



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Determinación de cromo (VI) en agua de mar

Determinación de cromo (VI) en auga de mar

Determination of chromium (VI) in seawater

Directora: Dña. María Elisa Beceiro González

LAURA DÍAZ CABANAS

Curso: 2019/2020 – Convocatoria: *Diciembre*

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Elisa, por ser mi guía, por sus consejos tanto en el ámbito académico como en el personal y sobretodo, por su enorme paciencia.

A mis abuelos, que de una forma u otra, tanto me protegen y ayudan.

A mi familia, por su apoyo constante.

A todos mis amigos, en especial a Alberto y Antía, de lo mejor que me llevo de esta etapa.

A Javi, mi compañero de vida. Gracias por creer en mí.

Y a mis padres, pues si soy quien soy es gracias a ellos. Esto es solo una pequeña muestra de agradecimiento, que espero os haga sentir orgullosos. Este logro es tanto mío como vuestro. Gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. OBJETIVOS	3
3. CRONOGRAMA	4
4. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	5
4.1. Propiedades físico-químicas y usos del cromo	5
4.2. Presencia y distribución del cromo en el medioambiente. Toxicidad de las especies de cromo	6
4.2.1. Toxicidad de las especies de cromo	7
4.2.2. Distribución del cromo en el medioambiente y legislación	8
4.2.2.1. Suelos.....	9
4.2.2.2. Aguas	10
4.2.2.3. Aire.....	11
4.2.2.4. Legislación.....	11
4.3. Especiación del cromo.....	12
4.3.1. Micro-extracción dispersiva líquido-líquido (DLLME)	12
4.3.2. Espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito.....	15
5. PARTE EXPERIMENTAL	18
5.1. Materiales y equipos	18
5.2. Reactivos	18
5.3. Preparación de disoluciones patrón	18
5.4. Método de extracción.....	19
5.5. Lavado de material.....	19
5.6. Análisis por ETA-AAS.....	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
6.1. Optimización del programa de temperaturas.....	22
6.1.1. Programa de temperaturas con patrones acuosos.....	22
6.1.2. Programa de temperaturas con patrones de composición similar a los extractos.....	24
6.2. Optimización del método de extracción	25
6.2.1. Optimización del volumen de TBP empleando ultrasonidos	25
6.2.2. Optimización del volumen de TBP con agitación	27
6.2.3. Optimización del volumen de HCl.....	27

6.2.4.	Optimización del tiempo de agitación.....	29
6.2.5.	Optimización de la centrifugación.....	29
6.2.6.	Optimización de la ratio fase orgánica- fase acuosa.....	30
6.2.7.	Condiciones optimizadas del método de extracción.....	31
6.3.	Validación.....	32
6.3.1.	Validación del método instrumental.....	32
6.3.1.1.	Calibrado.....	32
6.3.1.2.	Límites de detección y cuantificación.....	32
6.3.1.3.	Repetibilidad.....	33
6.3.2.	Validación del método de extracción.....	34
6.3.2.1.	Calibrado con patrones preparados con fase orgánica.....	34
6.3.2.2.	Calibrado del procedimiento de extracción.....	34
6.3.2.3.	Estudio del efecto matriz.....	36
6.3.2.4.	Límites de detección y cuantificación.....	38
6.3.2.5.	Precisión.....	38
6.3.2.6.	Exactitud.....	39
6.3.2.7.	Aplicación a muestras.....	40
7.	CONCLUSIONES	41
8.	BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APDC: Pirrolidinditiocarbamato amónico

ARN: Ácido ribonucleico

BCC: Cúbica centrada en el cuerpo

CAS: Chemical Abstracts Service ó Número de Registro

DDTC: Diclorodifeniltricloroetano

DLLME: Microextracción dispersiva líquido- líquido

DPC: 1, 5-difenilcarbácida

ETA-AAS: Espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica

FAAS: Espectroscopía de absorción atómica de llama

FNB-IOM: Junta de Alimentos y Nutrición del Instituto de Medicina de Estados Unidos

GF-AAS: Espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito

HR-CS FAAS: Espectroscopía de absorción atómica de llama de fuente continua de alta resolución

IARC: Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer

ICP-AES: Espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo

IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

LIBS: Espectrometría de masas de ruptura inducida por láser

LLE: Extracción líquido-líquido

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

NIOSH: Instituto Nacional para la Salud y Seguridad Ocupacional

OMS: Organización Mundial de la Salud

OSHA: Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de Estados Unidos

RPM: Revoluciones por minuto

RSD: Desviación Relativa Estándar

RX: Espectroscopía de Rayos X

SD: Desviación Estándar

SDS: Dodecilsulfato sódico

TBP: Tributilfosfato

TTA: Toliltriazol

USEPA: Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos

USFDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

UV-VIS: Espectrometría Ultravioleta-Visible

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diagrama de Gant de la distribución temporal aproximada de las actividades realizadas durante el Trabajo de Fin de Grado

Tabla 2. Propiedades físico-químicas del cromo

Tabla 3. Métodos de DLLME para la determinación de especies de cromo

Tabla 4. Programa del horno de grafito

Tabla 5. Programa de temperaturas de la cámara de grafito

Tabla 6. Condiciones optimizadas del método de extracción

Tabla 7. Estudio de comparación de pendientes

Tabla 8. Comparación de pendientes para el estudio del efecto matriz

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución del cromo en compartimentos ambientales

Figura 2. Esquema de un horno de grafito

Figura 3. Esquema del procedimiento de extracción

Figura 4. Curvas de mineralización de ambos modificadores de matriz

Figura 5. Curvas de atomización de ambos modificadores de matriz

Figura 6. Curvas de mineralización y atomización empleando el HNO_3 como modificador de matriz

Figura 7. Influencia del volumen de TBP en la extracción de Cr(VI) empleando ultrasonidos

Figura 8. Influencia del volumen de TBP en la extracción de Cr(VI) empleando agitación automática

Figura 9. Influencia del volumen de HCl en la extracción de Cr(VI)

Figura 10. Influencia del tiempo de agitación en la extracción de Cr(VI)

Figura 11. Influencia de la velocidad de centrifugación en la extracción de Cr(VI) y Cr(III)

Figura 12. Influencia de la ratio fase orgánica-fase acuosa en la extracción de Cr(VI) y Cr(III)

Figura 13. Recta de calibrado con patrones acuosos

Figura 14. Recta de calibrado con patrones en fase orgánica

Figura 15. Recta de calibrado del procedimiento de extracción

Figura 16. Recta de calibrado del procedimiento de extracción con agua Milli-Q

Figura 17. Recta de calibrado del procedimiento de extracción con agua de mar

Figura 18. Pico de absorbancia obtenido para un patrón de $0.2 \mu\text{g/L}$ preparado con agua de mar sintética

Figura 19. Pico de absorbancia obtenido para una muestra de agua de mar de la playa de Esteiro (Viveiro)

1. RESUMEN

Este Trabajo de Fin de Grado se ha planteado con el propósito de que el alumno optimice y valide un método para la determinación de Cr(VI) en agua de mar. El método se basa en la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), seguida de análisis por absorción atómica con atomización electrotérmica (ETA-AAS). En las condiciones optimizadas, el Cr(VI) se extrae selectivamente empleando 10 mL de muestra de agua de mar a la que se añade 1 mL de HCl 5M, se utilizan 200 μ L de tributilfosfato como disolvente de extracción y se sustituye el dispersante por una etapa de agitación (10 min a 1200 rpm). Para separar las fases, se centrifuga durante 5 min a 3500 rpm y el extracto obtenido se diluye (1:2) con HNO₃ 0.1M en metanol analizándose por ETA-AAS. El método desarrollado presenta buena exactitud y precisión, siendo el LOQ (0.088 μ g/L) muy inferior al valor máximo de Cr(VI) permitido por la legislación (5 μ g/L) para aguas superficiales.

Palabras clave: Cromo (VI); Microextracción líquido-líquido dispersiva; Agua de mar; Espectroscopía de absorción atómica

Este Traballo de Fin de Grao planteouse co propósito de que o alumno optimice e valide un método para a determinación de Cr(VI) en auga de mar. O método baséase na microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), seguida da análise por absorción atómica con atomización electrotérmica (ETA-AAS). Nas condicións optimizadas, o Cr(VI) extráese selectivamente empregando 10 mL de mostra de auga de mar á que se lle engade 1 mL de HCl 5M, usando 200 μ L de tributilfosfato como disolvente de extracción e substitúese o dispersante por unha etapa de axitación (10 min a 1200 rpm). Para separar as fases, centrifúgase durante 5 min a 3500 rpm e o extracto obtido dilúese (1:2) con HNO₃ 0.1M en metanol analizándose por ETA-AAS. O método desenvolvido presenta boa exactitude e precisión, sendo o LOQ (0.088 μ g/L) moi inferior ao valor máximo de Cr(VI) permitido pola lexislación (5 μ g/L) para augas superficiais.

Palabras clave: Cromo (VI); Microextracción líquido-líquido dispersiva; Auga de mar; Espectroscopía de absorción atómica

This Final Degree Project has been developed with the purpose of optimizing and validating a method for the determination of Cr(VI) in seawater. The method is based on

liquid-liquid dispersive microextraction (DLLME), followed by analysis using electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETA-AAS). Under the optimized conditions, Cr(VI) is selectively extracted using 10 mL of seawater sample with 1 mL of HCl 5M added, employing 200 μ L of tributyl phosphate as extraction solvent and an agitation step (10 min at 1200 rpm) instead of dispersant solvent. For the separation of both phases, the mixture was centrifuged at 3500 rpm during 5 min. The obtained extract is diluted with HNO₃ 0.1M in metanol (1:2) and analyzed by ETA-AAS. The developed method has shown good accuracy and precision being the LOQ (0.088 μ g/L) much lower than the maximum value allowed by the legislation (5 μ g/L) for Cr(VI) in surface waters.

Keywords: Chromium (VI); Liquid-liquid dispersive microextraction; Seawater; Atomic absorption spectroscopy

2. OBJETIVOS

El cromo aparece en el medioambiente mediante procesos naturales o antropogénicos y su toxicidad depende de la especie química que esté presente. Así, mientras el Cr(III) es un nutriente con funciones esenciales en nuestro organismo, el Cr(VI) es cancerígeno y mutagénico. De ahí la importancia de su especiación en sistemas complejos como son los ecosistemas acuáticos marinos.

En el agua de mar las especies metálicas se encuentran en bajas concentraciones, complicándose su análisis por el efecto de la matriz de la muestra. Por ello, es necesario el empleo de un método de extracción selectivo que permita la separación de la especie de interés y su preconcentración.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es el desarrollo de un método analítico para la extracción selectiva del Cr(VI) que nos permita tanto la separación del analito de la matriz acuosa, eliminando de este modo el efecto de la misma, como aumentar la sensibilidad en su posterior análisis por espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica. Este trabajo comprende las siguientes etapas:

- Optimización de un método de espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica, que nos proporcione la adecuada sensibilidad, precisión y linealidad para la determinación de Cr(VI)
- Optimización y validación de un método de extracción selectiva de Cr(VI) en agua de mar mediante microextracción líquido-líquido dispersiva
- Aplicación del método desarrollado a muestras reales

3. CRONOGRAMA

En el cronograma que se muestra a continuación (Ver **Tabla 1**) se indica la secuencia de actividades realizadas durante el desarrollo de este Trabajo de Fin de Grado, así como la duración de cada una de ellas.

Tabla 1. Diagrama de Gant de la distribución temporal aproximada de las actividades realizadas durante el Trabajo de Fin de Grado

TRABAJOS REALIZADOS	MESES DE TRABAJO							
	Marz.	Abr.	May.	Jul.	Sept.	Oct.	Nov.	Dic.
Optimización del programa de T del horno de grafito								
Optimización del método de extracción								
Validación del método de extracción								
Aplicaciones del método de extracción								
Realización de la memoria								
Realización de la presentación								

4. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

4.1. Propiedades físico-químicas y usos del cromo

El cromo (Cr) de número atómico 24, es el primer elemento químico en el grupo 6 y periodo 4 de la tabla periódica. Se encuentra entonces en el bloque central “d”, formando parte de la primera serie de transición. Se trata del 7º elemento y el 21º metal más abundante en la corteza terrestre [9].

Su estado habitual en la naturaleza es sólido y su aspecto físico, plateado metálico. Cuenta con cuatro isótopos naturales: ^{50}Cr , ^{52}Cr , ^{53}Cr y ^{54}Cr , aunque se han descubierto otros que son inestables, con tiempos de vida media que pueden ir desde milisegundos hasta días [1, 3].

La configuración electrónica del cromo es $[\text{Ar}] 3d^5 4s^1$, con todos los electrones desapareados. La presencia del orbital “d” parcialmente ocupado le permite ganar o perder electrones, adquiriendo así distintos números de oxidación: -2, -1, 0, +1, +2, +3, +4, +5 y +6; siendo los más estables el +3 y el +6. El solapamiento entre dichas bandas explica también ciertas propiedades físicas como su conductividad eléctrica o térmica [2].

Este metal presenta una estructura cristalina tipo “bcc” (cúbica centrada en el cuerpo) en la que un átomo se sitúa en el centro del cubo y otros en las aristas, de ahí su elevada dureza y sus altos puntos de fusión y ebullición [2]. Estas y otras propiedades físicas destacables del cromo se recogen en la **Tabla 2** [3].

La química del cromo es muy variada. Se solubiliza por oxidación y precipita por reducción, al contrario de otros metales como el manganeso. En disolución, actúa como un ácido fuerte y reacciona con el oxígeno del aire para formar óxidos iónicos, caracterizados por su coloración [2, 3, 5, 13]. A pH básico destacan las coloraciones azuladas y el estado de oxidación divalente, mientras que a pH ácido prevalece el estado hexavalente y colores amarillos-anaranjados. En una situación intermedia se encuentran los compuestos de Cr(III), con colores verdosos y violetas y propiedades anfóteras [6-7].

Tabla 2. Propiedades físico-químicas del cromo

PROPIEDADES	VALOR
Nº CAS	7440-47-3
Densidad	7140 kg/m ³
Masa atómica	51.9961 u
Radio atómico	166 pm
Radio covalente	127 pm
Punto de fusión	2173 K
Punto de ebullición	2915 K
Calor de fusión	16.9 kJ/mol
Presión de vapor	990 Pa a 2130 K
Electronegatividad	1,66 eV
Calor específico	450 J/(K*kg)
Conductividad eléctrica	7,74·10 ⁶ S/m
Conductividad térmica	93,7 W/(K*m)
Solubilidad en agua	Ninguna

A temperatura ambiente el metal es resistente al ataque químico, aunque se disuelve en HCl diluido y H₂SO₄, y el HNO₃ lo pasiva. A temperaturas más elevadas es reactivo, se combina con la mayoría de los no metales, como el O₂ o los halógenos. Por otro lado, especies como boruros, carburos y nitruros son inertes. Se conocen también peróxidos, perchromatos, ácidos percrómicos, compuestos organometálicos, etc [5].

Respecto a su uso, algunas de las aplicaciones más destacadas son:

- Como colorante y pigmento de telas, como tinte para el proceso del curtido del cuero, etc.
- En cromados de piezas metálicas y equipos eléctricos, para conseguir mayor fortaleza y soporte de altas temperaturas.
- En aleaciones con metales como el níquel o el hierro para la creación de aceros inoxidable, u otros (titanio, el cobre, el cobalto, etc...) con usos específicos.
- Otros usos específicos como: conservación y protección de la madera, catálisis, en cintas magnéticas de audio, en fertilizantes y fungicidas, etc [4, 8, 11].

4.2. Presencia y distribución del cromo en el medioambiente. Toxicidad de las especies de cromo

Las características biológicas, físicas y químicas de cualquier sistema natural (pH, oxígeno disuelto,...), determinan la distribución de las especies de los elementos y condicionan su transporte [13].

