an important influence in the classification of such samples, as will be seen in the ensuing sections.

4.2. Classification of Cocuy samples: discriminant analysis

Discriminant analysis (DA) is a chemometric technique whereby a set of functions (latent variables), which are combinations of the original (predictor) variables, are developed. The resulting model seeks to cluster observations by maximizing the between-group variance [27]. The dimensionality of the space can be reduced from a higher p -dimensional space (number of initial descriptors) to a smaller n -dimensional space (number of resulting discriminant functions) by this means. The latter has the benefit of permitting the visualization of the latent variables in 2 or 3 dimensions for graphical classification. Two variations of DA can be differentiated, depending on whether the latent variables are linear (LDA) or quadratic (QDA) combinations of the predictor variables. Irrespective of the model, correct application of the DA technique relies on the predicting variables having a multinormal distribution [27]. A preliminary study of the raw data revealed that frequency distributions showed high asymmetry. Therefore, it was necessary to perform a transformation of such variables which would help in smoothing their distributions so as to comply with the requirements of the technique. The variables were thus standardized according to the Eq. (4) (see Section 3.4).

A LDA was first performed on the standardized data set. Fig. 2 shows a scatter plot of the Cocuy samples by means of the first two linear discriminant functions. Copper and iron have the highest values in both discriminant functions, thus they contribute the most to the separation of the

Table 3
Zn, Cu and Fe average concentrations and ranges found in Venezuelan spirituous beverages (Cocuy) from Lara and Falcón states

Category	Concentration (mg l^{-1}) ^a		
	Zn	Cu	Fe
SP	0.12 ± 0.05 (0.03–0.17)	28.03 ± 27.99 (6.12–85.69)	0.32 ± 0.07 (0.27–0.51)
SS	0.97 ± 0.04 (0.89–1.00)	31.36 ± 0.67 (30.64–33.13)	0.26 ± 0.06 (0.18–0.36)
UP	0.23 ± 0.21 (0.02–0.65)	14.63 ± 14.69 (4.49–58.46)	0.36 ± 0.13 (0.20–0.55)
US	0.13 ± 0.02 (0.03–0.38)	15.58 ± 0.07 (7.82–26.12)	0.33 ± 0.01 (0.12–0.59)

^a Values correspond to the average $\pm$ S.D. Concentration ranges are shown in parenthesis.

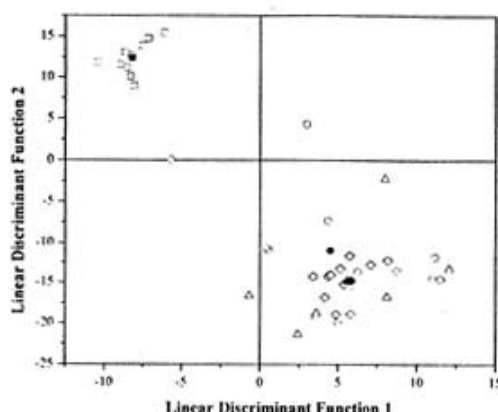


Fig. 2. Linear discriminant plot for Cocuy samples: (○) SP; (□) SS; (△) UP; and, (◇) US. Black symbols correspond to the groups' centroids.

groups. It is clear that, with the exception of one group (Category SS), all other groups present similar characteristics leading to the superposition of the corresponding categories. This is particularly evident in the closeness of the groups' centroids located in the lower right quadrant of the plot. The latter is attributed to the fact that, with the exception of group SS, the normalized concentrations of zinc, copper and iron are very similar among groups. The corresponding (normalized) concentrations in group SS are higher and statistically different to those of the remaining groups, which clearly contributes to its better separation by the first two discriminant functions. The high overlap between the groups is reflected in the low estimation and prediction percentages

summarized in Table 4. The overall classification accuracy is approximately 50%, which is evidently unsatisfactory.

Based on the fact that the high dispersion of the raw data is certainly responsible for the inability of the LDA model to provide adequate groups' separation, it was deemed appropriate to attempt the classification by means of a non-linear model. The statistical packages used along this work have a quadratic function which was used for this purpose. Quite surprisingly, it did not seem possible to plot the numerical outputs as in the case of LDA. Nonetheless, the results (see Table 4) indicate an improved performance of the corresponding model. Again, Category SS can be clearly separated from the rest of the groups, as inferred from the 100% classification accuracy. For the remaining groups, estimation and prediction accuracies $\geq 50\%$ could be attained, with an overall estimate of ca. 80% and 72%, respectively.

The results discussed in the preceding paragraphs pinpoint to the groups been clearly non-linearly separable. The function though, must be more complex than a simple second-order polynomial, as evidenced by the still unacceptable estimation/prediction accuracy of the QDA model. Such a function, or combination of functions, cannot be determined a priori, thus impeding the application of classical mathematical models, and calling for a more effective alternative. ANNs are well recognized for the ability to model highly non-linear model, without the need of knowing which function could actually perform the separation [22]. The ensuing section is devoted to the

Table 4
Estimation and prediction accuracy of the LDA and QDA, and the (3:5:7:4) neural network on the determination of the category and geographic provenance of Cocuy samples

Category	LDA		QDA		ANN (3:5:7:4)	
	Estimation (%)	Prediction (%)	Estimation (%)	Prediction (%)	Estimation (%)	Prediction (%)
SP	33.3	27.8	83.3	72.2	88.5	100.0
SS	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
UP	33.3	33.3	55.6	50.0	100.0	83.3
US	44.4	44.4	83.3	72.2	100.0	100.0
Overall	51.7	50.0	79.2	72.5	96.5	97.0

evaluation of this alternative for the classification of the Cocuy samples.

4.3. Classification of Cocuy samples: artificial neural networks

Unlike many chemometric tools, data do not have to comply with any specific distribution, e.g. multivariate normal distribution, to be processed by ANNs. However, in order to prevent the networks from a priori giving more relevance to some elements based on the magnitude of their concentrations, as would be the case for copper, normalized data was used instead of the raw data. Standardized data was also evaluated for this purpose, but it was found that normalization led to ANNs showing a better classification performance, as will be shown later on.

The selection of the ANNs for classification of Cocuy samples was conducted considering the reduction in the mean square error (MSE) for various networks' topologies. Fig. 3 shows the trend in the MSE for the (3:5:7:4) ANN, which was considered the best on this basis. Clearly, the MSE experiences a monotonic reduction as the network is trained eventually reaching a plateau. Such a tendency is an indication of overtraining, i.e. the network has adjusted the weights so as to

match the training set, thus reducing its predicting capabilities. Training the network was thus stopped after 4000 cycles, in order to avoid the aforementioned problem.

Table 4 shows the performance of such ANN for estimating the provenance and nature of Cocuy samples. The superiority of this approach for determining the origin and nature of such samples is clear. The latter is certainly attributable to the fact that not only are the observations not linearly separable, but also because a more complex non-linear function is needed for a correct clustering. By adjusting the weights, ANNs are capable of developing extremely complex functions, which could be nearly impossible to emulate by most mathematical methods. The longest development time of ANNs may be considered a disadvantage when compared with the immediateness with which most chemometric tools are implemented. However, once trained they are able to predict the category to which the samples belong almost instantaneously, thus compensating such a drawback.

5. Conclusions

LDA, QDA, and ANNs were evaluated for classification of Cocuy de Penca firewater samples based on their Zn, Fe and Cu concentrations. ANNs clearly outperformed LDA and QDA, showing an excellent overall predicting capability (97% vs. 50% and 72%, respectively). The high dispersion of the data, resulting from the lack of quality control measures in the manufacturing of such beverages, exacts a detrimental effect on the classification powers of these chemometric tools. This represents a clear example of the capabilities of ANNs for developing complex mathematical models for classification purposes, without the inherent limitations of many chemometric techniques. Further work is being conducted so as to improve the classification of the various samples taking into account other trace elements that may provide additional information on the geographic origin of these beverages.

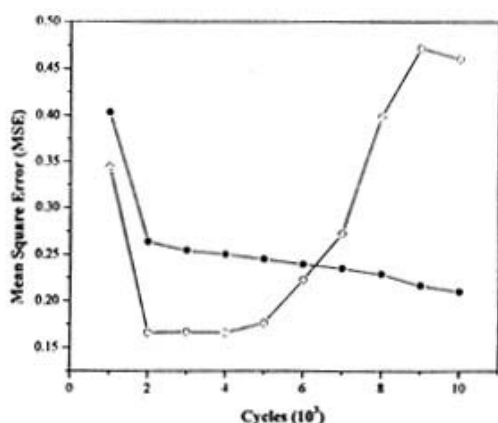


Fig. 3. Training (●) and validation (○) MSE for a (3:5:7:4) ANN.

