



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán**

**“Evaluación Experimental de las Condiciones Óptimas  
para Cuantificar Bismuto por EAA-GH”**

**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**  
**QUÍMICO**  
**PRESENTA:**  
**RODRIGO GÓMEZ FLORES**

Asesores:

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

QFB José Arturo Martín



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el Trabajo de Tesis.

Evaluación Experimental de las Condiciones Óptimas para Cuantificar Bismuto por EAA-GH.

Que presentó al pasarle: Rodrigo Gómez Flores

Con número de cuenta: 308251676 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Septiembre de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
VOCAL	M. C. Pablo Hernández Matamoros	
SECRETARIO	Q. Lidia Elena Ballesteros Hernández	
1er. SUPLENTE	Dr. José de Jesús Olmos Espejel	
2da. SUPLENTE	Q.I. Elizabeth Cruz Ruiz	

MÉXICO, los siguientes lugares están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 177)

## *Agradecimientos*

*A mi mamá por todo su cariño y apoyo. A mi papá que, aunque ya no esta con nosotros, ha sido mi inspiración para seguir adelante.*

*Al Sr. Adán y a la Sra. Catalina, que siempre me apoyaron y que de no ser por ellos no hubiera llegado tan lejos.*

*A la Dra. Alma por su confianza para realizar este trabajo, así como su paciencia y apoyo.*

*A todos los amigos que tengo, no sólo que conocí en la Universidad, si no que he conocido a lo largo de la vida, por los buenos momentos que hemos vivido y por qué también me han apoyado en los malos momentos.*

*A todos los profesores que he tenido a lo largo de mi educación, de la Universidad, la Preparatoria y la Secundaria, no solo por todos los conocimientos que me han dado, si no también por que algunos de ellos me enseñaron a soñar y que también fueron mis amigos.*

*Escribir el nombre de todas las personas a las que les agradezco sería difícil, porque no he logrado nada solo, si no todo ha sido gracias ha esas personas que siempre han estado ahí para apoyarme.*

*Gracias.*

*“Las palabras de los poderosos pueden tener prevalencia en otros campos de la experiencia humana, pero en la ciencia, la única cosa que cuenta es la evidencia y la lógica del argumento en sí mismo”*

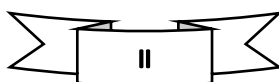
*Neil deGrasse Tyson, Cosmos.*

## Índice.

- Índice de Figuras y Tablas.	III
- Abreviaturas.	VII
- Introducción.	IX
- Objetivos.	XI
<b>1.- Marco Teórico.</b>	
<b>1.1.- Bismuto: Generalidades.</b>	1
<b>1.1.1.- Propiedades.</b>	2
<b>1.1.2.- Producción.</b>	4
<b>1.2.- Bismuto en Medicina.</b>	4
<b>1.3.- Bismuto como Anticancerígeno.</b>	10
<b>1.4.- Bismuto en Medicina Veterinaria.</b>	12
<b>1.5.- Toxicología del Bismuto.</b>	12
<b>1.6.- Espectrofotometría de Absorción Atómica.</b>	15
<b>1.6.1.- Lámpara de Cátodo Hueco.</b>	20
<b>1.6.2.- Generador de Hidruros.</b>	21
<b>1.7.- Hidruro Volátil de Bismuto.</b>	24
<b>1.8.- Muestra: Plasma.</b>	27
<b>1.9.- Digestión con Microondas.</b>	28
<b>1.10.- Gráfica de Calibrado y Regresión Lineal.</b>	34
<b>2.- Parte Experimental.</b>	
<b>2.1.- Reactivos.</b>	38
<b>2.2.- Material.</b>	38
<b>2.3.- Equipo.</b>	39
<b>2.4.- Preparación de Soluciones Stock.</b>	39
<b>2.5.- Espectrofotómetro de Absorción Atómica y Generador de Hidruros.</b>	41
<b>2.6.- Pruebas realizadas para determinar las condiciones óptimas.</b>	42
<b>2.7.- Tratamiento de la Muestra.</b>	44
<b>3.- Resultados y Discusión.</b>	
<b>3.1.- Evaluación de la influencia del HCl en la preparación de los sistemas.</b>	46
<b>3.1.1.- Solución stock de Bi a partir de la sal de <math>\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}</math></b>	46
<b>3.1.2.- Stock a partir de una solución de referencia comercial de Bi 1000ppm</b>	60



3.2.- Evaluación de diferentes medios ácidos para aforar los sistemas de la curva de calibración.	63
3.3.- Evaluación con diferentes medios ácidos empleando $\text{NaBH}_4$ 0.35%.	69
3.4.- Construcción de curvas de calibración con Ácido Cítrico y Tartárico.	74
3.5.- Evaluación de Ácido Tartárico a diferentes concentraciones.	77
3.6.- Evaluación estadística de las condiciones óptimas seleccionadas	80
3.6.1.- Linealidad del sistema	81
3.6.2.- Precisión del sistema	82
3.6.3.- Repetibilidad del sistema diferentes días	83
3.6.4.- Repetibilidad del sistema en diferentes equipos	86
3.6.5.- Aplicabilidad del método en muestras de plasma de equino.	89
3.7.- Estudio teórico de las interacciones de Bi en solución.	91
3.8.- Dificultades para determinar Bi por EAA-GH.	99
3.9.- Cuidados que se deben tener para determinar Bi por EAA-GH.	101
4.- Conclusiones.	104
5.- Referencias.	105
6.- Anexos.	
6.1.- Ejemplos de Cálculos.	112
6.2.- Formulas para calcular parámetros estadísticos.	114
6.3.- Construcción de DZP de Bi.	116



## Índice de Figuras y Tablas.

Tabla 1.1. Propiedades físicas del Bismuto.	3
Figura 1.1. Dímero de Citrato de Bi que funciona como bloque básico de las estructuras poliméricas.	6
Figura 1.2. Ejemplo de la estructura polimérica de RBC.	7
Figura 1.3. Estructura de complejos de organobismuto con actividad antimicrobiana.	9
Figura 1.4. Decaimiento radioactivo de $^{212}\text{Bi}$ y $^{213}\text{Bi}$ .	11
Tabla 1.2. Temperaturas máximas de flama.	18
Figura 1.5. Diagrama del atomizador en flama.	18
Figura 1.6. Diagrama del atomizador electrotérmico.	20
Figura 1.7. Esquema de la lámpara de cátodo hueco y el mecanismo de emisión.	20
Figura 1.8. Diagrama de generador de hidruros.	23
Figura 1.9. Reacción que explica la formación del hidruro volátil.	23
Tabla 1.3. Formación de hidruros.	25
Tabla 1.4. Propiedades de hidruros de As, Sb y Bi.	26
Figura 1.10. Diferencias entre calentamiento convencional y por microondas.	31
Figura 1.11. Mecanismos que provocan el calentamiento por microondas: rotación dipolar (arriba) y conducción iónica (abajo).	32
Tabla 1.5. Algunas especificaciones para la validación de métodos.	36
Tabla 2.1. Condiciones establecidas para la determinación de Bi por EAA-GH.	41
Figura 2.1. Fotografía del Espectrofotómetro de absorción atómica (SpectraAA800), con generador de hidruros (VGA77), que se usó (L-112, FESC, UNAM).	41
Figura 2.2. Diagrama de generador de hidruros.	42
Tabla 2.2. Condiciones establecidas para digerir plasma mediante horno de microondas	45
Tabla 2.3. Preparación de los sistemas para digerir las muestras con horno de microondas.	45
Tabla 3.1. Sistemas preparados como indica el método del manual del generador de hidruros.	46
Tabla 3.2. Resultados obtenidos utilizando el método del manual del generador de hidruros.	46
Figura 3.1. Curva de calibración obtenida utilizando el método del manual del generador de hidruros.	47
Tabla 3.3. Resultados obtenidos, empleando HCl 1 M como solución ácida.	48

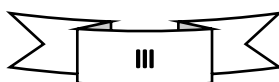


Figura 3.2. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha), obtenidos utilizando HCl 1 M como solución ácida.	48
Tabla 3.4. Resultados obtenidos aforando Stock con HCl 1 M.	49
Tabla 3.5. Sistemas preparados manteniendo un volumen constante con HNO <sub>3</sub> y aforados con HCl 1 M (Prueba No. 1).	50
Tabla 3.6. Resultados obtenidos en Prueba No. 1.	50
Figura 3.3. Curva de Calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos en Prueba No. 1.	51
Tabla 3.7. Resultados obtenidos aforando sistemas con HNO <sub>3</sub> .	51
Tabla 3.8. Sistemas preparados, manteniendo un volumen constante con HNO <sub>3</sub> y aforados con HCl 1.25 M (Prueba No. 2).	52
Tabla 3.9. Resultados obtenidos en Prueba No. 2.	53
Figura 3.4. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos en Prueba No. 2.	54
Figura 3.5. Comparación de pendientes para las curvas de calibración obtenidas en la Prueba No. 2.	56
Tabla 3.10. Sistemas preparados manteniendo un volumen constante con HNO <sub>3</sub> y aforados con HCl 1.76 M (Prueba No. 3).	57
Tabla 3.11. Resultados obtenidos en Prueba No. 3.	57
Figura 3.6. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos en Prueba No. 3.	57
Tabla 3.12. Sistemas preparados manteniendo un volumen constante con HNO <sub>3</sub> y aforados con HCl 1.44 M (Prueba No. 4).	58
Tabla 3.13. Resultados obtenidos en Prueba No. 4.	58
Figura 3.7. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos en Prueba No. 4.	59
Tabla 3.14. Sistemas preparados con solución Stock de 49.07 ppb.	60
Tabla 3.15. Resultados obtenidos con solución Stock de 49.07 ppb.	60
Tabla 3.16. Sistemas preparados a partir de solución de referencia comercial y aforados con HCl 1.66 M (Prueba No. 1A).	61
Tabla 3.17. Resultados obtenidos en Prueba No. 1A.	61
Tabla 3.18. Sistemas preparados a partir de solución de referencia comercial y aforados con HCl 2.5M (Prueba No. 2A).	62
Tabla 3.19. Resultados obtenidos en Prueba No. 2A.	62
Tabla 3.20. Preparación general de los sistemas para evaluar diferentes ácidos.	63
Tabla 3.21. Resultados obtenidos aforando con Ácido Fórmico 1 M.	64
Figura 3.8. Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Fórmico 1 M.	64
Tabla 3.22. Resultados obtenidos aforando con Ácido Oxálico 0.08 M.	65



Figura 3.9. Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Oxálico 0.08 M.	65
Tabla 3.23. Resultados obtenidos aforando con $H_2SO_4$ 1 M.	66
Figura 3.10. Curvas de calibración obtenidas aforando con $H_2SO_4$ 1 M.	66
Tabla 3.24. Resultados obtenidos aforando con Ácido Cítrico 0.5 M.	67
Figura 3.11. Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Cítrico 0.5 M.	67
Tabla 3.25. Resultados obtenidos aforando con Ácido Tartárico 0.5 M.	68
Figura 3.12. Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Tartárico 0.5 M.	68
Tabla 3.26. Resultados obtenidos con $H_2SO_4$ 1 M y $NaBH_4$ 35%.	69
Figura 3.13. Curvas obtenidas con $H_2SO_4$ 1 M y $NaBH_4$ 35%.	70
Tabla 3.27. Resultados obtenidos con Ácido Oxálico 0.08 M y $NaBH_4$ 35%.	70
Figura 3.14. Curvas obtenidas con Ácido Oxálico 0.08 M y $NaBH_4$ 35%.	71
Tabla 3.28. Resultados obtenidos con Ácido Cítrico 0.5 M y $NaBH_4$ 35%.	71
Figura 3.15. Curvas obtenidas con Ácido Cítrico 0.5 M y $NaBH_4$ 35%.	72
Tabla 3.29. Resultados obtenidos con Ácido Tartárico 0.5 M y $NaBH_4$ 35%.	72
Figura 3.16. Curvas obtenidas con Ácido Tartárico 0.5 M y $NaBH_4$ 35%.	73
Tabla 3.30. Preparación de sistemas para Ácido Cítrico y Tartárico.	74
Tabla 3.31. Resultados obtenidos para las curvas de Ácido Cítrico.	75
Figura 3.17. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos con Ácido Cítrico.	75
Tabla 3.32. Resultados obtenidos para las curvas de Ácido Tartárico.	76
Figura 3.18. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos con Ácido Tartárico.	76
Tabla 3.33. Resultados obtenidos aforando con Ácido Tartárico 0.75 M.	77
Figura 3.19. Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Tartárico 0.75 M.	78
Tabla 3.34. Resultados obtenidos aforando con Ácido Tartárico 0.25 M.	78
Figura 3.20. Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Tartárico 0.25 M.	79
Tabla 3.35. Resultados obtenidos para curva calibración con Ácido Tartárico 0.25 M.	80
Tabla 3.36. Resultados obtenidos para linealidad del sistema.	81
Figura 3.21. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha), obtenidos para Linealidad del Sistema.	81
Tabla 3.37. Valores obtenidos para comprobar linealidad del sistema.	82
Tabla 3.38. Valores obtenidos para comprobar precisión del sistema.	83
Tabla 3.39. Resultados obtenidos para repetibilidad del sistema en días diferentes.	84

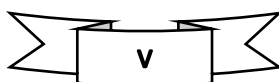


Figura 3.22. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha), obtenidos para repetibilidad del sistema en días diferentes.	84
Tabla 3.40. Valores obtenidos para comprobar repetibilidad entre diferentes días.	86
Tabla 3.41. Resultados obtenidos para repetibilidad del sistema en equipos diferentes.	86
Figura 3.23. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha), obtenidos para repetibilidad del sistema en equipos diferentes.	87
Tabla 3.42. Valores obtenidos para comprobar repetibilidad en diferentes equipos.	89
Tabla 3.43. Bismuto determinado en las muestras fortificadas de plasma de equino.	90
Figura 3.24. DZP de Bismuto en función de pH y pCl.	92
Figura 3.25. Polímeros iónicos formados entre el Bismuto y Halógenos.	93
Tabla 3.44. Comparación de resultados obtenidos para sistemas preparados a partir de la sal de Bi y de STD, aforados con HCl.	94
Figura 3.26. Complejo de Bi y el ion nitrato.	94
Figura 3.27. Posible disociación de la sal $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ .	94
Figura 3.28. Sal de Tartrato de Bismuto/Sodio.	96
Figura 3.29. DZP de Bi con Ácido Tartárico, para el complejo $\text{Bi}(\text{Tar})_3^{3-}$ (arriba) y $\text{Bi}(\text{HTar})_3$ (abajo)	97
Tabla 3.45. Comparación de resultados obtenidos para sistemas preparados a partir de la sal de Bi y de STD, aforados con Ácido Tartárico.	101

## Abreviaturas.

$^{212}\text{Bi}$	Isotopo Radioactivo de Bismuto-212.
$^{213}\text{Bi}$	Isotopo Radioactivo de Bismuto-213.
$^{\circ}\text{C}$	Grados Centígrados.
%C.V.	Porcentaje de Coeficiente de Variación.
As	Arsénico.
$b_0$	Ordenada al Origen.
$b_1$	Pendiente.
Bi	Bismuto.
$\text{BiH}_3$	Hidruro de Bismuto.
$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$	Nitrato de Bismuto.
C	Concentración.
CBS	Subcitrato de Bismuto.
CDDP	Cis-diamindicloroplatino
CIM	Concentración de Inhibición Mínima.
Cu	Cobre.
DZP	Diagrama de Zonas de Predominio.
EAA-GH	Espectrofotometría de Absorción Atómica con Generador de Hidruros.
$F_{\text{cal}}$	Estadístico F de Fisher Calculado.
$F_{\text{tab}}$	Estadístico F de Fisher Tabulado.
$H_0$	Hipótesis Nula
$H_1$	Hipótesis Alternativa
HCl	Ácido Clorhídrico.
$\text{HNO}_3$	Ácido Nítrico.
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de Hidrógeno
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Ácido Sulfúrico.
$\text{H}_2\text{Tar}$	Ácido Tartárico.
HTar <sup>-</sup>	Ion Bitartrato.
IC( $\beta_1$ )	Intervalo de Confianza para la Pendiente.
ICP-AES	Espectroscopia de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo.
ICP-MS	Espectroscopia de Masas-Plasma de Acoplamiento Inductivo
M	Concentración en Molaridad.
MT	Metalotioneina.
m/v	Concentración en Por ciento peso/volumen.
$\text{NaBH}_4$	Borohidruro de Sodio.
NaOH	Hidróxido de Sodio.
Pb	Plomo.
pCl	Menos Logaritmo de la Concentración de Cloruro.

pKa	Constante de Disociación Ácida.
pH	Potencial Hidrógeno.
ppb	Concentración en Partes por Billón.
ppm	Concentración en Partes por Millón.
pTar	Menos Logaritmo de la Concentración de Tartrato.
$r$	Coefficiente de Correlación.
$r^2$	Coefficiente de Determinación.
RBC	Citrato de Bismuto Ranitidina.
$S_{b1}$	Desviación Estándar de la Pendiente.
$S_{y/x}$	Desviación Estándar de la Recta.
Sb	Antimonio.
Se	Selenio.
SSB	Subsalicilato de Bismuto.
SNB	Subnitrito de Bismuto.
STD	Estándar.
$t_{cal}$	Estadístico t de Student Calculado.
$t_{tab}$	Estadístico t de Student Tabulado.
Tar <sup>2-</sup>	Ion Tartrato.

## Introducción.

El Bismuto (Bi) es el elemento número 83 en la tabla periódica, es comúnmente encontrado en la naturaleza como Bismita ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ), Bismutita ( $(\text{BiO})_2\text{CO}_3$ ) y Bismutina ( $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ). Del grupo 15 es el elemento más pesado y de los elementos pesados es el más estable. A diferencia de los otros elementos del mismo grupo (Fósforo, Arsénico y Antimonio), tiene menor estabilidad en estado de oxidación +5, de tal manera que se encuentran pocos compuestos de  $\text{Bi}^{5+}$ , tales como  $\text{NaBiO}_3$ ,  $\text{BiF}_5$  y sales de  $\text{BiF}_6^-$ , así como compuestos organometálicos con fórmula de  $\text{BiAr}_3\text{X}_2$ .

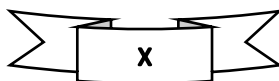
El Bismuto se considera el elemento número 69 en términos de abundancia en la naturaleza y en comparación con otros elementos pesados tiene una baja toxicidad, por lo que es considerado un elemento “verde” para el medio ambiente. Sus compuestos y aleaciones tienen una gran aplicación en lubricantes, cosméticos, soldaduras, materiales termoeléctricos, pigmentos, medicinas, entre otros. En medicina se utiliza como agente antimicrobiano y anticancerígeno, siendo los compuestos más usados, Tartrato de Bismuto y Potasio, Subgalato de Bismuto, Nitrato de Bismuto, Subsalicilato de Bismuto, etc. El uso de medicamentos basados en Bismuto no solo se limita a los seres humanos, si no también encuentra aplicaciones en algunos animales.

La técnica que se considera más adecuada para determinar el Bismuto en muestras biológicas y ambientales es la espectroscopia atómica, encontrando reportados diferentes métodos basados en esta, como espectrofotometría de absorción atómica en flama, espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros (EAA-GH), espectroscopia de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) y espectroscopia de masas-plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), lamentablemente la información que se encuentra reportada no es suficiente para poder evaluar la exactitud de estos métodos.

De las técnicas anteriormente mencionadas la EEA-GH se puede considerar la más recomendable para determinar Bismuto, ya que a comparación de las otras es relativamente más económica y además permite determinar concentraciones de hasta partes por billón. Como ya se mencionó, la información reportada para determinar Bismuto por estas técnicas es limitada y lo mismo sucede con el hidruro volátil de Bismuto ( $\text{BiH}_3\uparrow$ ), ya que debido a su inestabilidad química no ha sido investigada de manera extensa, del cual se sabe se descompone a  $-45^\circ\text{C}$  y su entalpía de formación es mayor a la de otros hidruros volátiles, como el de Arsénico y Antimonio, elementos

que también se suelen determinar por esta técnica y que se encuentra más información reportada en todos los aspectos.

De tal manera que en el trabajo presente se muestra un estudio en el cual se evaluaron las condiciones experimentales óptimas para poder Bismuto por EAA-GH y una vez seleccionas se probaron con una muestra de plasma de equino.



## **Objetivos**

**Objetivo General:** Evaluar y seleccionar las mejores condiciones experimentales que permitan cuantificar Bismuto mediante espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros, a fin de contar con un método preciso para su posterior uso en una muestra de plasma de equino.

### **Objetivos Particulares:**

Determinar la concentración necesaria y óptima de cada solución que participa en la formación del hidruro volátil de Bismuto a fin de lograr una metodología precisa.

Evaluar el método con una muestra de plasma de equino para verificar que las condiciones seleccionadas sean aplicables, determinando el recobro de Bismuto adicionado.

Determinar algunos parámetros estadísticos de desempeño, para evaluar la precisión del sistema y del método.

## 1.- Marco Teórico.

### 1.1. Bismuto: Generalidades.

El Bismuto (Bi) es el elemento número 83 de la tabla periódica, es comúnmente encontrado en la naturaleza como Bismita ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ), Bismutita ( $(\text{BiO})_2\text{CO}_3$ ) y Bismutina ( $\text{Bi}_2\text{S}_3$ ). Se obtiene como un subproducto de la refinación del Cobre (Cu) y Plomo (Pb). Del grupo 15 es el elemento más pesado y de los elementos pesados es el más estable. Se puede comparar con los elementos del mismo grupo Fósforo (P), Arsénico (As) y Antimonio (Sb), con los cuales comparte similitudes, como lo es en la configuración electrónica ( $ns^2 np^3$ ), pero también tiene algunas diferencias. La principal de ellas es que tiene menor estabilidad en estado de oxidación +5, por lo tanto se encuentran pocos complejos inorgánicos en este estado de oxidación. Aun así, existen excepciones como  $\text{NaBiO}_3$ ,  $\text{BiF}_5$  y sales de  $\text{BiF}_6^-$ . También se conoce una gran variedad de compuestos de organobismuto basados en la fórmula de  $\text{BiAr}_3\text{X}_2$  (Ar = arilo, p-tolueno, X = halógeno) [1].

El Bi, el As y Sb, elementos del mismo grupo, fueron de los primeros elementos en ser aislados y se conocieron incluso antes que elementos como el Nitrógeno (N) (1772) y Fósforo (P) (1669). Este elemento tal vez fue desconocido por los griegos y romanos, y no fue hasta la edad media que se volvió familiar, aunque se solía confundir con otros elementos como el Plomo (Pb), Estaño (Sn), Antimonio (Sb) e inclusive Plata (Ag). Su primer nombre proviene del alemán *wismut*, dado por Basil Valentine en 1450 y fue latinizado a *bisemutum* por el alemán G. Bauer cerca de 1530. En un inicio no se entendía del todo su química, ya que el elemento se obtenía con impurezas, pero gracias a la investigación de Torbern Olof Bergman, sus propiedades y reacciones fueron descritas de forma más precisa. A pesar de que no se puede dar una fecha precisa del descubrimiento del elemento, ni por quien fue descubierto (alquimistas, mineros o herreros), hoy en día se sintetizan muchos compuestos que contienen Bismuto y la investigación que se realiza sobre estos es muy amplia [1-3].



### 1.1.1. Propiedades.

El Bismuto es un metal de color gris claro, tiene un peso atómico de 208.98 g/mol, densidad de 9.7 g/cm<sup>3</sup>, un punto de fusión 271.3 °C, un punto de ebullición de 1560 °C. De entre todos los metales es el más diamagnético y tiene una baja conductividad térmica (7.87 W/m K). Debido a su bajo punto de fusión, alto punto de ebullición y baja sección transversal de absorción de neutrones, se utiliza como refrigerante en reactores nucleares. Este elemento se comporta como el agua, se expande cuando se enfría, algunas de sus propiedades se muestran en la Tabla 1.1. También existe como <sup>209</sup>Bi, siendo este el isótopo pesado más estable, el cual tiene una vida media de 1.9x10<sup>19</sup> años y se puede encontrar en la naturaleza, cualquier otro isótopo diferente al <sup>209</sup>Bi, es radioactivo. Es oxidado fácilmente a Bi<sup>3+</sup>, y este es el estado de oxidación más común, aunque también es encontrado como Bi<sup>5+</sup>, el cual se considera un fuerte oxidante Bi<sup>5+</sup>/Bi<sup>3+</sup>, con un potencial de 2.03 V. El Bi<sup>3+</sup> se hidroliza fácilmente en solución acuosa (pKa = 1.51) y tiene una alta afinidad por ligantes con Oxígeno y Nitrógeno. Sin embargo, tiene mayor afinidad por los grupos tiolato, en ligantes como cisteína y glutatión. Recientemente el estudio ha crecido en ligantes aminopolicarboxilato y poliaminopolicarboxilato. El Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> es básico, a diferencia de los óxidos de Sb y As que son anfóteros, y los de N y P que son ácidos, debido a que el Bismuto es el más electropositivo, siguiendo la tendencia periódica. Por lo anterior también crece la tendencia a formar sales de oxoácidos, por la reacción del metal o del óxido, con el ácido [Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> y (Bi<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>]. La reacción directa del Bismuto con O<sub>2</sub>, S y X<sub>2</sub>, a altas temperaturas resulta en la formación de Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Bi<sub>2</sub>S<sub>3</sub> y BiX<sub>3</sub>, respectivamente, decreciendo el tamaño del átomo del metal y por lo tanto la estabilidad en la fuerza del enlace covalente, por lo cual se tiene la siguiente tendencia P > Sb > As > Bi. También ha sido observado como Bi<sup>+</sup> en fases de estado sólido y sales fundidas, pero es raro. Así mismo en este estado de oxidación es encontrado en forma inestable como R<sub>2</sub>Bi<sup>-</sup>. Otros estados de oxidación que se ha reportado es Bi<sup>2+</sup> en tetraorganodibismutinas y Bi<sup>3-</sup>

en fases metal-álcali como  $M_3Bi$  ( $M = Li, Na, K, Rb, Cs$ ). Los compuestos de Bismuto son importantes por su actividad biológica, como superconductores por su alta temperatura crítica ( $T_c$ ) y como catalizadores de oxidación [1-3].

**Tabla 1.1.** Propiedades físicas del Bismuto. [1]

<b>Peso atómico</b>	208.98 uma
<b>Punto de fusión</b>	271 °C
<b>Punto de ebullición</b>	1560 °C
<b><math>\Delta H</math> de fusión</b>	10.48 kJ/mol
<b><math>\Delta H</math> de vaporización</b>	179.1 kJ/mol
<b>Densidad</b>	9.747 g/cm <sup>3</sup>
<b>S°</b>	56.74 J/K mol
<b>Cp</b>	25.22 J/K mol
<b>Resistividad eléctrica</b>	106.8x10 <sup>-8</sup> $\Omega$ m (273K)
<b>Conductividad térmica</b>	7.87 W/m K
<b>Susceptibilidad magnética de masa</b>	-1.684x10 <sup>-8</sup> m <sup>3</sup> / Kg (s)
<b>Coefficiente de dilatación térmica</b>	13.4x10 <sup>-6</sup> 1/K
<b>Electronegatividad</b>	2.02 (Pauling) 1.67 (Allred)
<b>Radio iónico Bi<sup>5+</sup></b>	0.74 Å
<b>Bi<sup>3+</sup></b>	0.96 Å
<b>Atómico</b>	1.55 Å
<b>Covalente</b>	1.52 Å
<b>Van der Waals</b>	2.40 Å
<b>Potenciales de ionización 1°</b>	703 kJ/mol
<b>2°</b>	1609 kJ/mol
<b>3°</b>	2466 kJ/mol
<b>4°</b>	4370 kJ/mol
<b>5°</b>	5403 kJ/mol

### **1.1.2. Producción.**

El Bismuto se considera un elemento relativamente raro y por lo cual es el número 69 en términos de abundancia natural en la corteza terrestre, estimado en una concentración de 0.2 ppm. En comparación con otros metales pesados tiene una baja toxicidad, por lo cual es denominado un elemento “verde” para el medio ambiente. Por la misma razón ha sustituido al Pb en algunos procesos industriales, provocando un crecimiento en el interés del mismo, con el fin de resolver los problemas ambientales causados por la contaminación debida al uso metales pesados, ya que el Bismuto comparte muchas características con el Pb, pero es mucho menos tóxico para organismos vivos. La cantidad de Bismuto en todo el mundo usualmente está basada en lo que se obtiene por la producción de Pb, ya que es un subproducto de su refinación, aunque también está vinculado con las refinerías de Cu. El proceso de obtención depende de la naturaleza del producto principal. El Bismuto debido a su bajo punto de ebullición, su baja solubilidad en Hierro (Fe) y su gran estabilidad para no ser oxidado por el aire, permite que este pueda ser fundido y moldeado en recipientes de Fe o acero. Al igual que el Sb, es un metal muy blando y darle forma a temperatura ambiente suele ser complicado, pero a temperaturas mayores de 225°C, hace más fácil poder trabajarlo. El consumo de Bismuto se ha expandido bastante rápido, en 2008 la refinería de Bismuto produjo aproximadamente 15 000 toneladas en todo el mundo. China fue el líder en la refinación de Bismuto con el 80% de la producción total del mundo, seguido por México, Bélgica y Perú con 7.8%, 5.3% y 4%, respectivamente [2, 4-5].