El cromo aparece de manera natural en el medioambiente (expulsión de gases y lava de volcanes, erosión de rocas,...) o debido a actividades antropogénicas como procesos de industrias químicas, metalúrgicas o del carbón. Su mineral principal es la cromita (FeCr_2O_4): una espinela de Cr(III) en huecos octaédricos y Fe(II) en huecos tetraédricos. Se extrae por reducción mediante la siguiente reacción: $\text{FeCr}_2\text{O}_4 + 4\text{C} \rightarrow \text{Fe} + 2\text{Cr} + 4\text{CO}$ [3]. En menor medida, también aparece en otros minerales como la vauquelinita ($\text{CuPb}_2\text{CrO}_4\text{-PO}_4\text{OH}$), la tarapacáite (K_2CrO_4), la bentorita ($\text{Ca}_6(\text{CrAl})_2(\text{SO}_4)_3$) o la crocoíta (PbCrO_4). Los mayores depósitos se encuentran en la Federación Rusa, Sudáfrica, Zimbabue, Turquía, Filipinas e India [9, 11-12, 15].

Está catalogado por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) como el metal pesado más cancerígeno y como uno de los contaminantes más tóxicos. Tanto su toxicidad, como su biodisponibilidad y su movilidad dependen de la forma química en la que se encuentre, lo que hace imprescindible su especiación [9, 15].

4.2.1. Toxicidad de las especies de cromo

Los estados de oxidación más relevantes del cromo son el +2, el +3 y el +6. Con la presencia del oxígeno del aire, el ion Cr^{+2} se oxida rápidamente a Cr^{+3} , ya que este estado octaédrico $3d^3$ es más estable. Por este motivo, en el medioambiente las especies de cromo predominantes son las de Cr(III) y de Cr(VI). Mientras las primeras presentan un comportamiento anfótero, las especies de Cr(VI) son ácidas. En su migración van a competir reacciones de tipo redox, mecanismos de adsorción/reducción, reacciones de disolución/precipitación y de formación de complejos [11-12, 19].

A nivel traza el Cr(III) es un elemento esencial para el cuerpo humano ya que actúa en procesos bioquímicos como en el metabolismo de lípidos, proteínas y del colesterol, la degradación de azúcar en la sangre (favorece la acción de la insulina), etc. Entre las especies más comunes se encuentran los iones de Cr^{3+} , el CrOH^{2+} o el $\text{Cr}(\text{OH})_3$, caracterizados por su baja solubilidad y su poca movilidad. La adsorción del Cr(III) se incrementa con el pH, pero se reduce con la presencia de otros cationes [15-16, 19].

El Cr(III) se encuentra en diversos granos, frutas y verduras, carnes o levaduras. Un déficit de este puede provocar trastornos metabólicos relacionados con problemas de corazón [1] e incluso, también se ha visto una relación directa entre su deficiencia y la utilización anormal de la glucosa en la sangre, ocasionando un incremento de los requerimientos de insulina (diabetes de tipo 2) [21]. Sin embargo, una excesiva ingesta

también puede llegar a causar alteraciones cutáneas [1]. La Junta de Alimentos y Nutrición del Instituto de Medicina de Estados Unidos (FNB-IOM) estableció una ingesta adecuada de cromo de entre 20 y 35 µg/día para adultos, no debiendo superar los 20-25 µg/día en el caso de mujeres y los 30-35 µg/día en varones. Estos valores son muy inferiores si nos referimos a bebés (0.2-5.5 µg/día), niños (entre 11-20 µg/día, aproximadamente) y ascienden si se trata de mujeres embarazadas (29-30 µg/día) o en periodo de lactancia (sobre 45 µg/día) [21].

El Cr(VI) por su parte es un contaminante industrial tóxico para los organismos pues presenta una estructura química similar a la de aniones como SO_4^{2-} o PO_4^{3-} , lo que le facilita la penetración a través de las membranas biológicas. Su adsorción disminuye a valores altos de pH o cuando existen aniones disueltos en el medio. Entre las especies de Cr(VI) destacan algunas como HCrO_4^- , CrO_4^{2-} o $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Estas son más solubles en agua y más móviles que las especies de Cr(III), aunque la presencia de Fe(II) o materia orgánica, inhiben la movilidad del cromo hexavalente. La exposición a Cr(VI) puede provocar desde malestar estomacal o problemas cutáneos hasta dañar órganos internos, alterar el material genético, o en casos extremos, la muerte [1, 8, 15].

Por su rápida capacidad de migración y por su elevado poder de oxidación, los compuestos de Cr(VI) son capaces de producir alteraciones en el ADN y el ARN y están considerados cancerígenos. Su implicación directa en el cáncer de piel y estómago es bien conocida, así como problemas en dientes, en el aparato respiratorio o en las membranas mucosas [17].

Por tanto, la monitorización del Cr(VI) en los diferentes compartimentos ambientales es de vital importancia, debido por un lado a su toxicidad y por otro a su elevada movilidad, lo que facilita su dispersión y el acceso a organismos vivos [1, 11, 15, 17-19].

4.2.2. Distribución del cromo en el medioambiente y legislación

La presencia de cromo en los diferentes compartimentos ambientales (Ver **Figura 1**) puede tener origen natural o antropogénico. Si dicho elemento forma óxidos e hidróxidos con otros metales presentes en los diferentes minerales del suelo (como es el caso del hierro, el aluminio, el manganeso, etc.), pasará así a absorberse en compuestos orgánicos que luego llegan a nosotros por diferentes vías: tanto cutánea, como por ingestión o inhalación [1, 9].

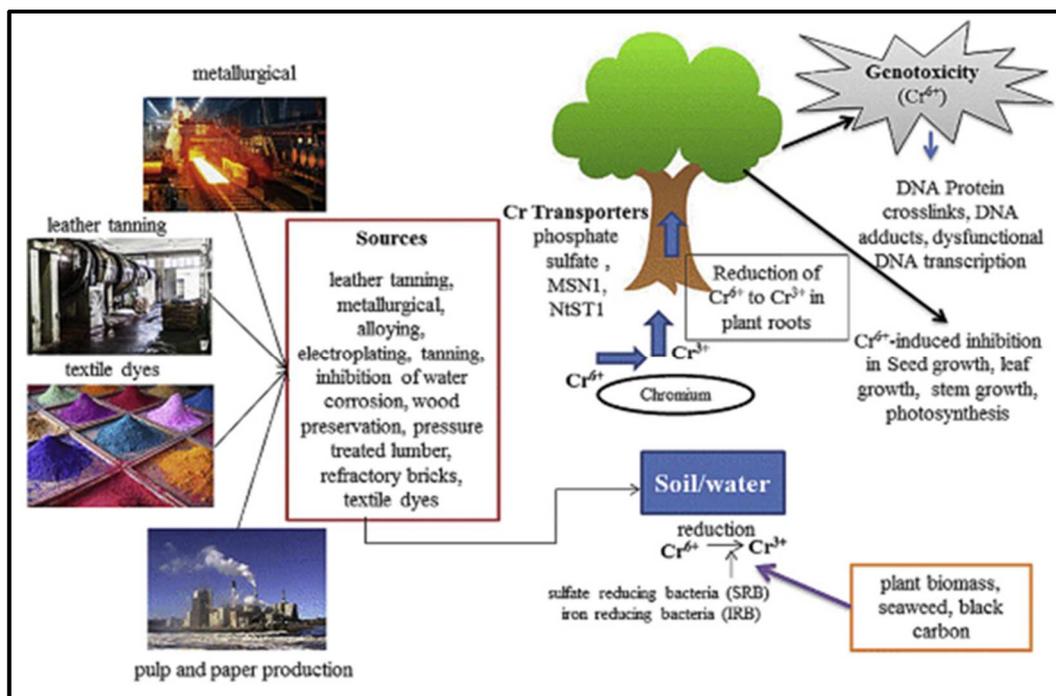


Figura 2. Distribución del cromo en compartimentos ambientales [9]

4.2.2.1. Suelos

La concentración de cromo varía significativamente de unos suelos a otros ya que depende del tipo de roca que lo forme. La mayor parte de los suelos contienen niveles de cromo entre 15 y 100 $\mu\text{g/g}$, aunque otras fuentes los fijan entre 5-1500 $\mu\text{g/g}$ [9, 11]. Por otra parte, las especies de Cr(III) y Cr(VI) varían en cuanto a su adsorción y disponibilidad en suelos y plantas [9].

El cromo de origen mineral se encuentra en su mayoría como Cr(III) en los suelos, ya que es el estado de oxidación más estable. Éste, siendo esencial para los seres humanos, no lo es para las plantas. La transferencia del cromo desde el suelo hacia las plantas dependerá de las propiedades del suelo y de la propia fisiología de la vegetación. Normalmente el metal queda retenido en los tejidos de las raíces evitando su disponibilidad, a excepción de condiciones extremas. En casos de temperaturas elevadas o de la presencia que metales en el suelo como el manganeso, el Cr(III) se oxidaría a Cr(VI), provocando efectos tóxicos en las plantas. Algunos de estos son: daños en las raíces, alteración de las actividades enzimáticas y del material genético, reducción de los pigmentos, modificaciones en la estructura de cloroplastos y células, aminoración de su crecimiento, etc [9, 11].

El Cr(VI) se puede considerar móvil en suelos con concentraciones bajas de materia orgánica. Se reduce a Cr(III) con la presencia de esta o con la acidificación del

suelo, y puede encontrarse presente en los propios suelos o filtrarse para las aguas subterráneas. Por este motivo, en su distribución afectarán factores como la propia textura del suelo, el pH, la cantidad de materia orgánica o la presencia de agentes reductores [1, 11].

El consumo de alimentos procedentes de suelos contaminados puede poner en riesgo nuestra salud. Para ello la legislación de los diferentes países de la Unión Europea establece niveles máximos de cromo total en muestras de suelo con uso agrícola. Dicha concentración es muy variable, mientras que en Serbia [50] y Turquía [52] se establece en 100 mg/kg, en Francia [53] en 150 mg/kg, en la República Checa entre 100-200 mg/kg [50] y en España en 200 mg/kg [61]. Del mismo modo, en las distintas comunidades autónomas españolas se fijan valores máximos para la concentración de este metal pesado. Por ejemplo, en Galicia se acepta un máximo de 80 mg/kg [55], en Madrid de 90 mg/kg [56], en Andalucía de 100 mg/kg [62], en la Rioja de 135 mg/kg [57] y en el País Vasco de 200 mg/kg [58].

4.2.2.2. Aguas

Generalmente la concentración de cromo en aguas es relativamente baja y los equilibrios redox y las reacciones de complejación y adsorción que tienen lugar, siguen cinéticas de transformación rápidas ($<10^{-10}$ s). Por ello la detección de este metal en aguas implica el uso de métodos sensibles [11, 13].

En la química del agua, las reacciones más comunes se clasifican en: reacciones redox (las más importantes), de intercambio de ligando y de transferencia de fases (adsorción-desorción, co-precipitación o coagulación). Estas condicionarán las especies químicas del metal que están presentes, al igual que lo hacen otros factores como la salinidad del medio, la actividad microbiológica, la presencia de organismos vivos, la actividad humana, etc [13].

La formación de hidróxidos metálicos juega un importante papel, ya que el Cr(III) coprecipita con muchos de ellos e incluso forma complejos y se absorbe en sedimentos a valores de pH elevados. Las sales de Cr(VI) son más solubles y más tóxicas, siendo relevante el estado de oxidación en que se encuentra [11].

Las principales especies de cromo en agua de mar se encuentran como nutrientes y son los aniones CrO_4^{2-} (2-5 nmol/kg) y NaCrO_4^- (4 nmol/kg) [14]. El cromo total en aguas oceánicas oscila entre 2 y 5 nM [13] y no suele perjudicar a la biota, excepto si se encuentran a concentraciones elevadas [1].

4.2.2.3. Aire

Al igual que sucede con los sistemas acuáticos, las concentraciones de cromo en aire suelen ser comúnmente bajas. Con todo, existen importantes diferencias dependiendo del grado de industrialización de la zona. Así, mientras el aire de zonas rurales presenta concentraciones de cromo inferiores a 10 ng/m^3 [28] (generalmente entre $59 \cdot 10^{-6}$ y $1.29 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{g/m}^3$ [9]), el de zonas urbanas puede alcanzar los 30 ng/m^3 [28] (suele estar entre 0.015 y $0.03 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ [9]). Existen otros factores como el tabaco que puede incrementar desde 10 hasta 400 veces la concentración de dicho metal en una zona cerrada, con respecto a su análisis al aire libre [28].

Aunque no se haya establecido un claro nivel de exposición al cromo, diversas instituciones consideran ciertos límites máximos. Así, la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de Estados Unidos (OSHA) y el Instituto Nacional para la Salud y Seguridad Ocupacional (NIOSH) fijan 0.005 mg/m^3 y 0.5 mg/m^3 como las concentraciones máximas de exposición al Cr(VI) y al Cr(III) respectivamente, durante una jornada de ocho horas de trabajo [12, 28]. Exposiciones a niveles en el aire con concentraciones de Cr(VI) superiores a 50 mg/m^3 han sido directamente relacionadas con el cáncer de órganos del aparato respiratorio, además de otras enfermedades como dermatitis o úlceras [12].

4.2.2.4. Legislación

Muchas legislaciones se refieren al cromo total, pero para el análisis de su toxicidad y biodisponibilidad su especiación es de vital importancia, ya que varía mucho de una especie de cromo a otra [15].

Respecto al agua de consumo, la concentración de Cr(VI) aunque suele ser inferior a $2 \text{ } \mu\text{g/L}$, ha llegado a alcanzar valores de hasta $120 \text{ } \mu\text{g/L}$ [29], por ello es relevante su legislación. Tanto la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (USFDA) como la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (USEPA) han estipulado $10 \text{ } \mu\text{g/L}$ como la concentración máxima de Cr(VI) en agua de consumo [18], mientras que la Organización Mundial de la Salud (OMS) [26] y el Gobierno Chino [27] establecen $50 \text{ } \mu\text{g/L}$. En España, en el Real Decreto 140/2003 del 7 de febrero, se fija una concentración máxima de $50 \text{ } \mu\text{g/L}$ para el cromo total en aguas de consumo humano [36]. En el caso de las aguas superficiales el Real Decreto 817/2015 del 11 de septiembre, fija como concentración máxima para el Cr(VI) y el cromo total $5 \text{ } \mu\text{g/L}$ y $50 \text{ } \mu\text{g/L}$ respectivamente [37].

Como las especies de cromo en su estado hexavalente son potencialmente cancerígenas y mutagénicas para el ser humano, cabe destacar la legislación existente

para diferentes productos cotidianos. Así, en las pinturas, madera, plásticos o productos textiles que puedan contener los juguetes, la concentración de Cr(VI) debe estar en el rango de 0.005-0.3 µg/g [8, 23]. En lo que respecta a los artículos de cuero que vayan a entrar en contacto con la piel, estos no se pueden comercializar si el Cr(VI) supera la concentración de 3 mg/kg [22] y en el caso de las levaduras comerciales, que suelen contener de 230 a 300 mg de cromo/kg, el contenido de cromo (VI) no debe sobrepasar el 0,2 % del cromo total [24].

4.3. Especiación del cromo

El estudio de la especiación de metales, metaloides y compuestos orgánicos es importante para conocer la bioquímica de las reacciones presentes y su impacto ambiental. La IUPAC define el concepto de “especiación” como todo proceso que pone de manifiesto las formas atómicas y moleculares de una especie química. Este término engloba tanto la distribución del analito como los métodos empleados para su identificación y cuantificación [13, 30].

En la especiación de cualquier metal es importante tener presentes los factores que pueden influir. Tienen mayor peso la fuerza iónica, el pH y el potencial redox (pE), que determinan la formación de los complejos, su estado de oxidación y los equilibrios ácido-base y/o de oxidación-reducción que tienen lugar. Otros factores como la temperatura, la presión, la cinética de las reacciones, la presencia de componentes solubles o las condiciones sinérgicas y antagónicas, también afectan a la estabilidad de las especies del medio [30].

