

UN MÉTODO DE BAJO COSTO PARA LA DETERMINACIÓN DE COBRE A NIVEL DE VESTIGIOS EN MATRICES DE INTERÉS AMBIENTAL POR ESPECTROFOTOMETRÍA EN FASE SÓLIDA (EFS)

Roberto Gerardo Pellerano, Cesar Hamilton Romero, Hugo Arnoldo Acevedo y Francisco Antonio Vazquez*
Facultad de Ciencias Exactas Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Av. Libertad 5.450, Corrientes (3400), Argentina

Recebido em 29/9/06; aceito em 27/4/07; publicado na web em 25/10/07

A LOW-COST PROCEDURE FOR COPPER DETERMINATION IN NATURAL WATERS AND PLANT MATERIALS EXPLOITING SOLID PHASE SPECTROPHOTOMETRY. A method for determining copper by solid phase spectrophotometry (SPS) was optimized using the Doehlert design. Copper(II) was sorbed on a styrene-divinylbenzene anion-exchange resin as a Cu(II)-1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) complex, at pH 7.0. Resin phase absorbances at 560 and 800 nm were measured directly. The detection limit was found to be $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$. The relative standard deviation on ten replicate determinations of $10 \mu\text{g Cu(II)}$ in 1000 mL samples was 1.1%. The linear range of the determination was $5.0\text{-}100 \mu\text{g L}^{-1}$. The method was applied successfully to the determination of Cu(II) in natural water and vegetable samples.

Keywords: copper; solid phase spectrophotometry; natural water.

INTRODUCCIÓN

La presencia del cobre en el ambiente (agua, aire y suelo), esta ligada principalmente a la meteorización de las formaciones rocosas y a la actividad volcánica que son fuentes de una concentración basal, en las aguas naturales por ejemplo. Habiendo sido referidas para las mismas concentraciones comprendidas en el rango $1\text{-}20 \mu\text{g L}^{-1}$, para aguas dulces superficiales, y del orden de $0,15 \mu\text{g L}^{-1}$, para aguas marinas en Argentina¹. La cantidad del elemento es incrementada por aportes antropogénicos, los que incluyen emisiones de la actividad minera, de las fundiciones que lo utilizan y de otras industrias. El Cu es asimismo incorporado a algunos procesos de tratamientos de aguas para el control de algas.

La deficiencia de este elemento en la nutrición humana puede provocar anomalías como la anemia o mal formaciones óseas, por lo que el Cu se considera como elemento esencial². Vestigios de Cu intervienen en reacciones metabólicas formando parte de diversas proteínas³, tales como la ceruloplasmina, la citocromoxidasa, etc. Sin embargo la exposición crónica a altas concentraciones de Cu(II) produce efectos tóxicos⁴. Esto determina interés en el monitoreo de Cu(II) a nivel de vestigios en muestras ambientales.

Si bien existen numerosas técnicas para determinar Cu(II) a nivel de vestigios estas son de carácter instrumental (absorción atómica⁵, espectroscopía de emisión atómica por plasma⁶, técnicas electroquímicas⁷, etc.) que presentan como principal desventaja el elevado costo de instalación y mantenimiento. La espectrofotometría UV-vis en solución para la determinación de Cu(II), si bien resulta económica, incorpora pasos previos a la determinación, generalmente para aumentar la sensibilidad, provocando mayores riesgos de contaminación y aumento del tiempo necesario para cada determinación.

En este trabajo se propone la espectrofotometría en fase sólida⁸ (EFS) como vía alternativa para la medición de concentraciones de Cu(II) a nivel de vestigios. Esta metodología presenta como ventajas la sencillez, sensibilidad, versatilidad y facilidad de aplicación además del bajo requerimiento de instrumental, dado que se lleva a cabo mediante el uso de un espectrofotómetro UV-vis convencional.

Con el objeto de obtener las condiciones óptimas para el método se utilizó el modelo de superficie de respuesta basado en el diseño de Doehlert⁹.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumental

Espectrofotómetro UV-visible haz simple (200 – 1100 nm), marca Metrolab[®] 1700, controlado desde PC, utilizando el programa Metrolab[®] SF170¹⁰. Cubetas de cuarzo (Hellma[®] 100 QS) de 1 mm de paso óptico y volumen útil de 0,240 mL, con adaptador para portacubetas de fabricación propia.

pH-metro digital, electrodo combinado de vidrio, marca Altronix[®] TPX. Centrifuga marca Cavour[®] VT-32165-DC 0 – 3500 rpm. Agitador mecánico rotativo.