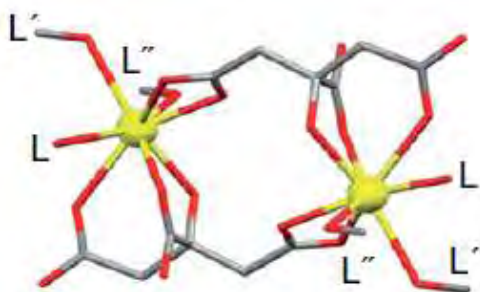
### **1.2.- Bismuto en Medicina.**

Comercialmente el Bismuto y sus aleaciones han encontrado diferentes aplicaciones, como en lubricantes, cosméticos, soldaduras, materiales termoelectricos, pigmentos, en

catálisis, en medicina, entre otros. En medicina ha tenido un gran desarrollo y ha sido utilizado por más de doscientos años. Fue utilizado por primera vez en 1786 por Louis Odier, para el tratamiento de la dispepsia. Hoy en día, muchos de sus compuestos se utilizan como astringentes, antiácidos, antisépticos, anticancerígenos y agentes radiopacos en diagnósticos de rayos X. De los compuestos más usados de Bisimuto en tratamientos, se encuentran el Tartrato de Bismuto y Potasio, Subcarbonato de Bismuto, Galato, Nitrato, Salicilato, entre otros. Los compuestos de Bismuto han sido utilizados en el tratamiento de diferentes infecciones microbianas, como sífilis (Tartrato de Bismuto y Potasio/Sodio, Yodo-quinina de Bismuto, Cloruro de Bismuto, etc.), para colitis (Subnitrato y Citrato de Bismuto), en infecciones de heridas (Óxido de Bismuto), malaria (Tioglicolato de Bismuto), dispepsia y diarrea (Subsalicilato de Bismuto, Subnitrato de Bismuto), úlceras pépticas (Subnitrato, Subcitrato coloidal, Subsalicilato de Bismuto). El Subsalicilato de Bismuto aún se utiliza aun para tratar desordenes estomacales y diarrea (SSB, PeptoBismol®), compuestos basados en Citrato de Bismuto, como coloides de Subcitrato de Bismuto (CBS, De-Nol®) y Citrato de Bismuto de Ranitidina (RBC, Pylorid®), que se utiliza en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales. El Subgalato de Bismuto y Óxido de Bismuto en algunas formulaciones tópicas para el tratamiento de hemorroides [4-11].

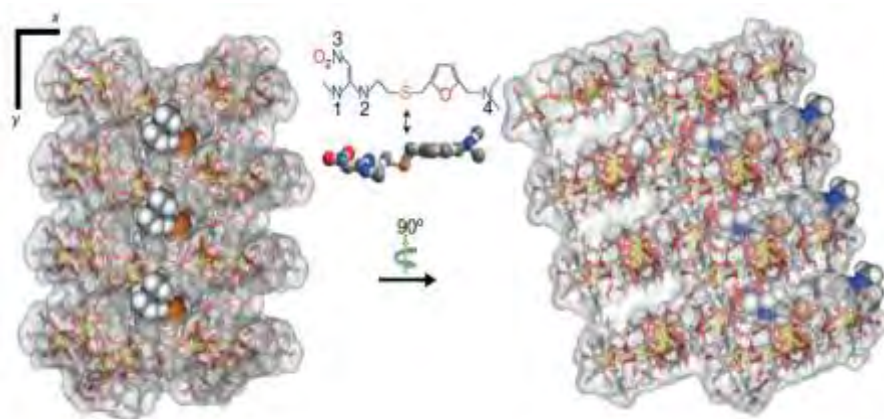
El nuevo desarrollo de terapias de régimen triple-cuádruple, que combina medicamentos basados en Citrato de Bismuto con antibióticos como Amoxicilina, Tetraciclina, Claritromicina o Nitroimidazol, ha sido recomendado para el tratamiento de las infecciones causadas por *Helicobacterpilory* (*H. pilory*). La eficacia terapéutica de los medicamentos basados en Citrato de Bismuto contra la infección de *H. pylori* (organismo descubierto en 1983) se atribuye a la actividad antimicrobiana del Bismuto y la formación de un revestimiento polimérico en las úlceras, previniendo la erosión causada por los jugos gástricos. En los últimos años se ha hecho el esfuerzo para dilucidar la estructura de los compuestos como el RBC y CBS, así como su mecanismo

de acción. Como por ejemplo, se sabe que la presencia de iones  $\text{Fe}^{3+}$ , retarda la acción de los medicamentos de Bismuto sobre la *H. pylori*, ya que este utiliza un transportador de Fe, para interferir con el metabolismo del patógeno. También medicamentos como el RBC, es un compuesto que se disocia por la acción de los jugos gástricos, en Citrato de Bismuto y Ranitidina, esta última en un antagonista  $\text{H}_2$ , que compite con la histamina por la unión por los receptores  $\text{H}_2$  los cuales inducen la secreción de los ácidos estomacales, resultando como un agente antiulceroso. En el caso de su estructura, se han cristalizado y caracterizado diferentes complejos de Citrato de Bismuto, a diferentes valores de pH. Para entender su farmacocinética y dinámica, se han obtenidos sus estructuras bajo valores de pH ácidos ( $\text{pH} \approx 3$ ), ya que esto representa una situación más real en el estómago. La estructura cristalina de cuatro de los complejos de Citrato de Bismuto, se obtuvieron a pH's ácidos en presencia de Etilendiamina o Piridina, revelando que las unidades dimericas de Citrato de Bismuto  $[\text{Bi}(\text{cit})_2\text{Bi}]^{2-}$ , como se observa la Figura 1.1, funcionan como bloques de construcción básicos para las estructuras poliméricas regulares con mallas y cavidades internas.



**Figura 1.1.** Dímero de Citrato de Bi que funciona como bloque básico de las estructuras poliméricas [12].

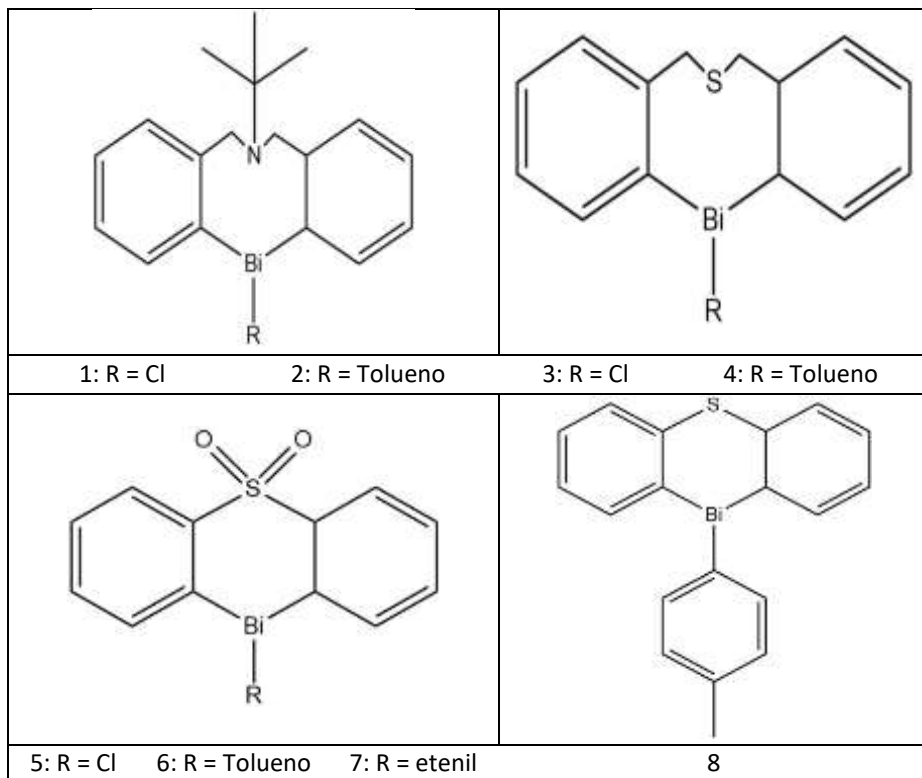
A pesar de que la Etilendiamina protonada no se observa en la estructura y restos de Piridina están incrustados probablemente por la difusión o las interacciones electrostáticas en la estructura polimérica, se logra el balance de cargas, ya que los aniones Citrato se encuentran desprotonados, llevando a tetraaniones Citrato  $[(C_6H_4O_7)^4]$ . La composición de la estructura de los complejos de Citrato de Bismuto depende del tamaño y el nivel de protonación de los cationes insertados, los valores de pH y también el tiempo de cristalización. Por ejemplo, en el caso de la RBC, las moléculas de Ranitidina pueden ser incrustadas fácilmente en las cavidades perpendiculares de los planos xy, por enlaces de Hidrógeno, formados entre la Ranitidina y los enlazados a los ligantes Citratos. Además los átomos de Azufre de la Ranitidina, forma enlaces de Hidrógeno con una molécula de agua que está coordinada al Bismuto, como se muestra en la Figura 1.2 [4, 9, 12-14].



**Figura 1.2.** Ejemplo de la estructura polimérica de RBC [12].

Un nuevo medicamento de Bismuto con ácido *d*-poligalacurónico, llamado, “Bismuto Coloidal Pectina”, ha sido aprobado para uso clínico en China en el tratamiento de úlceras pépticas, demostrando una efectividad similar al Citrato de Bismuto coloidal. Las propiedades antibacterianas del Bismuto también suelen mejorarse cuando este se combina con algún tiol lipofílico. Como es el caso del Nitrato de Bismuto [Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>] el cual al ser combinado con siete diferentes tioles (1,3-propanoditiol, Dimercaprol (BAL), Ditioteitrol, 3-mercapto-2-butanol, β-mercaptoetanol, 1-monotio Glicerol y Mercaptoetilamina), presenta un mejoramiento de 25-300 veces. De entre todos el que tiene un rango más amplio para diferentes bacterias es el Bismuto Dimercaprol (BiBAL) y de manera más particular con la *H. pylori*, con la cual tiene una concentración de inhibición mínima (CIM) 2.2 micro molar (μM), para *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*, CIM, 7.5 μM) y *C. difficile* (CIM, 7.5 μM), y teniendo menos contra enterococcus (CIM, 63 μM) y algunas bacterias anaerobias (15-100 μM). También se han sintetizado algunos compuestos de organobismuto, los cuales exhiben actividad antimicrobiana, sus estructuras se observan en la Figura 1.3. Los compuestos del 1-3, tienen una CIM de 0.50, 0.91 y 0.55 μM, respectivamente, contra *S.aureus*, mientras que del 5-8 tienen 34.73, 7.75, 8.84, y 33.03, para cada uno. Por último, debido a que en tiempos recientes la investigación en la nanotecnología ha crecido y en el caso específico de los nanomateriales basados en Bismuto, se ha centrado más en el ámbito farmacéutico. Un ejemplo de ello son los nanotubos de Subcarbonato de Bismuto [(BiO)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] que exhibe una actividad un poco alta contra *H. pylori*, siendo clínicamente usado bajo las mismas condiciones que el Subcitrato de Bismuto coloidal. Aún más importante los nanotubos de Bismuto pueden ser usados como capsulas en tratamientos terapéuticos de régimen triple-cuadruple contra *H. pylori* o también como medicamentos transportadores de liberación sostenida de otros

ingredientes en el cuerpo humano, cuando es usado en combinación con otros medicamentos, en el tratamiento de otras enfermedades [3-4].



**Figura 1.3.** Estructura de complejos de organobismuto con actividad antimicrobiana

[3]



### 1.3.- Bi como Anticancerígeno.

El  $^{212}\text{Bi}$  ( $t_{1/2} = 61$  min) y  $^{213}\text{Bi}$  ( $t_{1/2} = 46$  min) son partículas  $\alpha$ , que tienen mayor potencia que las partículas  $\beta$ , ambos tienen un decaimiento ramificado, resultando en la emisión de partículas  $\alpha/\beta$  y rayos  $\gamma$ . Pueden ser generados a partir de generadores de  $^{224}\text{Ra}$  y  $^{225}\text{Ac}$ , respectivamente, como se muestra en la Figura 1.4. Como otras partículas  $\alpha$ , tienen un pequeño rango de penetración (50-80  $\mu\text{m}$ ), de tal manera que reduce la radiación no específica a los tejidos normales que se encuentran alrededor de las células que son el objetivo. Investigaciones recientes muestran que el  $^{213}\text{Bi}$ , como un novedoso agente terapéutico para los tumores de volúmenes pequeños. Para dirigir al Bismuto al sitio deseado efectivamente, se usan ligantes quelatos como aminopolicarboxilato o poliaminopolicarboxilato (Iminodiacetato, Nitrilotriacetato, Piridindicarboxilato, Pentaacetato de Dietilentriamina (DPTA), etc.) que es usado para formar un complejo estable con el radionucleido. La conjugación del complejo CHX-A-DPTA  $^{213}\text{Bi}$  junto con ciertos anticuerpos se ha probado en modelos preclínicos de leucemia y cáncer prostático, dando resultados favorables.

El Bi también ha encontrado aplicaciones como agente anticancerígeno, en complejos organometálicos como  $([\text{Bi}(\text{tgn})_3\text{H}_2\text{O}] \cdot 3.5\text{H}_2\text{O})$  ( $\text{tgn} =$  tioguanina),  $[\text{Na}_2(\text{BiO}(\text{mp})_3) \cdot \text{H}_2\text{O}]$  ( $\text{mp} =$  6-mercaptopurina), tiolatos de Bismuto y oxinas de arilbismuto, mostrando actividad en concentraciones micro molares ( $\mu\text{M}$ ). También compuestos de Bismuto solubles en agua y basados en ciclinas, Bi-TPC (TPC = 1,4,7,10-tetraquis(2-piridimetil)-tetraazaciclododecano), exhibe una citotoxicidad contra el melanoma B16-BL6, con porcentaje de inhibición del 82% a una concentración de 0.25  $\mu\text{M}$ , después de 48 horas, siendo esta 100 veces más potente que la del Cisplatín (Cis-diamindicloroplatino, CDDP) [3-4, 7].

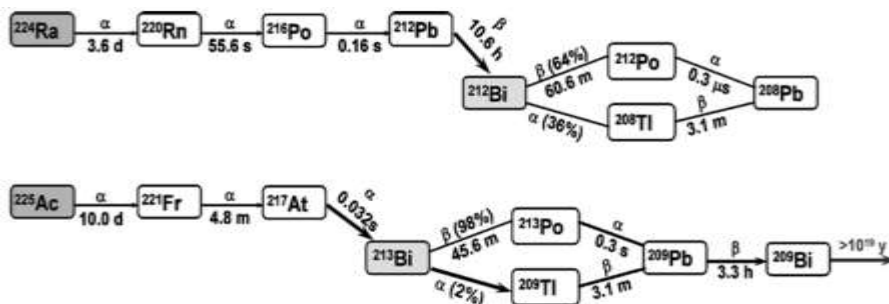


Figura 1.4. Decaimiento radioactivo de  $^{212}\text{Bi}$  y  $^{213}\text{Bi}$  [3].

Otra de las razones que favorece la aplicación de medicamentos de Bismuto en quimioterapia tiene que ver con su habilidad para reducir los efectos secundarios causados por el uso de otros medicamentos, como es el caso del CDDP y análogos, sin afectar la capacidad anticancerígena del medicamento. Recientemente el Subnitrato de Bismuto (SNB) ha demostrado ser capaz de disminuir los efectos secundarios del Cisplatino y en conjunto con el Citrato (SNB-Citrato), como un transportador, mejora su distribución en riñones. La alta absorción de Bismuto por riñones, aumenta la cantidad de Metalotioneina (MT) renal, pequeñas proteínas ricas en cisteína, la cual tiene una participación significativa en la protección de metales pesados, agentes alquilantes y radicales libres. El SNB-Citrato como un inductor para el aumento de la concentración de MT en riñones es 30 veces mayor que si se utiliza el SNB solo y además este aumento no ocurre con la MT de las células cancerosas, factor que se cree inactiva la acción de los medicamentos anticancerígenos. La forma en la que se detecta la nefrotoxicidad es con el nivel de Nitrógeno ureico en sangre, el cual se ve reducido al utilizar un pretratamiento de SNB-Citrato [3-4, 15-17].

#### 1.4.- Bismuto en Medicina Veterinaria.

El uso de medicamentos basados en Bismuto, no solo se limita a seres humanos, ya que también ha encontrado aplicaciones en animales. Un ejemplo de esto el SSB, el cual se utiliza para el tratamiento de la diarrea y como un componente de terapia triple para tratar infecciones causadas por la *H. pylori*, siendo utilizado principalmente en gatos, perros, hurones, ganado, caballos y cerdos. Se piensa que el Bismuto se adhiere en el intestino delgado, como Carbonato de Bismuto y Salicilato. Se cree que el Bismuto es responsable de la actividad antibacterial y anti-endotoxica, mientras que el Salicilato tiene una actividad antiprostaglandina, misma que ayuda a reducir los signos clínicos causados por la diarrea. Como tal no existe información específica en veterinaria, pero se sabe que en humanos la cantidad de Bismuto absorbida es despreciable, mientras que el Salicilato es absorbido rápidamente y por completo. El Salicilato se une fuertemente a las proteínas plasmáticas y es metabolizado por el hígado a Ácido Salicílico. El Ácido Salicílico, los metabolitos de Salicilato conjugados y el poco Bismuto absorbido es excretado vía renal. Debido a que puede ocurrir la absorción de Salicilatos, es necesario tener precaución en pacientes con trastornos en coagulación. También ya que el Bismuto sirve como radiopaco, puede ser una interferencia si se desea hacer un estudio radiológico en el tracto gastrointestinal [18-19].

#### 1.5.- Toxicología del Bismuto.

Los compuestos de Bismuto no se consideran tóxicos y de hecho un adulto puede tolerar hasta 15 g y solo su uso a largo plazo generar efectos secundarios. La absorción de Bismuto es distribuida en todos los tejidos blandos y huesos. Teniendo un tiempo de vida media biológico de retención en todo el cuerpo de 5 días aproximadamente. La

mayoría de casos que se conocen de intoxicación por Bismuto, no suelen suceder en las industrias que lo manufacturan, si no por el abuso de medicamentos que lo contienen. El grado de toxicidad del Bismuto suele verse de manera individual, tomando en cuenta el tipo de compuesto de Bismuto y la cantidad absorbida. La absorción gastrointestinal depende de la solubilidad en agua de las diferentes sales de Bismuto. Debido a que el Bismuto forma complejos insolubles con el Cloro, por la acción jugos gástricos después de la administración oral de las sales de Bismuto, la difusión del ion Bismuto dentro de la circulación es retrasada. No se sabe con certeza como o porque se genera la toxicidad del Bismuto, incluso no se conocen los niveles en el que es tóxico el mismo, aunque es raro encontrar complicaciones en cantidades menores a 50  $\mu\text{g/L}$  y se ha observado en tratamientos dicitratotripotásico de Bismuto, que las concentraciones de Bismuto en plasma aumentan hasta 10-20  $\mu\text{mol/L}$  sin considerarse tóxico. Uno de los primeros mecanismos que ha sido propuesto para explicar su toxicidad, es la interacción que tiene con los tioles, aunque también se cree que el Bismuto interfiere con el metabolismo oxidativo del sistema nervioso central, ya que se enlaza enzimas esenciales y reduce la circulación de sangre en el cerebro. En cuanto a la solubilidad, aquellas sales que son menos solubles como el Oxiclорuro de Bismuto y Subcarbonato de Bismuto, suelen ser menos tóxicos, a diferencia de compuestos que son más solubles como el Tartrato de Bismuto/Sodio y el Dicitrato Bismutatotripotásico que son más tóxicos. El Bismuto absorbido se acumula en riñones, pulmones, hígado, bazo, músculos y cerebro, siendo eliminado en orina y heces, por la secreción vía biliar e intestinal. La toxicidad suele ser dividida en aguda y grave, ambas pueden causar neurotoxicidad, toxicidad gastrointestinal, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y un aumento en la concentración de Bismuto en sangre [4-6, 8-10, 20].

Como ya se mencionó los casos de intoxicación por Bismuto suelen ser muy particulares y a la vez existen pocos reportados. Generalmente los efectos por la intoxicación de Bismuto se ejercen sobre el hígado y los riñones, aunque también existen casos reportados en otros sistemas. Por ejemplo, el caso de una mujer adulta que presentaba síntomas como retardo psicomotor, baja concentración, temblor en manos, alucinaciones y una postura inestable. Esta persona en un principio fue tratada con dosis controladas de diferentes medicamentos, para tratar el síndrome de intestino irritado, hipotiroidismo, hipertensión y depresión, lamentablemente no presentaba mejora y empeoraba en algunos de sus síntomas. Al final fue diagnosticada con intoxicación por Bismuto ya que se encontraron niveles en sangre de 397.3 ng/mL, que estaba por encima de la prueba de laboratorio 200 ng/mL que es considerado un límite de toxicidad y en orina fue de 292.5 ng/mL y el valor encontrado normalmente debe ser menor que 1 ng/mL. También se dio este diagnóstico porque se supo que la mujer anteriormente había estado tomando 45 mL de Subsalicilato de Bismuto, tres veces al día para controlar la diarrea y su colitis colágena, y de acuerdo con el marido esta cantidad había aumentado en las últimas semanas [21]. En otro caso se presentó daño renal en un niño de dos años, el cual ingirió 28 tabletas de CBS. Su madre estaba utilizando las tabletas para el tratamiento de ulcera péptica y había comprado una caja con 60 tabletas, de las cuales utilizó dos. Los padres observaron que el niño ingirió las tabletas y al revisar la caja se dieron cuenta que hacían falta 28. Al niño se le realizaron varios exámenes, presentando valores normales, entre ellos el de Nitrógeno ureico en sangre y de Creatinina en plasma, cantidades que aumentaban conforme avanzaban los días. Debido a esto se le realizó una diálisis peritoneal automatizada y una diálisis peritoneal continua ambulatoria, pero no fue hasta el décimo día después de ser hospitalizado que se encontró que los niveles de Bismuto eran altos, teniendo 739 µg/L y 693 µg/L, en sangre y orina, respectivamente [22].

En animales se ha observado que la aplicación de trimetil- y trietilbismuto en la piel de ratas y conejos, causa irritación y edema. También necrosis en sitios donde les es inyectado. Efectos locales agudos por la inhalación de trimetilbismuto en ratas, gatos y perros, incluido edema pulmonar [5].

Generalmente como cura para la intoxicación por Bismuto, solo es necesario interrumpir las terapias que incluyan medicamentos que lo contengan. Aunque de igual manera se tienen ciertos antidotos como la d-penicilamina, Ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS), Ácido Dimercaptosuccínico (DMSA) y Dimercaprol, los cuales han sido probados en animales y siendo más efectivos el DMPS y el DMSA, ya que tiene una fuerte habilidad para formar compuestos quelatos con los iones de Bismuto. En un caso reciente de un paciente que desarrollo graves complicaciones neurológicas, por el uso de una pasta de parafina de Yodoformo Bismuto en una herida quirúrgica, se recuperó con el tratamiento de DMPS [4-5].

### **1.6.- Espectrofotometría de Absorción Atómica.**

La absorción atómica, al igual que la emisión, fueron utilizadas por primera vez por Guystav Kirchhoff y Robert Bunsen, en 1859 y 1860, respectivamente, como estudio cualitativo para la identificación de átomos. La emisión se siguió desarrollando como una técnica analítica, mientras que la absorción se tardó casi un siglo. La espectroscopia de absorción atómica moderna fue introducida en 1955 por los trabajos independientes de A. Walsh y C.T.J. Alkemade [23].

La espectroscopia atómica es una técnica que se usa en el análisis tanto cualitativo como cuantitativo de más de 70 elementos, determinando la concentración con base en la absorción o emisión de estos en sus longitudes características. Su alta sensibilidad permite detectar concentraciones de partes por millón (ppm), partes por billón (ppb) e

inclusive para algunos casos concentraciones menores. La espectroscopia atómica comprende tres clases, la absorción, la emisión y la fluorescencia. Los átomos o iones en fase gaseosa, no tienen estados de energía migratoria o rotacional, por lo tanto solo ocurren transiciones electrónicas. De tal manera que los espectros de los diferentes tipos de espectroscopia se componen por un número limitado de líneas espectrales bien definidas [24].

En la emisión atómica los átomos del analito se excitan mediante una fuente de energía externa ya sea en forma de calor o energía eléctrica. Nanosegundos después de que el átomo ha sido excitado, pasa a su estado fundamental, cediendo la energía en fotones o radiación visible o ultravioleta. La intensidad de la emisión a una longitud de onda característica, indica la concentración y el elemento que se encuentra en la muestra. La absorción atómica tiene el mismo fundamento que la emisión, solo que para la absorción se utiliza una lámpara de cátodo hueco para excitar los átomos, la cual está constituida del elemento a analizar y en este caso la cantidad de luz que es absorbida está relacionada con la concentración del analito en la muestra. En el caso de la fluorescencia atómica, la muestra atomizada se incide con un haz de luz, la cual excita los átomos y estos al relajarse emiten una luz fluorescente, misma que suele ser de la de igual o mayor longitud de onda. La radiación emitida en este caso pasa por un filtro de emisión que se encuentra en un ángulo recto a la luz incidente, esto con el fin de evitar un efecto de dispersión. A diferencia de la emisión y absorción es más sensible detectando hasta partes por billón o por trillón (ppt), aunque solo ha encontrado aplicación con los elementos que generan hidruros volátiles y es una técnica que aún se encuentra en desarrollo [23-26].

En la espectrofotometría de absorción atómica para poder determinar algún elemento, lo principal es atomizar la muestra, es decir, volatilizar la muestra y producir átomos o iones en forma gaseosa. Existen dos tipos de atomización, la continua y la discreta, en

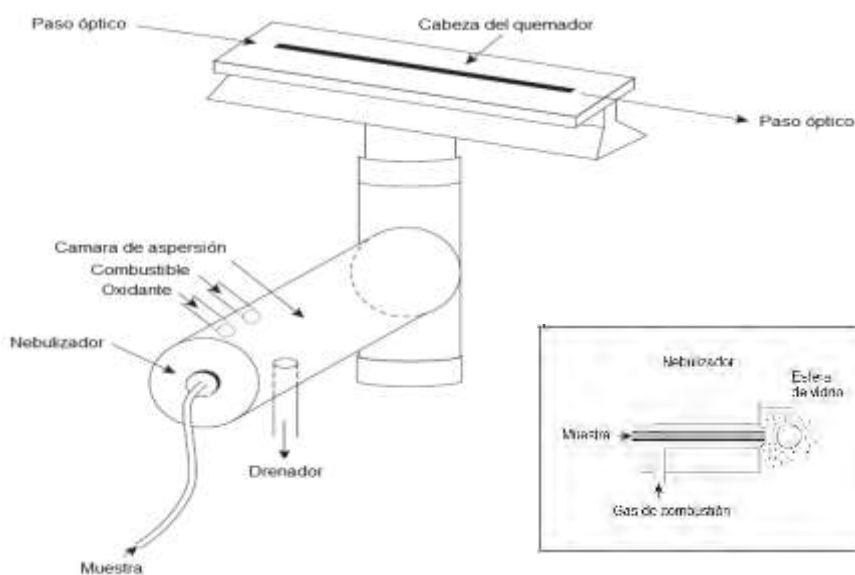
la primera como lo dice su nombre la muestra se introduce de manera continua y en los segundos la muestra es introducida por automuestreadores o por medio de jeringas. Los atomizadores más comúnmente utilizados son, para continuos la atomización en flama o plasma, y para los discretos la atomización electrotérmica, aunque para algunos elementos existen otros métodos [24].

El más utilizado es el de tipo continuo, en donde un nebulizador introduce la muestra en forma de aerosol, para ello la muestra debe ser introducida a una cámara de aspersión, esto se logra por la acción del oxidante (generalmente aire), que pasa sobre la punta del capilar que es por donde circula la muestra. La muestra entra a gran velocidad y se impacta contra una esfera de vidrio que convierte el aerosol en partículas más pequeñas y en la cámara de aspersión se mezcla con el oxidante y el combustible, para pasar al quemador donde la flama desolvata el aerosol, convirtiéndolo en pequeñas partículas, para que después la energía térmica las volatilice, produciendo un vapor que consiste en especies moleculares, especies iónicas y átomos libres, el esquema se observa en la Figura 1.5. La muestra también puede ser introducida por el método de análisis por inyección en flujo (FIA) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La energía térmica en la atomización en flama viene dada por la mezcla de oxidante-combustible, utilizándose más comúnmente Aire-Acetileno y Óxido Nitroso-Acetileno, las temperaturas que alcanzan se pueden observar en la Tabla 1.2. Existen flamas reductoras (ricas) y flamas oxidantes (pobres), las primeras suelen ser menos calientes y tener un exceso de especies carbonadas, las cuales pueden reducir óxidos metálicos, ya que para algunos elementos los óxidos no tienen el mismo espectro que los elementos libres, siendo menos intensa la señal atómica de los óxidos, por lo tanto, el uso de este tipo de flama ayuda a incrementar la sensibilidad para algunos elementos. Las flamas oxidantes son más calientes y se utilizan para elementos que requieren altas temperaturas para vaporizarse. De tal manera que dependiendo el elemento a analizar se utilizara la flama se requiera [24-25, 27].



**Tabla 1.2.** Temperaturas máximas de flama [27].

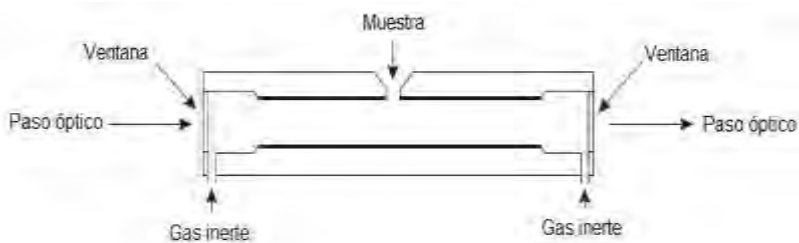
Combustible	Oxidante	Temperatura
<b>Acetileno</b>	Aire	2400-2700
<b>Acetileno</b>	Óxido nitroso	2900-3100
<b>Acetileno</b>	Oxígeno	3300-3400
<b>Hidrógeno</b>	Aire	2300-2400
<b>Hidrógeno</b>	Oxígeno	2800-3000
<b>Cianógeno</b>	Oxígeno	4800

**Figura 1.5.** Diagrama del atomizador en flama [23].

La atomización por flama tiene la ventaja de ser bastante reproducible por la forma en la que se introduce la muestra al espectrofotómetro. Lamentablemente tiene la desventaja de que la eficiencia de la atomización es pobre, debido a que casi el 95% de la muestra se pierde, porque las gotas que forman el aerosol son demasiado grandes para ser acarreadas por los gases de combustión y de igual manera el volumen de estos

gases es bastante, lo que provoca la dilución de una cantidad significativa de la muestra. Por lo tanto, se cree que de cada solución solo se encuentra en la flama  $2.5 \times 10^{-6}$ , de la concentración del analito, disminuyendo la sensibilidad [23].