La especiación de cromo en agua presenta cierta complejidad, pues en dicho compartimento ambiental los metales suelen estar en concentraciones ultra-traza. Por ello, suele ser necesaria una pre-concentración para lo que se pueden emplear diferentes técnicas de extracción (extracción líquido-líquido, de intercambio iónico, etc.). Además, es necesario el empleo de una técnica instrumental de elevada sensibilidad como la espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) o la espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETA-AAS) que consiguen límites de detección de µg/L o inferiores. En la mayor parte de los procedimientos de especiación, se analiza el cromo total y el Cr(III) y, por diferencia, se calcula la cantidad de Cr(VI) [30].

4.3.1. Micro-extracción dispersiva líquido-líquido (DLLME)

Una buena técnica para la especiación de metales debe ser sensible, simple, selectiva, rápida, de bajo coste, debe emplear poco volumen de muestra y de disolventes orgánicos tóxicos (Química Verde). Para la determinación de cromo en

aguas, la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) cumple con estos requisitos [31].

Se trata de una técnica de extracción y pre-concentración de analitos de muestras acuosas utilizando una mezcla entre un disolvente dispersante polar y miscible con el agua y un disolvente de extracción inmisible y, generalmente, más denso que el agua. Cuando el analito de interés se encuentra como un ion simple, suele ser insoluble en disolventes orgánicos, por lo que a menudo se transforma en iones complejos u otros compuestos solubles antes de aplicar DLLME [15, 31].

Esta técnica consiste en poner en contacto la muestra con la mezcla de disolventes, gracias a la ayuda del dispersante, el disolvente de extracción forma una nube de pequeñas gotas, asegurando una superficie de contacto elevada que permite alcanzar el equilibrio rápidamente. La solución se centrifuga, consiguiendo la separación de la gota del agente extractante en la que se encuentran las especies metálicas de interés. Finalmente, se recoge la gota con una microjeringa para su análisis [15, 31].

Además de la elección del agente extractante y el dispersante, en DLLME también son importantes otros factores como el tiempo de extracción, el pH y la fuerza iónica del medio. Se ha mostrado que el efecto salino creado al añadir NaCl a la disolución, facilita la interacción entre el agente extractante y las especies de Cr(VI) disminuyendo la solubilidad de estas [31].

La microextracción líquido-líquido dispersiva puede combinarse con diferentes técnicas de análisis como la espectroscopía de absorción atómica de llama (FAAS), la espectrometría de masas de ruptura inducida por láser (LIBS), la espectroscopía de rayos X (RX), la espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) o la espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito (GFAAS) [31].

En la **Tabla 3** se muestra diferentes métodos de DLLME empleados para determinación de especies de cromo.

Tabla 3. Métodos de DLLME para la determinación de especies de cromo

Fuente	Quelatante	Dispersante	Extractante	Volumen muestra	Surfactante	Técnica análisis
[38]	TTA	Agitación	CHCl ₃	10 mL	Tritón X-100	GFAAS
[39]	DDTC	Etanol	1-undecanol	9 mL	NO	LIBS
[40]	APDC	Agitación	[C ₈ MIm] ₂ [NTf ₂]	10 mL	Tritón X-114	GFAAS
[8]	NO	Ultrasonidos	TBP	10 mL	NO	GFAAS
[41]	APDC	Ultrasonidos	[H _{mim}][PF ₆]	8 mL	NO	GFAAS
[42]	APDC	Metanol	CCl ₄	7,5 mL	NO	RX
[43]	DPC	Agitación	[C ₄ H _{mim}][BF ₄]	10 mL	NO	FAAS
[44]	DPC	Ultrasonidos	1-undecanol	10 mL	SDS	GFAAS
[45]	DDTC	Agitación	[H _{mim}][PF ₆]	10 mL	NO	ICP-AES
[32]	APDC	Etanol	1-undecanol	10 mL	NO	HR-CS FAAS
[46]	APDC	Etanol	CCl ₄	5 mL	NO	FAAS
[15]	NO	Ultrasonidos	TBP	9 mL	NO	GFAAS
[17]	DPC	Etanol	CHCl ₃	5 mL	SDS	UV-VIS
[59]	NO	Agitación	Tolueno:CCl ₄ :CH ₃ CN	10 mL	NO	UV-VIS
[60]	APDC	Ultrasonidos	[H _{mim}][PF ₆]	5 mL	Tritón X-114	GFAAS

En estos trabajos, los agentes de extracción más empleados son algunos más densos que el agua como el cloroformo [17, 38] o el tetracloruro de carbono [42, 46, 59], otros de menor densidad como el 1-undecanol [32, 39, 44] o el tributilfosfato [8, 15] y algunos líquidos iónicos, tales como la 1-metil-3-octilimidazolio bis [trifluorometilsulfonil] imida ([C₈MIm]₂[NTf₂]) [40], el hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio ([H_{mim}][PF₆]) [41, 45, 60] o el tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio ([C₄H_{mim}][BF₄]) [43].

Respecto a los dispersantes los más comúnmente empleados son la agitación [38, 40, 43, 45, 59] o la aplicación de una etapa de ultrasonidos [8, 15, 41, 44, 60];

aunque algunos autores emplean disolventes como el etanol [17, 32, 39, 46] o el metanol [42].

En varios de los artículos que se referencian emplean también agentes quelatantes orgánicos como el tolitriazol (TTA) [38], el diclorodifeniltricloroetano (DDTC) [39, 45], el pirrolidinditiocarbamato amónico (APDC) [32, 40-42, 46, 60] o el 1,5-difenilcarbocida (DPC) [17, 43-44]. Los compuestos organometálicos formados son ligeramente apolares, por lo que en su mayoría presentan elevada solubilidad en disolventes orgánicos y baja en agua.

Por otra parte, en algunos de los artículos citados anteriormente se hace uso de agentes surfactantes, que presentan un grupo polar y otro apolar, y cuando se encuentran en una interfase de dos medios inmiscibles disminuyen la tensión superficial [47]. Los más frecuentes son los polietilenglicoles Tritón X-100 [38] y Tritón X-114 [40, 60]; y el dodecilsulfato sódico (SDS) [17, 44].

Las principales ventajas de DLLME son su simplicidad y bajo coste, el poco tiempo requerido para llevar a cabo una completa extracción y el pequeño volumen de muestra necesario [31]. El volumen de muestra comúnmente empleado es 10 mL [8, 32, 38, 40, 43-45, 59], pero puede ser inferior (ver **Tabla 3**). El principal problema que presenta esta técnica es la selección adecuada de la mezcla de disolventes (extractante y dispersante), puesto que pueden producirse pérdidas de analito si la mezcla y proporción no es la adecuada. Este problema puede evitarse, sustituyendo el dispersante por una etapa de agitación o con ultrasonidos.

4.3.2. Espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito

La espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica fue desarrollada a principios del siglo XX y sigue siendo una técnica con un gran número de aplicaciones. Se usa principalmente cuando no se dispone de mucha cantidad de muestra o bien si son necesarios bajos límites de detección en la medida [33].

El mecanismo de esta técnica se basa en que una radiación de una determinada longitud de onda llega hasta la muestra atomizada gaseosa y los átomos absorben radiación para pasar a un estado excitado. Para llevar a cabo este proceso tienen lugar cuatro tipos de reacciones: la conversión de las sales en óxidos metálicos, la evaporación de estos antes de la atomización, su disociación térmica y finalmente, la reducción del óxido: $MO (s/l) + C(s) \rightarrow M (g) + CO (g)$. Además la cinética juega un importante papel, ya que la velocidad de formación de átomos libres será igual a la de eliminación, y esta diferencia para un cierto tiempo será lo que veamos en el pico obtenido [33].

Teniendo esto en cuenta, el proceso que tiene lugar en un atomizador de grafito como el que se muestra en la **Figura 2** es el siguiente: con ayuda de una jeringa o un automuestreador se inyectan la muestra en el orificio central del tubo de grafito, el horno situado en el interior de una carcasa metálica se calienta eléctricamente de manera transversal, asegurando una mayor uniformidad en la temperatura que si el calentamiento fuese longitudinal [34-35]. Se realiza una refrigeración continua del tubo con agua y se purga con un gas inerte, generalmente argón, que fluye por el exterior de la cámara, impidiendo así la entrada del aire y la incineración del tubo. Además, un flujo interno de gas inerte arrastra posibles vapores procedentes de la descomposición de la matriz [33-34].

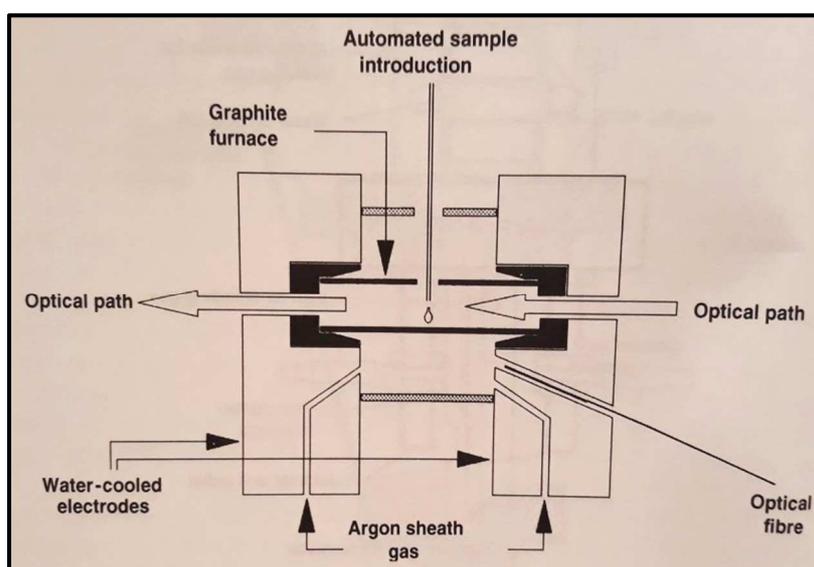


Figura 2. Esquema de un horno de grafito [33]

En esta técnica, es clave es el estudio del programa de temperaturas empleado. Este incluye una etapa de secado, una de mineralización, la atomización y una o varias etapas de limpieza. Inicialmente la muestra se evapora para la eliminación del disolvente a una temperatura próxima a la de ebullición del mismo. A continuación, se aumenta la temperatura (generalmente entre 300-1500°C) para eliminar la materia orgánica de la muestra y las sales volátiles, es la etapa de mineralización. El siguiente paso es la atomización, para ello se eleva la temperatura con rapidez (2000-3000°C). Se trata del paso crítico ya que una mala elección de la temperatura puede disminuir mucho la precisión, exactitud y/o sensibilidad del método [34]. Si la temperatura es muy elevada se dañaría el tubo y por el contrario, si esta es demasiado baja no se consigue la atomización completa y se pierde sensibilidad. Finalmente, se realiza uno o varios

programas de limpieza, a unos 200-300°C por encima de la temperatura de atomización para eliminar restos de la matriz [33].

Es importante destacar que el tubo empleado suele ser de grafito pirolítico para evitar la formación de carburos, disminuir la porosidad e incrementar la resistencia al ataque químico. Su tamaño más habitual es de 20-30 mm de longitud y de 5-10 mm de diámetro [33]. Siempre tiene ambos extremos abiertos y puede presentar o no plataforma de L'Vov, que solo toca las paredes del tubo retrasando la atomización y permitiendo un calentamiento más uniforme. Peso a esto, el volumen de muestra que se puede depositar en ella es inferior y su uso implica establecer temperaturas algo más elevadas en el programa [34].

La espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica presenta ciertas ventajas como su elevada sensibilidad, el poco volumen de muestra necesario para el análisis, el trabajo en la región ultravioleta del espectro, el tratamiento "in situ" de la muestra (llevándola directamente a cenizas con ácidos y ajustando el programa de temperaturas), la posibilidad de análisis directo de muestras sólidas, la seguridad operacional y la operación desatendida con el uso de automuestreadores [33]. Sin embargo, también muestra algunas desventajas como la duración de sus programas (varios minutos, mientras que en llama o plasma son segundos), baja precisión al no medir señales continuas, la tediosa optimización del programa de temperaturas y el riesgo de pérdida de homogeneidad al usar poca cantidad de muestra. La desventaja más importante es la existencia de interferencias que se pueden evitar o minimizar con una correcta optimización del programa de temperaturas, con el empleo de modificadores de matriz o con el uso de la plataforma de L'Vov [33].

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Materiales y equipos

- Agitador automático Vibrax-VXR IKA.
- Balanza analítica, precisión 0.0001 g AND, modelo ER-180.
- Centrífuga Eppendorf, modelo 5804.
- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer, modelo 4100, equipado con cámara de grafito modelo HGA-700, sistema corrector de fondo de lámpara de deuterio y automuestreador AS-70.
- Lámpara de cátodo hueco de cromo, marca Agilent.
- Material de uso común del laboratorio.
- Micropipetas Eppendorf de 10-100 μL , 20-200 μL y 100-1000 μL .
- Tubos de grafito pirolítico.
- Ultrasonidos J.P. Selecta, modelo ultrasonidos-H.

5.2. Reactivos

- Ácido clorhídrico (37.7%) J.T. Baker Instra-Analyzed Reagent.
- Ácido nítrico (69.0-70.0%) J.T. Baker Instra-Analyzed Reagent.
- Agua de mar sintética Sigma-Aldrich.
- Agua Milli-Q (resistividad específica = 18M Ω /cm), Millipore.
- Cloruro sódico ($\geq 99.5\%$) Sigma-Aldrich.
- Disolución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Sigma-Aldrich.
- Disolución patrón de Cromo (III) (995 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Sigma-Aldrich.
- Disolución patrón de Cromo (VI) (995 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Sigma-Aldrich.
- Metanol calidad gradiente HPLC, Merck.
- Tributil fosfato (TBP) (99.0 %) GC, Sigma-Aldrich.

5.3. Preparación de disoluciones patrón

A partir de las disoluciones individuales comerciales de cromo (VI) y cromo (III), se preparan disoluciones de 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ y a partir de éstas se preparan las disoluciones de trabajo que se emplearán para la optimización del método de extracción y la validación del método.

Todas las disoluciones de trabajo se preparan diariamente partiendo de las disoluciones patrón de cromo y diluyendo en agua Milli-Q las cantidades correspondientes.

Se preparan también patrones de Cr(VI) y Cr(III) simulando la fase orgánica (proporción de TBP y HNO₃ en metanol) que presentarán los extractos obtenidos tras el procedimiento de extracción.

5.4. Método de extracción

El método de extracción utilizado es la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). Como se muestra en la **Figura 3**, el procedimiento de extracción consiste en adicionar a la muestra (10 mL) 1 mL de HCl 5M, 200 µL de TBP y agitar durante 10 minutos a 1200 rpm. De este modo se obtiene una nube de micro-gotas que favorece el contacto entre ambas fases, pasando el cromo presente en la fase acuosa al agente de extracción. A continuación, la disolución se centrifuga durante 2 minutos a 2000 rpm, concentrándose las pequeñas gotas en una sola de mayor tamaño. En esta última etapa se produce la separación de las fases, quedando el extractante en la parte superior del tubo de extracción. La muestra se deja en reposo unos minutos y se recogen 100 µL de la fase orgánica que se diluyen con 200 µL de HNO₃ 0.1 M en metanol. Finalmente se determina la cantidad de Cr(VI) o Cr(III) en el extracto mediante espectroscopía de absorción atómica con cámara de grafito.

5.5. Lavado de material

Es importante que el material esté lavado correctamente para evitar cualquier fuente de contaminación que pueda producirse durante el procedimiento, ya que se está trabajando a niveles traza (µg/L). Por este motivo, el material utilizado se somete al siguiente protocolo de limpieza: una vez usado, se lava correctamente con agua y jabón y se enjuaga con agua Milli-Q. Se sumerge durante al menos 24 horas en HNO₃ al 10% y antes de su próximo uso, ha de enjuagarse de nuevo tres veces con agua Milli-Q.