Reactivos

Solución reguladora $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato a base KH_2PO_4 y de NaOH, con pH ajustado a 7,0; solución de tensioactivo no iónico éter mono[p-(1,1,3,3, tetrametilbutil) fenílico] del polietilenglicol (Triton X-100, Merck[®]) 5% (v/v); solución Stock: concentración de Cu(II) 500 mg L^{-1} ; solución etanólica de 1-(2-pyridylazo)-naftol (PAN) de concentración $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; resina Dowex 1 X-8 200 – 400 mallas. La resina se utilizó en forma clorulada.

Todos los reactivos fueron preparados con agua de elevada pureza (bidestilada sobre vidrio).

Software

Unscrambler V 6.011 para el diseño experimental y Origin 7.0 [9] para gráficos.

Determinación de Cu(II) por EFS

La EFS está basada en la preconcentración de un analito, formando un compuesto coloreado (Cu(II)-PAN), sobre un sustrato sólido (resina de intercambio iónico Dowex 1 X-8) y medición de la absorbancia del

*e-mail: fvazquez@exa.unne.edu.ar

compuesto coloreado directamente sobre la fase sólida. Este proceso permite obtener mejor sensibilidad y precisión que los métodos de absorción en solución. La reacción del ion Cu(II) con PAN se lleva a cabo en solución acuosa, pero dada la insolubilidad del reactivo PAN y sus complejos, en agua, se procedió al agregado de un tensoactivo; el elegido fue Tritón X-100 (tensoactivo no iónico). Luego se fijó el complejo coloreado sobre una resina aniónica tipo Dowex 1 X-8.

Medidas de absorbancia en EFS

En EFS la absorbancia de un determinado compuesto fijado sobre una resina se mide en forma diferente a la espectrofotometría UV-vis en solución.

En este trabajo la absorbancia del producto de la reacción fijado en la resina se midió a 560 nm (pico de máxima absorción para el complejo Cd(II) – PAN), y a 800 nm (esta última longitud de onda corresponde a la zona donde solo la resina causa atenuación de la luz por empaquetamiento). Luego por diferencia entre ambas absorbancias encontradas previamente se obtiene la absorbancia neta proporcional a la concentración de compuesto fijado. Similarmente las absorbancias de los blancos correspondientes fueron medidas a las mismas longitudes de onda.

La absorbancia neta, A_{neta} , para el compuesto se calcula:

$$A_{neta} = A_{complejo} - A_{BCO}$$

donde: $A_{complejo} = A_{560} - A_{800}$ para la muestra y $A_{BCO} = A_{560} - A_{800}$ para el blanco.

Diseño experimental

Entre los diferentes diseños de superficie de respuesta posibles se eligió el diseño de Doehlert dado que ofrece una distribución uniforme de puntos en el espacio de respuesta experimental. Dicha uniformidad de la distribución describe una figura romboidal (en el caso de dos variables se produce un hexágono), en la que se asignan cinco niveles a la variable de mayor peso o importancia (PAN, en este caso) y tres a la otra variable (Tritón X-100). Requiere también un escaso número de determinaciones experimentales, generados a partir de $N = k^2 + k + 1$. Esto representa la principal ventaja de este diseño con respecto a otros métodos de amplia aplicación, como el diseño central compuesto, por ejemplo, provocando en consecuencia un importante ahorro de costo-tiempo.

Se obtienen entonces siete puntos experimentales que deben medirse, para poder procesar y obtener los coeficientes de regresión cuadrática de la siguiente ecuación:

$$A_{neta} = a + b[PAR] + c[Triton] + d[PAN]^2 + e[Triton]^2 + f[PAN][Triton]$$

Donde: a es el término independiente, b y c son coeficientes de los términos lineales, d y e son coeficientes cuadráticos y f es el coeficiente de interacción. Cada coeficiente representa la proporción de la variabilidad total de la variable dependiente (absorbancia neta, ABS), que es explicada por la ecuación de regresión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Parámetros que afectan la determinación de Cu(II) por EFS

En la EFS el primer objetivo que se plantea es la elección del soporte adecuado sobre el que se fijará el compuesto en estudio. Se realizaron, en placa de toque, varios ensayos cualitativos de fijación del compuesto en los soportes aniónicos: Dowex 1 X-8 y de

adsorción: Amberlite XAD 7 y Amberlite XAD 16, realizando simultáneamente ensayos en blanco para cada uno.