Acknowledgements

E.A. Hernández-Caraballo and R.M. Avila-Gómez are grateful for their respective scholarships from Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT, Venezuela), for conducting post-graduate studies at Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela).

References

- [1] D.L. Tsalev, Z.K. Zaprianov, Atomic absorption spectrometry, Vol. I, Analytical Aspects and Health Significance, CRC Press, USA, 1983.
- [2] M.L. Cervera, A. Navarro, R. Montoro, M. de la Guardia, A. Salvador, *J. Anal. At. Spectrom.* 6 (1991) 477.
- [3] J. Cacho, V. Ferreira, C. Nerin, *Analyst* 117 (1992) 31.
- [4] T. Capote, L.M. Marcó, J. Alvarado, E.D. Greaves, *Spectrochim. Acta Part B* 54 (1999) 1463.
- [5] C. Clark, G.R. Scollary, *Anal. Chim. Acta* 413 (2000) 25.
- [6] R. Svendsen, W. Lund, *Analyst* 125 (2000) 1933.
- [7] R.C. de Campos Costa, A. Nova Araujo, *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 227.
- [8] I.E. Frank, B.R. Kowalski, *Anal. Chim. Acta* 162 (1984) 241.
- [9] S.J. Haswell, A.D. Walmsley, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 131.
- [10] A. Marcos, A. Fisher, G. Rea, S.J. Hill, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 521.
- [11] S. Rebollo, R.M. Peña, M.J. Latorre, S. García, A.M. Botana, C. Herrero, *Anal. Chim. Acta* 417 (2000) 211.
- [12] Z. Murányi, Z. Kovács, *Microchem. J.* 67 (2000) 91.
- [13] M.A. Brescia, V. Caldarola, A. De Giglio, D. Benedetti, F.P. Fanizzi, A. Sacco, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 177.
- [14] D. Bellido-Milla, J.M. Moreno-Pérez, M.P. Hernández-Artiga, *Spectrochim. Acta Part B* 55 (2000) 855.
- [15] S. Pérez-Margariño, M. Ortega-Heras, M.L. González-San José, *Anal. Chim. Acta* 458 (2002) 187.
- [16] B.O. Paredes Buenaño, Determinación de trazas de plomo en aguardientes larenses por espectroscopia de absorción atómica de llama mediante una configuración de flujo continuo, Undergraduate Thesis, Universidad de Los Andes, Venezuela, 2002.
- [17] I.-N. Sun, K. Danzer, G. Thiel, *Fresenius J. Anal. Chem.* 359 (1997) 143.
- [18] A.M. Cameán, I. Moreno, M. López-Artíguez, M. Repetto, A.G. González, *Talanta* 54 (2001) 53.
- [19] M. Angeles Herrador, A.G. González, *Talanta* 3 (2001) 1249.
- [20] A. Alcázar, F. Pablos, M.J. Martín, A.G. González, *Talanta* 57 (2002) 45.
- [21] J. Zupan, J. Gasteiger, *Neural Networks in Chemistry and Drug Design*, second ed, Wiley-VCH, Germany, 1999.
- [22] B.J. Wythoff, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 18 (1993) 115.
- [23] *nnorgastor™*, Neural Network Development Software, Version 1.0 for windows, ARD Corp., USA, 1993.
- [24] Standard conditions, in: *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry*, Perkin-Elmer Corp., Part No. 0303-0152, January 1982.
- [25] Analysis of alcoholic beverages. Copper and iron, in: *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrometry*, Perkin-Elmer Corp., Part No. 0303-0152, January 1982, TP-15.
- [26] D.L. Tsalev, Z.K. Zaprianov, Chapter 2. Biological and toxicological characteristics of individual elements, in: K. Copper (Ed.), *Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Practice*, Vol. 1, Analytical Aspects and Health Significance, CRC Press, USA, 1983, pp. 121–127.
- [27] C.J. Huberty, *Applied Discriminant Analysis*, Wiley, USA, 1994.

Publicación III

www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento



Increasing the working calibration range by means of artificial neural networks for the determination of cadmium by graphite furnace atomic absorption spectrometry

Edwin A. Hernández-Caraballo^{a,*}, Rita M. Avila-Gómez^{a,1},
Francilina Rivas^b, Marcela Burguera^a, José L. Burguera^a

^a Instituto Venezolano de Investigaciones Químicas (IVIVQ), Facultad de Ciencias,
Universidad de los Andes, P.O. Box 542, Mérida 5101, Venezuela

^b Laboratorio de Sistemas Inteligentes, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería de Sistemas,
Universidad de los Andes, Mérida 5101, Venezuela

Received 31 March 2003; received in revised form 15 October 2003; accepted 7 November 2003

Abstract

Feed-forward artificial neural networks (ANNs), trained with the generalized delta rule, were evaluated for modeling the non-linear behavior of calibration curves and increasing the working range for the determination of cadmium by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). Selection of this analyte was made on the basis of its short linear range (up to $4.0 \mu\text{g l}^{-1}$). Two-layer neural networks, comprising one node in the input layer (linear transfer function), a variable number of neurons in the hidden layer (sigmoid transfer functions), and a single neuron (linear transfer function) in the output layer were assessed for such a purpose. The (1:2:1) neural network was selected on the basis of its capacity to adequately model the working calibration curve in the range of study ($0-22.0 \mu\text{g l}^{-1}$ Cd). The latter resulted in a nearly six fold increase in the working range. Cadmium was determined in the certified reference material "Trace Elements in Drinking Water" (High Purity Standards, Lot No. 490915) at four concentration levels (2.0, 4.0, 8.0 and $12.0 \mu\text{g l}^{-1}$ Cd), which were experimentally within and above the linear dynamic range (LDR). No significant differences ($P < 0.05$) were found between the expected concentrations and the results obtained by means of the neural network. The proposed method was compared with the conventional "dilution" approach, and with fitting the working calibration curve by means of a second-order polynomial. Modeling by means of an ANN represents an alternative calibration technique, for its use helps in reducing sample manipulation (due to the extension of the working calibration range), and may provide higher accuracy of the determinations in the non-linear portion of the curve (as a result of the better fitness of the model).

© 2003 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Cadmium; Calibration curves; Graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS); Artificial neural networks (ANNs); Backpropagation

1. Introduction

Electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) is well recognized to be among the most powerful techniques for analysis at trace levels. This technique is characterized by its high sensitivity, considerable robustness

towards matrix interferences, low sample consumption, excellent performance for the analysis of solid, liquid and gaseous samples, etc. However, ETAAS is not without disadvantages, being the short linear dynamic ranges (LDRs) among them [1]. For comparison purposes, while the LDR for this technique extends only for about one to two decades, inductively coupled plasma, either with optical emission or mass detection, or total reflection X-ray fluorescence spectrometry can achieve LDRs spanning 4–6 orders of magnitude [2,3]. Working outside the linear range may render inaccurate results [4]. Therefore, the analyst is often forced to dilute a given sample in order to bring the analyte concentration within the linear range. Besides being time-consuming, the latter poses the intrinsic

* Corresponding author. Tel.: +58-274-2401376;
fax: +58-274-2401286.

E-mail address: ea.hernandez@ciqa.ve
(E.A. Hernández-Caraballo).

¹ Present address: Departamento de Procesos Agroindustriales, Decanato de Agronomía, Universidad Centro-Occidental Lisandro Alvarado, Núcleo Obelisco, Barquisimeto 3002, Venezuela.

sic risk of contaminating the sample during the dilution process.

Several methods have been proposed with various degrees of success, in an attempt to salvage the above inconvenience. Among the various approaches are worth mentioning: the use of peak area instead of peak height [5], high-pressure atomizers [6,7], quantitation at non-resonant absorption lines [8,9], non-stop gas condition during atomization [8], atomization off the platform or the atomizer wall [8,9], mathematical corrections of the cause of deviations from linearity [10–12], and less often modeling of the calibration curve with polynomial expressions [4,13,14].

Artificial neural networks (ANNs) are known for their capacity to model non-linear systems [15–18]. Therefore, on a first approximation, they could be used for modeling the behavior of calibration curves in atomic absorption spectrometry. Even though ANNs have received significant attention for spectrophotometric applications [19–22], their use in atomic spectrometry is relatively scarce [23–25].

The purpose of the present work was to evaluate the applicability of ANNs for modeling non-linear calibration curves in graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), aiming at extending the working range. Cadmium was chosen as the analyte of study due to its short LDR. A certified reference material, “trace metals in drinking water” (High Purity Standards), was used to check the accuracy and precision of the method. For comparison purposes, the determination of cadmium in such a material was also performed through the conventional dilution procedure and by fitting the entire calibration curve with a second-order polynomial.