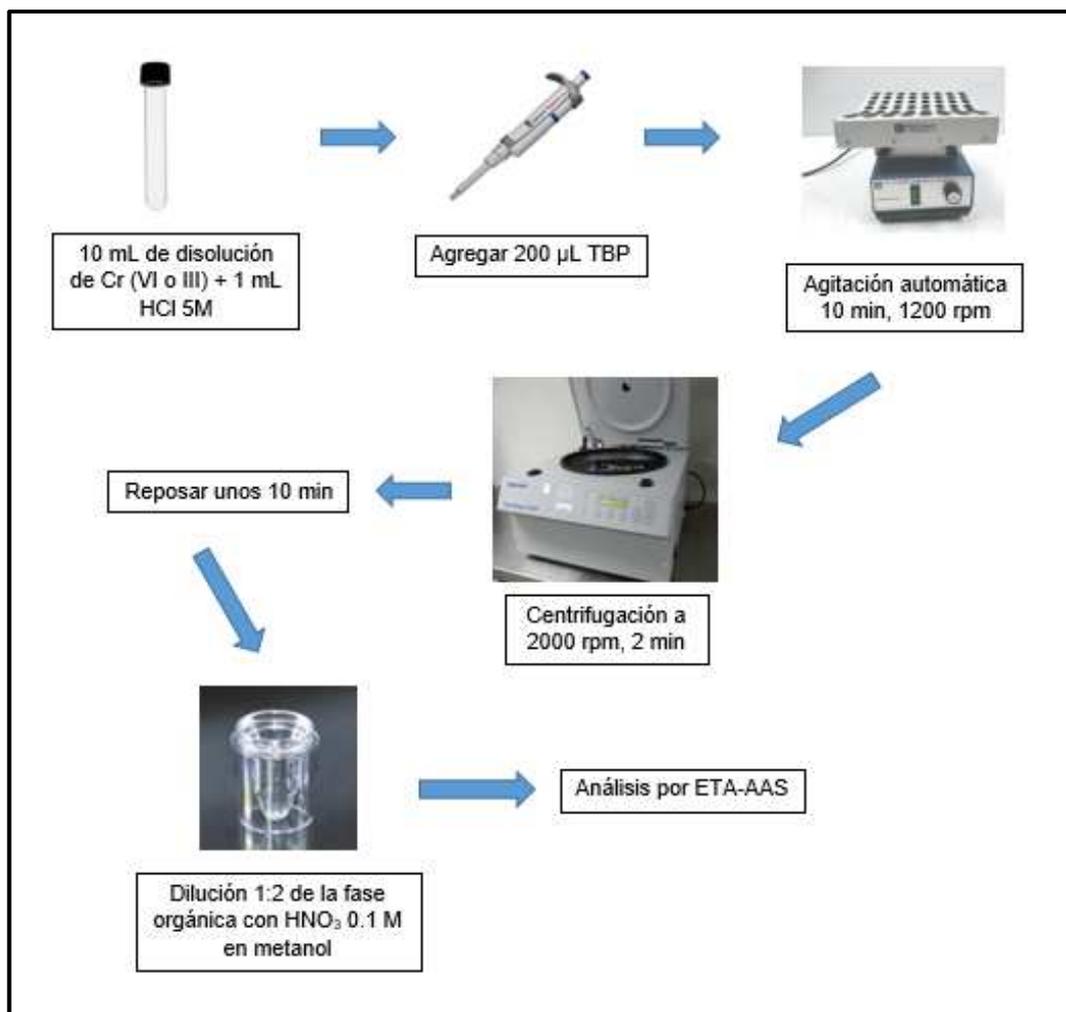


Figura 3. Esquema del procedimiento de extracción

5.6. Análisis por ETA-AAS

Para la determinación de cromo por el método de espectroscopía atómica con atomización electrotérmica (GFAAS) se ha trabajado bajo las siguientes condiciones:

- Corriente aplicada: 10 mA
- Longitud de onda: 357.9 nm
- Rendija: 0.7 nm
- Tubo de grafito pirolítico
- Volumen de inyección: 10 µL

El programa de temperaturas empleado para la determinación de cromo (III) y cromo (VI) se muestra en la **Tabla 4**:

Tabla 4. Programa del horno de grafito

ETAPA	Temperatura (°C)	t rampa (s)	t calentamiento (s)	Flujo de Ar (mL/ min)
1º Secado	120	1	20	300
2º Secado	300	15	20	300
Mineralización	1500	15	15	300
Atomización	2600	0	5	0
Limpieza	2600	1	5	300

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Optimización del programa de temperaturas

6.1.1. Programa de temperaturas con patrones acuosos

En la etapa de secado, la temperatura ha de ser ligeramente superior a la de ebullición del disolvente, para asegurar su eliminación total. Como en este caso tenemos agua, se escoge la temperatura de 120°C. Sin embargo, dado que el disolvente de extracción que se va a emplear (TBP) tiene un punto de ebullición relativamente alto (289°C), se decide poner una segunda etapa de secado a 300°C. Respecto a la etapa de limpieza tras la atomización, se lleva a cabo a la misma temperatura que la atomización con flujo de argón máximo para eliminar los restos de analito que hayan podido quedar en el tubo y minimizar así las contaminaciones por el efecto memoria.

Se llevó a cabo el estudio de las temperaturas de las etapas de mineralización y atomización empleando disoluciones de Cr(VI) de concentración 1 µg/L en agua Milli-Q. Se analizó el empleo de dos modificadores de matriz, Mg(NO₃)₂ de concentración 6.1 10⁻³ % y HNO₃ al 1%.

Para la optimización de la temperatura de mineralización se realizó un estudio variando la misma desde 1000°C hasta 1800°C para obtener la que proporcione la máxima señal de absorbancia sin perder analito. Como recoge la **Figura 4**, las temperaturas óptimas de mineralización obtenidas para los modificadores de matriz estudiados han sido 1500°C y 1400°C para HNO₃ y Mg(NO₃)₂, respectivamente.

En la etapa de atomización se busca la mínima temperatura que nos proporcione la máxima señal. Se ha realizado un estudio entre 2000°C y 2600°C y, como muestra la **Figura 5**, el valor óptimo coincide independientemente de si hacemos uso del ácido nítrico o de la sal de magnesio. Se puede observar como en ambos casos el valor mínimo para la temperatura de atomización es de 2600°C.

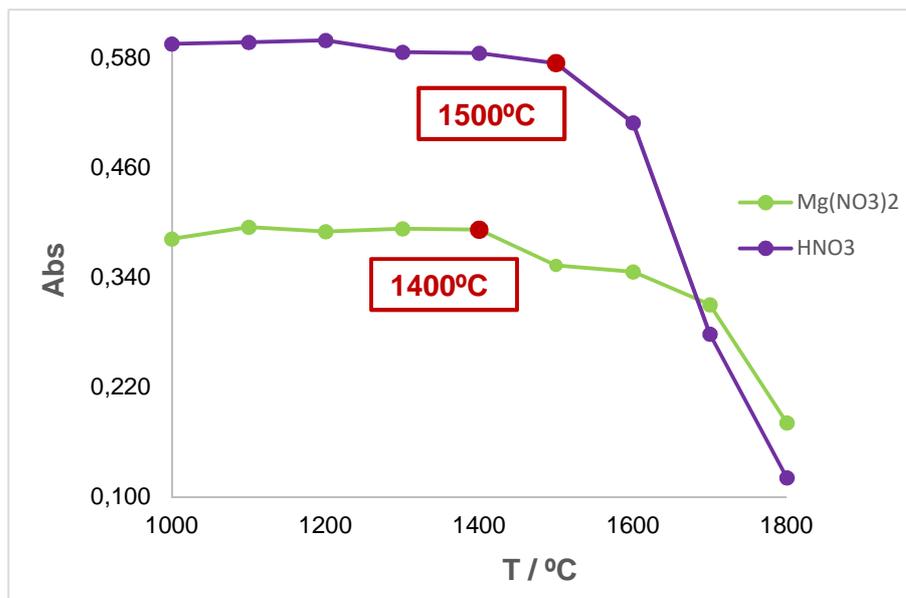


Figura 4. Curvas de mineralización de ambos modificadores de matriz

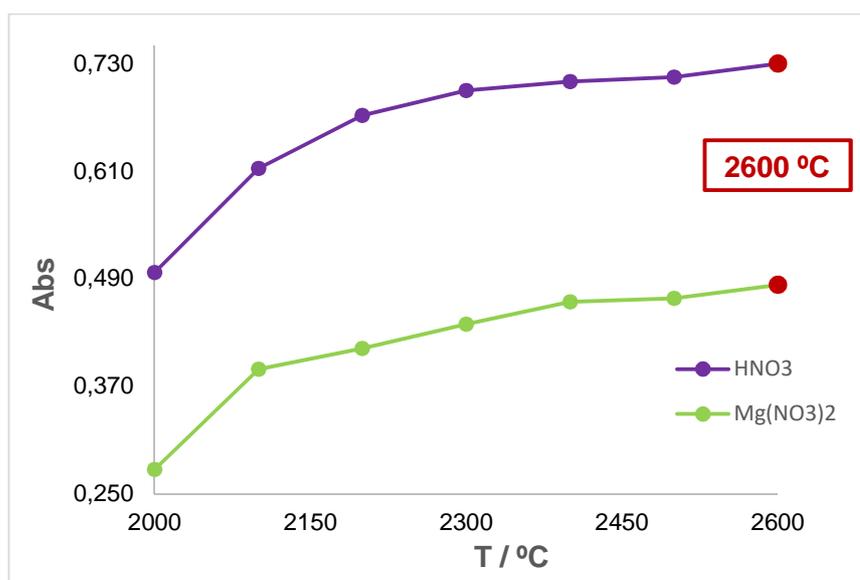


Figura 5. Curvas de atomización de ambos modificadores de matriz

A la vista de los resultados obtenidos y puesto que cuando se emplea HNO₃ como modificador se obtienen picos bien definidos, mientras que en el caso del Mg(NO₃)₂ los picos presentan cola, se escoge el HNO₃ como modificador de matriz.

El programa de temperaturas finalmente escogido se muestra a en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Programa de temperaturas de la cámara de grafito

ETAPAS	Temperatura (°C)	Tiempo de rampa (s)	Tiempo de calentamiento (s)	Flujo de Ar (mL/ min)
1º Secado	120	1	20	300
2º Secado	300	15	20	300
Mineralización	1500	15	15	300
Atomización	2600	0	5	0
Limpieza	2600	1	5	300

6.1.2. Programa de temperaturas con patrones de composición similar a los extractos

Se realizó un estudio del programa de temperaturas para patrones preparados con la misma matriz orgánica que la que presenta el extracto obtenido en el procedimiento de extracción. Se ensayaron las temperaturas de mineralización y atomización en los mismos rangos que para la sección 1.1. (aplicando el programa mostrado en la **Tabla 4**) y empleando un patrón de 1 µg/L de cromo (VI) preparado a partir de un patrón de 100 µg/L (100 µL), 300 µL de TBP y 600 µL de HNO₃ 0.1 M en metanol.

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 6**. Como puede observarse, de nuevo 1500°C es la temperatura óptima de mineralización, ya que nos ofrece la señal más alta de absorbancia y a partir de este punto esta empieza a decaer. De igual modo, 2600°C se puede considerar como la temperatura óptima de atomización, pues es el mínimo valor que nos permite tener una señal máxima.

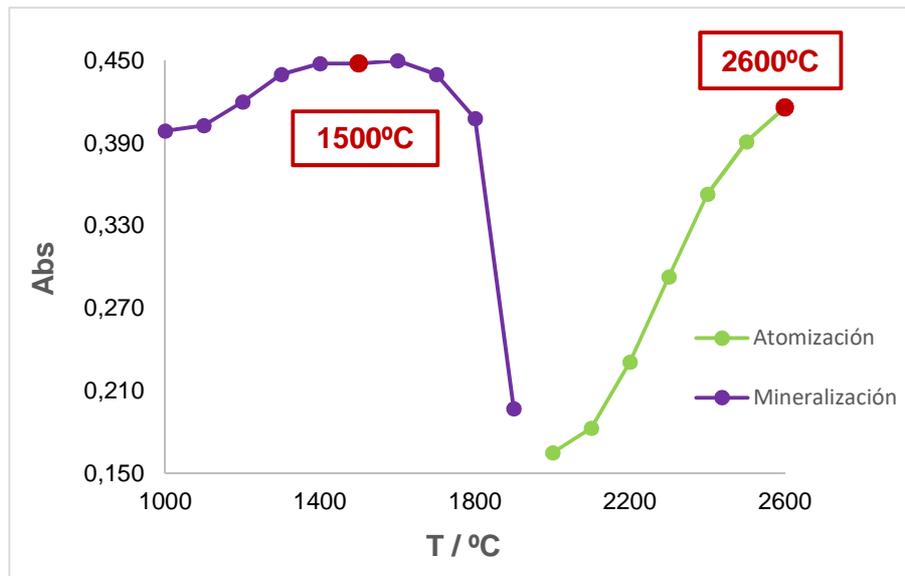


Figura 6. Curvas de mineralización y atomización empleando el HNO₃ como modificador de matriz

6.2. Optimización del método de extracción

El TBP [(CH₃CH₂CH₂CH₂O)₃PO] presenta baja solubilidad en agua (6g/L) y forma complejos hidrofóbicos estables con iones metálicos, que son solubles en disolventes orgánicos. En estudios previos se ha observado que el Cr(VI) puede ser selectivamente extraído en medio clorhídrico [8, 15, 63] y, por ello, se ha escogido como disolvente de extracción en este trabajo. Respecto al dispersante, tal y como han realizado en estudios previos [8, 15], se decide sustituir el mismo por ondas de ultrasonidos, puesto que las microburbujas generadas por la cavitación promueven la formación de pequeñas gotas del disolvente de extracción.

Para llevar a cabo la optimización del método de extracción es necesario estudiar los parámetros que influyen en la extracción (volumen de agente extractante, el pH del medio, la etapa de ultrasonidos y la centrifugación). Por otra parte, aunque el NaCl actúa facilitando la interacción del Cr(VI) con el extractante (TBP) por el “salting-out effect” que disminuye la solubilidad del Cr(VI) en la fase acuosa por la presencia de las sales inorgánicas [15], no se estudiarán cantidades de NaCl diferentes a 0.3 g, ya que ésta es la concentración presente en el agua de mar.

6.2.1. Optimización del volumen de TBP empleando ultrasonidos

Para realizar el estudio del volumen de TBP empleado en la extracción, se preparan disoluciones de 1 µg/L de cromo (VI) en 10 mL de agua Milli-Q a las que se añada 1 mL de HCl 5M, 0.3 g de NaCl y volúmenes variables del agente extractante

(150, 200 y 300 μL). Los estudios se realizan por duplicado. Las disoluciones se someten a una etapa en ultrasonidos durante 10 minutos y luego se centrifugan 5 minutos a 3500 rpm. La fase sobrenadante obtenida se recoge y se diluye con HNO_3 0.1M en metanol, para reducir la viscosidad de la fase orgánica. Para mantener constante en todas ellas la concentración de cromo las diluciones realizadas fueron 1:3, 1:2 y 1:1 respectivamente para los extractos de 150, 200 y 300 μL de TBP.

Además, se preparan patrones de cromo (VI) en TBP y HNO_3 0.1M en metanol que contengan la concentración final de los extractos (16.7 $\mu\text{g/L}$) y las mismas proporciones de TBP y HNO_3 0.1M en metanol que presentan los extractos obtenidos a partir de los volúmenes de 150, 200 y 300 μL de TBP para el cálculo de la recuperación.

En todos los estudios, se analizan tanto los blancos de procedimiento como los de los patrones. Los valores de absorbancia obtenidos se han empleado para corregir la señal. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 7**.