Se eligió el soporte aniónico Dowex 1 X-8, que produce fijación rápida y completa. Con el resto de las resinas la fijación no fue completa, esto se pone en evidencia porque la solución permanece coloreada luego de un tiempo de contacto prudencial y además, presentan la desventaja de una elevada opacidad al paso de la luz a las longitudes de onda de trabajo.

Otro parámetro importante porque afecta en forma directa la sensibilidad del método es el volumen de trabajo, en esta ocasión se fijó un volumen de 50 mL de muestra.

Dependencia del pH

La influencia del pH sobre la formación del complejo Cu(II)-PAN se estudió en solución, dado que la formación del complejo Cu(II)-PAN se realizó en la fase líquida previo a su fijación en la fase sólida (resina). Se tomaron 100 mL de muestra conteniendo al menos 0,1 mg de Cu(II), y se le adicionaron a continuación los siguientes reactivos: 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v) y 0,5 mL de solución de PAN $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Finalmente se hizo variar el pH de la solución obtenida agregando soluciones de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Los valores de pH ensayados estuvieron comprendidos entre 4,5 y 10,5. La gráfica obtenida de representar los diferentes valores de absorbancia neta medidos versus los diferentes valores de pH medidos potenciométricamente, luego de homogeneizar cuidadosamente las soluciones, puede verse en la Figura 1.

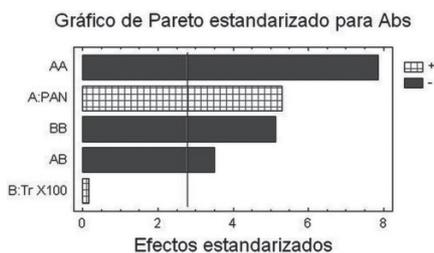


Figura 1. Influencia del pH de la formación del complejo Cu(II)-PAN. Absorbancia medida a 555 nm en solución

Se observaron valores prácticamente constantes en el rango de 6,2 a 7,4. El valor de pH óptimo seleccionado fue de 7,0 el cual fue ajustado utilizando solución reguladora de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato a base KH_2PO_4 y de NaOH por no ocasionar interferencias perceptibles en este rango de aplicación.

Diseño para optimizar [PAN] y [Tr X-100]

El primer diseño propuesto se encuentra centrado en el punto $[\text{PAN}] = 6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ y $[\text{Tr X-100}] = 0,05\%$, dicho punto se replica tres veces para obtener una estimación del error experimental. Las coordenadas del modelo y las absorbancias medidas se pueden observar en la Tabla 1.

Para la optimización se utilizaron alícuotas de 50 mL de solución tipo de Cu(II) de concentración adecuada, luego se agregaron sucesivamente volúmenes variables de acuerdo con el punto experimental, solución de Tritón X-100 + solución etanólica de PAN + 1 mL de buffer pH 7,0 + 70 mg de resina aniónica Dowex 1 X-8.

A continuación se agita la muestra en agitador mecánico durante 20 min. Se separa la resina del seno de la solución luego de centrifugar 5 min a 1.500 rpm. Se decanta por succión de la solución sobrenadante con vacío. Se cargan con la ayuda de goteros de vidrio las cubetas de 1 mm de paso óptico. Finalmente se lee la absorbancia

en el espectrofotómetro siguiendo el procedimiento explicado anteriormente para la medición de absorbancia en EFS.

Luego del análisis de regresión se obtiene una tabla de análisis de la varianza (ANOVA) correspondiente al modelo, Tabla 2 y una gráfica de superficie de respuesta Figura 2.

Tabla 1. Diseño para optimizar [PAN] y [Tr X-100].