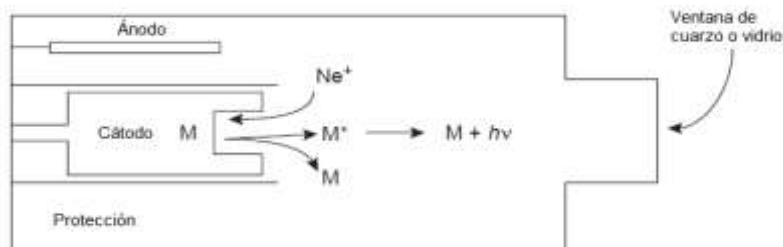
Los atomizadores electrotérmicos, aparecieron en 1970, siendo más sensibles que los atomizadores en flama y requieren menor cantidad de muestra. También se conoce como horno de grafito, el cual tiene un tubo de grafito de una longitud de 1-3 cm y un diámetro de 3-8 mm. Este tubo tiene un pequeño orificio en la parte superior por el cual se inyecta la muestra, que por lo general son de 5-50  $\mu\text{L}$ , el diagrama se observa en la Figura 1.6. La atomización se logra en tres fases. La primera es la deshidratación, en la cual la muestra se seca a una temperatura de 110 °C, calentando el tubo de grafito con una corriente eléctrica. Seguido de esto la temperatura se aumenta hasta 350-1200 °C, esta fase se llama calcinación, donde la materia orgánica se convierte en  $\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{CO}_2$ , y la materia inorgánica volátil se evapora, estos gases se remueven con el flujo de un gas inerte. Por último ocurre la atomización, donde la temperatura se aumenta hasta 2000-3000 °C. El paso óptico se encuentra encima de la superficie caliente donde está la muestra atomizada, la cual alcanza un máximo de absorbancia y disminuye conforme la muestra sale del tubo de grafito, el área o altura de pico que se obtiene es proporcional a la concentración de analito que fue inyectado. Las tres fases ocurren en aproximadamente 45-90 segundos gastándose la mayoría del tiempo en la deshidratación y calcinación, la atomización solo ocurre en milisegundos. Si bien la sensibilidad con este método aumenta, porque la concentración del analito en fase vapor es casi 1000 veces mayor que la atomización por flama y con esto también aumentan los límites de detección, la precisión disminuye, debido a que la eficiencia de la atomización es influenciada por el contacto de la muestra con el tubo de grafito, dificultando la reproducibilidad del mismo. Cabe decir que este tipo de atomización encuentra aplicación en absorbancia y fluorescencia atómica, para emisión no ha sido generalizado [23-24].



**Figura 1.6.** Diagrama del atomizador electrotermostático [23].

### 1.6.1.- Lámpara de Cátodo Hueco.

Las líneas en la espectrofotometría de absorción atómica generalmente son de un ancho menor a  $10^{-4}$  nm y debido a que no existe un monocromador que pueda generar anchos de línea menores a  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  nm, se recurre al uso de lámparas de cátodo hueco, que contienen el elemento a analizar y las cuales pueden producir líneas más estrechas de la frecuencia correcta. Estas lámparas se llenan con Ar o Ne, a presiones de 130 a 700 Pa (1-5 Torr). Con la aplicación de un potencial suficientemente grande, se logra la ionización del gas que se encuentra dentro de la lámpara (Ar o Ne), los cuales se aceleran hacia al cátodo. Estos iones contienen la suficiente energía para desprender los átomos metálicos que se encuentran en el cátodo, como se observa en la Figura 1.7.



**Figura 1.7.** Esquema de la lámpara de cátodo hueco y el mecanismo de emisión [23].

Algunos de los átomos desprendidos se encuentran excitados, de tal manera que emiten la longitud de onda característica del metal que se encuentra en el cátodo y la misma que puede absorber la muestra que se encuentra atomizada. Después los átomos desprendidos se vuelven a depositar en el cátodo o en las paredes de la lámpara, esto último por general provoca el desgaste de las lámparas. Hoy en día se pueden encontrar lámparas para cada uno de los 70 elementos que se pueden determinar por espectrofotometría de absorción atómica, aunque también existen lámparas que se han fabricado con más de un elemento, permitiendo así determinar varias especies [23, 25, 27].

#### 1.6.2.- Generador de Hidruros.

Para algunos elementos existe la posibilidad de introducir el analito en forma gaseosa para ser atomizado, esto mediante una reacción donde se obtiene un producto volátil. Para ello se utiliza  $\text{NaBH}_4$ , que se estabiliza con  $\text{NaOH}$  y reacciona con una disolución ácida del metal, formándose el hidruro volátil, el cual se lleva hacia el atomizador con ayuda de un gas inerte, el diagrama se observa en la Figura 1.8. Esta técnica suele utilizar una celda de cuarzo donde se concentra el hidruro volátil, esta celda se debe situar por el paso óptico y se combina con la atomización electrotérmica y flama. Las condiciones tienen que ser optimizadas para los distintos metales, ya que las concentraciones de ácido y del  $\text{NaBH}_4$ , suelen ser diferentes para cada uno. El único elemento que se puede determinar de manera directa es el Mercurio ( $\text{Hg}$ ), el cual se reduce con  $\text{SnCl}_2$ , obteniendo  $\text{Hg}^0$ , el cual es volátil a temperatura ambiente. Este método también se utiliza con metales difíciles de volatilizar y que por lo general no se pueden determinar por otros métodos, como son el Arsénico ( $\text{As}$ ), Selenio ( $\text{Se}$ ), Telurio ( $\text{Te}$ ), Estaño ( $\text{Sn}$ ), Antimonio ( $\text{Sb}$ ) y Bismuto ( $\text{Bi}$ ). Aunque la técnica solo se puede

usar con una reducida cantidad de elementos, como una forma de introducción de la muestra, ayuda mejorando la sensibilidad y por lo tanto también los límites de detección, y de igual manera aumenta la precisión para estos [29-30].

Históricamente, la primera referencia acerca del uso analítico del generador de hidruros en espectroscopia atómica surgió a finales de 1960, en el trabajo de Holak, quien usó la reacción de la formación de Arsina y lo acopló con espectrofotometría de absorción atómica en flama. En 1972 la reacción se innovó por Braman, usando el  $\text{NaBH}_4$ , como agente reductor para generar la Arsina. Ese mismo año se reportó el uso de plasma como fuente de excitación, logrando también la determinación simultánea de varios elementos formando el hidruro de cada uno a partir de la misma solución. Finalmente, en 1978, Thompson y colaboradores utilizaron el ICP-AES, para la determinación de As, Sb, Bi, Se y Te, generando los hidruros en la reacción con  $\text{NaBH}_4$ , en un sistema de separación de reacciones de flujo continuo. En 1978 muchos estudios se dedicaron a la generación de hidruros, indicando un fuerte interés en esta técnica y explorando las diferentes capacidades analíticas de la reacción, enfocándose en la especiación analítica y la determinación multielemental, desarrollando procedimientos eficientes para eliminar las interferencias que ocurren durante la fase de la reacción, así como diseñando novedosos sistemas de separación de la reacción. Esta técnica también se ha vuelto bastante útil como espectrometría de masas-ICP (ICP-MS), principalmente por el aumento de la sensibilidad. También tiene la ventaja de que como los hidruros volátiles tienen bajos puntos de ebullición, la reacción separa el elemento metálico de la matriz. [29-31].

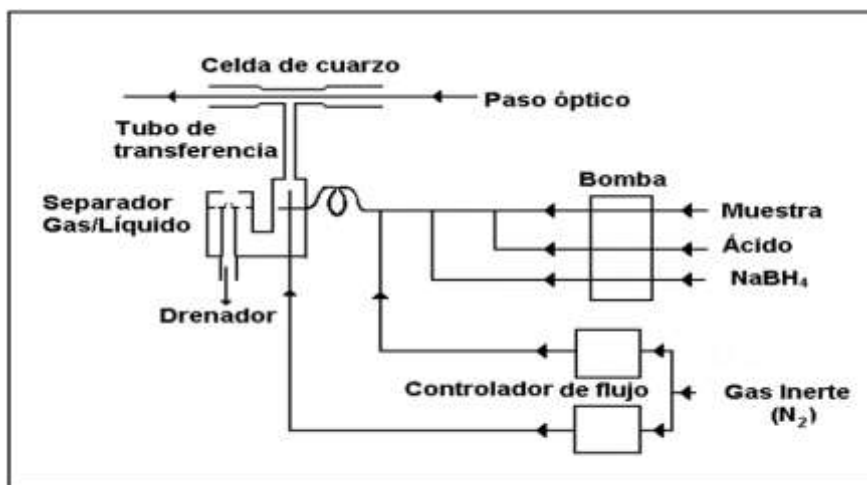


Figura 1.8. Diagrama de generador de hidruros [32].

Generalmente la determinación por generador de hidruros consta de cuatro pasos: la generación del hidruro, la recolección del hidruro (de ser necesario), la transferencia y la atomización. Lo más importante para la determinación de algún elemento por esta técnica es la generación del hidruro, la mayoría de los elementos que se pueden determinar, necesitan estar en un estado de oxidación en particular para formar el hidruro volátil, en el caso de As es 3+, Bi en 3+, Sb 3+, Se 2+, Te 2+ y Sn 2+. La reacción que explica la formación del hidruro volátil es la siguiente:

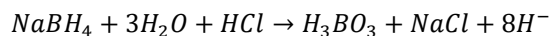


Figura 1.9. Reacción que explica la formación del hidruro volátil [29].

Donde E es el elemento, +m el estado de oxidación y  $\text{EH}_n$  el hidruro volátil.

Como medio ácido para la reacción, generalmente se utiliza HCl, aunque también han sido propuestos ácidos inorgánicos como  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HClO}_4$ , mezclas de HCl y  $\text{HNO}_3$ , y ácidos orgánicos como Ácido Acético, Ácido Cítrico, Ácido Oxálico, Ácido Sulfosalicílico, Ácido Tartárico y Ácido Mercaptoacético. En el caso de la concentración del reductor ( $\text{NaBH}_4$ ) tiene un rango bastante amplio, yendo desde 0.25% m/v hasta 10% m/v, siendo la concentración más común 1%. Se ha comprobado que la concentración tanto del medio ácido como el reductor, afecta considerablemente a la eficiencia de la reacción, ya que además del hidruro volátil, existen otros productos en la reacción ( $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) y de igual manera considerar las condiciones de la reacción permite mejorar aspectos como la sensibilidad, los límites de detección y la precisión [29].

### 1.7.- Hidruro Volátil de Bismuto.

El hidruro de Bismuto volátil, conocido como Bismutina ( $\text{BH}_3\uparrow$ ), es un compuesto inestable, descomponiéndose arriba de los  $-45\text{ }^\circ\text{C}$ . Existen diferentes métodos para formar el hidruro volátil de Bismuto, como se mencionó el uso de  $\text{NaBH}_4$  como agente reductor es la opción que comúnmente se utiliza hoy en día, aunque se conocen otras formas de síntesis como el uso de una aleación de Mg/Bi con HCl o  $\text{BiCl}_3$  con  $\text{LiAlH}_4$  a bajas temperaturas. Se prepara de mejor manera a una temperatura de  $-45\text{ }^\circ\text{C}$ , por la desprotonación de  $\text{MeBiH}_2$  o  $\text{Me}_2\text{BiH}$ , utilizando como agente reductor el  $\text{NaBH}_4$  o  $\text{LiAlH}_4$ . Debido a la inestabilidad del  $\text{BH}_3\uparrow$ , es difícil tener altos rendimientos en cantidades grandes, aunque en cantidades pequeñas puede que se formen por los métodos antes mencionados. En la Tabla 1.3 se muestra una comparación de los

diferentes métodos para obtener los hidruros de As, Sb y Bi, en la cual se puede observar los rendimientos que se tienen para cada uno de ellos y observando que son mayores a bajas temperaturas y que en el caso del Bismuto es mucho menor [1-2, 32].

**Tabla 1.3.** Formación de Hidruros [32].

	Reactivos	% de rendimiento
<b>AsH<sub>3</sub></b>	NaOH-As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -KBH <sub>4</sub>	59
<b>AsD<sub>3</sub></b>	AsCl <sub>3</sub> -LiAlD <sub>4</sub> (-90°)	83
<b>SbH<sub>3</sub></b>	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> SbK·1/2H <sub>2</sub> O-KBH <sub>4</sub>	51
<b>SbD<sub>3</sub></b>	SbCl <sub>3</sub> -LiAlD <sub>4</sub> (-90°)	82
<b>BiH<sub>3</sub></b>	BiCl <sub>3</sub> -LiAlH <sub>4</sub> (-100°)	1

Los hidruros mostrados en la Tabla 1.3, son inestables, aunque de todos ellos el más inestable es el de Bismuto, de hecho, se puede ver en los rendimientos, que la diferencia es grande en comparación de los otros hidruros. Por la poca estabilidad que tiene el hidruro volátil de Bismuto, la química del mismo no ha sido investigada extensamente, se conocen datos como el punto de ebullición y su entalpía de formación, pero de igual manera, en comparación con los hidruros mostrados anteriormente, es poca información, como se observa en la Tabla 1.4. Como se puede notar conforme aumenta el peso molecular la volatilidad disminuye. Lo mismo pasa con la fuerza del enlace M-H, este decrece del hidruro de As al de Bi. Los hidruros tanto de As, como Sb pueden ser almacenados en recipientes con Nitrógeno líquido, sin descomponerse en uno o máximo 2 días. Como ya se mencionó el Hidruro de Bismuto es muy inestable y su formación solo se ha demostrado utilizando Torio-C (<sup>212</sup>Bi), que fue una de las primeras aplicaciones que tuvieron los trazadores radioactivos [1-2, 33-34].



Tabla 1.4. Propiedades de hidruros de As, Sb y Bi [29].

	AsH <sub>3</sub>	SbH <sub>3</sub>	BiH <sub>3</sub>
<b>Punto de fusión (°C)</b>	-116.9	-88	
<b>Calor latente de fusión (kJ/mol)</b>	1.20		
<b>Punto de ebullición (°C)</b>	-62.5	-18.4	16.8
<b>Calor latente de evaporación (kJ/mol)</b>	16.75	21	25.2 (-43°C)
<b>Presión de Vapor (mmHg)</b>	35 (-111.6°C)	81 (-63.5°C) 224 (-45.2°C)	4.6 (-78°C)
<b>H°<sub>298</sub> - H°<sub>0</sub> (kJ/mol)</b>	10.2	10.47	
<b>H°<sub>f</sub> (kJ/mol)</b>	66.44	145.1	277.8
<b>C°<sub>p</sub> (J/mol K)</b>	38.07	41.05	
<b>S° (J/mol K)</b>	222.7	232.7	
<b>ΔG°<sub>f</sub> (kJ/mol)</b>	68.91	147.7	
<b>Potencial de ionización (kJ/mol)</b>	101		
<b>Densidad (Kg/m<sup>3</sup>)</b>	1622 (-63°)	2150	
<b>Longitud de enlace (pm)</b>	151.9±0.2	171.7±0.25	
<b>H-E-H ángulo de enlace (°)</b>	91.8±0.3	91.3±0.3	
<b>Frecuencias de vibración (cm<sup>-1</sup>)</b>			
v <sub>1</sub> (a <sub>1</sub> )	2116	1891	
v <sub>2</sub> (a <sub>2</sub> )	905	781.5	
v <sub>3</sub> (a <sub>3</sub> )	2123	1894	
v <sub>4</sub> (a <sub>4</sub> )	1003	831	
<b>Momento dipolar (D)</b>	0.22	0.116	
<b>Acoplamiento cuadrupolar nuclear</b>	<sup>75</sup> As: -160.1±0.4	<sup>121</sup> Sb:458.7±0.8	
<b>Constante e<sup>2</sup>Qq (MHz)</b>		<sup>123</sup> Sb:586.0±0.8	
<b>N.m.r. (ppm) (TMS = 10.0)°</b>	8.5	8.62	

### 1.8.- Muestra: Plasma.

El plasma corresponde a la fracción líquida en la que están suspendidas los componentes celulares de la sangre. Casi el 90% de este es agua, lo restante corresponde a iones minerales (Sodio, Calcio, Potasio, etc.), pequeñas moléculas orgánicas (aminoácidos, glucosa y ácidos grasos) y proteínas plasmáticas (albuminas, globulinas y fibrinógeno). Las proteínas plasmáticas corresponden al 7% de plasma, del cual del 40-50% son albuminas, 50% globulinas y no más del 5% pertenecen al fibrinógeno. La función de las albuminas es el transporte de moléculas como los aminoácidos, ácidos grasos, enzimas, fármacos, entre otros, y además controla la presión osmótica a nivel de la membrana capilar. Las globulinas se dividen en alfa, beta y gamma. Las alfa y beta ejercen diversas funciones como el transporte de algunas proteínas y la fijación de ciertos componentes de proteínas u hormonas. Las gamma y en menor proporción las beta, ayudan a proteger el cuerpo contra infecciones, debido a que estas son los principales constituyentes de los anticuerpos. En el caso del fibrinógeno, su función primordial es para la coagulación de la sangre. De hecho la única diferencia entre el suero y plasma sanguíneo es este último componente, por lo cual se puede decir que el plasma es la parte líquida de la sangre sin coagular, mientras que el suero es el sobrenadante de la sangre ya coagulado [35-40].

La neurotoxicidad asociada con el uso medicamentos de Bismuto generalmente es diagnosticada por la detección del mismo en la sangre, suero o plasma. En la sangre se encuentra principalmente en los glóbulos rojos y en menor proporción, en el suero y plasma. En algunos estudios se ha determinado Bismuto en suero, obteniendo cantidades en un rango de 0.007-0.067  $\mu\text{g/L}$ , esto mediante la técnica de ICP-MS, mientras que en sangre se ha determinado que el nivel normal se encuentra en un rango de 1-15  $\mu\text{g/L}$ . La presencia de Bi en plasma se relaciona con la Transferrina [5].

La transferrina es una glicoproteína (del grupo de beta-globulinas), de un con un peso de 80 kD, la cual transporta el  $\text{Fe}^{3+}$  en sangre. En la sangre humana la transferrina solo está saturada al 30% con  $\text{Fe}^{3+}$ , por lo cual se considera además un transportador de otros iones metálicos en el cuerpo. En el caso del  $\text{Bi}^{3+}$ , se enlaza fuertemente a los sitios de enlace del Hierro, en el lóbulo de C-terminal y N-terminal, aunque estudios demuestran que la unión de  $\text{Bi}^{3+}$  se da de manera preferencial en el lóbulo C-terminal. Cerca del 70% de Bismuto ha sido encontrado unido a la transferrina, con la presencia de un gran exceso de albumina (albumina: transferrina 13:1). De igual manera el Bismuto solo se ha encontrado unido a la albumina cuando los sitios de enlace de Hierro de la transferrina se encuentran saturados [3, 7, 41-42].

### 1.9.- Digestión con Microondas.

La preparación de muestras es algo tan antiguo que encuentra sus inicios en los egipcios y griegos. Los alquimistas desarrollaron un método de fusión con el que controlaban la pureza del Oro y Plata. En el siglo 14 con el descubrimiento de los ácidos minerales se pudo mejorar bastante la velocidad y precisión en la preparación de muestras y fueron las bases para los métodos industriales para la separación de Oro y Plata, cerca del siglo 15. La mayoría de métodos que se utilizan actualmente para la preparación de muestras fueron desarrollados durante el siglo 19, como el desarrollo de embudos de separación, crisoles de Platino y tubos de ensayo, hecho por Berzelius a inicios de 1800 y un método para la determinación gravimétrica de Azufre y Sulfatos en compuestos inorgánicos realizado por Henry y Zeise, en 1834. En 1860 Carius ideó un nuevo método para determinar Halógenos y Azufre, de manera más rápida y eficiente. En 1883 Kjeldahl publicó un método para determinar el Nitrógeno contenido en proteínas. Así mismo en estas fechas se desarrolló el método de Soxhlet, el cual permite extraer la grasa de

materiales biológicos, el cual se volvió muy popular ya que hacía posible realizar la extracción de múltiples muestras con la mínima atención del operador [43].

Al día de hoy el análisis instrumental ha crecido bastante, mejorando tanto la precisión como rapidez y permitiendo determinar concentraciones menores a las partes por billón, Sin embargo, el desarrollo en lo que se refiere a la preparación de muestras es algo que ha sido retrasado, principalmente porque para el análisis instrumental por lo general se requiere que la muestra se encuentre en el mismo nivel molecular en la fase líquida, lamentablemente la investigación para lograr lo anterior no ha tenido la misma dedicación que para el análisis instrumental. De igual manera, aunque se siga haciendo uso de los ácidos minerales o del método de extracción de Soxhlet, para preparar las muestras, son métodos propensos a tener errores, debido a que llevan horas o hasta días en completarse y además las habilidades del analista como la contaminación de la muestra se suelen tomar como influencias también [43].

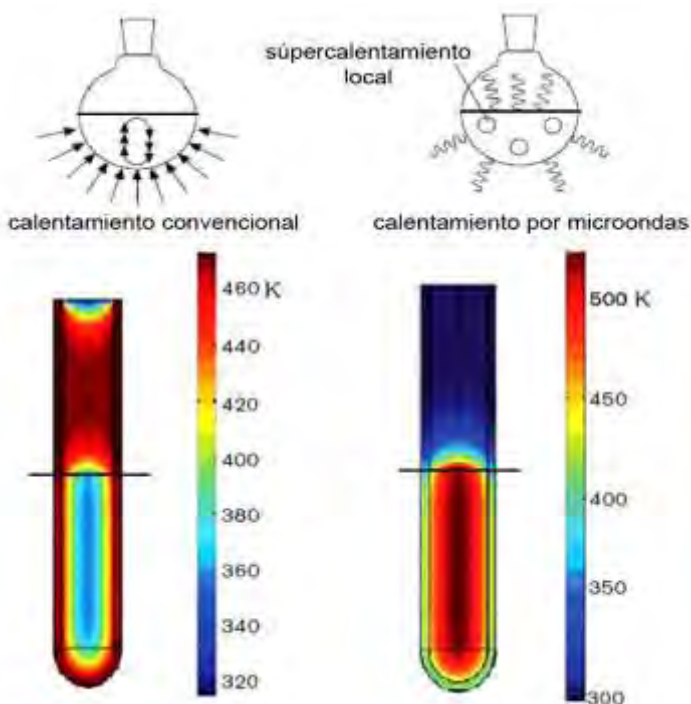
En 1975 se empezó a utilizar el calentamiento con microondas, en la digestión de muestras biológicas. Se utilizó un microondas casero realizando una mezcla de ácidos para la digestión, junto con la muestra y teniendo una temperatura próxima al punto de ebullición a presión atmosférica, en un matraz Erlenmeyer. En 1980 se realizaron digestiones en microondas con recipientes cerrados, alcanzando temperaturas mayores al punto de ebullición a presión atmosférica y encontrando también un aumento en la presión, dando como resultado un aumento en la velocidad de reacción y una disminución en los tiempos de la misma. En un inicio los métodos iban siendo desarrollados a base de prueba y error, contribuyendo poco a poco al entendimiento de las interacciones con las microondas y el mecanismo de digestión. Una de las primeras cosas que se necesitaba para entender de mejor manera el uso de microondas, era poder controlar la temperatura y la presión. El sistema para controlar la presión en un microondas de laboratorio se introdujo en 1989, mientras que el sistema para controlar

la temperatura se introdujo en 1992. Con la capacidad de monitorear la temperatura y la presión, se pudo estudiar mejor el mecanismo de digestión y con esto estandarizar métodos para la preparación de muestras con microondas [43].

Otra parte que tuvo que evolucionar junto con el desarrollo de microondas, fueron los recipientes donde se llevaba a cabo la digestión. Los primeros recipientes cerrados que se utilizaron estaban completamente hechos de teflón y resistían presiones de 7-10 atm. Estos eran propensos a tener fugas y además se deterioraban conforme pasaba el tiempo. La segunda generación de recipientes estaba constituida por dos piezas, un vaso con el interior de un copolímero de perfluoroalcoxi (PFA) y una tapa incrustada que tenía una capa de polieterimida, estos resistían presiones de hasta 30 atm. Contenían un mecanismo de alivio de presión, previniendo esta se excediera, el problema es que había pérdidas de muestra. Hoy en día se utilizan recipientes compuestos de dos piezas, el cuerpo y tapa están constituidos de fluoropolímeros de tetrafluorometoxilo, con una cubierta de polieterimida y polieter etercetona u otros materiales transparentes para las microondas. Estos soportan temperaturas de 260 °C a presiones de 60-100 atm. Igual que los recipientes anteriores contenían un mecanismo para evitar el exceso de presión, pero evitando la pérdida de la muestra. Algunos sistemas hoy en día soportan temperaturas de hasta 320 °C a presiones de 130-200 bar [43].

En la preparación convencional de muestra, el calentamiento ocurre por conducción, ya sea con flamas, mantas de calentamiento, hornos térmicos, placas calientes, entre otros. Utilizando este tipo de calentamiento, la energía solo se transfiere a la parte de la solución que se encuentra en contacto con el material de calentamiento y penetra a la solución por convección. El problema es que el calentamiento en la solución es muy lento y se ve afectado por el material donde se encuentra y la capacidad de este de conducir el calor, de igual manera solo cierta parte de la solución se encuentra a la temperatura del recipiente y por lo tanto a su punto de ebullición. El calentamiento por

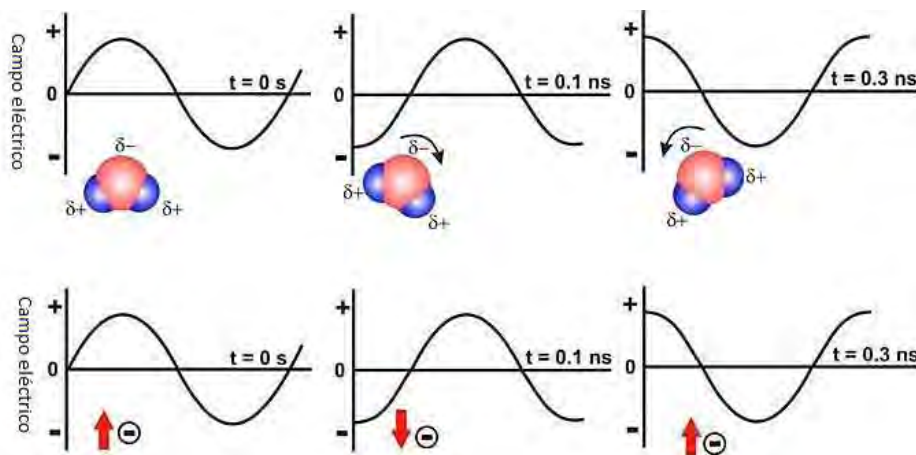
microondas se considera un proceso “frio”, ya que el aumento de temperatura solo ocurre cuando las moléculas de la solución absorben la energía de las microondas y sin el calentamiento del recipiente donde se encuentra, esta diferencia se muestra en la Figura 1.10 [43-44].



**Figura 1.10.** Diferencia entre calentamiento convencional y por microondas [45].

El calentamiento por microondas ocurre por dos mecanismos, por la rotación dipolar y la conducción iónica, como se muestra en la Figura 1.11. En el primero los dipolos de las moléculas se alinean con el campo eléctrico aplicado. El campo eléctrico oscila,

obligando a los dipolos de las moléculas a moverse, estas al reorientarse calientan la solución, debido a la fricción provocada, a 2.45 GHz que es generalmente a la frecuencia que se utiliza en un horno de microondas de laboratorio, el movimiento de las moléculas ocurre a 5 billones por segundo. En la conducción iónica, las especies iónicas se mueven de una dirección a otra, de acuerdo a la polaridad del campo electromagnético. El calentamiento ocurre como una respuesta natural cuando los iones se aceleran y encuentran resistencia a su flujo [24, 43-46].



**Figura 1.11.** Mecanismos que provocan el calentamiento por microondas: rotación dipolar (arriba) y conducción iónica (abajo) [46].

Estos dos únicos mecanismos calientan más rápido que la conducción y la convección. El exceso de energía que se genera, solo se disipa por vaporización, en recipientes abiertos y resulta algo llamado “supercalefacción”, ya que se obtienen temperaturas por encima del punto de ebullición, como, por ejemplo, 5 °C para el agua y 26 °C para Acetonitrilo [43, 46].

El uso de microondas en la preparación de muestras, permite realizarlo de manera más rápida, eficiente y reproducible. En combinación con otras técnicas químicas para la preparación de muestras, permite realizar análisis por debajo de los picogramos. Otras ventajas que se encuentran con el uso de microondas, es que se evita la pérdida de muestra por vaporización de tal manera que se puede trabajar con menor cantidad de muestra y de reactivos, con lo cual se disminuyen bastante las interferencias por contaminantes, y de igual manera permite trabajar con compuestos volátiles, con una pérdida mínima de los mismos. También debido a la disminución de tiempo para preparar muestras, siendo este de minutos en vez de horas o días y a que el proceso de calentamiento por microondas se puede controlar mejor que otros procesos de calentamiento, hace más fácil la automatización y estandarización de métodos [24, 43-44].

El uso de microondas ha encontrado muchos usos, principalmente en lo que se refiere al medio ambiente, en la digestión de sedimentos y suelos. Aunque es una de las áreas que encuentra más demanda, no quiere decir que no haya encontrado desarrollo en otros ámbitos, como lo es en medicina, donde una muestra que tarda 24 horas en prepararse, la cual debe ser deshidratada y teñida, para saber si hay algún crecimiento anormal en el cuerpo y decidir si es cáncer, con microondas puedes realizar el mismo proceso con la misma biopsia en solo 30 minutos. Otra área que también parece ser beneficiada, es la que se dedica a la prueba de drogas, la cual analiza muestras de sangre para encontrar abuso de las mismas y que el método que normalmente se utiliza tarda seis horas aproximadamente, mientras que con el uso de microondas solo se lleva un minuto y se obtienen mejores resultados. También el uso de microondas no solo encuentra aplicaciones en la preparación de muestras, otro campo donde se utiliza es en la síntesis orgánica e inorgánica, teniendo el mismo beneficio, que es la disminución de tiempo para realizarlas, donde antes una reacción se llevaba a cabo tres horas, ahora en el mismo tiempo puedes realizar cinco [43-44].



### **1.10.- Gráfica de Calibrado y Regresión Lineal.**

Hoy en día en las técnicas de análisis instrumental, ya sean los basados en espectroscopia, métodos electroquímicos, cromatografía de líquidos y gases, entre otros, abarcan más del 90% de todo el trabajo analítico. Estas técnicas tienen muchas ventajas sobre las técnicas de análisis clásico, si bien estas últimas encuentran muchas aplicaciones aun, las técnicas instrumentales ofrecen mayores ventajas, como la posibilidad de cuantificar especies químicas a niveles de sub-microgramos y la determinación de más de un analito a la vez. Así mismo este tipo de técnicas son muchos más rápidas de realizar y son menos laboriosas, permitiendo automatizar las diferentes técnicas y haciendo posible poder analizar hasta 100 muestras en una hora. También la combinación de dos diferentes tipos de técnicas de análisis instrumental (ej. Cromatografía líquida con espectroscopia), hace que estas ventajas sean más visibles [47].