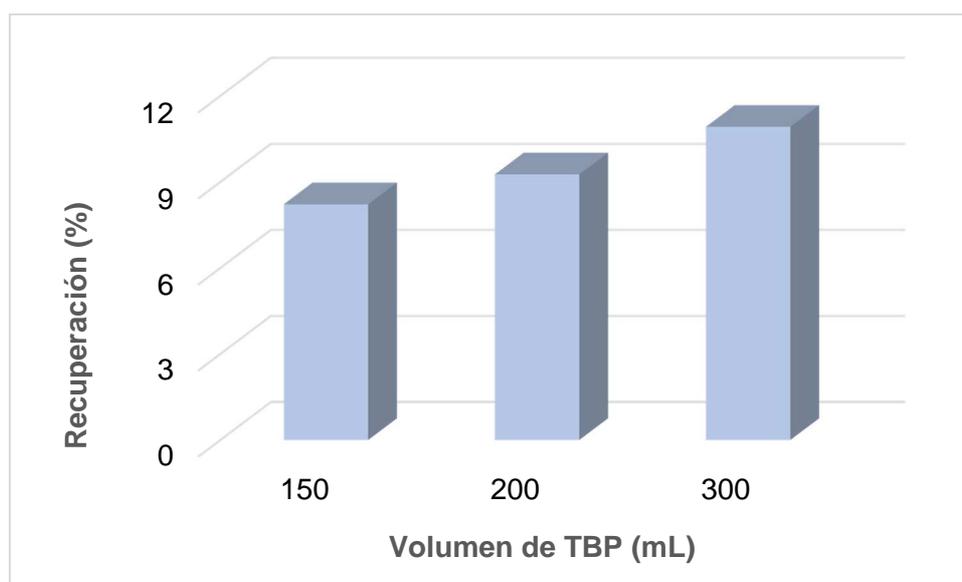


Figura 7. Influencia del volumen de TBP en la extracción de Cr(VI) empleando ultrasonidos

Como puede observarse, la extracción del cromo (VI) se incrementa al aumentar el volumen de TBP, pero se obtienen valores muy bajos de recuperación. Esto es debido, probablemente, al calentamiento de la muestra observado cuando se somete a la etapa de ultrasonidos, ya que la solubilidad del tributilfosfato en la fase acuosa aumenta cuando se produce un aumento de la temperatura. Esto da lugar, por un lado, a la obtención de un volumen inferior de extracto final y, por otro, a mayor dificultad para observar las microgotas de la fase orgánica (mayor transparencia de la disolución con

el calentamiento). Por ello, los mejores resultados para la transferencia desde la muestra acuosa al disolvente de extracción se obtienen a temperatura ambiente [8].

6.2.2. Optimización del volumen de TBP con agitación

Debido al problema de calentamiento en el baño de ultrasonidos, se ha decidido sustituir el empleo de ultrasonidos como dispersante por el empleo de agitación. El procedimiento descrito en el apartado anterior, se repite pero empleando una etapa de agitación automática (10 min a 1200 rpm) en lugar de ultrasonidos. Las disoluciones se someten a las mismas condiciones de centrifugación y las mismas diluciones.

En este caso, para todos los volúmenes de TBP estudiados, se obtiene una mayor recuperación que empleando ultrasonidos, observándose el mejor resultado para un volumen de 200 μ L (ver **Figura 8**). Por tanto, se escoge dicha cantidad de fase orgánica y agitación automática para los estudios posteriores.

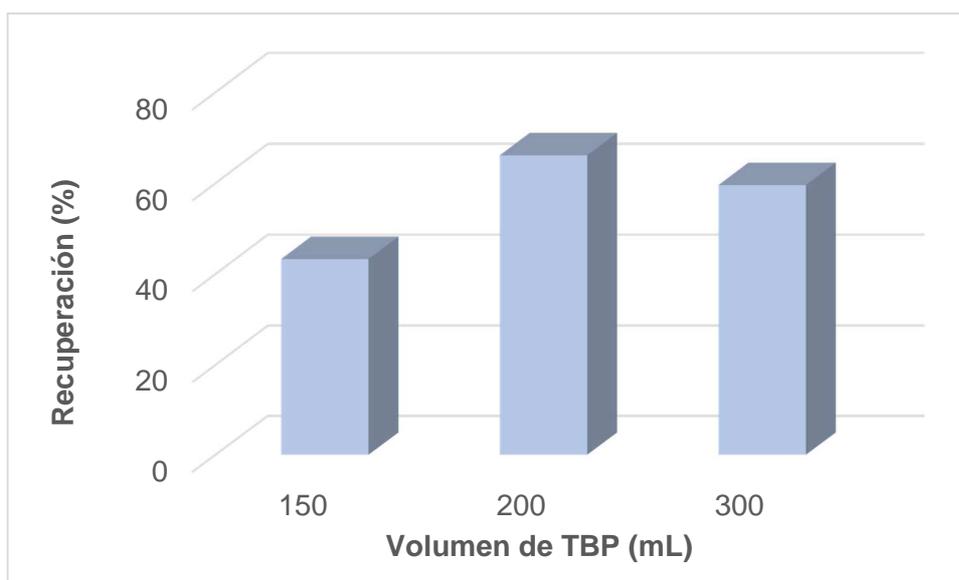


Figura 8. Influencia del volumen de TBP en la extracción de Cr(VI) empleando agitación automática

6.2.3. Optimización del volumen de HCl

Es necesario realizar un estudio de la acidez del medio que permita la extracción del Cr(VI) evitando la extracción del Cr(III). Para obtener el medio ácido se ha empleado HCl, ya que este ácido mejora la extracción de Cr(VI) con TBP, frente al HNO₃ o el H₂SO₄, debido al efecto sobre la extracción del Cr(VI) que han mostrado los iones cloruro [63].

Para este estudio, se preparan disoluciones de 1 $\mu\text{g/L}$ de cromo (VI) en 10 mL de agua Milli-Q, se les agrega 0.3 g de NaCl, 200 μL de TBP y volúmenes de 1.0, 1.5, 1.75 y 2 mL de HCl 5M, haciendo el análisis por duplicado en cada caso. Se someten a la etapa de agitación automática y se centrifugan durante 5 min a 3500 rpm. Por último, se recoge la fase sobrenadante y se realiza una dilución 1:2 con HNO_3 0.1M en metanol.

También se preparan por duplicado patrones de cromo (VI) en TBP y HNO_3 0.1M en metanol que contengan tanto la concentración final de los extractos (16.7 $\mu\text{g/L}$) como la proporción de TBP y HNO_3 0.1M en metanol. Como puede observarse en la **Figura 9** la mejor recuperación para el Cr(VI) se obtiene cuando se adiciona un volumen de ácido de 1 mL. No se han estudiado volúmenes menores de ácido ya que a mayor pH puede extraerse el cromo (III). Por tanto, se ha escogido 1 mL como el volumen de HCl óptimo para realizar la extracción.

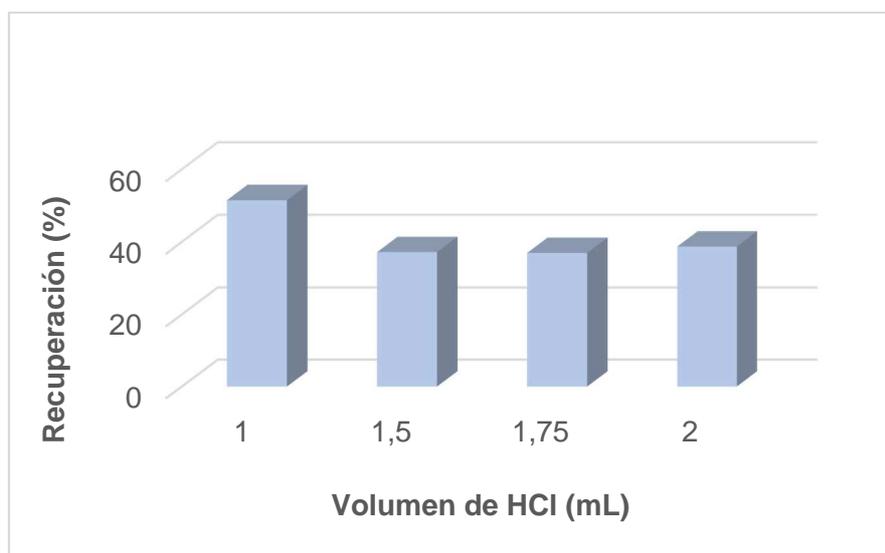


Figura 9. Influencia del volumen de HCl en la extracción de Cr(VI)

Para observar el comportamiento del Cr(III) en dicho medio ácido, se preparan dos disoluciones de cromo (III) de 1 $\mu\text{g/L}$ en 10 mL de agua Milli-Q y se someten al procedimiento de extracción empleando 1mL de HCl. La fase sobrenadante se diluye (1:2) con HNO_3 0.1M en metanol. Se analizan, por duplicado, patrones de 16.7 $\mu\text{g/L}$ de Cr(III) con la proporción de TBP y HNO_3 0.1M en metanol. La extracción del Cr(III) obtenida (20%) es relativamente baja.

6.2.4. Optimización del tiempo de agitación

Ouejhani et al. [63], empleando LLE convencional, han observado que 60s de tiempo de agitación son suficientes para la extracción cuantitativa de Cr(VI) con TBP. Además, observan que el empleo de mayores tiempos no produce efectos adversos en la extracción. Sin embargo, para optimizar esta etapa, se realizó un estudio variando el tiempo de la misma entre 10 y 30 min. Para ello, para cada uno de los tiempos ensayados, se realiza por duplicado el procedimiento de extracción descrito en el apartado anterior con el volumen de HCl 5M escogido (1mL).

Como puede observarse en la **Figura 10**, los resultados obtenidos coinciden con los observados por Ouejhani et al. [63]. El aumento en el tiempo de agitación no afecta a la extracción, siendo para una velocidad de 1200 rpm suficientes 10 minutos para alcanzar el equilibrio.

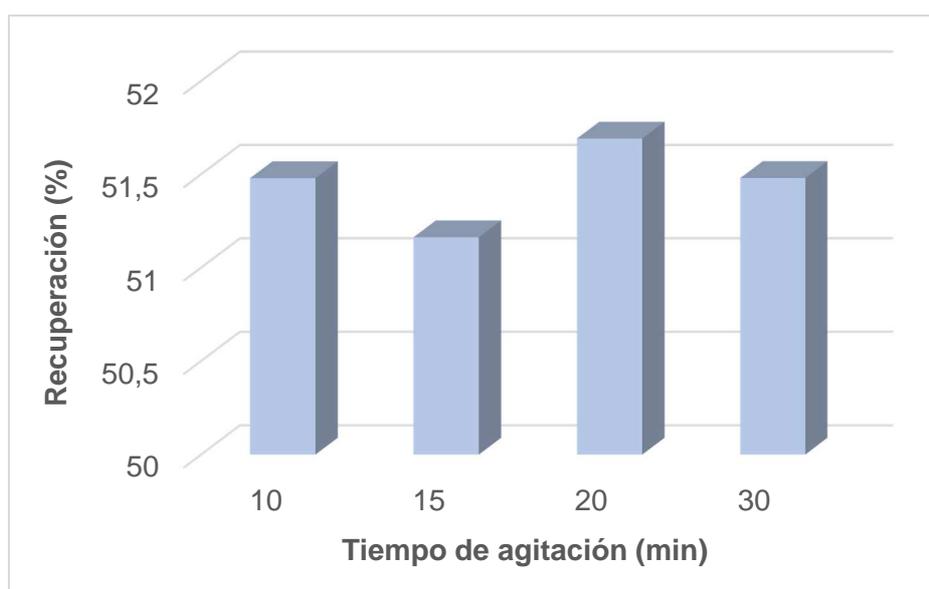


Figura 10. Influencia del tiempo de agitación en la extracción de Cr(VI)

6.2.5. Optimización de la centrifugación

Con el propósito de obtener una adecuada separación de la fase dispersa, se emplea una etapa de centrifugación. Para optimizar esta etapa, se emplean disoluciones de las especies de cromo de 1 $\mu\text{g/L}$ en 10 mL de agua Milli-Q, se les agrega 0.3 g de NaCl, 200 μL de TBP, 1 mL de HCl 5M y se someten a la etapa de agitación. Se estudian dos velocidades de centrifugación (2000 y 3500 rpm) empleando 5 min en ambos casos y la fase dispersa obtenida se diluye 1:2 con HNO_3 0.1M en metanol. Como en los

estudios anteriores, se preparan patrones de las especies en TBP y HNO_3 0.1M en metanol. Tanto los ensayos de centrifugación como los patrones se realizan por duplicado.

Como se muestra en la **Figura 11**, los resultados obtenidos para el Cr(VI) son similares en ambos casos, siendo ligeramente mejor la extracción cuando se emplean 3500 rpm. Sin embargo, en el caso del Cr(III) se observa un incremento en la extracción al disminuir la velocidad de centrifugación, pasando de no extraerse (1%) a 3500 rpm a un valor del 14% a 2000 rpm. Por tanto, las condiciones óptimas para la extracción selectiva del Cr(VI) es el empleo de 3500 rpm durante 5 min.

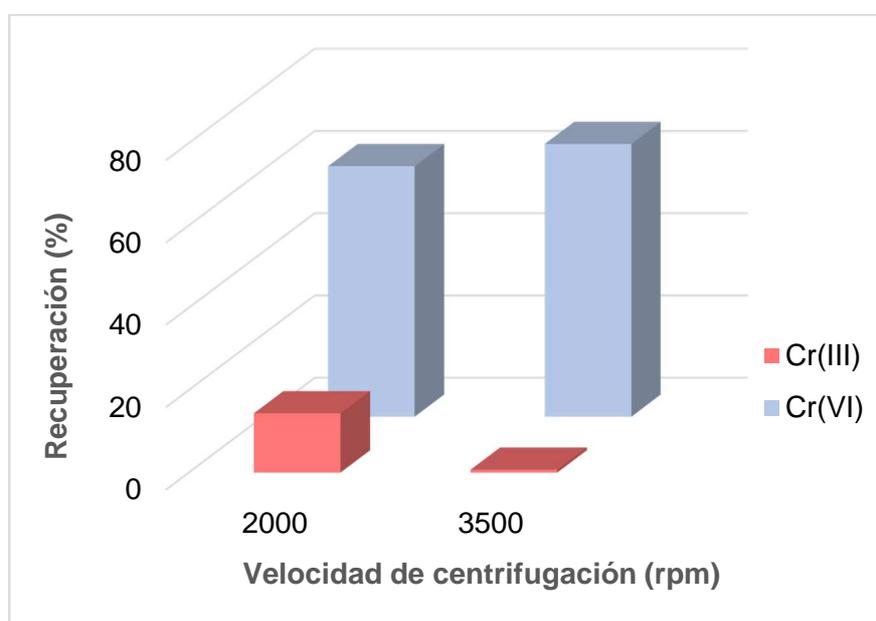


Figura 11. Influencia de la velocidad de centrifugación en la extracción de Cr(VI) y Cr(III)

6.2.6. Optimización de la ratio fase orgánica- fase acuosa

Se ha llevado a cabo un estudio de la ratio fase orgánica-fase acuosa manteniendo la concentración de las especies de cromo para ver si afecta a la extracción. Para ello, se preparan disoluciones de Cr(III) y Cr(VI) de $1 \mu\text{g/L}$ en 5 y 10 mL de agua Milli-Q a las que se les realiza el procedimiento de extracción descrito con anterioridad manteniendo constante el volumen de TBP empleado ($200 \mu\text{L}$). Los ensayos se realizan por duplicado.

Como se muestra en la **Figura 12**, la recuperación del Cr(III) se mantiene prácticamente constante al variar la relación fase orgánica-fase acuosa, siendo siempre un valor inferior del 1%. En cuanto a la del Cr(VI), se obtiene un resultado más favorable

cuando el volumen de muestra empleado es de 10 mL (66.3 %). Por tanto, se mantendrá este volumen en el método de extracción.