Se pueden observar los niveles de concentración tenidos en cuenta para la regresión de superficie de respuesta. Los valores han sido distribuidos teniendo en cuenta el modelo de Doehlert

Experimento	PAN [x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹]	Tr X-100 [x 10 ⁻² %]	Absorbancia Neta
1	6 (-1)	5 (0)	0.220
2	8 (-0.5)	7.5 (+1)	0.218
3	8 (-0.5)	2.5 (-1)	0.278
4	10 (0)	5 (0)	0.226
5	12 (+0.5)	7.5 (+1)	0.292
6	12 (+0.5)	2.5 (-1)	0.223
7	14 (+1)	5 (0)	0.308

Tabla 2. Tabla de análisis de la varianza correspondiente al modelo de regresión aplicado

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F	P
A: PAN	0,013441	1	0,0134	28,08	0,006
B: Tr X-100	0,000011	1	0,0000	0,02	0,886
AA	0,029502	1	0,0295	61,63	0,001
AB	0,005852	1	0,0059	12,22	0,025
BB	0,012567	1	0,0126	26,25	0,007
Error Total	0,001915	4	0,0005		
Total	0,089302	9			

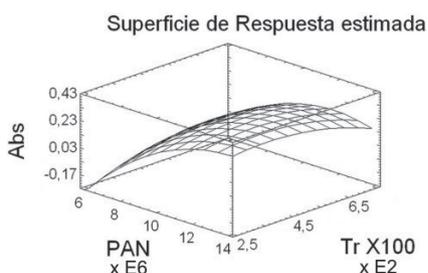


Figura 2. Superficie de respuesta obtenida para el diseño 1 con aplicación del modelo de Doehlert

La tabla de ANOVA divide la variabilidad de la respuesta (Abs) en distintos segmentos separados para cada uno de las variables y sus interacciones, después prueba la significación estadística de cada efecto comparando el cuadrado de la media contra una estimación del error experimental. En este caso, 4 de los efectos tienen los p-valores inferiores a 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero al 95,0% de nivel de confianza. Esto puede observarse también utilizando el gráfico de Pareto, que es un gráfico de barras que permite observar la significación de cada variable y sus interacciones sobre la variable de respuesta, Figura 3. El estadístico R-cuadrado indica que el modelo así ajustado explica el 97,9% de la variabilidad. El estadístico R-cuadrado ajustado, el cual es más adecuado para la comparación de números diferentes de variables independientes, es 95,17%. El error estándar de

la estimación muestra la desviación normal de los residuos es 0,0219. El estadístico Durbin-Watson (DW) examina los residuos para determinar si hay cualquier correlación significativa basada en el orden en el que se suceden en el fichero de datos. Puesto que el p-valor es superior a 0,05, no hay indicios de correlación de serie en los residuos, lo asegura la validez del modelo aplicado.

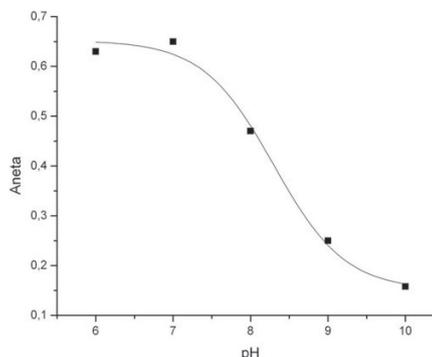


Figura 3. Gráfico de Pareto que permite observar el peso de cada variable sobre la variable de respuesta y sus interacciones

La superficie de respuesta, según la aplicación del criterio de Lagrange¹¹, indica que aparece un máximo de respuesta en las siguientes coordenadas para una absorbancia neta máxima igual a 0,329. Coordenadas: [PAN] = 13,25 x 10⁻⁶ mol L⁻¹, [Tr X-100] = 3,99 x 10⁻²%, que como se puede observar, el máximo aparece en la zona lateral derecha de la superficie definida por el campo experimental, Figura 2. Teniendo en cuenta que el máximo se encuentra en una zona de meseta de la superficie de respuesta se realiza una elección de compromiso final para las condiciones óptimas para la reacción con el Cu(II).

$$[PAN] = 1,3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ y } [Tr X-100] = 4,0 \times 10^{-2} \%$$

Otros parámetros experimentales

Se estudió el tiempo de agitación necesario para lograr la fijación completa del complejo a la resina, y se encontró como óptimo en 20 min. El complejo fijado permanece estable sobre la resina al menos por 48 h después de la fijación. La secuencia de adición de reactivos determinada es la siguiente: 50 mL de muestra + Triton X-100 + PAN + solución reguladora + resina aniónica.