2. Theory

ANNs are pseudo-parallel processing systems capable of “adaptable learning,” meaning that they can implement tasks without the formalisms and restrictions of computer programming languages [26]. The fundamental constituents of the ANNs are called neurons. Fig. 1a shows a basic representation of one of such units. Each neuron performs a series of simple calculations. First, the input signals (X_i) are processed in the “body” of the neuron according to:

$$Z_i = \sum_j w_j X_j \quad (1)$$

where w_j , the weights, represent the “artificial synapses”. This value is further modified in a second step by means of a transfer function (f). The unipolar sigmoid (Eq. (2)) is one of the most popularly used functions:

$$Y_i = \frac{1}{1 + \exp(-(Z_i + \theta))} \quad (2)$$

This is a monotonous, non-linear function, which restricts the output of the neuron (Y_i) between 0 and 1. The term θ is known as the bias, and it represents a threshold value above which the neuron is said to “fire”, or emit a signal.

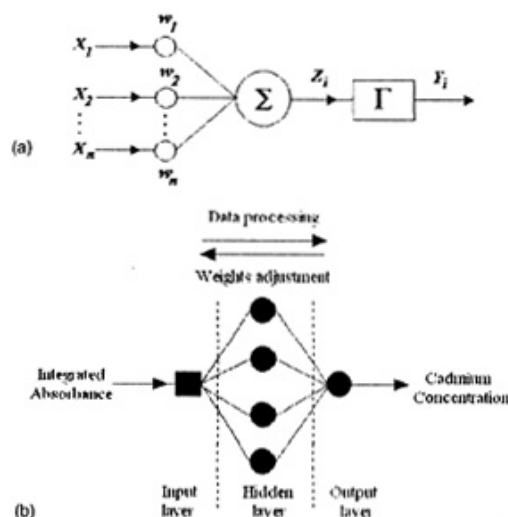


Fig. 1. Diagram of: (a) an individual neuron; and (b) an ANN with two (active) layers.

Transfer functions such as the one shown above are what make ANNs particularly suitable for modeling non-linear systems. The value Y_i is thus propagated to the neurons on to the following layers. “Learning” consists of adjusting the weights so that the error, that is the difference between the neuron (or the network’s) output and the expected value, is minimized (supervised learning). On this regards, the mean squared error (MSE) may be utilized [27]:

$$MSE = \frac{\sum_i (d_i - o_i)^2}{n} \quad (3)$$

in which d_i and o_i represent the desired and the actual network output values, respectively, and n the number of input-output pairs (patterns) used to training the network.

The ANNs evaluated in this work are fully connected arrangements such as the one depicted in Fig. 1b. Each black circle represents an individual neuron performing the operations described previously. The input layer serves to distribute the data and does not perform any calculation; thus the units are represented as black squares, and they are referred to as “nodes” instead. Neither is this layer taken into account when describing the topology of a given network. On this regards, the diagram in Fig. 1b shows a two-layer ANN. The hidden layer is known as such for it neither receives nor transmits data directly from or to the user. Finally there is the output layer, which provides the results of the networks calculation. Data “flows” exclusively from the input to the output layer, and thus this particular topology is usually referred to as “feed-forward ANN”. On the other hand, the adjustment of the weights is performed on the opposite direction, i.e. it is “backpropagated”. This means that the weights of the output layer are modified

first, followed by those on the layer immediately preceding it, and so on, until the weights of the input layer are finally adjusted [26,28]. The process is iteratively repeated until the error reaches a pre-determined level, or after a certain number of learning/validation cycles, also selected by the analyst, have been completed.

3. Experimental

3.1. Equipment, accessories and software

A Perkin Elmer atomic absorption spectrometer, model 2100, provided with an electrothermal atomization system model HGA-700, an autosampler system model AS-70, and a deuterium lamp background correction system, was used. Pyrolytically-coated graphite atomizers (Perkin-Elmer) with totally-pyrolytic graphite platforms (Perkin-Elmer) were employed after proper conditioning [29]. A monoelemental, cadmium hollow-cathode lamp (Varian), operated at 6 mA, was used at the 228.8 nm Cd line. All other conditions were as recommended by the manufacturer of the spectrometer.

The neural networks were developed using PROPAGATOR 1.0 (ARD Corporation) for Windows 3.X [27]. The software generates a list of weights after training is concluded. Those weights, together with the appropriate transfer functions, can be processed by different computational tools to yield the network's numerical output when presented with the corresponding input values. EXCEL 2002 (Microsoft Corp.) was employed for this purpose in a Windows Me (Microsoft Corp.) environment. Statistical evaluations, as well as linear and second-order polynomial fittings, were conducted with MINITAB Statistical Software v. 13.1. (Minitab Inc.).

3.2. Reagents and materials

Cd metal powder (Merck, pro analysi) was employed for preparation of the analyte's stock solution. Ten percent (10% w/v) palladium nitrate solution (Aldrich), and magnesium nitrate hexahydrate (Carlo Erba) were used as chemical modifiers. Nitric acid (Alfa Aesar, metal basis, 99.999% purity) served for dilution and stabilization of solutions. Distilled, de-ionized water (Millipore, 18 M Ω cm⁻¹) was utilized for preparation of sample and standard solutions.

The "trace metals in drinking water" certified reference material (High Purity Standards, Lot No. 490915) was employed to verify the accuracy of the methodology hereby proposed. Such reference material has a certified concentration of cadmium of 12.0 μ g l⁻¹ ($\pm 0.5\%$) [30].

4. Procedure

4.1. Preparation of working solutions

Cadmium standards were prepared from a laboratory-made stock solution (1000 mg l⁻¹ Cd in 1.0% HNO₃) by proper

Table 1

Atomization program for the determination of Cd by GFAAS^a

Step	Temperature (°C)	Ramp (s)	Hold (s)
Dry	200	20	5
Pyrolysis	800	5	15
Cool down I	50	1	5
Cool down II ^b	50	1	5
Atomization ^b	1400	0	3 (read)
Clean	2500	1	3
Cool down	20	1	8

^a Injection temperature: 100 °C; injection speed: 40%.

^b Gas stop mode: 300 ml min⁻¹ Ar flow in all other stages.

dilutions with a 0.2% v/v HNO₃ solution. Fifteen standards were prepared having the following concentrations: 0 (blank), 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 14.0, 16.0, 18.0, 20.0 and 22.0 μ g l⁻¹ Cd. A 6000 mg l⁻¹ magnesium nitrate solution was prepared by weighing an exact amount (1.037 g) of Mg(NO₃)₂·6H₂O and diluting to 100 ml with 0.2% v/v HNO₃. A mixed 500 mg l⁻¹ Pd + 300 mg l⁻¹ Mg(NO₃)₂ chemical modifier was prepared directly in an autosampler vial by proper dilution of the corresponding solutions. This concentration of modifier was chosen based on preliminary assays, in order to correct for a recurrent distortion of the analyte's peak profile observed during the analysis of the reference material.

The reference material was prepared by serial dilution to yield cadmium concentrations at four levels, namely, 2.0, 4.0, 8.0 and 12.0 μ g l⁻¹ Cd. These were selected to be inside and outside the linear calibration range.

4.2. Determination of cadmium by GFAAS

Table 1 summarizes the optimized atomization program employed for the determination of Cd. Ten microliters of the standards/samples and ten microliters of the mixed Pd + Mg(NO₃)₂ modifier were injected sequentially into a pre-heated (100 °C) graphite furnace electrothermal atomizer. A single, high-temperature drying step was used in order to reduce the span of the atomization program. A double-staged, pre-atomization cool down step was introduced in order to promote the formation of the atomic cloud in a more favorable thermodynamic environment [31,32]. All temperatures correspond to nominal values given by the software controlling the spectrometer. Five replicates (integrated absorbance values) for each standard/sample were taken.

The determination of Cd in the standard reference material was conducted three fold: (i) dilution of the sample and quantitation of the analyte's concentration using the linear portion of the calibration graph (0–4.0 μ g l⁻¹ Cd); (ii) modeling the entire working calibration curve (0–22.0 μ g l⁻¹ Cd) with a second-order polynomial; and, (iii) modeling the calibration curve in the same range as before, by means of an ANN.

4.3. Artificial neural networks

Two-layer ANNs with one node in the input layer (linear transfer function), a variable number of neurons in a single hidden layer (sigmoid transfer function), and a single neuron in the output layer (linear transfer function), were evaluated. The different ANNs were trained/validated for a variable number of cycles (10^4 – 10^5). The program employed in the development of the ANNs uses the generalized delta rule for weights' correction [27].