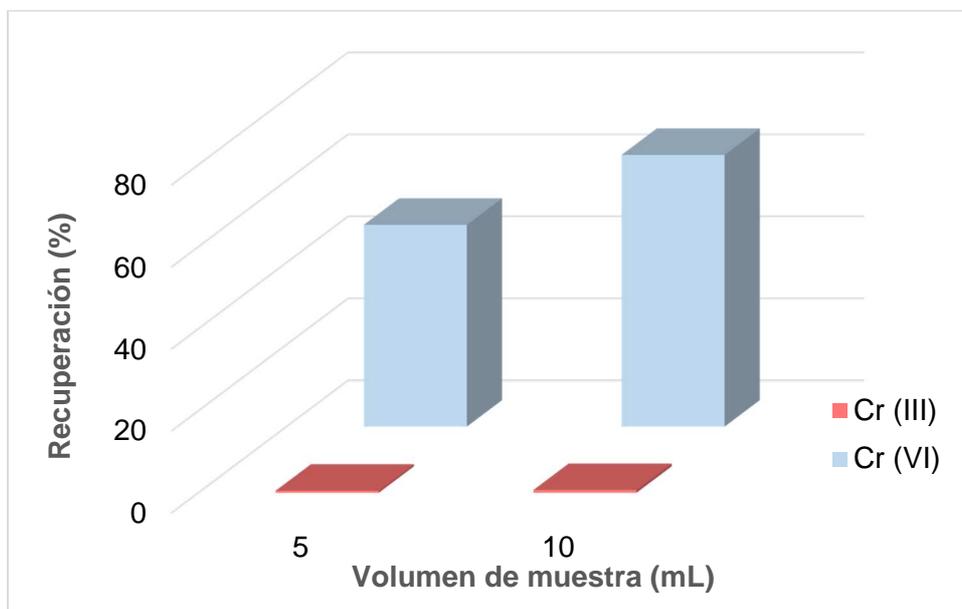


Figura 12. Influencia de la ratio fase orgánica-fase acuosa en la extracción de Cr(VI) y Cr(III)

6.2.7. Condiciones optimizadas del método de extracción

En la **Tabla 6** se recogen las condiciones óptimas finalmente empleadas en el método de microextracción dispersiva líquido-líquido.

Tabla 6. Condiciones optimizadas del método de extracción

Volumen de TBP (agente extractante)	200 μ L
Volumen de HCl	1mL
Cantidad de NaCl	0.3g
Agitación automática (agente dispersante)	10 min a 1200 rpm
Centrifugación	5 min a 3500 rpm

6.3. Validación

6.3.1. Validación del método instrumental

6.3.1.1. Calibrado

Las curvas de calibrado se obtienen a partir de seis disoluciones patrón con unas concentraciones de 0.0, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 y 8.0 µg/L. Cada nivel de concentración se prepara diluyendo el respectivo volumen del patrón de cromo (VI) de 100 µg/L en un volumen constante de 400 µL de HNO₃ al 1% y enrasando hasta 1 mL con agua de calidad Milli-Q. Se realizan 3 inyecciones de 20 µL por cada concentración en las condiciones optimizadas.

En la **Figura 13** se muestra la recta correspondiente al calibrado con los patrones acuosos. Los resultados muestran una buena linealidad en el rango estudiado, con coeficiente de determinación de 0.999.

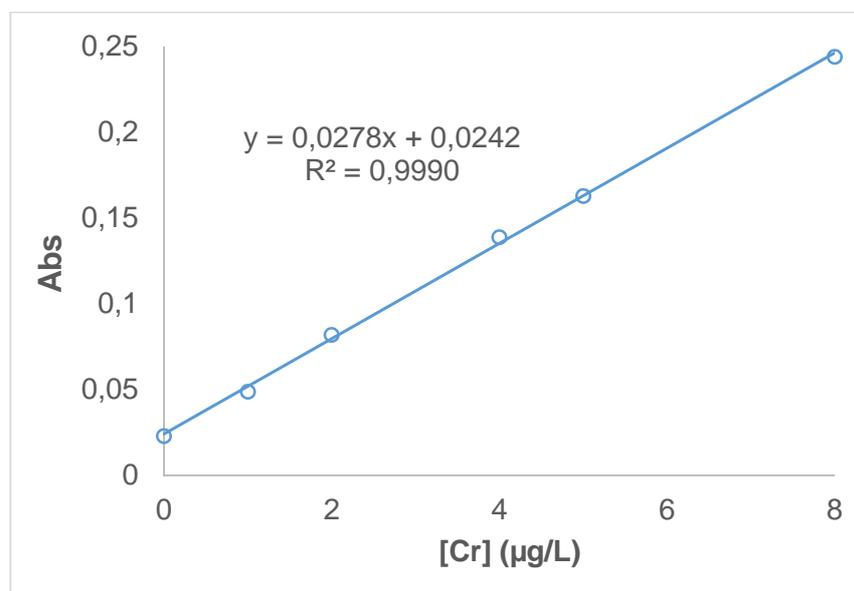


Figura 13. Recta de calibrado con patrones acuosos

6.3.1.2. Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) es la mínima concentración o masa de analito que genera una señal diferente a la de un blanco y el límite de cuantificación (LOQ) es la mínima concentración o masa de analito que genera una señal que puede ser cuantificada de forma fiable.

Sus valores nos indican la sensibilidad de la medida y para su cálculo a partir de los parámetros de la recta de calibrado se emplean las siguientes expresiones, con un nivel de confianza del 95%:

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot S_{y/x}}{b} \quad \text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_{y/x}}{b}$$

Donde,

“ $S_{y/x}$ ” es el error promedio del ajuste de la recta de calibrado

“ b ” es la pendiente de la recta de calibrado

Haciendo uso de las fórmulas descritas anteriormente, el LOD para el cromo (VI) es de 0.35 $\mu\text{g/L}$ y el LOQ 1.06 $\mu\text{g/L}$.

Por otra parte, se han estudiado estos límites analizando 10 blancos y empleando para el cálculo la desviación estándar obtenida en la medida de dichos blancos en lugar de $S_{y/x}$. En este caso, los resultados obtenidos son 0.13 y 0.43 $\mu\text{g/L}$ para el LOD y el LOQ respectivamente.

En ambos casos se obtienen valores muy por debajo de la concentración máxima de 5 $\mu\text{g/L}$ legislada para el nivel de Cr(VI) en aguas superficiales [37].

6.3.1.3. Repetibilidad

La precisión es una medida del error aleatorio y se define como el grado de concordancia entre diferentes medidas realizadas sobre la misma muestra en idénticas condiciones. Se interpreta como la dispersión de los valores experimentales en torno a la media aritmética y típicamente se estima con la desviación relativa estándar (RSD), descrita por la siguiente ecuación:

$$RSD = \frac{SD}{X} * 100$$

Donde,

“SD” es la desviación estándar de las medidas tomadas

“X” es el valor medio de las medidas

Para el método instrumental se ha estudiado la repetibilidad a dos niveles de concentración (0.5 y 5.0 $\mu\text{g/L}$), inyectando 10 réplicas de cada una de las disoluciones patrón de cromo (VI) el mismo día. Los valores obtenidos en el cálculo de la RSD de ambas disoluciones fueron 6.9% y 9,3% para 0.5 y 5 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, pudiendo concluir entonces que se trata de un método instrumental preciso.

6.3.2. Validación del método de extracción

El método de extracción optimizado, si bien es selectivo para el Cr(VI), ha mostrado una baja recuperación al comparar la señal obtenida, tras el procedimiento de extracción, con la que presentan los patrones preparados con fase orgánica (TBP y HNO₃ 0.1M en metanol) y la concentración final que deben tener los extractos.

Para comprobar el efecto que el método de extracción tiene en la señal se preparó un calibrado con patrones en fase orgánica y un calibrado del procedimiento de extracción.

6.3.2.1. Calibrado con patrones preparados con fase orgánica

Se realiza un calibrado preparando seis disoluciones patrón de cromo (VI) con unas concentraciones de 0, 1, 2, 4, 6 y 8 µg/L, todas ellas por duplicado. Para ello se mezcla la cantidad correspondiente del patrón de cromo (VI) de 100 µg/L llevándolo a un volumen de 1 mL empleando para ello la proporción necesaria de TBP y HNO₃ en metanol.

Se realizan 3 inyecciones de 20 µL cada una por cada nivel de concentración en las condiciones espectroscópicas optimizadas. En la **Figura 14** se muestra la recta de calibrado de dichos patrones.

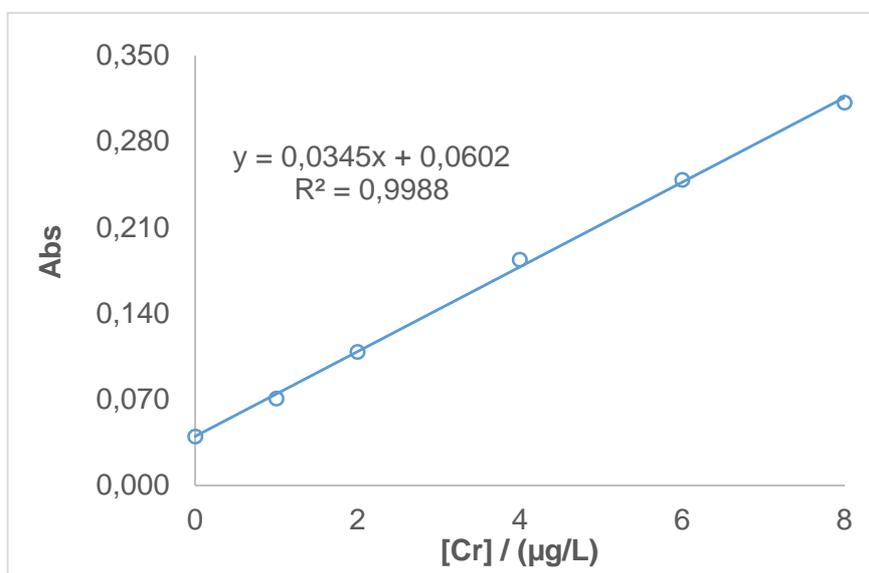


Figura 14. Recta de calibrado con patrones en fase orgánica

6.3.2.2. Calibrado del procedimiento de extracción

Se realiza un calibrado del procedimiento de extracción con patrones en agua Milli-Q. Para ello se preparan cinco disoluciones patrón de cromo (VI) con unas

concentraciones de 0.0, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 µg/L (todas ellas por duplicado), mezclando la respectiva cantidad del patrón de cromo (VI) de 100 µg/L con 1 mL de HCl, 0.3 g de NaCl, 200 µL de TBP y 10 mL de agua Milli-Q.

Se someten a las condiciones de extracción optimizadas y luego se hace una dilución 1:2 de la fase orgánica con HNO₃ 0.1M en metanol.

Para cada nivel de concentración se realizan 3 inyecciones de 20 µL cada una, en las condiciones espectroscópicas optimizadas. En la **Figura 15** se muestra la recta de calibrado de dichos patrones.

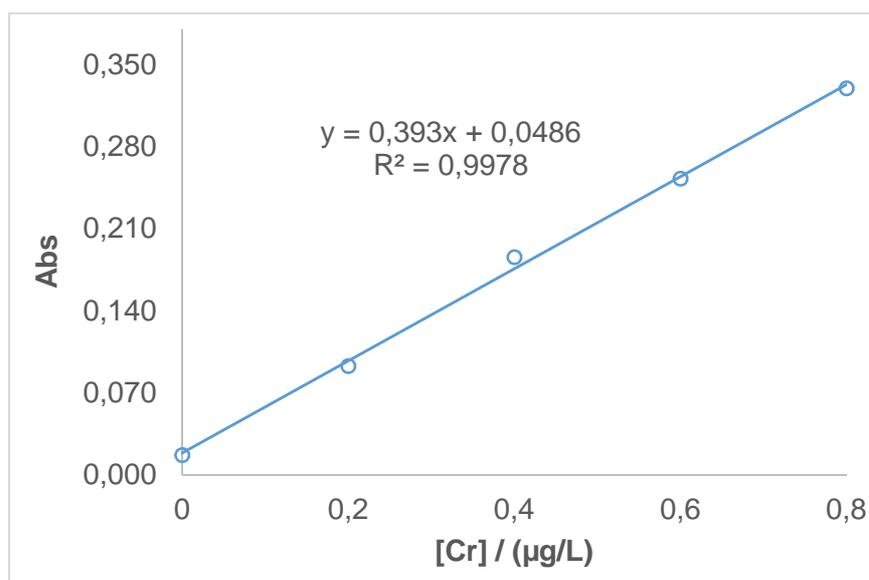


Figura 15. Recta de calibrado del procedimiento de extracción

Para comparar las pendientes del calibrado realizado con patrones acuosos (1), el calibrado realizado con patrones en fase orgánica (2) y el calibrado del procedimiento de extracción (3) se empleó, en primer lugar, el test F de Fischer para comprobar si las varianzas eran o no comparables, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$F_{exp} = \frac{S_y^2(1)}{S_y^2(2)}$$

Los resultados han mostrado que las varianzas del calibrado 1 y 2 son comparables al 99%, siendo también comparables las varianzas del calibrado 2 y 3 pues en ambos casos la $F_{experimental}$ tiene un valor inferior a la $F_{tabulada}$.

Puesto que no hay diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas, para comparar las pendientes el test se realiza calculando la varianza estimada conjunta de las pendientes de las dos rectas de calibrado:

$$S_{\bar{x} pool}^2 = \frac{(n_1 - 2) * S_{\bar{x}(1)}^2 + (n_2 - 2) * S_{\bar{x}(2)}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

y se compara el valor t_{tabulado} (95%) con la t calculada según la siguiente ecuación:

$$t_{exp} = \frac{|b_1 - b_2|}{S_{\bar{x} pool}^2 * \sqrt{\left(\frac{1}{\sum (X_{i,1} - \bar{X}_{i,1})^2} + \frac{1}{\sum (X_{i,2} - \bar{X}_{i,2})^2}\right)}}$$

siendo b_1 , b_2 , $S_{y/x(1)}^2$ y $S_{y/x(2)}^2$ las pendientes y varianzas de las respectivas rectas de calibrado.

Si la $t_{\text{experimental}}$ es menor que la t_{tabulada} al 95%, entonces las pendientes de las rectas estudiadas serán comparables. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Estudio de comparación de pendientes

Recta	Ecuación	R ²	Resultado test
1	Y=0.0278X+0.0242	0.9990	$t_{\text{exp}}=9.04$
2	Y=0.0345X+0.0602	0.9988	$t_{\text{tab}}=2.31$
2	Y=0.0345X+0.0602	0.9988	$t_{\text{exp}}=43.12$
3	Y=0.393X+0.0486	0.9978	$t_{\text{tab}}=2.37$

El estudio se hizo en primer lugar comparando las pendientes de las rectas 1 y 2 y luego las pendientes de las rectas 1 y 3. En ambos casos se concluye que las pendientes no son comparables. Por tanto, para el análisis de las muestras es necesario realizar un calibrado del procedimiento de extracción.

6.3.2.3. Estudio del efecto matriz

Para una adecuada cuantificación del analito, se evaluó el efecto de la matriz de agua de mar. Para ello, se preparó un calibrado empleando agua Milli-Q (10 mL) y otro empleando agua de mar sintética (10 mL). En ambos casos se emplean cinco

disoluciones patrón de cromo (VI) con unas concentraciones de 0,0, 0,2, 0,4, 0,6 y 0,8 $\mu\text{g/L}$ (todas ellas por duplicado). Las disoluciones se someten al procedimiento de extracción optimizado, pero en el caso de las disoluciones preparadas con agua de mar no se les añaden los 0,3 g de NaCl.

Para cada calibrado, los extractos se diluyen 1:2 con HNO_3 0,1M en metanol y se inyectan 10 μL en las condiciones espectroscópicas optimizadas. Los análisis se realizan por triplicado. En las **Figuras 16 y 17** se muestra las rectas obtenidas.