La masa de resina es otro parámetro a tener en cuenta¹², se fijó el valor en 70 mg de resina, que es una masa suficiente para que una vez cargada en la cubeta alcance a cubrir el camino óptico.

Propiedades analíticas

Se realizó una curva de calibración bajo las condiciones óptimas encontradas. La gráfica de calibración resulta lineal entre 5 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu(II), la pendiente alcanzó un valor de 0,012 L μg^{-1} con un coeficiente de correlación de 0,995 (n = 6). Se calculó el límite de detección en 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ teniendo en cuenta el criterio de 3 σ o tres veces la desviación estándar de una serie de 10 determinaciones de la absorbancia neta correspondiente al blanco¹³. La reproducibilidad se calculó realizando determinaciones independientes conteniendo 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu(II), obteniéndose un valor de 1,7%.

El límite de detección obtenido por el método propuesto se encuentra en niveles similares a otras técnicas instrumentales, tales como las de espectrometría atómica¹⁴⁻¹⁶ o espectrometría atómica combinadas con espectrometría de masas¹⁷, aunque los costos de instalación-mantenimiento no son comparables. Los valores de los

límites de detección típicos de las diferentes técnicas instrumentales disponibles pueden observarse en la Tabla 3.

El límite de detección de la técnica propuesta en este trabajo (EFS) es coherente con las demás técnicas instrumentales sofisticadas. La principal desventaja de la EFS es el elevado tiempo requerido por cada determinación.

Efecto de iones extraños

Se realizó un estudio de los posibles interferentes para la determinación de Cu(II). Para ello se prepararon soluciones tipo que contenían 10 mg L⁻¹ de Cu(II), los valores de concentración informados de los interferentes son tales que el error relativo introducido en la determinación fue inferior a $\pm 5\%$.

Los resultados se presentan en la Tabla 4. Se observan interferencias importantes, principalmente producidas por cationes tales como Fe(III), Zn(II), Ni(II) y Co(II). Se estudió el agregado de citrato de sodio como agente enmascarante, a una concentración de 1×10^{-3} mol L⁻¹ que resultó eficiente para eliminar la interferencia debida a los iones Zn(II), Fe(III), Cd(II) y Pb(II). La interferencia debida al Co(II) y Ni(II) no resulta de importancia a niveles normales de aparición en aguas naturales de río.

Tabla 3. Comparación del límite de detección del método propuesto con respecto a otras técnicas instrumentales de elevado costo

Técnica	Límite de detección [$\mu\text{g L}^{-1}$]
Espectrometría de absorción atómica	Llama (FAAS) ²⁰ 1,0 – 3,0
Espectrometría de emisión atómica	Horno de grafito (GFAAS) ¹⁶ 2,0
	Plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) ¹⁷ 0,8
	Plasma de acoplamiento inductivo – Espectrometría de masa (ICP-MS) ²¹ 2,5
Espectrometría en Fase Sólida (EFS)	Método propuesto 2,5
Refs.16-19	

Tabla 5. Aplicaciones analíticas – Concentraciones de Cu(II) medidas con el método propuesto y con la técnica de referencia GFAAS

Muestra	Cu(II) sobrealimentado [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Cu(II) encontrado ^a [$\mu\text{g g}^{-1}$]	GF-AAS [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Recuperación [%]
Hojas de té verde	—	26,4 \pm 0,4	26,9 \pm 0,1	98,1
Hoja de té negro	—	22,2 \pm 0,5	21,8 \pm 0,2	—
Hojas de Yerba Mate	—	47,2 \pm 0,4	46,9 \pm 0,1	100,6
		[$\mu\text{g L}^{-1}$]	[$\mu\text{g L}^{-1}$]	
Agua Río Paraná	—	24,5 \pm 0,4	25,0 \pm 0,1	98,0
Agua de bebida	—	< 2,5	< 1,0	—
	10	10,4	—	104
	30	30,5	—	101,6
	50	50,1	—	100,2