Para poder hablar con certeza de las ventajas que tiene el análisis instrumental, no basta con utilizar palabras como “es probable” o “es muy seguro”, se necesita información más cuantitativa, de tal manera que se pueda determinar la exactitud y precisión de las medidas obtenidas, para ello es necesario realizar análisis matemáticos estadísticos. Para realizar lo anterior por lo general se inicia haciendo una curva de calibración, esta se construye preparando varios sistemas (puntos de la curva), los cuales tienen una concentración conocida del analito a determinar. El instrumento analítico, genera una señal para cada sistema, la cual por lo general aumenta conforme aumenta la concentración del analito. La señal o propiedad medida (ej. Área de pico, altura de pico, absorbancia, fluorescencia, etc.) es la variable dependiente, mientras que la concentración es la independiente. Una vez obtenida la curva de calibración, se puede obtener la concentración del analito en una muestra real mediante interpolación. Estos, así como otros pasos, pueden analizarse de manera estadística [28, 47].

Una de las primeras cosas que se analiza es el comportamiento de la curva, el cual por lo general se espera sea lineal, debido a que es el tipo de curva que se usa comúnmente, además que de alguna manera es el más fácil de tratar. Esto no quiere decir que solo se use el tipo de curva lineal, también se pueden utilizar otro tipo de curvas (ej. Exponencial, logarítmica), aunque muchas veces esto conlleva más trabajo para tratar los datos y de igual manera se prefiere transformar a un comportamiento lineal. Como calculo estadístico se utiliza el coeficiente de correlación momento producto ( $r$ ), o llamado más comúnmente como coeficiente de correlación. Con este se puede determinar si una curva tiene un comportamiento lineal y al calcularlo este debe tener un valor próximo a 1. Al realizar el cálculo es necesario tomar dos cosas en cuenta, la primera de ellas es la cantidad de cifras significativas que se utilizan para calcularlo, ya que algunas veces se pueden obtener valores incorrectos de  $r$ . También es necesario la mayoría de veces representar la curva con los datos obtenidos, ya que aunque se obtengan valores de  $r$  cercanos a uno, los datos pueden no tener un comportamiento del todo lineal, por lo cual se puede malinterpretar el valor de  $r$  [47].

Una vez realizado anterior se procede a determinar cuál es la mejor recta, esto utilizando un procedimiento llamado suma de mínimos cuadrados, esto debido a que se supone todos los errores se encuentran en el eje  $y$ , de tal manera que se busca minimizar las desviaciones en esta dirección, entre los puntos experimentales y los obtenidos por la línea. Para ellos se calculan la pendiente y la ordenada al origen, con las cuales se podrá calcular la concentración de un analito por interpolación. Ya que tanto la pendiente como la ordenada al origen están sujetas a errores aleatorios, es necesario calcular diferentes parámetros estadísticos, para conocer las desviaciones estándar de ambas, como su nivel de confianza [28, 47].

Todo lo anterior mencionado junto con otros cálculos estadísticos, como la precisión y exactitud, forma parte de algo conocido como validación de métodos. La validación es

algo que se utiliza con frecuencia hoy en día, ya que mediante esto se puede cerciorar de que, en algún método desarrollado para determinar alguna sustancia en específico, se produzcan resultados comparables con diferentes analistas. En la tabla 1.5 se muestran algunos criterios de aceptación que se indican en una guía de validación, para diferentes parámetros estadísticos [47-48].

**Tabla 1.5.** Algunas especificaciones para la validación de métodos [48].

Parámetro*	Criterio de evaluación	Criterio de aceptación
<b>Linealidad del sistema*</b>	$r^2$	$\geq 0.98$
	IC ( $\beta_1$ )	No debe incluir cero
<b>Precisión del sistema*</b>	% C.V.	$\leq 1.5\%$ para métodos físico-químicos. $\leq 3\%$ para métodos biológicos.
<b>Precisión intermedia*</b>	% C.V.	$\leq 2\%$ para métodos cromatográficos o volumétricos, $\leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos, $\leq 5\%$ para métodos microbiológicos.
<b>Exactitud y repetibilidad*</b>	IC ( $\mu$ )	Debe incluir 100% o que la media aritmética incluya los siguientes intervalos: 98-102% para métodos cromatográficos, 98-102% para métodos volumétricos, 97-103% para métodos espectrofotométricos, 95-105% para métodos microbiológicos.
	%C.V.	$\leq 2\%$ para métodos cromatográficos, $\leq 2\%$ para métodos volumétricos, $\leq 3\%$ para métodos químicos o espectrofotométricos, $\leq 5\%$ para métodos microbiológicos.

Existen otros parámetros como la linealidad del método, adecuabilidad del método, robustez, estabilidad analítica, tolerancia, límite de detección y cuantificación. Estos dos últimos parámetros se han vuelto de gran importancia en el análisis instrumental, ya que como se ha mencionado estos permiten analizar cantidades de traza y ultratrazas, como es comúnmente llamado. En la literatura se pueden encontrar diferentes definiciones para ambos parámetros, en este caso se definirá de la manera más sencilla. El límite de cuantificación se define como la concentración mínima de analito que se puede determinar de manera precisa y exacta, mientras que el límite de detección se define como la concentración mínima de analito que puede ser detectada, aunque esta no se cuantifique, realizando esto bajo las condiciones de operación establecidas. Por último es necesario decir que los valores expuestos como criterios de aceptación para cada uno de los parámetros antes mencionados, puede diferir en diferentes análisis, ya que no son dogmáticos, dependiendo del análisis a realizar se pueden modificar estos valores, siempre dando justificación del porque se cambian. Así mismo se pueden excluir de un estudio alguno de los parámetros mencionados, dependiendo del tipo de análisis que se realice y del alcance que se quiera tener con el mismo [47-48].

**2.- Parte Experimental.****2.1.- Reactivos.**

HCl R.A. (J.T. Baker) 36.5% Pureza.

HNO<sub>3</sub> R.A. (J.T. Baker) 69% Pureza.

NaBH<sub>4</sub> R.A. (Sigma) 99% Pureza.

NaOH (J.T. Baker) 98.4% Pureza.

Ácido Tartárico (Productos Químicos Monterrey) 99.5% Pureza.

Ácido Oxálico (Sigma) 98% Pureza.

Ácido Sulfúrico (J.T. Baker) 98.2% Pureza.

Ácido Cítrico (J.T. Baker) 100% Pureza.

Ácido Fórmico (J.T. Baker) 99.5% Pureza.

Peróxido de Hidrógeno (Reactivos Meyer) 30% Pureza.

Estándar de Bi (III) 1000 ppm (Sigma).

Bi(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·5H<sub>2</sub>O (Sigma) 98% Pureza.

Agua desionizada 18.2 MΩcm Millipore.

Muestra de plasma de equino.

Acetileno Grado: Alta pureza (Praxair, USA).

Nitrógeno Grado: Alta pureza (Praxair, USA).

Aire comprimido.

**2.2.- Material.**

Matraz Volumétrico de 50 mL (BLAU BRAND, Alemania) Tipo B.

Matraces Volumétricos de 25 mL (Kimax, México) Tipo A.

Matraces Volumétricos de 100, 250, 500 y 1000 mL (Kimax, México) Tipo A o B.

Pipeta Volumétrica 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 25 mL (Kimax, México) Tipo A.

Probeta 10 mL (Kimax, México).

Vasos de Precipitados 50, 100 y 250 mL (Kimax, México).

Celda de Cuarzo.

Lámpara de Cátodo Hueco de Bi (Varian, Australia).

### 2.3.- Equipo.

Espectrofotómetro de Absorción Atómica SpectrAA-800 (Varian, Australia).

Espectrofotómetro de Absorción Atómica SpectrAA-200 (Varian, Australia).

Generador de Hidruro VGA77 (Varian, Australia).

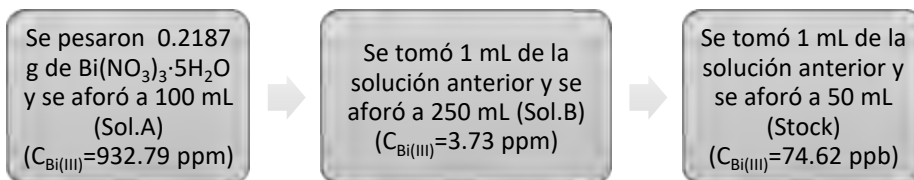
Horno de Microondas MARS6X (CEM, USA).

Balanza Analítica (BOECO, Alemania).

Desionizador Direct-Q 5 (Millipore, México).

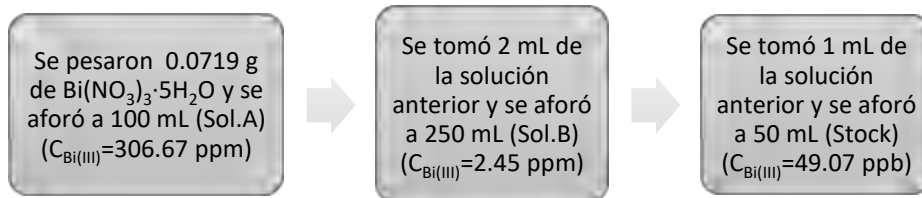
### 2.4.- Preparación de Soluciones Stock.

#### 1ª Stock a partir de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .



La sal de Bismuto se disolvió con  $\text{HNO}_3$  concentrado, de tal manera que el ácido quedara con una concentración 5% m/v aproximadamente y también se preparo una solución de este ácido a esta concentración para aforar la solución B, como el Stock.

### 2ª Stock a partir de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$



El procedimiento para preparar estas soluciones, fue el mismo que el anteriormente descrito.

### Stock a partir de estándar (STD) de Bi de 1000ppm.



Al igual que en las soluciones anteriores se preparó un  $\text{HNO}_3$  5% m/v para aforar.

**2.5.- Espectrofotómetro de Absorción Atómica y Generador de Hidruros.****Tabla 2.1.** Condiciones establecidas para la determinación de Bi por EAA-GH.

Condiciones del equipo [32]			
Equipo	Longitud de onda (nm)	Slit	Intensidad de lámpara
SpectrAA-800	223.1	0.2	12 mA
SpectrAA-200	223.1	0.2	10 mA

**Figura 2.1.** Fotografía del Espectrofotómetro de absorción atómica (SpectraAA800), con generador de hidruros (VGA77), que se usó (L-112, FESC, UNAM).

En la Figura 2.2 es un diagrama que ejemplifica la forma en que funciona el generador de hidruros. Como se puede ver el flujo de los sistemas que contienen Bismuto fue de 6 mL/min, y el de la solución ácida y reductor ( $\text{NaBH}_4$  en  $\text{NaOH}$ ) de 1 mL/min. El gas inerte que se utilizó para arrastrar el hidruro volátil de Bismuto al atomizador fue  $\text{N}_2$ .



Y por último la flama del espectrofotómetro para atomizar la muestra, se generó con una mezcla de Aire-Acetileno.

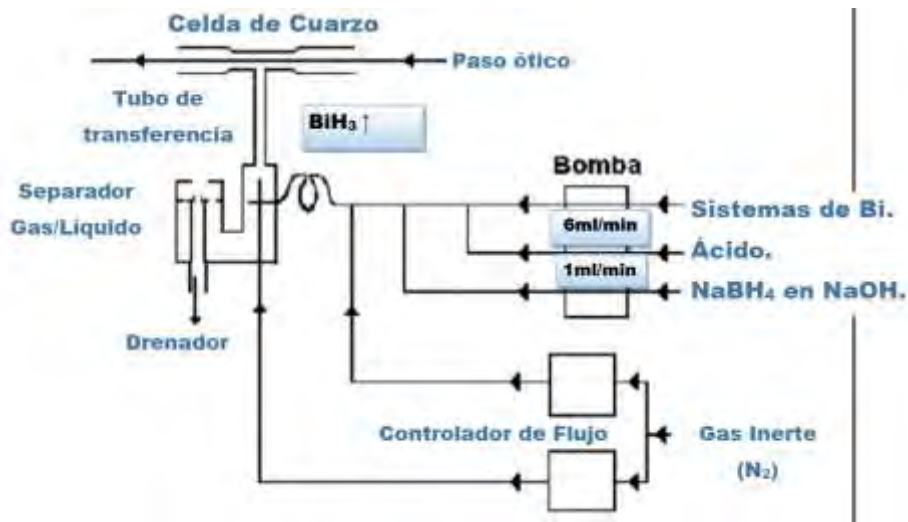


Figura 2.2. Diagrama de generador de hidruros [modificado de 32].

### 2.6.- Pruebas realizadas para determinar las condiciones óptimas.

Con la 1ª solución stock se inició la experimentación, donde el volumen de aforo fue de 50 mL y se utilizaron las condiciones descritas por el proveedor del equipo [32]:

- Reductor:  $\text{NaBH}_4$  0.6% m/v en  $\text{NaOH}$  0.5% m/v.
- Solución ácida:  $\text{HCl}$  5 M.
- Sistemas de la curva aforados con  $\text{HCl}$  1 M.

Después se fueron realizando varios cambios en la experimentación donde los más representativos fueron los siguientes:

- a) Cambio de la concentración de la solución ácida de HCl a 1 M.
- b) Pruebas con la 2ª solución Stock, donde el volumen de aforo fue de 25 mL.
- c) Pruebas con la solución Stock a partir del STD de Bi de 1000 ppm, donde el volumen de aforo fue de 25 mL.

Con cada una de las diferentes soluciones Stock que se realizaron, se hicieron diferentes pruebas en donde los sistemas se llevaron al volumen de aforo correspondiente con HCl, cambiando la concentración de este, las pruebas se explican de manera detallada en la Sección 3.1.

Luego se evaluaron diferentes ácidos, los cuales se utilizaron tanto como solución ácida y como medio para aforar los sistemas, en seguida se indica cuales fueron estos ácidos, así como la concentración a la que se utilizó cada uno de ellos:

- Ácido Fórmico 1 M.
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.
- Ácido Tartárico 0.5 M.
- Ácido Cítrico 0.5 M.
- Ácido Oxálico 0.08 M.

Para realizar las pruebas con estos ácidos se utilizó la solución Stock a partir del STD de Bi de 1000 ppm y el volumen de aforo fue de 25 mL.

Posteriormente con estos ácidos (excepto el Ácido Fórmico), se realizó una prueba en donde se cambio la concentración del  $\text{NaBH}_4$  a 0.35% m/v, manteniendo la concentración de 0.5% m/v del  $\text{NaOH}$ .

Dejando el cambio anterior se realizaron otras pruebas con el Ácido Cítrico y el Tartárico, este último se utilizó para realizar la evaluación estadística de las condiciones óptimas. Los análisis estadísticos que se realizaron fueron la Linealidad del Sistema, Precisión del Sistema, Repetibilidad del Sistema en diferentes días y equipos, y el porcentaje de recobro en muestras de plasma de equino, la forma en que se realizó cada prueba se explica de manera detallada en la Sección 3.6.

### **2.7.- Tratamiento de la Muestra.**

Para el tratamiento de la muestra se utilizó un método que ya se encuentra validado para la determinación de Selenio en plasma [49]. En este se indica el uso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HNO}_3$  y agua desionizada, utilizando la misma cantidad de cada uno ellos para digerir 1 mL de plasma de equino. Las condiciones a las que trabaja el horno de microondas se muestran en la Tabla 2.2. Se prepararon nueve sistemas con tres niveles diferentes de concentración (tres sistemas para cada nivel), fortificando los sistemas con el stock de 50 ppb a partir del STD de Bismuto de 1000 ppm, la forma en que se prepararon se encuentra en la Tabla 2.3.

Cada sistema se dejó reposar 30 min antes de ser sometido a digestión. La forma en se prepararon los sistemas de las muestras digeridas, para poder medirlos en el EAA-GH, se explica de manera detallada en la Sección 3.6.5.

**Tabla 2.2.** Condiciones establecidas para digerir plasma mediante horno de microondas [49].

Condiciones del horno de microondas					
Potencia (W)	Potencia (%)	Tiempo de Alcance (min)	Temperatura (°C)	Presión (psi)	Tiempo de Mantenimiento (min)
1200	100	5	120	350	2
1200	100	5	170	350	5

**Tabla 2.3.** Preparación de los sistemas para digerir las muestras con horno de microondas.

Sistema	1	2	3
Stock de 50 ppb (mL)	2	4	7
HNO <sub>3</sub> (mL)	5	5	5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	2	2	2
Agua desionizada	10	10	10
Plasma (mL)	1	1	1
C. de Bi (ppb)	4	8	14

### 3.- Resultados y Discusión.

#### 3.1.- Evaluación de la influencia del HCl en la preparación de los sistemas.

##### 3.1.1.- Solución stock de Bi a partir de la sal de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .

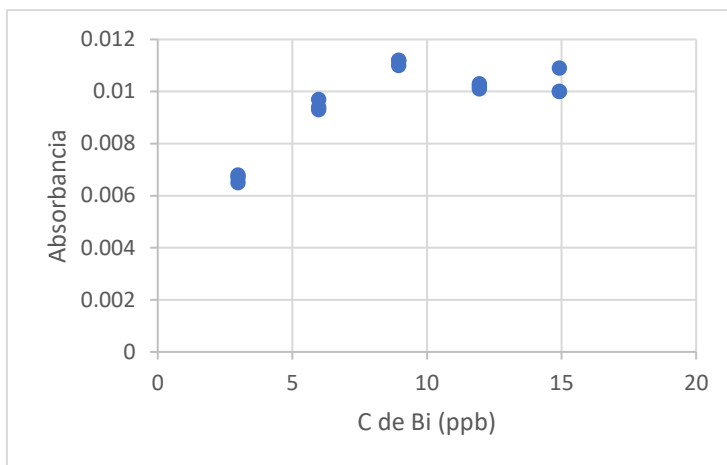
Como ya se mencionó en la Sección 2.6 cuando se inició la experimentación, el método que se utilizó fue el descrito en el manual del generador de hidruros [32]. Se prepararon cinco sistemas, como se muestra en la Tabla 3.1, los cuales se midieron por triplicado, los resultados se ven en la Tabla 3.2 y en la Figura 3.1 el gráfico obtenido, observando en este último que no existe un comportamiento lineal. Este método solo se probó una vez, ya que ninguna de las referencias consultadas hablaba del uso del HCl a una concentración de 5 M [50-57].

**Tabla 3.1.** Sistemas preparados como indica el método del manual del generador de hidruros [32].

Sistemas	1	2	3	4	5
Stock (mL)	2	4	6	8	10
Aforo (mL)	50	50	50	50	50
Conc. (ppb)	2.98	5.97	8.95	11.94	14.92

**Tabla 3.2.** Resultados obtenidos utilizando el método del manual del generador de hidruros [32].

Sistema	Concentración (ppb)	Absorbancia		
1	2.98	0.0065	0.0068	0.0067
2	5.97	0.0094	0.0097	0.0093
3	8.95	0.0110	0.0112	0.0112
4	11.94	0.0103	0.0102	0.0101
5	14.92	0.0109	0.0100	0.0100



**Figura 3.1.** Curva de calibración obtenida utilizando el método del manual del generador de hidruros [32].

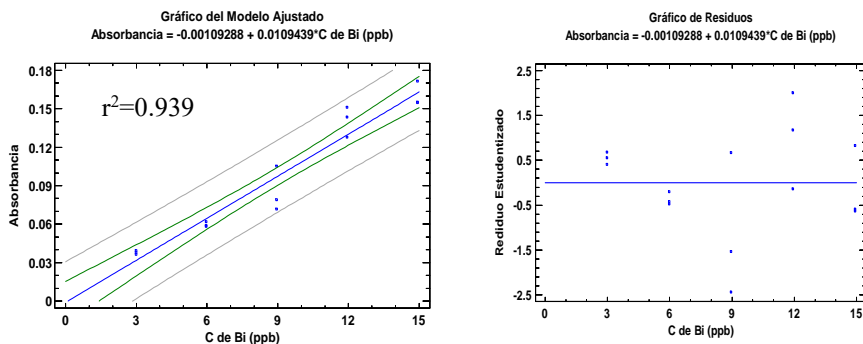
Debido a que con el método indicado por el proveedor del equipo no se obtuvieron resultados satisfactorios, se decidió realizar una investigación más detallada sobre la cuantificación de Bismuto por esta técnica.

Los cambios realizados en este trabajo se basaron en artículos que reportaban el uso espectrofotometría de absorción atómica con atomización en flama, y también para emisión y fluorescencia, así como el uso de atomización electrotérmica y plasma de acoplamiento inductivo [29, 50-57]. De la información que se consultó, la mayoría coincidía en algo, que la concentración del HCl para los sistemas y la solución ácida debía ser menor a 3 M y algunos de ellos coincidían en que 1 M era la concentración óptima [55-57]. Como tal, la primera modificación que se realizó fue la concentración de la solución ácida, de 5 M a 1 M; los sistemas se prepararon como se mostró antes en

la Tabla 3.1. Los resultados y gráficos obtenidos se muestran en la Tabla 3.3 y la Figura 3.2, en esta última se observa que, para la curva obtenida, su coeficiente de determinación ( $r^2$ ) es menor a 0.98 y que los resultados son heterocedasticos (gráfico de residuales), es decir que la dispersión no es homogénea, parámetros que se sabe son necesarios para que un método se considere preciso.

**Tabla 3.3.** Resultados obtenidos, empleando HCl 1 M como solución ácida.

Sistema	Concentración (ppb)	Absorbancia.		
1	2.98	0.0380	0.0394	0.0363
2	5.97	0.0618	0.0591	0.0584
3	8.95	0.1053	0.0791	0.0716
4	11.94	0.1512	0.1434	0.1279
5	14.92	0.1717	0.1550	0.1554



**Figura 3.2.** Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha), obtenidos utilizando HCl 1 M como solución ácida.

La heterocedasticidad de los resultados se atribuyó a que, como se menciona en la parte experimental, la solución stock se afora con  $\text{HNO}_3$  5% m/v, mientras que los sistemas de la curva se aforan con  $\text{HCl}$  1 M, así que, para cada sistema, la cantidad de stock va aumentando y por lo tanto la cantidad de  $\text{HCl}$  que se agrega va disminuyendo, por lo cual la concentración de ambos ácidos no es constante. En su momento se intentó aforar la solución stock con  $\text{HCl}$  1 M, preparando 6 sistemas y midiendo cada uno por triplicado, pero los resultados que se obtenían fueron también inconsistentes como se observa en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** Resultados obtenidos aforando Stock con  $\text{HCl}$  1 M.

Sistema	Concentración (ppb)	Absorbancia		
1	4.47	0.0436	0.0511	0.0608
2	5.97	0.0731	0.0808	0.0930
3	7.46	0.0385	0.0435	0.0595
4	8.95	0.0622	0.0669	0.0803
5	11.94	0.8071	0.8199	0.8294
6	14.92	0.1528	0.1544	0.1541

Para corregir esto los siguientes sistemas se prepararon de tal forma que la cantidad  $\text{HCl}$  para aforar fuera la misma, por lo cual se agregó  $\text{HNO}_3$  5% m/v para tener a un volumen constante de este ácido en todos los sistemas como se muestra en la Tabla 3.5.



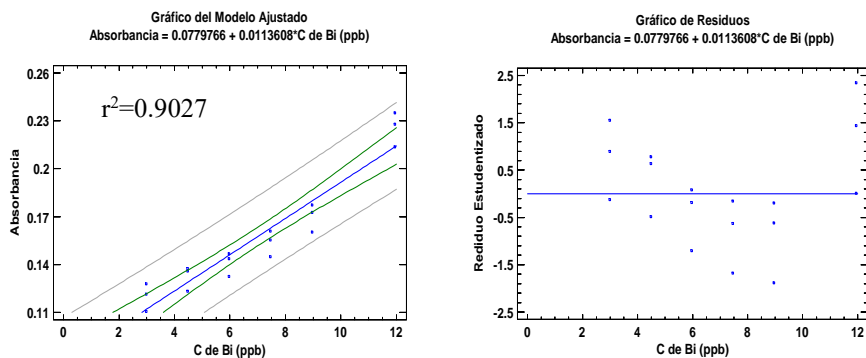
**Tabla 3.5.** Sistemas preparados manteniendo un volumen constante con HNO<sub>3</sub> y aforados con HCl 1 M (Prueba No. 1).

Sistemas	1	2	3	4	5	6
Stock (mL)	2	3	4	5	6	8
HNO <sub>3</sub> 5% (mL)	8	7	6	5	4	2
Aforo (mL)	50	50	50	50	50	50
Conc. (ppb)	2.98	4.47	5.97	7.46	8.95	11.94

Los resultados obtenidos, midiendo cada sistema por triplicado, se muestran en la Figura 3.3, donde se observa que el valor de  $r^2$ , es más bajo que el obtenido anteriormente, además que el gráfico de residuales muestra que los resultados no se ajustan al modelo lineal y que para su ajuste tal vez sería necesario agregar el término cuadrático. De igual manera en la Tabla 3.6 se observa que los valores de absorbancia que se obtienen son mayores, atribuyendo esto al HNO<sub>3</sub>.

**Tabla 3.6.** Resultados obtenidos en Prueba No. 1.

Sistema	Concentración (ppb)	Absorbancia		
1	2.98	0.1105	0.1215	0.1278
2	4.47	0.1234	0.1376	0.136
3	5.97	0.1324	0.1468	0.1436
4	7.46	0.1448	0.1555	0.1609
5	8.95	0.1602	0.1727	0.1774
6	11.94	0.2137	0.2280	0.2350



**Figura 3.3.** Curva de Calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos en Prueba No. 1.

Se realizó otra curva en donde los sistemas se llevaron al aforo con  $\text{HNO}_3$  5% m/v, sin embargo, los resultados obtenidos no fueron los esperados, como se ve en la Tabla 3.7.

**Tabla 3.7.** Resultados obtenidos aforando sistemas con  $\text{HNO}_3$ .

Sistema	Concentración (ppb)	Absorbancia		
1	2.98	1.3609	1.0649	1.2493
2	5.97	1.1148	0.1631	0.1847
3	8.95	0.8889	0.1029	0.1186
4	11.94	0.3549	0.7494	0.9406
5	14.92	0.2442	0.1254	0.1789

Ya que tampoco funcionó el aforar con  $\text{HNO}_3$  y a que en los sistemas anteriores la concentración de HCl (que era 1 M) se diluía por la cantidad de  $\text{HNO}_3$  que se agregaba a cada sistema, quedando una concentración final de 0.8 M. Los sistemas se aforaron con una solución más concentrada de HCl (1.25 M), con el fin de que esta quedará 1 M en cada sistema como se muestra en la Tabla 3.8, mientras que la concentración de  $\text{HNO}_3$  se mantuvo constante, adicionando un volumen complementario al de la solución stock de Bismuto que estaba en  $\text{HNO}_3$  5% m/v. Estos sistemas se midieron por triplicado y durante cuatro días consecutivos.

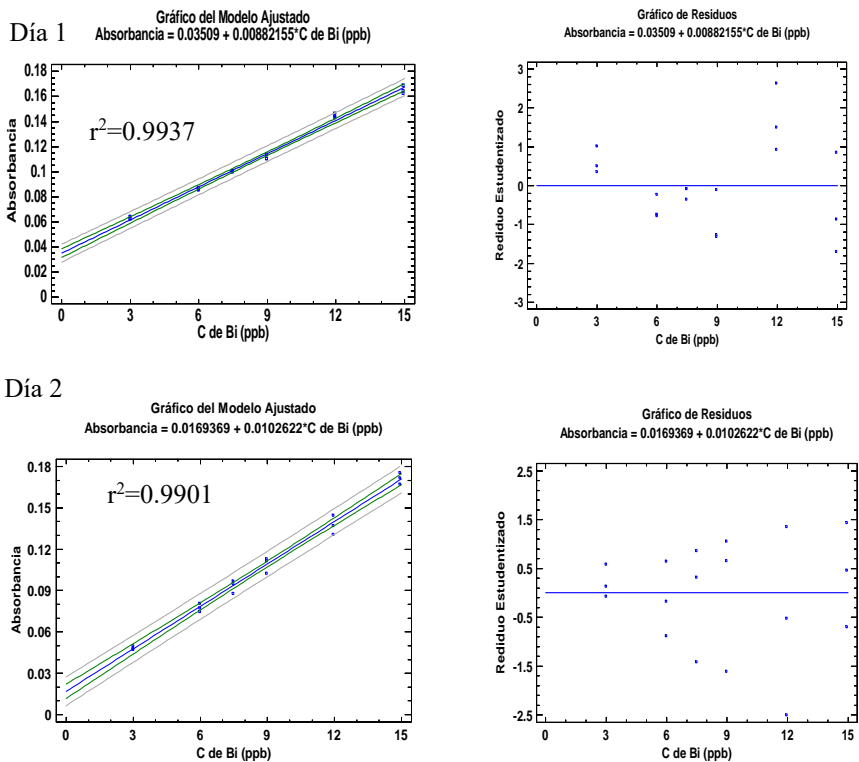
**Tabla 3.8.** Sistemas preparados manteniendo un volumen constante con  $\text{HNO}_3$  y aforados con HCl 1.25 M (Prueba No.2).

Sistemas	1	2	3	4	5	6
Stock (mL)	2	4	5	6	8	10
$\text{HNO}_3$ 5% (mL)	8	6	5	4	2	0
Aforo (mL)	50	50	50	50	50	50
Conc. (ppb)	2.98	5.97	7.46	8.95	11.94	14.92

En la Tabla 3.9 y Figura 3.4, se muestran los resultados y gráficos obtenidos, cada sistema que se midió por triplicado. Como se observa, la heterocedasticidad se conserva en el día 1 y día 2, mientras que los valores de  $r^2$  son aceptables, sin embargo, para los días 3 y 4, los resultados ya muestran homocedasticidad y disminuye el valor de  $r^2$ .

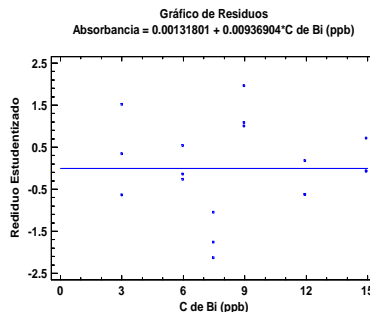
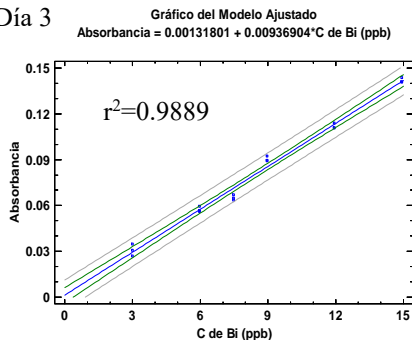
**Tabla 3.9.** Resultados obtenidos en Prueba No. 2.