Preliminary assays revealed that low MSE were obtained using a learning rate of 0.04 and a momentum factor of 0.4, as well as with normalized cadmium concentrations instead of the raw ones for outputs. A group of patterns (45 integrated absorbance–concentration pairs) covering the entire working range were randomly selected and used for training the ANNs. A set of 30 patterns (validation set) was employed to prevent the networks from becoming overtrained. The adjustment of the network weights for a given topology was conducted at least three times, in order to avoid the networks to be stuck in a local minimum during training. In each case, the initial weights were randomly started (–1.0 to 1.0). The selected topology was that whose MSE best approached the average training MSE. The code (1:n:1) is used throughout to describe the topology of the neural networks (n representing the number of neurons in the hidden layer).

Testing the chosen ANN was conducted two fold. First, by evaluating the quality of a linear regression analysis of cadmium concentrations predicted by the network versus the actual concentrations in the working solutions. The goodness-of-fit of the model generated by the ANN was also

assessed through the estimation of the root mean square of the percentage deviations (RMSPD) [13,33]:

$$\text{RMSPD} = \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N \left(\frac{C_{\text{Pred}}^i - C_{\text{Real}}^i}{C_{\text{Real}}^i} \times 100 \right)^2 \right)^{1/2} \quad (4)$$

where C_{Pred}^i and C_{Real}^i corresponds to the i th predicted and actual concentrations, respectively, and N is the number of points used in the calibration (excluding the blank). Second, employing the model thus generated for the determination of cadmium in the reference material at the concentration levels described in the preceding section.

5. Results and discussion

5.1. Cadmium calibration curve in GFAAS

Fig. 2 clearly shows the non-linear behavior of the integrated absorbance signal for cadmium with increasing concentrations in the range of 0–22.0 $\mu\text{g l}^{-1}$. Above this value the curve reached a quasi-plateau, and so those X – Y pairs were discarded from the studies that followed. Precision in the above concentration range was better than 2.5 %R.S.D., except at 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Cd (ca. 4 %R.S.D.), which is still analytically acceptable. The data points were fit with the second-order polynomial described by $A_i = -0.0013[\text{Cd}]^2 + 0.0761[\text{Cd}] - 0.0002$ ($r^2 = 0.9988$). The goodness-of-fit was assessed in the first place through the adjusted coefficient of determination (r^2) [34]. This

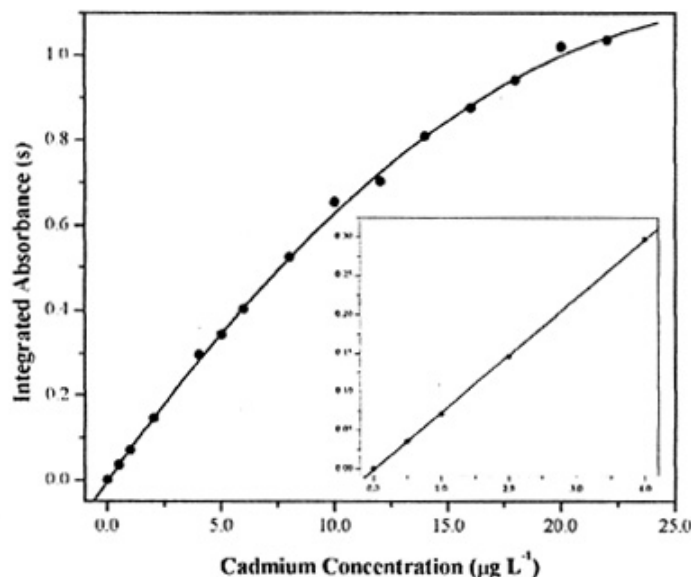


Fig. 2. Integrated absorbance as a function of Cd concentration. The line represents a second-order polynomial fit. Inset shows cadmium's LDR (see text for details).

parameter takes into account the variation in the degrees of freedom experienced by the residuals with the inclusion of further terms in a polynomial expression. Therefore, it provides a statistically more accurate reflection of the polynomial fitness than the coefficient of determination employed otherwise [35].

The linear range is significantly short, spanning up to $4.0 \mu\text{g l}^{-1}$ Cd (see inset in Fig. 2). The regression equation best describing the variation of the integrated absorbance with concentration was found to be $A_i = 0.0745[\text{Cd}] - 0.0019$ ($r^2 = 0.9998$). Inclusion of an additional X - Y pair already deteriorated the adequacy of the linear model ($r^2 = 0.9967$). Such a short LDR entails that samples with concentrations higher than the upper limit would require dilution, with all the disadvantages already mentioned. An alternative could be to extend the working range by modeling the entire (non-linear) calibration curve with ANNs.

5.2. Modeling the calibration curve by artificial neural networks

Vander Heyden et al. [24] developed a Kohonen neural network approach for diagnosing the adequacy of the calibration curves in AAS. Such an approach would determine whether a calibration graph contains outliers, may give rise to imprecision in the determinations, or deviates from linearity. In our case, we decided to evaluate another kind of ANNs, viz. feed-forward ANNs trained with the generalized delta rule, for modeling the non-linear calibration and increasing the working range for the determination of cadmium by GFAAS.

Several ANNs were evaluated for modeling the calibration curve depicted in Fig. 2. Variables to be optimized were the number neurons in the hidden layer and the training/validation cycles. The initial criterion for selection of the most adequate ANN was the achievement of the minimum MSE in a relatively small number of cycles.

Fig. 3 shows the trend in the training and validation MSEs for a (1:2:1) ANN. Only such values are presented for sake of simplicity, since increasing the number of hidden nodes did not yield a better performance. Also, using more complex networks would have unnecessarily complicated the data processing step, and were not further considered. The training MSE reached a quasi-plateau after ca. 4×10^4 cycles, whereas the validation one did so after 8×10^4 cycles. No significant variation in the MSE was observed beyond 10^5 cycles, and thus training/validation was stopped at this point. The training/validation time took only 15–27 s in a Pentium III processor; therefore, the development of the networks in this case was a relatively rapid process.

While a reduction of the MSE is an important aspect to be considered for selecting the most adequate topology, it is as relevant evaluating the generalization capacity with data not used during the training process. On this sense, a group of integrated absorbance data from the calibration set was input to the selected ANN, and the corresponding concentrations were estimated. A linear regression model of predicted versus expected cadmium concentrations was developed. The regression equation for the (1:2:1) network was $[\text{Cd}]_{\text{pred}} = 1.002[\text{Cd}]_{\text{real}} + 0.056$ ($r^2 = 0.999$). A statistical test, Student's t -test showed that the intercept and the slope of such equations did not differ significantly ($P = 0.05$).

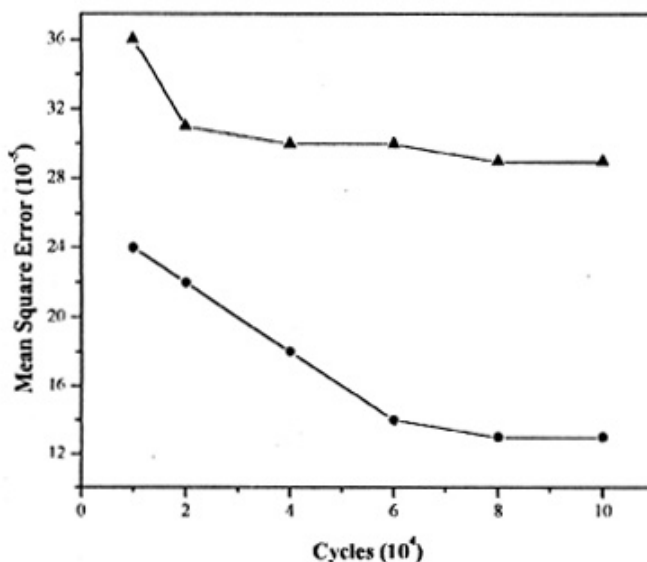


Fig. 3. Training ($\blacktriangle$) and validation ($\bullet$) mean square error for the (1:2:1) neural network.

Table 2
Determination of Cd in "trace metals in drinking water" certified reference material by GFAAS using different calibration approaches

Concentration ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Method ^a		
	Dilution	Second-order polynomial	ANN (1:2:1)
2.0	2.09 $\pm$ 0.03 (1.4)	2.10 $\pm$ 0.03 (1.4)	2.03 $\pm$ 0.03 (1.4)
4.0	4.00 $\pm$ 0.04 (1.0)	4.19 $\pm$ 0.04 (1.0)	4.08 $\pm$ 0.04 (1.1)
8.0	–	8.05 $\pm$ 0.11 (1.4)	7.90 $\pm$ 0.12 (1.5)
12.0	–	12.35 $\pm$ 0.08* (0.6)	12.30 $\pm$ 0.08 (0.6)

^a Values correspond to the average $\pm$ standard deviation ($N = 5$). Relative standard deviation (%R.S.D.) is given in parenthesis.

* Significant differences ($P = 0.05$).

from 0 and 1, respectively [34], indicating the adequacy of the model in a first approximation. The RMSPDs (Eq. (4)) was also estimated in order to assess the goodness-of-fit of the model generated by such a network. The low RMSPD (4.3%) is a clear indication of the capability of the neural network for modeling the calibration curve in the entire range of study.