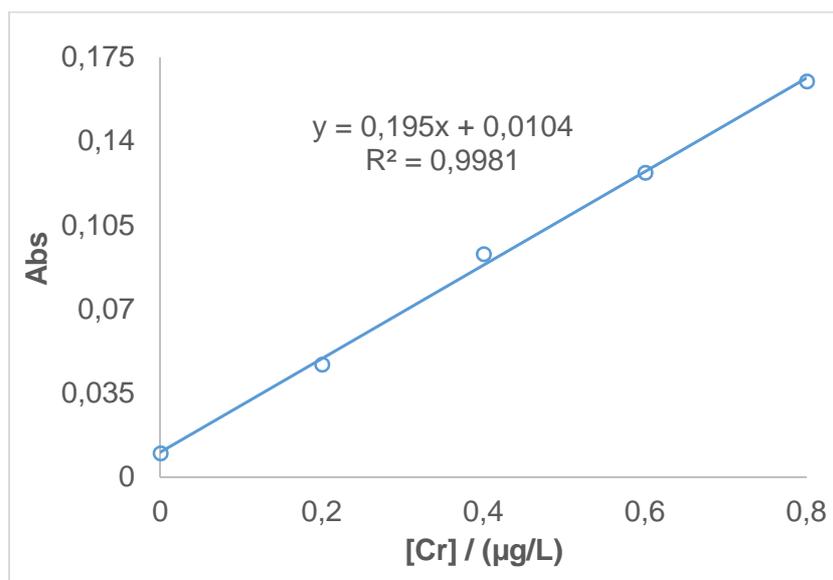


Figura 16. Recta de calibrado del procedimiento de extracción con agua Milli-Q

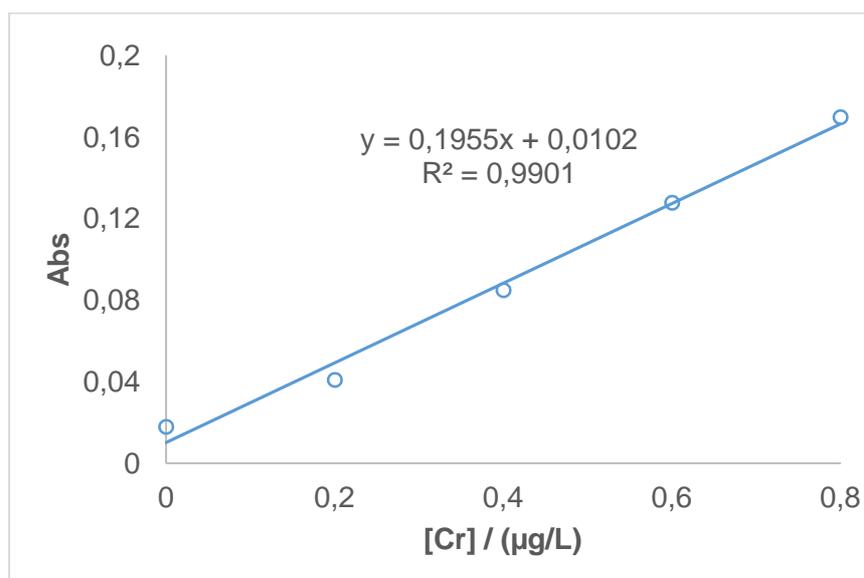


Figura 17. Recta de calibrado del procedimiento de extracción con agua de mar

Se realiza de nuevo un estudio para comparar las pendientes obtenidas cuando se realiza el calibrado del procedimiento de extracción (1) y cuando se emplea muestra de agua de mar (2).

De acuerdo con lo explicado anteriormente, se comprueba que las varianzas de ambas rectas son comparables, pues en ambos casos el valor experimental de la F de Fischer es menor que la F_{tabulada} , trabajando al 99% de precisión. Los resultados obtenidos respecto a la comparación de las pendientes (95%), se recogen en la **Tabla 8**. Como puede observarse la $t_{\text{experimental}}$ tiene un valor inferior a la t_{tabulada} , concluyéndose que son comparables. Por tanto, se puede trabajar empleando el calibrado del procedimiento de extracción de los patrones preparados con agua Milli-Q.

Tabla 8. Comparación de pendientes para el estudio del efecto matriz

Recta	Ecuación	R ²	Resultado test
1	$Y=0.195X+0.0104$	0.9981	$t_{\text{exp}}=0.04$
2	$Y=0.1955X+0.0102$	0.9901	$t_{\text{tab}}=2.45$

6.3.2.4. Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se han calculado a partir de los parámetros de la recta de calibrado del procedimiento de extracción (Figura 16) utilizando las expresiones de la sección 5.3.1.2. Los resultados obtenidos para el LOD y LOQ (0.023 y 0.088 $\mu\text{g/L}$ respectivamente) son muy satisfactorios con valores de LOQ cerca de 60 veces inferiores a la concentración máxima (5 $\mu\text{g/L}$) legislada para el Cr(VI) en aguas superficiales [37].

6.3.2.5. Precisión

El estudio de precisión del método de extracción se evalúa mediante la repetibilidad y la reproducibilidad. La repetibilidad se estudió para un nivel de concentración de cromo (VI) de 0.6 $\mu\text{g/L}$. Para ello, diez alícuotas de 10 mL de agua de mar se sobrecargan cada una de ellas al nivel de concentración y se someten al procedimiento de extracción. Los extractos obtenidos se diluyen y se analizan por triplicado mediante ETA-AAS. El valor obtenido para la desviación relativa estándar (7.4%) es satisfactorio.

La reproducibilidad se estudió a un nivel de concentración de 1 µg/L. Cada día del estudio se emplean tres alícuotas de 10 mL de agua de mar sintética fortificadas y el ensayo se realiza en cuatro días consecutivos. El valor obtenido (9.7%) indica que el método es reproducible.

6.3.2.6. Exactitud

La exactitud se evalúa en término de recuperación, empleando alícuotas de 10 mL de agua de mar fortificada a dos niveles de concentración (0.2 y 0.8 µg/L) que se someten al procedimiento de extracción. Para cada nivel de concentración se prepararon tres réplicas. Para calcular la recuperación se emplean alícuotas de agua de mar (10 mL) que se someten al procedimiento de extracción y, a partir de los extractos obtenidos, se preparan los patrones fortificando a la concentración correspondiente.

Los valores obtenidos para la recuperación del Cr(VI) son superiores al 75% para ambos niveles de concentración, siendo un poco más baja para el menor nivel de concentración ($76.2 \pm 0.03\%$ para 0.2 µg/L) que para el nivel más alto ($97.3 \pm 0.01\%$ para 0.8 µg/L). Estos resultados se pueden considerar satisfactorios en ambos casos.

En las **Figuras 18 y 19** se muestran a modo de ejemplo los picos de absorbancia obtenidos para un patrón preparado con agua de mar sintética al nivel más bajo de sobrecarga y para una muestra real.

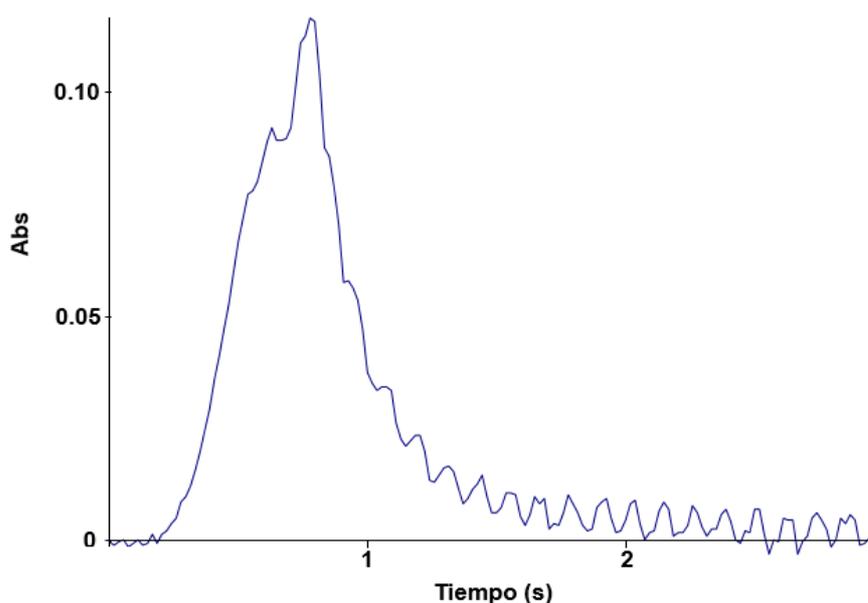


Figura 28. Pico de absorbancia obtenido para un patrón de 0.2 µg/L preparado con agua de mar sintética

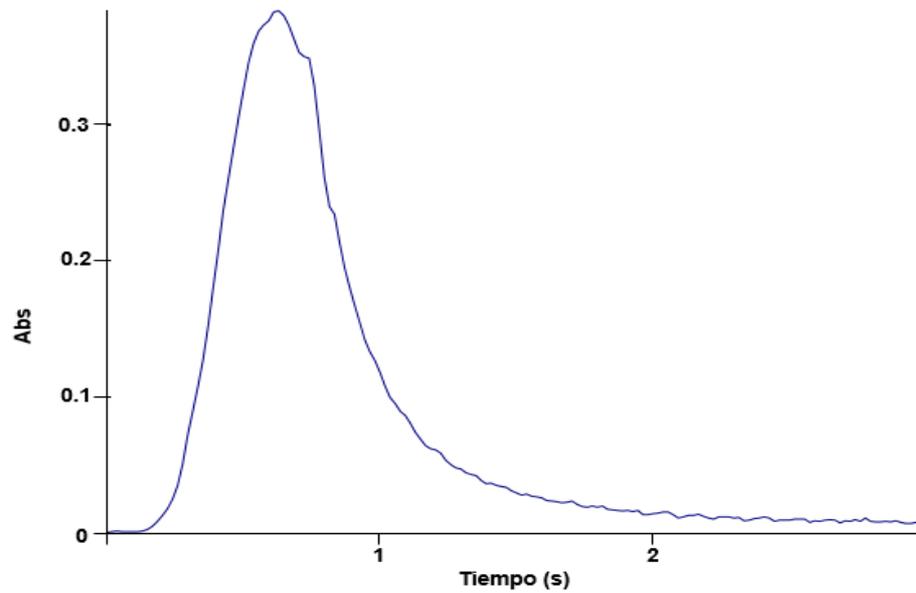


Figura 19. Pico de absorción obtenido para una muestra de agua de mar de la playa de Esteiro (Viveiro)

6.3.2.7. Aplicación a muestras

El método desarrollado se ha aplicado al análisis de Cr(VI) en muestras de agua de mar de dos zonas del norte de Galicia (comarca da Mariña lucense y comarca de A Coruña). Las muestras se recogieron en el mes de julio de 2019 en dos playas de Viveiro (playa de Esteiro y playa de Muiñelo), en la playa de Foz, en la playa de Riazor y el Parrote (A Coruña) y en dos playas de Oleiros (playa de Mera y playa de Santa Cristina), tomándose tres muestras en cada punto de muestreo.

Los resultados obtenidos para las muestras analizadas han mostrado niveles de Cr(VI) por debajo del LOD, excepto la muestra de la playa de Esteiro para la que se obtuvo un valor de concentración de Cr(VI) de $0.78 \pm 0.05 \mu\text{g/L}$.

7. CONCLUSIONES

Se ha optimizado y validado un método para la determinación de Cr(VI) en agua de mar empleando la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y la determinación mediante ETA-AAS.

En este trabajo se ha optimizado tanto el programa de temperaturas empleado para el análisis como el método de extracción. Los resultados obtenidos han mostrado que el Cr(VI) es selectivamente extraído de las muestras de agua de mar en medio clorhídrico empleando un pequeño volumen de TBP (200 μ L) como disolvente de extracción y una etapa de agitación en lugar de agente dispersante.

El método fue validado en términos de linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud. El estudio de las pendientes de calibrado obtenidas empleando patrones acuosos, patrones en fase orgánica y patrones sometidos al procedimiento de extracción mostró que no son comparables. Por tanto, para una adecuada cuantificación del Cr(VI) en las muestras es necesario emplear un calibrado del procedimiento de extracción. Por otra parte, se evaluó el efecto de la matriz del agua de mar comprobándose que no afecta a la extracción del Cr(VI).

La linealidad del calibrado ($R^2 > 0.99$), la repetibilidad (7.4%) y la reproducibilidad (9.7%) estudiadas con agua de mar sintética fueron satisfactorias. En el caso de la exactitud las recuperaciones son adecuadas (76.2 y 97.3% para niveles de concentración de 0.2 y 0.8 μ g/L respectivamente). Se han obtenido muy buenos valores para el LOD (0.023 μ g/L) y el LOQ (0.088 μ g/L), siendo este último aproximadamente 60 veces inferior a la concentración máxima (5 μ g/L) legislada para el Cr(VI) en aguas superficiales.

Por último destacar que el método además de ser simple, rápido y de bajo coste, emplea un volumen muy pequeño de disolvente de extracción de acuerdo a los principios de la Química Verde.

Optimizouse e validouse un método para a determinación de Cr(VI) en auga de mar empregando a microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) e a determinación mediante ETA-AAS.

Neste traballo optimizouse tanto o programa de temperaturas empregado coma o método de extracción. Os resultados obtidos mostraron que o Cr(VI) se extrae selectivamente das mostras de auga de mar en medio clorhídrico empregando un

pequeno volume de TBP (200 μL) como disolvente de extracción e unha etapa de axitación en vez dun axente dispersante.

O método foi validado en termos de linealidade, límites de detección e cuantificación, precisión e exactitude. O estudo das pendentes de calibrado obtidas empregando patróns acuosos, patróns en fase orgánica e patróns sometidos ao procedemento de extracción mostrou que non eran comparables. Polo tanto, para unha axeitada cuantificación do Cr(VI) nas mostras é necesario empregar un calibrado do procedemento de extracción. Por outra parte, avalíouse o efecto matriz da auga de mar comprobándose que non afecta á extracción do Cr(VI).

A linealidade do calibrado ($R^2 > 0.99$), a repetibilidade (7.4%) e a reproducibilidade (9.7%) estudadas con auga de mar sintética foron satisfactorias. No caso da exactitude as recuperacións foron axeitadas (76.2 e 97.3% para niveis de concentración de 0.2 e 0.8 $\mu\text{g/L}$ respectivamente). Obtivéronse bos valores para o LOD (0.023 $\mu\text{g/L}$) e o LOQ (0.088 $\mu\text{g/L}$), sendo este último aproximadamente 60 veces inferior á concentración máxima (5 $\mu\text{g/L}$) lexislada para o Cr(VI) en augas superficiais.

Por último destacar que o método ademais de ser sinxelo, rápido e de baixo custo, emprega un volume moi pequeno de disolvente de extracción de acordo cos principios da Química Verde.

A method for the determination of Cr(VI) in seawater using dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and determination by ETA-AAS has been optimized and validated.

In this work, the graphite furnace program used for the analysis and the parameters of the extraction method have been optimized. The results obtained have shown the selective extraction of Cr(VI) from seawater samples in hydrochloric medium employing a small volume of the extraction solvent (200 μL of TBP). Furthermore, a stirring step instead of a disperser solvent has been used.

The method was validated in terms of linearity, detection and quantification limits, precision and accuracy. The study of the calibration slopes obtained using aqueous standards, organic phase standards and standards submitted to the extraction procedure has revealed that slopes are not comparable. Therefore, the use of a calibration obtained with standard solutions submitted to the extraction procedure is necessary to achieve an adequate quantification of Cr(VI) in the samples. Moreover, the evaluation of seawater matrix effect showed that it does not affect to the Cr(VI) extraction.