Concentración (ppb)	Absorbancia (Día 1)			Absorbancia (Día 2)		
	<b>2.98</b>	0.0634	0.0628	0.0641	0.0481	0.0473
<b>5.97</b>	0.0856	0.0857	0.0871	0.0775	0.0746	0.0809
<b>7.46</b>	0.1007	0.0999	0.1007	0.0949	0.0879	0.0971
<b>8.95</b>	0.1138	0.1106	0.1255	0.1132	0.1025	0.1116
<b>11.94</b>	0.1466	0.1444	0.1430	0.1373	0.1307	0.1448
<b>14.92</b>	0.1690	0.1626	0.1645	0.1719	0.1674	0.1754
Concentración (ppb)	Absorbancia (Día 3)			Absorbancia (Día 4)		
	<b>2.98</b>	0.0269	0.0306	0.0347	0.0228	0.0250
<b>5.97</b>	0.0562	0.0594	0.0567	0.0533	0.0450	0.0431
<b>7.46</b>	0.0647	0.0671	0.0636	0.0686	0.0618	0.0599
<b>8.95</b>	0.0895	0.0892	0.0924	0.0762	0.0723	0.0685
<b>11.94</b>	0.1139	0.1107	0.1107	0.1130	0.1063	0.1041
<b>14.92</b>	0.1438	0.1409	0.1459	0.1292	0.1160	0.1150

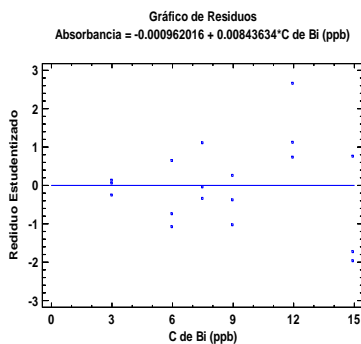
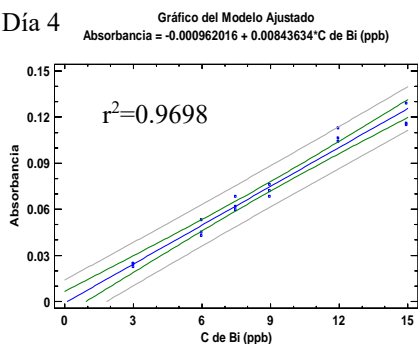


**Figura 3.4.** Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos en Prueba No. 2.

Día 3

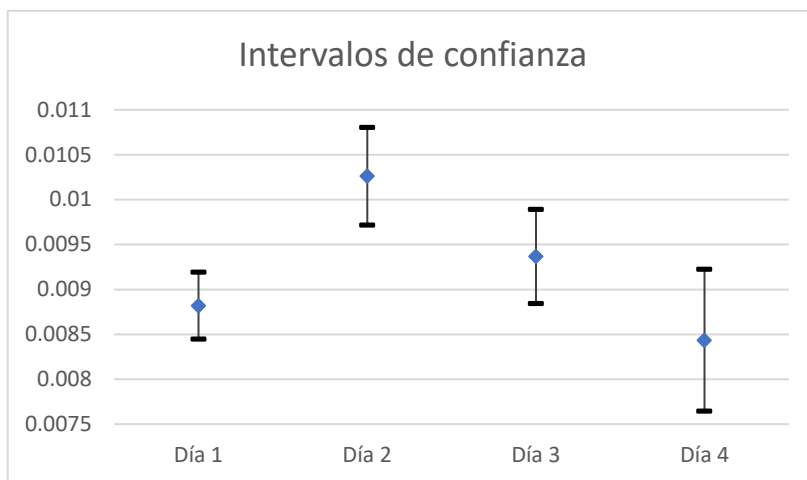


Día 4



**Figura 3.4.** Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos en Prueba No. 2 (continuación).

Se realizó una comparación de pendientes para saber si existía una diferencia significativa, entre las curvas de calibración obtenidas anteriormente, esto utilizando los intervalos de confianza de la pendiente de cada una [58]. Como se observa en la Figura 3.5, entre el día uno, tres y cuatro no existe diferencia significativa, pero si se compara el día tres y cuatro, con el dos la diferencia si es significativa.



**Figura 3.5.** Comparación de pendientes para las curvas de calibración obtenidas en la Prueba No. 2

Siendo que al parecer la presencia de  $\text{HNO}_3$  aumentaba la señal, se realizaron otras pruebas en las cuales se aumentaba el volumen de  $\text{HNO}_3$ , en cantidades extra a la que se necesitaban para tener un volumen constante en relación al stock y agregando el  $\text{HCl}$  a la concentración necesaria para que por dilución este quedara 1 M.

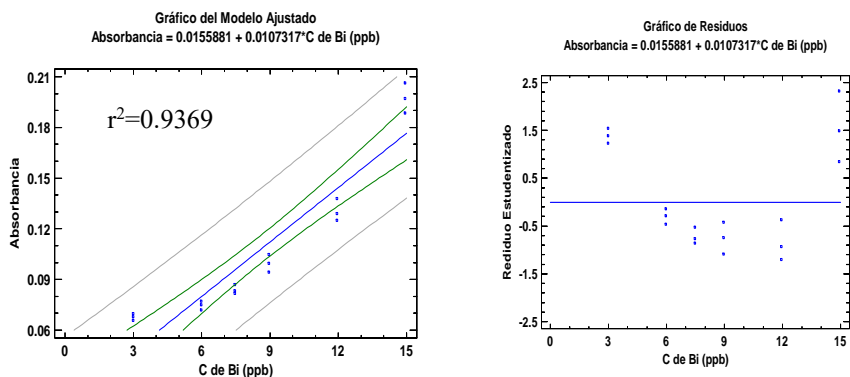
Se realizó una primera propuesta, la cual se muestra en la Tabla 3.10 donde se tenían 20 mL de  $\text{HNO}_3$  5% m/v y se aforan a 50 mL con  $\text{HCl}$  1.76 M. Los resultados se observan en la Tabla 3.11 y Figura 3.6, donde se puede ver que los datos no se ajustan al modelo lineal.

**Tabla 3.10.** Sistemas preparados manteniendo un volumen constante con HNO<sub>3</sub> y aforados con HCl 1.76 M (Prueba No. 3).

Sistemas	1	2	3	4	5	6
Stock (mL)	2	4	5	6	8	10
HNO <sub>3</sub> 5% (mL)	18	16	15	14	12	10
Aforo (mL)	50	50	50	50	50	50
Conc. (ppb)	2.98	5.97	7.46	8.95	11.94	14.92

**Tabla 3.11.** Resultados obtenidos en Prueba No. 3.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
<b>2.98</b>	0.0699	0.0679	0.0658
<b>5.97</b>	0.0773	0.075	0.0721
<b>7.46</b>	0.0871	0.0832	0.0818
<b>8.95</b>	0.1047	0.0996	0.0944
<b>11.94</b>	0.1378	0.1290	0.1251
<b>14.92</b>	0.2062	0.1970	0.1884



**Figura 3.6.** Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha), obtenidos en Prueba No. 3.



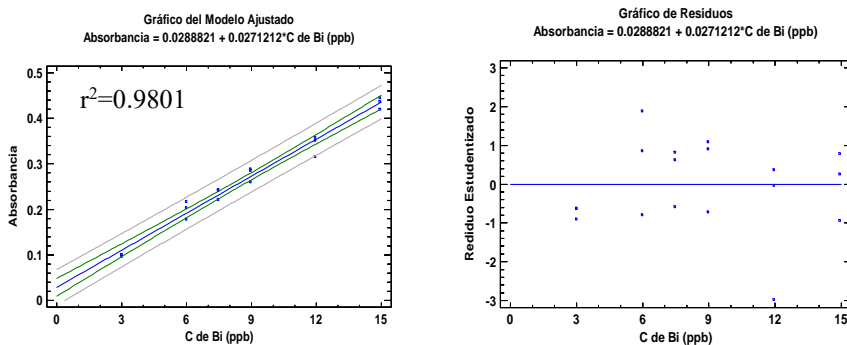
La segunda propuesta fue la que se muestra en la Tabla 3.12, donde se tenían 15 mL de  $\text{HNO}_3$  5% m/v y se aforan a 50 mL con HCl 1.44 M. En este caso, se observa en la Tabla 3.13 y en la Figura 3.7, una menor dispersión en los datos obtenidos y que se ajustan al modelo lineal.

**Tabla 3.12.** Sistemas preparados manteniendo un volumen constante con  $\text{HNO}_3$  y aforados con HCl 1.44 M (Prueba No. 4).

Sistemas	1	2	3	4	5	6
Stock (mL)	2	4	5	6	8	10
$\text{HNO}_3$ 5% (mL)	13	11	10	9	7	5
Aforo (mL)	50	50	50	50	50	50
Conc. (ppb)	2.98	5.97	7.46	8.95	11.94	14.92

**Tabla 3.13.** Resultados obtenidos en Prueba No. 4.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
<b>2.98</b>	0.1007	0.0968	0.1006
<b>5.97</b>	0.2175	0.1787	0.2041
<b>7.46</b>	0.2442	0.2221	0.2412
<b>8.95</b>	0.2885	0.2605	0.2859
<b>11.94</b>	0.3584	0.3157	0.3522
<b>14.92</b>	0.4375	0.4202	0.4451



**Figura 3.7.** Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos en Prueba No. 4.

La segunda solución Stock a partir de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de 49.07 ppb, se preparó con el fin de disminuir gasto de reactivos y aumentar el intervalo de concentraciones de la curva de calibración, en donde los sistemas se aforaron a 25 mL. Con esta solución stock solo se realizaron algunas pruebas, esperando que los resultados fueran parecidos a los que se obtuvieron con anterioridad, los sistemas se prepararon como se hizo con la 1ª solución stock, agregando  $\text{HNO}_3$  5% m/v a cada sistema para tener un volumen constante de éste y aforando con HCl de la concentración necesaria para que por dilución tuviera una concentración 1 M en cada sistema tal como se muestra en la Tabla 3.14.

Si bien los datos obtenidos, que se muestran en la Tabla 3.15, se podían utilizar para realizar una curva, los valores de absorbancia tienen una menor dispersión, comparados con los que se tienen en la Tabla 3.9 y 3.13.

**Tabla 3.14.** Sistemas preparados con solución Stock de 49.07 ppb.

Sistemas	1	2	3	4	5
Stock (mL)	1	4	6	8	10
HNO <sub>3</sub> 5% (mL)	9	6	4	2	0
Aforo (mL)	25	25	25	25	25
Conc. (ppb)	1.96	7.85	11.77	15.70	19.63

**Tabla 3.15.** Resultados obtenidos con solución Stock de 49.07 ppb.

Concentración (ppb)	Absorbancia (Día 1)			Absorbancia (Día 2)		
<b>1.96</b>	0.0442	0.0442	0.0432	0.0519	0.0482	0.0489
<b>7.85</b>	0.0513	0.0513	0.0506	0.0703	0.0668	0.0678
<b>11.77</b>	0.0611	0.0611	0.0603	0.0874	0.0800	0.0795
<b>15.70</b>	0.0803	0.0803	0.0809	0.1047	0.0990	0.0994
<b>19.63</b>	0.0987	0.0987	0.0980	0.1276	0.1257	0.1263

Esta prueba indicaba que, al aforar con HCl a cualquier volumen, no se generaban resultados reproducibles, sin embargo, a fin de descartar algún problema debido a la preparación de la solución stock a partir de la sal de Bismuto, se adquirió una solución de referencia comercial para realizar pruebas con HCl y descartar lo anterior.

### 3.1.2.- Stock a partir de una solución de referencia comercial de Bi 1000 ppm.

Al igual que antes, se realizaron dos tipos de preparación de sistemas, por un lado, se prepararon cuatro sistemas a partir de la solución de referencia comercial manteniendo a 10 mL de HNO<sub>3</sub> 5% m/v y aforando a 25 mL con HCl 1.66 M como se indica en la

Tabla 3.17. Los resultados se muestran en la Tabla 3.18, donde se observa que las señales son pequeñas y no presentan un comportamiento ascendente.

**Tabla 3.16.** Sistemas preparados a partir de solución de referencia comercial y aforados con HCl 1.66 M (Prueba No. 1A).

Sistemas	1	2	3	4
Stock (mL)	2	4	6	8
HNO <sub>3</sub> 5% (mL)	8	6	4	2
Aforo (mL)	25	25	25	25
Conc. (ppb)	4	8	12	16

**Tabla 3.17.** Resultados obtenidos en Prueba No. 1A.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
4	0.0678	0.0671	0.0679
8	0.0606	0.0596	0.0607
12	0.0562	0.0548	0.0573
16	0.0755	0.0764	0.0763

Se realizó otra prueba agregando una cantidad mayor de HNO<sub>3</sub> 5% m/v y por lo tanto un HCl más concentrado (2.5 M), con el fin de que este último quedara a una concentración 1 M como se observa en la Tabla 3.18.

**Tabla 3.18.** Sistemas preparados a partir de solución de referencia comercial y aforados con HCl 2.5 M (Prueba No. 2A).

Sistemas	1	2	3
Stock (mL)	2	4	7
HNO <sub>3</sub> 5% (mL)	13	11	8
Aforo (mL)	25	25	25
Conc. (ppb)	4	8	14

Se observan los resultados obtenidos en la Tabla 3.19, las señales son igual muy pequeñas, pero con una cierta tendencia ascendente.

**Tabla 3.19.** Resultados obtenidos en Prueba No. 2A.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
4	0.0158	0.0314	0.0231
8	0.0207	0.0509	0.0499
14	0.0303	0.0565	0.0555

Se realizaron diferentes pruebas, cambiando la concentración tanto del HCl, como la del HNO<sub>3</sub> y agregándolos en diferentes cantidades en los sistemas, buscando encontrar una concentración adecuada para ambos ácidos, que sirviera para poder construir de manera reproducible una curva de calibración, pero se siguieron obteniendo resultados parecidos a los expuestos con anterioridad. En la Sección 3.4 se explica de manera detallada el porque tal vez no se obtuvieron los resultados esperados con HCl.

Debido a lo anterior se propuso entonces el realizar pruebas con otros ácidos, basados en los artículos consultados. Con esto también se buscaba, que el ácido que se seleccionara sirviera para aforar la solución stock y los sistemas.

### 3.2.- Evaluación de diferentes medios ácidos para aforar los sistemas de la curva de calibración.

Para estas pruebas el volumen de aforo de los sistemas se mantuvo de 25 mL y solo se prepararon tres sistemas, con el fin de evitar un gasto excesivo de reactivos y cada sistema se midió por triplicado. Cada ácido que se probó se utilizó para aforar la solución stock, los sistemas y como solución ácida.

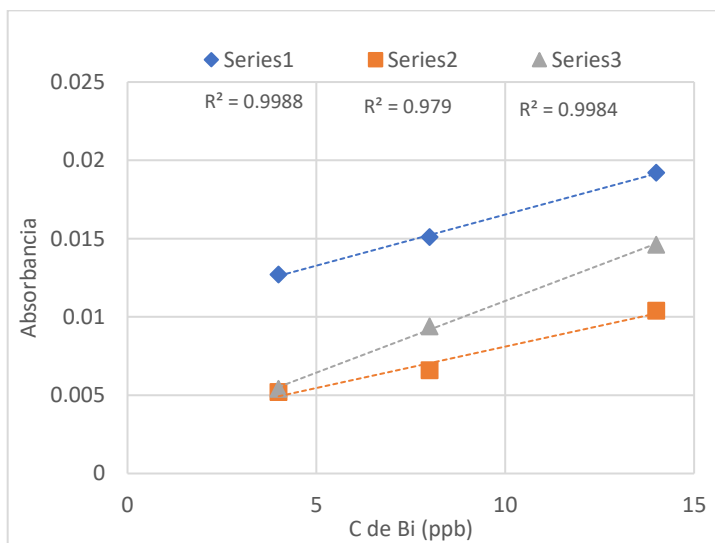
**Tabla 3.20.** Preparación general de los sistemas para evaluar diferentes ácidos.

Sistemas	1	2	3
Stock (mL)	2	4	7
Aforo (mL)	25	25	25
Conc. (ppb)	4	8	14

En total se probaron cinco ácidos, dos de ellos se escogieron de manera arbitraria de uno de los artículos consultados [29], estos fueron Ácido Fórmico y Sulfúrico, preparándose a una concentración 1 M, mientras que los otros tres se escogieron basados otra referencia [55], estos fueron Ácido Oxálico, Tartárico y Cítrico, a la concentración que indicaba el artículo, 0.08 M, 0.5 M y 0.5 M, respectivamente. Los resultados se muestran a continuación en las Tablas 3.21 a 3.25 y Figuras 3.8 a 3.12.

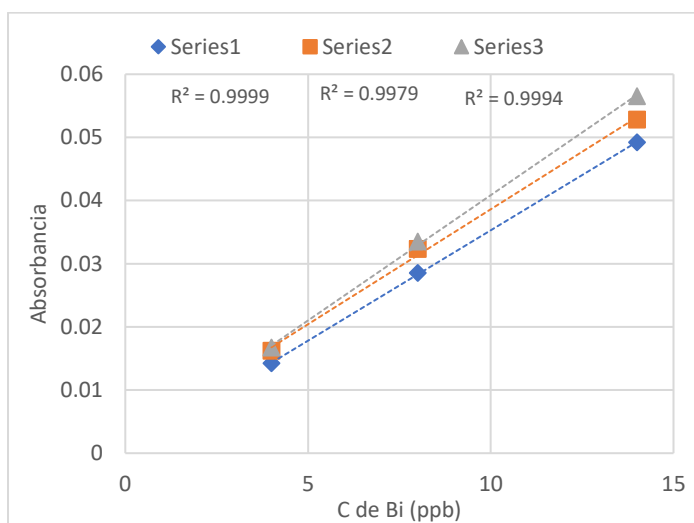
**Tabla 3.21.** Resultados obtenidos aforando con Ácido Fórmico 1 M.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
4	0.0127	0.0052	0.0054
8	0.0151	0.0066	0.0094
14	0.0192	0.0104	0.0146

**Figura 3.8.** Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Fórmico 1 M.

**Tabla 3.22.** Resultados obtenidos aforando con Ácido Oxálico 0.08 M.

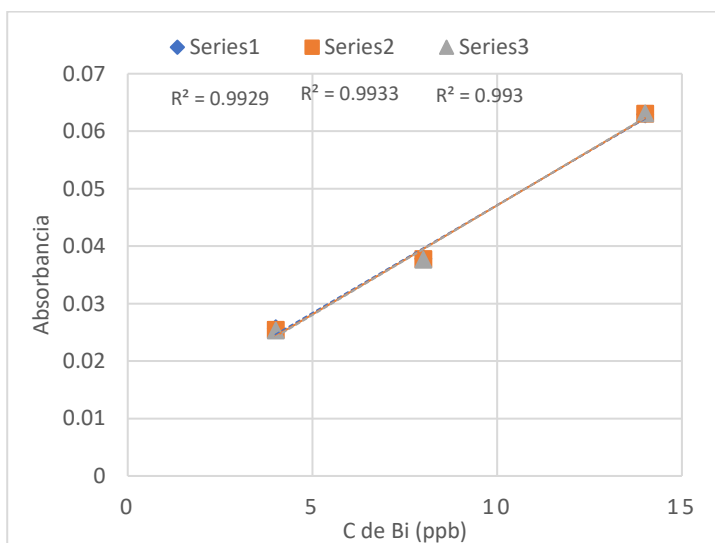
Concentración (ppb)	Absorbancia		
4	0.0142	0.0162	0.0167
8	0.0285	0.0323	0.0335
14	0.0492	0.0528	0.0565

**Figura 3.9.** Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Oxálico 0.08 M.



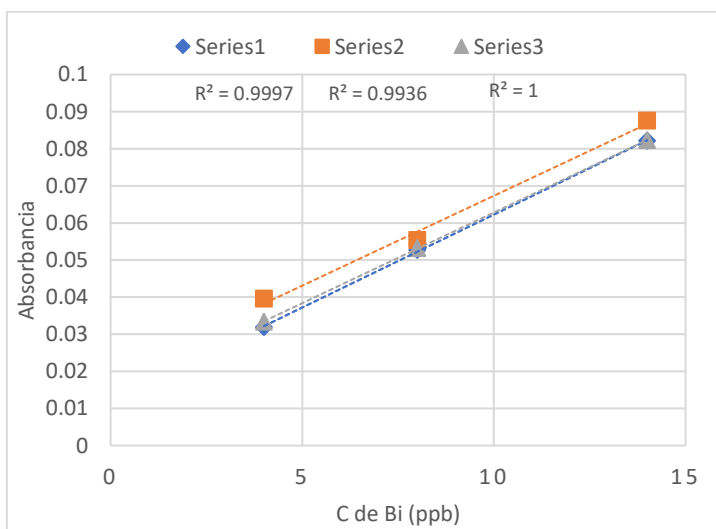
**Tabla 3.23.** Resultados obtenidos aforando con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
4	0.0257	0.0299	0.0265
8	0.0378	0.0434	0.0382
14	0.0629	0.0690	0.0628

**Figura 3.10.** Curvas de calibración obtenidas aforando con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.

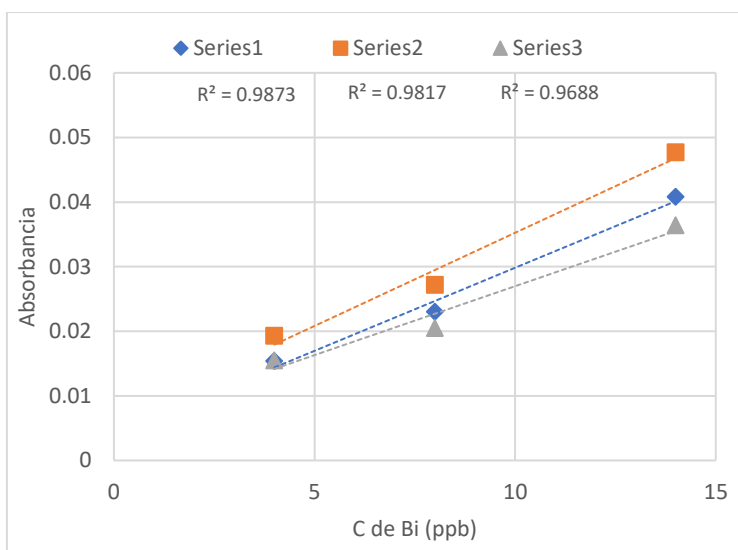
**Tabla 3.24.** Resultados obtenidos aforando con Ácido Cítrico 0.5 M.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
4	0.0319	0.0306	0.0312
8	0.0527	0.0544	0.0566
14	0.0821	0.0876	0.0885

**Figura 3.11.** Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Cítrico 0.5 M.

**Tabla 3.25.** Resultados obtenidos aforando con Ácido Tartárico 0.5 M.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
4	0.0154	0.0193	0.0155
8	0.0230	0.0272	0.0205
14	0.0408	0.0477	0.0364

**Figura 3.12.** Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Tartárico 0.5 M.

En general se observa que las señales son bajas en relación a las reportadas en el manual del equipo [32] y con algunas obtenidas con HCl, siendo el Ácido Cítrico el que

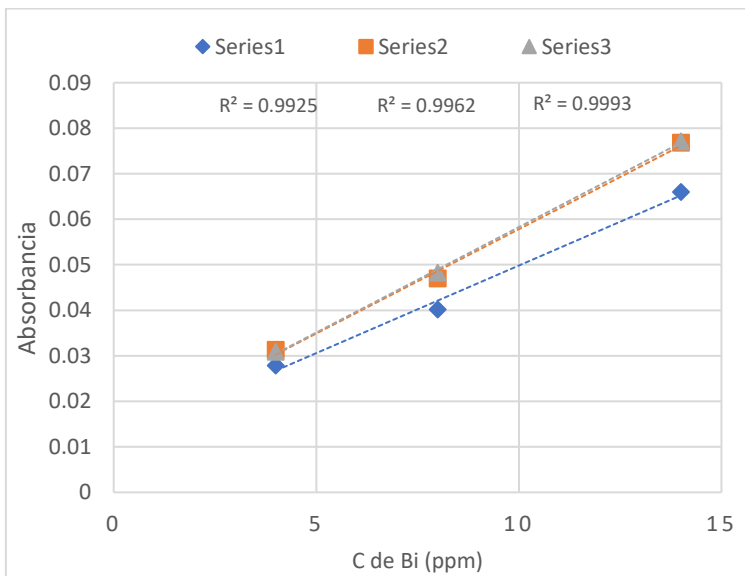
presentó las señales más altas. En la mayoría de los casos, se observan valores similares de absorbancia entre las diferentes mediciones. Al construir las curvas de calibración y obtener coeficientes de determinación ( $r^2$ ) mayores a 0.98, se decidió seguir realizando pruebas con los mismos, pero ahora modificando la concentración del Borohidruro de Sodio.

### 3.3.- Evaluación con diferentes medios ácidos empleando $\text{NaBH}_4$ 0.35%.

Retomando el artículo mencionado [55], se evaluó modificar la concentración del reductor, disminuyéndola a 0.35%, m/v, en lo que refiere a la concentración de NaOH esta no se modificó, se mantuvo al 0.5% m/v. Hasta el momento todas pruebas se realizaron utilizando una concentración 0.6% m/v para el Borohidruro; se decidió realizar este cambio para ver si se obtenían señales más altas. Como tal se probaron nuevamente Ácido Oxálico, Sulfúrico, Cítrico y Tartárico, el Fórmico se descartó ya que no dio señales parecidas entre diferentes mediciones en las pruebas anteriores. Los sistemas se prepararon igual que como se indicó en la Tabla 3.20. Los resultados se muestran en las Tablas 3.26 a 3.29 y de la Figuras 3.13 a 3.16.

**Tabla 3.26.** Resultados obtenidos con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M y  $\text{NaBH}_4$  0.35%.

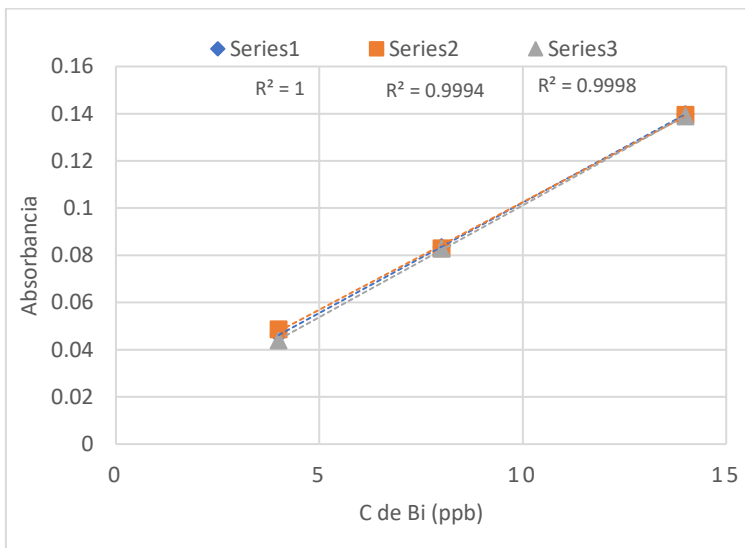
Concentración (ppb)	Absorbancia		
4	0.0279	0.0313	0.0309
8	0.0402	0.0470	0.0483
14	0.0660	0.0768	0.0771



**Figura 3.13.** Curvas de calibración obtenidas con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M y  $\text{NaBH}_4$  0.35%.

**Tabla 3.27.** Resultados obtenidos con Ácido Oxálico 0.08 M y  $\text{NaBH}_4$  0.35%.

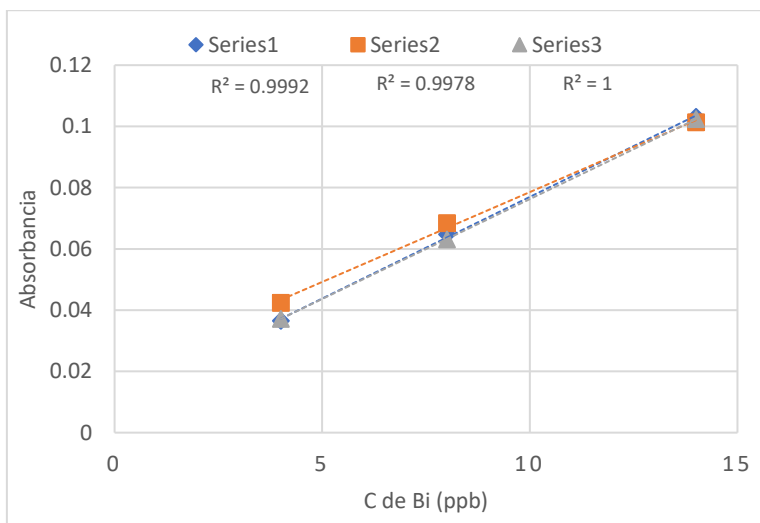
Concentración (ppb)	Absorbancia		
	4	0.0463	0.0486
8	0.0835	0.0830	0.0829
14	0.1398	0.1395	0.1388



**Figura 3.14.** Curvas de calibración obtenidas con Ácido Oxálico 0.08 M y  $\text{NaBH}_4$  0.35%.

**Tabla 3.28.** Resultados obtenidos con Ácido Cítrico 0.5 M y  $\text{NaBH}_4$  0.35%.

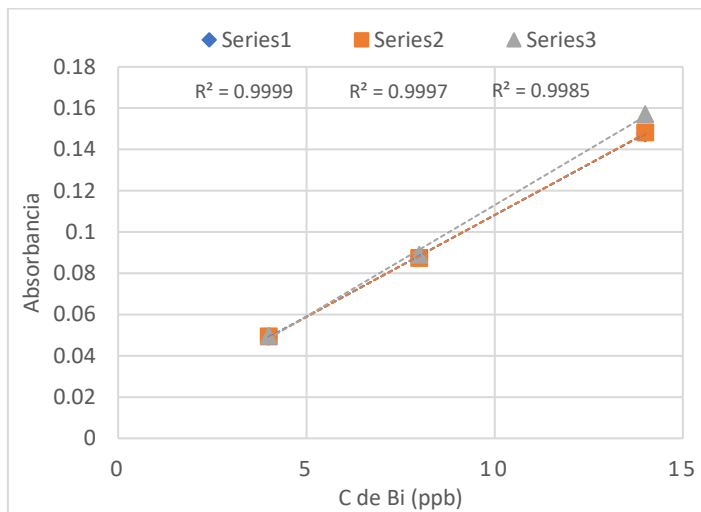
Concentración (ppb)	Absorbancia		
	4	0.0365	0.0424
8	0.0648	0.0684	0.0631
14	0.1031	0.1014	0.1024



**Figura 3.15.** Curvas de calibración obtenidas con Ácido Cítrico 0.5 M y  $\text{NaBH}_4$  0.35%.

**Tabla 3.29.** Resultados obtenidos con Ácido Tartárico 0.5 M y  $\text{NaBH}_4$  0.35%.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
4	0.0493	0.0494	0.0498
8	0.0880	0.0875	0.0890
14	0.1478	0.1482	0.1571



**Figura 3.16.** Curvas de calibración obtenidas con Ácido Tartárico 0.5 M y NaBH<sub>4</sub> 0.35%.

Disminuir la concentración de NaBH<sub>4</sub> de 0.6% al 0.35% m/v, tuvo un efecto positivo en los valores de absorbancia y de igual manera se seguían obteniendo valores de  $r^2$  mayores a 0.98. El único ácido que no mostro cambios significativos fue el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Se cree que en el caso del Ácido Fórmico no dio buenos resultados debido a que este es considerado un ácido débil ( $pK_a = 3.75$ ) [59] y ya que se sabe que el Bi se hidroliza a pH's mayores a 1.51 [3], puede que este ácido no tenga un pH menor a este y por lo tanto afecte a la formación del hidruro volátil. El H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en su caso, a pesar de ser un ácido fuerte, las señales que se obtienen son muy pequeñas, inclusive después de



cambiar la concentración de  $\text{NaBH}_4$ , en este caso se puede deber a que este ácido se considera un oxidante fuerte, si bien no por la presencia de iones  $\text{SO}_4^{2-}$ , si por la presencia de  $\text{SO}_3$  [60].