5.3. Determination of Cd by GFAAS in a certified reference material

As the concentration of the analyte ($12.0 \mu\text{g l}^{-1}$) in the reference material is clearly outside the linear range, a dilution of such a solution would have been certainly considered the first approach for the determination of cadmium. The results obtained in such a way are presented in Table 2. A statistical evaluation of Student's *t*-test [34] revealed no significant differences ($P = 0.05$) between the expected and estimated concentrations. Again, this method presents certain disadvantages, and alternative methods should be sought in order to overcome them.

A polynomial fitting of a non-linear curve is a relatively fast and simple method that can be easily implemented by any dedicated computer program. According to L'vov et al. [10], these methods should not be considered for calibration purposes, since the coefficients adjusting the polynomial lack physical meaning. Even though this observation (coefficients' lack of meaning) is clearly accurate, we estimate that an adequate fitting, as well as the ease and speed of such a method should make of this an interesting calibration alternative.

The determination of cadmium in the reference material was carried out using the second-order polynomial fit discussed in Section 5.1 (see Table 2). The statistical analysis indicates no significant differences ($P = 0.05$) for all but the highest concentration. Attempts to increase the accuracy of the determination at such a level, for instance by modeling solely the non-linear portion of the curve (5.0 – $22.0 \mu\text{g l}^{-1}$), did not render better results. Therefore, and in spite of the apparently goodness-of-fit of the second-order polynomial (high r^2), this method was found partially inadequate for the case of study. Other authors have long reported on problems associated with the accuracy of the determinations in the non-linear portion of the calibration curves [4], yet second-order polynomials have still been successfully used

[35]. Finally, the determination of cadmium in the reference material was conducted by means of the model generated by the ANN. Contrarily to the previous case, no statistical differences ($P = 0.05$) were found between the expected concentrations and those obtained by the proposed method at all levels (see Table 2).

The results presented here indicate that the working calibration range can be extended by means of an ANN, without sacrificing either accuracy or precision. For the specific case of cadmium, a nearly six fold increase could be achieved. The high sensitivity of the measurements is still preserved at the linear portion of the calibration graphs. The latter permits the determination of cadmium at both low (linear portion) and moderately-high (non-linear portion) concentrations with the same calibration curve. This is not possible with some methods which resort to decreasing the sensitivity of the measurements for increasing the LDR, thus allowing only the determination of elements at high concentrations [8,9]. Another advantage of modeling by ANNs is, in general, the fact that no a priori knowledge of the system is required ("soft" modeling), as it is when modeling by conventional mathematical methods ("hard" modeling).

It is important to highlight that, just like the coefficients of the second-order polynomial, the neuron's weights do not have any physical meaning. Furthermore, while an ANN can model almost any system, it is not possible to translate such a model into a mathematical expression, particularly for large networks. This is in fact one of the major criticisms to ANNs, i.e. their "black box" character. However, we reiterate that such models could be used for practical purposes, e.g. for routine analysis, as long as they provide results that could be proved to be accurate, while having an acceptable degree of precision. Modeling calibration curves by means of ANNs could be an alternative in multielemental (simultaneous) GFAAS, wherein selection of the dilution factor for the determination of various analytes in a single sample is more critical than in other multielemental techniques, e.g. ICP-OES, TXRF, etc. due to the intrinsically shorter linear range.

6. Conclusions

An ANN was successfully used for modeling the calibration graph and increasing the working range for cadmium in

GFAAS. An interesting aspect is that, contrary to some instrumental methods hitherto developed, the ANN approach allows retaining the high sensitivity of the measurements at the linear portion of the curve. This aspect may be of importance in those cases where the analyte concentration varies in such a way that high sensitivity is still required for some samples, yet dilution may be needed for some others. Modeling by ANNs may represent an alternative in multielemental (simultaneous) GFAAS, as a means of coping with the shorter linear range of the technique and the compromise dilution conditions required for multielemental analysis in a single sample.

Acknowledgements

E.A. Hernández-Caraballo, R.M. Avila-Gómez are grateful for their respective scholarships awarded by Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT, Venezuela), for conducting post-graduate studies at Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela).

References

- [1] L. de Galan, *J. Anal. At. Spectrom.* 2 (1987) 89.
- [2] R.B. Boss, K.J. Fredeen, General characteristics of ICP-OES, in: *Concepts, Instrumentation, and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, Perkin-Elmer Corp., USA, 1999, pp. 2–12 (Chapter 2).
- [3] R.P. Peterson, TXRF, in: *Design of a Total-Reflection X-ray Fluorescence Spectrometer and Application to Periphyton Communities*, Ph.D. Thesis, Chalmers University of Technology and Göteborg University, Sweden, 1997, pp. 8–11 (Chapter 3).
- [4] J.M. Marchante Gayón, A. Sanz-Medel, C. Fellows, P. Rock, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 1079.
- [5] R.E. Sturgeon, C.L. Chakrabarti, P.C. Bertels, *Anal. Chem.* 47 (1975) 1250–1257.
- [6] R.E. Sturgeon, C.L. Chakrabarti, P.C. Bertels, *Spectrochim. Acta Part B* 32 (1977) 257.
- [7] C.M. Smith, J.M. Hamly, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 187.
- [8] M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo, *Spectrochim. Acta Part B* 51 (1996) 697.
- [9] J.B. Borda da Silva, M.B. Oss Giacomelli, I. Gonçalves de Souza, *Anal. Chim. Acta* 401 (1999) 307.
- [10] B.V. L'vov, L.K. Polzik, N.V. Kocharova, *Spectrochim. Acta Part B* 47 (1992) 889.
- [11] E.G. Su, A.I. Yuzefovsky, R.G. Michel, J.T. McCaffrey, W. Slavin, *Spectrochim. Acta Part B* 49 (1994) 367.
- [12] A.I. Yuzefovsky, R.F. Leonardo, J.X. Zhou, R.G. Michel, *Appl. Spectrosc.* 51 (1997) 738.
- [13] S.R. Bysouth, J.F. Tyson, *J. Anal. At. Spectrom.* 1 (1986) 85.
- [14] H.C. Wagenaar, L. de Galan, *Spectrochim. Acta Part B* 30 (1975) 361.
- [15] J.R. Long, V.G. Gregoriu, P.J. Gemperline, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1791.
- [16] Z. Li, Z. Cheng, L. Xu, T. Li, *Anal. Chem.* 65 (1993) 393.
- [17] T.B. Black, S.D. Brown, *Anal. Chem.* 65 (1993) 3081.
- [18] L. Hadjiiski, P. Geladi, P. Hopke, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 49 (1999) 91.
- [19] Y. Ni, C. Liu, *Anal. Chim. Acta* 396 (1996) 221.
- [20] A. Safavi, G. Absalan, S. Maesum, *Anal. Chim. Acta* 432 (2001) 229.
- [21] G. Absalan, A. Safavi, S. Maesum, *Talanta* 55 (2001) 1227.
- [22] Y. Zhou, A. Yan, H. Xu, K. Wang, X. Chen, Z. Hu, *Analyst* 125 (2000) 2376.
- [23] C. Schierle, M. Otto, *Fresenius J. Anal. Chem.* 344 (1992) 190.
- [24] Y. Vander Heyden, P. Vankeerberghen, M. Novic, J. Zupan, D.L. Massart, *Talanta* 51 (2000) 455.
- [25] R. Zhang, X. Chen, S. Chen, Z. Hu, *Fenxi Huaxue* 24 (1996) 724.
- [26] J. Zupan, J. Gasteiger, *Neural Networks in Chemistry and Drug Design*, second ed., Wiley-VCH, Germany, 1999.
- [27] Propagator, Neural Network Development Software, Version 1.0 for Windows, ARD Corp., USA, 1993.
- [28] B.J. Wythoff, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 18 (1993) 115.
- [29] HGA-700 Graphite Furnace Operator's Manual, Perkin-Elmer Corp., Part No. B017-4145, 1990.
- [30] HPS Certified Reference Material "Trace Metals in Drinking Water", Certificate of Analysis, High Purity Standards, Charleston, SC, USA.
- [31] E.A. Hernández Caraballo, J.R. Domínguez, J. Alvarado, *At. Spectrosc.* 21 (2000) 132.
- [32] E.A. Hernández Caraballo, J.R. Domínguez, J. Alvarado, *At. Spectrosc.* 22 (2001) 295.
- [33] N.J. Miller-Ihli, T.C. O'Haver, J.M. Hamly, *Spectrochim. Acta Part B* 39 (1984) 1603.
- [34] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, fourth ed., Prentice Hall, UK, 2000.
- [35] M.G.R. Vale, M.M. Silva, B. Welz, R. Nowka, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 38.