The linearity of the calibration curve ($R^2 > 0.99$), the repeatability (7.4%) and the reproducibility (9.7%) studied using synthetic seawater were satisfactory. Regarding accuracy, recoveries were adequate (76.2 and 97.3% for concentration levels of 0.2 and 0.8 $\mu\text{g/L}$ respectively). The values obtained for LOD (0.023 $\mu\text{g/L}$) and LOQ (0.088 $\mu\text{g/L}$) were very good, being the LOQ approximately 60 times lower than the maximum level (5 $\mu\text{g/L}$) established by the legislation for Cr(VI) in surface water.

Finally, it is worthy to note that in addition to being simple, fast and low cost, the method employs a very small volume of the extraction solvent according to the principles of Green Chemistry.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] *Propiedades químicas del cromo. Efectos del cromo sobre la salud. Efectos ambientales del cromo*; Lenntech BV: Delfgauw, Países Bajos. <https://www.lenntech.es/periodica/elementos/cr.htm> (acceso 25 de septiembre de 2019).
- [2] Bolívar, G. *Cromo: propiedades, características y usos*. Lifeder.com. <https://www.lifeder.com/cromo/> (acceso 25 de septiembre 25 de 2019).
- [3] Callón Álvarez, J. *Cromo*. Elementos: elementos de la tabla periódica y sus propiedades. <https://elementos.org.es/cromo> (acceso 25 de septiembre de 2019).
- [4] *Fichas Internacionales de Seguridad Química*; Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (España). <https://www.insst.es/fisq> (acceso 25 de septiembre 25 de 2019).
- [5] Housecroft, C.E.; Sharpe, A.G. *Química Inorgánica*; Pearson Prentice Hall: Madrid, 2006.
- [6] Katz, S.A.; Salem, H. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.* **1993**, *13* (3), 217-224.
- [7] Venugopal, B.; Luckey, T.D. Chemical toxicity of metals and metalloids. En: *Metal toxicity in mammals*; Plenum Press: New York, 1978; Vol. 2.
- [8] López-García, I.; Briceño, M.; Vicente-Martínez, Y.; Hernández-Córdoba, M. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the speciation of traces of chromium using electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* **2013**, *115*, 166-171.
- [9] Shahid, M.; Shamshad, S.; Rafiq, M.; Khalid, S.; Bibi, I.; Niazi, N.K.; Dumat, C.; Rashid, M.I. Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: a review. *Chemosphere: Global Change Sci.* **2017**, *178*, 513-533.
- [10] Larios Bayona, M. Niveles de Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en los suelos de ribera de la Cuenca del río Turia. Trabajo de fin de máster [en línea], Universitat de Lleida, España, 2014. <https://digital.csic.es/bitstream/10261/141280/1/Tesis-Larios.pdf> (acceso 28 de septiembre de 2019).
- [11] *Biological and Environmental aspects of chromium*; Langgård, S., Ed.; Elsevier Biomedical Press: Amsterdam, 1982.
- [12] Norberg, G. Metales: propiedades químicas y toxicidad. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*, 4ª ed.; Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales: Madrid, 2012; Vol. 2, cap. 63, pp 1-76.

<https://www.insst.es/documents/94886/162520/Cap%C3%ADtulo+63.+Metales+propiedades+qu%C3%ADmicas+y+toxicidad> (acceso 1 de octubre de 2019).

[13] Bernhard, M.; Brinckman, F.E.; Sadler, P.J. Eds. *The importance of chemical "speciation" in environmental processes*. Dahlem workshop reports: Life sciences research report 33; Springer-Verlag: Berlín, 1986.

[14] Chester, R. Trace elements in the oceans, En: *Marine Geochemistry*; Springer: Dordrecht, 1990, pp 346-421. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-010-9488-7_11 (acceso 5 de noviembre de 2019).

[15] Kulek de Andrade, J.; Kulek de Andrade, C.; Felsner, M.L.; Egéa dos Anjos, V. Ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for the chromium speciation in water samples, *Talanta* **2019**, *191*, 94-102.

[16] Dos Santos, J.M.; Quináia, S.P.; Felsner, M.L. Fast and direct analysis of Cr, Cd and Pb in brown sugar by GF AAS. *Food Chem.* **2018**, *260*, 19-26.

[17] Sobhi, H.R.; Azadikhah, E.; Behbahani, M.; Esrafilí, A.; Ghambarian, M. Application of a surfactant-assisted dispersive liquid-liquid microextraction method along with central composite design for micro-volume based spectrophotometric determination of low level of Cr(VI) ions in aquatic samples. *Spectrochim. Acta Part A* **2018**, *202* (5), 36-40.

[18] Zhang, J.; Guo, W.; Guo, Q.; Jin, L.; Liu, Z.; Hu, S. On-site separation of Cr(VI) and Cr(III) in natural waters by parallel cartridge ion-exchange columns. *Royal Society of Chemistry Adv.* **2017**, *7* (80), 50657-50662.

[19] Richard, F.C.; Bourg, A.C.M.; Aqueous geochemistry of chromium: a review. *Water Res.* **1991**, *25* (7), 807-816.

[20] Preuss H.G., Anderson, R.A. Chromium update: examining recent literature 1997-1998. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **1998**, *1*(6), 509-512.

[21] Oregon State University. Linus Pauling Institute: Centro de Información de Micronutrientes. Minerales: Cromo. <https://lpi.oregonstate.edu/es/mic/minerales/cromo> (acceso 18 de noviembre de 2019).

[22] Reglamento (UE) 301/2014 de la Comisión Europea, de 25 de marzo de 2014, por el que se modifica, en lo que respecta a los compuestos de cromo VI, el anexo XVII del Reglamento (CE) 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH). *DOUE-L-90*, 1-3, de 26 de marzo de 2014.

[23] Directiva (UE) 2018/725 de la Comisión de 16 de mayo de 2018 por la que se modifica, para adaptarlo al progreso técnico y científico, el punto 13 de la parte III del anexo II de la Directiva 2009/48/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, relativa a la

seguridad de los juguetes, en lo que respecta al cromo VI. *DOUE-L-122*, 29-31, de 17 de mayo de 2018.

[24] Reglamento (UE) 119/2014 de la Comisión de 7 de febrero de 2014 por el que se modifica la Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, en lo que se refiere a la levadura enriquecida con cromo utilizada en la fabricación de complementos alimenticios y el lactato de cromo (III) trihidrato añadido a los alimentos. *DOUE- L-39*, 44-45, de 8 de febrero de 2014.

[25] Ministry of Health of People's Republic of China. *Standards for drinking water quality* (GB 5749-2006); Beijing, 2006. <http://tradechina.dairyaustralia.com.au/wp-content/uploads/2018/08/GB-5749-2006-Standards-for-Drinking-Water-Quality.pdf> (acceso 10 de noviembre de 2019).

[26] World Health Organization. *Guidelines for drinking-water quality*, 4th ed. WHO Press: Geneva, 2011. http://www.iasaude.pt/attachments/article/660/WHO_Guidelines%20for%20drinking-water%20quality.pdf (acceso 15 de noviembre de 2019).

[27] Jin, Y.; Xueli, E.; Chen, C.; Chen, X.; Zhang, L.; Chen, Y.; Cai, Z.; Gan, R.; Shentu, H.; Guo, C.; Wei, J.; Ning, R.; Liu, W.; Hu, L. *Standards for drinking water quality* (2006), 1-13

[28] Departamento de Salud y Servicios humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades. División de Toxicología y Ciencias de la salud. *Resumen de salud pública: Cromo* [en línea]; ATSDR: Atlanta, 2012. https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs7.pdf (acceso 28 de septiembre de 2019).

[29] Organización Mundial de la Salud. Hojas de información sobre sustancias químicas. En: *Guías para la calidad de agua potable* [en línea]: *recomendaciones*, 3^a ed.; OMS: Ginebra, Suiza, 2006; Vol.1. pp 243-363. https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_12.pdf?ua=1 (acceso 15 de noviembre de 2019).

[30] Pérez-Bendito, D.; Rubio, S. *Environmental analytical chemistry*; Elsevier Science: Amsterdam, 1999. Vol. 32.

[31] El-Shahawi, M.S.; Al-Saidi, H.M. Dispersive liquid-liquid microextraction for chemical speciation and determination of ultra-trace concentrations of metal ions. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2013**, 44, 12-24.

[32] Porto, D.; Akiba, N.; Oliveira, M.A.L. de; Gaubeur, I. Speciation of chromium in water samples after dispersive liquid-liquid microextraction, and detection by means of

- high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* **2017**, 28 (2), 266-276.
- [33] Ebdon, L.; Evans, E.H.; Fisher, A.; Hill, S.J. *An introduction to analytical atomic spectrometry*; John Wiley & Sons: Chichester, England, 1998.
- [34] Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, J.F.; Crouch, S. R. *Fundamentos de química analítica*, 8ª ed.; Paraninfo: Madrid, 2004.
- [35] Harris, D. C. *Análisis químico cuantitativo*, 3ª ed.; Reverté: Barcelona, 2007.
- [36] Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. *BOE* 45, 7228-7245, de 21 de febrero de 2003.
- [37] Real Decreto 817/2015, de 11 de septiembre, por el que se establecen los criterios de seguimiento y evaluación del estado de las aguas superficiales y las normas de calidad ambiental *BOE* 219, 80582-80677, de 12 de septiembre de 2015.
- [38] Dokpikul, N.; Chaiyasith, W.C.; Sananmuang, R.; Ampiah-Bonney, R.J. Surfactant-assisted emulsification dispersive liquid-liquid microextraction using 2-thenoyltrifluoroacetone as a chelating agent coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry for the speciation of chromium in water and rice samples. *Food Chem.* **2018**, 246, 379-385.
- [39] Gaubeur, I.; Aguirre, M.A.; Kovachev, N.; Hidalgo, M.; Canals, A. Speciation of chromium by dispersive liquid-liquid microextraction followed by laser-induced breakdown spectrometry detection (DLLME-LIBS). *J. Anal. At. Spectrom.* **2015**, 30, 2541-2547.
- [40] Vidal, L.; Silva, S.G.; Canals, A.; Nóbrega, J.A. Tungsten coil atomic emission spectrometry combined with dispersive liquid-liquid microextraction: a synergistic association for chromium determination in water samples. *Talanta* **2016**, 148, 602-608.
- [41] Chen, H.; Du, P.; Chen, J.; Hu, S.; Li, S.; Liu, H. Separation and preconcentration system based on ultrasonic probe-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for determination trace amount of chromium(VI) by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta* **2010**, 81(1-2), 176-179.
- [42] Bahadir, Z.; Bulut, V.N.; Hidalgo, M.; Soylak, M.; Marguá, E. Cr speciation in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B* **2016**, 115, 46-51.
- [43] Majidi, B.; Shemirani, F. Salt-assisted liquid-liquid microextraction of Cr(VI) ion using an ionic liquid for preconcentration prior to its determination by flame atomic absorption spectrometry. *Microchim. Acta* **2012**, 176, 143-151.
- [44] Ezoddin, M.; Abdi, K.; Esmaeili, N. Ultrasound enhanced air-assisted surfactant liquid-liquid microextraction based on the solidification of an organic droplet for the

determination of chromium in water, air and biological samples. *Microchem. J.* **2016**, 129, 200-204.

[45] López-García, I.; Vicente-Martínez, Y.; Hernández-Córdoba, M. Determination of very low amounts of chromium (iii) and (vi) using dispersive liquid–liquid microextraction by in situ formation of an ionic liquid followed by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, 27, 874-880.

[46] Rezaee, M.; Yamini, Y.; Faraji, M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217(16), 2342-2357.

[47] Sepúlveda Bustos, E.S.; Zazueta Ranahan, F. Tensión superficial: material tensioactivo. University of Florida. Center for Instructional Technology and Training. <http://fsz.ifas.ufl.edu/surfacetensionandcapillarity/html/tensioactivos.htm> (acceso 28 de octubre de 2019)

[48] Vik, E.A.; Breedveld, G.; Farestveit, T. *Guidelines for the risk assessment of contaminated sites*; SFT report: TA-1691-1999; Norwegian Pollution Control Authority: Oslo, 1999.

[49] Finnecey, K.; Pearce, I. Land contamination and reclamation. En: *Understanding of our environment*; Hester, R.F. Ed.; Royal Society of Chemistry: London, 1986, vol. 172, pp 329-337.

[50] Ding, C.; Li, X.; Zhang, T.; Ma, Y.; Wang, X. Phytotoxicity and accumulation of chromium in carrot plants and the derivation of soil thresholds for Chinese soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2014**, 108, 179-186.

[51] Kabata–Pendias, A.; Pendias, H. *Trace elements in soils and plants*, 3rd ed.; CRC Press: Boca Raton, Florida, 2001.

[52] Acosta, Y.; El Zauahre, M.; Reyes, N.; García, H.; Morales, C.; Revilla, A. Metales pesados en un suelo afectado con aceite proveniente de motores de combustión interna. *Multiciencias* **2011**, 11(1), 26-34.

[53] Marmo, L. *Heavy metals in the context of EU policies on soil and waste*. European Commission, DG Environment, 2003.

[54] *Los criterios y estándares para declarar un suelo contaminado en Andalucía y la metodología y técnicas de toma de muestra y análisis para su investigación*. Junta de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente, 1999. <http://www.ugr.es/~fjmartin/Criterios%20y%20estandares.pdf> (acceso 22 de noviembre de 2019).

[55] Macías-Vázquez, F.; Calvo de Anta, R. *Niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza en suelos de Galicia*. Xunta de Galicia: Santiago de Compostela, 2009.

- [56] Orden 2770/2006, de 11 de agosto, del Consejero de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, por la que se procede al establecimiento de niveles genéricos de referencia de metales pesados y otros elementos traza en suelos contaminados de la Comunidad de Madrid. *BOCM* 204, 29 (3106), de 28 de agosto de 2006.
- [57] *Niveles genéricos de referencia (NGR)*; Gobierno de La Rioja, 2016. <https://www.larioja.org/medio-ambiente/es/residuos/suelo/actividades-potencialmente-contaminantes-suelo-apcs/niveles-genericos-referencia/niveles-genericos-referencia-ngr> (acceso 15 de octubre de 2019).
- [58] IHOBE, S.A. *Investigación de la contaminación del suelo. Calidad del suelo: valores indicativos de evaluación (VIE-A, VIE-B, VIE-C)*. Gobierno Vasco. Departamento de Ordenación del Territorio, Vivienda y Medio Ambiente: Bilbao, 1998; Vol. 8. https://www.euskadi.eus/contenidos/documentacion/investigacion_cont_suelo/es_doc/adjuntos/08.pdf (acceso 15 de octubre de 2019).
- [59] Ahmad, W.; Bashammakh A.S.; Al-Sibaai A.A.; Alwael H.; El-Shahawi M.S. Trace determination of Cr(III) and Cr(VI) species in water samples via dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume UV–Vis spectrometry. Thermodynamics, speciation study. *J. Mol. Liq.* **2016**, 224 (part B), 1242-1248.
- [60] Sadeghi, S.; Moghaddam, A.Z. Multiple response optimization of sequential speciation of chromium in water samples by in situ solvent formation dispersive liquid–liquid microextraction prior to electrothermal atomic absorption spectrometry determination (2016), *J. Iran. Chem. Soc.* **2016**, 13, 117-130.
- [61] Ley 1/2005, de 4 de febrero, para la prevención y corrección de la contaminación del suelo. *BOE* 274, 117142-117172, de 14 de noviembre de 2011.
- [62] Sierra Aragón, M. Niveles de metales pesados y elementos asociados en suelos de la provincia de Almería. Parámetros que los afectan y riesgos de contaminación. Tesis doctoral [en línea], Universidad de Granada, Granada, 2005. <https://hera.ugr.es/tesisugr/15344836.pdf> (acceso 20 de noviembre de 2019).
- [63] Ouejhani, A.; Dachraoui, M.; Lalleve, G.; Fauvarque, J.F. Hexavalent chromium recovery by liquid-liquid extraction with tributylphosphate from acidic chloride media. *Anal. Sci.* **2003**, 19, 1499-1504.