### 3.4.- Construcción de curvas de calibración con Ácido Cítrico y Tartárico.

El empleo de los Ácidos Oxálico, Tartárico y Cítrico fueron los que presentaron las absorbancias más altas con el cambio en la concentración del  $\text{NaBH}_4$ . El Ácido Oxálico se descartó ya que no dio resultados reproducibles al medir por segunda vez la curva.

Como las pruebas anteriores se habían hecho sólo con tres sistemas, se decidió para el Ácido Cítrico y Tartárico, realizar una curva de calibración preparando seis sistemas, como se indica en la Tabla 3.30 y midiendo cada uno por triplicado, y en días diferentes.

**Tabla 3.30.** Preparación de sistemas para Ácido Cítrico y Tartárico.

Sistemas	1	2	3	4	5	6
Stock (mL)	1	2	3	5	6	7
Aforo (mL)	25	25	25	25	25	25
Conc. (ppb)	2	4	6	10	12	14

En el caso del Ácido Cítrico los valores de  $r^2$  que se obtienen son mayores a 0.98, como se ve en la Tabla 3.31 y Figura 3.17, mientras que para el Ácido Tartárico pasa lo contrario los valores de  $r^2$  son menores a 0.98, pero las señales de absorbancia que se obtienen son mayores como se muestra en la Tabla 3.32 y Figura 3.18.

Tabla 3.31. Resultados obtenidos para las curvas de Ácido Cítrico.

Concentración (ppb)	Absorbancia (Día 1)			Absorbancia (Día 2)		
2	0.0162	0.0157	0.0167	0.0415	0.0414	0.417
4	0.0310	0.0341	0.0315	0.0539	0.0541	0.0533
6	0.0470	0.0505	0.0454	0.0763	0.0745	0.0748
10	0.0969	0.0976	0.0935	0.1223	0.1215	0.1201
12	0.1009	0.1010	0.1015	0.1457	0.1465	0.1462
14	0.1152	0.1187	0.1164	0.1697	0.1680	0.1669

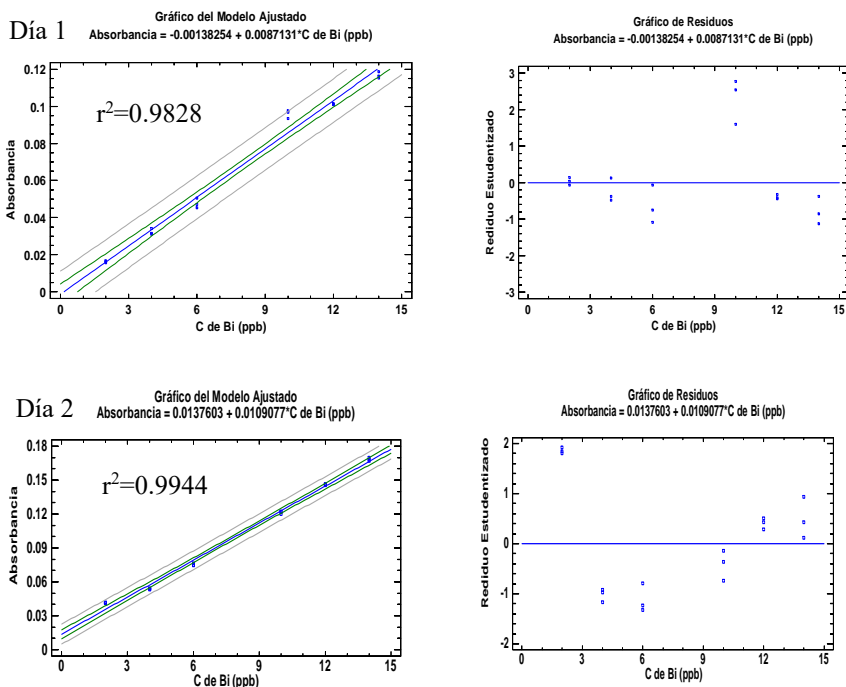


Figura 3.17. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos con Ácido Cítrico.

Tabla 3.32. Resultados obtenidos para las curvas de Ácido Tartárico.

Concentración (ppb)	Absorbancia (Día 1)			Absorbancia (Día 2)		
	2	0.0159	0.0267	0.0338	0.0269	0.0224
4	0.0290	0.0459	0.0586	0.0465	0.0453	0.0619
6	0.0505	0.0749	0.0859	0.0629	0.0655	0.0788
10	0.1073	0.1263	0.1490	0.1076	0.1175	0.1282
12	0.1372	0.1578	0.1869	0.1354	0.1419	0.1662
14	0.1746	0.1865	0.2168	0.1501	0.1693	0.2064

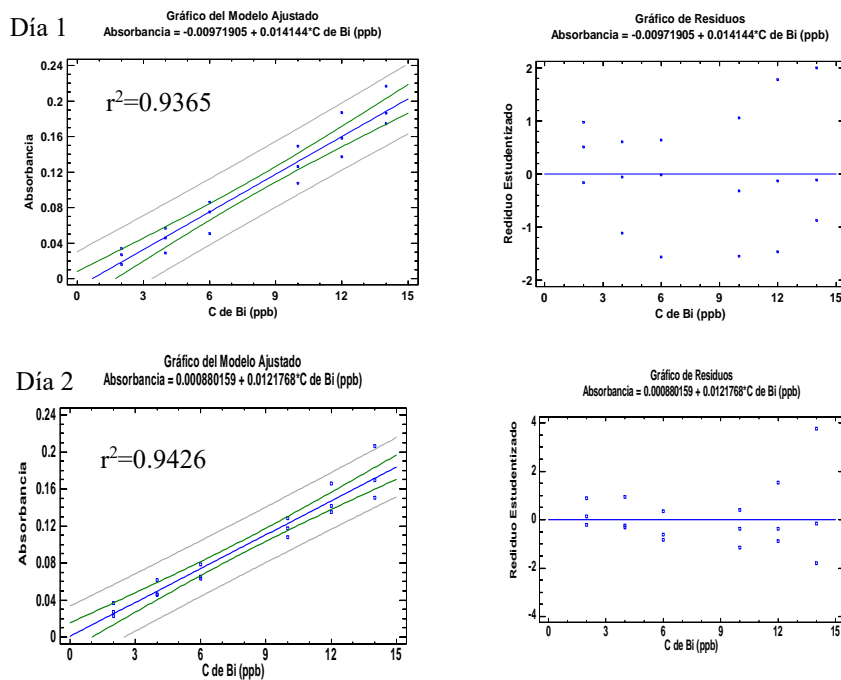


Figura 3.18. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha) obtenidos con Ácido Tartárico.

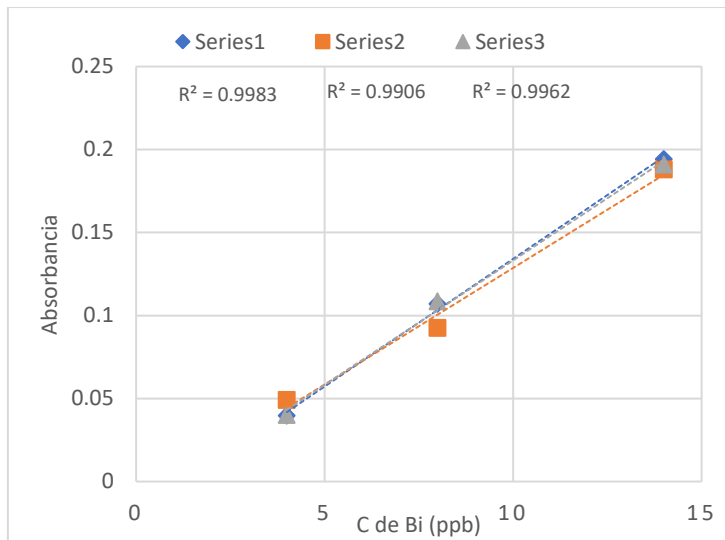
Dados los resultados obtenidos, se seleccionó al Ácido Tartárico para aforar los sistemas y emplearlo como solución ácida durante la medición, porque presentó los resultados más repetibles al momento, más adelante se mostrarán los estudios de repetibilidad y la estadística asociada, en la Sección 3.6.

### 3.5.- Evaluación con Ácido Tartárico a diferentes concentraciones.

Aunque se había decidido que el Ácido Tartárico 0.5 M era el que presentaba los mejores resultados para realizar la determinación de Bismuto, se realizaron algunas pruebas con este mismo ácido a diferentes concentraciones para ver si había un cambio significativo en las señales que se obtenían. Se probó una concentración de 0.75 M, los resultados se encuentra en la Tabla 3.33 y Figura 3.19, y 0.25 M los resultados se pueden ver en la Tabla 3.34 y Figura 3.20, preparando solo tres sistemas y midiéndolos por triplicado.

**Tabla 3.33.** Resultados obtenidos aforando con Ácido Tartárico 0.75 M.

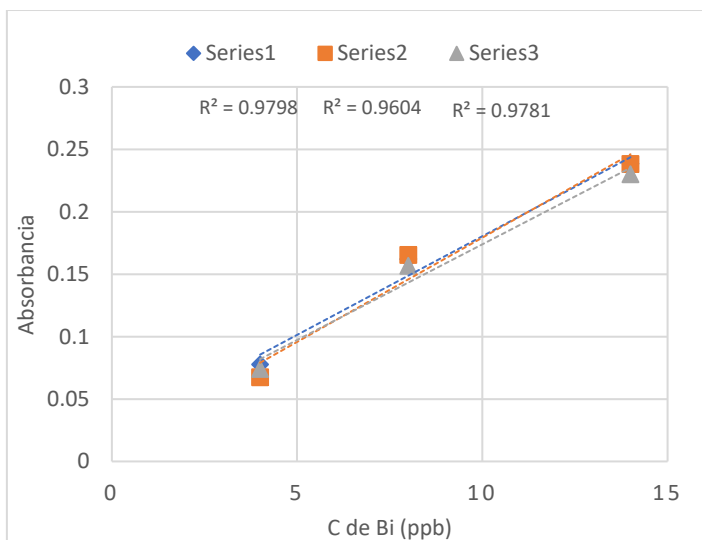
Concentración (ppb)	Absorbancia		
4	0.0397	0.0492	0.0401
8	0.1071	0.0927	0.1086
14	0.1942	0.1880	0.1910



**Figura 3.19.** Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Tartárico 0.75 M.

**Tabla 3.34.** Resultados obtenidos aforando con Ácido Tartárico 0.25 M.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
<b>4</b>	0.0777	0.0673	0.0740
<b>8</b>	0.1619	0.1654	0.1565
<b>14</b>	0.2384	0.2382	0.2299



**Figura 3.20.** Curvas de calibración obtenidas aforando con Ácido Tartárico 0.25M.

Como se puede observar, las señales que se obtienen para la concentración de 0.25 y 0.75 M, no varían mucho en comparación con el Ácido Tartárico 0.5 M. Se realizó una curva de calibración con Ácido Tartárico 0.25 M, con seis puntos, pero las señales descendían a veces en algunos puntos, provocando que se traslaparan algunos puntos, como se ve en la Tabla 3.35, por lo que se eligió seguir con la concentración 0.5 M.

**Tabla 3.35.** Resultados obtenidos para curva de calibración con Ácido Tartárico 0.25 M.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
2	0.0106	0.0260	0.0238
4	0.0340	0.0487	0.0453
6	0.0757	0.0866	0.0695
8	0.1203	0.1153	0.0907
10	0.1272	0.1403	0.1149
12	0.1775	0.1884	0.1703
14	0.1972	0.1933	0.1659

### 3.6.- Evaluación estadística a las condiciones óptimas seleccionadas.

Después de todos los estudios anteriores se seleccionaron las siguientes condiciones como las óptimas:

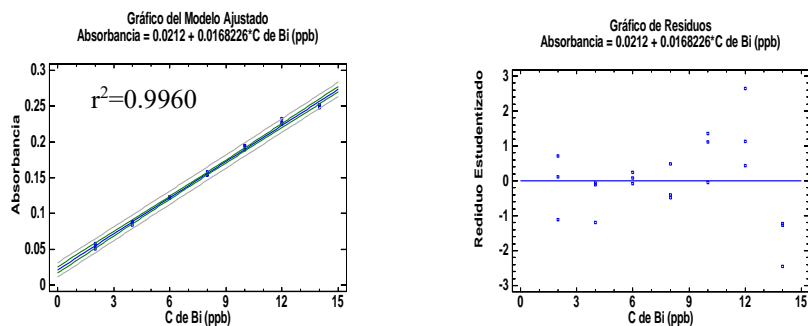
- ✓ Reductor:  $\text{NaBH}_4$  0.35% m/v en NaOH 0.5% m/v.
- ✓ Solución ácida: Ácido tartárico 0.5 M.
- ✓ Solución para aforar sistemas: Ácido tartárico 0.5 M.
- ✓ Volumen de aforo: 25 mL.
- ✓ Intervalo de concentración de la curva de calibración: 2 a 14 ppb.

### 3.6.1.- Linealidad del sistema.

Se prepararon siete sistemas para comprobar la linealidad del sistema, cada uno se midió por triplicado, los resultados se muestran en la Tabla 3.36 y Figura 3.21.

**Tabla 3.36.** Resultados obtenidos para linealidad del sistema.

Concentración (ppb)	Absorbancia		
2	0.0553	0.0577	0.0504
4	0.0882	0.088	0.0836
6	0.1232	0.1225	0.1218
8	0.1579	0.1540	0.1537
10	0.1892	0.1950	0.1941
12	0.2249	0.2277	0.2326
14	0.2517	0.2519	0.2480



**Figura 3.21.** Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha), obtenidos para Linealidad del Sistema.



Se calcularon los parámetros estadísticos que sugiere la guía de validación de métodos editada por el Colegio Nacional de QFB, para un nivel de confianza de 95% (las fórmulas se muestran en el Anexo 6.2) [48]. Los criterios de aceptación para la Linealidad del Sistema son los siguientes:

- $r^2 \geq 0.98$
- $IC(\beta_1)$ , no debe incluir cero.

Como se puede observar en la Tabla 3.37 se cumplen los parámetros en las especificaciones marcadas, donde el valor de  $r^2$  es mayor 0.98 y el intervalo de confianza de la pendiente no incluye cero. Valores que indican que existe una relación lineal entre la concentración y la respuesta analítica.

**Tabla 3.37.** Valores obtenidos para comprobar linealidad del sistema.

Datos estadísticos de la recta	
Pendiente ( $b_1$ )	0.0168
Ordenada al origen ( $b_0$ )	0.0212
Coefficiente de correlación ( $r$ )	0.9962
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0.9960
Desviación estándar de la recta ( $S_{y/x}$ )	$4.344 \times 10^{-3}$
Desviación estándar de la pendiente ( $S_{b1}$ )	$2.37 \times 10^{-4}$
Intervalo de confianza para la pendiente ( $IC(\beta_1)$ )	0.0163, 0.0173

### 3.6.2.- Precisión del sistema.

Se prepararon dos sistemas a la concentración de ocho ppb y se midieron en total tres veces cada uno utilizando la curva anterior, con el fin de determinar la precisión del

sistema, los resultados se muestran en la Tabla 3.38. El criterio de aceptación para este parámetro es el siguiente:

$$- \%C.V. \leq 1.5$$

Por lo tanto, se cumple con este parámetro, ya que el obtenido es menor.

**Tabla 3.38.** Valores obtenidos para comprobar precisión del sistema.

Absorbancia de sistema de 8 ppb	
1	0.1561
2	0.1563
3	0.1559
4	0.1548
5	0.1539
6	0.1538
<b>Media</b>	0.1551
<b>Desviación estándar</b>	0.0011
<b>%C.V.</b>	0.7230

### 3.6.3.- Repetibilidad del sistema diferentes días.

Se realizó la comparación de dos curvas de calibración obtenidas utilizando el mismo equipo diferentes días, con el fin de determinar la repetibilidad del sistema. Esto se realizó preparando seis sistemas y midiendo cada uno por triplicado los resultados se muestran en la Tabla 3.39 y Figura 3.22.

Tabla 3.39. Resultados obtenidos para repetibilidad del sistema en días diferentes.

Concentración (ppb)	Absorbancia (Día 1)			Absorbancia (Día 2)		
2	0.0432	0.0477	0.0521	0.0266	0.0277	0.0239
4	0.0697	0.0811	0.0785	0.0547	0.0561	0.058
6	0.1155	0.1124	0.1037	0.0923	0.0905	0.0949
10	0.1675	0.1749	0.1716	0.1568	0.1526	0.1573
12	0.2252	0.2124	0.2244	0.1731	0.1777	0.1786
14	0.2475	0.2340	0.2438	0.2159	0.2197	0.2203

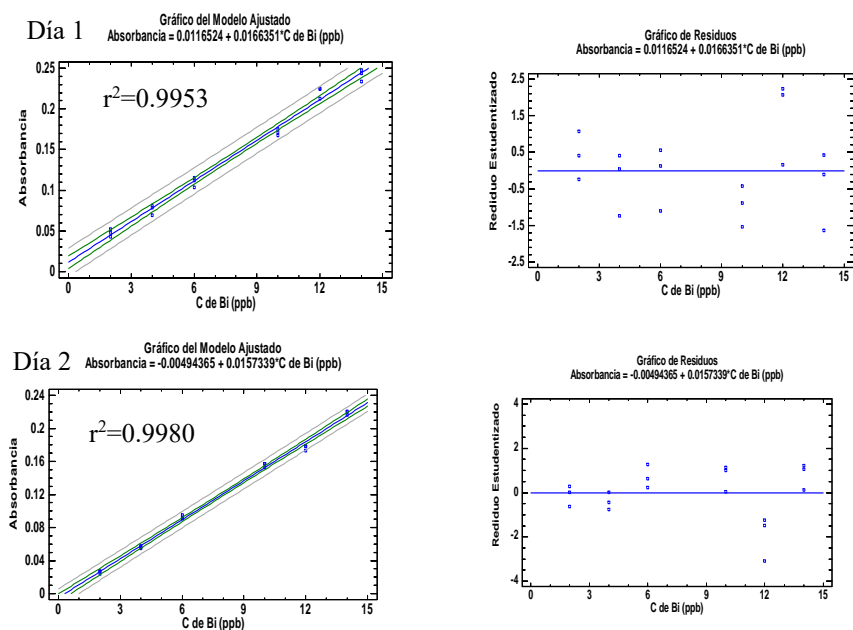


Figura 3.22. Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha), obtenidos para repetibilidad del sistema en días diferentes.

El análisis estadístico se realizó tal como indica una de las referencias [58], planteando las siguientes hipótesis:

<p>1ª Hipótesis</p> <p>H<sub>0</sub>: Las varianzas de los residuales se consideran iguales</p> <p>H<sub>1</sub>: Las varianzas de los residuales se consideran diferentes</p> <p>Criterio de aceptación:</p> <p>Si <math>F_c &lt; F_\alpha</math> se acepta H<sub>0</sub></p> <p>Si <math>F_c &gt; F_\alpha</math> se rechaza H<sub>0</sub></p>
<p>2ª Hipótesis</p> <p>H<sub>0</sub>: No existen diferencias significativas entre las pendientes de diferentes días</p> <p>H<sub>1</sub>: Existen diferencias significativas entre las pendientes de diferentes días</p> <p>Criterio de aceptación:</p> <p>Si <math>t_c &lt; t_\alpha</math> se acepta H<sub>0</sub></p> <p>Si <math>t_c &gt; t_\alpha</math> se rechaza H<sub>0</sub></p>

En la Tabla 3.40 se observan los valores obtenidos para  $F_c$  y  $t_c$ , las fórmulas que se utilizaron para calcularlos se muestran en el Anexo 6.2. También se muestran los valores de  $F_\alpha$  y  $t_\alpha$ , los cuales se tomaron de tablas, para un nivel de significancia de 0.05. Para la 1ª hipótesis, se acepta H<sub>0</sub>, en este caso solo nos indica cómo se debe calcular el valor de t. Para la segunda hipótesis también se acepta H<sub>0</sub>, con esta se concluye que no existen diferencias significativas entre las pendientes determinadas en dos días diferentes.

**Tabla 3.40.** Valores obtenidos para comprobar repetibilidad entre diferentes días.

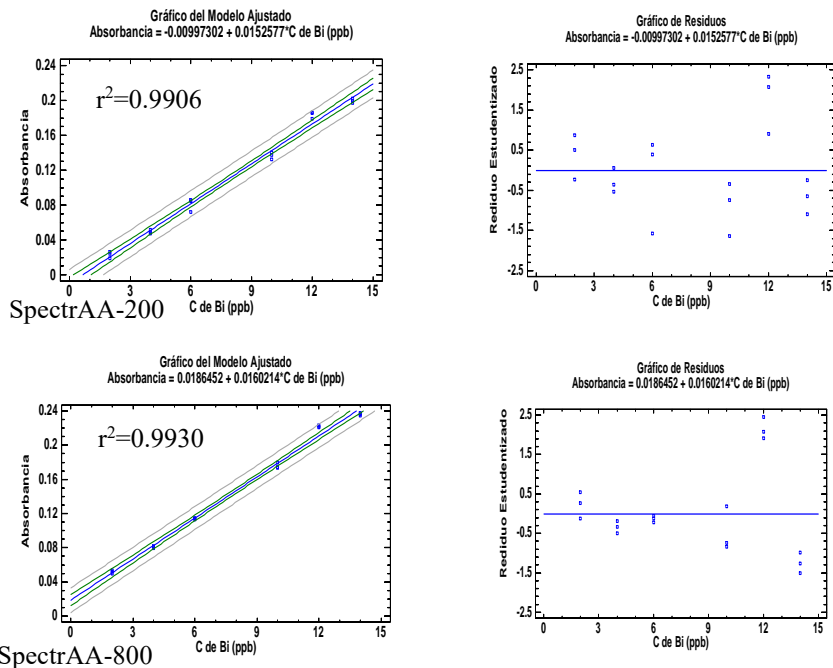
Valores calculados.		
<b>Varianza de las pendientes</b>	(Día 1) $2.066 \times 10^{-5}$	(Día 2) $5.433 \times 10^{-5}$
<b>F</b>	$F_{\alpha} = 2.72$	$F_c = 0.3803$
<b>Varianza común</b>	$3.7494 \times 10^{-5}$	
<b>t</b>	$t_{\alpha} = 2.048$	$t_c = 1.9076$

### 3.6.4.- Repetibilidad del sistema en diferentes equipos.

De igual manera se prepararon seis sistemas y se midió cada uno por triplicado, en diferentes equipos, los resultados se muestran en la Tabla 3.41 y Figura 3.23. También se realizó un análisis estadístico de los sistemas, para conocer su reproducibilidad en dos diferentes equipos.

**Tabla 3.41.** Resultados obtenidos para repetibilidad del sistema en equipos diferentes.

Concentración (ppb)	Absorbancia (SpectrAA-200)			Absorbancia (SpectrAA-800)		
	<b>2</b>	0.0191	0.0238	0.0260	0.0522	0.0538
<b>4</b>	0.0514	0.0475	0.0487	0.0798	0.0816	0.0807
<b>6</b>	0.0858	0.0717	0.0842	0.1134	0.1144	0.1140
<b>10</b>	0.1376	0.1403	0.1324	0.1744	0.1800	0.1738
<b>12</b>	0.1864	0.1853	0.1790	0.2219	0.2212	0.2233
<b>14</b>	0.2020	0.1969	0.1995	0.2348	0.2374	0.2360



**Figura 3.23.** Curva de calibración (izquierda) y gráfico de residuales (derecha), obtenidos para repetibilidad del sistema en equipos diferentes.

Al igual que en el análisis anterior se plantean las siguientes hipótesis:

1ª Hipótesis

$H_0$ : Las varianzas de los residuales se consideran iguales

$H_1$ : Las varianzas de los residuales se consideran diferentes

Criterio de aceptación:

Si  $F_c < F_\alpha$  se acepta  $H_0$

Si  $F_c > F_\alpha$  se rechaza  $H_0$

2ª Hipótesis

$H_0$ : No existen diferencias significativas entre las pendientes de diferentes equipos

$H_1$ : Existen diferencias significativas entre las pendientes de diferentes equipos

Criterio de aceptación:

Si  $t_c < t_\alpha$  se acepta  $H_0$

Si  $t_c > t_\alpha$  se rechaza  $H_0$

En la Tabla 3.42 se observan los valores obtenidos para F y t, calculados y reportados en tablas para un nivel de significancia de 0.05. En este caso también se acepta  $H_0$ , para ambas hipótesis, de tal manera que no existe una diferencia significativa entre las determinadas en dos equipos diferentes.

**Tabla 3.42.** Valores obtenidos para comprobar repetibilidad en diferentes equipos

Valores calculados.		
<b>Varianza de las pendientes</b>	(Eq 1) $3.7617 \times 10^{-5}$	(Eq 2) $4.6374 \times 10^{-5}$
<b>F</b>	$F_{\alpha} = 2.72$	$F_c = 1.2328$
<b>Varianza común</b>	$2.4997 \times 10^{-5}$	
<b>t</b>	$t_{\alpha} = 2.048$	$t_c = 1.5275$

Tanto con la comparación de pendientes entre diferentes días y también en diferentes equipos, se comprobó la repetibilidad del sistema, utilizando Ácido Tartárico 0.5 M.

### 3.6.5.- Aplicabilidad del método en muestras de plasma de equino.

Se determinó la aplicabilidad del método desarrollado empleando muestras de plasma de equino. Para ello, se emplearon las condiciones ya reportadas [49] para la digestión ácida asistida por microondas para plasma, este método está validado para la determinación de Selenio (Se), un metal volátil, mediante EAA-GH. Las muestras de plasma se fortificaron con Bismuto en tres niveles de concentración. Cabe aclarar que se tuvo que evaporar la solución obtenida después de la digestión, hasta aproximadamente 5 mL, a fin de poder aforar los sistemas con Ácido Tartárico y obtener una concentración de 0.5 M.

En la Tabla 3.43 se observan los resultados obtenidos, para los tres sistemas de cada nivel de concentración que se midieron por triplicado, de los nueve resultados obtenidos se determinó el porcentaje de recuperación y a este último se le determino el coeficiente de variación.



**Tabla 3.43.** Bismuto determinado en las muestras fortificadas de plasma de equino.

Sistema	Bi Adicionado (ppb)	Bi Recuperado (ppb)	% Recobro	Promedio / %C.V.
1	4	5.49	137.25	140.25% 6.84
1	4	5.32	133.00	
1	4	5.55	138.75	
1	4	5.2	130.00	
1	4	5.3	132.50	
1	4	5.37	134.25	
1	4	5.88	147.00	
1	4	6.13	153.25	
1	4	6.25	156.25	
2	8	8.63	107.88	104.25% 3.90
2	8	8.57	107.12	
2	8	8.67	108.38	
2	8	8.24	103.00	
2	8	8.47	105.88	
2	8	8.53	106.62	
2	8	7.75	96.88	
2	8	8.29	103.62	
2	8	7.91	98.88	
3	14	13.91	99.36	100.75% 1.81
3	14	13.93	99.50	
3	14	14.08	100.57	
3	14	14.12	100.86	
3	14	13.88	99.14	
3	14	14.16	101.14	
3	14	14.55	103.93	
3	14	14.47	103.36	
3	14	13.85	98.93	

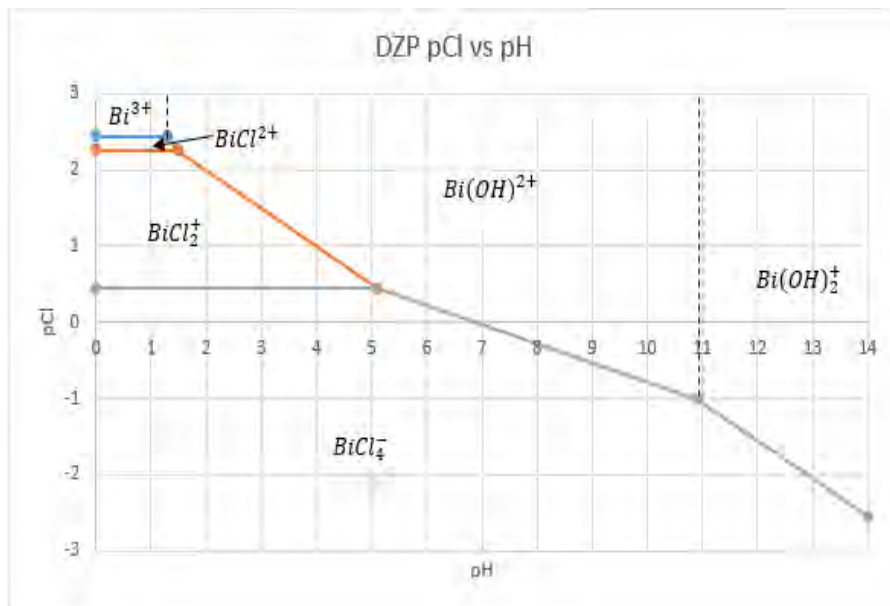
Los coeficientes de variación determinados son menores al 10% y son aceptables según la guía VICH y una guía para la validación de métodos bioanalíticos [61-62], las cuales

también mencionan que, para un análisis de muestras biológicas, es más importante la precisión de los datos obtenidos, que la exactitud.