Publicación IV

www.bdigital.ula.ve

C.C.Reconocimiento



Determination of cadmium in urine specimens by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a fast atomization program

Edwin A. Hernández-Caraballo*, Marcela Burguera, José L. Burguera

Instituto Venezolano de Investigaciones Químicas (IVIVIM), Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela

Received 10 October 2003; received in revised form 6 November 2003; accepted 6 November 2003

Abstract

A simple, fast, and reliable method was developed for the determination of cadmium in urine specimens by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). The method involved dilution (1:1) of the specimens with a 4.0% HNO₃, direct injection of a 10 µl aliquot of the corresponding solution into a hot transversely-heated graphite atomizer (110 °C), and application of a fast atomization program (42 s) in which the conventional dry-pyrolysis sequence was substituted by a high-temperature (300 °C) drying step. The effect of the injection temperature (A), injection rate (B), pyrolysis ramp (C) and hold (D) times over the analyte's integrated absorbance, peak-shape and repeatability of the measurements was evaluated by means of a 2⁴⁻¹ fractional factorial design. All those individual variables, as well as their first-order interactions (AB-, AC- and AD-type interactions) were found to exert a statistically significant effect ($P < 0.05$). The lack of a chemical modifier other than the nitric acid itself benefited the overall methodology by allowing low-temperature atomization (1200 °C), enhanced atomic and background signals separation, and reduced blank values. A detection limit (3s, $n = 20$) of 0.06 µg l⁻¹ Cd, corresponding to 0.12 µg l⁻¹ Cd in the urine specimen, and a characteristic mass of 1.78 pg/0.0044 s were obtained under the optimized conditions. The standard calibration technique (SCT) was used for quantitation. The successful determination of cadmium in Seronorm™ Trace Elements Urine Batch No. 115 (Nycomed Pharma AS) and in four urine specimens from volunteer donors (recoveries: 91.3–103.4%) attested to the robustness of the proposed method.

© 2003 Published by Elsevier B.V.

Keywords: Cadmium; Urine; Graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS); Fast atomization programs; Fractional factorial designs

1. Introduction

Cadmium is a toxic element with no known beneficial role in the metabolism of living organisms. The element occurs in relatively low concentrations in nature [1], but anthropogenic activities have contributed to increase its concentration in the environment. Mining, zinc refining, plastic manufacturing, production and application of phosphate-containing fertilizers, etc., are among the most important sources of cadmium contamination [1,2]. On the other hand, smoking, ingestion of certain types of foods, particularly legumes, rice, etc., and exposure to cadmium dust and cadmium-containing pigments, are amongst the principal ways through which this element can be incorporated into the human body [1–4].

Regular monitoring of cadmium concentrations in either environmental or biological/clinical specimens therefore plays an important part in, among other things, identifying possible sources of contamination/intoxication, as well as in preventing, through early detection, the onset of cadmium-related illnesses in individuals working in exposed environments.

The determination of cadmium in blood and urine are the most important toxicodynamic tests [1]. The former gives an indication of recent exposure, whereas the latter provides information on body burden, as long as the kidneys' functions have not been irreparably hampered by the toxic [1]. The low concentrations of this element in the aforementioned fluids demand a technique with high sensitivity. Electrothermal (graphite furnace) atomic absorption spectrometry (GFAAS) is usually the method of choice, and numerous reports testify to this observation [5–20]. However, the technique is not exempt from interferences, particularly in the determination of cadmium in urine specimens. Low analyte concentrations, elevated concentrations

* Corresponding author. Tel.: +58-274-2401376; fax: +58-274-2401286.

E-mail address: ea_hernandez@yahoo.com (E.A. Hernández-Caraballo).

of certain concomitants (mainly NaCl), and reduced maximum achievable pyrolysis temperatures, the latter even in the presence of chemical modifiers, all combine to hinder the applicability of GFAAS to this particular task.

In addition to the specific problems associated with determination of cadmium in urine by GFAAS, this technique also suffers from a more general problem, viz. long analysis times (2–3 min per measurement) [21]. The latter is detrimental in the case of those laboratories conducting routine analyses, not only because it reduces analysis throughput, but also because it increases general costs. The most expedient way for coping with such a difficulty has been the development of simplified (faster) atomization programs in which the steps that usually constitute the programs are either skipped or optimized [22,23]. The implementation of the above approach to the determination of cadmium by GFAAS has been, however, rather limited [10,11,13,15,17,19].

The aim of the present work was the development of a fast atomization program for the determination of cadmium in urine specimens by GFAAS, using a transversely-heated graphite atomizer (THGA) and only nitric acid as chemical modifier. It will be shown that the apparently problematic low thermal stability of cadmium in the absence of commonly used chemical modifiers, e.g., palladium, ammonium phosphate, etc., can be in fact turned into an advantage, thanks in part to the performance of that atomizer, in order to tackle this seemingly difficult determination.

2. Experimental

2.1. Equipments and accessories

A Perkin-Elmer atomic absorption spectrometer, model 4100 ZL, equipped with a transversely-heated electrothermal atomization unit, a longitudinal Zeeman-effect background correction system, and a model AS-71 autosampler, was used throughout. Transversely-heated graphite atomizers with integrated platforms were used after proper conditioning according to the manufacturer's recommendation [24]. A cadmium hollow-cathode lamp (Varian), operated at 6 mA, was used at the 228.8 nm Cd line. All other conditions were as recommended by the manufacturer of the spectrometer unless otherwise stated.

2.2. Reagents and materials

Cd metal powder (MERCK, pro analysis) was employed for preparation of the analyte's stock solution. Concentrated nitric acid (Alfa Aesar, 99.999%, metals basis) was used for stabilization/preparation of standards and specimens. Distilled, de-ionized water (DDW) (Milipore, 18 M Ω cm⁻¹), served for dilution purposes. All plastic- and glassware were cleaned by soaking them in a 10% HNO₃ solution for at least 12 h. They were thoroughly rinsed with DDW and allowed to dry protected from air contamination prior to their usage.

2.3. Specimens

The reference material SeronormTM Trace Elements Urine Batch No. 115 (Nycomed Pharma AS), with a recommended cadmium concentration of 3.8 μ g l⁻¹ [25], was employed for assessment of the accuracy of the method. Spot specimens from volunteer donors with no known physical affections were collected in previously cleaned, 30 ml universal containers. The specimens were acidified to pH < 2 with nitric acid upon receipt. They were stored at 4 °C until analysis, the latter normally been carried out within 5 days.

3. Procedure

3.1. Preparation of working and specimen solutions

Cadmium standards were prepared from a laboratory-made stock solution (1000 mg l⁻¹ Cd in 1.0% HNO₃) by proper dilutions with 4.0% HNO₃. Urine specimens were diluted (1:1) directly in the autosampler vials. Five hundred microliters of an 8.0% HNO₃ solution followed by the same volume of the specimen were dispensed into the vial, and the micropipette was pumped several times inside the liquid to promote through homogenization. The SeronormTM Trace Elements Urine Batch No. 115 reference material (Nycomed Pharma AS) was reconstituted according to the manufacturer's instructions [25], and prepared for analysis in the same fashion as the specimens.

3.2. Determination of cadmium by GFAAS

Ten microliters of the standard/specimen solutions were injected into a pre-heated THGA and subjected to the corresponding atomization program shown in Table 1. The

Table 1
Atomization programs^a

Step	Temperature (°C)	Ramp (s)	Hold (s)
(a) Conventional program ^b			
Dry	110	1	20
Dry	130	10	30
Pyrolysis	300	10	20
Cool-down	50	1	5
Atomization	1200	0	4 (Read)
Clean	2500	1	3
(b) Fast program ^c			
Dry	300	10	20
Cool-down	50	1	5
Atomization	1200	0	4 (Read)
Clean	2500	1	1

^a Argon flow 250 ml min⁻¹ except during the atomization step (gas-stop mode). Baseline offset correction: 4 s.

^b Injection temperature: 60 °C; injection rate: 100%; and program time: 105 s.

^c Injection temperature: 110 °C; injection rate: 60%; and program time: 42 s.

temperatures reported herein correspond to nominal values given by the software controlling the spectrometer. A pre-atomization cool-down step was included for better establishment of the baseline offset correction. Integrated absorbance (A_i) values were used exclusively for quantification, although the peak-height/peak-area ratios (A_h/A_i) were also employed for optimization purposes. The values given in this work represent the average of at least three measurements.

4. Results and discussions

4.1. Evaluation of atomizer's and specimen's preparation conditions

A study was conducted on the electrothermal atomization behavior of cadmium in an aqueous standard and in a pooled urine specimen, prior to the development of the fast atomization program. With this aim a conventional atomization program, comprised of the common dry-pyrolysis-atomization-clean stages, was used. The conditions (ramp and hold times) for each of the program stages were chosen on the basis of previous experiences.