^a Promedio de tres determinaciones

REFERENCIAS

- Subsecretaría de recursos hídricos de la Nación; *Desarrollos de Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente Correspondientes a Cobre*, Niveles Guía Nacionales de Calidad de Agua Ambiente, 2005
- Nath, R.; *Int. J. Biochem. Cell Biol* **1997**, *29*,1245
- Aitio, A.; Aro, A.; Jarvisalo, J.; Vainio, H.; *Trace elements in health and disease*, 1st ed., RSC: Cambridge, 1991

Tabla 4. Estudio del efecto de posibles interferentes en la determinación de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$

Ion extraño	Concentración tolerada con enmascarante [$\mu\text{g L}^{-1}$]
Cl ⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , SiO ₃ ²⁻ , PO ₄ ³⁻ , CO ₃ ²⁻ , HCO ₃ ⁻ ;Ca(II), Mg(II)	> 10000
SO ₄ ²⁻	5000
F ⁻	2000
Al(III)	1000
Cr(III), Pb(II), Fe(III)	100
Cd(II)	50
Bi(III), Zn(II)	25
Ni(II)	10
Co(II)	5

Aplicaciones analíticas

El método de EFS propuesto se aplicó a diferentes matrices de interés ambiental, como: agua de río, agua potabilizada y muestras de origen vegetal como hojas de té verde y hojas de yerba mate. Los resultados se presentan en la Tabla 5.

Para validar los valores de concentración obtenidos se determinó en forma paralela el contenido de Cu(II) con espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito¹⁸ (GFAAS), se observó gran concordancia de los valores de concentración medidos por las técnicas en las diferentes muestras.

Finalmente como una aplicación particular, el contenido de Cu(II) en el agua potabilizada de la ciudad de Corrientes se encontró por debajo del límite de detección propuesto. Se realizó el estudio de sobrealimentado de estándar¹⁹ a la muestra para comprobar el desempeño del método desarrollado. Se obtuvieron excelentes porcentajes de recuperación en todos los casos (superior al 95%) Tabla 5.

CONCLUSION

Se consiguió desarrollar un método para la determinación de Cu(II), sencillo confiable, sensible y de bajo costo aplicable a muestras con matrices de interés ambiental.

- Malvankar, P. L.; Shinde, V. M.; *Analyst* **1991**, *116*, 1081.
- Welz, B.; *Atomic Absorption Spectroscopy*, 1st ed., Wiley: Amsterdam, 1985, cap. 9.
- Kamiura, T.; Funasaka, K.; Tajima, Y.; Kawaraya T.; Kuroda, K.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *327*, 61.
- Chow, C. W. K.; Kolev, S. D.; Davey D. E.; Mulcahy, D. E.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, *330*, 79.
- Yoshimura, K.; Waki, H.; *Talanta* **1985**, *32*, 345.

9. Doehlert, D. H.; *Applied Statistics* **1970**, *19*, 231.
10. Metrolab SF-170; *Software for spectrophotometer*, Metrolab, Argentina, 1999.
11. *The Unscrambler 6.11*, CAMO® Computer Aid Modelling, 1996.
12. Zougagh, M.; Rudner, P. C.; De Torres, A. G.; Pavon, J. M. C.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2000**, *15*, 1589.
13. Ortega-Barrales, P.; Fernández de Córdova, M. L.; Molina-Díaz, A.; *Anal. Chim. Acta* **1998**, *376*, 227
14. IUPAC; *Pure Appl. Chem.* **1976**, *45*, 115.
15. U.S. EPA National Exposure Research Laboratory (NERL); Method 200.7 *Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry*, 1994.
16. U.S. EPA National Exposure Research Laboratory (NERL); Method 200.9. *Determination of Trace Elements by Stabilized Temperature Graphite Furnace Atomic Absorption*, 1994.
17. U.S. EPA National Exposure Research Laboratory (NERL); Method 200.8. *Determination of Trace Elements in Waters by Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry*, 1994.
18. Cabon, J. Y.; Le Bihan, A.; *Spectrochim. Acta, Part B* **1995**, *50*, 1703.
19. Prichard, E.; Mackay, G. M.; Points, J.; *Trace Analysis: A structures approach to obtaining reliable results*, 1st ed., RSC: United Kingdom, 1996.