En resumen, se puede decir que las condiciones óptimas seleccionadas permiten la determinación adecuada y reproducible de Bismuto en muestras de plasma de equino.

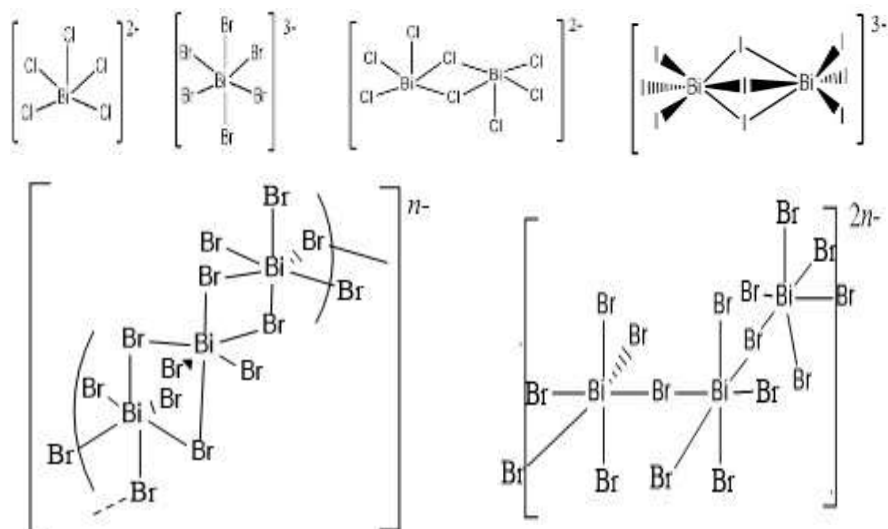
### **3.7.- Estudio teórico de las interacciones del Bi en solución.**

Debido a la variedad de los resultados que se obtuvieron, se realizó investigación acerca de qué tipo de interacciones que puede tener el Bismuto en solución. Primero se buscó información para saber si el Bi formaba complejos con el  $\text{Cl}^-$ , encontrando constantes que indicaban así era [59]. Con estas se realizó un diagrama de zonas de predominio (DZP) de pCl en función del pH, que se encuentra en la Figura 3.24 en este se observan tres de los cuatro complejos de  $\text{BiCl}_n^{3-n}$  que se forman, el  $\text{BiCl}_3$  se considera inestable en solución, por lo cual no aparece en el DZP. A la concentración de HCl que se trabajaba el complejo que se forma es el  $\text{BiCl}_4^-$ , lo cual nos dice que, para la reacción, el Bi no se encuentra libre, de tal manera que no concuerda con la ecuación que se muestra en la Figura 1.9, por lo cual este puede ser uno de los factores que afecte a la formación del hidruro volátil. También durante el estudio de los complejos de Bi y el  $\text{Cl}^-$ , se encontró información que habla acerca de la existencia de complejos polinucleares de haluros de Bismuto, los cuales tienen un gran interés debido a ciertas propiedades que presentan como el termocromismo, fotocromismo, luminiscencia, semiconductividad, entre otras. Estos complejos van desde complejos binucleares, hasta complejos polinucleares, algunos de estos se muestran en la Figura 3.25 [2, 33, 63-64].



**Figura 3.24.** DZP de Bismuto en función de pH y pCl.

Si bien es cierto la existencia de los complejos polinucleares solo ha sido comprobada en estado sólido, se deben de tomar a consideración, ya que en algunas referencias se indica que la síntesis de los mismos se lleva a cabo en solución acuosa y además que estos complejos se encuentran en un constante proceso de asociación/disociación en solución, por lo cual esto podría afectar de alguna manera la formación del hidruro volátil [65-70].



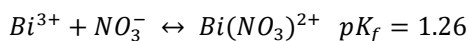
**Figura 3.25.** Polímeros iónicos formados entre el Bismuto y Halógenos [1].

También se observó que al empezar a utilizar el stock que se preparó a partir del STD de Bi de 1000 ppm los resultados que se obtuvieron probando lo que ya se había hecho anteriormente eran diferentes, para corroborar esto se hicieron dos grupos de sistemas, uno de ellos hechos con el stock de 49.06 ppb a partir de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y otro a partir del stock del STD de Bi de 1000 ppm, y se midieron utilizando las mismas concentraciones de HCl y  $\text{NaBH}_4$ , los resultados obtenidos se pueden ver en la Tabla 3.44.

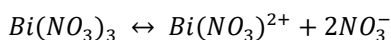
**Tabla 3.44.** Comparación de resultados obtenidos para sistemas preparados a partir de la sal de Bi y del STD, aforados con HCl.

C (ppb)	Absorbancia de sistemas a partir stock de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$			C (ppb)	Absorbancia de sistemas a partir de STD.		
<b>3.93</b>	0.1149	0.1198	0.1002	<b>4</b>	0.0314	0.0231	0.0158
<b>7.85</b>	0.1426	0.1432	0.1223	<b>8</b>	0.0509	0.0499	0.0207
<b>13.74</b>	0.7152	0.7131	0.7935	<b>14</b>	0.0565	0.0555	0.0303

Lo anterior se le atribuyo a la presencia de  $\text{NO}_3^-$ , esto debido a que existe un complejo de Bismuto con este ion, el cual se muestra en la Figura 3.26 [59], si bien puede ser un complejo que no se forme en solución, porque su constante de reacción es muy pequeña, puede que al preparar la solución a partir de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  no se disocie por completo en  $\text{Bi}^{3+}$  y  $3\text{NO}_3^-$ , sino que lo haga como se muestra en la Figura 3.27.



**Figura 3.26.** Complejo de Bi y el ion nitrato.



**Figura 3.27.** Posible disociación del  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  en solución.

Relacionando esto último, con la formación el complejo  $\text{BiCl}_4^-$  y la constante disociación/asociación de los complejos iónicos polinucleares de Bismuto en solución, podemos hacer la hipótesis de que en la solución que está hecha a partir de la sal, si el complejo con el ion nitrato está presente, este impide la formación de los diferentes complejos de Bi con el ion  $\text{Cl}^-$ . De tal manera que todo lo anterior puede ser la razón por la cual lograr un método con HCl fuera complicado, aunque si es necesario recalcar que esto solo es una suposición, ya que como se abordara en la Sección 3.9 existen otras razones que pueden ser las causantes.

Con el Ácido Tartárico también se hizo un estudio para conocer las interacciones que puede tener este en solución con el Bi, ya que, aunque se comprobó la reproducibilidad de los sistemas, se buscaba saber la razón que provocaba que a veces se obtuvieran señales variables. En este caso se encontró una constante que indicaba la formación de un complejo, el cual constaba de una molécula de Bi con tres moléculas de Ácido Tartárico [59], el problema es que no se encontró como se enlazaba este al Bi, ya que el ácido tiene dos constantes de disociación ( $\text{pK}_{a1} = 3.036$  y  $\text{pK}_{a2} = 4.366$ ) [59], por lo cual, se podría enlazar como, Ácido Tartárico, Bitartrato o Tartrato ( $\text{H}_2\text{Tar}$ ,  $\text{HTar}^-$  o  $\text{Tar}^{2-}$ ). La existencia del Tartrato de Bismuto/Sodio que se muestra en la Figura 3.28 [71], nos puede decir que el complejo en solución es  $\text{Bi}(\text{Tar})_3^{3-}$ , el problema es que debido a que el Bi tiene gran afinidad por los ligantes que contienen Oxígeno, la posibilidad de otros complejos es posible. Lo anterior se dice ya que en la literatura se encuentran reportados complejos en estado sólido como Acuobistartratobismutato(III) de Amonio Hidratado y Bitartrato(tartrato)bismuto(III) Trihidratado,  $(\text{NH}_4[\text{Bi}(\text{Tar})_2\text{H}_2\text{O}] \cdot \text{H}_2\text{O})$  y  $[\text{Bi}(\text{HTar})(\text{Tar})] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , respectivamente[72-74], en donde en uno de ellos se enlazan dos moléculas como  $\text{Tar}^{2-}$ , mientras que en el otro una

molécula se enlaza como  $\text{HTar}^-$  y otra como  $\text{Tar}^{2-}$ , además que en ambos complejos, el Bi tiene un número de coordinación de nueve, de tal manera que los ligantes de Ácido Tartárico no solo se encuentran enlazados por los oxígenos del ion Carboxilato, sino también por los oxígenos de los hidroxilos, por lo cual es difícil saber cómo lo hacen tres moléculas de Ácido Tartárico en solución. Por lo anterior se realizaron dos DZP que se encuentran en la Figura 3.29, uno para el complejo  $\text{Bi}(\text{HTar})_3$  y otro para  $\text{Bi}(\text{Tar})_3^{3-}$ .

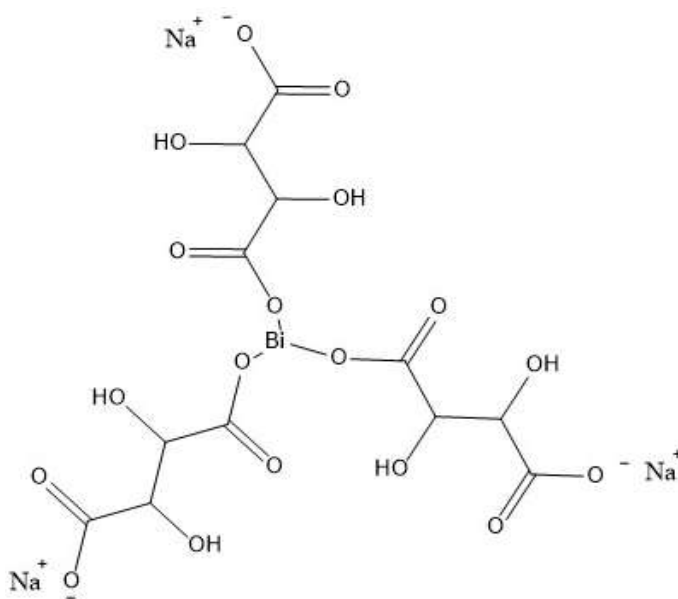
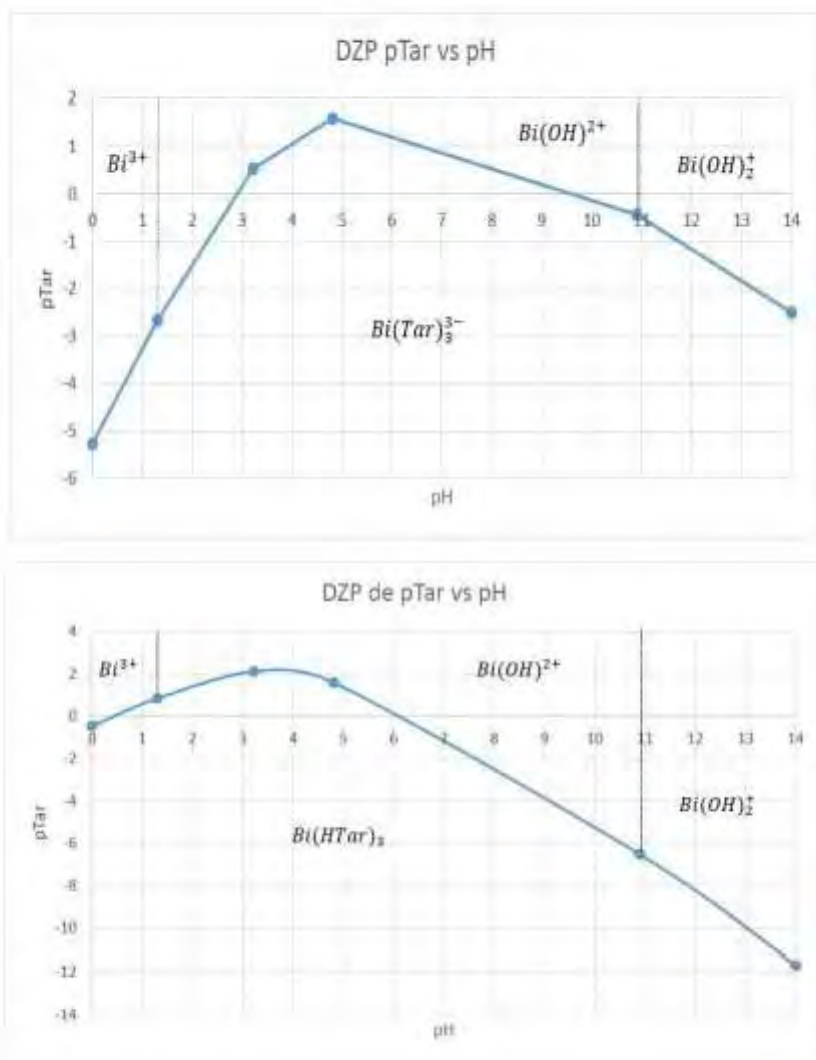


Figura 3.28. Sal de Tartrato de Bismuto/Sodio [71].



**Figura 3.29.** DZP de Bi con Ácido Tartárico, para el complejo  $Bi(Tar)_3^{3-}$  (arriba) y  $Bi(HTar)_3$  (abajo).



Tomando en cuenta la concentración de Ácido Tartárico a la que se trabajó y aplicando la operación de  $-\log$ , se obtiene un valor de  $p\text{Tar} \approx 0.3$  y en el caso del pH se determinó con un potenciómetro teniendo valores de pH de 1.3-1.5. Con lo anterior mencionado es un poco difícil afirmar que se forma o no el complejo con Ácido Tartárico, ya que con el valor de  $p\text{Tar}$ , en el diagrama del complejo  $\text{Bi}(\text{Tar})_3^{3-}$ , el complejo no se forma, mientras que en el de  $\text{Bi}(\text{HTar})_3$ , si lo hace. Y en el caso del pH en el diagrama de  $\text{Bi}(\text{Tar})_3^{3-}$ , si bien el complejo no se forma, el Bi si se hidroliza. Esto último tomando en cuenta que 1.3 es el valor de pH teórico al cual ocurre la hidrolisis, ya que como se ha mencionado anteriormente el valor experimental es 1.51 [3].

Por lo antes dicho solo se supuso lo siguiente: con el valor de  $p\text{Tar}$  y al pH de 1.3, el Bi se encuentra libre en solución permitiendo así la formación del hidruro volátil con mayor facilidad, mientras que cuando el pH es de 1.5, puede que algunos átomos de Bismuto se hidrolicen y por lo tanto haya una disminución en las señales. Lo anterior también se puede relacionar con las pruebas de Ácido Tartárico 0.25 M, como ya se mostró cuando se utilizaban tres sistemas, se observaban señales parecidas al ácido 0.5 M, pero al realizar una curva con seis sistemas, habían algunos donde la señal disminuía provocando un traslape con el sistema anterior, al Ácido Tartárico 0.25 M también se le midió el pH, dando  $\approx 1.6-1.7$ , lo cual podría indicar que la hidrolisis del Bismuto ocurre en mayor proporción a esta concentración. El artículo de donde se tomó el uso de Ácido Tartárico igual indica que a concentraciones mayores a 0.5M, las señales van disminuyendo ligeramente, esto se puede deber a que las interacciones entre el ácido y el Bismuto aumentan, dificultando la formación del hidruro volátil [55].

### **3.8.- Dificultades para determinar Bi por EAA-GH.**

El estudio teórico que se hizo para saber el tipo de interacciones que tiene el Bismuto en solución, nos puede ayudar a entender por qué se obtuvieron los resultados anteriormente expuestos. Aunque también hay otras razones que podrían ser las causantes y a la vez pueden considerarse problemas que se tienen al momento de intentar determinar el Bi por EAA-GH. El primero de ellos sin duda alguna es la poca información que se tiene, ya que a pesar de que se encontraron algunos artículos donde se determina Bi por espectrofotometría, no todos eran solo sobre absorción, algunos de ellos eran sobre fluorescencia y emisión atómica, que a pesar de servir como apoyo para poder desarrollar el método, es normal que no se obtengan los mismos resultados, lo cual se apoya en una de las referencias [55], que indica que la eficiencia para la generación del hidruro volátil no solo dependerá de las condiciones experimentales, sino también de la técnica instrumental que se use, como lo es en la fluorescencia, la cual se sabe es más sensible que la absorción atómica. Aunado a esto, artículos recientes indican la ayuda de otros complementos para aumentar la eficiencia de la generación del hidruro, así como el uso de otro tipo de atomizadores e inclusive la generación del hidruro en un medio no acuoso lamentablemente en este caso no se contaba con lo necesario para poder realizarlo [75-84].

Relacionado un poco a lo anterior tiene que ver la concentración a la que se trabajó, ya que como se observa esta fue 2-14 ppb, mientras que por ejemplo el artículo donde se tomó el uso de diferentes ácidos realizó su estudio a una concentración de 400 ppb [55] o en otro donde habla sobre la eliminación de interferencias de metales de transición, realizó su estudio a una concentración de 20 ppb [57]. De tal manera que se entiende

porque tal vez algunas condiciones que ellos aplicaron no hayan dado los mismos resultados en este estudio. Así mismo el trabajar a concentraciones tan bajas implica otros problemas, como ya se mostró a veces las señales de dos concentraciones diferentes y cercanas daban casi el mismo valor de absorbancia, impidiendo obtener la curva de calibración, que en parte fue la razón por la cual el Ácido Cítrico no se escogió para aforar los sistemas, debido a que como se muestra en la Figura 3.15, Día 1, el desplazamiento de las señales es poco entre una concentración y otra, lo que podía provocar traslapes en las señales. Tampoco se trabajó a concentraciones más altas debido a que se buscaba realizar un método que permitiera determinar Bismuto a bajas concentraciones. Además que el equipo de absorción atómica mostraba que la curva de Bismuto tiene un comportamiento logarítmico y el desplazamiento empieza a ser menor después de las 14 ppb, esto se observa en los gráficos que se obtuvieron con el Ácido Tartárico, donde el punto de esta concentración tiene un menor desplazamiento que los otros, relacionando esto con lo que dice uno de los artículos consultados, que a concentraciones altas los rendimientos que se obtienen para la generación del hidruro son pequeños, pero a concentraciones bajas estos pueden mejorar [33].

Al final el Ácido Tartárico fue el ácido que se escogió para aforar los sistemas porque en varias pruebas que se hicieron con tres sistemas se observó que las señales eran parecidas entre diferentes días, de igual manera se realizó una prueba parecida a la que se hizo con el HCl, donde se realizaron tres sistemas a partir del STD y otros tres a partir del Stock de 49.06ppb a partir de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ , los cuales dieron valores de absorbancia parecidos como se ve en la Tabla 3.45, a diferencia del HCl, que como se mostró anteriormente, no sucedía esto.

**Tabla 3.45.** Comparación de resultados obtenidos para sistemas preparados a partir de la sal de Bi y del STD, aforados con Ácido Tartárico.

C (ppb)	Absorbancia de sistemas a partir de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$			C (ppb)	Absorbancia de sistemas a partir de STD.		
<b>3.9</b>	0.0626	0.0686	0.0673	<b>4</b>	0.0674	0.0723	0.0803
<b>7.85</b>	0.1116	0.1178	0.1176	<b>8</b>	0.0955	0.1041	0.1161
<b>13.7</b>	0.1944	0.2100	0.2105	<b>14</b>	0.1504	0.1686	0.1888

### 3.9.- Cuidados que se deben tener para determinar Bi por EAA-GH.

Como se mencionó anteriormente además de lo dicho en el estudio teórico, existe otra razón por la cual los resultados que se expusieron en este trabajo hayan sido tan variables. Esto tiene que ver con las interferencias, ya que a lo largo del desarrollo de este método se pudo observar que el Bismuto era muy sensible a estas. Por lo cual se hará mención de ciertos cuidados que se deben tener a la hora de determinar Bi por EAA-GH.

Material de vidrio: uno de las primeras cosas que se debe cuidar es que el material que se utilice para preparar todas las soluciones (matraces, vasos de precipitados, pipetas volumétricas, etc), debe ser exclusivo para la determinación de Bismuto, ya que durante la experimentación se observó que si este había sido usado para otro trabajo de investigación a veces provocaba señales inconsistentes al momento de utilizarlo.

Generador de hidruros: si bien este no puede ser exclusivo para Bismuto, se debe buscar que todas las partes que sean desmontables (mangueras, reactor, celda de cuarzo, etc), si lo sean, ya que este generalmente se suele utilizar para determinar As y Se, elementos que se consideran interferencias [32] y que durante la experimentación también se observó que si se intentaba medir Bismuto con el generador de hidruros, después de haber sido utilizado para determinar alguno de los elementos mencionados, las señales que se obtenían eran inconsistentes.

Envases: para guardar algunas soluciones o transportarlas se suelen utilizar envases de plástico o de vidrio, de igual manera deben ser solo para las soluciones que se usen para determinar Bismuto, ya que a pesar de que a veces parezca están limpios, pueden tener algún residuo que cause alguna interferencia.

Si bien lavar el material antes de usarlo podría ser una opción, es necesario decir que esto se llegó a hacer, usando  $\text{HNO}_3$  2 M y NaOH 2 M, y enjuagando con agua desionizada, pero como se dijo el Bismuto es muy sensible a las interferencias, por lo cual inclusive haciendo esto se pueden obtener señales inconsistentes. En el caso del generador de hidruros es más complicado, ya que a veces si se introducen muestras, están dejan residuos sólidos los cuales son más difíciles de remover y conlleva más tiempo. Y en el caso de los envases, si bien es menos probable que haya una interferencia, también es necesario tomarlo en cuenta.

De igual manera la recomendación se hace para que las personas que quiere realizar algún estudio no inviertan tanto tiempo, además que si no se sabe que contenía o para que se utilizó el material de vidrio, el generador de hidruros o los envases, es difícil saber si con el lavado que se le aplique quede limpio. Por último, todo lo anterior se dice para evitar que se obtengan “falsos positivos”, ya que durante la experimentación

llegó a ocurrir esto y al no poder reproducir los datos nuevamente, generaba incertidumbre.

Cabe decir que aún después de saber esto se probó algunas veces el HCl, para saber si se obtenían mejores resultados, pensando las interferencias habían sido las causantes en estudios anteriores, pero los resultados seguían siendo parecidos a los que ya se habían obtenido, por lo tanto, no se insistió en su uso.

#### **4.- Conclusiones.**

Se evaluaron diversos parámetros relacionados con la determinación de Bismuto por espectrofotometría de absorción atómica con generador de hidruros y se establecieron las mejores condiciones experimentales en cuanto al medio ácido a emplear, su concentración y tipo, así como la concentración de la solución reductora y el intervalo de concentraciones que generan una tendencia lineal y que permiten obtener resultados reproducibles. Se determinaron para ello, algunos parámetros de desempeño como linealidad del sistema, repetibilidad y precisión entre otros, los cuales cumplieron con los criterios establecidos en diversas guías de validación de métodos analíticos.

Por otro lado, se demostró la aplicabilidad del método para la determinación de Bismuto en muestras de plasma de equino, las cuales fueron digeridas, empleando una metodología previamente validada para la cuantificación de Selenio en plasma de bovino, y fortificadas con una solución de Bismuto a tres niveles de concentración, los cuales estuvieron alrededor del 100%.

**5.- Referencias.**

- [1] R. Bruce King. Encyclopedia of Inorganic of Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons, [Vol. 1]. 280-299, (1997).
- [2] N. Greenwood. Chemistry of the Element 2<sup>a</sup> ed. Ch. 13, 547-599, (1997).
- [3] N. Yang, H. Sun. Biocoordination chemistry of bismuth: Recent advances. Coord. Chem. Rev. 251, 2354-2366, (2007).
- [4] N. Yang, H. Sun. Encyclopedia of Environmental Health, 414-420, (2011).
- [5] B. A. Fowler. D. W. Sullivan Jr., M. J. Sexto. Handbook on the Toxicology Metals. 4<sup>th</sup> ed. [Vol II]. Ch. 31, 655-666, (2015).
- [6] S. C. Gad. Encvlopedia of Toxicology. 3<sup>rd</sup> ed. [Vol I] Ch. Bismuth, 512-513, (2014).
- [7] P. J. Sadler, H. Li, H. Sun. Coordination chemistry of metals in medicine: target sites for bismuth. Coord. Chem. Rev. 185-185, 689-709, (1999).
- [8] R. Jewell. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Ch. Bismuth, 1-5, (2007)
- [9] R. Jewell. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Ch. Ranitidine Bismuth Citrate, 1-4, (2007)
- [10] M.N. Graham Dukes. Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reaction and Interactions. Ch. Bismuth, 518-522, (2006).
- [11] E. J. Baran, G. E. Tobon Zapata. La nueva farmacoterapia inorgánica XVI. Compuestos de Bismuto. Acta Farm. Bonaer. 14 (2), 133-138, (1995).
- [12] H. Li, H. Sun. Curr. Recent advances in bioinorganic chemistry of bismuth. Opin. Chem. Biol. 16, 74-83, (2012).
- [13] R. Ge, H. Sun. Acc. Bioinorganic Chemistry of Bismuth anda Antimony: Target Sites of Metallodrugs. Chem. Res. 40, 267-274, (2007).
- [14] W. Li, L. Jin, N. Zhu, X. Hou, F. Deng, H. Sun. Structure of colloidal bismuth subcitrate (CBS) in dilute HCl: Unique assembly of bismuth citrate dinuclear units ( $[\text{Bi}(\text{cit})_2\text{Bi}]^{2-}$ ) J. Chem. Soc. 125, 12408-12409, (2003).
- [15] L. García Rico, M. R. Robles Burgueño, E. M. Valenzuela Soto. Las metalotioneinas y su relación con la toxicidad del cadmio en los mamíferos. Rev. Int. Contam. Ambient. 15 (2), 113-120, (1999).
- [16] D. Juárez Rebollar, M. Méndez Armenta. Aspectos funcionales de la metalotioneina en el sistema nervioso. Arch. Neurocién. (Mex). 19 (1), 34-41, (2014).
- [17] L. Amable. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. Pharmacol. Res. 106, 27-36, (2016).
- [18] D. C. Plumb. Veterinary Drug Handbook 6<sup>th</sup> ed. Wisconsin: PharmaVet Inc. pp. 102-104, (2008).
- [19] C. M. Lizeth D. Desarrollo de una formulación (pasta) de subsalicilato de bismuto para el tratamiento de diarrea en equinos. Tesis de Maestría, FESC, UNAM.



- [20] B. Bradley, M. Singleton, A. L. Wan Po. Bismuth toxicity – A Reassessment. *J. Clin. Pharm. Ther.* 14, 423-441, (1989).
- [21] P.T. Reynolds, K. C. Abalos, J. Hoop, M. E. Williams. Bismuth toxicity: A rare cause of neurologic dysfunction. *Int. J. Clin. Med.* 3, 46-48, (2012).
- [22] İ. İşlek, S. Uysal, F. Gök, R. Dündaröz, Ş. Küçüködük. Reversible nephrotoxicity after overdose of colloidal bismuth subcitrate. *Pediatr. Nephrol.* 16, 510-514, (2001).
- [23] D. Harvey. *Modern Analytical Chemistry*. USA: McGraw-Hill, (2000).
- [24] D. A. Skoog. *Fundamentos de Química Analítica* 8ª ed. México: Thomson, (2005).
- [25] G. Horlick. Atomic Absorption, Atomic Fluorescence, and Flame Spectrometry. *Anal. Chem.* 54 (5), 276R-293R, (1982).
- [26] J. C. Van Loon. Atomic Fluorescence Spectrometry. Present Status and Future Prospects. *Anal. Chem.* 53 (2), 332A-361A, (1981).
- [27] D. C. Harris. *Análisis Químico Cuantitativo* 3ª ed. México: Grupo Editorial Iberoamérica, (1992).
- [28] K. A. Rubinson, J. F. Rubinson. *Análisis Instrumental*. España: Pretice Hall, (2001).
- [29] P. Pohl. Hydride generation – recent advances in atomic emission spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 23, [No. 2], 87-101, (2004).
- [30] N. H. Bings, A. Bogaerts, J. A. C. Broekaert. Atomic Spectroscopy. *Anal. Chem.* 74, 2691-2712, (2002).
- [31] K. W. Jackson and T. M. Mahmood. Atomic absorption, atomic emission and flame emission spectrometry. *Anal. Chem.* 66, 252R-279R, (1994).
- [32] Agilent Technologies. *Agilent Vapor Generation Accessory VGA 77 and VGA 77P*. 11ª ed. Australia. (2014).
- [33] J. D. Smith. The Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth. Ch. 3-4, 10, 576-588, 639-646, (1973).
- [34] B. Siegel. Hydride Formation by Atomic Hydrogen Reactions. *J. Chem. Educ.* 38 (10), 496-501, (1961).
- [35] E. S. Hernández C. Validación de los métodos de digestión ácida en horno de microondas para la determinación de selenio en leche y plasma. Tesis de QFB, FESC, UNAM, (2005).
- [36] M. A. Silva B. Leucorreducción de sangre de equinos (*Equus caballus*) para transfusión. Tesis de Médico Veterinario, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, (2005).
- [37] R. Hiraldo Lebrón. La Sangre y sus Componentes. Recuperado el 24 de mayo de 2018 de:  
[https://www.quia.com/files/quia/users/cmontelara/1101/Informes/Presentaciyyn\\_Rosa\\_Hiraldo\\_La\\_sangre\\_y\\_sus\\_componentes.pdf](https://www.quia.com/files/quia/users/cmontelara/1101/Informes/Presentaciyyn_Rosa_Hiraldo_La_sangre_y_sus_componentes.pdf).
- [38] L. Thomson. Proteínas plasmáticas. Recuperado el 24 de mayo de 2018 de:  
<http://enzimologia.fcien.edu.uy/BQII%202011/Prote%C3%ADnas%20plasm%C3%AIticas.pdf>.