Pyrolysis and atomization curves were obtained for each of the aforementioned solutions. Maximum pyrolysis temperatures were similar irrespective of the matrix composition, ca. 300–400 °C. The atomization curves showed the expected trend for a diffusion-controlled removal of the analyte from the atomizer. Although the maximum sensitivity of the measurements was observed at the lowest atomization temperature studied (1100 °C), the latter also entailed broad peaks that required long integration/atomization times. Narrower peaks were observed at higher atomization temperatures, with a concomitant reduction in sensitivity, and an important increment in the background absorption signal (in the case of the urine specimen), as evidenced in Fig. 1. The latter is ascribed to the fact that a higher amount of the matrix, mainly NaCl, is co-vaporized along with the analyte as the atomization temperature approaches the melting point of this salt.

An important aspect in developing a robust GFAAS method is usually the selection of an appropriate chemical modifier. Despite the clear advantages brought about by their use, it has also been recognized that they can be the source of additional problems. High blank values, increased background absorption, reduction of the sensitivity of the measurements (overstabilization), reduction of

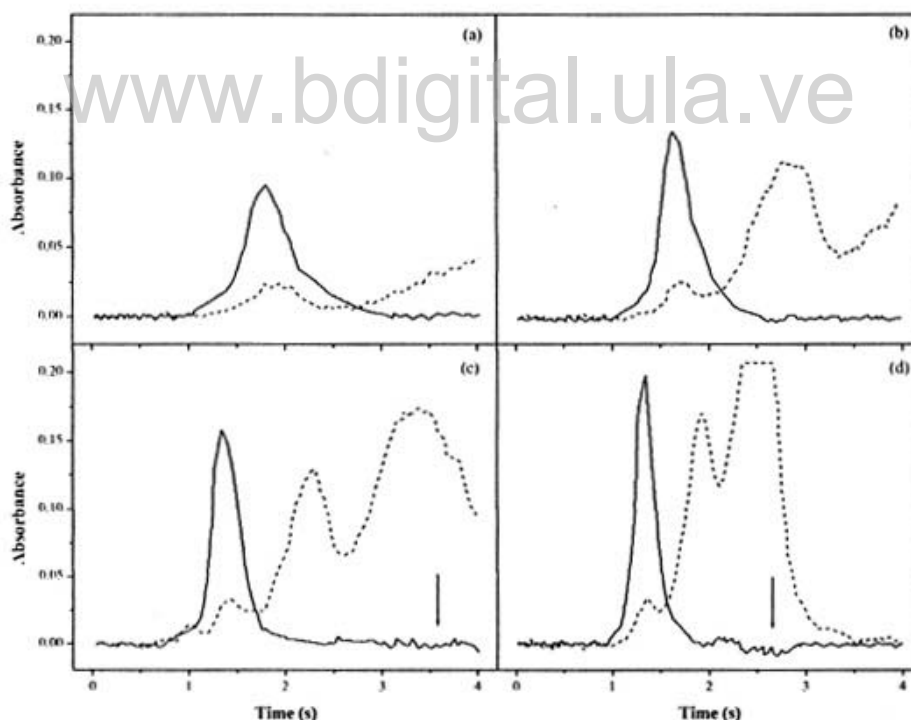


Fig. 1. Effect of the atomization temperature on the atomic (solid lines) and background (dashed lines) profiles for a pooled urine specimen spiked with 0.02 ng Cd. (a) 1200 °C; (b) 1300 °C; (c) 1400 °C; (d) 1600 °C. The arrows show a small overcompensation of the atomic signal.

atomizer's lifetimes, and elevated costs, are among them [26]. Based on the latter remarks, nitric acid was chosen as both diluent solution and chemical modifier. This reagent is known to exert both a stabilization effect on the analyte, through formation of oxide species, and a de-stabilization effect on the chloride-containing offending matrix compounds, by formation of volatile hydrogen chloride. Also, its corrosive effects on the atomizer are less pronounced than those of other reagents. Finally it can be acquired in a very pure presentation which benefits the analytical performance, i. e., the method's detection limit.

The effect of nitric acid (0–4.0%, v/v) on the background absorption signal of a urine specimen was recorded along with the effect of the pyrolysis temperature (200–450 °C). As shown in Fig. 2, a reduction of the background signal is achieved as the pyrolysis temperature is varied between 250 and 450 °C. The effect of the nitric acid was less pronounced than expected. The selection of the final (conventional) atomization conditions was based on the following. On the one hand, the pyrolysis temperature cannot be higher than 300 °C for losses of the analyte will take place. On the other hand, as the composition of the urine matrix is known to vary from individual to individual, and even for the same individual along the day, it was deemed safer to use a 4.0% HNO_3 solution as both diluent and chemical modifier. The atomization program resulting from these essays is summarized on Table 1(a). Note that in looking for mild temperature conditions a considerably long (105 s) program resulted. The knowledge gained in the preceding experiments was further taken into account in improving the performance of the method.

4.2. Development of a fast atomization program

The conventional atomization program shown in Table 1(a) has one major drawback: it is time consuming.

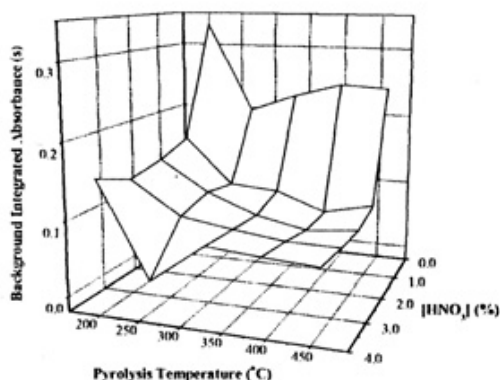


Fig. 2. Effect of the pyrolysis temperature and nitric acid concentration on the background integrated absorbance for a pooled urine specimen.

Therefore, ensuing attempts were directed towards shortening the program time. An additional improvement could be achieved if the autosampler dispensing time could also be reduced, but this is usually not possible in most commercial spectrometers. It must be noted though, that reducing the aliquot volume and the number of solutions been dispensed into the graphite furnace is a simple, yet effective way of minimizing the autosampler injection time.

Substituting the time consuming dry-pyrolysis sequence in Table 1(a) with a single, high-temperature drying stage is the logic approach to reducing the overall program time. Five variables could be optimized to achieve this goal, namely, the injection temperature (A), injection rate (B), as well as the ramp time (C), hold time (D) and temperature (E) of the pyrolysis step. This last factor was nonetheless fixed at its highest permissible value (300 °C) for previous experiences had shown that this was mandatory in avoiding matrix-related interferences. Each one of the variables was assigned a minimum (–) and a maximum (+) value, as summarized in Table 2. Evaluating the effect of these factors was conducted by means of a 2^{4-1} fractional factorial design. This design was chosen for a reduced number of experiments were required (24, taking into account three replicate measurements per run). The level of the fourth factor was determined by the design generator $D = ABC$, i. e., the result of the multiplication of the signs of the first three factors. The integrated absorbance (sensitivity), the peak-height:peak-area ratio (peak-shape) and the relative standard deviation (repeatability) were evaluated as response functions. Other variables could have been selected instead, such as the signal-to-background ratio [27], but we chose the previous ones for they are easily and directly acquired from the spectrometer's control software (peak-height and peak-area), and further mathematical processing is minimal [27].

A statistical evaluation of the results obtained with the fractional factorial design revealed that all the main factors, as well as the first-order interactions of the type AB, AC, and AD, exerted a significant effect on the response functions ($P < 0.05$). Nevertheless, different combinations of factors resulted in similar response functions' values, although they were slightly better for the combination of factors shown in Table 2. The atomization program could be

Table 2
Factors and levels used in the 2^{4-1} fractional factorial design^a

Code	Factor	Level	
		Minimum (–)	Maximum (+)
A	Injection temperature, T_{inj} (°C)	90	110 ^a
B	Injection rate, r_{inj} (%)	60 ^a	90
C	Drying ramp time, r_{dry} (s)	10 ^a	15
D	Drying hold time, t_{dry} (s)	10	20 ^a

^a Best combination of levels as used in the definitive fast atomization program (Table 1).

further shortened by reducing the cleaning time from 3 to 1 s. The background absorption remained at the same level as that observed when using a longer cleaning stage for a pooled urine specimen. The fast program in Table 1(b) is over a minute shorter than its conventional counterpart, thus contributing to a three-fold reduction in the analysis time and, as an obvious consequence, a likewise increase in the analyses throughput.