- [39] N. Bradan, C. Llanos, M. B. Barrios, A. P. Escalante M., D. A. N. Ruíz D. Proteínas plasmáticas. Recuperado el 24 de mayo de 2018 de: <http://www.uaz.edu.mx/histo/Biologia/FaiUnneAr/Pdf/proteinas.pdf>.
- [40] Enfermería Virtual. Sistema Inmune y la Sangre. Recuperado el 24 de mayo de 2018 de: <https://www.infermeravirtual.com/files/media/file/102/Sangre.pdf?1358605574>.
- [41] M. Forrellat B., H. Gautier D. G., N. Fernández D. Metabolismo del hierro. Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter. 16 (3), 149-160, (200).
- [42] D. Pérez Surribas. Proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro. Química Clínica. 24 (1), 5-40, (2005).
- [43] R. C. Richter, D. Link, H. M. Kingston. Microwave-Enhanced. Anal. Chem. 73 (1), 30A-37A (2001).
- [44] B. Erickson. Standardizing the world with microwaves. Anal. Chem. 70 (13), 467A-471A (1998).
- [45] D. Aradilla Z., R. Oliver P., F. Estrany C. La química de la radiación de Microondas. Recuperado el 24 de mayo de 2018 de: <http://www.tecnicaindustrial.es/tiadmin/numeros/66/75/a75.pdf>.
- [46] T. A. Saleh. Principles and advantages of Microwave-assisted methods for the Synthesis of Nanomaterials for water purification. Ch. 3, 40-57, (2017).
- [47] J. N. Miller, J. C. Miller. Estadística y Quimiometría para Química Analítica 4ª ed. Madrid: Pearson Educación, (2002).
- [48] M. A. García, E. Soberón, M. Cortés, R. Rodríguez, J. L. Herrera, A. Alcántara. Métodos Analíticos Guía de Validación. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, (2002).
- [49] M. E. Gleason H. Desarrollo y optimización de los métodos de digestión ácida en horno de microondas para la cuantificación de selenio en muestras biológicas. Tesis de QFB, FESC, UNAM, (2004).
- [50] W.N. Lopes dos Santos, A. de F. Santos Junior, L. O. Bastos Silva, B. R. da Silva Santos, D. L. França da Silva. Multivariate optimization of a digestion procedure for bismuth determination in urine using continuous flow hydride generation and atomic fluorescence spectrometry. Microchem. J. **130**, 147-152, (2017).
- [51] C. Moscoso P., J. Moreda P., P. López M., S. Muniategui L., E. Fernández F., D. Prada R. Bismuth determination in environmental samples by hydride generation-electrothermal atomic absorption spectrometry. Talanta, 61, 633-642, (2003).
- [52] I. Kula, Y. Arslan, S. Bakirdere, S. Titretir, E. Kendüzler, O. Y. Ataman. Determination and interference studies of bismuth by tungsten trap hydride generation atomic absorption spectrometry. Talanta **80**, 127-132, (2009).
- [53] D. Soo Lee. Determination of Bismuth in Environmental Samples by Flameless Atomic Absorption Spectrometry with Hydride Generation. Anal. Chem. 54, 1682-1686, (1982).

- [54] P. Carrero, L. Gutiérrez, C. Rondón, J. L. Burguera, M. Burguera, Y. P. Peña. Flow injection determination of bismuth in urine by successive retention of Bi(III) and tetrahydrobarate(III) on an anion-exchange resin and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Talanta* 64, 1309-1316, (2004).
- [55] J. Marrero, S. Pérez Arisnabarreta, P. Smichowski. The effect of six reaction on the determination of bismuth at trace levels in environmental samples by hydride generation and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 1875-1881, (1999).
- [56] A. Klassen, M. L. Kim, M. B. Tudino, N. Baccan, M. A. Zezzi A. A metallic furnace atomizer in hydride generation atomic absorption spectrometry: Determination of bismuth and selenium. *Spectrochim. Acta Part B.* 63, 850-855, (2008).
- [57] Y. Zhang, S. B. Adeloju. Flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometric determination of selenium, arsenic and bismuth. *Talanta* 76, 724-730, (2008).
- [58] D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewis, J. Smeyers-Verbeke. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A.* Vol. 20, Ch. 8, (1998).
- [59] J. A. Dean. *Lange's Handbook of Chemistry.* 15<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, [Sec. 8]. (1998).
- [60] M. Thompson. Sulfuric Acid. Recuperado el 10 de octubre de 2018 de <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/h2so4/Sulfuric%20Acid%20-%20Molecule%20ofthe%20Month%20May%202008.pdf>
- [61] U.S. Department of Health and Human Services. Bioanalytical Method Validation. May 2001.
- [62] U.S. Department of Health and Human Services. VICH GL49(R). March 2015.
- [63] G. A. Fisher, N. C. Norman. The structures of the group 15 element (III) halides and halogenoanions. *Advances in Inorganic Chemistry.* Vol. 41, 233-271, (1994).
- [64] S.A. Adonin, M. N. Sokolov, V.P. Fedin. Polynuclear halide complexes of Bi(III): From structural diversity to the new properties. *Coord. Chem. Rev.* 312, 1-21, (2016)
- [65] N. Mercier, N. Louvain, W. Bi. Structural diversity and retro-crystal engineering analysis of iodometalate hybrids. *CrystEngComm*, 11, 720-734, (2009).
- [66] H. Ferjani, H. Boughzala, A. Driss. Poly[bis(1-carbamoylguanidinium) [tri- $\mu$ -chlorido-dichloridobismuthate(III)]] *Acta Cryst.* E68, m615, (2012).
- [67] Z. M. Jin, H. Yang Li, H. B. Wang, W. J. Feng. Russ. The directional polymeric chain of  $[(\text{BiCl}_5)^{2-}]_n$  in 2,2'-Bi(2-1H-imidazolium) Pentachlorobismuthate dihydrate. *J. Inorg. Chem.* 53 (4), 594-597, (2008).
- [68] W. Masmoudi, S. Kamoun, H. F. Ayedi. Synthesis and structure of Bis(3-dimethylammonium-1-propyne) pentachlorobismuthate(III)  $(\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N})_2\text{BiCl}_5$  *J. Chem. Crystallogr.* 41, 693-696, (2011).

- [69] M. Owczarek, P. Szklarz, R. Jakubas, A. Miniewicz.  $[\text{NH}_2(\text{C}_2\text{H}_4)_2\text{O}]\text{MX}_5$ : a new family of morpholinium nonlinear optical materials among halogenoantimonate(III) and halogenobismuthate(III) compounds. Structural characterization, dielectric and piezoelectric properties. Dalton Trans. 41, 7285, (2012).
- [70] Z. L. Ru. catena-Poly[(S)-2-methylpiperazine-1,4-dium [[trichlorobismuthate(III)]-di- $\mu$ -chlorido]] Acta Cryst. E66, m1079, (2010).
- [71] Chemical Book. Bismuth Sodium Tartrate. Recuperado el 20 de julio de 2018 de: [https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB3377583\\_EN.htm](https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB3377583_EN.htm)
- [72] B. G. Glen, N. Burford. Bismuth Compounds and preparations with biological or medicinal relevance. Chem. Rev. 99, 2601-2657, (1999).
- [73] W. A. Herrmann, E. Herdtweck, W. Scherer, P. Kiprof, L. Padja. New bismuth hydroxycarboxylate complexes. Synthesis and structure of bismuth (III) malate monohydrate and bismuth(III) tartrate trihydrate. Chem. Ber. 126, 51-56, (1993).
- [74] D. S. Sagatys, E. J. O'Reilly, S. Patel, R. C. Bott, D. Lynch, G. S. Smith, L. H. Kennard. Group 15 Metal complexes with carboxylic acids. Preparation and crystal structure of polymeric ammonium Aquabis[(+)-tartrato(2-)]bismuthate(III) Hydrate. J. Chem. 18, 1027-1034, (1992).
- [75] Z. Furdíková, B. Docekal. Trapping interference effects of arsenic, antimony and bismuth hydrides in collection of selenium hydride within iridium-modified transversally-heated graphite tube atomizer. Spectrochim. Acta Part B 64, 323-328, (2009).
- [76] L. Chen, Z. Lei, K. Hun, S. Yang, X. Wen. Non-aqueous phase hydride generation and determination of trace bismuth by atomic fluorescence spectrometry. Microchem. J. 137, 329-333, (2018).
- [77] C. Zeng, H. Tan, Y. Gu, C. Liang. Enhancement effect of room temperature ionic liquids on the chemical vapor generation of lead cadmium, and bismuth for thermospray flame furnace atomic absorption spectrometric. Anal. Methods, 6, 4710-4715, (2014).
- [78] S. Moyano, R. G. W. Wuilloud, R. A. Olsina, J. A. Gásquez, L. D. Martínez. On-line preconcentration system for bismuth determination in urine by flow injection hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Talanta, 54, 211-219, (2001).
- [79] J. Kratzer, J. Bousek, R. E. Sturgeon, Z. Mester, J. Dedina. Determination of bismuth by dielectric barrier discharge atomic spectrometry coupled with hydride generation: Method optimization and evaluation of analytical performance. Anal. Chem. 86 (19), 9620-9625, (2014).

- [80] J. P. Valles, M. R. Fernández, A. Sanz M. Merging zones flow injection for the determination of ultratracés of bismuth by volatile species generation atomic absorption spectrometry using sodium tetraethylborate (III). *J. Anal. At. Spectrom.* 13, 431-435, (1998).
- [81] C. Zeng, L. Ji, C. Zhou, F. Zhang, M. Liu, Q. Xie. Chemical vapor generation of bismuth in non-aqueous phase based on cloud point extraction with thermospray flame furnace atomic absorption spectrometric determination. *Microchem. J.* 19, 1-5, (2015).
- [82] H. Vanhoe, J. Versieck, L. Vanballenberghe, R. Dams. Bismuth in human serum. Reference interval and concentrations after intake of a therapeutic dose of colloidal bismuth subcitrate. *Clin. Chim Acta.* 219, 79-91, (1993).
- [83] F. Shemirani, M. Baghdadi, M. Ramezani, M. R. Jamali. Determination of ultra trace amounts of bismuth in biological and water samples by electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS) after cloud point extraction. *Anal. Chim Acta.* 534, 163-169, (2005).
- [84] M. Sun, Q. Wu. Determination of trace bismuth in human serum by cloud point extraction coupled flow injection inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J. Hazard. Mater.* 192, 935-939, (2011).
- [85] S. Fariás, R. E. Rodríguez, A. Ledesma, D. A. Batistoni, P. Smichwski. Assessment of acid media effects on the determination of tin by hydride generation-inductively coupled plasma atomic emission. *Microchem. J.* 73, 79-88, (2002).
- [86] F. O. Correia, D. S. Silva, S. S. Lopes Costa, I. K. V. Silva, D. R. da Silva, J. P. D. Alves, C. A. B. García, T. A. Maranhão, E. A. Passos, R. G. O. Araujo. Optimization of microwave digestion and inductively coupled plasma-based methods to characterize cassava, corn and wheat flours using chemometrics. *Microchem. J.* 135, 190-198, (2017).
- [87] S. Ashoka, B. M. Peake, G. Bremner, K. J. Hageman, M. R. Reid. Comparison of digestion methods for ICP-MS determination of trace elements in fish tissues. *Anal. Chim. Acta.* 653, 191-199, (2009).
- [88] Y. Lu, M. Kippler, F. Harari, M. Grandér, B. Palm, H. Nordqvist, M. Vahter. Alkali dilution of blood samples for high throughput ICP-MS analysis-comparison with acid digestion. *Clin. Biochem.* 48, 140-147, (2015).
- [89] M. Levi, C. Hjelm, F. Harari, M. Vahter. ICP-MS measurement of toxic and essential elements in human breast milk. A comparison of alkali digestion and acid digestion sample preparation methods. *Clin Biochem.* 53, 81-87, (2018).

- [90] E. Rozet, R. D. Marini, E. Ziemons, B. Boulanger, Ph. Hubert. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 848-858, (2011).
- [91] M. M. Moein, A. Beqqali, M. Abdel-Rehim. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *J. Chromatogr. B.* 1043, 3-11, (2017).
- [92] M Fillela. How reliable are environmental data on “orphan” elements? The case of bismuth concentrations in surface waters.
- [93] G. A. Binder, R. Metcalf, Z. Atlas, K. G. Daniel. Evaluation of digestion methods for analysis of trace metals in mammalian tissues and NIST 1577c.

## 6.- Anexos

## 6.1.- Ejemplos de Cálculos.

Solución A (1ª).

$$0.2187 \text{ g Bi(NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \left| \frac{99 \text{ g RP}}{100 \text{ g RA}} \right| \left| \frac{1 \text{ mol Bi(NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}}{485.07 \text{ g}} \right| \left| \frac{1 \text{ mol Bi}}{1 \text{ mol Bi(NO}_3)_3} \right|$$

$$\left| \frac{208.98 \text{ g}}{1 \text{ mol Bi}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} \right| \left| \frac{\text{mg}}{0.1 \text{ L}} \right| = 932.7908 \text{ ppm}$$

Solución B (1ª).

$$C = \frac{(932.7908 \text{ ppm})(1 \text{ mL})}{250 \text{ mL}} = 3.7311 \text{ ppm}$$

Solución Stock (1ª).

$$C = \frac{(3.7311 \text{ ppm})(1 \text{ mL})}{50 \text{ mL}} = 0.07462 \text{ ppm} \times 1000 = 74.6232 \text{ ppb}$$

Solución de HNO<sub>3</sub> de concentración 5% m/v.

$$12 \text{ mL HNO}_3 \left| \frac{1.51 \text{ g}}{1 \text{ mL HNO}_3} \right| \left| \frac{70 \text{ g RP}}{100 \text{ g RA}} \right| \left| \frac{\text{mg}}{250 \text{ mL}} \right| \times 100 = 5.0736\% \frac{\text{m}}{\text{v}}$$

Solución A (a partir de STD).

$$C = \frac{(1000 \text{ ppm})(1 \text{ mL})}{200 \text{ mL}} = 5 \text{ ppm}$$

Solución Stock (a partir de STD).

$$C = \frac{(5 \text{ ppm})(0.5 \text{ mL})}{50 \text{ mL}} = 0.05 \text{ ppm} \times 1000 = 50 \text{ ppb}$$

Solución de HCl de concentración 1 M.

$$50 \text{ mL HCl} \left| \frac{1.12 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \right| \left| \frac{36.5 \text{ g RP}}{100 \text{ g RA}} \right| \left| \frac{1 \text{ mol HCl}}{36.46 \text{ g}} \right| \left| \frac{\quad}{0.5 \text{ L}} \right| = 1.1212 \text{ M}$$

Solución de Ácido Tartárico de concentración 0.5 M.

$$19.0538 \text{ g H}_2\text{Tar} \left| \frac{1 \text{ mol H}_2\text{Tar}}{150.09 \text{ g}} \right| \left| \frac{99 \text{ g RP}}{100 \text{ g RA}} \right| \left| \frac{\quad}{0.25 \text{ L}} \right| = 0.5027 \text{ M}$$

Solución de Ácido Cítrico de concentración 0.5 M.

$$26.4358 \text{ g HCit} \left| \frac{1 \text{ mol HCit}}{90.03 \text{ g}} \right| \left| \frac{100 \text{ g RP}}{100 \text{ g RA}} \right| \left| \frac{\quad}{0.25 \text{ L}} \right| = 0.5032 \text{ M}$$

Solución de Ácido Oxálico de concentración 0.08 M.

$$1.8846 \text{ g HOx} \left| \frac{1 \text{ mol HOx}}{90.03 \text{ g}} \right| \left| \frac{98 \text{ g RP}}{100 \text{ g RA}} \right| \left| \frac{\quad}{0.25 \text{ L}} \right| = 0.082 \text{ M}$$

Solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de concentración 1M.

$$14 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 \left| \frac{1.84 \text{ g}}{1 \text{ mL}} \right| \left| \frac{98.2 \text{ g RP}}{100 \text{ g RA}} \right| \left| \frac{1 \text{ mol H}_2\text{SO}_4}{98.08 \text{ g}} \right| \left| \frac{\quad}{0.25 \text{ L}} \right| = 1.0316 \text{ M}$$

Solución de NaBH<sub>4</sub> de concentración 0.35% m/v.

$$0.3578 \text{ g NaBH}_4 \left| \frac{99 \text{ g RP}}{100 \text{ g RA}} \right| \left| \frac{\quad}{100 \text{ mL}} \right| \times 100 = 0.3542\% \frac{m}{v}$$

Solución de NaOH de concentración 0.5% m/v.

$$0.5833 \text{ g NaOH} \left| \frac{98.4 \text{ g RP}}{100 \text{ g RA}} \right| \left| \frac{\quad}{100 \text{ mL}} \right| \times 100 = 0.5739\% \frac{m}{v}$$



## 6.2.- Formulas para calcular parámetros estadísticos.

Linealidad del sistema.

$$\text{Pendiente } b_1 = \frac{n\Sigma xy - \Sigma x\Sigma y}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

$$\text{Ordenada al origen } b_0 = \frac{\Sigma y - b_1\Sigma x}{n}$$

$$\text{Coeficiente de determinación } r^2 = \frac{(n\Sigma xy - \Sigma x\Sigma y)^2}{n\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2(n\Sigma y^2) - (\Sigma y)^2}$$

$$\text{Intervalo de confianza para la pendiente } IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b_1}$$

$$\text{Desviación STD de la recta } S_{y/x} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - b_1\Sigma xy - b_0\Sigma y}{n - 2}}$$

$$\text{Desviación STD de la pendiente } S_{b_1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}}$$

Precisión del sistema.

$$\text{Media Arimética } \bar{y} = \frac{\Sigma y}{n}$$

$$\text{Desviación STD } s = \sqrt{\frac{n\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2}{n(n - 1)}}$$

$$\text{Coeficiente de variación } CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

Para comparación de pendientes.

Comparación para saber si varianzas de residuales iguales

$$F = \frac{s_{e2}^2}{s_{e1}^2} < F_{0.05, n_1-1, n_2-1}$$

Si las varianzas de los residuales se consideran iguales, calcular varianza común.

$$\text{Varianza común } s_{ep}^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{e1}^2 + (n_2 - 2)s_{e2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

Aplicar prueba t.

$$t_{cal} = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{s_{ep}^2 \left( \frac{1}{\sum(x_{i1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum(x_{i2} - \bar{x}_2)^2} \right)}}$$

Si varianzas de los residuales no se consideran iguales.

$$t_{cal} = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{s_{b1}^2 + s_{b2}^2}} \text{ recordando que } s_{b1}^2 = \frac{s_{e1}^2}{\sum(x_{i1} - \bar{x}_1)^2}$$

Para ambos casos:

Si  $t_{cal} < t_{0.025, n_1+n_2-4}$  no existen diferencias significativas entre pendientes

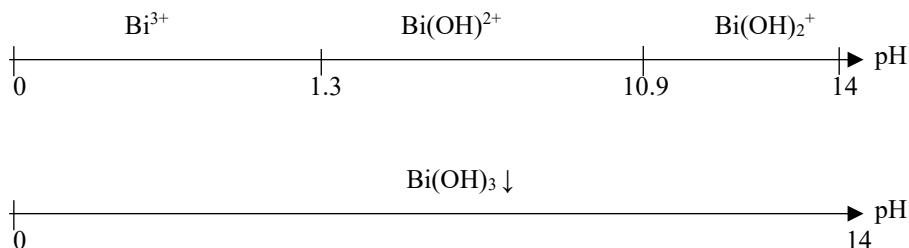
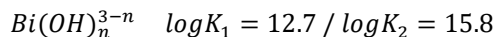
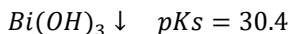
$n$  = número de muestras

$$s_{e1}^2 = s_{(y/x)1}^2$$

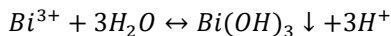
## 6.3.- Construcción de DZP de Bi.

Comportamiento del Bi en agua.

Constantes.

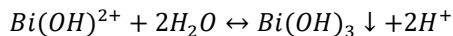


$$0 \leq pH \leq 1.3$$



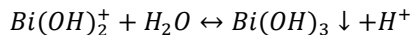
$$pBi = -11.6 + 3pH \quad \left| \begin{array}{l} 1.3 \rightarrow -7.7 \\ 0 \rightarrow -11.6 \end{array} \right|$$

$$1.3 \leq pH \leq 10.9$$

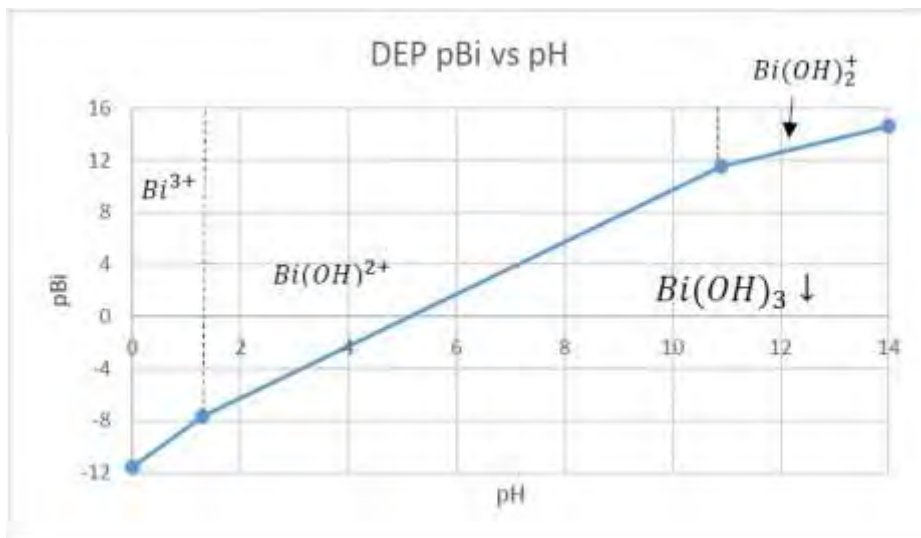


$$pBi = -10.3 + 2pH \quad \left| \begin{array}{l} 10.9 \rightarrow 11.5 \\ 1.3 \rightarrow -7.7 \end{array} \right|$$

$$10.9 \leq pH \leq 14$$



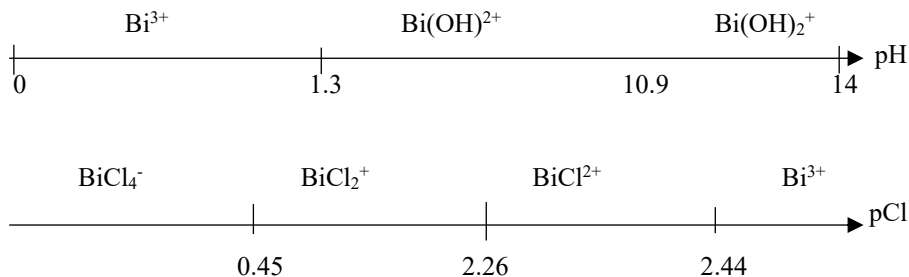
$$pBi = 0.6 + pH \quad \left| \begin{array}{l} 14 \rightarrow 14.6 \\ 10.9 \rightarrow 11.5 \end{array} \right|$$



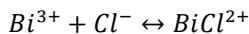
Comportamiento de Bi en presencia de Cl<sup>-</sup>.

Constantes.

$$BiCl_n^{3-n} \quad \log K_1 = 2.44 / \log K_2 = 4.7 / \log K_3 = 5 / \log K_4 = 5.6$$

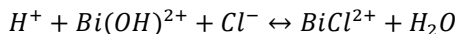


$$1EG \quad 0 \leq pH \leq 1.3$$



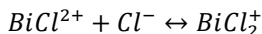
$$pCl = 2.44 \left| \begin{array}{l} 1.3 \rightarrow 2.44 \\ 0 \rightarrow 2.44 \end{array} \right|$$

$$1.3 \leq pH \leq 1.48$$



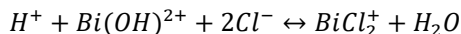
$$pCl = 3.74 - pH \left| \begin{array}{l} 1.48 \rightarrow 2.26 \\ 1.3 \rightarrow 2.44 \end{array} \right|$$

$$2EG \quad 0 \leq pH \leq 1.48$$



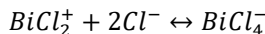
$$pCl = 2.26 \left| \begin{array}{l} 1.48 \rightarrow 2.26 \\ 0 \rightarrow 2.26 \end{array} \right|$$

$$1.48 \leq pH \leq 5.1$$



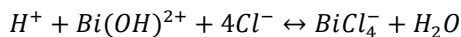
$$pCl = \frac{6 - pH}{2} \left| \begin{array}{l} 5.1 \rightarrow 0.45 \\ 1.48 \rightarrow 2.26 \end{array} \right|$$

$$3EG \quad 0 \leq pH \leq 5.1$$



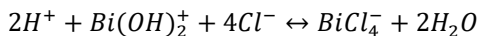
$$pCl = \frac{0.9}{2} \left| \begin{array}{l} 5.1 \rightarrow 0.45 \\ 0 \rightarrow 0.45 \end{array} \right|$$

$$5.1 \leq pH \leq 10.9$$

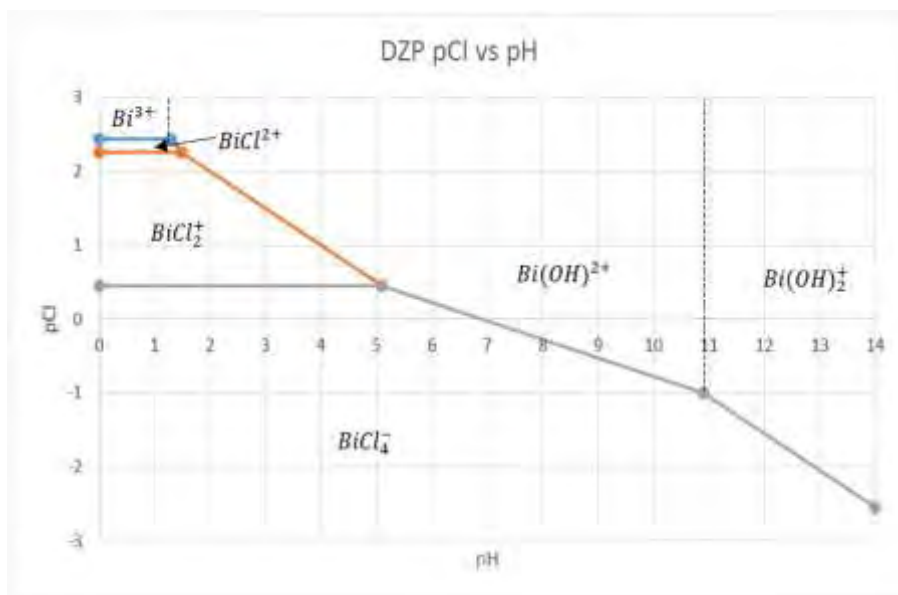


$$pCl = \frac{6.9 - pH}{4} \left| \begin{array}{l} 10.9 \rightarrow -1 \\ 5.1 \rightarrow 0.45 \end{array} \right|$$

$$10.9 \leq pH \leq 14$$

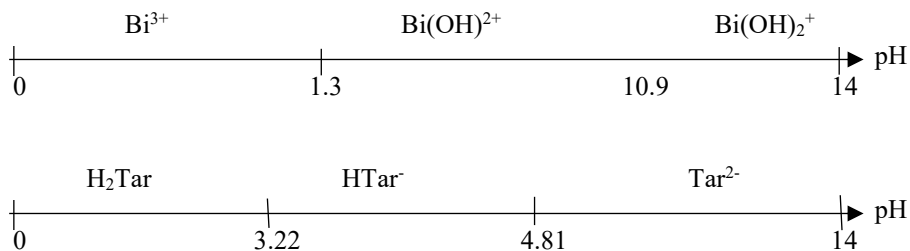
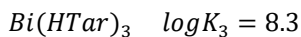


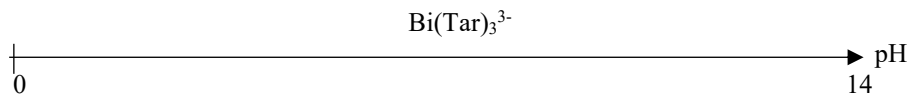
$$pCl = \frac{17.8 - 2pH}{4} \left| \begin{array}{l} 14 \rightarrow -2.55 \\ 10.9 \rightarrow -1 \end{array} \right|$$



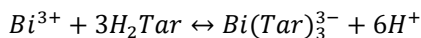
Diagramas para Bi con Ácido Tartárico.

Constante.



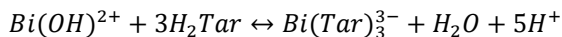


$$0 \leq \text{pH} \leq 1.3$$



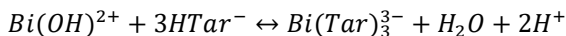
$$\text{pTar} = \frac{-15.79 + 6\text{pH}}{3} \quad \left| \begin{array}{l} 1.3 \rightarrow -2.6633 \\ 0 \rightarrow -5.2633 \end{array} \right|$$

$$1.3 \leq \text{pH} \leq 3.22$$



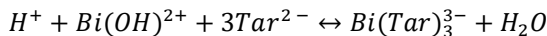
$$\text{pTar} = \frac{-14.49 + 5\text{pH}}{3} \quad \left| \begin{array}{l} 3.22 \rightarrow 0.5366 \\ 1.3 \rightarrow -2.6633 \end{array} \right|$$

$$3.22 \leq \text{pH} \leq 4.81$$



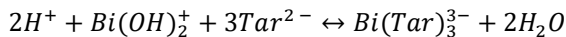
$$\text{pTar} = \frac{-4.83 + 2\text{pH}}{3} \quad \left| \begin{array}{l} 4.81 \rightarrow 1.5966 \\ 3.22 \rightarrow 0.5366 \end{array} \right|$$

$$4.81 \leq \text{pH} \leq 10.9$$



$$\text{pTar} = \frac{9.6 - \text{pH}}{3} \quad \left| \begin{array}{l} 10.9 \rightarrow -0.4433 \\ 4.81 \rightarrow 1.5966 \end{array} \right|$$

$$10.9 \leq \text{pH} \leq 14$$



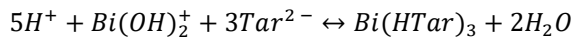
$$\text{pTar} = \frac{20.5 - 2\text{pH}}{3} \quad \left| \begin{array}{l} 14 \rightarrow -2.5 \\ 10.9 \rightarrow -0.4433 \end{array} \right|$$





$$pTar = \frac{24.03 - 4pH}{3} \quad \left| \begin{array}{l} 10.9 \rightarrow -6.5233 \\ 4.81 \rightarrow 1.5966 \end{array} \right.$$

$$10.9 \leq pH \leq 14$$



$$pTar = \frac{34.93 - 5pH}{3} \quad \left| \begin{array}{l} 14 \rightarrow -11.69 \\ 10.9 \rightarrow -6.5233 \end{array} \right.$$