4.3. Analytical performance

A final study was conducted so as to establish the performance of the fast atomization program, viz. a comparison of the slopes of the standard calibration technique (SCT) and the analyte addition technique (AAT) with both the conventional and the fast programs. As evidenced in Fig. 3, similar slopes were obtained in all cases. Although the difference between the slopes of the techniques with the conventional program is slightly more marked, it did not reach 10%. The latter may be acceptable provided that a small degree of error is tolerable by the analyst [28]. In the case of the fast atomization program the difference between the corresponding slopes is less pronounced (<5%), and so will be the associated error. The standard calibration technique can thus be used for quantitation purposes, with higher accuracy, when the fast atomization program is implemented.

The analytical figures of merit obtained with the fast atomization program are as follows. The detection limit (3s, $n = 20$) under the optimized conditions was $0.06 \mu\text{g l}^{-1}$, corresponding to $0.12 \mu\text{g l}^{-1}$ in the undiluted specimen. This value is similar to those reported for more complex atomization programs. Increasing the baseline offset correction from the default value (2 s) to 4 s contributed to a 1.7-fold reduction in the LOD. An important improvement in this figure could additionally be achieved by instrumental means, namely, with the use of a high-energy line source (elec-

Table 3

Results for the determination of cadmium in a reference material and "real" urine specimens

Specimen	Cd concentration ^a ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Recovery ^b (%)
Reference material ^c	3.93 ± 0.05	103.4
Urine 1	0.20 ± 0.04	95.2
Urine 2	0.60 ± 0.04	91.3
Urine 3	0.66 ± 0.02	94.6
Urine 4	2.06 ± 0.06	101.5

^a Values correspond to the average $\pm$ standard deviation of five measurements.

^b Recoveries were assessed after spiking the original specimen with 0.02 ng Cd.

^c The recommended concentration is $3.8 \mu\text{g l}^{-1}$ Cd.

trodeless discharge lamp), end-capped THGAs and modified graphite cones [18,29]. These accessories were unfortunately not available by the time this work was in progress. The characteristic mass (m_0/pg , 0.0044 s), calculated from the slope of the standard calibration technique, was estimated in 1.78 pg, which is in close agreement with the value reported by the manufacturer [24]. The repeatability of the measurements was 5.9 and 4.0 % R.S.D. at the 0.5 and $1.0 \mu\text{g l}^{-1}$ level, respectively.

The method was applied to the determination of cadmium in the reference material SeronormTM Trace Elements Urine (Batch 115) and in four specimens from volunteer donors. Table 3 summarizes the results of the corresponding determinations, as well as the recovery studies. No significant differences ($P > 0.05$) were observed between the result obtained and the recommended value in the first case; whereas good recoveries (91.3–101.5%) were attained in the analysis of the real specimens.

Finally, it is important to highlight that faster atomization programs, lasting 16 s [11], 21 s [10] and even 32 s [15], have been developed so far. However, it is also true that the analyte addition technique had to be frequently used for quantitation in most fast atomization methods [10,11,19], due to residual matrix interferences. The latter may be ascribed to some of them using conditions that significantly deviated from the STPF concept [10,11], viz. wall atomization, ramped atomization, peak-height measurements, etc. In our case, the design of the THGA greatly contributed to the robustness of the method hereby proposed [15]. Therefore, while the cycle time was somewhat longer than in the cases mentioned above, the overall method is simpler—both in terms of specimen preparation [17] and atomization conditions [13]—as well as reliable, and may be more appealing for routine analysis.

5. Conclusions

A simple and rapid method was developed for the determination of cadmium in urine specimens by GFAAS, which involved 1:1 specimen dilution with nitric acid (4.0%), direct

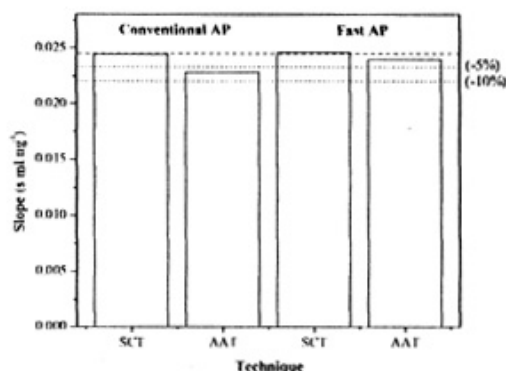


Fig. 3. Comparison of the slopes of the standard calibration technique (SCT) and the analyte additions technique (AAT) for the determination of cadmium by GFAAS with the conventional and the fast atomization programs. Dotted lines represent the 5 and 10% lower tolerance limits.

injection into a pre-heated (110 °C) transversely-heated graphite atomizer, a fast atomization program with a high-temperature drying step and no pyrolysis, and quantitation against aqueous standards. The absence of chemical modifiers other than nitric acid helped in achieving low-temperature atomization, with a concomitant separation of the atomic and background signals, and a detection limit comparable to those reported for more complicated heating programs developed so far.

Acknowledgements

E. A. Hernández-Caraballo is grateful for a scholarship awarded by Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT, Venezuela), for conducting post-graduate studies leading to a PhD degree at Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela).

References

- [1] D.L. Tsalev, Z.K. Zaprianov, H. Cadmium, in *Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Practice, Analytical Aspects and Health Significance*, vol. 1, CRC Press, Inc., USA, 1983, pp. 105–112, (Chapter 2).
- [2] K. Robards, P. Worsfold, *Analyst* 116 (1991) 549.
- [3] J. Ladrón de Guevara, V. Moya Pueyo, Cadmio y sus compuestos, in *Toxicología Clínica: Médica y Laboral*, McGraw-Hill Interamericana, España, 1995, pp. 161–167 (Capítulo 31).
- [4] E.J. Underwood, Cadmium, in *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*, fourth ed., Academic Press Inc., London, pp. 243–257 (Chapter 9).
- [5] P.E. Gardiner, J.M. Ottaway, G.S. Fell, *Talanta* 26 (1977) 841.
- [6] E. Pruszkowska, G.R. Camrick, W. Slavin, *Clin. Chem.* 29 (1983) 477.
- [7] W. Slavin, D.C. Manning, E. Pruszkowska, *Spectrochim. Acta Part B* 38 (1983) 1157.
- [8] J.J. McAughey, N.J. Smith, *Anal. Chim. Acta* 156 (1984) 129.
- [9] X. Yin, G. Schlemmer, B. Welz, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1462.
- [10] D.J. Halls, M.M. Black, G.S. Fell, J.M. Ottaway, *J. Anal. At. Spectrom.* 2 (1987) 305.
- [11] M.B. Knowles, *J. Anal. At. Spectrom.* 4 (1989) 257.
- [12] J. Smeyers-Verbeke, Q. Yang, W. Penninckx, F. Vandervoort, *J. Anal. At. Spectrom.* 5 (1990) 393.
- [13] D. Littlejohn, J.N. Egila, R.M. Gosland, U.K. Kunwar, C. Smith, *Anal. Chim. Acta* 250 (1991) 71.
- [14] J.M. Marchante Gayón, A. Sanz-Medel, C. Fellows, P. Rock, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 1079.
- [15] Z. Li, G. Camrick, W. Slavin, *Spectrochim. Acta Part B* 48 (1993) 1435.
- [16] S.T. Sauerhoff, Z.A. Grosser, G.R. Camrick, *At. Spectrosc.* 17 (1996) 225.
- [17] S.-C. Chen, M.-Y. Shiue, M.-H. Yang, *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 1192.
- [18] J.P. Snell, S. Sandberg, W. Frech, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 491.
- [19] N. Campillo, P. Villás, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, *Anal. Chim. Acta* 390 (1999) 207–215.
- [20] C.-J. Horng, J.-L. Tsai, P.-H. Horng, S.-C. Lin, S.-R. Lin, C.-C. Tzeng, *Talanta* 56 (2002) 1109.
- [21] L. de Galan, *J. Anal. At. Spectrom.* 2 (1987) 89.
- [22] D.J. Halls, *Analyst* 109 (1984) 1081.
- [23] D.J. Halls, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 169.
- [24] The THGA graphite furnace: techniques and recommended conditions, Perkin-Elmer Corp., Part No. B050-5538, June 1992.
- [25] Seronorm™ Trace Elements Urine Batch No. 115 reference material (Nycomed Pharma AS).
- [26] D.L. Tsalev, V.I. Slaveykova, P.B. Mandjukov, *Spectrochim. Acta Rev.* 13 (1990) 225.
- [27] J.Y. Cabón, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 939.
- [28] R. Cornelis, B. Heinzow, R.F.M. Herber, J. Molin Christensen, O.M. Paulsen, E. Sabbioni, D.M. Templeton, Y. Thomassen, M. Vahter, O. Vesterberg, *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) 1575.
- [29] B.V. L'vov, L.K. Polzik, A.V. Borodin, A.O. Dyakov, A.V. Novichikhin, *J. Anal. At. Spectrom.* 10 (1995) 703.